



-
- CMV Sec V_H C_H1 L1 V_H L3 V_L His
- CD3 Fd CLDN6 scFv
- CMV Sec V_L C_L L2 V_H L3 V_L Strp
- CD3 L CLDN6 scFv

(52) CPC특허분류

C07K 16/2809 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2039/53 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/35 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
C07K 2317/94 (2013.01)

(72) 발명자

피셔, 레일라

독일 가우-오벤하임 55239, 테오도어-호이스-스트
라쎄 20에이

젠드레츠키, 아르네

독일 마인츠-코스트하임 55246, 하우프트스트라쎄
163

튀게시, 오즈렘

독일 마인츠 55116, 필리프-본-자베른-플라츠 1

리 갈, 파브리스

독일 마인츠 55122, 콘스바흐블리크 29

크로이츠베르그, 마리아

독일 아헨 52068, 슈톨베르거 스트라쎄 180

명세서

청구범위

청구항 1

3개 이상의 결합 도메인을 포함하는 결합체로서,

제1 결합 도메인은 T 세포-특이적 항원 CD3에 결합하고,

제2 결합 도메인 및 제3 결합 도메인은 클라우딘 6(CLDN6)에 결합하고,

제1 결합 도메인은 Fab 분자의 포맷을 가지고, 제2 결합 도메인 및 제3 결합 도메인은 scFV 분자의 포맷을 가지며,

상기 결합체는

(a) T 세포-특이적 항원 CD3에 대한 특이성을 갖는 면역글로불린의 중쇄의 가변 도메인(VH(CD3)),

클라우딘 6에 대한 특이성을 갖는 면역글로불린의 중쇄의 가변 도메인(VH(CLDN6)), 및

클라우딘 6에 대한 특이성을 갖는 면역글로불린의 경쇄의 가변 도메인(VL(CLDN6))을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및

(b) T 세포-특이적 항원 CD3에 대한 특이성을 갖는 면역글로불린의 경쇄의 가변 도메인(VL(CD3)),

클라우딘 6에 대한 특이성을 갖는 면역글로불린의 중쇄의 가변 도메인(VH(CLDN6)), 및 클라우딘 6에 대한 특이성을 갖는 면역글로불린의 경쇄의 가변 도메인(VL(CLDN6))을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하고,

상기 제1 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드가 결합체를 형성하도록 회합되고,

(i) CD3에 대한 결합 도메인은 중쇄 가변 영역 VH(CD3) 및 경쇄 가변 영역 VL(CD3)을 포함하고,

상기 VH(CD3)는

GYTFTRYT의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1,

INPSRGGY의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 및

ARYYDDHYSLDY의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하고;

상기 VL(CD3)는

SSVSYS의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1,

DTS의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2 및

QQWSSNPLT의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함하고,

(ii) CLDN6에 대한 결합 도메인은

(a) 서열번호 44의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 45의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 46의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 VH(CLDN6), 및

서열번호 50의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 51의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 52의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 VL(CLDN6);

(b) 서열번호 44의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 45의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 47의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 VH(CLDN6), 및

서열번호 50의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 51의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 53의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 VL(CLDN6); 및

(c) 서열번호 44의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 45의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 46의 서열을 포

함하는 HCDR3을 포함하는 VH(CLDN6), 및

서열번호 50의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 51의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 53의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 VL(CLDN6); 으로 이루어진 군에서 선택되는 중쇄 가변영역 VH(CLDN6) 및 경쇄 가변영역 VL(CLDN6)의 조합을 포함하는 것인,

결합제.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제1 폴리펩티드는 면역글로불린의 중쇄의 불변 도메인 1 (CH1)을 추가로 포함하고, 상기 제2 폴리펩티드는 면역글로불린의 경쇄의 불변 도메인(CL)을 추가로 포함하고, 상기 두 도메인 모두는 서로 결합될 수 있는 것인. 결합제.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 제1 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드가 CH1 도메인과 CL 도메인 사이의 디설파이드 가교를 통해 공유결합되는 것인, 결합제.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 제1 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드에서, 상기 VH 도메인들, VL 도메인들, CH1 도메인 및 CL 도메인이, N-말단으로부터 C-말단까지

- VH(CD3)-CH1-VH(CLDN6)-VL(CLDN6) 및 VL(CD3)-CL-VH(CLDN6)-VL(CLDN6);

또는

VH(CD3)-CH1-VL(CLDN6)-VH(CLDN6) 및 VL(CD3)-CL-VL(CLDN6)-VH(CLDN6)의 순서로 배열되는 것인, 결합제.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 VH-VL 또는 VL-VH 도메인은 펩티드 링커를 통해 CH1 도메인 또는 CL 도메인에 연결되는 것인, 결합제.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 펩티드 링커는 DVPG₂S 또는 SGPG₃RS(G₄S)₂의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 결합제.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 VH 및 VL 도메인은 펩티드 링커를 통해 VH-VL 또는 VL-VH 도메인을 형성하는 것인, 결합제.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 펩티드 링커는 (G₄S)_x의 아미노산 서열을 포함하고, 여기에서 x는 3, 4, 5 또는 6인 것인, 결합제.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 결합제는 CLDN6를 발현하는 암 세포에 대해 T 세포 매개 세포독성을 유도하는 것인, 결합제.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 결합제가 $\leq 10\text{nM}$ 또는 $\leq 1\text{nM}$ 또는 $\leq 500\text{pM}$ 또는 $\leq 250\text{pM}$ 또는 $\leq 100\text{pM}$ 또는 $\leq 50\text{pM}$ 의 EC₅₀으로 CLDN6를 발현하는 암 세포에 대한 T 세포 매개 세포독성을 유도하는 것인, 결합제.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 CD3에 대한 결합 도메인은

서열번호 5로 표시된 아미노산 서열 또는 이 서열의 변이체를 포함하거나, 또는 서열번호 5로 표시된 아미노산 서열 또는 이 서열의 변이체로 이루어지는 VH(CD3); 및

서열번호 6으로 표시된 아미노산 서열 또는 이 서열의 변이체를 포함하거나, 또는 서열번호 6으로 표시된 아미노산 서열 또는 이 서열의 변이체로 이루어지는 VL(CD3)를 포함하고,

상기 아미노산 서열의 변이체는 서열번호 5 또는 서열번호 6으로 표시된 아미노산 서열에 대해 95% 이상의 동일성을 가지는 것인, 결합제.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 CLDN6에 대한 결합 도메인은

서열번호 8로 표시된 아미노산 서열 또는 이 서열의 변이체를 포함하거나, 또는 서열번호 8로 표시된 아미노산 서열 또는 이 서열의 변이체로 이루어지는 VH(CLDN6) 및,

서열번호 10으로 표시된 아미노산 서열 또는 이 서열의 변이체를 포함하거나, 또는 서열번호 10으로 표시된 아미노산 서열 또는 이 서열의 변이체로 이루어지는 VL(CLDN6)를 포함하고,

상기 아미노산 서열의 변이체는 서열번호 8 또는 서열번호 10으로 표시된 아미노산 서열에 대해 95% 이상의 동일성을 가지는 것인, 결합제.

청구항 13

제1항에 있어서,

(i) 상기 제1 폴리펩티드는 서열번호 14로 표시된 아미노산 서열 또는 이 서열의 변이체를 포함하거나, 또는 서열번호 14로 표시된 아미노산 서열 또는 이 서열의 변이체로 이루어지고, 상기 제2 폴리펩티드는 서열번호 16으로 표시된 아미노산 서열 또는 이 서열의 변이체를 포함하거나, 또는 서열번호 16으로 표시된 아미노산 서열 또는 이 서열의 변이체로 이루어지고,

(ii) 상기 제1 폴리펩티드는 서열번호 15로 표시된 아미노산 서열 또는 이 서열의 변이체를 포함하거나, 또는 서열번호 15로 표시된 아미노산 서열 또는 이 서열의 변이체로 이루어지고, 상기 제2 폴리펩티드는 서열번호 16으로 표시된 아미노산 서열 또는 이 서열의 변이체를 포함하거나, 또는 서열번호 16으로 표시된 아미노산 서열 또는 이 서열의 변이체로 이루어지고,

(iii) 상기 제1 폴리펩티드는 서열번호 17로 표시된 아미노산 서열 또는 이 서열의 변이체를 포함하거나, 또는 서열번호 17로 표시된 아미노산 서열 또는 이 서열의 변이체로 이루어지고, 상기 제2 폴리펩티드는 서열번호 19으로 표시된 아미노산 서열 또는 이 서열의 변이체를 포함하거나, 또는 서열번호 19으로 표시된 아미노산 서열 또는 이 서열의 변이체로 이루어지고,

(iv) 상기 제1 폴리펩티드는 서열번호 18로 표시된 아미노산 서열 또는 이 서열의 변이체를 포함하거나, 또는 서열번호 18로 표시된 아미노산 서열 또는 이 서열의 변이체로 이루어지고, 상기 제2 폴리펩티드는 서열번호 19으로 표시된 아미노산 서열 또는 이 서열의 변이체를 포함하거나, 또는 서열번호 19으로 표시된 아미노산 서열 또는 이 서열의 변이체로 이루어지고,

상기 아미노산 서열의 변이체는 서열번호 14, 15, 16, 17, 18, 또는 19로 표시된 아미노산 서열에 대해 95% 이상의 동일성을 가지는 것인, 결합제.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 결합제의 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 동일한 핵산 또는 서로 다른 핵산상에 코딩되는 것인, 결합제.

청구항 15

제1항의 결합제 또는 제1항에서 정의된 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 결합제는 하나 이상의 폴리펩티드 사슬을 포함하고, 서로 다른 폴리펩티드 사슬들은 동일한 핵산 또는 서로 다른 핵산상에 코딩되는 것인, 핵산.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 핵산은 벡터의 형태이거나 또는 RNA의 형태인 것인, 핵산.

청구항 18

제15항의 핵산을 포함하는 분리된 숙주세포.

청구항 19

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 결합제, 제15항 내지 제17항 중 어느 한 항의 핵산, 또는 제18항의 분리된 숙주세포를 포함하는 암의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 암이 비노기방광암, 난소암, 소세포폐암(SCLC) 및 비소세포 폐암(NSCLC)을 포함하는 폐암, 위암, 유방암, 간암, 췌장암, 피부암, 악성 흑색종, 두경부암, 육종, 담관암, 신장암, 대장암, 회장의 암을 포함하는 소장암, 고환 배아 암종, 태반 융모암종, 자궁경부암, 고환암, 고환 기형종, 배아 고환암, 자궁암, 생식세포 종양, 및 이들의 전이성 형태로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 약학적 조성물.

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

발명의 설명

기술 분야

[0001] 클라우딘은 상피와 내피의 밀착 연결 내에 위치하는 내재성 막 단백질이다. 클라우딘은 2개의 세포의 루프와 세포질에 위치한 N-말단과 C-말단을 갖는 4개의 막관통 세그먼트를 갖는 것으로 예측된다. 막관통 단백질의 클라우딘(CLDN) 패밀리는 상피와 내피의 밀착 연결의 유지에 중요한 역할을 하며 또한 세포골격의 유지 및 세포 신호전달에서 중요한 역할을 할 수 있다.

배경 기술

[0002] CLDN18은 마우스 및 인간에서 설명되는 2종의 상이한 스플라이스 변이체로 존재한다(Niimi, Mol. Cell. Biol. 21:7380-90, 2001). 스플라이스 변이체(진뱅크(Genbank) 수탁 번호: 스플라이스 변이체 1(CLDN18.1): NP_057453, NM_016369, 및 스플라이스 변이체 2(CLDN18.2): NM_001002026, P_001002026)는 약 27.9/27.72 kD의 분자량을 갖는다. 스플라이스 변이체 CLDN 18.1 및 CLDN 18.2는 제1 막관통(TM) 영역 및 루프 1을 포함하는 N-말단 부분이 상이하지만, C-말단의 1차 단백질 서열은 동일하다.

[0003] 정상 조직에는, CLDN18.2이 짧은 수명의 분화된 위장 상피 세포에서만 단독으로 발현되는 위를 제외하고는 CLDN18.2의 검출가능한 발현은 없다. CLDN18.2는 악성 형질전환 과정에서 유지되고 이에 따라 종종 인간 위암 세포의 표면에 제시된다. 게다가, 이러한 범 종양 항원은 식도, 췌장 및 폐 선암에서 유의적 수준으로 이소성 활성화된다. CLDN18.2 단백질은 또한 위암 선암의 림프절 전이 및 특히 난소로의 원거리 전이(소위 크루켄버그 종양(Krukenberg tumor))에 국소화된다.

[0004] CLDN6은 일련의 상이한 인간 암 세포에서 발현되는 반면에, 정상 조직에서의 발현은 태반으로 한정된다.

[0005] 암 세포와 정상 세포 간의 CLDN18.2 및 CLDN6과 같은 클라우딘의 차등적 발현, 그들의 막 국소화 및 대부분의 독성 관련 정상 조직에의 그들의 부재는 이러한 분자들을 암 면역요법에 대한 흥미로운 표적으로 만들며, 암 요법에서 클라우딘을 표적화하기 위한 항체 기반 치료제의 사용은 높은 수준의 치료 특이성을 약속한다.

[0006] 본 발명의 목적은 암 질환의 요법을 위한 신규 제제 및 방법을 제공하는 것이었다.

[0007] 본 발명의 기초가 되는 문제의 해결책은 중앙 관련 클라우딘 분자, 즉 암 세포에 특이적인 2개의 결합 도메인을 포함하는 결합제를 생성하는 개념에 근거한다. 결합제는 또한 T 세포에 결합하여 T 세포를 복합체로 끌어들이 수 있게 하는 CD3과 같은 T 세포-특이적 항원에 특이적인 결합 도메인을 포함하고, 이에 따라 T 세포의 세포독성 효과를 암 세포로 표적화하는 것을 가능하게 한다. 이러한 복합체의 형성은 그 자체로 또는 보조 세포 (accessory cell)와 함께 세포독성 T 세포에서 신호전달을 유도할 수 있으며, 이는 세포독성 매개체의 방출을 초래한다.

