



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년06월03일  
(11) 등록번호 10-2259085  
(24) 등록일자 2021년05월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 47/68 (2017.01) A61K 38/20 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/54 (2006.01)  
C07K 14/78 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
A61K 47/6813 (2017.08)  
A61K 38/208 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7025138
- (22) 출원일자(국제) 2019년02월08일  
심사청구일자 2020년09월03일
- (85) 번역문제출일자 2020년08월31일
- (65) 공개번호 10-2020-0109380
- (43) 공개일자 2020년09월22일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2019/053136
- (87) 국제공개번호 WO 2019/154986  
국제공개일자 2019년08월15일
- (30) 우선권주장  
18156141.6 2018년02월09일  
유럽특허청(EPO)(EP)  
18179313.4 2018년06월22일  
유럽특허청(EPO)(EP)
- (56) 선행기술조사문헌  
WO2013014149 A1  
WO2006119897 A2  
WO2011020783 A2

- (73) 특허권자  
필로젠 에스.피.에이.  
이탈리아 아이-53100 시에나 라 리짜 7
- (72) 발명자  
빌라, 알레산드라  
스위스 오텔핀겐 8112 리베른스트라쎄 3 필로켄  
아게 내  
마타씨, 마띠아  
스위스 오텔핀겐 8112 리베른스트라쎄 3 필로켄  
아게 내  
온가로, 티치아노  
스위스 오텔핀겐 8112 리베른스트라쎄 3 필로켄  
아게 내
- (74) 대리인  
인비전 특허법인

전체 청구항 수 : 총 3 항

심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 EDB 표적화 IL-12 조성물

(57) 요약

본 발명은 제 1 및 제 2 서브유닛을 갖는 IL-12 단백질, EDB-결합 도메인, 및 상기 IL-12 단백질과 상기 EDB-결합 도메인 사이의 링커를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

*A61K 47/6843* (2017.08)  
*A61K 47/6851* (2017.08)  
*A61K 47/6889* (2017.08)  
*A61P 35/00* (2018.01)  
*C07K 14/5434* (2013.01)  
*C07K 14/78* (2013.01)  
*C07K 16/18* (2013.01)  
*C07K 2319/00* (2013.01)  
*C07K 2319/33* (2013.01)

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

단백질에 있어서,

- a. 제 1 IL-12 서브유닛 및 제 2 IL-12 단백질 서브유닛을 포함하는 인간 IL-12 단백질;
- b. EDB 결합도메인을 포함하는 단백질; 및
- c. 상기 IL-12 단백질과 상기 EDB 결합 도메인을 포함하는 단백질 사이의 링커를 포함하며, 상기 단백질은,
  - 제 1 링커에 의해 p35 도메인에 연결된 p40 도메인;
  - SAD 링커에 의해 상기 p35 도메인에 연결된 제 1 L19 VH 도메인;
  - 제 3 링커에 의해 상기 제 1 L19 VH 도메인에 연결된 제 1 L19 VL 도메인;
  - 제 4 링커에 의해 상기 제 1 L19 VL 도메인에 연결된 제 2 L19 VH 도메인; 및
  - 제 5 링커에 의해 상기 제 2 L19 VH 도메인에 연결된 제 2 L19 VL 도메인을 포함하며, 상기 단백질은 서열 번호 16에 따른 전장 서열을 가지는 단백질.

**청구항 2**

신생물 질환(neoplastic disease)의 발생이

- ● 진단되거나,
- ● 이로 인해 고통받고 있거나, 또는
- ● 이의 위험이 있는

인간 또는 동물 대상체의 치료를 위한 약제학적 조성물에 있어서,

상기 신생물 질환(neoplastic disease)은 악성 흑색종, 비소세포 폐암(non-small cell lung cancer; NSCLC), 신장 세포 암종, 요로상피 암종(urothelial carcinoma), 두경부 편평 세포 암종(head and neck squamous cell carcinoma; HNSCC), 고빈도-현미부수체 불안정성(microsatellite instability-high; MSI-H) 또는 불일치 복구 결핍 전이성 대장암(mismatch repair deficient (dMMR) metastatic colorectal cancer), 간세포암, 위암, 피부 편평 세포 암종(squamous cell carcinoma of the skin), 자궁 경부암(cervical cancer) 및 미만성 거대 B 세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma; DLBCL)으로 이루어진 군에서 선택되며,

유효성분으로 제1항에 따른 단백질을 포함하는 약제학적 조성물.

**청구항 3**

- a) 제 1 항에 따른 단백질 또는 제 2 항에 따른 약제학적 조성물,
  - b) 상기 단백질 또는 상기 약제학적 조성물을 투여하기 위한 장치, 및
  - c) 사용 지침
- 을 포함하는 부분으로 이루어진 치료 키트.

**청구항 4**

삭제

**청구항 5**

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

- 청구항 22
- 삭제
- 청구항 23
- 삭제
- 청구항 24
- 삭제
- 청구항 25
- 삭제
- 청구항 26
- 삭제
- 청구항 27
- 삭제
- 청구항 28
- 삭제
- 청구항 29
- 삭제
- 청구항 30
- 삭제
- 청구항 31
- 삭제
- 청구항 32
- 삭제
- 청구항 33
- 삭제
- 청구항 34
- 삭제
- 청구항 35
- 삭제
- 청구항 36
- 삭제
- 청구항 37
- 삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

### 배경 기술

- [0001] [0001] 본 출원은 사이토카인, 항원 결합 도메인 및 개선된 링커를 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- [0002] [0002] IL-12 는 2 개의 이황화 결합 서브유닛인 p35 와 p40를 포함하는 이종 이량체(heterodimeric) 사이토카인이다. IL-12는 T-세포 및 자연 살해 세포로부터 IFN $\gamma$ 의 생성을 자극하고, 또한 Th1 헬퍼 세포의 분화를 유도한다. IL-12는 항암 및 항-전이 활성화에 대한 가능성(potential)을 갖는 선천성(innate) 및 세포-매개 면역의 주요 매개체이다.
- [0003] [0003] 그러나, 다른 많은 사이토카인과 같이, IL-12의 투여는 1 kg 당 1  $\mu$ g 의 낮은 용량에서도 심각한 독성과 관련이 있어서 (Car et al., 1999) 항암제로서의 개발에 제약이 되고 있다.
- [0004] [0004] 본 발명은 무엇보다도 EDB 피브로넥틴의 발현과 관련된 다양한 질병 및 장애를 효과적으로 치료하는데 사용될 수 있는 개선된 조성물 및 방법을 제공한다.
- [0005] [0005] 특히, 본 발명은 공지된 제조법 IL-12 작체물들보다 바람직한 치료 특성을 갖는 IL-12 가 연결된 EDB 결합 도메인들을 제공한다. 본원에 기재된 조성물들은 놀랍게도 EDB를 표적으로 하도록 디자인된 이미 공지된 IL-12 작체물들보다 우수하며, 예를 들어 암과 같은 질병 또는 장애의 표적화된 치료를 위해 IL-12를 안전하고 효과적으로 투여하는 데 있어서의 오랜 문제점을 해결한다. 본원에 기재된 조성물들 및 방법들은 질병 부위에 도달하는 데 있어서 IL-12에 대하여 하나 이상의 이의 생체 분포 프로파일(biodistribution profile), 이의 내

약성, 이의 치료 범위(therapeutic window), 및 이의 효능을 향상시킴으로써 IL-12의 개선된 치료 가능성을 제공한다. 본원에 기재된 작체물들은 또한 놀랍게도 우수한 제조성(manufacturability)을 보여준다.

- [0006] [0006] 면역사이토카인 치료의 조직 침투에 대해서 당업계에서는 이의 개선이 요구되고 있다. 면역사이토카인은 생산이 어려운 고도로 복잡한 단백질이므로 면역 사이토카인 치료 또한 이의 개선된 제조가 당업계에서 요구되고 있다.
- [0007] [0007] 따라서, 본 발명의 하나의 목적은 개선된 버전의 면역 사이토카인(예; IL-12 및 EDB 피브로넥틴 결합 도메인을 포함하는 단백질 치료제)을 제공하는 것이다. 본 발명의 다른 목적은 보다 효율적인 생산을 나타내는 면역사이토 카인을 제공하는 것이다. 본 발명의 또 다른 목적은 개선된 생체 내 성능(예; 표적 결합 또는 조직 침투)을 갖는 면역사이토 카인을 제공하는 것이다.
- [0008] [0008] 본 발명은 항원-결합 도메인 및 상기 우수한 특성들을 갖는 사이토카인을 포함하는 조성물들을 제공한다. 적절한 링커를 포함한 본 발명의 특징들 및 이들 특징의 일반적인 장점은 하기에 상세히 기재한다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

**과제의 해결 수단**

- [0009] [0009] 본 발명의 일 측면에 따르면,
- [0010] a. 제 1 IL-12 서브유닛 및 제 2 IL-12 단백질 서브유닛을 포함하는 IL-12 단백질;
- [0011] b. EDB 결합 도메인을 포함하는 펩티드 또는 단백질; 및
- [0012] c. 상기 IL-12 단백질과 상기 EDB 결합 도메인을 포함하는 펩티드 또는 단백질 사이의 링커
- [0013] 를 포함하는 조성물이 제공된다..
- [0014] [0010] 바람직하게는, 상기 IL-12의 2 개의 서브유닛은 하기 Scheme (N->C 향)에 따라 주어진 링커에 의해 서로 연결된다: p40-링커 1-p35.
- [0015] [0011] 바람직하게는 IL-12는 인간 IL-12이다. 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 단일 사슬 디아바디(diabody)는 피브로넥틴의 스플라이스 이소형(splice isoform)에 결합한다. 바람직하게는, 상기 피브로넥틴의 엑스트라 도메인 B(ED-B)는 인간 피브로넥틴의 엑스트라-도메인 B (UniProt: P02751)이다.
- [0016] [0012] 일부 구체예에서, 상기 IL-12 단백질과 상기 EDB 결합 도메인을 포함하는 상기 펩티드 또는 단백질 사이의 링커는 GSADGGSSAGGSDAG (서열번호 4)를 포함한다.
- [0017] [0013] 일부 구체예에서, 상기 EDB 결합 도메인을 포함하는 상기 펩티드 또는 단백질은 scFv 를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 EDB 결합 도메인을 포함하는 상기 펩티드 또는 단백질은 디아바디(diabody)이다. 일부 구체예에서, 상기 EDB 결합 도메인을 포함하는 상기 펩티드 또는 단백질은 단일 사슬 디아바디이다.
- [0018] [0014] 일부 구체예에서, 상기 IL-12 단백질의 상기 제 1 서브유닛은 p40 이고 상기 제 2 서브유닛은 p35 이다.
- [0019] [0015] 일부 구체예에서, 상기 IL-12 단백질의 상기 제 1 서브유닛은 서열번호 1 에 기재된 아미노산 서열 또는 이의 단편과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 p40 이고, 여기서 상기 IL-12 단백질은 IL-12 수용체를 활성화시킬 수 있다.
- [0020] [0016] 일부 구체예에서, 상기 IL-12 단백질의 상기 제 2 서브유닛은 서열번호 3 에 기재된 아미노산 서열 또는 이의 단편과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 p35 이고, 여기서 상기 IL-12 단백질은 IL-12 수용체를 활성화시킬 수 있다.

- [0021] [0017] 일부 구체예에서, 상기 EDB 결합 도메인을 포함하는 펩티드 또는 단백질은 단일 특이적(monospecific) 이거나 이중 특이적(bispecific)이다.
- [0022] [0018] 일부 구체예에서, 상기 EDB 결합 도메인을 포함하는 펩티드 또는 단백질은 상기 피브로넥틴의 엑스트라-도메인 B (extra-domain B; ED-B)에 결합한다.
- [0023] [0019] 일부 구체예에서, 상기 EDB 결합 도메인을 포함하는 펩티드 또는 단백질은 서열번호 28 내지 33 에 기재된 아미노산 서열 중 하나 이상과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0024] [0020] 일부 구체예에서, 상기 EDB 결합 도메인을 포함하는 펩티드 또는 단백질은 서열번호 28 내지 33 의 아미노산 서열의 각각을 포함한다.
- [0025] [0021] 일부 구체예에서, 상기 EDB 결합 도메인을 포함하는 펩티드 또는 단백질은 서열번호 7 과 서열번호 5 에 기재된 아미노산 서열 중 하나 이상과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0026] [0022] 일부 구체예에서, 상기 EDB 결합 도메인을 포함하는 펩티드 또는 단백질은 서열번호 7 과 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열의 각각을 포함한다.
- [0027] [0023] 일부 구체예에서, 상기 EDB 결합 도메인을 포함하는 펩티드 또는 단백질은,
- [0028] 상기 EDB 결합 도메인을 포함하는 펩티드 또는 단백질은,
- [0029] 상기 피브로넥틴의 엑스트라 도메인 B (ED-B)에 결합하는 능력을 유지하면서
- [0030] a) 상기 도메인 중 적어도 하나가 서열 번호 7 또는 서열 번호 5에 대해 각각 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 조건 하에서 상기 기재에 따른 서열 쌍(sequence pair) 및/또는
- [0031] b) 상기 도메인 중 적어도 하나가 각각 서열 번호 7 또는 서열 번호 5에 대해 최대 10 개의 아미노산 치환을 갖는 조건 하에서 상기 기재에 따른 서열쌍
- [0032] 중 적어도 하나를 포함한다.
- [0033] [0024] 일부 구체예에서, 상기 펩티드 또는 단백질은 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하며, 여기서 상기 적어도 하나의 아미노산 치환은 보존적 아미노산 치환이다.
- [0034] [0025] 일부 구체예에서, EDB 결합 도메인을 포함하는 펩티드 또는 단백질은,
- [0035] · ● 상기에 기재한 EDB 결합 도메인을 포함하는 펩티드들 또는 단백질들 중 하나와 비교하여, 상기 피브로넥틴의 엑스트라-도메인 B (ED-B)에 대해 50% 이상의 표적 결합 친화도를 가지고, 및/또는
- [0036] · ● 상기에 기재한 EDB 결합 도메인을 포함하는 펩티드들 또는 단백질들 중 하나와 상기 피브로넥틴의 엑스트라-도메인 B (ED-B)에 결합하기 위해 경쟁한다.
- [0037] [0026] 일부 구체예에서, 상기 EDB 결합 도메인을 포함하는 펩티드 또는 단백질은 2 개의 L19 VH 도메인 및 2 개의 L19 VL 도메인을 포함한다.
- [0038] [0027] 일부 구체예에서, 상기 2 개의 L19 VH 도메인은 동일한 아미노산 서열을 가지거나;
- [0039] · ● 상기 2 개의 L19 VH 도메인은 다른 아미노산 서열을 가지며;
- [0040] · ● 상기 2 개의 L19 VL 도메인은 동일한 아미노산 서열을 갖거나; 또는
- [0041] · ● 상기 2 개의 L19 VL 도메인은 다른 아미노산 서열을 갖는다.
- [0042] [0028] 일부 구체예에서, 상기 EDB 결합 도메인을 포함하는 펩티드 또는 단백질은 1 개의 L19 VH 도메인 및 1 개의 L19 VL 도메인을 포함한다.
- [0043] [0029] 일부 구체예에서, 상기 조성물은:
- [0044] · ● 제 1 링커("링커 1"로도 불리움)에 의해 p35 도메인에 연결된 p40 도메인;
- [0045] · ● SAD 링커에 의해 상기 p35 도메인에 연결된 제 1 L19 VH 도메인;

- [0046] · ● 제 3 링커("링커 3"으로도 불리움)에 의해 상기 제 1 L19 VH 도메인에 연결된 제 1 L19 VL 도메인;
- [0047] · ● 제 4 링커("링커 4"로도 불리움)에 의해 상기 제 1 L19 VL 도메인에 연결된 제 2 L19 VH 도메인; 및
- [0048] · ● 제 5 링커("링커 5"로도 불리움)에 의해 상기 제 2 L19 VH 도메인에 연결된 제 2 L19 VL 도메인을 포함한다.
- [0049] [0030] 일부 구체예에서, 상기 제 3 링커 및 제 5 링커는 동일한 아미노산 서열을 포함하고 및/또는 서로 대체될 수 있다.
- [0050] [0031] 일부 구체예에서, 상기 p40 도메인은 서열번호1 에 기재된 아미노산 서열 또는 이의 단편과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0051] [0032] 일부 구체예에서, 상기 p35 도메인은 서열번호3 에 기재된 아미노산 서열 또는 이의 단편과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0052] [0033] 일부 구체예에서, 상기 제 1 링커는 GS 링커이다.
- [0053] [0034] 일부 구체예에서, 상기 제 1 링커는 서열번호2 에 기재된 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0054] [0035] 일부 구체예에서, 상기 제 1 L19 VH 도메인, 제 2 L19 VH 도메인, 또는 둘 모두는 서열번호28 내지 30 에 기재된 아미노산 서열 중 적어도 하나와 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0055] [0036] 일부 구체예에서, 상기 제 1 L19 VL 도메인, 제 2 L19 VL 도메인, 또는 둘 모두는 서열번호31 내지 33 에 기재된 아미노산 서열 중 적어도 하나와 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0056] [0037] 일부 구체예에서, 상기 제 1 L19 VH 도메인, 제 2 L19 VH 도메인, 또는 둘 모두는 서열번호7 에 기재된 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0057] [0038] 일부 구체예에서, 상기 제 1 L19 VL 도메인, 제 2 L19 VL 도메인, 또는 둘 모두는 서열번호5 에 기재된 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0058] [0039] 일부 구체예에서, 상기 SAD 링커는 서열번호4 에 기재된 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0059] [0040] 일부 구체예에서, 상기 제 3 링커는 GS 링커이다.
- [0060] [0041] 일부 구체예에서, 상기 제 3 링커는 서열번호6 에 기재된 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0061] [0042] 일부 구체예에서, 상기 제 5 링커는 GS 링커이다.
- [0062] [0043] 일부 구체예에서, 상기 제 5 링커는 서열번호6 에 기재된 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0063] [0044] 일부 구체예에서, 상기 제3 링커와 제5 링커는 동일한 아미노산 서열을 포함하며 및/또는 서로에 의해 교체될 수 있다.
- [0064] [0045] 일부 구체예에서, 상기 제4 링커는 GS 링커이다.
- [0065] [0046] 일부 구체예에서, 상기 제4 링커는 서열번호8 에 기재된 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0066] [0047] 일부 구체예에서, 상기 조성물은 서열번호16 에 기재된 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

- [0067] [0048] 일부 구체예에서, 상기 조성물은 서열번호16 에 기재된 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0068] [0049] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 신생물 질환(neoplastic disease)의 발생이
- [0069] · ● 진단되거나,
- [0070] · ● 이로 인해 고통받고 있거나, 또는
- [0071] · ● 이의 위험이 있는
- [0072] 인간 또는 동물 대상체의 치료, 또는 이러한 상태의 예방을 위한 (의약의 제조를 위한) 조성물의 용도가 제공된다.
- [0073] [0050] 일부 구체예에서, 상기 신생물 질환(neoplastic disease)은 악성 흑색종, 비소세포 폐암(non-small cell lung cancer; NSCLC), 신장 세포 암종, 요로상피 암종(urothelial carcinoma), 두경부 편평 세포 암종(head and neck squamous cell carcinoma; HNSCC), 고빈도-현미부수체 불안정성(microsatellite instability-high; MSI-H) 또는 불일치 복구 결핍 전이성 대장암(mismatch repair deficient (dMMR) metastatic colorectal cancer), 간세포암, 위암, 피부 편평 세포 암종(squamous cell carcinoma of the skin), 자궁 경부암(cervical cancer) 및 미만성 거대 B 세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma; DLBCL)으로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0074] [0051] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 인간 또는 동물 대상체의 혈관 신생(angiogenesis)의 억제를 위한 (의약 제조용) 상기 개시에 따른 조성물의 용도가 제공된다.
- [0075] [0052] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 적어도 상기 기재에 따른 조성물 및 임의로 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.
- [0076] [0053] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, (i) 상기 기재에 따른 조성물 또는 상기 기재에 따른 약학적 조성물 및 (ii) 하나 이상의 치료학적 활성 화합물을 포함하는 조합물(combination)이 제공된다.
- [0077] [0054] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상기 기재에 따른 조성물, 상기 기재에 따른 약학적 조성물, 또는 상기 기재에 따른 조합물을 이를 필요로 하는 대상체에게 유효량으로 투여하는 것을 포함하는 ED-B 피브로넥틴의 발현 또는 과발현과 관련된 장애 또는 상태를 치료 또는 예방하는 방법이 제공된다.
- [0078] [0055] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면,
- [0079] a) 상기 기재에 따른 조성물, 상기 기재에 따른 약학적 조성물, 또는 상기 기재에 따른 조합물,
- [0080] b) 상기 조성물, 조성물 또는 조합물을 투여하기 위한 장치, 및
- [0081] c) 사용 지침
- [0082] 을 포함하는 부분으로 이루어진 치료 키트가 제공된다.

**도면의 간단한 설명**

- [0083] [0056] 도1a-1b: 단백질 발현 실험 결과. 재료 및 방법은 하기를 참조 요망.
- [0057] 도1a: 서열번호4의 아미노산 서열을 갖는 (본원에서 "SAD" 로 별칭됨)의 15-머 링커는 모든 변이체들(variants)(본원에서 "클론"으로도 칭함) 중 최고의 생산 수율을 보여준다. 상기 수율은 두 번째 최상의 변이체인 DDS보다 거의 100% 더 우수하다.
- [0058] AKKAS 라인의 2 개의 서열은 서열 번호 9 및 18이고, AP7 라인의 2 개의 서열은 서열 번호 15 및 19 이고, DDS 라인의 2 개의 서열은 서열 번호 10 및 20 이고, AP6 라인의 2 개의 서열은 서열 번호14 및 21 이고, G4S 라인의 2 개의 서열은 서열 번호11 및 22 이고, SES 라인의 2 개의 서열은 서열 번호12 및 23 이고, alpha3 라인의 2 개의 서열은 서열 번호13 및 24 이고, 및 SAD 라인의 2 개의 서열은 서열 번호4 및 25 이다.
- [0059] 도 1a에는 N-말단 및 C-말단 잔기들(또는 5'- 또는 3'- 뉴클레오티드들)이 회색으로 표시되어 있다. 이들은 검색이 필요한 본 출원의 개시에 속하지 않는다. 이들은 단순히 각각의 링커가 포함(embedded)될 수 있는 골격을 보여준다.