[0008] 본 발명자들은 클라우딘을 표적으로 하는 2개의 결합 도메인과 CD3과 같은 T 세포-특이적 항원을 표적으로 하는 또 다른 결합 도메인을 포함하는 결합제가 강력한 T 세포 매개 용해를 유도하고 중앙 질환의 치료에서 효과적인다는 것을 최초로 보고한다.

[선행기술문헌]

국제공개공보 W02014/075697A1 (2014.05.22.)

국제공개공보 W02016/097408A1 (2016.06.23.)

발명의 내용

[0009] **발명의 개요**

[0010] 본 발명은 적어도 3개의 결합 도메인을 포함하는 결합제로서, 제1 결합 도메인이 T 세포-특이적 항원에 결합하고 제2 결합 도메인 및 제3 결합 도메인이 클라우딘에 결합하는 결합제를 제공한다. 본 발명의 결합제는 (예를 들어, CD3 수용체와 맞물림(engaging)으로써) T 세포 및 표적으로서 파괴되어야 하는 클라우딘을 발현하는 암 세포에 결합할 수 있다.

[0011] 일 실시형태에서, 결합제는 적어도 3개의 결합 도메인을 갖는 6개의 항체 가변 도메인을 포함하고, 여기서 적어도 2개의 결합 도메인은 클라우딘과 결합하고 1개의 결합 도메인은 T 세포-특이적 항원에 결합한다.

[0012] 일 실시형태에서, 제1 결합 도메인, 제2 결합 도메인 및 제3 결합 도메인 각각은 면역글로불린의 중쇄의 가변 도메인(VH) 및 면역글로불린의 경쇄의 가변 도메인(VL)을 포함한다.

[0013] 일 실시형태에서, 제1 결합 도메인은 T 세포-특이적 항원에 대한 특이성을 갖는 면역글로불린의 중쇄의 가변 도메인(VH)(VH(T)) 및 T 세포-특이적 항원에 대한 특이성을 갖는 면역글로불린의 경쇄의 가변 도메인(VL)(VL(T))을 포함하고, 제2 결합 도메인 및 제3 결합 도메인은 각각 클라우딘 항원에 대한 특이성을 갖는 면역글로불린의 중쇄의 가변 도메인(VH)(VH(CLDN)) 및 클라우딘 항원에 대한 특이성을 갖는 면역글로불린의 경쇄의 가변 도메인(VL)(VL(CLDN))을 포함한다.

[0014] 일 실시형태에서, 상기 결합 도메인들 중 하나 이상의 중쇄 가변 도메인(VH) 및 대응하는 경쇄 가변 도메인(VL)은 펩티드 링커, 특히 글리신-세린 펩티드 링커와 같은 유연한 펩티드 링커를 통해 연결된다. 일 실시형태에서, 펩티드 링커는 아미노산 서열(G₄S)_x를 포함하고, 여기서 x는 3, 4, 5 또는 6이다.

[0015] 일 실시형태에서, 상기 결합 도메인들 중 하나 이상의 중쇄 가변 도메인(VH) 및 대응하는 경쇄 가변 도메인(VL)은 Fab 분자 및/또는 scFv 분자의 포맷을 갖는다.

[0016] 일 실시형태에서, 제1 결합 도메인은 Fab 분자의 포맷을 갖고/갖거나 제2 결합 도메인 및 제3 결합 도메인은 scFv 분자의 포맷을 갖는다.

[0017] 일 실시형태에서, 본 발명의 결합제는 2개의 폴리펩티드 쇄로 이루어진 이량체이며, 여기서 제1 폴리펩티드는 면역글로불린의 경쇄의 불변 도메인(CL)을 통해 추가적인 VL 도메인에 연결된 scFv를 포함하고, 제2 폴리펩티드는 면역글로불린의 중쇄의 불변 도메인 1(CH1)을 통해 추가적인 VH 도메인에 연결된 scFv를 포함한다. 상기 2개의 폴리펩티드 쇄는 바람직하게는 디설파이드 가교에 의해 함께 결합된다. 디설파이드 가교는 바람직하게는 CL 도메인 내의 Cys 잔기와 CH1 도메인 내의 Cys 잔기 사이에 형성되고, 이에 따라 제1 폴리펩티드의 추가적인 VL

도메인은 항원-결합 입체배치에서 제2 폴리펩티드의 추가적인 VH 도메인과 회합하여 결합체는 전체적으로 3개의 항원 결합 도메인을 포함한다. 본 발명에 따라, scFv 모이어티(moiety)의 VH 도메인과 VL 도메인은 바람직하게는 아미노산 서열($(G_4S)_x$ (여기서, x는 3, 4, 5 또는 6이다))를 포함하는 펩티드 링커와 같은 펩티드 링커에 의해 연결되고, Fab 쇠 및 scFv는 바람직하게는 아미노산 서열 DVP_{G2}S 또는 SGPG₃RS($(G_4S)_2$)를 포함하는 펩티드 링커와 같은 펩티드 링커에 의해 연결된다. 일 실시형태에서, scFv 모이어티는 클라우딘에 결합하고 Fab 모이어티는 T 세포-특이적 항원에 결합한다.

[0018] 일 실시형태에서, 제1 결합 도메인은 Fab 단편에 의해 포함되며 제2 결합 도메인과 제3 결합 도메인은 각각 scFv에 의해 포함되며, 여기서 Fab 단편의 각 쇠는 하나의 scFv에 연결되고, scFv는 바람직하게는 Fab 단편의 C 말단에 연결된다.

[0019] 일 실시형태에서, 결합체는 제1 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드를 포함하고, 상기 제1 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드는 T 세포-특이적 항원에 대한 특이성을 갖는 VH 도메인(VH(T)), T 세포-특이적 항원에 대한 특이성을 갖는 VL 도메인(VL(T)), 클라우딘에 대한 특이성을 갖는 제1 VH 도메인(VH(CLDN)), 클라우딘에 대한 특이성을 갖는 제2 VH 도메인(VH(CLDN)), 클라우딘에 대한 특이성을 갖는 제1 VL 도메인(VL(CLDN)) 및 클라우딘에 대한 특이성을 갖는 제2 VL 도메인(VL(CLDN))을 포함하고, 여기서 제1 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드는 결합체를 형성하도록 회합된다.

[0020] 일 실시형태에서, 결합체는

[0021] (a) T 세포-특이적 항원에 대한 특이성을 갖는 VH 도메인(VH(T)), 클라우딘에 대한 특이성을 갖는 VH 도메인(VH(CLDN)) 및 클라우딘에 대한 특이성을 갖는 VL 도메인(VL(CLDN))을 포함하는 제1 폴리펩티드; 및

[0022] (b) T 세포-특이적 항원에 대한 특이성을 갖는 VL 도메인(VL(T)), 클라우딘에 대한 특이성을 갖는 VH 도메인(VH(CLDN)) 및 클라우딘에 대한 특이성을 갖는 VL 도메인(VL(CLDN))을 포함하는 제2 폴리펩티드

[0023] 를 포함하고, 여기서 상기 제1 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드는 결합체를 형성하도록 회합된다.

[0024] 일 실시형태에서, 제1 폴리펩티드는 면역글로불린의 중쇄의 불변 도메인 1(CH1)을 추가로 포함하고, 제2 폴리펩티드는 면역글로불린의 경쇄의 불변 도메인(CL)을 추가로 포함하고, 상기 두 도메인은 모두 회합할 수 있다.

[0025] 일 실시형태에서, 제1 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드는 CH1 도메인과 CL 도메인 사이의 디설파이드 가교를 통해 공유 결합된다.

[0026] 본 발명의 결합체의 일 실시형태에서, 제1 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드에서, VH 도메인(들), VL 도메인(들), CH1 도메인 및 CL 도메인은 N-말단부터 C-말단까지 다음의 순서로 배열된다:

[0027] - VH(T)-CH1-VH(CLDN)-VL(CLDN) 및 VL(T)-CL-VH(CLDN)-VL(CLDN); 또는

[0028] - VH(T)-CH1-VL(CLDN)-VH(CLDN) 및 VL(T)-CL-VL(CLDN)-VH(CLDN); 또는

[0029] - VH(T)-CH1-VH(CLDN)-VL(CLDN) 및 VL(T)-CL-VL(CLDN)-VH(CLDN); 또는

[0030] - VH(T)-CH1-VL(CLDN)-VH(CLDN) 및 VL(T)-CL-VH(CLDN)-VL(CLDN); 또는

[0031] - VH(CLDN)-CH1-VH(T)-VL(T) 및 VL(CLDN)-CL-VH(CLDN)-VL(CLDN); 또는

[0032] - VH(CLDN)-CH1-VL(T)-VH(T) 및 VL(CLDN)-CL-VL(CLDN)-VH(CLDN); 또는

[0033] - VH(CLDN)-CH1-VL(T)-VH(T) 및 VL(CLDN)-CL-VH(CLDN)-VL(CLDN); 또는

[0034] - VH(CLDN)-CH1-VH(T)-VL(T) 및 VL(CLDN)-CL-VL(CLDN)-VH(CLDN); 또는

[0035] - VH(CLDN)-CH1-VH(CLDN)-VL(CLDN) 및 VL(CLDN)-CL-VH(T)-VL(T); 또는

[0036] - VH(CLDN)-CH1-VL(CLDN)-VH(CLDN) 및 VL(CLDN)-CL-VL(T)-VH(T); 또는

[0037] - VH(CLDN)-CH1-VL(CLDN)-VH(CLDN) 및 VL(CLDN)-CL-VH(T)-VL(T); 또는

[0038] - VH(CLDN)-CH1-VH(CLDN)-VL(CLDN) 및 VL(CLDN)-CL-VL(T)-VH(T).

[0039] 일 실시형태에서, 1개 쇠의 가장 N-말단 VH 도메인은 다른 쇠의 가장 N-말단 VL 도메인과 회합하여 결합 도메인을 형성하고 1개 쇠 내의 VH-VL 도메인 또는 VL-VH 도메인 각각은 결합 도메인을 형성한다.

- [0040] 일 실시형태에서, VH-VL 도메인 또는 VL-VH 도메인은 아미노산 서열 DVPG₂S 또는 SGPG₃RS(G₄S)₂를 포함하는 펩티드 링커와 같은 펩티드 링커를 통해 CH1 도메인 또는 CL 도메인에 연결된다.
- [0041] 일 실시형태에서, VH 도메인과 VL 도메인은 아미노산 서열 (G₄S)_x(여기서 x는 3, 4, 5 또는 6이다)를 포함하는 펩티드 링커와 같은, VH-VL 또는 VL-VH 도메인을 형성하는 펩티드 링커를 통해 연결된다.
- [0042] 본 발명의 결합제에서, T 세포-특이적 항원에 대한 특이성을 갖는 VH 도메인(VH(T)) 및 T 세포-특이적 항원에 대한 특이성을 갖는 VL 도메인(VL(T))은 T 세포-특이적 항원에 결합하는 결합 도메인을 형성하도록 회합할 수 있다.
- [0043] 또한, 본 발명의 결합제에서, 클라우딘에 대한 특이성을 갖는 VH 도메인(VH (CLDN))과 클라우딘에 대한 특이성을 갖는 VL 도메인(VL(CLDN))은 클라우딘에 결합하는 결합 도메인을 형성하도록 회합할 수 있다. 본 발명에 따라, 클라우딘에 대한 특이성을 갖는 VH 도메인(VH(CLDN)) 및 클라우딘에 대한 특이성을 갖는 VL 도메인(VL(CLDN))은 각각 동일하거나 상이할 수 있다. 본 발명의 결합제가 클라우딘에 대한 특이성을 갖는 상이한 VH 도메인(VH(CLDN), VH(CLDN)^{*}) 및/또는 클라우딘에 대한 특이성을 갖는 상이한 VL 도메인(VL(CLDN), VL(CLDN)^{*})을 포함하는 경우, VH(CLDN) 및 VL(CLDN)은 클라우딘에 결합하는 제1 결합 도메인을 형성하도록 회합할 수 있고 VH(CLDN)^{*} 및 VL(CLDN)^{*}은 클라우딘에 결합하는 제2 도메인을 형성하도록 회합할 수 있다.
- [0044] 일 실시형태에서, 본 발명의 결합제는 이중특이적 이량체 결합제이다.
- [0045] 일 실시형태에서, T 세포-특이적 항원은 T 세포의 표면에서 발현된다.
- [0046] 일 실시형태에서, 결합제가 T 세포상의 T 세포-특이적 항원에 결합하면 T 세포의 증식 및/또는 활성화가 야기된다.
- [0047] 일 실시형태에서, T 세포-특이적 항원은 CD3이다.
- [0048] 일 실시형태에서, 제1 결합 도메인은 CD3의 엡실론-쇄에 결합한다.
- [0049] 일 실시형태에서, CD3은 T 세포의 표면에서 발현된다. 일 실시형태에서, 결합제가 T 세포상의 CD3에 결합하면 T 세포의 증식 및/또는 활성화가 야기되고, 여기서 상기 T 세포는 바람직하게는 세포독성 인자, 예를 들어 퍼포린 및 그랜자임을 방출하고 암 세포의 세포용해 및 아포토시스(apoptosis)를 개시한다.
- [0050] 일 실시형태에서, 클라우딘은 암 세포의 표면에서 발현된다.
- [0051] 일 실시형태에서, 클라우딘은 클라우딘 6 및 클라우딘 18.2로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0052] 일 실시형태에서, 결합제는 클라우딘의 세포외 도메인에 결합한다.
- [0053] 일 실시형태에서, 본 발명의 결합제는 살아있는 세포의 표면에 존재하는 클라우딘의 고유한(native) 에피토프에 결합한다. 일 실시형태에서, 결합제는 클라우딘의 제1 세포외 루프에 결합한다.
- [0054] 일 실시형태에서, T 세포-특이적 항원에의 결합 및/또는 클라우딘에의 결합은 특이적 결합이다.
- [0055] 일 실시형태에서, 결합제는 클라우딘을 발현하는 암 세포에 대한 T 세포-매개 세포독성을 유도한다.
- [0056] 일 실시형태에서, 결합제는 <10 nM 또는 <1 nM 또는 <500 pM 또는 <250 pM 또는 <100 pM 또는 <50 pM의 EC₅₀으로 클라우딘을 발현하는 암 세포에 대한 T 세포 매개 세포독성을 유도한다.
- [0057] 일 실시형태에서, 클라우딘은 클라우딘 6이며, 암 세포(들)는 방광암, 난소암, 특히 난소 선암 및 난소 기형암종, 소세포 폐암(SCLC) 및 비소세포 폐암(NSCLC)을 포함하는 폐암, 특히 편평 세포 폐암종 및 선암, 위암, 유방암, 간암, 췌장암, 피부암, 특히 기저 세포 암종 및 편평 세포 암종, 악성 흑색종, 두경부암, 특히 악성 다형선종, 육종, 특히 활막 육종 및 암육종증, 담관암, 방광의 암, 특히 이행세포 암종 및 유두상 암종, 신장암, 특히 투명세포 신세포 암종 및 유두상 신세포 암종을 포함하는 신세포 암종, 결장암, 회장의 암을 포함하는 소장암, 특히 소장 선암 및 회장의 선암, 고환 배아 암종, 태반 용모암종, 자궁경부암, 고환암, 특히 고환 정상피종, 고환 기형종 및 배아 고환암, 자궁암, 기형암종 또는 배아 암종과 같은 생식세포 종양, 특히 고환의 생식세포 종양 및 이들의 전이성 형태로 이루어진 군으로부터 선택된 암 유래의 것(들)이다.
- [0058] 일 실시형태에서, 클라우딘은 클라우딘 18.2이며, 암 세포(들)는 위암, 식도암, 췌장암, 비소세포 폐암(NSCLC)과 같은 폐암, 유방암, 난소암, 결장암, 간암, 두경부암, 담낭의 암 및 이의 전이, 크루젠버그 종양, 복막 전이

및/또는 림프절 전이로 이루어진 군으로부터 선택된 암 유래의 것(들)이다.

- [0059] 일 실시형태에서, T 세포-특이적 항원은 CD3이며, VH(T)는 서열번호 5로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어지고/지거나 VL(T)는 서열번호 6으로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0060] 일 실시형태에서, 클라우딘은 클라우딘 6이며, VH(CLDN)은 서열번호 8로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어지고/지거나 VL(CLDN)은 서열번호 10으로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0061] 일 실시형태에서, T 세포-특이적 항원은 CD3이며, 클라우딘은 클라우딘 6이며,
- [0062] - 제1 폴리펩티드는 서열번호 14로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어지고, 제2 폴리펩티드는 서열번호 16으로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어진다;
- [0063] - 제1 폴리펩티드는 서열번호 15로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어지고, 제2 폴리펩티드는 서열번호 16으로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어진다;
- [0064] - 제1 폴리펩티드는 서열번호 17로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어지고, 제2 폴리펩티드는 서열번호 19로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어진다; 또는
- [0065] - 제1 폴리펩티드는 서열번호 18로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어지고, 제2 폴리펩티드는 서열번호 19로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0066] 일 실시형태에서, 클라우딘은 클라우딘 18.2이며 (i) VH(CLDN)는 서열번호 20으로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어지고/지거나 VL(CLDN)은 서열번호 22로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어지거나 (ii) VH(CLDN)은 서열번호 21로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어지고/지거나 VL(CLDN)은 서열번호 23으로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0067] 일 실시형태에서, T 세포-특이적 항원은 CD3이며, 클라우딘은 클라우딘 18.2이고
- [0068] - 제1 폴리펩티드는 서열번호 30으로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어지고 제2 폴리펩티드는 서열번호 32로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어진다;
- [0069] - 제1 폴리펩티드는 서열번호 31로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어지고 제2 폴리펩티드는 서열번호 32로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어진다;
- [0070] - 제1 폴리펩티드는 서열번호 33으로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어지고 제2 폴리펩티드는 서열번호 35로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어진다;
- [0071] - 제1 폴리펩티드는 서열번호 34로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어지고 제2 폴리펩티드는 서열번호 35로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어진다;
- [0072] - 제1 폴리펩티드는 서열번호 36으로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어지고 제2 폴리펩티드는 서열번호 37로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어진다;

- [0073] - 제1 폴리펩티드는 서열번호 38로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어지고 제2 폴리펩티드는 서열번호 39로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어진다;
- [0074] - 제1 폴리펩티드는 서열번호 40으로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어지고 제2 폴리펩티드는 서열번호 41로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어진다;
- [0075] - 제1 폴리펩티드는 서열번호 42로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어지고 제2 폴리펩티드는 서열번호 43으로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0076] 다른 실시형태에서, 본 발명의 결합제 또는 본 발명의 결합제의 하나 이상의 폴리펩티드쇄는 N-말단 분비 신호와 같은 분비 신호, 특히 서열 MGWSCIILFLVATATGVHS와 같은 IgG 분비 신호와 같은 면역글로불린을 포함하거나 포함하지 않고/않거나 태그, 특히 His-태그, 특히 서열 Gly-Gly-Ser-(His)₆ 또는 (His)₆ 또는 Strep-태그와 같은 C-말단 태그를 포함하거나 포함하지 않는다.
- [0077] 본 발명은 또한 본 발명의 결합제를 코딩하는 핵산을 제공한다.
- [0078] 본 발명은 또한 본원에 정의된 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 제공한다.
- [0079] 일 실시형태에서, 본 발명의 핵산은 벡터의 형태 또는 RNA의 형태이다.
- [0080] 일 실시형태에서, 본 발명의 핵산은 재조합 핵산이다.
- [0081] 본 발명은 또한 본 발명의 핵산을 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0082] 본 발명은 또한 의약으로서 사용하기 위한 본 발명의 결합제, 본 발명의 핵산 또는 본 발명의 숙주 세포를 제공한다.
- [0083] 본 발명은 또한 암의 치료 또는 예방에서 사용하기 위한 본 발명의 결합제, 본 발명의 핵산 또는 본 발명의 숙주 세포를 제공한다.
- [0084] 본 발명은 또한 본 발명의 결합제, 본 발명의 핵산 또는 본 발명의 숙주 세포를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0085] 일 실시형태에서, 약학 조성물은 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 추가로 포함한다.
- [0086] 본 발명은 또한 본 발명의 결합제, 본 발명의 핵산, 본 발명의 숙주 세포 또는 본 발명의 약학 조성물을 이 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 질환의 치료 방법을 제공한다. 일 실시형태에서, 질환은 암이다.
- [0087] 본 발명은 또한 본 발명의 결합제, 본 발명의 핵산, 본 발명의 숙주 세포 또는 본 발명의 약학 조성물을 이 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.
- [0088] 본 발명은 또한 의약의 제조를 위한 본 발명의 결합제, 본 발명의 핵산, 본 발명의 숙주 세포 또는 본 발명의 약학 조성물의 용도를 제공한다. 일 실시형태에서, 의약은 암 치료용이다.
- [0089] 일 실시형태에서, 상기 암 세포는 상기 결합제가 결합할 수 있는 클라우딘을 발현한다.
- [0090] 일 실시형태에서, 상기 클라우딘은 클라우딘 6이고, 상기 암은 방광암, 난소암, 특히 난소 선암 및 난소 기형암종, 소세포 폐암(SCLC) 및 비소세포 폐암(NSCLC)을 포함하는 폐암, 특히 편평 세포 폐암종 및 선암, 위암, 유방암, 간암, 췌장암, 피부암, 특히 기저 세포 암종 및 편평 세포 암종, 악성 흑색종, 두경부암, 특히 악성 다형선종, 육종, 특히 활막 육종 및 암육종증, 담관암, 방광의 암, 특히 이행세포 암종 및 유두상 암종, 신장암, 특히 투명세포 신세포 암종 및 유두상 신세포 암종을 포함하는 신세포 암종, 결장암, 회장의 암을 포함하는 소장암, 특히 소장 선암 및 회장의 선암, 고환 배아 암종, 태반 용모암종, 자궁경부암, 고환암, 특히 고환 정상피종, 고환 기형종 및 배아 고환암, 자궁암, 기형암종 또는 배아 암종과 같은 생식세포 종양, 특히 고환의 생식세포 종양 및 이의 전이성 형태로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0091] 일 실시형태에서, 상기 클라우딘은 클라우딘 18.2이고, 상기 암은 위암, 식도암, 췌장암, 비소세포 폐암(NSCLC)과 같은 폐암, 유방암, 난소암, 결장암, 간암, 두경부암, 담낭의 암 및 이의 전이, 크루켄버그 종양, 복막 전

이 및/또는 림프절 전이로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0092] 본 발명은 또한 본원에 기재된 치료 방법에서 사용하기 위한 본원에 기재된 결합제, 핵산 또는 숙주 세포를 제공한다. 일 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 치료 방법에서 사용하기 위한 본원에 기재된 약학 조성물을 제공한다.

[0093] 본 발명에 따라, 클라우딘 18.2는 바람직하게는 서열번호 1에 따른 아미노산 서열을 가지며, 클라우딘 6은 바람직하게는 서열번호 2 또는 3에 따른 아미노산 서열을 갖는다.

[0094] 본 발명의 다른 특징 및 장점은 다음의 상세한 설명 및 청구범위로부터 자명해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0095] 도 1: TAA CLDN6을 표적으로 하는 DNA 작제물 및 bstb 단백질을 예시하는 모듈 도식.

(A) DNA 수준에서 bstb 채 설계. (B) bstb 분자의 개략적 모델.

CH₁은 bstb_{369/367}의 IgG1 및 bstb_{371/367}의 IgG2로부터 유래한다.

C는 불변 영역을 나타내고; CMV는 사이토메갈로바이러스 프로모터를 나타내고; Fd는 Fab의 분해 가능한 단편/중쇄 부분(항원 결합 단편)을 나타내고; H는 중쇄를 나타내고; His는 6xHis-태그를 나타내고; L은 경쇄를 나타내고; L1은 SGPG₃RS(G₄S)₂ 링커를 나타내고; L2는 DVPG₂S 링커를 나타내고; L3은 (G₄S)₄ 링커를 나타내고; S-S는 디설파이드 가교를 나타내고; scFv는 단일쇄 가변 단편을 나타내고; Sec는 분비 신호를 나타내고; Strp는 *Strep*-태그를 나타내고; V는 가변 도메인을 나타낸다.

도 2: 세포 배양 상청액으로부터 태그된 bstb 단백질 및 태그 없는 bstb 단백질의 정제.

Expi293FTM 세포를 각각의 bstb 작제물로 일시적으로 형질감염시켰다. 형질감염 7일 후에 상청액을 수거하고 정제하였다. (A) Ni-NTA 친화성 크로마토그래피(고정된 금속 이온 친화성 크로마토그래피 - IMAC)를 통한 태그된 bstb의 첫번째 정제 단계를 나타내는 크로마토그램. y-축상의 mAU(밀리 흡광도 단위)는 x-축상의 ml 단위 용적에 대해 플롯팅되어 있다. 좌측, bstb_{369/367}의 IMAC 피크, 우측, bstb_{371/367}의 IMAC 피크. 각각의 우측 피크는 HMW 종을 함유하고 각각의 중간 피크는 단량체 종을 함유한다. 각각의 좌측 피크는 불순물을 나타낸다. 1)은 주로 단량체 종을 함유하는 주 피크로서 풀링된(pooled) 분획을 명시하고, 2)는 HMW 종으로서 풀링된 분획을 명시한다. (B) 태그된 bstb의 두번째 정제 단계를 나타내는 크로마토그램. IMAC 주 피크 풀을 Strep-Tactin[®] 친화성 크로마토그래피에 적용하였다. 좌측의 플롯, bstb_{369/367}의 피크, 우측의 플롯, bstb_{371/367}의 피크. (C) 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의한 bstb_{369/367}의 HMW 종과 단량체 종의 분리. 풀링된 HMW 분획 및 풀링된 단량체 분획은 꺾쇠괄호로 명시되어 있다. (D) 정제 후 태그 없는 bstb_{5726/5725}의 SE-HPLC 분석. y-축상의 mAU(밀리 흡광도 단위)는 x-축상의 분 단위 시간에 대해 플롯팅되어 있다.

bstb는 이종특이적 TriMAB를 나타내고; HMW는 고분자량 종을 나타내고; LMW는 저분자량 종을 나타낸다.

도 3: CLDN6 x CD3 단백질 bstb_{369/367}의 SDS-PAGE 분석.

bstb_{369/367}을 일시적으로 발현하는 Expi293FTM 세포의 상청액을 IMAC를 통해 정제하였다. HMW 종은 주 피크로부터 별도로 용출되었다. 이어서, 주 피크 종을 Strep-Tactin[®] 친화성 크로마토그래피에 적용하였다. 용출된 풀을 SEC에 의해 추가 분리하여 고도의 단량체 bstb를 수거하였다. 세포 배양 상청액, 참조물 및 상이한 정제 단계의 분취액을 비환원 조건(좌측) 및 환원 조건(우측) 하에 4 내지 15% Tris-글리신 무염색 겔(stain-free)에 로딩하였다. (A) 밴드를 형광을 통해 무염색 겔에서 가시화하였다. (B) 항-His 태그 검출 항체(상단의 블롯) 또는 StrepMAB 검출 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석. 좌측의 화살표는 비환원된 단량체 및 HMW를 명시하고, 우측의 화살표는 환원된 bstb 채를 명시한다. Fd는 Fab의 분해 가능한 단편/중쇄 부분(항원 결합 단편)을 나타내고; HMW는 고분자량 종을 나타내고; His는 6xHis-태그를 나타내고; IMAC는 고정된 금속 친화성 크로마토그래피를 나타내고; L은 경쇄를 나타내고; scFv는 단일쇄 가변 단편을 나타내고; SEC는 크기 배제 크로마토그래피를 나타내고; Strp는 *Strep*-태그를 나타낸다.