- [0060] 도1b: SDS-PAGE 특성화는 모든 변이체에 대해 약 120 kDa의 분자량을 나타내었다.
- [0061] 도2: ELISA 실험. 모든 변이체는 10 µg/ml 및 1 µg/ml 농도 모두에서 인간 피브로넥틴의 도메인 7B89에 결합한다.
- [0062] 도3a 및 도3b: Biacore 실험. 모든 변이체는 인간 피브로넥틴의 도메인 7B89와 유사한 결합 거동을 나타낸다.
- [0063] 도4a 및 도 4b: 크기 배제 크로마토그래피 (SEC). 모든 변이체는 13 ml에서 단량체 면역사이토카인에 해당하는 주요 피크와 10 ml에서 응집체에 해당하는 더 작은 피크를 갖는 비슷한(comparable) 응집 프로파일을 나타내었다.
- [0064] 도5a 내지 도 5c: 면역형광 염색 실험. 모든 변이체는 음성 대조군과 비교하여 냉동된 동계(syngeneic) F9 기형 암종(teratocarcinoma) 샘플의 혈관 구조(vasculature)를 특이적으로 염색하였다.
- [0065] 도6a 내지 도 6c: 생체 내 종양 표적화. 모든 변이체 및 양성 대조군을 <sup>125</sup>I 로 방사선 요오드화하고 (radioiodinated) 면역능을 가진(immunocompetent) 피하(s.c.) 이식된 F9 마우스 기형 암종(teratocarcinoma) 마우스에 주사하였다 (4-9 µg 단백질/동물). 주사 후 24 시간에 측정된 방사능은 모든 변이체에 대해 종양에 축적된 것으로 나타났다. 그러나, "SAD" 변이체는 다른 7 개의 클론 (약2,9% ID/g (= 조직 그램 당 주사 용량) 대(vs.) 두 번째로 높은 수치인 (G4S)<sub>3</sub>이며, 약 2,4 % ID/g를 나타냄)과 비교하여 종양에서 우수한 축적을 나타내었다.
- [0066] 도 7 및 도 8: IL-12 및 항-피브로넥틴 항체를 사용한 예시적인 면역사이토카인 형태.
- [0067] 도9a 및 도 9b: 다른 융합 단백질의 SEC 분석 (A) huIL-12L19L19 "SAD" 배치(batch)-A; (B) huIL-12L19L19 "SAD" 배치-B; (C) huIL-12L19L19 "이전(O1d)" 배치 A; 및 (D) huIL-12L19L19 "이전(O1d)" 배치 B.
- [0068] 도10: Biacore 실험. 상기 "SAD" 변이체는 피브로넥틴 7B89 도메인 (3.8 nM 대 6.7 nM)을 향한 "이전(O1d)" 링커를 갖는 변이체와 비교하여 개선된 겉보기 친화도(apparent affinity)를 나타내었다. 링커의 변이가 단백질의 안정성에 영향을 미칠 수 있지만 일반적으로 그의 표적에 대한 친화성에는 영향을 미치지 않기 때문에, 이 놀라운 결과는 예상치 못한 것이다.
- [0069] 도11: 생체 내 종양 표적화 실험. 상기 "SAD" 및 "이전(O1d)" 변이체들을 <sup>125</sup>I 로 방사선 요오드화하고 (radioiodinated) 면역능을 가진(immunocompetent) 피하(s.c.) 이식된 F9 마우스 기형 암종(teratocarcinoma) 마우스에 주사하였다 (10-11 µg 단백질/동물). 상기 "SAD" 변이체는 상기 "이전(O1d)" 링커 변이체와 비교하여 개선된 종양 표적화 능력을 갖는 것으로 나타났다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0084] [0070] 정의
- [0085] [0071] "항체"는 사량체(tetrameric) 구조 단위를 포함하는 면역 글로불린 패밀리의 분자를 의미한다. 각각의 사량체는 2 개의 동일한 쌍의 폴리펩티드 사슬로 구성되며, 각 쌍은 이황화 결합을 통해 연결된 하나의 "경"쇄 (약 25kD) 및 하나의 "중"쇄(약 50-70kD)를 갖는다. 인식된 면역글로불린 유전자는 무수한 면역글로불린 가변 영역 유전자들뿐 아니라 κ, λ, α, γ, δ, ε 및 μ 불변 영역 유전자들을 포함한다. 경쇄는 κ 또는 λ로 분류된다. 중쇄는 γ, μ, α, δ 또는 ε 로 분류되며, 이는 다시 면역글로불린 클래스인 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE를 각각 정의한다. 항체는 임의의 이소형/클래스(예; IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE), 또는 임의의 서브클래스(예; IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2) 일 수 있다.
- [0086] [0072] 경쇄 및 중쇄는 둘 모두 구조적 및 기능적 상동성 영역으로 구분된다. 상기 용어 "불변" 및 "가변"은 구조적 및 기능적으로 사용된다. 각 쇠의 N-말단은 주로 항원 인식을 담당하는 약 100 내지 110 개 또는 그 이상의 아미노산의 가변 (V) 영역 또는 도메인을 정의한다. 상기 용어 가변 경쇄 (V<sub>L</sub>) 및 가변 중쇄 (V<sub>H</sub>)는 각각 경쇄 및 중쇄의 이들 영역을 의미한다. V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 의 쌍은 함께 단일 항원-결합 부위를 형성한다. V 영역들 이외에도, 중쇄 및 경쇄는 모두 불변 (C) 영역 또는 도메인을 포함한다. 분비된 형태의 면역글로불린 C 영역은 3 개의 C 도메인인 CH1, CH2, 및 CH3와 임의로 CH4 (C<sub>μ</sub>) 및 힌지 영역으로 이루어진다. 면역글로불린 C 영역의 막-결합 형태는 또한 막 및 세포 내 도메인들도 갖는다. 각각의 경쇄는 N-말단에서 V<sub>L</sub> 을 가지며, 그 다른 말단에

서 불변 도메인 (C)를 갖는다. 상기 경쇄(CL) 및 중쇄 (CH1, CH2 또는 CH3)의 불변 도메인은 분비, 태반경유 이동성(transplacental mobility), Fc 수용체 결합, 보체 결합 등과 같은 중요한 생물학적 특성을 부여한다. 통상적으로, 불변 영역 도메인들의 넘버링은 이들이 항체의 항원 결합 부위 또는 아미노-말단으로부터 멀어질수록 증가한다. N-말단은 가변 영역이고 C-말단은 불변 영역이며; 상기 CH3 및 CL 도메인은 실제로 상기 중쇄 및 경쇄의 카르복시-말단 도메인을 각각 포함한다. 상기 VL은 VH와 정렬되고 상기 CL은 상기 중쇄의 첫 번째 불변 도메인과 정렬된다. 본원에서 사용된 용어 "항체"는 통상적인 항체 구조 및 항체의 변형을 포함한다. 따라서, 전장 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체 및 이들의 항체 단편이 이러한 개념의 범위 내에 포함된다.

[0087] [0073] 항체는 온전한(intact) 면역글로불린 사슬로 존재하거나 또는 다양한 펩티다제에 의한 분해에 의해 생성된 다수의 잘 특성화된 항체 단편으로서 존재한다. 본원에서 사용된 상기 용어 "항체 단편"은 항원의 에피토프와 특이적으로 상호 작용하는 능력(예; 결합, 입체 장애, 안정화/불안정화, 공간 분포에 의해)을 유지하는 항체의 하나 이상의 부분을 의미한다. 따라서, 예를 들어, 펩신은 힌지 영역에서 이황화 결합 아래의 항체를 분해하여 이황화 결합에 의해  $V_H-C_H1$  에 결합된 경쇄 자체인 Fab '의 이량체인 F(ab)'<sub>2</sub> 를 생성한다. 온화한 조건 하에서 F(ab)'<sub>2</sub>가 감소되어 힌지 영역에서 이황화 결합을 끊어 F(ab)'<sub>2</sub> 이량체를 Fab' 단량체로 전환시킬 수 있다. Fab' 단량체는 본질적으로 힌지 영역의 일부를 갖는 Fab이다 (Paul, *Fundamental Immunology* 3d ed. (1993)). 다양한 항체 단편이 온전한 항체의 분해 측면에서 정의되지만, 당업자는 이러한 단편들이 화학적으로 또는 재조합 DNA 방법론을 사용하여 새로이(*de novo*) 합성될 수 있음을 이해할 것이다. 본원에서 사용된 상기 용어 "항체 단편"은 결합 특이성 및 기능적 활성을 유지하는, 전체 항체의 변형에 의해 생성되거나 또는 재조합 DNA 방법론을 사용하여 새로이(*de novo*) 합성된 것들 중 하나 이상을 의미한다. 항체 단편의 예로서 Fv 단편, 단일 사슬 항체(ScFv), Fab, Fab', Fd(Vh 및 CH1 도메인), dAb(Vh 및 단리된 CDR); 디아바디 및 단일 사슬 디아바디; 및 동일한 결합 특이성을 갖는 이들 단편의 다량체 버전(예; F(ab')<sub>2</sub>)을 들 수 있다. 항체 단편은 또한 사이토카인 생착된(engrafted) 단백질에 통합되어 본 개시에서 제공되는 결합 특이성 및 활성을 성취할 수 있다.

[0088] [0074] 본원에서 사용된 용어 "Fab" 도메인은 중쇄 가변 도메인, 불변 영역 CH1 도메인, 경쇄 가변 도메인, 및 경쇄 불변 영역 CL 도메인을 포함한다. 상기 도메인의 상호 작용은 상기 CH1과 CL 도메인 사이의 이황화 결합에 의해 안정화된다. 일부 구체예에서, 상기 Fab의 상기 중쇄 도메인은 N-말단에서 C-말단까지의 순서, VH-CH로 존재하며 및 Fab의 상기 경쇄 도메인은 N-말단에서 C-말단까지의 순서, CL-VL 로 존재한다. 일부 구체예에서, 상기 Fab의 상기 중쇄 도메인은 N-말단에서 C-말단까지의 순서, CH-VH 로 존재하며, Fab의 상기 경쇄 도메인은 N-말단에서 C-말단까지의 순서, VL-CL 로 존재한다. 비록 Fabs가 역사적으로 손상되지 않은 면역 글로불린의 파파인 절단(papain digestion)에 의해 확인되었지만, 이 공개의 맥락에서, "Fab"은 일반적으로 임의 방법의 재조합으로 생산된다. 각 Fab 단편은 항원 결합에 관한 1가, 즉 단일 항원 결합 부위를 갖는다

[0089] [0075] "상보성 결정 도메인" 또는 "상보성 결정 영역" ("CDRs") 은 상호 교환 가능하게 초가변 영역  $V_L$  및  $V_H$  을 의미한다. CDRs 은 이러한 표적 단백질에 대한 특이성을 보유하는 항체 사슬의 표적 단백질-결합 부위이다. 각각의 인간  $V_L$  또는  $V_H$  에는 3 개의 CDRs (CDR1-3, N-말단으로부터 순차적으로 번호가 매겨짐)이 있으며, 가변 도메인의 약 15-20%를 구성한다. CDRs 은 표적 단백질의 에피토프에 구조적으로 상보적이고 따라서 결합 특이성에 직접 관계된다. 소위 골격 영역(FR)인  $V_L$  또는  $V_H$  의 나머지 스트레치(stretches)는 아미노산 서열 상 변동이 적다 (Kuby, *Immunology*, 4th ed., Chapter 4. W.H. Freeman & Co., New York, 2000).

[0090] [0076] CDR 및 골격 영역의 위치는 당업계에 널리 공지된 다양한 정의를 사용하여 결정될 수 있다(예; Kabat, Chothia, international ImmunoGeneTics database (IMGT) and AbM (see, e.g., Johnson *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 29:205-206 (2001); Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987); Chothia *et al.*, *Nature*, 342:877-883 (1989); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 227:799-817 (1992); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 273:927-748 (1997)). 항원 결합 부위의 정의는 또한 하기에 기재되어 있다: Ruiz *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 28:219-221 (2000); and Lefranc, M.P., *Nucleic Acids Res.*, 29:207-209 (2001); MacCallum *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 262:732-745 (1996); and Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:9268-9272 (1989); Martin *et al.*, *Methods Enzymol.*, 203:121-153 (1991); and Rees *et al.*, In Sternberg M.J.E. (ed.), *Protein Structure Prediction*, Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996).

[0091] [0077] Kabat 의 정의에서는, VH의 CDR 아미노산 잔기가 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2), 및 95-102 (HCDR3)로 번호가 매겨지고;  $V_L$  의 CDR 아미노산 잔기가 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2), 및 89-97 (LCDR3) 로 번호가 매

겨진다. Chothia 의 정의에서는, VH의 CDR 아미노산 잔기가 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2), 및 95-102 (HCDR3)로 번호가 매겨지고; VL 의 CDR 아미노산 잔기가 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2), 및 91-96 (LCDR3)로 번호가 매겨진다. Kabat 와 Chothia 의 CDR 정의를 조합함으로써, 인간 VH에서 CDR은 아미노산 잔기 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2), 및 95-102 (HCDR3)로 이루어지며, 인간 VL에서 CDR은 아미노산 잔기 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2), 및 89-97 (LCDR3)로 이루어진다.

**[0092]** **[0078]** 본원에서 사용된 "항체 가변 경쇄" 또는 "항체 가변 중쇄" 각각 VL 또는 VH 를 포함하는 폴리펩티드를 의미한다. 내인성 VL 은 유전자 세그먼트 V (가변) 및 J (접합(junctional))에 의해, 내인성 VH 는 V, D (다양성) 및 J에 의해 코딩된다. VL 또는 VH 각각은 골격 영역 (FR) 및 CDRs 을 포함한다. 용어 "가변 영역" 또는 "V-영역"은 상호 교환적으로 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4를 포함하는 중쇄 또는 경쇄를 의미한다. V-영역은 자연 발생, 재조합 또는 합성일 수 있다. 본원에서, 항체 경쇄 및/또는 항체 중쇄는 때때로 총체적으로 "항체 사슬"로 의미될 수 있다. 본원에 제공되고 추가로 기재된 바와 같이, "항체 가변 경쇄" 또는 "항체 가변 중쇄" 및/또는 "가변 영역" 및/또는 "항체 사슬"은 임의로 CDR에 생착된 사이토카인 폴리펩티드 서열을 포함한다.

**[0093]** **[0079]** 예를 들어 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 본원에 개시된 면역글로불린 중쇄의 C-말단 부분은 "Fc" 도메인이다. 본원에서 사용된 "Fc 영역"은 제 1 불변 영역 (CH1) 면역글로불린 도메인을 제외한 항체의 불변 영역을 의미한다. Fc는 IgA, IgD 및 IgG의 마지막 2 개의 불변 영역 면역글로불린 도메인, 및 IgE 및 IgM의 마지막 3 개의 불변 영역 면역글로불린 도메인, 및 이들 도메인에 대한 가요성(flexible) 힌지 N-말단을 의미한다. IgA 및 IgM Fc의 경우 J 사슬을 포함할 수 있다. IgG의 경우, Fc는 면역글로불린 도메인인 C $\gamma$ 2 와 C $\gamma$ 3 및 C $\gamma$ 1과 C $\gamma$  사이의 힌지를 포함한다. 상기 Fc 영역의 경계는 변할 수 있다는 것이 당업계에서 이해되고 있지만, 그러나 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 이의 카르복실-말단에 보통 Kabat 등의 EU 지수에 따른 넘버링을 사용하여 잔기 C226 또는 P230을 포함하는 것으로 정의된다 (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, Va.). "Fc 영역"은 단리 상태의 이 영역 또는 항체 또는 항체 단편과 관계에서 이 영역을 의미할 수 있다. "Fc 영역"은 예를 들어 이펙터 기능을 조절하는 변형을 포함하여 Fc 영역(예; CH2 및 CH3 영역)에서 Fc 영역의 자연 발생 대립 유전자 변이체를 포함한다. Fc 영역은 또한 생물학적 기능을 변경시키지 않는 변이체를 포함한다. 예를 들어, 생물학적 기능의 실질적인 손실없이 면역글로불린의 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단에서 하나 이상의 아미노산이 결실된다. 예를 들어, 특정 구체예에서 C-말단 리신은 변형되거나 교체된다. 특정 구체예에서, Fc 영역에서 하나 이상의 C-말단 잔기는 변경되거나 제거된다. 특정 구체예에서, Fc 중 하나 이상의 C-말단 잔기(예; 말단 라이신)가 결실된다. 특정 구체예에서, Fc에서 하나 이상의 C-말단 잔기는 대체 아미노산으로 치환된다(예; 말단 라이신이 대체됨). 이러한 변이체는 당업계에 공지된 일반적인 규칙에 따라 선택되어 활성에 미치는 영향을 최소화한다(참조, 예; Bowie, *et al.*, Science 247:306-1310, 1990). 상기 Fc 도메인은 FcR과 같은 세포 수용체에 의해 인식되는 면역글로불린 (Ig)의 일부이고 보체-활성화 단백질인 C1q가 결합하는 장소이다. CH2 엑손의 5' 부분에 코딩된 하부 힌지 영역은 FcR 수용체에 결합하기 위한 항체 내에 유연성을 제공한다.

**[0094]** **[0080]** "키메라 항체"는 (a) 항원 결합 부위(가변 영역)가 다르거나 변경된 클래스, 이펙터 기능 및/또는 종(species)의 불변 영역 또는 키메라 항체에 새로운 특성을 부여하는 완전히 다른 분자(예; 효소, 독소, 호르몬, 성장 인자, 및 약물)에 연결될 수 있도록 상기 불변 영역 또는 이의 일부가 변경, 대체 또는 교환되거나; 또는 (b) 상기 가변 영역 또는 이의 일부가 변경, 또는 다르거나 변경된 항원 특이성을 갖는 가변 영역과 대체 또는 교환된, 항체 분자이다.

**[0095]** **[0081]** "인간화된" 항체는 인간에서 면역원성이 약한 반면 비인간 항체의 반응성(예; 결합 특이성, 활성)을 유지하는 항체이다. 이것은 예를 들어 비인간 CDR 영역을 유지하고 항체의 나머지 부분을 인간 대응물(counterparts)로 대체함으로써 성취될 수 있다. 참조, 예; Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984); Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44:65-92 (1988); Verhoeyen *et al.*, Science, 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun., 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun., 31(3):169-217 (1994).

**[0096]** **[0082]** "인간 항체"는 골격 영역 및 CDR 영역 둘 모두가 인간 기원의 서열로부터 유래된 가변 영역을 갖는 항체를 포함한다. 또한, 항체가 불변 영역을 포함하는 경우, 불변 영역 또한 이러한 인간 서열(예; 인간 생식선(germline) 서열, 또는 변이된 버전의 인간 생식선 서열 또는 인간 골격 서열 분석으로부터 유래된 컨센서스 골격 서열을 포함하는 항체)로부터 유래된다(예, Knappik *et al.*, J. Mol. Biol. 296:57-86, 2000 에 기재됨). 인간 항체는 인간 서열에 의해 코딩되지 않은 아미노산 잔기 (예; 시험관 내 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이

유발에 의해 또는 생체 내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 변이(mutation) 또는 안정성 또는 제조를 촉진하기 위한 보존적 치환)를 포함할 수 있다.

- [0097] [0083] 핵산 또는 단백질에 적용 시 "단리된(isolated)"이라는 용어는 자연 상태에서 핵산 또는 단백질과 관련된 기타 세포 성분들이 본질적으로 없음을 나타낸다. 바람직하게는 균질한 상태이다. 건조 상태 또는 수용액 중 하나의 상태일 수 있다. 순도 및 균질성은 전형적으로 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동 또는 고성능 액체 크로마토그래피와 같은 분석 화학 기술을 사용하여 결정된다. 제제에 존재하는 미세한 종(species)인 단백질은 실질적으로 정제된다. 특히, 단리된 유전자는 상기 유전자의 측면에 있는 해독틀(OFR)으로부터 분리되어 관심있는 유전자 이외의 단백질을 코딩한다. "정제된"이라는 용어는 핵산 또는 단백질이 전기 영동 겔에서 본질적으로 하나의 밴드를 생성함을 의미한다. 특히, 이는 핵산 또는 단백질이 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 95%, 가장 바람직하게는 적어도 99% 순수한 것을 의미한다.
- [0098] [0084] 상기 용어 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오티드"는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태의 데옥시 리보 핵산(DNA) 또는 리보 핵산(RNA) 및 이의 중합체를 의미한다. 구체적으로 제한되지 않는 한, 상기 용어는 기준 핵산(reference nucleic acid)과 유사한 결합 특성을 가지며, 천연 발생 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 대사되는 공지된 천연 뉴클레오티드 유사체를 포함하는 핵산을 포함한다. 달리 표시되지 않는 한, 특정 핵산 서열은 명시적으로 표시된 서열뿐 아니라 또한 이의 보존적으로 변형된 변이체(예; 축퇴성(degenerate) 코돈 치환), 대립 유전자, 동원체(orthologs), SNPs, 및 상보적 서열을 암시적으로 포함한다. 구체적으로, 축퇴성 코돈 치환은 하나 이상의 선택된(또는 모든) 코돈의 제 3 위치가 혼합-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 생성함으로써 성취될 수 있다(Batzer *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); and Rossolini *et al.*, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).
- [0099] [0085] 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 의미하며 본원에서 상호 교환적으로 사용된다. 상기 용어는 자연 발생 아미노산 중합체 및 비 천연 아미노산 중합체 뿐 아니라 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 자연 발생 아미노산의 인공 화학 모방체(artificial chemical mimetic)인 아미노산 중합체에 적용된다. 본원에서 사용된 용어 "EDB 결합 도메인을 포함하는 펩티드 또는 단백질"은 전체적으로 또는 이의 일부/단편을 통해 EDB(즉, 피브로넥틴을 함유하는 엑스트라 도메인-B)에 결합하는 펩티드 또는 단백질과 관련된다.
- [0100] [0086] 일반적으로, 펩티드는 예를 들어 3 개 이상의 아미노산 잔기 및 50 개 이하의 아미노산 잔기(따라서, 올리고-또는 폴리펩티드)를 갖는 단량체 분자일 수 있으며, 단백질은 예를 들어 길이가 50 개 이상의 아미노산 잔기를 갖는 하나 이상의 단백질을 갖는 단량체, 이량체 또는 폴리머 분자일 수 있다.
- [0101] [0087] 상기 용어 "아미노산" 은 천연 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체뿐 아니라 천연 아미노산 및 합성 아미노산을 의미한다. 자연적으로 발생하는 아미노산은 후에 변형되는 아미노산(예; 히드록시프롤린,  $\gamma$ -카르복시글루타메이트 및 O-포스포세린)뿐 아니라 유전자 코드로 코딩된 아미노산이다. 아미노산 유사체는 자연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학 구조를 갖는 화합물(즉, 수소, 카르복실기, 아미노기 및 R기(예; 호모세린, 노르류신, 메티오닌 설폭시드, 메티오닌 메틸 설포늄)에 결합된  $\alpha$ -탄소)를 의미한다. 이러한 유사체는 변형된 R 기(예; 노르류신) 또는 변형된 펩티드 골격을 갖지만, 자연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학 구조를 유지한다. 아미노산 모방체(mimetics)는 아미노산의 일반적인 화학적 구조와는 다른 구조를 가지나 자연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 화학적 화합물을 의미한다.
- [0102] [0088] "보존적으로 변형된 변이체"는 아미노산 및 핵산 서열 모두에 적용된다. 특정 핵산 서열과 관련하여, 보존적으로 변형된 변이체는 동일하거나 본질적으로 동일한 아미노산 서열, 또는 핵산이 아미노산 서열을 코딩하지 않는 경우 본질적으로 동일한 서열을 의미한다. 유전자 코드의 축퇴성으로 인해, 기능적으로 동일한 다수의 핵산이 임의의 주어진 단백질을 코딩한다. 예를 들어, 코돈 GCA, GCC, GCG 및 GCU는 모두 아미노산 알라닌을 코딩한다. 따라서, 알라닌이 코돈에 의해 특정되는 모든 위치에서, 상기 코돈은 코딩된 폴리펩티드를 변경하지 않고 기재된 임의의 상응하는 코돈으로 변경될 수 있다. 이러한 핵산 변이는 "침묵 변이(silent variations)"이며, 이는 보존적으로 변형된 변이의 한 종(species)이다. 폴리펩티드를 코딩하는 본원의 모든 핵산 서열은 또한 상기 핵산의 모든 가능한 침묵 변이를 기재한다. 당업자는 핵산의 각 코돈(메티오닌의 유일한 코돈인 AUG와 트립토판의 유일한 코돈인 TGG 제외)이 기능적으로 동일한 분자를 생성하도록 변형될 수 있음을 인식한다. 따라서, 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 각각의 침묵 변이는 각각의 기재된 서열에 내재되어 있다.
- [0103] [0089] 아미노산 서열과 관련하여, 당업자는 코딩된 서열에서 단일 아미노산 또는 소량의 아미노산을 변경, 첨가 또는 결실시키는 핵산, 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질 서열에 대한 개별 치환, 결실 또는 첨가가 "보존적

으로 변형된 변이체"임을 인식할 것이며, 여기서 상기 변경(alteration)으로 인해 아미노산이 화학적으로 유사한 아미노산으로 치환된다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 테이블은 당업계에 잘 알려져 있다. 이러한 보존적으로 변형된 변이체는 다형성(polymorphic) 변이체, 중간 상동체(interspecies homologs) 및 대립 유전자(alleles) 이외의 것으로서 이들을 배제하지 않는다. 하기 8 개 그룹은 각각 서로 보존적 치환인 아미노산을 포함한다: 1) 알라닌 (A), 글리신 (G); 2) 아스파르트산 (D), 글루탐산 (E); 3) 아스파라긴 (N), 글루타민 (Q); 4) 아르기닌 (R), 리신 (K); 5) 이소류신 (I), 류신 (L), 메티오닌 (M), 발린 (V); 6) 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y), 트립토판 (W); 7) 세린 (S), 트레오닌 (T); 및 8) 시스테인 (C), 메티오닌 (M) (예; Creighton, Proteins (1984) 참조).

[0104] [0090] 이와 관련하여, 본원에서 사용된 "보존적 아미노산 치환"은 비 보존적 치환보다 항체 기능에 더 작은 영향을 미친다. 아미노산을 분류하는 방법은 많지만, 이들의 구조와 이들의 R 그룹의 일반적인 화학적 특성을 기초로 6 가지 주요 그룹으로 종종 분류된다.

[0105] [0091] 일부 구체예에서, "보존적 아미노산 치환"은 상기 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체된 것이다. 예를 들어, 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 패밀리가 당업계에 정의되어 있다. 이들 패밀리에

[0106] · ● 기본 측쇄 (예; 라이신, 아르기닌, 히스티딘)

[0107] · ● 산성 측쇄 (예; 아스파르트산, 글루탐산),

[0108] · ● 비하전 극성 측쇄 (예; 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인),

[0109] · ● 비극성 측쇄 (예; 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판),

[0110] · ● 베타-분기 측쇄 (예; 트레오닌, 발린, 이소류신) 및

[0111] · ● 방향족 측쇄 (예; 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 갖는

[0112] 아미노산들을 포함한다.