도 4: CLDN6 x CD3 단백질 bstb_{369/367} 및 bstb_{371/367}에 의해 매개되는 특이적 용해를 결정하기 위한 시험관내 세포독성 분석법.

이펙터 세포로서 인간 PBMC 및 표적 세포로서 안정하게 루시페라제 형질도입된 인간 암종 세포를 루시페라제-기반 세포독성 분석법에서 5:1의 이펙터 대 표적 비로 사용하여 특이적 농도 의존적 용해를 결정하였다. CLDN6⁺ 세포주 PA-1(난소 기형 암종) 및/또는 OV-90(난소암)은 양성 표적으로서 기능하였고 CLDN6⁻ 세포주 MDA-MB-231(유방암)은 음성 표적으로서 기능하였다. 표준 편차를 포함한 3회 반복실험의 평균값이 도시되어 있다. 최대 용해 값의 절반(EC50)은 대응하는 도표 아래에 표시되어 있다. (A) 48시간 항온배양 후 CLDN6⁺ 난소 암종 세포 OV⁻90의 bstb_369/367 및 bstb_371/367에 의해 매개된 특이적 용해(표준 기울기). (B) bstb_369/367과 CLDN6×CD3 특이적 bi-(scFv)₂ 참조 단백질에 의해 매개되는 특이적 용해(표준 기울기)의 비교. 세포주와 배양 시간은 하나의 그래프에 표시되어 있다. (C) bstb_369/367의 특이적 용해 (가변 기울기) 및 bstb_369/367의 활성화에 미치는 5% HMW의 영향. 좌측: PA-1과 함께 16시간 동안 항온배양. 우측: OV-90과 함께 48시간 동안 항온배양. 실선은 단량체 bstb_369/367의 용해 곡선을 명시하고, 점선은 5% HMW 종이 추가 첨가된(spiked) 단량체 bstb_369/367의 용해 곡선을 명시한다. (D) 48시간 항온배양 후 OV-90의 특이적 용해(표준 기울기). 좌측 플롯: 단량체로서 및 5% HMW가 추가 첨가된 단량체로서 bstb_369/367 및 태그 없는 유사체 bstb_5726/5725에 의해 매개된 용해. 우측 플롯: 참조물로서의 bstb_369/367에 의해 매개된 용해 및 단량체로서 및 5% HMW가 추가 첨가된 단량체로서 CH1(IgG2)-보유 변이체에 의해 매개된 용해.

bstb는 이중특이적 TriMAB를 나타내고; bi-(scFv)₂는 이중특이적 단일쇄 가변 단편을 나타내고; EC50은 최대 유효 농도의 절반을 나타내고; HMW는 고분자량 종을 나타낸다.

도 5: CLDN6 x CD3 단백질 bstb_369/367 및 bstb_371/367에 의해 매개되는 표적-의존적 T 세포 조절

CLDN6⁺ OV-90 및 PA-1 및 CLDN6⁻ MDA-MB-231 암 세포주를 표적 세포로서 기능하였다. 인간 PBMC는 5:1의 E:T 비에서 이펙터 세포로서 사용하였다. 활성화 대조군으로서 항-CD3 IgG2a OKT3를 100 ng/ml의 농도로 적용하였다. 모의(mock) 샘플을 DPBS 함께 항온배양하여 분석된 샘플 값에서 배경 신호를 공제하였다. 표적 세포를 포함하지 않는 PBMC를 추가의 특이성 대조군으로서 사용하였다. 모든 샘플은 24웰 포맷에서 이중으로 설정하였다. 점증 농도의 bstb 단백질 bstb_369/367 또는 bstb_371/367(0.005~5000 ng/ml)를 적용하였다. (A) T-세포 활성화: 48시간 공동-항온배양한 후 PBMC를 수거하고, 유세포계측법에 의해 생존 T 세포의 활성화를 분석하기 위해 항-CD5-PE-Cy7, 항-CD25-PE, 항-CD69-APC 및 eFluor506으로 표지하였다. (B) T 세포 증식: 분석법 시작 전에 인간 PBMC를 CFSE-염색하였다. 72시간 공동-항온배양한 후 PBMC를 수거하고, 비-림프구와 죽은 세포를 제외하기 위해 항-CD5-APC 및 eFluor506으로 표지하였다. T-세포 증식을 나타내는 CFSE 신호의 감소를 유세포계측법에 의해 분석하였다.

bstb는 이중특이적 TriMAB를 나타내고; ctrl은 대조군을 나타낸다.

도 6: 종양 특이적 항원 CLDN6에의 상이한 CLDN6 x CD3 이중특이적 항체의 결합.

(A) bi-(scFv)₂ 참조물, bstb_369/367 및 bstb_5726/5725의 상대적 결합 친화성을 내생적으로 CLDN6을 발현하는 PA-1 인간 암종 세포에서 9.77 ng/ml 내지 10 µg/ml의 농도 범위 유세포계측법에 의해 조사하였다. 1차 항체는 단백질 L-FITC(4 µg/ml)로 검출하였다. 데이터는 평균±표준 편차(n = 2회 반복실험)로서 서술되어 있다. (B) 단량체 bstb_5726/5725의 결합에 미치는 고분자량(HMW) 종의 영향을 단량체 bstb_5726/5725, 또는 약 3% 또는 5% HMW 종(농도 범위 9.77 ng/ml 내지 10 µg/ml)이 추가 첨가된 단량체 bstb_5726/5725 중 하나를 이용하여 유세포계측법으로 분석하였다. 1차 항체는 단백질 L-FITC(4 µg/ml)로 검출하였다. 데이터는 평균±표준 편차(n = 2회 반복실험)로서 서술되어 있다. bstb는 이중특이적 TriMAB를 나타내고; MFI는 중간 형광 강도를 나타낸다.

도 7: 마우스 이종이식편 종양 모델에서의 CLDN6 x CD3 단백질 bstb_369/367의 생체내 효과.

수컷과 암컷 면역결핍 NSG 마우스를 사용하였다. (A) 주사 일정 계획. 마우스에게 표적 세포로서 CLDN6⁺ 인간 난소 암종 세포 OV-90를 피하 접종하고 이펙터 세포로서 인간 PBMC를 복강내(i.p.)에 생착시켰다. 처리는 군당 약 35mm³의 평균 종양 체적에서 시작하여 일주일에 3회 복강내 수행하였다. 군 1(G1)에게는 비히클 완충액 DPBS를 투여하였고, 군 2(G2)에게는 31 µg/kg의 저 용량 bstb_369/367을 투여하였고 군 3(G3)에게는 308µg/kg의 고용량을 투여하였다. (B) 시간 경과에 따른 모든 마우스와 군의 종양 증식. 처리는 테두리로 강조된 시간 기간 동안에 복강내 적용하였다. 상단, 비히클 군 G1; 하단 좌측, 저 bstb_369/367 용량 군 G2; 하단 우측, 고 bstb_369/367 용량 군 G3; 각각의 선은 개별 마우스를 나타낸다. (C) 처리 시작일부터 안락사일까지의 모든 군

의 카플란-마이어 생존 플롯. 아래의 표는 로그 순위(만텔-콕스) 검정에 의한, G1과 비교한 G2 및 G3의 군당 중앙 생존 일수 및 생존의 유의성을 나타낸다.

bstb는 이중특이적 TriMAB를 나타내고; d는 일수를 나타내고; G는 군을 나타내고; GVHD는 이식편 대 숙주질환을 나타내고; i.p.는 복강내를 나타내고; PBMC는 말초혈 단핵세포를 나타내고; s.c.는 피하를 나타낸다.

도 8: CLDN6 x CD3 단백질 bstb_369/367의 생체내 약동학의 추정.

5mg/kg bstb_369/367을 0일에 암컷 면역결핍 NSG 마우스에게 복강내 주사하였다. DPBS 주사("0시간")은 주사 전에 대조군으로서 기능하였다. 주사 후 0.25시간, 1시간, 2시간, 3시간, 6시간 및 8시간째에 혈장을 수거하였다. bstb_369/367 혈장 농도를 ELISA를 통해 검출하였다. 농도는 y-축상에 로그 눈금으로 플롯팅되어 있다. 각 포인트는 3마리 마우스의 평균값과 표준 편차를 나타낸다. I.p.는 복강내를 나타낸다.

도 9: 마우스 이중이식편 중앙 모델에서의 CLDN6 x CD3-bstb 단백질 bstb_5726/5725을 이용한 생체내 용량 조사 결과

수컷과 암컷 면역결핍 NSG 마우스에게 표적 세포로서 CLDN6⁺ 인간 난소 암종 세포 OV-90를 피하 접종하고 이펙터 세포로서 인간 PBMC를 복강내(i.p.) 이식하였다. 처리는 군당 약 150mm³의 평균 종양 체적에서 시작하여 주 3회 복강내 수행하였다. (A) 주사 일정 계획. (B) 중앙 증식 플롯. 군(n = 6)의 투약은 단일 플롯에 나타난 바와 같았다. 대조군 G7(n = 8)에게는 DPBS를 투여하였다. 플롯은 시간 경과에 따른 모든 마우스와 군의 중앙 증식을 나타낸다. 처리 기간은 테두리로 강조되어 있다. 각각의 선은 개별 마우스를 나타낸다(마우스 ID = BIO-####).

bstb는 이중특이적 TriMAB를 나타내고; DPBS는 돌베코 인산염 완충 식염수(Dulbecco's phosphate-buffered saline)를 나타내고; i.p.는 복강내를 나타내고; PBMC는 말초혈 단핵세포를 나타내고; s.c.는 피하를 나타낸다.

도 10: TAA CLDN18.2를 표적으로 하는 DNA 작제물 및 bstb 단백질을 예시하는 모듈 도식.

(A) DNA 수준에서의 bstb 채의 설계. 항-CLDN18.2-scFv는 V_H-V_L 순서(위의 도식) 또는 V_L-V_H 순서(아래 도식) 중 하나로 배향되어 있다. 디설파이드 가교(S-S)를 갖는 작제물 및 갖지 않는 작제물("+/-")을 설계하였다. (B) 태그를 갖지만 scFv 모이어티 내에 디설파이드 가교(S-S)를 갖지 않는(상단) 및 태그가 없지만 S-S를 갖는(하단), V_H-V_L 또는 V_L-V_H 순서로 항-CLDN18.2 scFv를 갖는 예시된 bstb 분자의 이론 모델. C_H1은 IgG1 또는 IgG2로부터 유래한다.

C는 불변 영역을 나타내고; CMV는 사이토메갈로 바이러스 프로모터를 나타내고; Fd는 Fab의 분해 가능한 단편/중쇄 부분(항원 결합 단편)을 나타내고; H는 중쇄를 나타내고; His는 6xHis-태그를 나타내고; L은 경쇄를 나타내고; L1은 SGPG₃RS(G₄S)₂ 링커를 나타내고; L2는 DVP₂S 링커를 나타내고; L3은 (G₄S)₄ 링커를 나타내고; L4는 (G₄S)₅ 링커를 나타내고; S-S는 디설파이드 가교를 나타내고; scFv는 단일쇄 가변 단편을 나타내고; Sec는 분비 신호를 나타내고; Strp는 *Strep*-태그를 나타내고; V는 가변 도메인을 나타낸다.

도 11: CLDN18.2 x CD3-bstb 단백질에 의해 매개되는 특이적 용해를 비교하기 위한 시험관내 세포독성 분석법.

이펙터 세포로서 인간 PBMC 및 표적 세포로서 안정하게 루시페라제 형질도입된 인간 암종 세포를 루시페라제 기반 세포독성 분석법에서 5:1의 이펙터 대 표적 비로 사용하였다. SEC를 통한 단량체 종의 추가 농축 없이 IMAC 및 Strep-Tactin[®] 정제된 bstb 시험 항목을 사용하였다. 좌측 그래프: 48시간 항온배양 후, bstb_5730/5728, bstb_5731/5729, bstb_5732/5728 및 bstb_5733/5729에 의해 매개되는 CLDN18.2⁺ 위 암종 세포 NUGC-4_hCLDN18.2의 특이적 및 농도 의존적 용해. 우측 그래프: CLDN18.2⁻ 대조군 세포주 MDA-MB-231의 용해. 표준 편차를 포함하는 3회 반복실험의 평균 값이 제시된다.

bstb는 이중특이적 TriMAB를 나타낸다.

도 12: 정제 후 상이한 CLDN18.2 x CD3-bstb 단백질의 SE-HPLC 분석.

Expi293F[™] 세포를 bstb_5745/5747, bstb_5749/5751, bstb_5746/5748 또는 bstb_5750/5752 작제물로 일시적으로 형질감염시켰다. 형질감염시킨지 7일 후 상청액을 수거하고 정제하였다. (A) 정제 후 bstb_5745/5747(상단 플롯) 및 bstb_5749/5751(하단 플롯)의 SE-HPLC 분석. y-축상의 mAU(밀리 흡광도 단위)는 x-축상의 분 단위 시

간에 대해 플롯팅되어 있다. 단량체 함량은 항-CLDN18.2 scFv 모이어티 내에 추가의 디설파이드 결합을 함유하는 bstb_5749/5751에서 강력하게 증가되어 있다. (B) 정제 후 bstb_5746/5748(상단 플롯) 및 bstb_5750/5752(하단 플롯)의 SE-HPLC 분석. y-축상의 mAU(밀리 흡광도 단위)는 x-축상의 분 단위 시간에 대해 플롯팅되어 있다. 단량체 함량은 항-CLDN18.2 scFv 모이어티 내에 추가의 디설파이드 결합을 함유하는 bstb_5749/5751에서 강력하게 증가되어 있다.

bstb는 이중특이적 TriMAB를 나타내고; HMW는 고분자량 종을 나타내고; LMW는 저분자량 종을 나타낸다.

도 13: 고도의 단량체 디설파이드 가교 함유 CLDN18.2 x CD3-bstb 및 bi-(scFv)₂ 단백질에 의해 매개되는 특이적 용해를 비교하기 위한 시험관내 세포독성 분석법.

이펙터 세포로서 인간 PBMC 및 표적 세포로서 안정적으로 루시퍼라제 형질도입된 인간 CLDN18.2⁺ 위 암종 세포 NUGC-4_hCLDN18.2를 루시퍼라제-기반 세포독성 분석법에서 5:1의 이펙터 대 표적 비로 사용하였다. SEC에 의해 분리된 단량체 bstb 시험 항목 및 이의 bi-(scFv)₂ 단백질을 유사체를 10-포인트, 5배 연속 희석액에서 사용하였다. (A) 48시간 항온배양 후 bstb_5749/5751 및 bstb_5750/5752(좌측 그래프) 및 bi-scFv_5506 및 bi-scFv_5538(우측 그래프)에 의해 매개되는 특이적 및 농도 의존적 용해. EC50 값은 아래의 표에 요약되어 있다. "플레이트 참조물"의 EC50 값은 정규화를 위해 사용되었다. (B) "플레이트 참조물"에 대한 정규화 후 관련 bi-(scFv)₂ 유사체와 비교한 2가 bstb의 배수 차이. 계산을 위해 관련 bi-(scFv)₂ EC 50 값을 1로 설정하였다.

bi-scFv는 이중특이적 단일쇄 가변 단편을 나타내고; bstb는 이중특이적 TriMAB를 나타내고; EC50은 최대 유효 농도의 절반을 나타낸다.

도 14 : CLDN6 x CD3 bstb를 코딩하는 RNA 작제물을 설명하는 모듈 도식.

RNA 수준에서의 bstb Fd-쇄(상단)와 L-쇄(하단)의 설계.

C는 불변 영역을 나타내고; CMV는 사이토메갈로바이러스 프로모터를 나타내고; Fd는 Fab의 분해 가능한 단편/중쇄 부분(항원 결합 단편)을 나타내고; H는 중쇄를 나타내고; His는 6xHis 태그를 나타내고; L은 경쇄를 나타내고; L1은 SGPG₃RS(G₄S)₂ 링커를 나타내고; L2는 DVPG₂S 링커를 나타내고; L3은 (G₄S)₄ 링커를 나타내고; S-S는 디설파이드 가교를 나타내고; scFv는 단일쇄 가변 단편을 나타내고; Sec는 분비 신호를 나타내고; Strp는 Strep-태그를 나타내고; V는 가변 도메인을 나타낸다.

도 15: 생산자 세포에서 IVT-mRNA 코딩된 CLDN6 x CD3 bstb_435/434 및 bstb_436/434의 웨스턴 블롯 분석.

인간 만성 골수성 백혈병 세포주 K-562를 전기천공을 통해 동일한 IVT-mRNA 양의 Fd-쇄 및 L-쇄 또는 단독의 H₂O(모의)로 일시적으로 형질감염시켰다. 전기천공 48시간 후에 K-562 상청액을 회수하고 세포 용해물을 생성하였다. 참조로서 정제된 단백질 유사체 bstb_369/367(A) 또는 bstb_371/367(B)를 단량체 조제물 및 HMW 조제물로서 겔에 로딩하였다. 번역되고 정제된 단백질 생성물의 검출을 위해 구매 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.

두 bstb 돌연변이체 모두((A) bstb_435/434, (B) bstb_436/434)는 항-6xHis-태그 HRP(Fd-부분) 및 항-Strep-MAB-HRP(L-부분)에 의해 K-562 상청액 및 세포 용해물 중에서 검출되었다. 항-β-액틴 면역블롯팅은 세포 용해물에 대한 로딩 대조군으로서 기능하였다. 샘플을 첨부된 샘플 로드 표에 나타난 바와 같이 비환원 조건 및 환원 조건 하에 로딩하였다. 화살촉은 관심대상의 단백질 밴드를 나타낸다. (A) bstb_435/434 (B) bstb_436/434. (C)에서, 항체 유도체의 이중이량체 상태를 가시화하기 위해 두 bstb 돌연변이체 모두를 환원 조건 하에 항-6xHis-태그 HRP와 항-Strep-MAB-HRP의 혼합물을 이용하여 검출하였다.

bstb는 이중특이적 TriMAB를 나타내고; Fd는 Fab의 분해 가능한 단편/중쇄 부분(항원 결합 단편)을 나타내고; His는 6xHis 태그를 나타내고; HMW는 고분자량 종을 나타내고; HRP는 호스래디쉬 퍼옥시다제를 나타내고; L은 경쇄를 나타내고; scFv는 단일쇄 가변 단편을 나타내고; SN을 상청액을 나타낸다.

도 16: CLDN6 x CD3 bstb_435/434 및 bstb_436/434에 의해 매개되는 특이적 용해를 결정하기 위한 시험관내 세포독성 분석.

이펙터 세포로서 인간 PBMC 및 표적 세포로서 안정하게 루시퍼라제 형질도입된 인간 암종 세포를 루시퍼라제 기반 세포독성 분석법에서 5:1의 이펙터 대 표적 비로 사용하였다. RNA 코딩된 bstb_435/434 또는 bstb_436/434를

함유하는 K-562 SN을 7-포인트, 5배 연속 희석액에서 적용하였다. 48시간 항온배양 후 CLDN6⁺ 난소 암종 세포 OV-90의 bstb_435/434 및 bstb_436/434에 의해 매개되는 특이적 농도 의존적 용해가 나타난다. CLDN6⁺ 유방 암종 세포 MDA-MB-231은 음성 대조군으로서 기능하였다. 표준 편차를 포함하는 3회 실험의 평균값을 나타낸다.

bstb는 이중특이적 TriMAB를 나타내고; EC50는 최대 유효 농도의 절반을 나타낸다.

도 17: 마우스 이중이식 종양 모델에서 CLDN6 x CD3 RNA 및 단백질 bstb 및 bi-(scFv)₂의 생체내 효능의 비교.

수컷(검은색 기호) 및 암컷(흰색 기호) 면역결핍 NSG 마우스를 사용하였다. (A) 주사 일정 계획. 마우스에게 표적 세포로서 CLDN6⁺ 인간 난소 암종 세포 OV-90로 피하(s.c.) 접종하고 이펙터 세포로서 인간 PBMC를 복강내(i.p.) 이식하였다. 처리는 군당 약 250mm³의 평균 종양 체적에서 시작하고 주 1회 정맥내(i.v.) 실시하였다. 군 1(G1)에는 RNA 대조 복합체(TransIT 중의 루시퍼라제 RNA), G2 bstb RNA 복합체 및 G3 bi-(scFv)₂ RNA 복합체를 투여하였다. 각 주사는 총 3 µg RNA를 함유하였다. G4 내지 G6은 단백질 대조군/참조군으로서 기능하였다: G4에는 비히클 완충액(단백질 제형 완충액)을 투여하였고, G5에는 100 µg/kg bstb 참조물을 투여하였고, G6에는 200 µg/kg bi-(scFv)₂를 투여하였다. (B) 시간 경과에 따른 모든 마우스와 군의 종양 증식. 처리는 화살촉으로 나타낸 바와 같이 정맥내 적용하였다. 군당 처리는 그래프 제목으로 명시되어 있다. 각 선은 개별 마우스를 나타낸다. (C) 대조 RNA(G1), bstb RNA(G2) 또는 bi-(scFv)₂ RNA(G3)로 처리된 마우스의 이중이식된 종양 조직에 침윤된 인간 T 세포의 유세포계측 분석. 각 기호는 개별 마우스를 나타내고, 선은 군당 평균값을 나타낸다. 기호는 (B)에 따른다.

bi-scFv는 이중특이적 단일쇄 단편을 나타내고; bstb는 이중특이적 TriMAB를 나타내고; d는 일수를 나타내고; G는 군을 나타내고; GVHD는 이식편 대 숙주질환을 나타내고; i.p.는 복강내를 나타내고; PBMC는 말초혈 단핵세포를 나타내고; s.c.는 피하를 나타낸다.

도 18: IMGT 명명법에 따른 V_H 및 V_L 아미노산 서열.

본원에 기재된 bstb 분자에서 사용된 V_H 도메인 및 V_L 도메인의 표준 1문자 코드의 아미노산 서열이 도시되어 있다. A) 항-CLDN18.2 및 항-CLDN6의 V_H 서열 및 V_L 서열, B) 항-CD3의 V_H 서열 및 V_L 서열.

CDR은 상보성 결정 영역을 나타내고; FR은 프레임워크 영역을 나타내고; IMGT는 국제 면역 유전학 정보시스템(international ImmunoGeneTics information system)을 나타내고; VH는 가변 중쇄를 나타내고; VL은 가변 경쇄를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0096] 이하에 본 발명을 보다 상세히 설명하지만, 본원에 기재된 방법론, 프로토콜 및 시약이 다양할 수 있는 바 본 발명이 본원에 기재된 특정 방법론, 프로토콜 및 시약으로 한정되는 것이 아님을 이해하여야 한다. 또한, 본원에서 사용되는 용어들은 특정 실시형태를 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 한정하려는 의도는 아니며 본 발명의 범위는 첨부된 청구범위에 의해서만 한정되는 것으로 이해되어야 한다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어들은 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.

[0097] 이하에서, 본 발명의 구성요소들이 설명된다. 이러한 구성요소들은 특정 실시형태와 함께 열거되지만, 이들은 임의의 방식과 임의의 횟수로 조합되어 추가적인 실시형태를 구현할 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 다양하게 기재된 예시 및 바람직한 실시형태는 명시적으로 설명된 실시형태만으로도 본 발명을 한정하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본 명세서에는 명시적으로 기재된 실시형태와 임의의 수의 개시된 및/또는 바람직한 구성요소들을 조합하는 실시형태를 뒷받침하고 포괄하는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 본 출원에서 설명된 모든 구성요소의 임의의 순열 및 조합들은 문맥상 달리 지시되지 않는 한, 본 출원의 설명에 의해 개시된 것으로 간주되어야 한다.

[0098] 바람직하게는, 본원에서 사용되는 용어는 문헌["A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, and H. Koelbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland, (1995)]에 기재되어 있는 바와 같이 정의된다.