[0113] [0092] 한 펩티드의 전하를 변형시키기 위해 아스파르트산을 아스파라긴으로 치환할 때와 같이, 아미노산의 측쇄 패밀리에서 다른 보존된 아미노산 치환이 발생할 수도 있다. 보존적 변화는 화학적으로 상동성 있는 비천연 아미노산의 치환을 추가로 포함할 수 있다(즉, 류신 대신 합성 비천연 소수성 아미노산, 트립토판 대신 합성 비천연 방향족 아미노산).

[0114] [0093] "서열 동일성 백분율"은 비교 창(comparison window)에서 최적으로 정렬된 두 개의 서열을 비교함으로써 결정되며, 여기서 비교 창에서 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 상기 두 서열의 최적 정렬을 위해, 추가 또는 결실을 포함하지 않는 참조 서열(예; 폴리펩티드)과 비교하여 추가 또는 결실(즉, 깎)을 포함할 수 있다. 백분율의 계산은, 일치하는 위치의 수를 산출하기 위해 두 서열에서 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 발생하는 위치의 수를 결정하고, 일치하는 위치의 수를 상기 비교 창에서 총 위치의 수로 나눈 후, 그 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 백분율을 산출함으로써 수행된다.

[0115] [0094] 둘 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열과 관련하여 용어 "동일한" 또는 퍼센트 "동일성"은 동일한 서열인 둘 이상의 서열 또는 하위 서열을 의미한다. 하기 시퀀스 비교 알고리즘 중 하나를 사용하거나 수동 정렬 및 육안 검사를 통해 측정된 비교 창 또는 지정된 영역에 대한 최대 대응(maximum correspondence)을 위해 비교되고 및 정렬된 경우, 두 서열이 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드를 특정 비율로 갖는다면, 상기 두 서열은 "실질적으로 동일"하다(즉, 특정 영역 또는 명시되지 않은 경우 참조 서열의 전체 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성). 본 개시 내용은 본원에 예시된 각각의 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드와 실질적으로 동일한 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 선택적으로, 동일성은 적어도 약 15, 25 또는 50 개의 뉴클레오티드 길이의 영역, 또는 보다 바람직하게는 100 내지 500 개 또는 1,000 개 이상의 뉴클레오티드 길이의 영역, 또는 상기 참조 서열의 전장에 걸쳐 존재한다. 아미노산 서열과 관련하여, 동일성 또는 실질적인 동일성은 적어도 5, 10, 15 또는 20 개 아미노산 길이의 영역, 임의로, 적어도 약 25, 30, 35, 40, 50, 75 또는 100 개의 아미노산 길이, 임의로 적어도 약 150, 200 또는 250 개의 아미노산 길이, 또는 상기 참조 서열의 전장에 걸쳐 존재할 수 있다. 본원에 정의된 보존적 치환에 따라, 짧은 아미노산 서열들(예; 20 개 이하의 아미노산 서열)과 관련하여, 하나 또는 두 개의 아미노산 잔기가 보존적으로 치환될 때 실질적인 동일성이 존재한다.

- [0116] [0095] "대상체", "환자" 및 "개체" 라는 용어들은 포유 동물(예; 인간 또는 비인간 영장류 포유 동물)을 상호 교환적으로 의미한다. 포유 동물은 또한 실험실 포유 동물(예; 마우스, 래트, 토끼, 햄스터)일 수 있다. 일부 구체예에서, 포유 동물은 농업용 포유 동물(예; 말, 양, 소, 돼지, 낙타) 또는 가정내 포유 동물(예; 개, 고양이)일 수 있다.
- [0117] [0096] 본원에서 사용된 용어들인 임의의 질환 또는 장애의 "치료하다", "치료하는" 또는 "치료"는, 일부 구체예에서, 상기 질병 또는 장애를 개선하는 것(즉, 질병 또는 이의 임상 증상 중 하나 이상의 진행을 늦추거나 정지시키거나 감소시키는 것)을 의미한다. 다른 구체예에서, "치료하다", "치료하는" 또는 "치료"는 환자가 식별할 수 없는 것을 포함하여 적어도 하나의 물리적 매개변수를 완화 또는 개선하는 것을 의미한다. 또 다른 구체예에서, "치료하다", "치료하는" 또는 "치료"는 상기 질병 또는 장애를 신체적으로(예; 식별 가능한 증상의 안정화) 생리학적으로(예; 물리적 매개변수의 안정화) 또는 둘 모두를 조절하는 것을 의미한다. 또 다른 구체예에서, "치료하다", "치료하는", "치료" 또는 "예방(prophylaxis)"은 질병 또는 장애의 발병 또는 발달 또는 진행을 예방(preventing) 또는 지연시키는 것을 의미한다.
- [0118] [0097] "공동-투여(co-administer)"라는 용어는 개체에서 2 개(또는 그 이상)의 활성제(active agents)가 동시에 존재함을 의미한다. 공동 투여되는 활성제는 동시에 또는 순차적으로 전달될 수 있다.
- [0119] [0098] 본 발명의 다양한 양태는 다음 섹션에서 상세하게 설명된다. 섹션의 사용은 본 발명을 제한하려는 것이 아니다. 각 섹션은 본 발명의 임의의 양태에 적용될 수 있다. 본 발명은 기재된 조성물의 특정 성분 부분들 또는 이들 방법의 공정 단계들에 제한되지 않으며 이러한 조성물 및 방법들은 다양할 수 있다. 또한, 본원에서 사용된 용어는 특정 실시예를 설명하기 위한 것으로서 이들을 제한하려는 것이 아님을 이해해야 한다.
- [0120] [0099] 본 명세서 및 첨부된 청구 범위에 사용된 바와 같이, 단수 형태 "하나(a)", "한(an)" 및 "상기(the)"는 문맥상 명백하게 달리 지시되지 않는 한 단수 및/또는 복수의 지시 대상을 포함한다. 본 출원에서, "또는"의 사용은 달리 언급되지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 또한, 수치로 구분되는 매개변수 범위가 제공되는 경우, 상기 범위는 이러한 제한값을 포함하는 것으로 간주된다는 것을 이해해야 한다. 본원에 인용된 모든 기술 분야의 개시 내용은 그 전문이 참조로 포함된다.
- [0121] [0100] 본원에 사용된 용어 "GS 링커"는 주로 또는 배타적으로 글리신 및 세린 잔기("Gly-Ser 링커"로도 불림)로 구성된 펩티드 링커에 관한 것이다. 다른 구체예에서, 상기 GS 링커는 본원에서 서열 번호 2, 6 또는 8 중 어느 하나에서 보여주는 링커이다.
- [0122] [00101] 본원에서 사용된 "보존적 아미노산 치환"은 비-보존적 치환보다 항체 기능에 더 작은 영향을 미친다. 아미노산을 분류하는 방법은 많지만, 이들의 구조와 이들의 R 그룹의 일반적인 화학적 특성을 기초로 6 가지 주요 그룹으로 종종 분류된다.
- [0123] [00102] 본원에서 사용된 용어 "표적 결합 친화도"는 본 발명에 따른 결합 분자의 그의 표적에 대한 친화성을 의미하며, "KD"값을 사용하여 수치적으로 표현된다. 일반적으로 KD 값이 높을수록 결합력이 약하다. 일부 구체예에서, 상기 "KD"는 예를 들어 BIAcore™-2000 또는 BIAcore™-3000을 사용하여 방사성 표지된 항원 결합 분석(MA) 또는 표면 플라즈몬 공명(SPR) 분석에 의해 측정된다. 특정 구체예에서, "온-속도(on-rate)"또는 "결합 속도(rate of association)"또는 "결합 속도(association rate)"또는 "kon" 및 "오프-속도(off-rate)"또는 "해리 속도(rate of dissociation)" 또는 "해리 속도(dissociation rate)" 또는 "koff"는 또한 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 기술로 결정된다. 추가 구체 예에서, "KD", "kon" 및 "koff"는 Octet® 시스템을 사용하여 측정된다.
- [0124] [00103] 본원에서 사용된 용어 "결합을 위해 경쟁하다"는 상기와 같은 서열들에 의해 정의된 항체 중 하나와 관련하여 사용되며, 상기 서열이 정의된 항체와 마찬가지로, 동일한 표적, 또는 표적 에피토프 또는 도메인 또는 서브 도메인에 결합하는 활성으로서의 실제 항체를 의미하며, 후자의 변이체이다. 결합의 효율(예; 운동역학 또는 열역학)은 후자의 효율과 같거나 크거나 작을 수 있다. 예를 들어, 상기 기질에 결합하기 위한 평형 결합 상수는 두 항체에 대해 상이할 수 있다.
- [0125] [00104] 본원에서 사용된 용어 "주어진 표적에 결합하는 능력을 유지하는"이라는 용어는 예를 들어, 각각의 변이체가 비변형 펩티드의 표적 결합 친화도와 비교하여 50% 이상의 표적 결합 친화도를 갖는 것을 의미한다.
- [0126] [00105] EDB 피브로넥틴

- [0127] [00106] 피브로넥틴(UniProt: P02751)은 세포 외 매트릭스의 고 분자량(약 440 kDa) 당 단백질로서, 인테그린이라고 불리는 막-스패닝 수용체 단백질에 결합한다. 인테그린과 유사하게, 피브로넥틴은 콜라겐, 피브린, 및 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(예; 신데칸(syndecans))과 같은 세포 외 매트릭스 성분과 결합한다.
- [0128] [00107] 피브로넥틴은 암종 발달과 관련이 있다. 폐암종에서, 특히 비소세포 폐암종에서 피브로넥틴 발현이 증가한다. 폐암종 세포의 피브로넥틴에 대한 접착(adhesion)은 종양 형성(tumorigenicity)을 향상시키고 세포사멸-유도 화학 요법제에 대한 내성을 부여한다. 피브로넥틴은 폐 종양 성장/생존 및 치료에 대한 내성을 촉진할 수 있으며, 새로운 항암제의 개발을 위한 새로운 표적을 나타내는 것으로 논의되었다.
- [0129] [00108] 피브로넥틴은 한 쌍의 이황화 결합에 의해 연결된 2 개의 거의 동일한 단량체로 구성된 단백질 이량체로서 존재한다. 상기 피브로넥틴 단백질은 단일 유전자에서 생산되지만, 그러나 단일 카피 피브로넥틴 유전자로부터 생성된 이의 전구체 mRNA의 대안적 스플라이싱은 EDA, EDB 및 IIICS 도메인을 코딩하는 3 개 부위에서 발생하며 그 결과 여러 이소형이 생성된다.
- [0130] [00109] EDA 또는 EDB 도메인을 포함하는 피브로넥틴 이소형은 배아 발달에 있어서의 중요성 및 정상적인 성인 조직에서의 존재가 제한되어 있기 때문에 태아 종양(oncofetal) 형태로 알려져 있다. 이들 이소형은 또한 발달에 있어서 중요한 생리학적 과정인 혈관 신생의 중요한 마커들로서 인식되며, 암의 진행에 있어서 종양 세포에 의해 요구된다. ED-B 피브로넥틴은 종양 조직, 특히 유방암종, 뇌종양, 림프종 세포 및 전립선 암에서 발현된다. 조직 특이적 발현 프로파일로 인해, ED-B 피브로넥틴은 치료 표적화에 이용하기에 매력적인 종양 항원이다.
- [0131] [00110] IL-12
- [0132] [00111] 인터루킨-12는 면역계에 여러 가지 생물학적 영향을 미치는 이중 이량체 사이토카인이다. 인터루킨-12는 IL-12 및 p70의 활성 형태의 분비에 모두 필요한 2 개의 서브유닛인 p35 및 p40으로 구성된다. 인터루킨-12는 수지상 세포(dendritic cells; DC)에 작용하여 성숙 및 항원 제시(antigen preparation)를 증가시켜 종양 특이적 항원들에 대한 T 세포 반응의 개시를 허용할 수 있다. 인터루킨-12는 또한 수지상 세포에 의한 IL-12 분비를 유도하여 반응을 증폭시키는 긍정적인 피드백 메커니즘을 만든다. 일단 반응이 개시되면, IL-12는 면역계를 Th1 사이토카인 프로파일로 향하게 하여 CD4+ T 세포가 인터페론-감마(IFN- $\gamma$ )를 분비하도록 유도하고 CD8+ 세포 독성 T 세포 반응을 유도하는 핵심 역할을 한다.
- [0133] [00112] IL-12는 또한 종양 괴사 인자-알파(TNF- $\alpha$ )를 포함한 다른 사이토 카인의 분비를 유발하는 강력한 염증성(pro-inflammatory) 사이토카인으로서, IFN- $\gamma$ 와 함께, CD4+ 세포 독성 T 림프구(CTL)의 개발을 위한 전제 조건이다. 더욱이, IL-12는 IFN- $\gamma$  및 다른 사이토카인의 유도를 통해 대식세포 및 호산구와 같은 선천성 면역 세포의 활성화를 촉진 할 수 있다. 이러한 활성화는 이들 세포에 의한 IL-12 분비 및 선천적 및 후천적 반응 둘 모두의 추가 증폭으로 이어진다. 그러나, 높은 레벨의 IL-12, 및 결과적으로 IFN- $\gamma$ 는 또한 IL-10과 같은 길항 분자의 유도 및 STAT4와 같은 IL-12의 하류 신호 전달 분자의 고갈과 관련이 있다.
- [0134] [00113] IL-12를 치료제로 사용하려는 이전의 시도들은 성공적이지 않았는데, 이는 IL-12가 열, 피로, 혈액학적 변화, 고혈당증 및/또는 장기의 기능 장애를 포함한 수용할 수 없는 독성 부작용을 종종 수반하는 기껏해야 중간 정도의 항종양 효과를 나타내었기 때문이다.
- [0135] [00114] 본원에 사용된 "p35" 는 하기에 표시된 아미노산 서열에 최소 80% 의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다:
- [0136] RNLVPATPDPGMPFLHHSQNLRAVSNMLQKARQTLEFYPTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSMMLCLSSIIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMALVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (서열 번호 3).
- [0137] [00115] 본원에 사용된 "p40" 은 하기에 표시된 아미노산 서열에 최소 80% 의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다:
- [0138] IWELKKDVYVVELDWPDPAGEMVVLTCDTPEEDGITWTLTDSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYVCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDKQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWLLTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAEESLPIEVMDAVHKLKYENYNTSSFFIRDI IKPDPKLNQLKPLKNSRQVEVSWEYPTWSTPHSYFSLTFCVQVQGGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCS (서열번호 1).

- [0139] [00116] 본원에 사용된 " IL-12" 는
- [0140] (i) (a) p35 또는 이의 단편으로서, 여기서 p35는 하기에 표시된 아미노산 서열에 적어도 80% 의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 포함함:
- [0141] RNLPVATPDPGMFCLHHSQNLRLRAVSNMLQKARQITLEFYPTCTSEEIDHEDI TKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMALCLSSIIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (서열번호 3)
- [0142] 및
- [0143] (b) p40 또는 이의 단편으로서, 여기서 p40 은 하기에 표시된 아미노산 서열에 적어도 80% 의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 포함함:
- [0144] IWELKKDVYVVELDWPDPAGEMVVLCTDTPPEEDGITWTLDDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLLHKKEDGIWSTDILDKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVEQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDI IKPDPKLNQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASI SVRAQDRYSSSWSEWASVPCS (서열번호 1)를 모두 포함하며,
- [0145] (ii) IL-12 수용체를 활성화시킬 수 있는 폴리펩티드를 의미한다.
- [0146] [00117] 링커
- [0147] [00118] 특정 구체예에서, 하나 이상의 펩티드 링커는  $(Gly_n-Ser)_m$  서열,  $(Gly_n-Ala)_m$  서열, 또는  $(Gly_n-Ser)_m/(Gly_n-Ala)_m$  서열의 임의의 조합으로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 각각의 n은 독립적으로 1 내지 5의 정수이고 각각의 m은 독립적으로 0 내지 10의 정수이다. 일부 구체예에서, 펩티드 링커는  $(Gly_4-Ser)_m$  이고, 여기서 m 은 0 내지 10의 정수이다. 일부 구체예에서, 펩티드 링커는  $(Gly_4-Ala)_m$  이고, 여기서 m은 0 내지 10의 정수이다. 링커의 예는 특정 구체예를 포함하나, 이에 제한되지는 않고, 하나 이상의 링커는  $G_4S$  반복체(repeats), 예를 들어 Gly-Ser 링커 GGGGS (서열 번호 34) 또는  $(GGGGS)_m$  을 포함하며, 여기서 m은 1 과 같거나 1 보다 큰 양의 정수이다. 예를 들어, m = 1, m = 2, m = 3, m = 4, m = 5 및 m = 6, m = 7, m = 8, m = 9 및 m = 10 이다. 일부 구체예에서, 상기 링커는  $(GGGGS)_3$  또는  $(GGGGS)_4$ 를 포함하지만 이에 제한되지 않는 GGGGS (서열 번호 34)의 복수의 반복을 포함한다. 일부 구체예에서, Ser은 Ala, 예를 들어  $(GGGGA)$ (서열 번호 35) 또는  $(GGGGA)_m$  과 같은 링커 G/A 로 대체될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 링커는 GGGGA(서열번호35)의 복수의 반복을 포함한다. 다른 구체예에서, 링커는 GGGGS (서열 번호 34)와 GGGGA(서열 번호 35)의 조합과 배수를 포함한다.
- [0148] [00119] 일부 구체예에서, 링커는 상기 아미노산 서열 GGGSGGGSGGGGS(서열번호 2)를 포함한다. 일부 구체예에서, 링커는 상기 아미노산 서열 GSADGGSSAGGSDAG(서열번호4)를 포함한다. 일부 구체예에서, 링커는 상기 아미노산 서열 GSSGG(서열번호6)를 포함한다. 일부 구체예에서, 링커는 상기 아미노산 서열 SSSSGSSSGSSSG(서열번호8)를 포함한다. 일부 구체예에서, 링커는 상기 아미노산 서열 GGGAKGGGKAGGGS(서열번호9)를 포함한다. 일부 구체예에서, 링커는 상기 아미노산 서열 GGGGDGGGDGGGGS(서열번호10)를 포함한다. 일부 구체예에서, 링커는 상기 아미노산 서열GGGGSGGGSGGGGS(서열번호11)를 포함한다. 일부 구체예에서, 링커는 상기 아미노산 서열 GGGSGGGGEGGGGS(서열번호12)를 포함한다. 일부 구체예에서, 링커는 상기 아미노산 서열 AEAANKAEAAKEAAKA(서열번호13)를 포함한다. 일부 구체예에서, 링커는 상기 아미노산 서열 APAPAPAPAPAP(서열번호14)를 포함한다. 일부 구체예에서, 링커는 상기 아미노산 서열 APAPAPAPAPAP(서열번호15)를 포함한다.
- [0149] [00120] Anti-EDB linked IL-12
- [0150] [00121] 본 발명은, 무엇보다도, 암을 포함하여 EDB-피브로넥틴의 발현과 관련된 질병 또는 장애를 치료하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. IL-12의 암-유도 전달(cancer-directed delivery)을 달성하기 위한 표적으로서 피브로넥틴을 이용하는 새로운 조성물 및 방법이 본원에 기재되어 있다. 이러한 접근법은 전신 독성을 감소시키고 IL-12의 치료 범위(therapeutic window)를 확대시키면서 IL-12의 치료 잠재력을 최대로 활용하게 한다.
- [0151] [00122] 비록 IL-12 및 EDB 피브로넥틴 표적화 도메인을 포함하는 다른 작체물들이 앞서 기재되었지만,

현재 개시된 조성물들은 놀라운 정도로 우수하다.

- [0152] [00123] 그 내용이 본원에 참조로 포함된 W02006/119897은 "L19" 로 명명된 EDB 피브로넥틴 표적화 항체와 조합된 3 종류의 상이한 분자 형태의 IL-12를 개시하고 있다.
- [0153] [00124] 한 포맷은 도 7A에 도시된 바와 같이 sc(IL-12)-scFv(L19) 였다. 2 개의 서브유닛이 펩티드 링커를 통해 연결된 IL-12 이중 이량체로 구성된 이 포맷(따라서, "단일 사슬 "IL-12, 또는 sc (IL-12))과 상기 IL-12는 제 2 펩티드 링커를 통해 역시 단일 사슬 Fv 포맷(따라서, scFv(L19))인 L19 항체에 연결된다. 이 포맷은 종래 기술에서 발견한 것과 일치하는 적당한 종양-표적화 능력을 보여 주었다.
- [0154] [00125] 다른 포맷은 도 7B에 도시된 바와 같이 sc(IL-12) SIP (L19)의 동중 이량체였다. SIP 포맷("작은 면역 단백질")은 W02003/076469의 출원인들에 의해 개발되었으며 "미니 항체"라고도 불린다. SIP는 CH4 도메인에 연결된 scFv를 포함하는 2 개의 서브 시스템으로 구성된 동중 이량체이다. 2 개의 CH4 도메인은 이항화 결합에 의해 서로 연결되어 있다. SIP 포맷을 사용하여 L19의 종양-표적화 특성이 개선될 수 있다는 선행 기술의 지적에도 불구하고, 이 결합체(conjugate)의 증가된 종양 흡수(tumor uptake)는 관찰되지 않았다.
- [0155] [00126] 도 7C에 도시된 바와 같이, 다른 포맷은 이항화 결합에 의해 서로 연결된 IL-12 p40 및 p35 서브유닛의 이중 이량체였고, 각각의 서브유닛은 scFv(L19)에 융합되어 scFv(L19)-p35/p40-scFv(L19) 이중 이량체를 형성하였다. 상기 이중 이량체 포맷으로, 조성물의 종양 흡수에서 현저한 개선이 성취되었다.
- [0156] [00127] 그 내용이 본원에 참조로 포함된 W02013/014149에서, 본 출원인은 "F8" 로 명명된 항-EDA 피브로넥틴 종양 표적화 항체에 결합된 2 개의 새로운 IL-12의 대안적 분자 포맷을 개시하였다.
- [0157] [00128] 거기에, IL-12 면역결합체(immunoconjugates)의 다른 포맷으로서 " 단일 사슬 디아바디(single chain diabody)"를 포함한다. 이것은 본질적으로 더 긴-15 개의 아미노산-펩티드 링커에 의해 서로 연결된 짧은- 5 개의 아미노산-링커(따라서 "디아바디"를 형성함) 를 갖는 2 개의 scFv 항체로 구성된다.
- [0158] [00129] 단일 특이적 F8 단일 사슬 디아바디(도 8B 참조)에 융합된 IL-12를 나타내는 분자 포맷(도 8B 참조)은 종양 표적화 측면에서 (i) L19 변이체에서 W02006/119897에 개시된 최상의 포맷인 것으로 입증된 scFv(F8)-p35/p40-scFv(F8) 이중 이량체(도 8A) 또는 (ii) 디아바디에 연결된 2 개의 IL-12 분자(도 8C) 보다 우수함이 입증되었다.
- [0159] [00130] L19
- [0160] [00131] 본원에 사용된 "L19 항체"는 EDB 피브로넥틴 또는 이의 부분에 결합하는 임의의 항체를 의미하며, 하기 아미노산 서열 중 하나 이상에 대해 적어도 75%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다:
- [0161] [00132] L19 VH (서열번호 7)
- [0162] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSI SGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPPFYFDYWGQGTILVTVSS
- [0163] [00133] L19 VL (서열번호 5)
- [0164] EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIK
- [0165] [00134] CDR1 VH (서열번호 28)
- [0166] SFSMS
- [0167] [00135] CDR2 VH (서열번호 29)
- [0168] SISGSSGTTYADSVKG
- [0169] [00136] CDR3 VH (서열번호 30)
- [0170] PFPYFDY
- [0171] [00137] CDR1 VL (서열번호 31)
- [0172] RASQSVSSSFLA

- [0173] [00138] CDR2 VL (서열번호 32)
- [0174] YASSRAT
- [0175] [00139] CDR3 VL (서열번호 33)
- [0176] QQTGRIPPT
- [0177] [00140] L19 Diabody (서열번호 36)
- [0178] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIIGSSGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPPFYFDYWGQGLTVTVSSGSSGGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIK
- [0179] [00141] **약학적 조성물**
- [0180] [00142] 본 발명의 또 다른 양태는 적어도 하나의 본 발명의 결합체(conjugate) 및 임의로 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0181] [00143] 본 발명의 약학적 조성물은 전형적으로 치료 유효량의 본 발명에 따른 결합체 및 임의로 약학적으로 허용되는 부형제(들)와 같은 보조 물질을 포함한다. 상기 약학적 조성물은 약학 분야에 잘 알려진 방식으로 제조된다. 담체 또는 부형제는 유효 성분을 위한 비히클 또는 배지로서 작용할 수 있는 액체 물질일 수 있다. 적합한 담체 또는 부형제는 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 안정화제, 항산화제, pH 조절 물질, 제어 방출 부형제를 포함한다.
- [0182] [00144] 본 발명의 약학적 제제는 예를 들어 비경구용으로 적합화 될 수 있고 용액 등의 형태로 환자에게 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물을 포함하는 조성물은 환자에게 투여될 수 있다. 투여는 바람직하게는 "치료적 유효량"으로 수행되는데, 이는 환자에게 충분히 이롭기 때문이다. 이러한 이점은 적어도 하나의 증상의 적어도 개선일 수 있다. 실제 투여량, 투여 속도 및 시간 경과에 따라 치료 대상의 성질 및 심각성에 따라 달라질 수 있다. 치료 처방(예; 복용량 등에 대한 결정)은 일반 개업의 및 기타 의사들이 책임 분야이다. 치료는 의사의 판단에 따라 매일, 일주일에 두 번, 매주 또는 매월 간격으로 반복될 수 있다.
- [0183] [00145] 경구 투여용 약학적 조성물은 정제, 캡슐, 분말 또는 액체 형태일 수 있다. 정제는 젤라틴 또는 보조제와 같은 고체 담체를 포함할 수 있다. 액체 약학적 조성물은 일반적으로 물, 석유, 동물성 또는 식물성 오일, 미네랄 오일 또는 합성 오일과 같은 액체 담체를 포함한다. 생리 식염수, 텍스트로스 또는 다른 당류 용액 또는 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 글리콜이 포함될 수 있다.
- [0184] [00146] 정맥 내 주사, 또는 고통 부위의 주사를 위해, 유효 성분은 발열원이 없고(pyrogen-free) 적당한 pH, 등장성 및 안정성을 갖는 비경구적으로 허용되는 수용액의 형태일 것이다. 당업자는 예를 들어 염화나트륨 주사제, 링거 주사제, 링거 젯산 주사제(Lactated Ringer's Injection)와 같은 등장성 비히클을 사용하여 적합한 용액을 제조할 수 있다. 방부제, 안정화제, 완충액, 산화 방지제 및/또는 기타 첨가제가 필요에 따라 포함될 수 있다.
- [0185] [00147] 본 명세서에 개시된 실시예들은 서로 관련이없는 개별적 실시예로서 이해되도록 의도된 것이 아님을 이해해야 한다. 특정 실시예와 관련하여 논의된 특징들은 본 명세서에 제시된 다른 실시예들과도 관련하여 개시되도록 의도된다. 하나의 경우에, 특정 특징이 일 실시예와 함께 개시되지 않고 다른 실시예와 함께 개시되는 경우, 당업자는 상기 특징이 상기 다른 실시예와 조합하여 개시되는 것을 의미하지만은 않는다는 것을 이해할 것이다. 당업자는 다른 실시예에 대해서도 상기 특징을 개시하는 것이 본 출원의 요지라는 것을 이해하겠지만, 명료성 및 명세서를 관리 가능한 부피로 유지하려는 목적을 위해, 상기가 이루어지지 않았다는 것을 이해할 것이다.
- [0186] [00148] 또한, 본원에 언급된 참고 문헌의 내용은 참조로 포함된다. 이는 특히 표준 또는 일상적인 방법을 공개하는 종래 기술 문서에 관한 것이다. 이 경우, 참조에 의한 통합은 주로 충분한 실시가능한 개시를 제공하고 긴 반복을 피하고자 하는 목적을 갖는다.
- [0187] [00149] 일반적으로, 본 발명의 조성물은 세포, 조직, 기관 또는 환자의 특정 표적 구조에 결합할 수 있으며, 이들 표적 구조는 EDB 결합 도메인을 포함하는 펩티드 또는 단백질의 특이성에 의해 정의된다.
- [0188] [00150] 일단 표적에 도달하면, IL-12는 T-세포 및 자연 살해 세포로부터 IFN $\gamma$ 의 생성을 자극하고, 또

한 Th1 헬퍼 세포의 분화를 유도한다. IL-12는 선천적 및 세포-매개 면역의 주요 매개자이다. 작체물에 EDB 결합 도메인을 포함하는 펩티드 또는 단백질이 신생 물성(neoplasticity)(예; 종양, 혈액 질환 또는 암으로 변형되는 과정에 있는 세포)을 특성화하는 표적 구조(예; 수용체 또는 세포 외 매트릭스 단백질)에 특이적인 경우, 상기 조성물의 결합은 IL-12 매개된 강력한 항암 및 항전이 활성을 유발한다.

- [0189] [00151] 놀랍게도 출원인들은 GSADGGSSAGGSDAG를 포함하는 아미노산 모티프를 포함하는 링커가 IL-12를 EDB 결합 도메인(즉, W02013/014149에 개시된 바와 같은 디아바디)을 포함하는 펩티드 또는 단백질에 연결하는데 사용될 경우, 더 우수한 종양 표적화 성능 및 우수한 생산 수율이 달성될 수 있음을 발견하였다. 동시에, 이 변이체의 결합 거동(binding behaviour)은 본원에서 "이전(Old)"으로 별칭되고 W02013/014149에 개시된 더 짧은 GSADGG 링커의 결합 거동보다 우수하다.
- [0190] [00152] 출원인들은 먼저 단일 사슬 디아바디 포맷(huIL-12L19L19)에서 사이토카인과 L19 단일 사슬 디아바디 사이에 상이한 폴리펩티드 링커를 갖는 L19 항체에 결합된 인간 IL-12의 8 개의 클론을 평가하고 특성화하였다.
- [0191] [00153] 5 개의 클론을 명명하였다: (i) "AKKAS", (ii) "DDS", (iii) "(G4S)<sub>3</sub>", (iv) "SAD" 및 (v) "SES" 에는 면역 사이토카인과 재조합 항체의 결합(conjugation)을 위한 링커가 포함되어 있고, 서로 다른 전하 특성(중성, 양전하, 음전하)으로 인해 선택되었다.
- [0192] [00154] (vi) Alpha3, (vii) AP6 및 (viii) AP7 로 명명된 3 개의 추가 클론을 개발하였다. 이 3 개의 클론과 관련하여 Chen et al (2013)에 보고된 원칙을 고려하여 시행하였다. 본 검토는 강한 링커가 더 나은 안정성을 가질 수 있고 사이토카인과 항체 사이의 올바른 거리를 유지하여 치료 효능을 증가시킬 수 있음을 암시한다.
- [0193] [00155] 링커 (i)-(viii) 중 어느 것도 본 특정 면역 사이토카인에서 이전에 테스트되지 않았다.
- [0194] [00156] 놀랍게도 "SAD"링커는 (iii) 다른 클론들과 비교하여 ED-B에 대한 결합 거동을 손상시키지 않으면서, (i) 종양 표적화 성능 및 (ii) EDB 결합 도메인을 포함하는 펩티드 또는 단백질에 결합된 IL-12의 생산 수율을 크게 향상시킨다는 것이 밝혀졌다. Chen에 의해 보고된 원리들을 고려 함에도 불구하고, "이전(Old)" 클론 및 기타 본원에 기재된 다른 신규 변이체들 모두와 비교했을 때, 오직 SAD 링커 만이 다수의 우수한 특성을 갖는 조성물을 생성하였다는 것은 매우 놀라운 일이다.
- [0195] [00157] 마지막으로, W02013/014149에 개시된 링커를 포함하는 "이전(Old)"으로 명명된 제 9 클론을 "SAD" 링커와 비교하였다. 놀랍게도, 서열의 첫 부분을 "이전(Old)" 링커와 공유함에도 불구하고, "SAD" 링커는 ED-B보다 우수한 결합 친화도를 갖는 것으로 밝혀졌다.
- [0196] [00158] 또한, 크기 배제 크로마토그래피 후, "SAD" 링커는 "이전(Old)" 링커와 비교하여 더 높은 단량체 부분을 나타내며, 이는 전체 결합체(conjugate)의 조립이 보다 효율적임을 의미한다. "SAD" 링커에 의해 제공된 더 높은 단량체 부분은 전반적인 제조 수율을 증가시킬 것으로 기대된다.
- [0197] [00159] 본원에서 사용된 용어 "단일 사슬 디아바디"는 짧은 링커, 바람직하게는 3 내지 10 개의 아미노산 길이, 보다 바람직하게는 5 개의 아미노산 길이("디아바디"로도 알려짐)를 갖는, 더 긴 링커, 바람직하게는 5 내지 20 개의 아미노산 길이, 보다 바람직하게는 15 개의 아미노산 길이에 의해 다음 scheme (N->C 배향)에 따라 서로 연결된, 2 개의 단일 사슬 Fv (scFv) 항체의 작체물에 관한 것이다: L19VH-링커3-L19VL-링커4-L19VH-링커3-L19VL.
- [0198] [00160] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 이중 이량체 IL-12 단백질의 첫 번째 서브유닛은 p40이고, 두 번째 서브유닛은 p35이다.
- [0199] [00161] 상기에서 논의된 바와 같이, EDA 또는 EDB 도메인을 포함하는 피브로넥틴 이소형은 정상 성인 조직에서 제한적으로 존재하는 것과는 대조적으로, 발달 상의 중요성 및 종양에서 이의 재-발현으로 인해 태아 종양(oncofetal) 형태로 알려져 있다.
- [0200] [00162] 이들 이소형은 또한 발달에서 핵심적 생리학적 과정이며 암 진행에서 종양 세포에 의해 요구되는 혈관 신생의 중요한 마커로서 인식된다.
- [0201] [00163] 따라서, 상기 피브로넥틴의 엑스트라 도메인 B(ED-B)는 본원에 논의된 면역 사이토카인의 사용을 포함하여 항암 요법에 있어서 매력적 표적이다.

- [0202] [00164] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 단일 사슬 디아바디는 관심 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 상보성 결정 영역(CDRs)을 갖는 항원-결합 부위 또는 VH 및/또는 VL 도메인(예; 피브로넥틴의 엑스트라 도메인 B의 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 하나 이상의 CDR 또는 VH 및/또는 VL 도메인)을 포함할 수 있다.
- [0203] [00165] 항원 결합 부위는 상보성 결정 영역(CDR)의 배열에 의해 제공될 수 있다. CDR 또는 CDR 세트를 운반하기 위한 구조는 일반적으로 항체 중쇄 또는 경쇄 서열 또는 이의 상당 부분일 것이며, 여기서 상기 CDR 또는 CDR 세트는 재배열된 면역글로불린 유전자에 의해 코딩된 자연 발생 VH 및 VL 항체 가변 도메인의 CDR 또는 CDR 세트에 상응하는 위치에 위치된다. 상기 면역글로불린 가변 도메인의 구조 및 위치는 Kabat 등의 문헌(Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4<sup>th</sup> Edition, US Department of Health and Human Services (1987))을 참조하여 결정할 수 있고, 인터넷에서 업데이트 버전(at immuno.bme.nwu.edu 또는 서치 엔진을 사용하여 "Kabat"을 검색)을 볼 수 있다.
- [0204] [00166] CDR 영역 또는 CDR에 의해, Kabat 등에 의해 정의된 바와 같은 면역 글로불린의 중쇄 및 경쇄의 초가변 영역(hypervariable regions)을 나타내는 것으로 의도된다 (Kabat *et al.* (1987) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4<sup>th</sup> Edition, US Department of Health and Human Services (Kabat *et al.*, (1991a), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>th</sup> Edition, US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington, 및 이후 버전들). 항체는 전형적으로 3 개의 중쇄 CDR 및 3 개의 경쇄 CDR을 포함한다. CDR 또는 CDR이라는 용어는, 경우에 따라, 항원 또는 항원이 인식하는 에피토프에 대한 항체의 친화력에 의해 결합을 담당하는 아미노산 잔기의 대부분을 함유하는 영역들 중 하나 또는 이들 영역의 일부 또는 전체를 나타내기 위해 사용된다.
- [0205] [00167] 따라서, 단일 사슬 디아바디는 1, 2, 3, 4, 5 또는 6 개의 CDR, 또는 항체 L19의 VH 및/또는 VL 도메인을 갖는 항원-결합 부위를 포함할 수 있다.
- [0206] [00168] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 단일 사슬 디아바디는 서열번호 28 내지 33에 제시된 항체 L19의 상보성 결정 영역(CDR)을 갖는 항원 결합 부위를 포함할 수 있다. 상기 항원 결합 부위는 서열번호 7 및 5에 각각 제시된 항체 L19의 VH 및/또는 VL 도메인을 포함할 수 있다.
- [0207] [00169] 항원-결합 부위는 항체 L19의 1, 2, 3, 4, 5 또는 6 개의 CDR을 포함할 수 있다. 상기 L19의 CDR의 아미노산 서열들은 하기와 같다:
- [0208] 서열번호 28 (VH CDR1);
- [0209] 서열번호 29 (VH CDR2);
- [0210] 서열번호 30 (VH CDR3);
- [0211] 서열번호 31 (VL CDR1);
- [0212] 서열번호 32 (VL CDR2), 및/또는
- [0213] 서열번호 33 (VL CDR3)
- [0214] [00170] 서열번호 28 내지 30은 인간 모노클로날 항체 L19의 VH CDR 영역(각각 1 내지 3)의 아미노산 서열들이다. 서열번호 31 내지 33은 인간 모노클로날 항체 L19의 VL CDR 영역(각각 1 내지 3)의 아미노산 서열들이다. 항체 L19의 VH 및 VL 도메인의 아미노산 서열은 각각 서열번호 7 및 5에 해당한다.
- [0215] [00171] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 단일 사슬 디아바디는 적어도 하기 중 하나를 포함하며:
- [0216] a) 본원에서 서열번호 28 내지 30으로 정의된 3 개의 중쇄 CDR 및 본원에서 서열번호 31 내지 33으로 정의된 3 개의 경쇄 CDR을 포함하는 세트;
- [0217] b) 본원에서 서열번호 7 로 정의된 VH의 3 개의 중쇄 CDR 세트 및 본원에서 서열번호 5 로 정의된 VL의 3 개의 경쇄 CDR 세트;
- [0218] c) 피브로넥틴의 엑스트라 도메인 B (ED-B)에 결합하는 능력을 유지하면서, a) 또는 b)의 중쇄 CDR/경쇄 CDR의 조합 (단, 상기 CDR 중 적어도 하나가 a) 또는 b)에 명시된 바와 같이 각각의 CDR에 대해 최대 3 개의 아미노산

치환을 가짐);

- [0219] d) 피브로넥틴의 엑스트라 도메인 B (ED-B)에 결합하는 능력을 유지하면서, a) 또는 b)의 중쇄 CDR/경쇄 CDR의 조합 (단, 상기 CDR 중 적어도 하나가 a) 또는 b)에 명시된 바와 같이 각각의 CDR에 대해 66% 이상의 서열 동일성을 가짐),
- [0220] 여기서 CDR은 피브로넥틴의 엑스트라 도메인 B (ED-B)에 결합할 수 있도록 적합한 단백질 골격에 내재된다 (embedded).
- [0221] [00172] 일부 구체예에서, 상기 CDR 중 적어도 하나는 각각의 CDR에 대해 67% 이상, 바람직하게는 68% 이상, 더 바람직하게는 69% 이상, 70% 이상, 71% 이상, 72% 이상, 73% 이상, 74% 이상, 75% 이상, 76% 이상, 77% 이상, 78% 이상, 79% 이상, 80% 이상, 81% 이상, 82% 이상, 83% 이상, 84% 이상, 85% 이상, 86% 이상, 87% 이상, 88% 이상, 89% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 가장 바람직하게는 99% 이상의 서열 동일성을 가진다.
- [0222] [00173] 다른 실시예에서, 상기 CDR 중 적어도 하나는 친화도 성숙(affinity maturation) 또는 다른 변형에 의해 변형되어, 상기 개시된 서열들과 비교하여 서열 변형을 초래한다.
- [0223] [00174] 일부 구체예에서, 상기 CDR 중 적어도 하나는 a) 또는 b)에 명시된 바와 같이 각각의 CDR에 대해 최대 2 개 및 바람직하게는 1 개의 아미노산 치환을 가진다.
- [0224] [00175] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 단일 사슬 디아바디는 피브로넥틴의 엑스트라 도메인 B (ED-B)에 결합하는 능력을 유지하면서, 적어도 하기 중 하나를 포함한다:
- [0225] a) 서열번호 7 및 5에 기재된 항체 L19의 VH 및 VL 도메인;
- [0226] b) a)의 중쇄/경쇄 가변 도메인 서열 쌍 (단, 상기 도메인 중 적어도 하나는 서열번호 7 또는 서열번호 5 각각에 대하여 80% 이상의 서열 동일성을 가짐), 및/또는
- [0227] c) a)의 중쇄/경쇄 가변 도메인 서열 쌍 (단, 상기 도메인 중 적어도 하나는 서열번호 7 또는 서열번호 5 각각에 대하여 최대 10 개의 아미노산 치환을 가짐).
- [0228] [00176] 일부 구체예에서, 상기 도메인 중 적어도 하나는 서열번호 7 또는 서열번호 5 각각에 대하여 81% 이상, 바람직하게는 82% 이상, 보다 바람직하게는 83% 이상, 84% 이상, 85% 이상, 86% 이상, 87% 이상, 88% 이상, 89% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 가장 바람직하게는 99% 이상의 서열 동일성을 가진다.
- [0229] [00177] 일부 구체예에서, 상기 도메인 중 적어도 하나는 서열번호 7 또는 서열번호 5 각각에 대하여 최대 9 개, 바람직하게는 최대 8 개, 보다 바람직하게는 최대 7, 6, 5, 4, 3 또는 2 개, 및 가장 바람직하게는 1 개의 아미노산 치환을 가진다.
- [0230] [00178] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 단일 사슬 디아바디에서 적어도 하나의 아미노산 치환은 보존적 아미노산 치환이다.
- [0231] [00179] 추가 구체예에 따르면, 상기 조성물은 "[p40]-[링커1]-[p35]-[SAD링커]-[L19VH]-[링커3]-[L19VL]-[링커4]-[L19VH]-[링커3]-[L19VL]"의 전장(full-length) 구조를 가진다.
- [0232] [00180] 추가 구체예에 따르면, 상기 조성물은 서열번호 16에 따른 전장(full-length) 서열을 가진다.
- [0233] [00181] **장애(Disorders)**
- [0234] [00182] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면,
- [0235] 신생물 질환(neoplastic disease)의 발생이
- [0236] · 진단되거나,
- [0237] · 이로 인해 고통받고 있거나, 또는
- [0238] · 이의 위험이 있는
- [0239] 인간 또는 동물 대상체의 치료, 또는 이러한 상태의 예방을 위한 (의약의 제조를 위한) 상기 기재에 따른 조성물의 용도가 제공된다.

- [0240] [00183] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 인간 또는 동물 대상체의 혈관 신생의 억제에 있어서 (의약의 제조를 위한) 조성물의 용도가 제공된다.
- [0241] [00184] 따라서, 본원에 기재된 결합체(conjugate)는 생체 내에서 IL-12를 신경 구조에 표적화함으로써 신생물 질환을 치료하거나 혈관 신생을 억제하는 방법에 사용될 수 있다.
- [0242] [00185] 상기 용어 "신생물 질환(neoplastic disease)"은 종양 및 혈액 질환을 포함한 악성 형질 전환 및 암을 포함한다.
- [0243] [00186] 또한 제제, 특히 치료제(예; IL-12)를 환자의 신생 혈관(neovasculature)에 표적화함으로써 암을 치료하거나 혈관 신생을 억제하는 방법도 고려되며, 여기서 상기 방법은 치료 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 결합체를 환자에게 투여하는 것을 포함한다. 본원에 기재된 바와 같은 조성물을 사용하여 치료 가능한 상태는 암, 기타 종양 및 신생물 상태를 포함한다. 상기 조성물은 신생 혈관 형성을 억제하여 류마티스 관절염, 당뇨병성 망막증, 나이-관련 근육 변성, 혈관종(angiomias), 종양 및 암을 치료하는데 사용될 수 있다. 상기 치료는 예방 치료를 포함할 수 있다. 상기 조성물은 또한 예를 들어 진단 방법(예; 상기 상태 중 임의의 것과 관련될 수 있는 혈관 형성의 표적화 및 진단)으로 투여될 수 있다. 조성물에 포함된 단백질 치료제 또는 진단제의 성질 및 표적화 부분의 특이성에 따라 다른 질환 및 상태 역시 진단 및 치료할 수 있다.
- [0244] [00187] 본원에 기재된 바와 같은 치료에 적합한 암은 임의의 유형의 고형 또는 비-고형암 또는 악성 림프종 및 특히 간암, 림프종, 백혈병(예; 급성 골수성 백혈병), 육종, 피부암, 방광암, 유방암, 자궁암, 난소암, 전립선 암, 폐암, 대장암(colorectal cancer), 자궁 경부암(cervical cancer), 두경부암, 식도암, 췌장암, 신장 암, 위암 및 뇌암을 포함한다. 암은 가족 내력적(familial)이거나 산발적일 수 있다. 암은 전이성이거나 또는 전이성이 아닐 수 있다.
- [0245] [00188] 바람직하게는, 상기 암은 신장암, 유방암, 간암, 폐암, 림프종, 육종(예; 위장관 기질 종양(gastrointestinal stromal tumor)), 피부암(예; 흑색종), 대장암(colorectal cancer), 및 신경 내분비 종양으로 이루어진 군으로부터 선택된 암이다.
- [0246] [00189] 일부 구체예에서, 상기 신생물 질환(neoplastic disease)은 ED-B 피브로넥틴의 발현 또는 과발현을 특징으로 한다.
- [0247] [00190] 본 발명의 조성물은 임의의 적합한 경로를 통해 치료가 필요한 환자에게, 통상적으로 혈류 내 및/또는 치료될 부위(예; 종양 또는 종양 혈관 구조(vasculature))로 직접 주사함으로써 투여할 수 있다. 정확한 용량 및 투여 빈도는 인자의 수, 치료 경로, 치료될 부위의 크기 및 위치(예; 종양)에 따라 달라지게 된다.
- [0248] [00191] 반응성과 관련하여, 대상체에서 암의 매개 변수(예; 혈액암, (예; 암세포 성장, 증식 및/또는 생존))가 지연되거나(retarded) 검출 가능한 양(예; 임의의 적절한 측정(예; 질량, 세포 수 또는 부피)에 의해 결정되는 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 이상)만큼 감소되는 경우, 대상체는 치료에 반응한다. 일 실시예에서, 대상체가 치료를 받지 않을 경우의 예상 수명보다 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% 또는 그 이상의 연장된 기대 수명을 경험하는 경우, 상기 대상체는 치료에 반응한다. 다른 실시예에서, 대상체가 무병 생존율, 전체 생존율 또는 진행 시간이 증가된 경우, 상기 대상체는 치료에 반응한다. 예를 들어 종양학의 NCCN 임상 실무 지침(NCCN Guidelines<sup>®</sup>)에 의해 제공된 기준을 포함하여 대상체가 치료에 반응하는지 여부를 결정하기 위해 여러 가지 방법을 사용할 수 있다.
- [0249] [00192] **병용 요법(Combination Therapy)**
- [0250] [00193] 조성물은 치료될 상태에 따라 동시에 또는 순차적으로 단독으로 또는 다른 치료와 함께 투여될 수 있다. 다른 치료는 비-스테로이드 성 항염증제(예; 아스피린, 이부프로펜 또는 케토프로펜) 또는 모르핀, 또는 진토제(antiemetics)와 같은 아편제(opiate)와 같은 적절한 용량의 진통제 투여를 포함할 수 있다.
- [0251] [00194] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 상기 조성물 또는 상기 기재에 따른 약학적 조성물 및 하나 이상의 치료학적 활성 화합물의 조합이 제공된다.
- [0252] [00195] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 상기 조성물, 상기 약학적 조성물, 또는 상기에 따른 조합물(combination)을 이를 필요로 하는 대상체에게 유효량으로 투여하는 것을 포함하는 ED-B 피브로넥틴의 발현 또는 과발현과 관련된 장애 또는 상태를 치료 또는 예방하는 방법이 제공된다.
- [0253] [00196] **키트 (Kits)**