- [0099] 본 발명의 실시는 달리 지시되지 않는 한, 본 분야의 문헌에 설명되어 있는 종래의 화학적, 생화학적, 세포생물학적, 면역학적 방법 및 재조합 DNA 기술의 방법을 이용할 것이다(참고: 예를 들어 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).
- [0100] 본 명세서 및 하기의 청구범위 전반에 걸쳐, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, "포함하다(comprise)"란 단어 및 "포함한다(comprises)" 및 "포함하는(comprising)"와 같은 변형어는 언급된 구성원, 정수 또는 단계, 또는 구성원들, 정수들 또는 단계들의 군을 포함하는 것을 의미하되, 비록 일부 구현예에서 이러한 다른 구성원, 정수 또는 단계, 또는 구성원들, 정수들 또는 단계들의 군을 배제할 수도 있지만, 임의의 다른 구성원, 정수 또는 단계, 또는 구성원들, 정수들 또는 단계들의 군을 배제하는 것을 의미하지 않는 것으로 이해될 것이며, 즉 본 발명의 청구대상은 언급된 구성원, 정수 또는 단계, 또는 구성원들, 정수들 또는 단계들의 군을 포함하는 것이다. 본 발명을 설명하는 문맥(특히, 본 청구범위의 문맥)에서 사용되는 단수형(원문의 "a", "an" 및 "the")의 용어 및 유사한 지시대상은 본원에서 달리 지시되지 않거나 문맥에 의해 분명하게 부정되지 않는 한, 단수형과 복수형 둘 다를 포함하는 것으로 해석될 수 있다. 본원에서의 값 범위의 열거는 단순히 그 범위에 포함되는 각각의 개별 값을 개별적으로 언급하는 단축 방법으로서 기능하는 것으로 의도된다. 본원에서 달리 지시되지 않는 한, 각각의 개별 값은 마치 본원에 개별적으로 열거되어 있는 것처럼 본 명세서에 통합된다. 본원에 기재된 모든 방법은, 본원에서 달리 지적되지 않거나 또는 문맥에 의해 명백하게 부인되지 않는 한, 임의의 적절한 순서로 실시할 수 있다. 본원에서 제공되는 임의의 및 모든 예 또는 예시적인 언어(예를 들어, "와 같은")의 사용은 본 발명을 더욱 명확하게 하기 위한 것만을 의도하고, 달리 청구되지 않은 본 발명의 범위에 대한 한정을 제기하지 않는다. 본 명세서의 어떠한 언어도 본 발명의 실시를 필수적인 임의의 청구되지 않은 구성요소를 나타내는 것으로 해석되지 않아야 한다.
- [0101] 본 명세서의 본문 전반에 걸쳐 몇몇 문헌들이 인용된다. 본원에서 인용되는 각각의 문헌들(모든 특허, 특허출원, 과학 간행물, 제조업체의 설명서, 지침서 등을 포함)은 상기 또는 하기를 불문하고 그 전문이 본원에서 참조로 인용된다. 본 명세서의 어떠한 것도, 본 발명이 선행 발명을 통해 이러한 개시내용을 선행할 자격이 없다는 것을 인정하는 것으로서 해석되지 않아야 한다.
- [0102] 클라우딘은 밀착 연결의 가장 중요한 성분인 단백질들의 패밀리에, 클라우딘은 이러한 밀착 연결에서 상피 세포들 간의 세포간 공간의 분자 흐름을 제어하는 세포주위(paracellular) 장벽을 이룬다. 클라우딘은 N-말단 및 C-말단 둘 다가 세포질에 위치하는, 막을 4회 가로지르는 막관통 단백질이다. EC1 또는 ECL1라 명명되는 제1 세포외 루프는 평균 53개의 아미노산으로 이루어지고, EC2 또는 ECL2라 명명되는 제2 세포외 루프는 평균 24개의 아미노산으로 이루어진다. CLDN6 및 CLDN18.2와 같은, 클라우딘 패밀리 중 세포 표면 단백질은 다양한 기원의 종양에서 발현되며, 이의 선택적 발현(독성 관련 정상 조직에서의 발현 없음) 및 원형질막으로의 국소화로 인해 항체-매개 암 면역요법과 관련하여 표적 구조로서 특히 적합하다.
- [0103] 본 발명의 맥락에서, 바람직한 클라우딘은 CLDN6 및 CLDN18.2이다. CLDN6 및 CLDN18.2는 종양 조직에서 차등적으로 발현되는 것으로 확인되었고, CLDN18.2를 발현하는 유일한 정상 조직은 위이며 CLDN6을 발현하는 유일한 정상 조직은 태반이다.
- [0104] CLDN18.2는 위 점막의 분화된 상피 세포의 정상 조직에서 선택적으로 발현된다. CLDN18.2는 췌장 암종, 식도 암종, 위 암종, 기관지 암종, 유방 암종 및 ENT 종양과 같은 다양한 기원의 암에서 발현된다. CLDN18.2는 위암, 식도암, 췌장암, 비소세포 폐암(NSCLC)과 같은 폐암, 난소암, 결장암, 간암, 두경부암 및 담낭의 암과 같은 원발성 종양 및 이의 전이, 특히 크루젠버그 종양, 복막 전이 및 림프절 전이와 같은 위암 전이의 예방 및/또는 치료를 위한 유용한 표적이다.
- [0105] CLDN6은 예를 들어 난소암, 폐암, 위암, 유방암, 간암, 췌장암, 피부암, 흑색종, 두경부암, 육종, 담관암, 신장 세포 암 및 방광암에서 발현되는 것으로 밝혀졌다. CLDN6은 난소암, 특히 난소 선암 및 난소 기형암종, 소세포 폐암(SCLC) 및 비소세포 폐암(NSCLC)을 포함하는 폐암, 특히 편평 세포 폐암종 및 선암, 위암, 유방암, 간암, 췌장암, 피부암, 특히 기저 세포 암종 및 편평 세포 암종, 악성 흑색종, 두경부암, 특히 악성 다형 선종, 육종, 특히 활막 육종 및 암육종증, 담관암, 방광의 암, 특히 이행세포 암종 및 유두상 암종, 신장암, 특히 투명세포 신세포 암종 및 유두상 신세포 암종을 포함하는 신세포 암종, 결장암, 회장의 암을 포함하는 소장암, 특히 소장 선암 및 회장의 선암, 고환 배아 암종, 태반 융모암종, 자궁경부암, 고환암, 특히 고환 정상피종, 고환 기형종 및 배아 고환암, 자궁암, 기형암종 또는 배아 암종과 같은 생식세포 종양, 특히 고환의 생식세포 종양 및 이의 전이성 형태의 예방 및/또는 치료에 특히 바람직한 표적이다. 일 실시형태에서, CLDN6 발현과 연관된 암 질환은

난소암, 폐암, 전이성 난소암 및 전이성 폐암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는, 난소암은 암종 또는 선암이다. 바람직하게는, 폐암은 암종 또는 선암이고, 바람직하게는 세기관지 암종 또는 세기관지 선암과 같은 세기관지암이다.

- [0106] "클라우드인" 또는 "CLDN"이란 용어는 CLDN18.2 및 CLDN6을 포함한다. 바람직하게는, 클라우드인은 인간 클라우드인이다.
- [0107] "클라우드인 18" 또는 "CLDN18"이란 용어는 클라우드인 18 스플라이스 변이체 1(클라우드인 18.1(CLDN18.1)) 및 클라우드인 18 스플라이스 변이체 2(클라우드인 18.2(CLDN18.2))을 포함하는 임의의 변이체를 포함한다.
- [0108] "클라우드인 18.2" 또는 "CLDN18.2"란 용어는 바람직하게는 인간 CLDN18.2 및 특히 서열목록의 서열번호 1에 따른 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열의 변이체를 포함하는, 바람직하게는 이로 이루어진 단백질에 관한 것이다. CLDN18.2의 제1 세포의 루프는 바람직하게는 서열번호 1에 나타난 아미노산 서열의 아미노산 27번 내지 81번, 보다 바람직하게는 아미노산 29번 내지 78번을 포함한다. CLDN18.2의 제2 세포의 루프는 바람직하게는 서열번호 1에 나타난 아미노산 서열의 아미노산 140번 내지 180번 또는 144번 내지 167번을 포함한다. 상기 제1 세포의 루프 및 제2 세포의 루프는 바람직하게는 CLDN18.2의 세포의 부분을 형성한다.
- [0109] "클라우드인 6" 또는 "CLDN6"이란 용어는 바람직하게는 인간 CLDN6 및 특히 서열목록의 서열번호 2 또는 서열번호 3의 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열의 변이체를 포함하는, 바람직하게는 이로 이루어진 단백질에 관한 것이다. CLDN6의 제1 세포의 루프는 바람직하게는 서열번호 2에 나타난 아미노산 서열의 아미노산 28번 내지 80번 또는 29번 내지 81번, 보다 바람직하게는 아미노산 28번 내지 76번 또는 서열번호 3에 나타난 아미노산 서열을 포함한다. CLDN6의 제2 세포의 루프는 바람직하게는 서열번호 2에 나타난 아미노산 서열의 아미노산 138번 내지 160번, 바람직하게는 아미노산 141번 내지 159번, 보다 바람직하게는 아미노산 145번 내지 157번 또는 서열번호 3에 나타난 아미노산 서열을 포함한다. 상기 제1 세포의 루프 및 제2 세포의 루프는 바람직하게는 CLDN6의 세포의 부분을 형성한다.
- [0110] 본 발명에 따른 "변이체"란 용어는 특히 돌연변이체, 스플라이스 변이체, 입체형태 변이체(conformation), 동형(isoform), 대립형질 변이체, 종 변이체 및 종 상동체, 특히 천연적으로 존재하는 것들을 지칭한다. 대립형질 변이체는 유전자의 정상 서열의 변경에 관한 것이고, 그 중요성은 종종 불분명하다. 완전한 유전자 시퀀싱은 종종 소정의 유전자에 대한 수많은 대립형질 변이체를 동정한다. 종 상동체는 소정의 핵산 또는 아미노산 서열과는 상이한 종의 기원을 갖는 핵산 또는 아미노산 서열이다. "변이체"란 용어는 임의의 번역후 변형된 변이체 및 입체형태 변이체를 포함할 수 있다.
- [0111] 본원에 기재된 결합체의 제2 표적 분자는 T 세포-특이적 항원이다. T 세포-특이적 항원은 T 세포의 표면상의 항원이다. 이러한 T 세포-특이적 항원의 바람직한 실시형태는 CD3(분화집단(cluster of differentiation) 3) 복합체이다.
- [0112] CD3 복합체는 다분자 T-세포 수용체(TCR) 복합체의 부분으로서 성숙한 인간 T-세포, 흉선세포 및 자연살해세포의 서브세트에서 발현되는 항원을 나타낸다. T-세포 공수용체는 단백질 복합체이며 4개의 별개의쇄로 구성된다. 포유동물에서, 복합체는 CD3 γ 쇄, CD3 δ 쇄 및 2개의 CD3 ϵ 쇄를 함유한다. 이러한쇄들은 T-세포 수용체(TCR)로서 공지된 분자 및 ζ -쇄와 회합하여 T 림프구에서 활성화 신호를 발생한다. TCR, ζ -쇄와 CD3 분자는 함께 TCR 복합체를 포함한다.
- [0113] 인간 CD3 ϵ 는 진뱅크 수탁번호 NM_000733로 표시되며 서열번호 4를 포함한다. 인간 CD3 γ 는 진뱅크 수탁번호 NM_000073로 표시된다. 인간 CD3 δ 는 진뱅크 수탁번호 NM_000732로 표시된다. CD3은 TCR의 신호전달에 관여한다. 문헌[Lin and Weiss, Journal of Cell Science 114, 243-244 (2001)]에 의해 설명된 바와 같이, MHC-제시된 특이적 항원 에피토프의 결합에 의해 TCR 복합체가 활성화되면 Src 패밀리 키나제에 의한 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM)의 인산화를 초래하여 추가 키나제의 동원을 촉발하고, 이는 Ca²⁺ 방출을 포함한 T-세포 활성화를 초래한다. 예를 들어 고정화 항-CD3-항체에 의한 T 세포상의 CD3의 군집화는 T 세포 수용체의 맞물림과 유사하지만 이의 클론 전형적 특이성과 무관한 T 세포 활성화를 유도한다.
- [0114] 본원에서 사용되는 바와 같이, "CD3"은 인간 CD3을 포함하고 다분자 T 세포 수용체 복합체의 부분으로서 인간 T 세포에서 발현되는 항원을 나타낸다.
- [0115] CD3과 관련하여, 본 발명의 결합체는 바람직하게는 CD3의 엠실론-쇄를 인식하고, 특히 CD3 ϵ 의 처음 27개 N-말단 아미노산 또는 이러한 27개 아미노산 스트레치의 기능적 단편에 대응하는 에피토프를 인식한다.

- [0116] 본 발명에 따라, "클라우딘 양성 암"이란 용어 또는 유사 용어들은 클라우딘을 발현하는 암 세포, 바람직하게는 상기 암 세포의 표면에서 클라우딘을 발현하는 암 세포를 포함하는 암을 의미한다.
- [0117] "세포 표면"은 당업계에서 이의 통상적인 의미에 따라 사용되며 따라서 단백질 및 다른 분자에 의한 결합이 허용가능한 세포의 외부를 포함한다.
- [0118] 클라우딘은 세포의 표면에 위치하고 상기 세포에 첨가된 클라우딘-특이적 항체에 의한 결합이 허용가능하다면, 상기 세포의 표면에서 발현된다.
- [0119] 본 발명의 맥락에서 "세포의 부분"이란 용어는 세포의 세포외 공간을 향하고 있고 바람직하게는, 예를 들어 세포 외부에 위치한 항체와 같은 항원-결합 분자에 의해 상기 세포의 외부에서 접근가능한 단백질과 같은 분자의 일부를 지칭한다. 바람직하게는, 상기 용어는 하나 이상의 세포외 루프 또는 도메인 또는 이의 단편을 지칭한다.
- [0120] "부분" 또는 "단편"이란 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용되고 연속적인 구성요소를 지칭한다. 예를 들어, 아미노산 서열 또는 단백질과 같은 구조의 일부분은 상기 구조의 연속적인 구성요소를 지칭한다. 구조의 부분, 일부분 또는 단편은 바람직하게는 상기 구조의 하나 이상의 기능적 특성을 포함한다. 예를 들어, 에피토프 또는 펩티드의 부분, 일부분 또는 단편은 바람직하게는 그것이 유래하는 에피토프 또는 펩티드와 면역학적으로 동등하다. 단백질 서열의 일부분 또는 단편은 바람직하게는 단백질 서열의 적어도 4개, 특히 적어도 6개, 적어도 8개, 적어도 12개, 적어도 15개, 적어도 20개, 적어도 30개, 적어도 50개 또는 적어도 100개의 연속적인 아미노산을 포함한다.
- [0121] 본 발명에 따라, CLDN18.2는 그 발현 수준이 위 세포 또는 위 조직에서의 발현과 비교하여 더 낮다면 세포에서 실질적으로 발현되지 않는다. 바람직하게는, 발현 수준은 위 세포 또는 위 조직에서의 발현의 10% 미만, 바람직하게는 5%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1% 또는 0.05% 미만이거나 심지어 더 낮다. 바람직하게는, CLDN18.2는 그 발현 수준이 위 이외의 비-암 조직에서의 발현 수준을 2배 이하, 바람직하게는 1.5배만큼 초과하고, 바람직하게는 상기 비-암 조직에서의 발현 수준을 초과하지 않는 경우 세포에서 실질적으로 발현되지 않는다. 바람직하게는, CLDN18.2는 그 발현 수준이 검출 한계 미만인 경우 및/또는 그 발현 수준이 너무 낮아서 세포에 첨가된 CLDN18.2-특이적 항체에 의한 결합을 허용할 수 없는 경우, 세포에서 실질적으로 발현되지 않는다.
- [0122] 본 발명에 따라, CLDN18.2는 그 발현 수준이 위 이외의 비-암 조직에서의 발현 수준을 2배 초과, 바람직하게는 10배, 100배, 1000배 또는 10000배만큼 초과하는 경우, 세포에서 발현된다. 바람직하게는, CLDN18.2는 그 발현 수준이 검출 한계를 초과하는 경우 및/또는 그 발현 수준이 세포에 첨가된 CLDN18.2-특이적 항체에 의한 결합을 허용하기에 충분히 높은 경우, 세포에서 발현된다. 바람직하게는, 세포에서 발현된 CLDN18.2는 상기 세포 표면에 발현되거나 노출된다.
- [0123] 본 발명에 따라, CLDN6은 그 발현 수준이 태반 세포 또는 태반 조직에서의 발현과 비교해 낮은 경우 세포에서 실질적으로 발현되지 않는다. 바람직하게는, 발현 수준은 태반 세포 또는 태반 조직에서의 발현의 10% 미만, 바람직하게는 5%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1% 또는 0.05% 미만이거나 심지어 더 낮다. 바람직하게는, CLDN6은 그 발현 수준이 태반 이외의 비-암 조직에서의 발현 수준을 2배 이하, 바람직하게는 1.5배만큼 초과하고, 바람직하게는 상기 비-암 조직에서의 발현 수준을 초과하지 않는 경우 세포에서 실질적으로 발현되지 않는다. 바람직하게는, CLDN6은 그 발현 수준이 검출 한계 미만인 경우 및/또는 그 발현 수준이 너무 낮아서 세포에 첨가된 CLDN6-특이적 항체에 의한 결합을 허용할 수 없는 경우, 세포에서 실질적으로 발현되지 않는다.
- [0124] 본 발명에 따라, CLDN6은 그 발현 수준이 태반 이외의 비-암 조직에서의 발현 수준을 2배 초과, 바람직하게는 10배, 100배, 1000배 또는 10000배 초과하는 경우, 세포에서 발현된다. 바람직하게는, CLDN6은 그 발현 수준이 검출 한계를 초과하는 경우 및/또는 그 발현 수준이 세포에 첨가된 CLDN6-특이적 항체에 의한 결합을 허용하기에 충분히 높은 경우 세포에서 발현된다. 바람직하게는, 세포에서 발현된 CLDN6은 상기 세포 표면에 발현되거나 노출된다.
- [0125] 본 발명에 따라, "질환"이란 용어는 암, 특히 본원에 기재된 암의 형태를 비롯한 임의의 병리적 상태를 지칭한다. 암 또는 암의 특정 형태에 대한 모든 지칭은 이의 암 전이를 또한 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 본 출원발명에 따라 치료될 질환은 클라우딘18.2(CLDN18.2) 및/또는 클라우딘6(CLDN6)과 같은 클라우딘을 발현하는 세포와 연관되어 있다.
- [0126] "클라우딘을 발현하는 세포와 연관된 질환" 또는 유사한 표현은 본 발명에 따라, 클라우딘이 이환된 조직 또는