- [0254] [00197] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면,
- [0255] a) 상기 조성물, 상기 약학적 조성물 또는 상기에 따른 조합물(combination),
- [0256] b) 상기 조성물, 조성물 또는 조합물을 투여하기 위한 장치, 및
- [0257] c) 사용 지침
- [0258] 을 포함하는 부분으로 이루어진 치료 키트가 제공된다.
- [0259] [00198] 일부 구체예에서, 이러한 부품 키트는 적합한 환자 리플렛(patient leaflet)이 제공된 미리 채워진 주사기를 포함한다. 다른 실시예에서, 이러한 부품 키트는 적합한 사용자 지침을 갖는 주입 병(infusion bottle)을 포함한다.
- [0260] [00199] 키트의 성분은 바람직하게는 멸균되고 밀봉된 바이알 또는 다른 용기에 보관된다.
- [0261] [00200] 키트는 본원에 기재된 방법에서 성분의 사용을 위한 지침을 추가로 포함할 수 있다. 상기 키트의 성분은 용기, 예를 들어 백(bag), 박스, 병(jar), 주석 또는 블리스터 팩(blister pack)에 포함되거나 포장될 수 있다.
- [0262] [00201] **실시예**
- [0263] [00202] 본 발명이 도면 및 상기 설명에서 자세히 도시 및 설명되었지만, 이러한 도시 및 설명은 예시적이거나 실례적인 것으로서 제한되지 않으며; 본 발명은 개시된 실시예에 제한되지 않는다. 개시된 실시예에 대한 다른 변형은 상기 도면, 개시 및 첨부된 청구 범위를 연구하여 청구된 발명을 실시함에 있어 당업자에 의해 이해되고 달성될 수 있다. 청구 범위에서, "포함하는(comprising)"이라는 단어는 다른 요소 또는 단계를 배제하지 않으며, 부정 관사 "a" 또는 "an"은 복수를 배제하지 않는다. 특정 수단들(measures)이 서로 다른 종속항들에서 인용된다는 사실은 이들 수단들(measures)의 조합이 유리하게 사용될 수 없다는 것으로 이해해서는 안 된다. 청구 범위의 임의의 참조 부호는 그 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.
- [0264] [00203] 본원에 개시된 모든 아미노산 서열은 N-말단에서 C-말단으로 나타내며; 본원에 개시된 모든 핵산 서열은 5' → 3'으로 표시된다.
- [0265] [00204] **실시예 1**
- [0266] [00205] 출원인들은 놀랍게도 특정 링커가 IL-12를 단일 사슬 디아바디에 결합시키는데 사용될 때(즉, WO2013/014149에 개시된 우수한 포맷), 더 우수한 종양 표적화 성능 및 우수한 생산 수율이 달성될 수 있음을 발견하였다.
- [0267] [00206] 출원인들은 사이토카인과 L19 단일 사슬 디아바디 사이에 상이한 폴리펩티드 링커를 가지는 단일 사슬 디아바디 포맷(huIL-12L19L19)에서 L19 항체에 결합된 8 개의 인간 IL-12 클론을 평가하고 특성화하였다.
- [0268] [00207] 5 개의 클론을 명명하였다: (i) "AKKAS", (ii) "DDS", (iii) "(G4S)<sub>3</sub>", (iv) "SAD" 및 (v) "SES" 에는 면역 사이토카인과 재조합 항체의 결합(conjugation)을 위한 링커가 포함되어 있고, 서로 다른 전하 특성(중성, 양전하, 음전하)으로 인해 선택되었다.
- [0269] [00208] (vi) Alpha3, (vii) AP6 및 (viii) AP7 로 명명된 3 개의 추가 클론을 개발하였다. 이 3 개의 클론과 관련하여 Chen et al (2013)에 보고된 교시를 고려하여 시행하였다. 본 검토는 강한 링커가 더 나은 안정성을 가질 수 있고 사이토카인과 항체 사이의 올바른 거리를 유지하여 치료 효능을 증가시킬 수 있음을 암시한다.
- [0270] [00209] 링커 (i)-(viii) 중 어느 것도 본 특정 면역 사이토카인에서 이전에 테스트되지 않았다.
- [0271] [00210] 놀랍게도 "SAD"링커는 다른 클론들과 비교하여 ED-B에 대한 결합능을 동일한 수준으로 유지하면서, 종양 표적화 성능(tumor targeting performance) 및 단일 사슬 디아바디에 결합된 IL-12의 생산 수율을 크게 향상시킨다는 것이 밝혀졌다.
- [0272] [00211] **재료 및 방법 (Materials & Methods)**
- [0273] [00212] 실시예에서 테스트된 변이체들은 하기와 같은 공통 구조를 가진다.

**표 1**

도메인 (N->C)	p40	링커1	p35	링커2	L19VH	링커3	L19VL	링커4	L19VH	링커3 /5	L19VL
서열번호	1	2	3	4, 9-15	7	6	5	8	7	6	5

[0274]

[0275]

[00213] 상이한 변이체들(본원에서 "클론"으로도 불리움)은 표 2에 상세히 기재된 바와 같이 링커 2의 서열에서 서로 상이하다.

**표 2**

링커 2	서열번호	서열
AKKAS	9	GGGAKGGGKAGGGS
DDS	10	GGGDGGGDGGGS
(G4S) <sub>3</sub>	11	GGGSGGGSGGGS
SAD	4	GSADGGSSAGSDAG
SES	12	GGGSGGGEGGGGS
Alpha3	13	AEAAAKEAAAKEAAKA
AP6	14	APAPAPAPAPAP
AP7	15	APAPAPAPAPAPAP

[0276]

[0277]

[00214] 상이한 링커를 갖는 8 개의 융합 단백질의 클로닝

[0278]

[00215] 상기 huIL-12L19L19 코딩 서열은 상이한 PCR 단편을 조립함으로써 생성되었다: L19 항체 및 IL12 탑재물(payload). 이미 생성된 융합 단백질 L19-IL2 주형으로부터 적합한 프라이머를 사용하여 L19 유전자를 PCR 증폭시켰다. 적합한 프라이머를 사용하여 제 2 L19 유전자를 PCR 증폭시켰다.

[0279]

[00216] 동시에, 이미 생성된 IL12-기반 번역 사이토카인으로부터 적합한 프라이머를 사용하여 IL-12의 p35 도메인 유전자의 일부를 PCR 증폭시켰다. 2 개의 중간 단편을 PCR-조립하고 (P35-L19 단편을 생성하기 위해) BamHI/BspEI로 이중 절단 후 p35를 포함하는 이중 절단 벡터로 클로닝하였다. 새로 생성된 p35-L19 벡터를 이어서 BspEI/NotI-HF로 이중 절단(digest)하고 제 2 L19 디아바디 단편 유전자와 결합시켰다. 단편 p35-L19L19를 BamHI/NotI-HF에 의해 절단(digest) 후, p40 서브유닛 유전자를 보유하는 이미 이중 절단된, p40 서브유닛 유전자를 보유한 포유동물 세포 발현 벡터 pcDNA3.1(+에 클로닝하여, 전장 IL12-L19L19를 수득하였다.

[0280]

[00217] IL12와 단일 사슬 디아바디 L19 단편 사이의 상이한 링커를 단편 "A" (링커로 p35의 일부를 코딩함) 및 단편 "B" (링커 및 항체의 일부를 코딩함)의 PCR 어셈블리에 의해 삽입하였다. 주형 IL12-L19L19로부터 적합한 프라이머를 사용하여 상이한 프라이머 "A" 및 단편 "B"를 증폭하였다.

[0281]

[00218] 클론 AP7을 위해 설계된 클로닝 전략을 통해 돌연변이 클론 (AP6)을 생성하였다. 모든 PCR 산물을 BamHI-HF 및 BspEI 제한 효소로 이중 절단 후 P35-L19L19 pcDNA3.1 플라스미드에 결합시켰다. 생성된 플라스미드를 증폭시키고, NotI-HF 및 BamHI-HF 제한 효소로 이중 절단 후, 상기 인서트(insert)를 IL12 를 포함하는 pcDNA3.1 플라스미드에 서브-클로닝하였다. 생성된 DNA 플라스미드를 증폭시킨 후 세포 형질감염에 사용하였다.

[0282]

[00219] 상이한 링커를 갖는 8 개의 융합 단백질의 발현 정제 (Expression purification)

[0283]

[00220] 다양한 인간 IL-12 융합체의 생산을 위해, 현탁액 중 CHO-S 세포를 사용하였다. 상기 huIL-12L19L19 변이체들을 일시적(transient) 유전자 발현을 사용하여 발현시켰다. 1 ml 생산을 위하여, 현탁액 중  $4 \times 10^6$  CHO-S 세포를 원심분리하고 CHO-S에 적합한 1 mL의 배지에 재현탁시켰다. 이어서, 백만 세포 당 0.625  $\mu$ g의 플라스미드 DNA에 이어서 2.5  $\mu$ g의 폴리에틸렌 이민(PEI; pH 7.0의 물에 1 mg/mL 용액)을 세포에 첨가하고 부드럽게 혼합하였다. 상기 형질감염된 배양물을 31°C 진탕 배양기에서 6 일 동안 배양하였다.

[0284]

[00221] 최종적으로, 일시적인 유전자 발현에 의해 생성된 상기 융합 단백질들을 단백질 A 친화성 크로

마토그래피에 의해 세포 배양 배지로부터 정제한 후 PBS에 대해 투석하였다.

- [0285] [00222] **SDS-PAGE**
- [0286] [00223] 상기 융합 단백질들의 정확한 분자량은 환원 및 비환원 조건 하에서 SDS-PAGE 10% 및 SDS-PAGE 12%에 의해 분석되었다.
- [0287] [00224] **효소면역분석법(ELISA)**
- [0288] [00225] 다양한 IL-12 융합체의 올바른 결합을 확인하기 위해, Elisa 플레이트를 50 ug/ml 피브로넥틴 도메인 7B89로 밤새 코팅하였다 (W02001/062800 A1 참조, 이의 내용은 본원에 참조로 포함됨). 상기 면역사이토 카인은 10 ug/ml 및 1 ug/ml 에서 테스트하였다. 2차 시약으로서, 단백질 A 서양 고추냉이 퍼옥시다제를 사용하였다. 상기 분석은 BM-Blue POD 가용성 기질로 발색시켰다. 333 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 를 첨가하여 비색반응(colorimetric reaction)을 중단시킨 후 마이크로 타이터 플레이트 리더를 사용하여 450 nm 및 650 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.
- [0289] [00226] **크기 배제 크로마토그래피 및 비아 코어 (Size exclusion chromatography and Biacore)**
- [0290] [00227] 크기-배제 크로마토그래피를 Superdex 200 증가 칼럼을 사용하여 ÄKTA FPLC 시스템에서 수행하였다. 표면 플라즈몬 공명 실험 친화도 측정은 피브로넥틴 7B89 도메인 코팅된 CM5 칩상에서 정제된 huIL-12L19L19 클론을 갖는 Biacore X100 기기를 사용하여 수행하였다. 샘플은 1 μM 내지 250 nM 범위의 농도로 연속 희석하여 주입하였다.
- [0291] [00228] **면역형광 (Immunofluorescence)**
- [0292] [00229] 다양한 huIL-12 융합체의 암세포 결합 능력을 확인하기 위해, 동결된 동계 F9 기형 암종 표본 동결 절편(frozen syngeneic F9 teratocarcinoma specimen cryostat sections; 8 um)에 대해 면역형광을 수행하였다. 종양 슬라이스를 빙냉 아세톤(5 분)으로 고정시켰다. 고정 후, 커버 슬립을 세척 후 45 분 동안 PBS 중 20% 소 태아 혈청으로 블로킹하였다. 5 μg/ml 농도의 HuIL-12L19L19 클론을 실온에서 1 시간 동안 2% BSA/PBS 용액에 첨가하였다. 이어서, 커버 슬립을 PBS로 2 회 세척 후, 2 차 항체 마우스 항-인간 인터루킨-12 (최종 희석 1:1000)을 2% BSA/PBS 용액에 실온에서 1 시간 동안 첨가하였다. 이어서, 커버 슬립을 다시 PBS로 2 회 세척 후, 3 차 항체 염소 항-마우스(최종 희석 1:500)를 첨가하였다. DAPI 는 핵을 대비 염색(counterstain)하는 데 사용하였다.
- [0293] [00230] **방사성 표지 및 생체 내 종양 표적화 (Radiolabelling and *in vivo* tumor targeting)**
- [0294] [00231] 다양한 IL-12 융합체의 생체 내 종양 결합 능력을 확인하기 위해, 이들의 표적화 능력을 생체 분포 분석(biodistribution analysis)에 의해 평가하였다. IL-12L19L19 클론 각각 100 μg을 <sup>125</sup>I 및 클로라민 T 수화물로 방사선 요오드화한 후 PD10 칼럼에서 정제하였다. 방사선 표지된 단백질을 피하(s.c.) 이식된 F9 마우스 기형 암종(teratocarcinoma)을 갖는 면역 적격(immunocompetent) 마우스의 측면 꼬리 정맥에 주사하였다. 마우스 당 주사 용량은 4 내지 9 μg으로 다양하였다. 주사 24 시간 후에 마우스들을 희생시켰다. Packard Cobra 감마 카운터를 사용하여 각 기관의 무게를 측정하고 방사능을 계산하였다. 대표적인 기관들의 방사능 함량은 조직 그램 당 주사된 용량의 백분율 (%ID/g ± 표준 오차)로 표현하였다.
- [0295] [00232] **결과**
- [0296] [00233] **클로닝, 발현 및 SDS-PAGE**
- [0297] [00234] huIL-12L19L19 융합 단백질의 8 가지 변이체를 사이토카인과 L19 단일 사슬 디아바디 사이에 상이한 폴리펩티드 링커를 사용하여 각각 성공적으로 클로닝하였다. SDS-PAGE 특성화는 모든 변이체에 대해 약 120 kDa의 분자량을 나타냈으며, 이는 예상되는 단백질 크기(약 109 kDa가 글리코실화되지 않음)를 확인하였다. 상기 발현은(CHO-S 세포에서 일시적인 유전자 발현에 의해) 모든 변이체가 3.5 내지 5 mg/L의 범위를 가짐을 결정하였다. 놀랍게도, "SAD" 라는 별칭을 갖는 클론은 나머지 7 개의 클론의 수율보다 현저히 높은 9 mg/L의 수율을 나타내었다. 결과는 도 1b에 도시되어 있다.
- [0298] [00235] **효소면역분석법(ELISA)**
- [0299] [00236] ELISA 에서, 8 개의 클론(Alpha3, AP6, AP7, DDS, SES, AKKAS, (G4S)<sub>3</sub> 및 SAD)은 모두 인간

피브로넥틴의 도메인 7B89에 대한 결합(10 µg/ml 및 1 µg/ml 농도 둘 모두)을 확인하였다. 결과는 도 2에 도시되어 있다.

[0300] [00237] **비아코어 (BiaCore)**

[0301] [00238] 인간 피브로넥틴 코팅된 칩의 도메인 7B89에 대한 보다 정확한 친화력 상수 결정을 비아코어 분석에 의해 수행하였다 (도 3a 및 도 3b). 샘플을 연속 희석, 1000 nM, 750 nM, 500 nM 및 250 nM (도 3a 및 도 3b)과 동일한 농도로 주입 하였다. 겔보기 KD(apparent KD)는 Biacore X100 평가 소프트웨어를 이용하여 추정하였다.

[0302] [00239] **크기 배제 크로마토그래피 (Size exclusion chromatography)**

[0303] [00240] 8 개의 클론(Alpha3, AP6, AP7, DDS, SES, AKKAS, (G4S)<sub>3</sub> 및 SAD)을 크기 배제 크로마토그래피 (SEC-200 증가)로 특성화하였고, 여기서 모든 클론은 단량체성 면역 사이토카인(도 4a 및 도 4b)에 상응하는 주요 피크와 비슷한(comparable) 프로파일을 나타내었다.

[0304] [00241] **면역형광 (Immunofluorescence)**

[0305] [00242] Alpha3, AP6, AP7, DDS, SES, AKKAS, (G4S)<sub>3</sub> 및 SAD 클론에 대하여 동결된 동계 F9 기형 암종 표본 동결 절편 (frozen syngeneic F9 teratocarcinoma specimen cryostat section; 8 µm)에서 면역 형광 실험을 수행하였다. 모든 클론은 음성 대조군(도 5a 내지 도 5c)과 비교하여 혈관 구조(vasculature)에 특이적인 결합을 보였다.

[0306] [00243] **생체 내 종양 표적화 (In vivo tumor targeting)**

[0307] [00244] 생체 내 표적화를 생체 분포 분석에 의해 평가하였다. 양성 대조군(L19 단일 사슬 디아바디가 묶인 IL-12에 결합됨(joined)) 및 상기 8 개의 클론(Alpha3, AP6, AP7, DDS, SES, AKKAS, (G4S)<sub>3</sub> 및 SAD)을 <sup>125</sup>I 로 방사선 요오드화한 후, 피하(s.c.) 이식된 F9 마우스 기형 암종(teratocarcinoma)을 갖는 면역 적격 (immunocompetent) 마우스에 주사하였다 (4-9g 단백질/동물). 주사 후 24 시간에 측정된 방사능은 모든 클론에 대해 종양에 축적된 것으로 나타났지만, "SAD" 클론은 나머지 7 개의 클론에 비해 종양에서 우수한 축적을 나타내었다 (도 6a 내지 도 6c).

[0308] [00245] **실시예 2**

[0309] [00246] 다른 일련의 비교 실험에서, 놀랍게도 "SAD" 링커는, 결합 능력, 단량체 프로파일 및 종양 표적화 능력의 관점에서 W02013/014149에 개시된 이전(old) (그리고 더 짧은) GSADGG 링커(서열번호 26) 보다 우수하다는 것이 밝혀졌다.

[0310] [00247] **재료 및 방법**

[0311] [00248] 본 실시예에서 테스트된 변이체들은 하기와 같은 공통 구조를 가진다:

**표 3**

[0312]	도메인 (N->C)	p40	링커 1	p35	링커2	L19VH	링커 3	L19VL	링커4	L19VH	링커3 /5	L19VL
	서열번호	1	2	3	4, 26	7	6	5	8	7	6	5

[0313] [00249] 상이한 변이체들(본원에서 "클론" 으로도 불리움)은 링커 2의 서열에서 서로 상이하다.

**표 4**

[0314]	링커 2	서열번호	서열
	SAD	4	GSADGGSSAGGSDAG
	Old	26	GSADGG

[0315] [00250] **융합 단백질의 클로닝(Cloning of fusion proteins)**

- [0316] [00251] 단일 사슬 디아바디 포맷으로 6 개 또는 15 개 아미노산 링커를 통해 L19 항체에 융합된(즉, 각각 huIL-12L19L19 "이전(Old)" 및 huIL-12L19L19 "SAD" 변이체), huIL-12를 포함하는 융합 단백질들을 상기 라인을 따라 클로닝하였다.
- [0317] [00252] **융합 단백질의 발현 (Expression of fusion proteins)**
- [0318] [00253] 단일 사슬 디아바디 포맷으로 6 개 또는 15 개 아미노산 링커를 통해 L19 항체에 융합된(즉, 각각 huIL-12L19L19 "이전(Old)" 및 huIL-12L19L19 "SAD" 변이체), huIL-12를 포함하는 융합 단백질들을 현탁액 적응된 CHO 세포 배양에서 일시적(transient) 유전자 발현에 의해 생성하였다. 형질감염 후 세포를 진탕 조건 하에 31°C에서 6 일 동안 ProCHO-4 배지 (4 mM 울트라 글루타민이 보충됨)에 유지시킨 후, 배양 상청액을 원심 분리에 의해 수확하고 상기 융합 단백질을 정제하기 위해 추가 처리하였다.
- [0319] [00254] **단백질 A 수지를 사용한 융합 단백질 정제 (Purification of fusion proteins using protein A resin)**
- [0320] [00255] 형질감염된 CHO 세포 현탁 배양물을 4°C에서 5000 rpm으로 30 분 동안 원심 분리하였다. 상청액을 0.45 µm 필터를 사용하여 여과하여 추가 정제하였다. 단백질 A 수지를 상기 여과된 상청액에 첨가하고 혼합물을 약 1 시간 동안 진탕 조건 하에서 배양하였다. 상기 수지를 액체 크로마토그래피 칼럼에 수집하고, "버퍼 A" (100 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.1% 트윈 20 in PBS pH 7.4)로 세척한 후, "버퍼 B"(500 mM NaCl 0.5 mM EDTA in PBS pH 7.4)로 2 차 세척하였다. huIL-12를 포함하는 융합 단백질을 100 mM TEA를 사용하여 중력 흐름에 의해 용리시켰다. 분취액을 수집 후, UV 분광 분석법에 의해 확인된 바와 같이 융합 단백질을 포함하는 분획을 모아서(pooling) 밤새 PBS에 대해 투석하였다.
- [0321] [00256] **융합 단백질의 크기 배제 크로마토그래피 (Size exclusion chromatography of fusion proteins)**
- [0322] [00257] 융합 단백질의 크기 배제 크로마토그래피는 ÄKTA-FPLC 시스템에서 러닝 버퍼(running buffer)로서 PBS와 함께 Superdex 200 증가 10/300 GL 칼럼을 사용하여 수행하였다. 100 µl 단백질 용액을 루프에 주입하여 자동으로 상기 칼럼에 주입하였다. 280 nm에서 UV 흡광도를 시간 경과에 따라 평가하였다. 상기 융합 단백질의 SEC 프로파일을 UNICORN 소프트웨어의 피크 통합 기능을 사용하여 분석하여 총% 면적 또는 피크% 면적에 대한 단량체 분율의 백분율을 정량화하였다. 샘플 로딩 또는 샘플 버퍼에 존재하는 염으로 인한 피크 아티팩트(peak artifacts)를 배제하기 위해, 보유량 5 내지 17.5 mL 사이의 간격 만을 정량화를 위해 고려하였다.
- [0323] [00258] **비아코어 (BIAcore)**
- [0324] [00259] 표면 플라즈몬 공명 실험 친화도 측정은 새로 피브로넥틴 7B89 도메인 코팅된 CM5 칩 상에서 정제된 "이전(Old)" 클론 및 "SAD" 클론을 갖는 BiacoreX100 기기에 의해 수행되었다. 샘플을 연속 희석, 250 nM, 125 nM 및 62.5 nM (도 10)의 농도로 주입하였다. 겔보기 KD(apparent KD)는 Biacore X100 평가 소프트웨어에 의해 추정하였다.
- [0325] [00260] **방사성 표지 및 생체 내 종양 표적화 (Radiolabelling and *In vivo* tumor targeting)**
- [0326] [00261] 정제된 단백질 샘플 huIL-12L19L19 "SAD" (링커 GSADGGSSAGGSDAG, 서열번호 4) 및 huIL-12L19L19 "Old" (링커 GSADGG, 서열번호 26) (100 µg)를 <sup>125</sup>I 및 클로라민 T 수화물로 방사선 요오드화한 후 PD10 칼럼에서 정제하였다. 단백질 A 친화성 크로마토그래피 후에 단백질을 방사성 요오드화하였다. 피하 이식된 F9 뮤린 기형 암종(teratocarcinoma)을 보유하는 면역 적격(immunocompetent) (129/Sv) 마우스의 측면 꼬리 정맥에 단백질을 주입하였다. 마우스 당 주사 용량은 10 내지 11µg 사이에서 다양하였다. 주사 후 24 시간에 마우스들을 희생시켰다. Packard Cobra 감마 카운터를 사용하여 각 기관 샘플의 무게를 측정하고 방사능을 계산하였다. 서로 다른 기관에서의 단백질 흡수는 조직 그램 당 주사된 용량의 백분율(%ID/g ± 표준 오차)로 표현하였다. 종양으로의 단백질 흡수는 Tarli 등(1999)에 따른 종양 성장에 의해 조절되었다.
- [0327] [00262] **결과**
- [0328] [00263] **융합 단백질의 발현 및 정제 및 크기 배제 크로마토그래피 (Expression and purification of fusion proteins and Size Exclusion Chromatography)**
- [0329] [00264] 상기 두 변이체(huIL-12L19L19 "SAD" 및 huIL-12L19L19 "이전(Old)")를 CHO 세포에서 일

시적 유전자 발현에 의해 생성하였다. 실험은 복수로 수행되었으며, 여기서 두 세트의 생산 실험이 각각 다른 날에 수행되어 배치 A 및 B를 각각 생성하였다. 단백질-A 친화성 크로마토그래피에 의한 단일 단계 정제 및 PBS 에 대한 투석, 단백질 샘플의 균질성을 크기 배제 크로마토그래피(도 9)에 의해 평가하였다. 상기 두 단백질 변이체는 초기 보유 부피에서 용리되는 고분자량 변이체의 존재에 의해 강조된 바와 같이 일정한 정도의 단백질 응집을 나타내었다. 두 경우 모두, 상기 huIL-12L19L19 "SAD" 는 UNICORN 소프트웨어의 피크 통합 기능을 사용하여 단백질의 단량체 부분의 정량화에 의해 확인된 바와 같이 더 양호한 프로파일을 나타내었다. 실제로, 상기 huIL-12L19L19 "SAD" 변이체는 huIL-12L19L19 "이전(Old)"과 비교할 때 응집 경향이 더 낮았으며, 이는 상기 단량체 피크 면적을 기준선 위의 곡선 아래 전체 면적의 백분율로(평균값: 각각 54.57% 대(vs) 46.69%) 또는 상기 단량체 피크 면적을 모든 통합된 피크의 합의 백분율로서(평균값: 각각 58.83% 대(vs) 52.74%) (표 5) 고려한 것이다.

[0330] [00265]

표 5

[0331]

단백질	링커 길이 (아미노산)	배치	단량체 피크 보유 부피 (mL)	단량체 피크 면적 / 총 면적 (*)(%)	평균 면적 / 총 면적 (*)(%)	단량체 피크 면적 / 피크 면적 (°)(%)	Mean Area / 총 면적 (°)(%)
huIL-12L19L19 "SAD"	15	A	11.70	54.06	54.57	58.51	58.83
huIL-12L19L19 "SAD"	15	B	11.72	55.08		59.14	
huIL-12L19L19 이전(Old)"	6	A	11.87	46.73	46.69	48.99	52.74
huIL-12L19L19 "이전(Old)"	6	B	11.86	46.65		56.48	

[0332]

[00266] 표 5: UNICORN 소프트웨어의 피크 통합 기능에 의해 평가된 상이한 용합 단백질의 모노머 분율 (fraction)의 정량화. \* 피크 면적은 베이스라인 위에서 커브 아래의 전체면적의 퍼센트이고, ° 피크 면적은 전체 통합된 피크의 합계의 퍼센트이다.

[0333]

[00267] 비아코어 (Biacore)

[0334]

[00268] 겔보기 KD(apparent KD)를 Biacore X100 평가 소프트웨어에 의해 "이전(Old)" 클론 (링커 GSADGG 를 가진 huIL-12L19L19 "이전(Old)")의 경우 6.7 nM 로, 링커 GSADGGSSAGGSDAG를 가진 "SAD"클론 ("HIL-12L19L19"SAD ")의 경우 3.8 nM 로 추정하였다 (도 10).

[0335]

[00269] 생체 내 종양 표적화 (In vivo tumor targeting)

[0336]

[00270] 상기 주사 후 24 시간 동안 측정된 방사능은 "SAD" 클론이 "이전(Old)" 클론과 비교할 때 예상치 못한 우수한 종양 흡수를 나타냄을 보여 주었다 (도 11).

[0337]

[00271] 실시예 3

[0338]

[00272] 상기 huIL-12L19L19 "SAD" 변이체의 효능은 악성 흑색종, 비소세포 폐암(NSCLC), 신장 세포 암종, 요로상피 암종, 두경부 편평 세포 암종(HNSCC), 고빈도-현미부수체 불안정성(microsatellite instability-high; MSI-H) 또는 불일치 복구 결핍 전이성 대장암(mismatch repair deficient (dMMR) metastatic colorectal cancer), 간세포암, 위암, 피부 편평 세포 암종(squamous cell carcinoma of the skin), 자궁 경부암(cervical cancer) 및 미만성 거대 B 세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma; DLBCL) 를 가진 인간 환자에서 평가된다. 환자들 중 적어도 한 명의 코호트는 즉각적인 선행 치료로서 투여된 면역 체크 포인트 차단 요법(immune checkpoint blockade therapy)-기반 요법에서 질병 진행을 나타낸다.

[0339]

[00273] 환자들은 huIL-12L19L19 "SAD" 변이체를 8 주 동안 매주 1 회 정맥 내 주사로 투여받았다. 환

자들은 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 12  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 16  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 또는 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 용량을 투여받았다.

- [0340] [00274] 환자들은 치료 시작 후 6 개월 동안 또는 동의 또는 진행성 질환이 철회될 때까지 추적하게 된다.
- [0341] [00275] IL12-L19L19L19-L12의 약동학적 분석은 상기 융합 분자 및 IL12 부분의 샌드위치 포획 (sandwich capture)을 사용하여 평가된다. 인간 항 융합 단백질 항체(Human anti-fusion protein antibodies; HAFA)는 표면 플라즈몬 공명 분석 및 샌드위치 포획에 의해 테스트된다. 항 종양 활성(예; 효능)은 고형 종양에 대해 RECIST(버전 1.1)를 사용하거나 악성 림프종 평가 기준에 대한 루가노(LUGANO) 기준에 의해 8 주, 16 주 및 24 주차에 평가된다.
- [0342] [00276] **추가 실시예들**
- [0343] [00277] 제 1 세트의 실시예들에 따라 하기가 제공된다:
- [0344] [00278] 1. a) 제 1 및 제 2 서브유닛을 가지는 이중 이량체 IL-12 단백질;
- [0345] b)단일 사슬 디아바디; 및
- [0346] c) SAD 를 포함하는 아미노산 모티프를 포함하는 링커인, 상기 IL-12 단백질과 상기 단일 사슬 디아바디 사이의 링커
- [0347] 를 포함하는 것인 결합체(conjugate).
- [0348] [00279] 2. 상기 1.에 있어서, 상기 SAD 링커가 아미노산 모티프 GSADGGSSAGGSDAG (서열 번호 4)를 포함하는 것인 결합체(conjugate).
- [0349] [00280] 3. 상기 1. 내지 2. 중 어느 하나에 있어서, 상기 이중 이량체 IL-12 단백질의 첫번째 서브유닛은 p40 이고, 두번째 서브유닛은 p35 인 것인 결합체(conjugate).
- [0350] [00281] 4. 상기 1. 내지 3. 중 어느 하나에 있어서, 상기 단일 사슬 디아바디는 단일 특이적 (monospecific)이거나 이중 특이적(bispecific)인 것인 결합체(conjugate).
- [0351] [00282] 5. 상기 1. 내지 4. 중 어느 하나에 있어서, 상기 단일 사슬 디아바디는 피브로넥틴의 엑스트라-도메인 B (extra-domain B; ED-B)에 결합하는 것인 결합체(conjugate).
- [0352] [00283] 6. 상기 1. 내지 5. 중 어느 하나에 있어서, 상기 단일 사슬 디아바디는 2 개의 L19 VH 도메인 및 2 개의 L19 VL 도메인을 포함하는 것인 결합체(conjugate).
- [0353] [00284] 7. 상기 1. 내지 6. 중 어느 하나에 있어서, 상기 결합체(conjugate)는 전장(full-length) 구조 [p40]-[링커1]-[p35]-[SAD 링커]-[L19VH]-[링커3]-[L19VL]-[링커4]-[L19VH]-[링커3]-[L19VL] 를 가지는 것인 결합체(conjugate).
- [0354] [00285] 8. 상기 1. 내지 7. 중 어느 하나에 있어서, 상기 결합체(conjugate)는 서열번호 16 에 따른 전장 서열을 가지는 것인 결합체(conjugate).
- [0355] [00286] 9.
- [0356] 신생물 질환(neoplastic disease)의 발생이
- [0357] · ● 진단되거나,
- [0358] · ● 이로 인해 고통받고 있거나, 또는
- [0359] · ● 이의 위험이 있는
- [0360] 인간 또는 동물 대상체의 치료, 또는 이러한 상태의 예방을 위한 (의약의 제조를 위한) 상기 1. 내지 8. 중 어느 하나에 따른 결합체(conjugate)의 용도.
- [0361] [00287] 10. 인간 또는 동물 대상체에서 신생 혈관의 억제를 위한 (의약의 제조를 위한)상기 상기 1. 내지 8. 중 어느 하나에 따른 결합체(conjugate)의 용도.
- [0362] [00288] 11. 적어도 상기 1. 내지 8. 중 어느 하나에 따른 결합체(conjugate)와 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 것인 약학적 조성물.

- [0363] [00289] 12. (i) 상기 1. 내지 8. 중 어느 하나에 따른 결합체(conjugate) 또는 상기 11.에 따른 약학적 조성물 및 (ii) 하나 이상의 치료학적 활성 화합물을 포함하는 조합물(combination).
- [0364] [00290] 13. 상기 1. 내지 8. 중 어느 하나에 따른 결합체(conjugate), 상기 11.에 따른 약학적 조성물, 또는 상기 12.에 따른 조합물(combination)을 이를 필요로 하는 대상체에게 유효량으로 투여하는 것을 포함하는 ED-B 피브로넥틴의 발현 또는 과발현과 관련된 장애 또는 상태를 치료 또는 예방하는 방법.
- [0365] [00291] 14.
- [0366] a) 상기 1. 내지 8. 중 어느 하나에 따른 결합체(conjugate), 상기 11.에 따른 약학적 조성물 또는 상기 12.에 따른 조합물(combination),
- [0367] b) 상기 결합체(conjugate)를 투여하기 위한 장치, 조성물 또는 조합물, 및
- [0368] c) 사용 지침
- [0369] 을 포함하는 부분으로 이루어진 치료 키트.
- [0370] [00292] 제 2 세트의 실시예들에 따라 하기가 제공된다:
- [0371] [00293] 1.
- [0372] a) 제 1 및 제 2 서브유닛을 가지는 이중 이량체 IL-12 단백질;
- [0373] b) 단일 사슬 디아바디; 및
- [0374] c) GSADGGSSAGGSDAG(서열번호 4)를 포함하는 아미노산 모티프를 포함하는 링커인, 상기 IL-12 단백질과 상기 단일 사슬 디아바디 사이의 링커
- [0375] 를 포함하는 것인 결합체(conjugate).
- [0376] [00294] 2. 상기 1.에 있어서, 상기 이중 이량체 IL-12 단백질의 첫번째 서브유닛은 p40 이고, 두번째 서브유닛은 p35 인 것인 결합체(conjugate).
- [0377] [00295] 3. 상기 1. 내지 2. 중 어느 하나에 있어서, 상기 단일 사슬 디아바디는 단일 특이적(monospecific)이거나 이중 특이적(bispecific)인 것인 결합체(conjugate).
- [0378] [00296] 4. 상기 1. 내지 3. 중 어느 하나에 있어서, 상기 단일 사슬 디아바디는 피브로넥틴의 엑스트라-도메인 B (extra-domain B; ED-B)에 결합하는 것인 결합체(conjugate).
- [0379] [00297] 5. 상기 1. 내지 4. 중 어느 하나에 있어서, 상기 단일 사슬 디아바디는 2 개의 L19 VH 도메인 및 2 개의 L19 VL 도메인을 포함하는 것인 결합체(conjugate).
- [0380] [00298] 6. 상기 1. 내지 5. 중 어느 하나에 있어서, 상기 상기 결합체(conjugate)는 전장(full-length) 구조 [p40]-[링커1]-[p35]-[SAD 링커]-[L19VH]-[링커3]-[L19VL]-[링커4]-[L19VH]-[링커3]-[L19VL] 를 가지는 것인 결합체(conjugate).
- [0381] [00299] 7. 상기 1. 내지 6. 중 어느 하나에 있어서, 상기 결합체(conjugate)는 서열번호 16 에 따른 전장 서열을 가지는 것인 결합체(conjugate).
- [0382] [00300] 8.
- [0383] 신생물 질환(neoplastic disease)의 발생이
- [0384] · ● 진단되거나,
- [0385] · ● 이로 인해 고통받고 있거나, 또는
- [0386] · ● 이의 위험이 있는
- [0387] 인간 또는 동물 대상체의 치료, 또는 이러한 상태의 예방을 위한 (의약의 제조를 위한) 상기 1. 내지 7. 중 어느 하나에 따른 결합체(conjugate)의 용도.
- [0388] [00301] 9. 인간 또는 동물 대상체에서 신생 혈관의 억제를 위한 (의약의 제조를 위한) 상기 상기 1. 내지 7. 중 어느 하나에 따른 결합체(conjugate)의 용도.

- [0389] [00302] 10. 적어도 상기 1. 내지 7. 중 어느 하나에 따른 결합체(conjugate)와 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 것인 약학적 조성물.
- [0390] [00303] 11. (i) 상기 1. 내지 7. 중 어느 하나에 따른 결합체(conjugate) 또는 상기 10.에 따른 약학적 조성물 및 (ii) 하나 이상의 치료학적 활성 화합물을 포함하는 조합물(combination).
- [0391] [00304] 12. 상기 1. 내지 7. 중 어느 하나에 따른 결합체(conjugate), 상기 10.에 따른 약학적 조성물, 또는 상기 11.에 따른 조합물(combination)을 이를 필요로하는 대상체에게 유효량으로 투여하는 것을 포함하는 ED-B 피브로넥틴의 발현 또는 과발현과 관련된 장애 또는 상태를 치료 또는 예방하는 방법.
- [0392] [00305] 13.
- [0393] a) 상기 1. 내지 7. 중 어느 하나에 따른 결합체(conjugate), 상기 10.에 따른 약학적 조성물 또는 상기 11.에 따른 조합물(combination),
- [0394] b) 상기 결합체(conjugate)를 투여하기 위한 장치, 조성물 또는 조합물, 및
- [0395] c) 사용 지침
- [0396] 을 포함하는 부분으로 이루어진 치료 키트.
- [0397] [00306] 제 3 세트의 실시예들에 따라 하기가 제공된다:
- [0398] [00307] 1.
- [0399] a) 제 1 및 제 2 서브유닛을 가지는 이중 이량체 IL-12 단백질;
- [0400] b) 단일 사슬 디아바디; 및
- [0401] c) GSADGGSSAGGSADG(서열번호 4)를 포함하는 아미노산 모티프를 포함하는 링커인, 상기 IL-12 단백질과 상기 단일 사슬 디아바디 사이의 링커
- [0402] 를 포함하는 것인 결합체(conjugate).
- [0403] [00308] 2. 상기 1.에 있어서, 상기 이중 이량체 IL-12 단백질의 첫번째 서브유닛은 p40 이고, 두번째 서브유닛은 p35 인 것인 결합체(conjugate).
- [0404] [00309] 3. 상기 1. 내지 2. 중 어느 하나에 있어서, 상기 단일 사슬 디아바디는 단일 특이적(monospecific)이거나 이중 특이적(bispecific)인 것인 결합체(conjugate).
- [0405] [00310] 4. 상기 1. 내지 3. 중 어느 하나에 있어서, 상기 단일 사슬 디아바디는 피브로넥틴의 엑스트라-도메인 B (extra-domain B; ED-B)에 결합하는 것인 결합체(conjugate).
- [0406] [00311] 5. 상기 1. 내지 4. 중 어느 하나에 있어서, 상기 단일 사슬 디아바디는 서열번호 28 내지 33에 기재된 항체 L19의 상보성 결정 영역 (CDR)을 갖는 항원-결합 부위를 포함하는 것인 결합체(conjugate).
- [0407] [00312] 6. 상기 1. 내지 5. 중 어느 하나에 있어서, 상기 단일 사슬 디아바디는 서열번호 7 및 5에 기재된 항체 L19의 VH 및 VL 도메인을 포함하는 것인 결합체(conjugate).
- [0408] [00313] 7. 상기 1. 내지 6. 중 어느 하나에 있어서, 상기 단일 사슬 디아바디는,
- [0409] 상기 피브로넥틴의 엑스트라-도메인 B (ED-B)에 결합하는 능력을 유지하면서
- [0410] a) 상기 도메인 중 적어도 하나가 서열 번호 7 또는 서열 번호 5에 대해 각각 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 조건 하에서 상기 6.의 중쇄/경쇄 변량 도메인 서열 및/또는
- [0411] b) 상기 도메인 중 적어도 하나가 각각 서열 번호 7 또는 서열 번호 5에 대해 최대 10 개의 아미노산 치환을 갖는 조건 하에서 상기 6.의 중쇄/경쇄 변량 도메인 서열
- [0412] 중 적어도 하나를 포함하는 것인 결합체(conjugate).
- [0413] [00314] 8. 상기 1. 내지 7. 중 어느 하나에 있어서, 상기 단일 사슬 디아바디에 있어서 적어도 하나의 아미노산 치환은 보존적 아미노산 치환인 것인 결합체(conjugate).
- [0414] [00315] 9. 상기 1. 내지 8. 중 어느 하나에 있어서, 상기 단일 사슬 디아바디는

- [0415] · 상기 5. 또는 6.의 항체들 중 하나와 비교하여, 상기 피브로넥틴의 엑스트라-도메인 B (ED-B)에 대해 50% 이상의 표적 결합 친화도를 가지고, 및/또는
- [0416] · 상기 5. 또는 6.의 항체들 중 하나와 상기 피브로넥틴의 엑스트라-도메인 B (ED-B)에 결합하기 위해 경쟁하는 것인 결합체(conjugate).
- [0417] [00316] 10. 상기 1. 내지 9. 중 어느 하나에 있어서, 상기 단일 사슬 디아바디는 2 개의 L19 VH 도메인 및 2 개의 L19 VL 도메인을 포함하는 것인 결합체(conjugate).
- [0418] [00317] 11. 상기 1. 내지 10. 중 어느 하나에 있어서, 상기 결합체(conjugate)는 전장(full-length) 구조 [p40]-[링커1]-[p35]-[SAD 링커]-[L19VH]-[링커3]-[L19VL]-[링커4]-[L19VH]-[링커3]-[L19VL] 를 가지는 것인 결합체(conjugate).
- [0419] [00318] 12. 상기 1. 내지 11. 중 어느 하나에 있어서, 상기 결합체(conjugate)는 서열번호 16 에 따른 전장 서열을 가지는 것인 결합체(conjugate).
- [0420] [00319] 13.
- [0421] 신생물 질환(neoplastic disease)의 발생이
- [0422] · ● 진단되거나,
- [0423] · ● 이로 인해 고통받고 있거나, 또는
- [0424] · ● 이의 위험이 있는
- [0425] 인간 또는 동물 대상체의 치료, 또는 이러한 상태의 예방을 위한 (의약의 제조를 위한) 상기 1. 내지 11. 중 어느 하나에 따른 결합체(conjugate)의 용도.
- [0426] [00320] 14. 인간 또는 동물 대상체에서 신생 혈관의 억제를 위한 (의약의 제조를 위한) 상기 1. 내지 12. 중 어느 하나에 따른 결합체(conjugate)의 용도.
- [0427] [00321] 15. 적어도 상기 1. 내지 12. 중 어느 하나에 따른 결합체(conjugate)와 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 것인 약학적 조성물.
- [0428] [00322] 16. (i) 상기 1. 내지 12. 중 어느 하나에 따른 결합체(conjugate) 또는 상기 15.에 따른 약학적 조성물 및 (ii) 하나 이상의 치료학적 활성 화합물을 포함하는 조합물(combination).
- [0429] [00323] 17. 상기 1. 내지 12. 중 어느 하나에 따른 결합체(conjugate), 상기 15.에 따른 약학적 조성물, 또는 상기 16.에 따른 조합물(combination)을 이를 필요로 하는 대상체에게 유효량으로 투여하는 것을 포함하는 ED-B 피브로넥틴의 발현 또는 과발현과 관련된 장애 또는 상태를 치료 또는 예방하는 방법.
- [0430] [00324] 18.
- [0431] a) 상기 1. 내지 12. 중 어느 하나에 따른 결합체(conjugate), 상기 15.에 따른 약학적 조성물 또는 상기 16.에 따른 조합물(combination),
- [0432] b) 상기 결합체(conjugate)를 투여하기 위한 장치, 조성물 또는 조합물, 및
- [0433] c) 사용 지침
- [0434] 을 포함하는 부분으로 이루어진 치료 키트.
- [0435] [00325] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 SAD 링커는 아미노산 모티프 GSADGGSSAGGSDAG(서열 번호 4)를 포함한다. 본원에서 사용된 용어 "단일 사슬 디아바디"는 짧은 링커, 바람직하게는 5 개의 아미노산 길이를 갖는, 더 긴 링커, 바람직하게는 5 내지 15 개의 아미노산 길이에 의해 다음 scheme (N->C 배향) 에 따라 서로 연결된, 2 개의 단일 사슬 Fv (scFv) 항체의 작체물에 관한 것이다: L19VH-링커<sub>3</sub>-L19VL-링커<sub>4</sub>-L19VH-링커<sub>3</sub>-L19VL.
- [0436] [00326] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 링커<sub>3</sub> 은 GSSGG(서열번호 6)이고 링커<sub>4</sub> 는 SSSSGSSSSGSSSSG(서열 번호 8)이다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 이중 이량체 IL-12 단백질의 첫번째 체 서브유닛은 p40 이고, 두번째 체 서브유닛은 p35 이다. 바람직하게는, 두 가지 서브유닛은 하기 scheme (N->C 배향)에 따라 주어진 링커에

의해 서로 결합된다: p40- 링커<sub>1</sub>-p35.

- [0437] [00327] 바람직하게 IL-12 는 인간 IL-12 이다. 바람직한 실시예에서, 링커 1은 GGGGSGGGSGGGGS (서열 번호 2)이다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 단일 사슬 디아바디는 단일 특이적(monospecific)이거나 이중 특이적(bispecific) 이다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 단일 사슬 디아바디는 피브로넥틴의 스플라이스 이소형에 결합한다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 단일 사슬 디아바디는 피브로넥틴의 엑스트라-도메인 B (extra-domain B; ED-B)에 결합한다.
- [0438] [00328] 참조 문헌 (그 개시 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.)
- [0439] Car et al., Toxicologic Pathology (1999), 27(1), 58-63
- [0440] Chen et al., Adv Drug Deliv Rev. (2013), 65(10), 1357-1369
- [0441] WO2013/014149
- [0442] WO2006/119897
- [0443] Tarli et al., Blood (1999), 94(1), 192-198.
- [0444] [00329] 서열 (Sequences)
- [0445] [00330] 하기 서열들은 본원의 개시의 일부를 형성한다. 본원에는 WIPO ST 25 호환 전자 서열 목록도 제공된다. 하기 표의 서열들 및 전자 서열 목록 사이에 불일치가 존재하는 경우, 의혹을 없애기 위해, 하기 표의 서열들을 올바른 것으로 간주한다.
- [0446] [00331]

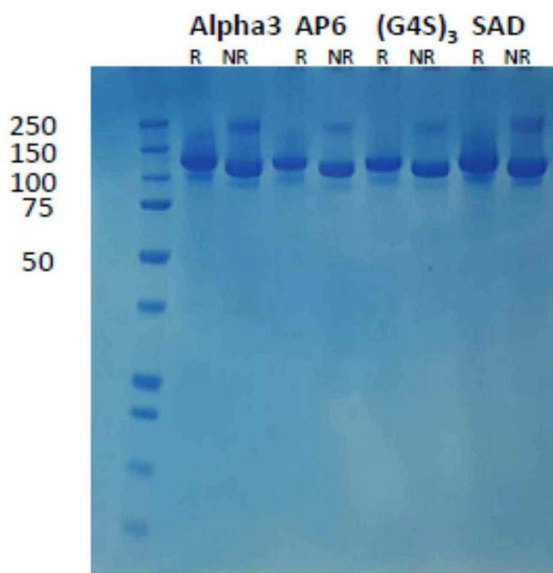
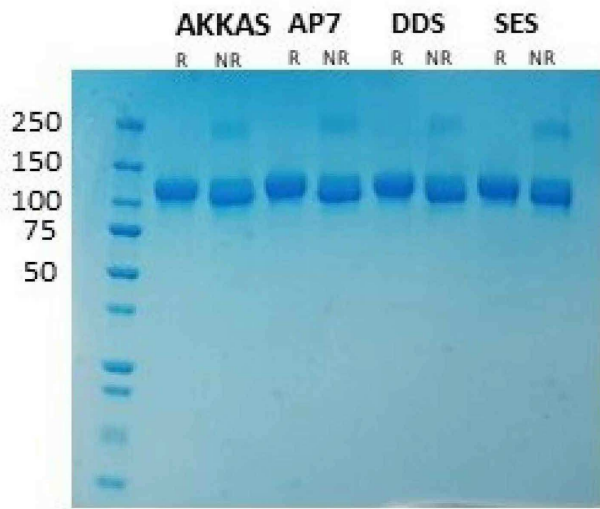
**표 6**

서열번호	적격자 (qualifier)	서열
1	P40	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHK GGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTLFLRCEAKNYSGRFTCWLLTTISTDLTFVSKSSRGS SDPQGVTCGAATLSAERVIRGDNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLPIEVMDAVHKLKYENYTSFFIRDI IKPDPKLNQLKPLKNSRQVEVSWEYPTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICR NASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
2	링커 1	GGGGSGGGSGGGGS
3	P35	RNLPVATPDPGMFPLHHSQNLRAVSNMLQKARQTLFYPCTSEEDHEDITKDKTSTVEACLPLELTK NESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAV IDELMQALNFNSETVPOKSSLEEDPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
4	링커 2 ("SAD")	GSADGGSSAGGSDAG
5	L19VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSFLAWYQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPEDFAVYVYCCQGTGRIPPTFGQGTQVEIK
6	링커 3/링커 5	GSSGG
7	L19VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSAASGFTFSFMSWVRQAPGKGLEWVSSI GSSGTTYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKFPYFDYWGGTLVTVSS
8	링커 4	SSSSGSSSSGSSSSG
9	링커 2 ("AKKAS")	GGGAKGGGKAGGGS
10	링커 2 ("DDS")	GGGGDGGGGGGGGS
11	링커 2 ("G4S <sub>3</sub> ")	GGGGSGGGSGGGGS
12	링커 2 ("SES")	GGGGSGGGGEGGGGS
13	링커 2 ("Alpha 3")	AEAAAKEAAAKEAAKA
14	링커 2 ("AP6")	APAPAPAPAPAP
15	링커 2 ("AP7")	APAPAPAPAPAP