장기의 세포에서 발현됨을 의미한다. 일 실시형태에서, 이환된 조직이나 장기의 세포에서의 클라우딘의 발현은 건강한 조직 또는 장기에서의 상태에 비해 증가된다. 증가는 적어도 10%, 특히 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 500%, 적어도 1000%, 적어도 10000% 또는 그 이상의 증가를 의미한다. 일 실시형태에서, 발현이 이환된 조직에서만 발견되는 반면, 건강한 조직에서의 발현은 억제된다. 본 발명에 따라, 클라우딘을 발현하는 세포와 연관된 질환에는 암 질환이 포함된다. 또한, 본 발명에 따라, 암 질환은 바람직하게는 암 세포가 클라우딘을 발현하는 질환이다.

[0127] 본원에서 사용되는 바와 같이, "암 질환" 또는 "암"은 세포 성장, 증식, 분화, 유착 및/또는 이동이 비정상적으로 조절됨을 특징으로 하는 질환을 포함한다. "암 세포"란, 급속한, 제어되지 않는 세포 증식에 의해 성장하고 그 새로운 성장을 개시한 자극이 중단된 후에도 지속적으로 성장하는 비정상적 세포를 의미한다. 바람직하게는, "암 질환"은 클라우딘을 발현하는 세포를 특징으로 하고 암 세포는 클라우딘을 발현한다. 클라우딘을 발현하는 세포는 바람직하게는 본원에 기재된 암의 암 세포이다.

[0128] 본 발명에 따른 "암"이란 용어는 백혈병, 정상피종, 흑색종, 기형종, 림프종, 신경아세포종, 신경교종, 직장암, 자궁내막암, 신장암, 부신암, 갑상선암, 혈액암, 피부암, 뇌의 암, 자궁경부암, 장암(intestinal cancer), 간암, 결장암, 위암, 장암(intestine cancer), 두경부암, 위장관암, 림프절암, 식도암, 대장암, 췌장암, 이비인후(ENT) 암, 유방암, 전립선암, 자궁의 암, 난소암 및 폐암 및 이들의 전이를 포함한다. 이의 예에는 폐 암종, 유방 암종, 전립선 암종, 결장 암종, 신세포 암종, 자궁경부 암종 또는 상기 기재한 암 유형 또는 종양의 전이를 포함한다. 본 발명에 따른 암이란 용어는 또한 암 전이를 포함한다.

[0129] 본 발명에 따라, "암종"은 상피 세포로부터 유래된 악성 종양이다. 이러한 군은 일반적인 형태의 유방암, 전립선암, 폐암 및 결장암을 포함하는 가장 일반적인 암을 나타낸다.

[0130] "선암"은 선상(腺狀) 조직에서 발생하는 암이다. 이러한 조직은 또한 상피 조직으로 알려진 더 큰 조직 범주의 일부분이다. 상피 조직에는 피부, 선 및 신체의 체강 및 장기의 안을 형성하고 있는 다양한 다른 조직이 포함된다. 상피는 발생학적으로 외배엽, 내배엽 및 중배엽으로부터 유래된다. 선암으로서 분류되기 위해, 세포가 분비 특성을 가지는 한, 세포는 반드시 선의 일부분일 필요는 없다. 이러한 형태의 암종은 인간을 포함한 일부 고등 포유동물에서 발생할 수 있다. 잘 분화된 선암은 이것이 유래한 선상 조직과 유사한 경향이 있는 반면에, 열악하게 분화된 선암은 그러하지 않을 수 있다. 생검 유래의 세포를 염색함으로써, 병리학자는 종양이 선암인지 또는 일부 다른 유형의 암인지 여부를 결정할 것이다. 선암은 신체내 어디에나 있는 선의 성질로 인해 신체의 많은 조직에서 발생할 수 있다. 각 선은 동일한 물질을 분비하지 않을 수 있지만, 세포에 외분비 기능이 있는 한, 이는 선으로 간주되며, 따라서 이의 악성 형태는 선암으로서 명명된다. 악성 선암은 다른 조직을 침범하고 그렇게 하기 위해 충분한 시간이 주어진다면 종종 전이된다. 난소 선암은 가장 일반적인 유형의 난소 암종이다. 이는 장액성 및 점액성 선암, 투명세포 선암 및 자궁내막양 선암을 포함한다.

[0131] "전이"란, 암세포가 원래 위치에서 다른 신체 부위로 확산되는 것을 의미한다. 전이의 형성은 매우 복잡한 과정이며 원발성 종양으로부터 악성 세포가 분리되고 세포외 기질로 침투하며 내피 기저막으로 투과하여 체강과 혈관으로 진입한 다음, 혈액에 의해 운반된 후, 표적 장기로 침윤하는 것에 의존한다. 마지막으로, 표적 부위에서 새로운 종양의 성장은 혈관신생에 의존한다. 종양 전이는 종양 세포 또는 성분이 전이 잠재성을 유지하고 발달시킬 수 있기 때문에 원발성 종양의 제거 후에도 종종 발생한다. 일 실시형태에서, 본 발명에 따른 "전이"라는 용어는 원발성 종양 및 국소 림프절계로부터 멀리 떨어진 전이와 관련된 "원거리 전이"에 관한 것이다. 일 실시형태에서, 본 발명에 따른 "전이"라는 용어는 림프절 전이에 관한 것이다. 본 발명의 요법을 이용하여 치료 가능한 한가지 특정 형태의 전이는 원발성 부위로서 위암으로부터 기원하는 전이이다. 바람직한 실시형태에서, 이러한 위암 전이는 크루첸버그 종양, 복막 전이 및/또는 림프절 전이이다.

[0132] 크루첸버그 종양은 모든 난소 종양의 1% 내지 2%를 차지하는, 난소의 흔치 않은 전이성 종양이다. 크루첸버그 종양의 예후는 여전히 매우 불량하고 크루첸버그 종양에 대한 확립된 치료법은 없다. 크루첸버그 종양은 난소의 전이성 반지고리 세포(signet ring cell) 선암이다. 위는 대부분의 크루첸버그 종양 사례(70%)에서 원발성 부위이다. 결장, 맹장 및 유방의 암종(주로 침윤성 소엽 암종)은 그 다음으로 가장 일반적인 원발성 부위이다. 담낭, 담관, 췌장, 소장, 바터 팽대부, 자궁경부 및 방광/요막관의 암종으로부터 기원하는 크루첸버그 종양의 희귀 사례가 보고되었다.

[0133] "치료하다(treat)"란, 대상체에서 종양의 크기 또는 종양의 수를 감소시키는 것; 대상체에서 질환을 정지 또는 둔화시키는 것; 대상체에서 새로운 질환의 발달을 억제 또는 둔화시키는 것; 현재 질환을 앓고 있거나 이전에 질환에 앓았던 대상체에서 증상 및/또는 재발의 빈도 또는 중증도를 감소시키는 것; 및/또는 대상체의 수명을

연장, 즉 증가시키는 것을 포함하여 질환을 예방 또는 제거하기 위해, 대상체에게 화합물 또는 조성물 또는 화합물이나 조성물의 조합물을 투여하는 것을 의미한다.

- [0134] 특히, "질환의 치료"란 용어는 질환 또는 이의 증상을 치유, 기간 단축, 완화, 예방하거나 둔화시키거나 진행 또는 악화를 억제하거나 또는 개시를 예방 또는 둔화시키는 것을 포함한다.
- [0135] 본 발명의 맥락에서 "보호하다", "예방하다", "예방적", "방지적" 또는 "방어적"과 같은 용어들은 대상체에서 질환의 발생 및/또는 전파의 예방 또는 치료 또는 이들 둘 다에 관한 것이고, 특히, 대상체에서 질환이 발달할 수 있는 가능성을 최소화하거나 질환의 발달을 지연시키는 것에 관한 것이다. 예를 들어, 암의 위험에 처한 인간은 암을 예방하기 위한 요법의 후보가 될 수 있다.
- [0136] "위험에 처한"이란, 일반 집단과 비교하여, 질환, 특히 암이 발달할 확률이 정상인보다 높은 것으로 확인된 대상체를 의미한다. 또한, 질환, 특히 암을 앓았거나 또는 현재 앓고 있는 대상체는 이러한 대상체에서는 계속 질환이 발달할 수 있기 때문에 질환이 발달할 위험이 증가된 대상체이다. 현재 암을 앓고 있거나 앓았던 대상체는 또한 증가된 암 전이의 위험성을 갖는다.
- [0137] "환자"란 용어는 본 발명에 따라 치료의 대상체, 특히 질환에 걸린 대상체를 의미하며 여기에는 인간, 비인간 영장류 또는 또 다른 동물, 특히 소, 말, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이와 같은 포유동물 또는 마우스 및 래트와 같은 설치류가 포함된다. 특히 바람직한 실시형태에서, 환자는 인간이다.
- [0138] "표적 세포"는 암 세포와 같은 임의의 원치 않는 세포를 의미한다. 바람직한 실시형태에서, 표적 세포는 클라우딘을 발현한다.
- [0139] "항원"이란 용어는 그에 대한 물질이 바람직하게는 면역반응을 유도하도록 지시되고/되거나 지시될 예정인 에피토프를 포함하는 단백질 또는 펩티드와 같은 분자에 관한 것이다. 바람직한 실시형태에서, 항원은 CLDN18.2 또는 CLDN6과 같은 종양-관련 항원, 즉 세포질, 세포 표면 및 세포핵으로부터 유래될 수 있는 암 세포의 구성성분, 특히 바람직하게는 대량으로, 세포내에서 또는 암 세포상의 표면 항원으로서 생산되는 항원이다.
- [0140] 본 발명의 맥락에서 "종양-관련 항원"이란 용어는 바람직하게는 정상 조건 하에서는 제한된 수의 조직 및/또는 장기에서 특이적으로 또는 특정 발달 단계에서 발현되고 하나 이상의 종양 또는 암 조직에서 발현되거나 또는 비정상적으로 발현되는 단백질에 관한 것이다. 본 발명의 맥락에서, 종양-관련 항원은 바람직하게는 암 세포의 세포 표면과 연관이 있고 바람직하게는 정상 조직에서는 발현되지 않거나 드물게만 발현된다.
- [0141] "에피토프"란 용어는 분자 내의 항원 결정기, 예를 들어 면역계에 의해 인식되는, 예를 들어 항체에 의해 인식되는 분자 내의 일부분을 지칭한다. 예를 들어, 에피토프는 면역계에 의해 인식되는, 항원상의 불연속적인 3차원 부위이다. 에피토프는 일반적으로 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자의 화학적으로 활성인 표면 군화로 구성되어 일반적으로 특정한 3차원 구조적 특징뿐만 아니라 특정한 전하 특징을 갖는다. 입체형태적 에피토프 및 비입체형태적 에피토프는 변성 용매의 존재 하에 전자에 대한 결합은 결여되는 반면 후자에 대한 결합은 그렇지 않다는 점에서 구별된다. 단백질의 에피토프는 바람직하게는 상기 단백질의 연속적인 또는 불연속적인 부분을 포함하며 바람직하게는 길이가 5 내지 100개, 바람직하게는 5 내지 50개, 더욱 바람직하게는 8 내지 30개, 가장 바람직하게는 10 내지 25개의 아미노산, 예를 들어 에피토프는 길이가 바람직하게는 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개 또는 25개 아미노산일 수 있다.
- [0142] 본원에서 사용되는 바와 같이, "결합제"란 용어는 목적하는 항원에 결합할 수 있는 임의의 제제를 지칭한다. 본 발명의 특징의 실시형태에서, 결합제는 항체, 항체 단편 또는 이의 작제물이다. 결합제는 또한 합성, 변형된 또는 비-천연 발생 모이어티, 특히 비-펩티드 모이어티를 포함할 수 있다. 이러한 모이어티는 예를 들어 항체 또는 항체 단편과 같은 목적하는 항원-결합 작용기 또는 영역을 연결시킬 수 있다. 일 실시형태에서, 결합제는 항원-결합 CDR 또는 가변 영역을 포함하는 합성 작제물이다.
- [0143] "면역글로불린"이란 용어는 면역글로불린 슈퍼패밀리의 단백질, 바람직하게는 항체 또는 B 세포 수용체(BCR)와 같은 항원 수용체에 관한 것이다. 면역글로불린은 특징적인 면역글로불린(Ig) 폴드를 갖는 구조 도메인, 즉 면역글로불린 도메인을 특징으로 한다. 상기 용어는 막 결합형 면역글로불린뿐만 아니라 가용성 면역글로불린을 포함한다. 가용성 면역글로불린은 일반적으로 항체로 명명된다. 면역글로불린은 일반적으로 수개의쇄, 전형적으로 디설파이드 결합을 통해 연결된 2개의 동일한 중쇄 및 2개의 동일한 경쇄를 포함한다. 이러한쇄들은 V_L (가변 경쇄) 도메인, C_L (불변 경쇄) 도메인 및 C_H (불변 중쇄) 도메인인 C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} 및 C_{H4} 와 같은 면역글로불린