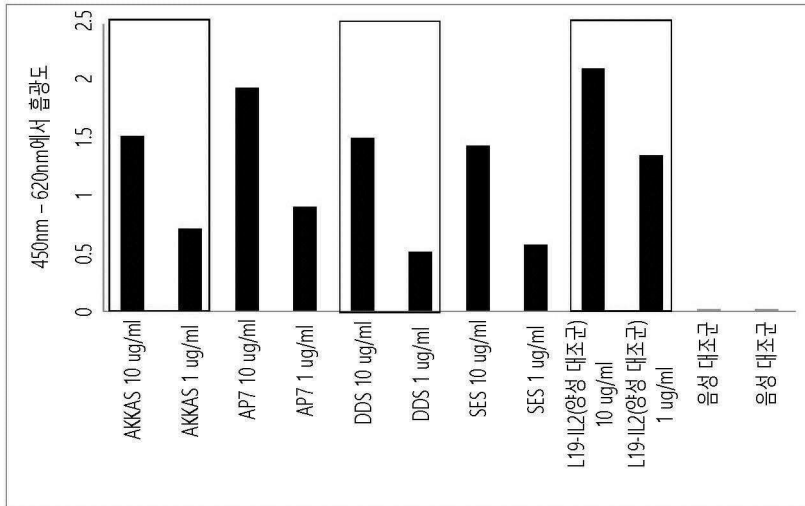
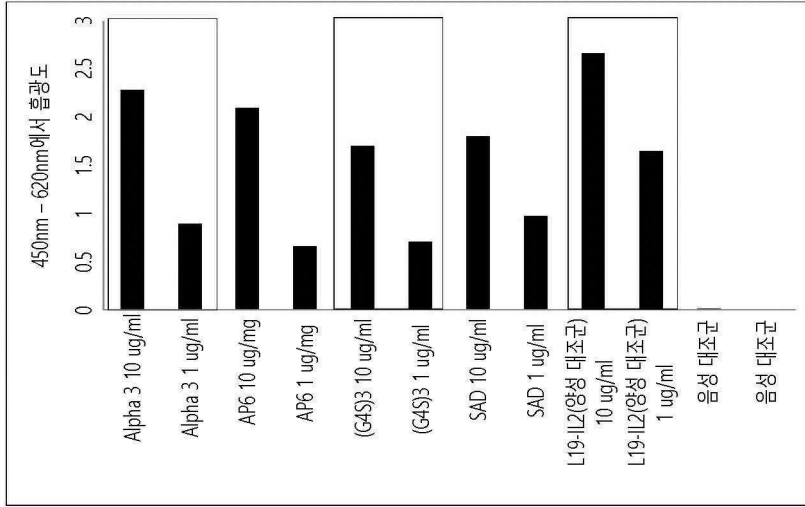
16	전장 SAD 변이체	IWELKKDVYVVELDWYDPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHK GGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVKSSRGS SDPQGVTCGAATLSAERVGRDNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLP I EVMVDVAVHKLKYENYTSFFIRDI IKPDPKLNQLKPLKNSRQVEVSWEYPTDWTSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVCRK NASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCSGGGSGGGSGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLRLRAVSNM LQKARQTLFYPCTSEEDHEDI TKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKT SFMMA LCLSS IYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNLAV I DELMQALNFNSETVPQKSSLEEDPFYKT KIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGSADGGSSAGGSDAGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSSFSMSWVRQAPGKLEWVSSI SGSSGTTYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KPPFYFDYWGQGT LVTVSSGSSGGEI VLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQKPGQAPR LLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKEIKSSSSGSSS SGSSSSGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKLEWVSSI SGSSGTTYADSV KGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPPFYFDYWGQGT LVTVSSGSSGGEI VLTQSPGTLS LSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKEIK
17	전장 muIL-12-L19-L19	MWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTPEEDDITWTS DQRHGVIGSGKTLTI TVKEFLDAGQYTCHK GGETLSHSLLLLHKKENG I WSTEILKNFKNKTFLKCEAPNYSGRFTCSWLVRNMDLKFNIKSSSSSPDS RAVTCGMASLSAEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCTAEETLPIELAL EARQNKYENYSTFFIRDI IK PDPKLNQMRPLKNSQVEVSWEYPSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETE EGCNQKGAFLVERTSTE VQCKGGNVCVQAQDRYNSSSCKWACVPCRVRSGGGSGGGSGGGSRVIVSGPARLCSQRNLLKTT DDMVKTARELKHYSCTAEDIHEDI TRDQSTLTKTCLPLELHKNESCLATRETSSTTRGSCLPPQKTSL MMTLC LGS IYEDLKMYQTEFQAINAALQNHNHQQI ILDKGMLVAIDELMQSLNHGETLRQKPPVGEADP YRVKMKLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSAGSADGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSM SWVRQAPGKLEWVSSI SGSSGTTYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPPFYFD YWGQGT LVTVSSGSSGGEI VLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQKPGQAPRLLIYYAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKEIKSSSSGSSSSGSSSSG EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKLEWVSSI SGSSGTTYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPPFYFDYWGQGT LVTVSSGSSGGEI VLTQSPGTLSLSPGERA TLSCRASQSVSSSFLAWYQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQTGRIPPTFGQGTKEIK
18	AKKAS 링커 염기 서열	ggagggggag ctaaaggtgg cggtggcaag gcagggggag ggagt
19	AP7 링커 염기 서열	gcaccagcac cagcaccagc accagcacca gcaccagcac ca
20	DDS 링커 염기 서열	ggaggtgggg gtgatgggtgg gggaggtgac ggcggaggtg ggtct
21	AP6 링커 염기 서열	gcaccagcac cagcaccagc accagcacca gcacca
22	(G4S)3 링커 염기 서열	ggtggaggcg ggtcaggcgg aggggggttct ggcggtggcg gatcg
23	SES 링커 염기 서열	ggtgggggtg ggtcggagg cggaggcga ggcggaggtg ggtcg
24	Alpha3 링커 염기 서열	gcagaagcag cagcaaaaga agcagcagca aaagaagcag cagcaaaagc a
25	SAD 링커 염기 서열	gggtctgcag acggcggatc atcagctggg ggaagtgcag cagga
26	링커 2 ("이전(O1d)")	GSADGG
27	전장 "이전(O1d)" 변이체	IWELKKDVYVVELDWYDPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHK GGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVKSSRGS SDPQGVTCGAATLSAERVGRDNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLP I EVMVDVAVHKLKYENYTSFFIRDI IKPDPKLNQLKPLKNSRQVEVSWEYPTDWTSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVCRK NASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCSGGGSGGGSGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLRLRAVSNM LQKARQTLFYPCTSEEDHEDI TKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKT SFMMA LCLSS IYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNLAV I DELMQALNFNSETVPQKSSLEEDPFYKT KIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGSADGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSW VRQAPGKLEWVSSI SGSSGTTYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPPFYFDY GQGT LVTVSSGSSGGEI VLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQKPGQAPRLLIYYASSR ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKEIKSSSSGSSSSGSSSSG EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKLEWVSSI SGSSGTTYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPPFYFDYWGQGT LVTVSSGSSGGEI VLTQSPGTLSLSPGERATL SCRASQSVSSSFLAWYQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ QTGRIPPTFGQGTKEIK
28	L19 VH CDR1	SFMS
29	L19 VH CDR2	SISGSSGTTYADSVKG
30	L19 VH CDR3	PPFYFDY
31	L19 VL CDR1	RASQSVSSSFLA
32	L19 VL CDR2	YASSRAT
33	L19 VL CDR3	QQTGRIPPT
34	GGGS 링커	GGGS
35	GGGA 링커	GGGA
36	L19 디아바디	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKLEWVSSI SGSSGTTYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPPFYFDYWGQGT LVTVSSGSSGGEI VLTQSPGTLSLSPGERA TLSCRASQSVSSSFLAWYQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQTGRIPPTFGQGTKEIK



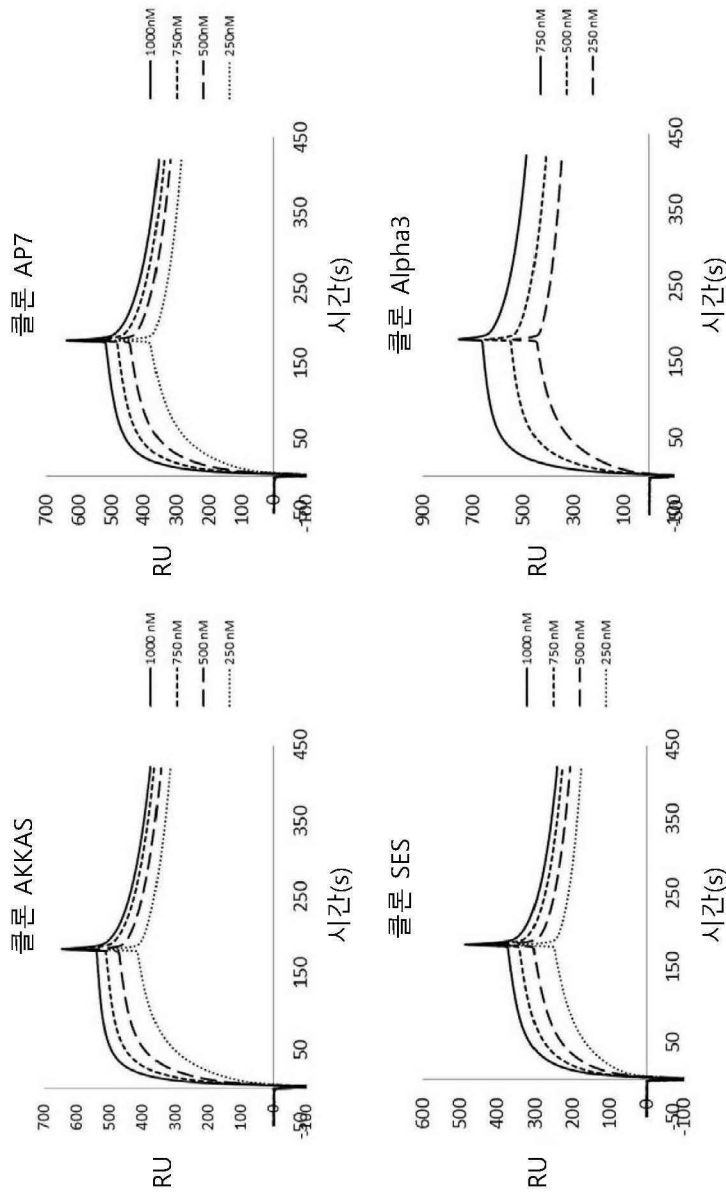
도면1b



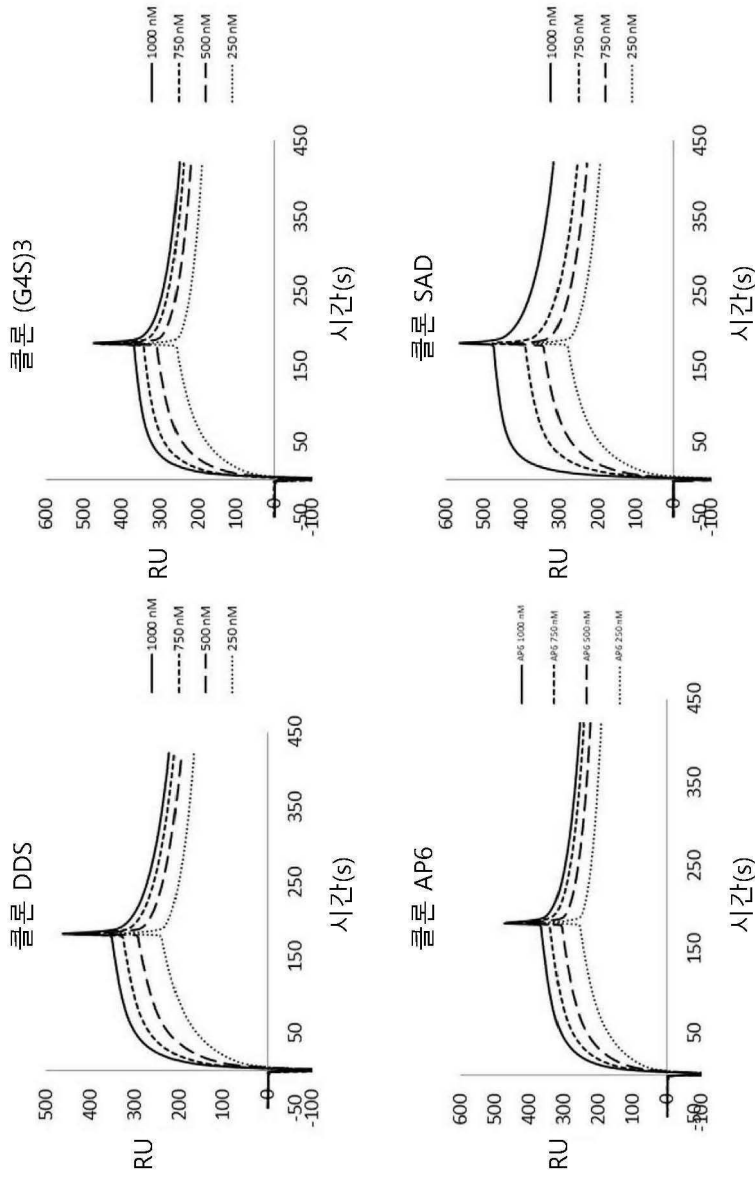
도면2



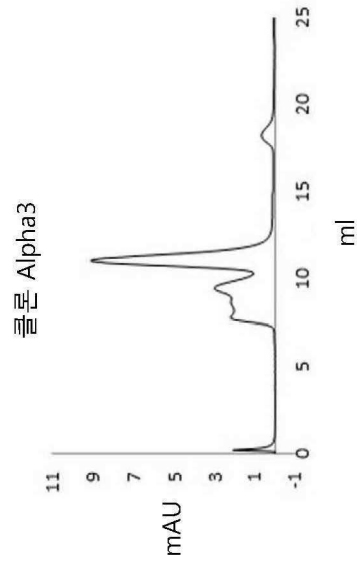
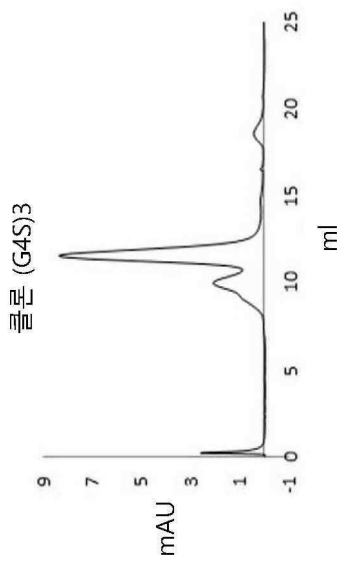
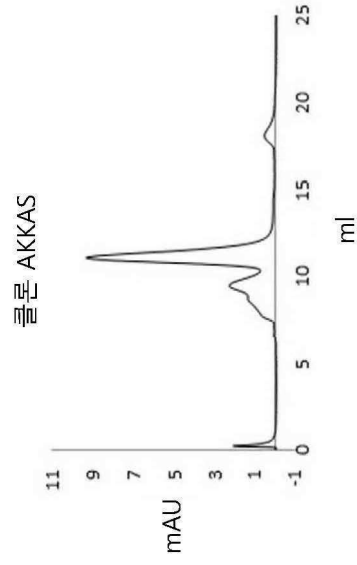
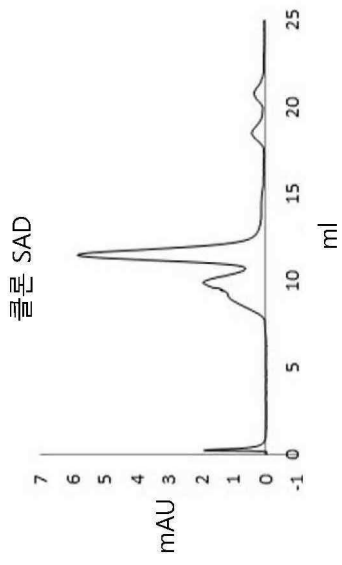
도면3a



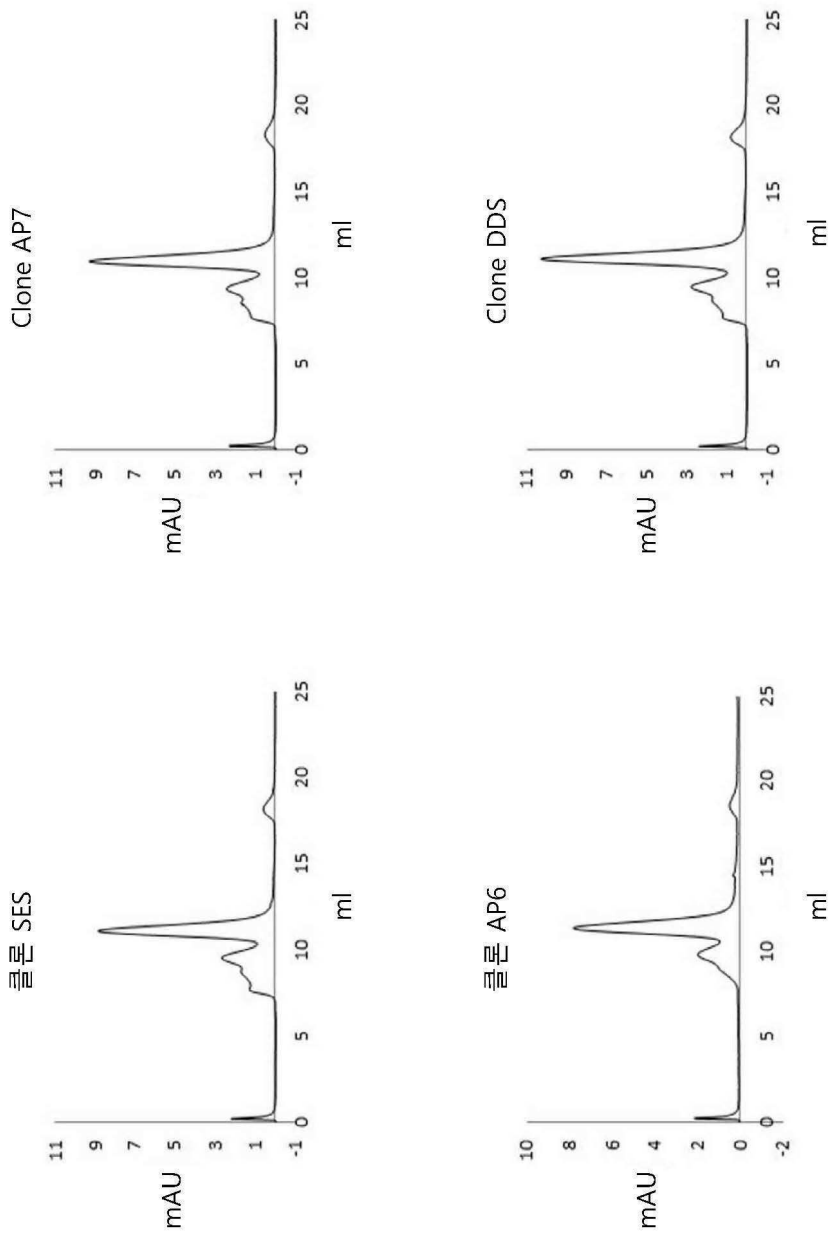
도면3b



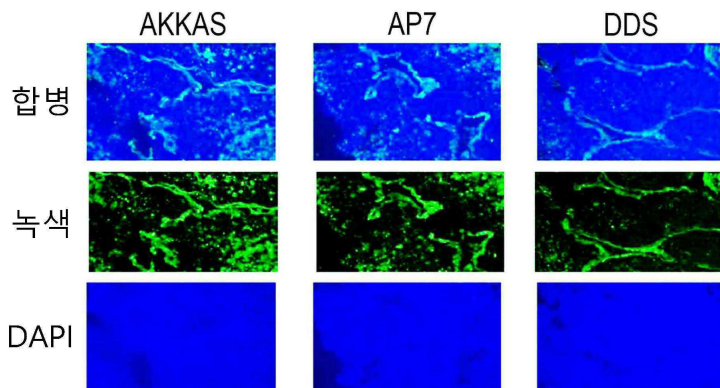
도면4a



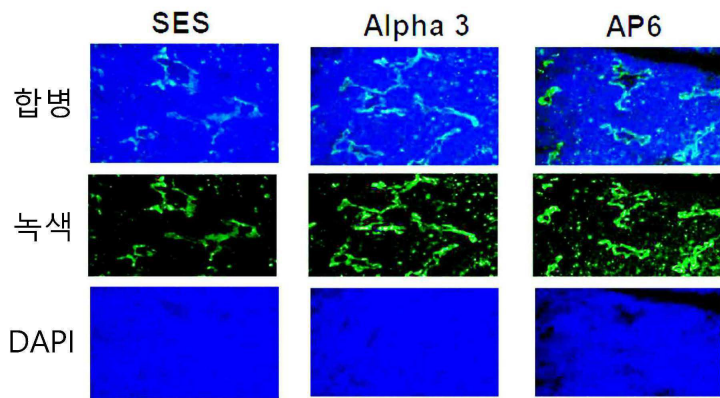
도면4b



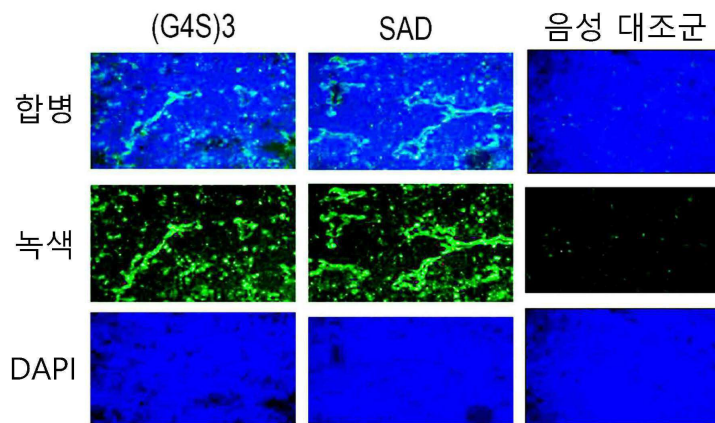
도면5a



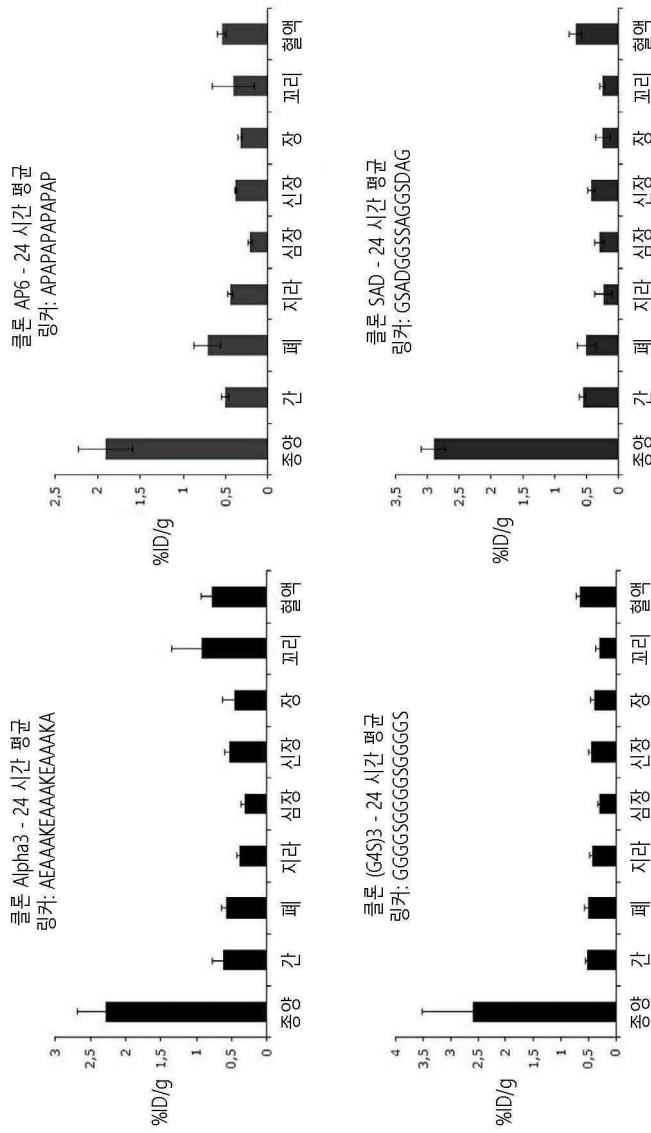
도면5b



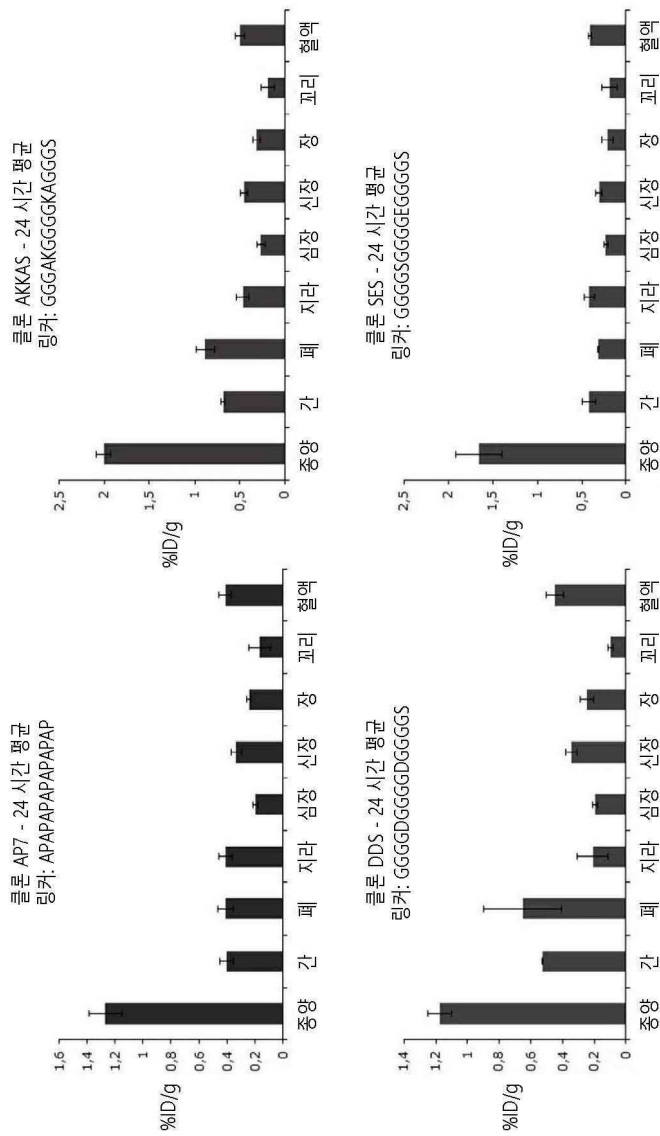
도면5c



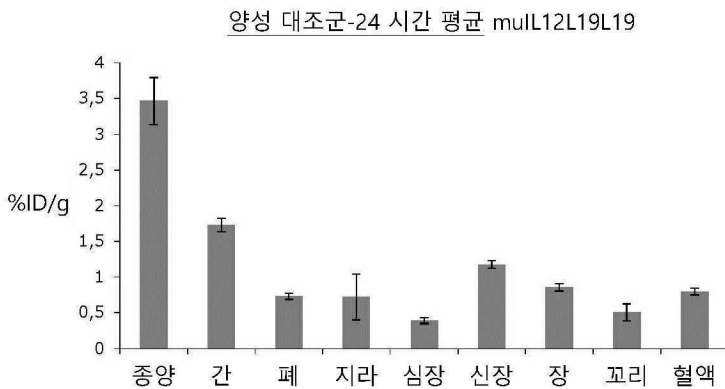
도면6a



도면6b

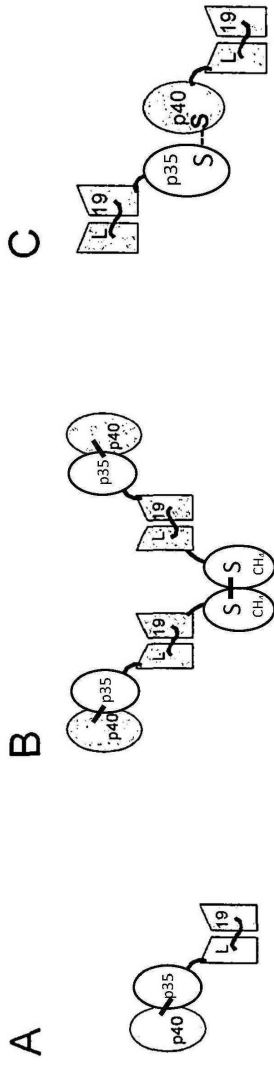


도면6c



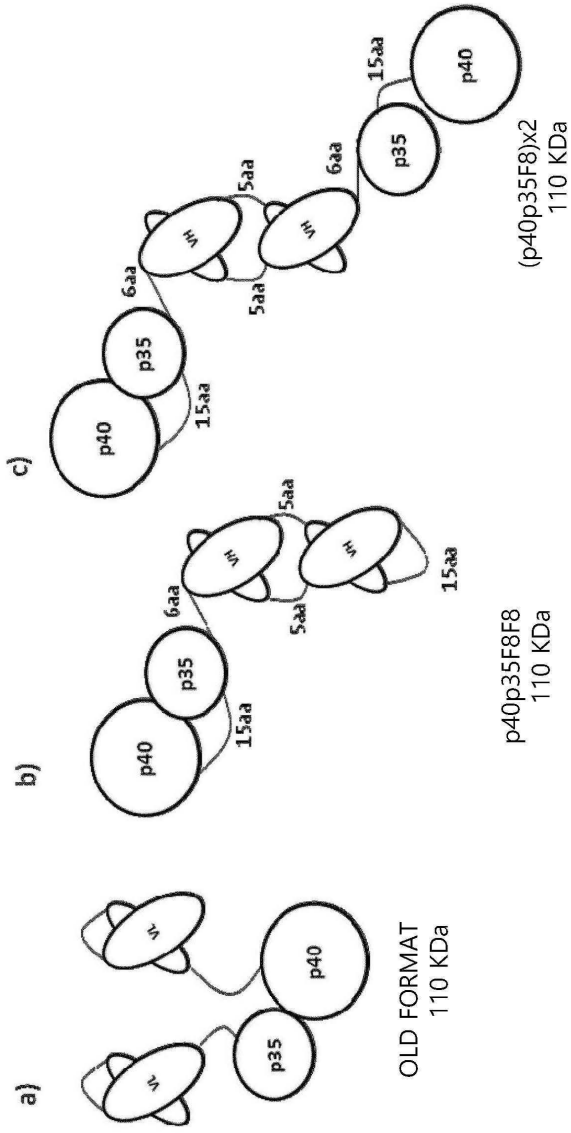
도면7

[예시적 목적의 실행 기술]

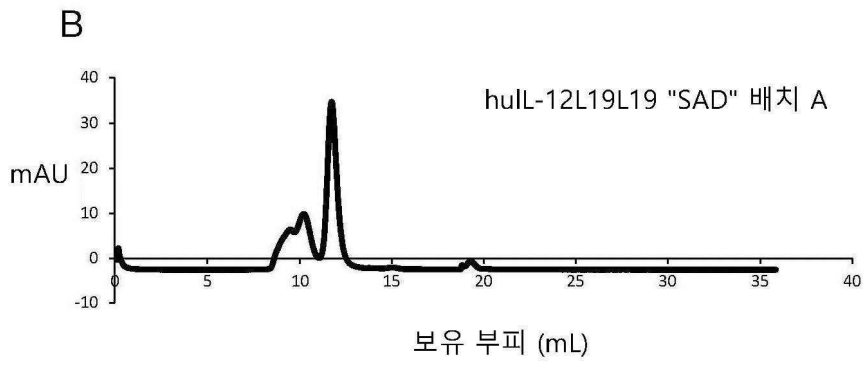
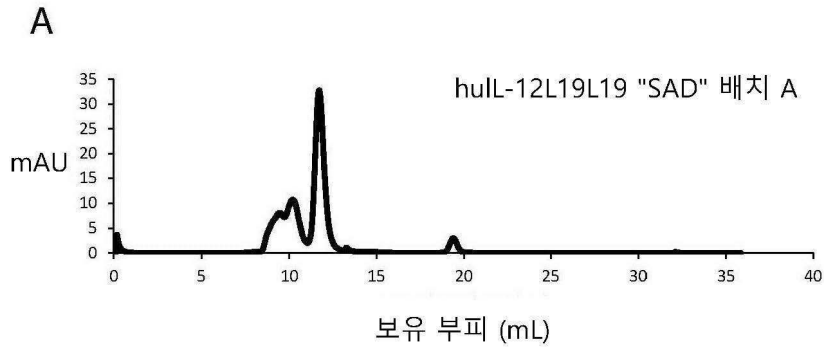


도면8

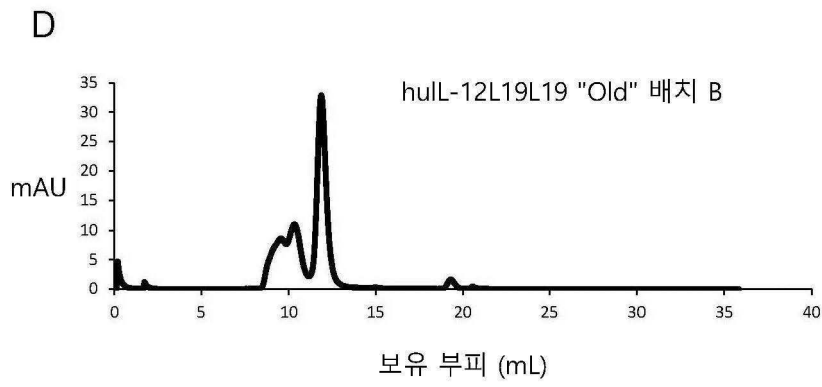
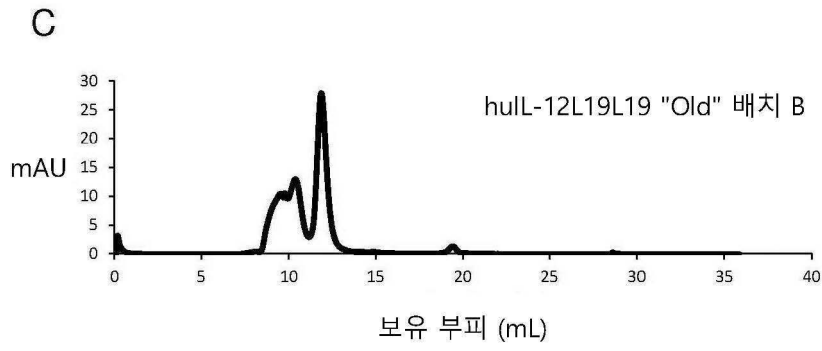
[예시적 목적의 선행 기술]



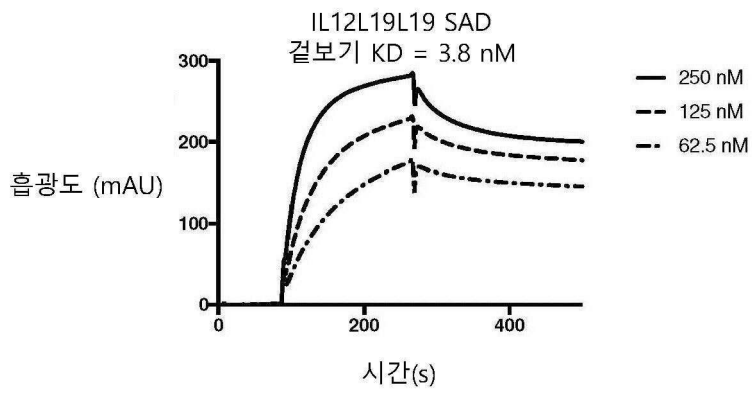
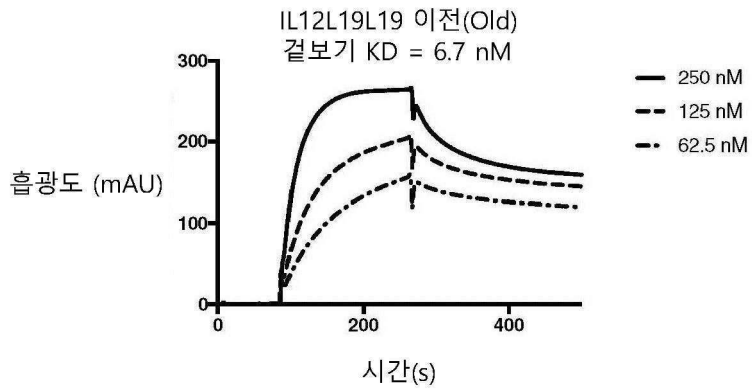
도면9a



도면9b

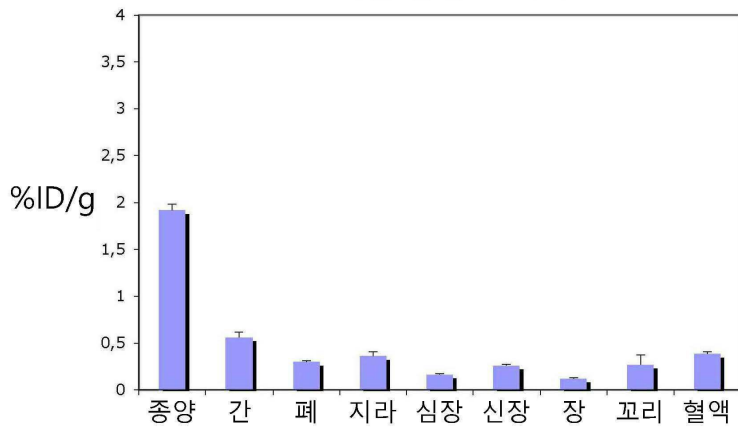


도면10

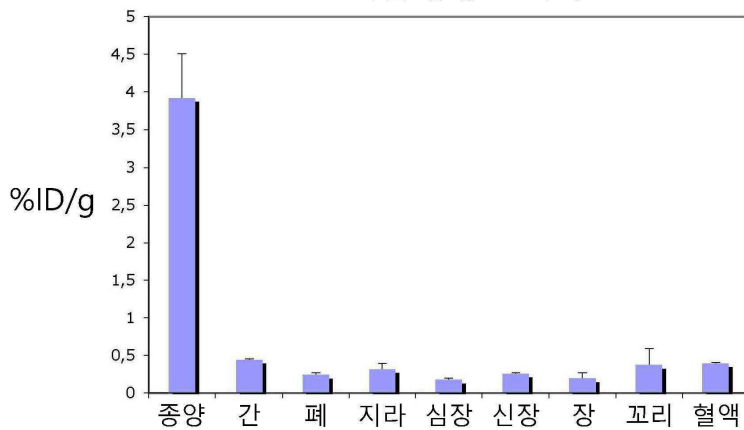


도면11

<<이전(Old)>> 변이체로  
24 시간 종양 표적화



<<SAD>> 변이체로  
24 시간 종양 표적화



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Philogen S.p.A.

<120> IL-12 antagonists with optimized linkers

<130> PD43169

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 306

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr Phe Cys Val Gln Val Gln  
 245 250 255  
 Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg Val Phe Thr Asp Lys Thr  
 260 265 270  
 Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala Ser Ile Ser Val Arg Ala  
 275 280 285  
 Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser Glu Trp Ala Ser Val Pro

290 295 300  
 Cys Ser  
 305  
 <210> 2  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <220><223> linker  
 <400> 2

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10 15  
 <210> 3  
 <211> 197  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 3

Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met Phe Pro Cys Leu  
 1 5 10 15

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



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 Tyr 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 Thr Gly Arg Ile Pro  
                          85                    90                    95

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

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> linker

<400> 6

Gly Ser Ser Gly Gly

1                    5

<210> 7

<211> 116

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> antibody sequence (variable domain)

<400> 7

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 Ser Phe

20                    25                    30

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

35 40 45  
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr 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 Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser

115  
 <210> 8  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <220><223> linker

<400> 8  
 Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly  
 1 5 10 15  
 <210> 9  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence

<220><223> linker  
 <400> 9  
 Gly Gly Gly Ala Lys Gly Gly Gly Gly Lys Ala Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10 15  
 <210> 10  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <220><223> linker  
 <400> 10

Gly Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly Gly Ser

1                    5                    10                    15

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> linker

<400> 11

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

1                    5                    10                    15

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> linker

<400> 12

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Gly Gly Gly Gly Ser

1                    5                    10                    15

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> linker

<400> 13

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys

1                    5                    10                    15

Ala

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> linker

<400> 14

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro

1                    5                    10

<210> 15

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> linker

<400> 15

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro

1                    5                    10

<210> 16

<211> 1006

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Immunoconjugate sequence

<400> 16

Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val Val Glu Leu Asp Trp Tyr

1                    5                    10                    15

Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu Thr Cys Asp Thr Pro Glu

                  20                    25                    30

Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln Ser Ser Glu Val Leu Gly

                  35                    40                    45

Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys Glu Phe Gly Asp Ala Gly

50                    55                    60

Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val Leu Ser His Ser Leu Leu

65                    70                    75                    80

Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp Ser Thr Asp Ile Leu Lys

                  85                    90                    95

Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe Leu Arg Cys Glu Ala Lys

                  100                    105                    110

Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp Leu Thr Thr Ile Ser Thr



Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser Thr Val Glu Ala Cys  
 370 375 380  
  
 Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu  
 385 390 395 400  
 Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser  
 405 410 415  
 Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met  
 420 425 430  
 Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro  
 435 440 445  
  
 Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu  
 450 455 460  
 Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser  
 465 470 475 480  
 Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile  
 485 490 495  
 Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met  
 500 505 510  
  
 Ser Tyr Leu Asn Ala Ser Gly Ser Ala Asp Gly Gly Ser Ser Ala Gly  
 515 520 525  
 Gly Ser Asp Ala Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu  
 530 535 540  
 Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe  
 545 550 555 560  
 Thr Phe Ser Ser Phe Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys  
 565 570 575  
  
 Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr  
 580 585 590  
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser  
 595 600 605  
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr







305                    310                    315                    320  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Val Ile Pro Val Ser Gly Pro  
  
                          325                    330                    335  
 Ala Arg Cys Leu Ser Gln Ser Arg Asn Leu Leu Lys Thr Thr Asp Asp  
                          340                    345                    350  
 Met Val Lys Thr Ala Arg Glu Lys Leu Lys His Tyr Ser Cys Thr Ala  
                          355                    360                    365  
 Glu Asp Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Arg Asp Gln Thr Ser Thr Leu  
                          370                    375                    380  
 Lys Thr Cys Leu Pro Leu Glu Leu His Lys Asn Glu Ser Cys Leu Ala  
  
 385                    390                    395                    400  
 Thr Arg Glu Thr Ser Ser Thr Thr Arg Gly Ser Cys Leu Pro Pro Gln  
                          405                    410                    415  
 Lys Thr Ser Leu Met Met Thr Leu Cys Leu Gly Ser Ile Tyr Glu Asp  
                          420                    425                    430  
 Leu Lys Met Tyr Gln Thr Glu Phe Gln Ala Ile Asn Ala Ala Leu Gln  
                          435                    440                    445  
 Asn His Asn His Gln Gln Ile Ile Leu Asp Lys Gly Met Leu Val Ala  
  
                          450                    455                    460  
 Ile Asp Glu Leu Met Gln Ser Leu Asn His Asn Gly Glu Thr Leu Arg  
 465                    470                    475                    480  
 Gln Lys Pro Pro Val Gly Glu Ala Asp Pro Tyr Arg Val Lys Met Lys  
                          485                    490                    495  
 Leu Cys Ile Leu Leu His Ala Phe Ser Thr Arg Val Val Thr Ile Asn  
                          500                    505                    510  
 Arg Val Met Gly Tyr Leu Ser Ser Ala Gly Ser Ala Asp Gly Glu Val  
  
                          515                    520                    525  
 Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu  
                          530                    535                    540  
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Ser Met  
 545                    550                    555                    560

Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser  
 565 570 575  
 Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly  
 580 585 590  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 595 600 605  
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys  
 610 615 620  
 Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 625 630 635 640  
 Ser Ser Gly Ser Ser Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly  
 645 650 655  
 Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala  
 660 665 670  
 Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 675 680 685  
 Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
 690 695 700  
 Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 705 710 715 720  
 Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys  
 725 730 735  
 Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val  
 740 745 750  
 Glu Ile Lys Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser  
 755 760 765  
 Ser Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro  
 770 775 780  
 Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
 785 790 795 800  
 Ser Phe Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu



1                    5                    10                    15  
 Gly Thr Gly Gly Cys Gly Gly Thr Gly Gly Cys Ala Ala Gly Gly Cys

                  20                    25                    30  
 Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Thr  
                   35                    40                    45

<210> 19

<211> 42

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> linker

<400> 19

gcaccagcac cagcaccagc accagcacca gcaccagcac ca 42

<210> 20

<211> 45

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> linker

<400> 20

ggaggtgggg gtgatggtgg gggaggtgac ggcggaggtg ggtct 45

<210> 21

<211> 36

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> linker

<400> 21

gcaccagcac cagcaccagc accagcacca gcacca 36

<210> 22

<211> 45

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> linker

<400> 22

ggtggaggcg ggtcaggcgg agggggttct ggcggtggcg gatcg 45

<210> 23  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence  
 <220><223> linker  
 <400> 23  
 ggtgggggtg ggtccggagg cggaggcgaa ggcggaggtg ggtcg 45

<210> 24  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence  
 <220><223> linker  
 <400> 24  
 gcagaagcag cagcaaaaga agcagcagca aaagaagcag cagcaaaagc a 51

<210> 25  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence  
 <220><223> linker  
 <400> 25  
 ggtctgcag acggcggatc atcagctggg ggaagtgacg cagga 45

<210> 26  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <220><223> linker  
 <400> 26  
 Gly Ser Ala Asp Gly Gly  
 1 5

<210> 27  
 <211> 997  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence

<220><223> Immunoconjugate sequence

<400> 27

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

Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr Phe Cys Val Gln Val Gln  
 245 250 255  
 Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg Val Phe Thr Asp Lys Thr  
 260 265 270  
 Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala Ser Ile Ser Val Arg Ala  
 275 280 285  
 Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser Glu Trp Ala Ser Val Pro  
 290 295 300  
 Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 305 310 315 320  
 Ser Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met Phe Pro Cys  
 325 330 335  
 Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val Ser Asn Met Leu Gln  
 340 345 350  
 Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile  
 355 360 365  
 Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser Thr Val Glu Ala Cys  
 370 375 380  
 Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu  
 385 390 395 400  
 Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser  
 405 410 415  
 Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met  
 420 425 430  
 Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro  
 435 440 445  
 Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu  
 450 455 460  
 Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser  
 465 470 475 480  
 Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile

485 490 495  
 Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met

500 505 510  
 Ser Tyr Leu Asn Ala Ser Gly Ser Ala Asp Gly Gly Glu Val Gln Leu

515 520 525  
 Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu

530 535 540  
 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Ser Met Ser Trp

545 550 555 560  
 Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser

565 570 575  
 Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe

580 585 590  
 Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn

595 600 605  
 Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Phe

610 615 620  
 Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

625 630 635 640  
 Gly Ser Ser Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu

645 650 655  
 Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln

660 665 670  
 Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

675 680 685  
 Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile

690 695 700  
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

705 710 715 720  
 Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

725 730 735

Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
 740 745 750  
 Lys Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly  
 755 760 765  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 770 775 780  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe  
 785 790 795 800  
 Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 805 810 815  
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 820 825 830  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 835 840 845  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 850 855 860  
 Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 865 870 875 880  
 Thr Val Ser Ser Gly Ser Ser Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser  
 885 890 895  
 Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys  
 900 905 910  
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln  
 915 920 925  
 Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg  
 930 935 940  
 Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
 945 950 955 960  
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr  
 965 970 975  
 Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr



<220><223> antibody sequence (CDR)  
 <400> 31  
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala  
 1                    5                    10

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> antibody sequence (CDR)

<400> 32

Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1                    5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> antibody sequence (CDR)

<400> 33

Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr

1                    5

<210> 34

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> GGGGS linker

<400> 34

Gly Gly Gly Gly Ser

1                    5

<210> 35

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> GGGGA linker

<400> 35

Gly Gly Gly Gly Ala

1 5

<210> 36

<211> 229

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> L19 Diabody

<400> 36

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 Ser Phe

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr 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 Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln

145 150 155 160

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg  
165 170 175  
Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
180 185 190  
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr  
195 200 205  
  
Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr  
210 215 220  
Lys Val Glu Ile Lys  
225