도메인들로 주로 구성된다. 항체의 상이한 클래스, 즉 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM을 설명하는 5가지 유형의 포유동물 면역글로불린 중쇄, 즉 α , δ , ϵ , γ , 및 μ 가 있다. 가용성 면역글로불린의 중쇄와는 대조적으로, 막 또는 표면 면역글로불린의 중쇄는 이들의 카복시-말단에 막관통 도메인과 짧은 세포질 도메인을 포함한다. 포유동물에는 2가지 유형의 경쇄, 즉 람다 및 카파가 있다. 면역글로불린 쇠는 가변 영역과 불변 영역을 포함한다. 불변 영역은 면역글로불린의 상이한 이소형(isotype) 내에 본질적으로 보존되어 있고, 여기서 가변 부분은 고도로 다양하고 항원 인식을 담당한다.

[0144] "항체"란 용어는 디설파이드 결합에 의해 상호연결된 적어도 2개의 중(H)쇄와 2개의 경(L)쇄를 포함하는 면역글로불린 또는 이의 항원 결합 부분을 지칭한다. "항체"란 용어는 단일클론 항체, 재조합 항체, 인간 항체, 인간화 항체 및 키메라 항체를 포함한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본원에서는 VH로 약칭함) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서는 VL로 약칭함) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. "영역"이란 용어와 "도메인"이란 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용된다. VH 영역 및 VL 영역은 프레임워크 영역(FR)이라 명명되는 더욱 보존된 영역이 산재되어 있는, 상보성 결정 영역(CDR)이라 명명되는 초가변 영역으로 추가 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 아미노-말단부터 카복시-말단까지 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변 영역은 면역계의 다양한 세포(예를 들어, 이펙터 세포) 및 고전 보체계의 제1 성분(C1q)을 포함하는 숙주 조직 또는 인자에의 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다.

[0145] 본원에서 사용된 바와 같이 "단일클론 항체"란 용어는 단일 분자 조성의 항체 분자의 조제물을 지칭한다. 단일클론 항체는 단일 결합 특이성 및 친화성을 나타낸다. 일 실시형태에서, 단일클론 항체는 불멸화된 세포에 융합된, 비-인간 동물, 예를 들어, 마우스로부터 수득된 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 생성된다.

[0146] 본원에서 사용되는 바와 같이, "재조합 항체"란 용어는 (a) 면역글로불린 유전자에 대하여 유전자이식(transgenic) 또는 염색체이식(transchromosomal)한 동물(예를 들어, 마우스) 또는 이로부터 제조된 하이브리도마로부터 단리된 항체, (b) 항체를 발현하도록 형질전환된 숙주세포, 예를 들어 형질감염종(transfectoma)으로부터 분리된 항체, (c) 재조합의 조합적 항체 라이브러리로부터 단리된 항체 및 (d) 면역글로불린 유전자 서열을 다른 DNA 서열로 스플라이싱하는 것을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제조, 발현, 창출 또는 단리된 항체와 같은, 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 창출 또는 단리된 모든 항체를 포함한다.

[0147] 본원에서 사용되는 바와 같이, "인간 항체"란 용어는 인간 생식계열(germline) 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 영역 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 인간 항체는 인간 생식계열 면역글로불린 서열에 의해 코딩되지 않은 아미노산 잔기(예를 들어, 시편관내 무작위 또는 부위 특이적 돌연변이유발에 의해 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다.

[0148] "인간화 항체"란 용어는 비-인간 종의 면역글로불린으로부터 실질적으로 유래된 항원 결합 부위를 갖고 분자의 나머지 면역글로불린 구조가 인간 면역글로불린의 구조 및/또는 서열에 기반하는 분자를 지칭한다. 항원 결합 부위는 불변 도메인에 융합된 완전한 가변 도메인을 포함하거나 가변 도메인 내의 적절한 프레임워크 영역에 이식된 상보성 결정 영역(CDR)만을 포함할 수 있다. 항원 결합 부위는 야생형일 수 있거나 하나 이상의 아미노산 치환에 의해 변형, 예를 들어 인간 면역글로불린과 더 유사하게 변형될 수 있다. 인간화 항체의 일부 형태는 모든 CDR 서열(예를 들어, 마우스 항체 유래의 6개의 CDR 모두를 함유하는 인간화 마우스 항체)을 보존한다. 다른 형태는 원래의 항체와 관련하여 변경된 하나 이상의 CDR을 갖는다.

[0149] "키메라 항체"란 용어는, 중쇄 및 경쇄의 각각의 아미노산 서열의 일부분은 특정 종으로부터 유래되거나 특정 클래스에 속하는 항체 내의 대응하는 서열들과 상동성인 반면 쇠의 나머지 세그먼트는 다른 쇠 내의 대응하는 서열과 상동성인 항체를 지칭한다. 전형적으로, 경쇄 및 중쇄의 가변 영역은 포유동물의 한 종으로부터 유래된 항체의 가변 영역을 모방하는 반면, 불변 부분은 또 다른 것으로부터 유래된 항체의 서열과 상동이다. 이러한 키메라 형태에 대한 한가지 명백한 이점은, 비-인간 숙주 유기체 유래의 용이하게 이용가능한 B-세포 또는 하이브리도마를 예를 들어 인간 세포 조제물로부터 유래된 불변 영역과 조합하여 사용하여 현재 알려진 공급원으로부터 가변 영역을 편리하게 유도할 수 있다는 점이다. 가변 영역은 제조의 용이함이라는 이점을 가지고 특이성은 공급원에 의해 영향을 받지 않지만, 인간의 것인 불변 영역은 항체가 주사될 때 비-인간 공급원 유래의 불변 영역인 것보다는 인간 대상체로부터 면역반응을 유도할 가능성이 낮다. 그러나, 정의는 이러한 특정 예로 한정되지는 않는다.

[0150] 항체는 마우스, 래트, 토끼, 기니아피그 및 인간을 포함하나 이에 한정되지 않는 상이한 종으로부터 유래될 수 있다.

- [0151] 본원에 기재된 항체는 IgA1 또는 IgA2와 같은 IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgM 및 IgD 항체를 포함한다. 다양한 실시형태에서, 항체는 IgG1의 항체, 더욱 특히 IgG1, 카파 또는 IgG1, 람다 이소형(즉, IgG1, κ , λ), IgG2a 항체(예를 들어, IgG2a, κ , λ), IgG2b 항체(예를 들어, IgG2b, κ , λ) IgG3 항체(예를 들어, IgG3, κ , λ) 또는 IgG4 항체(예를 들어, IgG4, κ , λ)이다.
- [0152] 본원에서 사용되는 바와 같이, "이종 항체"는 이러한 항체를 생산하는 유전자이식 유기체와 관련하여 정의된다. 상기 용어는 유전자이식 유기체를 구성하지 않는 유기체에서 발견되는 것에 상응하고 유전자이식 유기체 외의 종으로부터 일반적으로 유래되는 아미노산 서열 또는 코딩 핵산 서열을 갖는 항체를 지칭한다.
- [0153] 본원에서 사용되는 바와 같이, "이종하이드리드(heterohybrid) 항체"는 상이한 유기체 기원의 경쇄 및 중쇄를 갖는 항체를 지칭한다. 예를 들어, 무린(murine) 경쇄와 회합된 인간 중쇄를 갖는 항체는 이종하이드리드 항체이다.
- [0154] 본원에 기재된 항체와 같은 결합체는 바람직하게는 단리된다. 본원에서 사용되는 "단리된"은, 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 결합체가 실질적으로 없는 결합체를 지칭하는 것으로 의도된다(예를 들어, CLDN18.2에 특이적으로 결합하는 단리된 결합체는 CLDN18.2 이외의 항원에 특이적으로 결합하는 결합체가 실질적으로 없다). 그러나, 인간 CLDN18.2의 에피토프, 동형 또는 변이체에 특이적으로 결합하는 단리된 결합체는 예를 들어 다른 종(예를 들어, CLDN18.2 종 상동체) 유래의 다른 관련된 항원에 대한 교차반응성을 가질 수 있다. 또한, 단리된 결합체는 다른 세포 물질 및/또는 화학물질이 실질적으로 없을 수 있다.
- [0155] 항체의 "항원-결합 부분"(또는 간단히 "결합 부분") 또는 항체의 "항원-결합 단편"(또는 간단히 "결합 단편")이란 용어 또는 유사한 용어는 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편을 지칭한다. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 실행될 수 있는 것으로 나타났다. 항체의 "항원-결합 부분"이란 용어에 포괄되는 결합 단편의 예에는 (i) VL 도메인, VH 도메인, CL 도메인 및 CH 도메인으로 이루어진 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 디설파이드 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (iii) VH 도메인 및 CH 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 암(arm)의 VL 도메인 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (v) VH 도메인으로 이루어진 dAb 단편(Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546); (vi) 단리된 상보성 결정 영역(CDR); 및 (vii) 임의로 합성 링커에 의해 연결될 수 있는 2종 이상의 단리된 CDR의 조합이 포함된다. 또한, Fv 단편의 2개의 도메인, VL 및 VH는 별도의 유전자에 의해 코딩되지만, 상기 2개의 도메인을 재조합 방법을 사용하여, VL 영역과 VH 영역이 쌍을 이루어 1가 분자를 형성하는 단일 단백질 쇄(단일 쇄 Fv(scFv)로서 공지되어 있음; 예를 들어, 문헌[Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; 및 Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883]을 참조)를 형성하는 단일 단백질 쇄로서 제조할 수 있게 하는 합성 링커에 의해 연결시킬 수 있다. 또한, 이러한 단일 쇄 항체는 항체의 "항원-결합 단편"이란 용어에 포함되는 것으로 의도된다. 추가의 예는 (i) 면역글로불린 힌지 영역 폴리펩티드에 융합된 결합 도메인 폴리펩티드, (ii) 힌지 영역에 융합된 면역글로불린 중쇄 CH2 불변 영역, 및 (iii) CH2 불변 영역에 융합된 면역글로불린 중쇄 CH3 불변 영역을 포함하는 결합-도메인 면역글로불린 융합 단백질이다. 결합 도메인 폴리펩티드는 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역일 수 있다. 결합-도메인 면역글로불린 융합 단백질은 US 2003/0118592 및 US 2003/0133939에 추가로 개시되어 있다. 이들 항체 단편은 당업자에게 공지된 통상적 기술을 사용하여 수득되며, 상기 단편은 온전한 항체와 동일한 방식으로 유용성에 대해 스크리닝된다.
- [0156] 단일쇄 가변 단편(scFv)은 일반적으로 10개 내지 약 30개의 아미노산의 짧은 링커 펩티드로 연결된, 면역글로불린의 중쇄(VH)와 경쇄(VH)의 가변 영역의 융합 단백질이다. 링커는 일반적으로 유연성을 위해 글리신이 풍부할 뿐만 아니라 가용성을 위해 세린 또는 트레오닌이 풍부하고 VH의 N-말단을 VL의 C-말단과 연결시킬 수 있거나 그 반대도 가능하다. 2가(divalent 또는 bivalent) 단일쇄 가변 단편(di-scFvs, bi-scFvs)은 2개의 scFv를 연결시켜 조작할 수 있다. 이것은 2개의 VH 영역과 2개의 VL 영역을 갖는 단일 펩티드 쇄를 제조하여 탠덤(tandem) scFv를 생성함으로써 실행할 수 있다. 본 발명은 또한 2개 초과 scFvs 결합 도메인을 포함하는 다중 특이적 분자를 포함한다. 하나의 일반적으로 유연한 연결 펩티드는 (Gly₄Ser)_x이고, 여기서 x는 3, 4, 5 또는 6 일 수 있다. 임의로, VH와 VL의 회합은 하나 이상의 분자간 디설파이드 결합에 의해 안정화될 수 있다.
- [0157] 본원에서 사용되는 바와 같이, "결합 도메인" 또는 "항원-결합 도메인"이란 용어는 예를 들어 항원에 결합하고 항체의 항원-결합 부분을 포함하는 항체의 부위를 지칭한다. 결합 도메인은 각각 4개의 보존된 프레임워크 영역(FR)과 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 도메인 및 경쇄 가변 도메인(VH 및 VL)으로 구성될 수 있다. CDR은 서열이 다양하고 특정 영역에 대한 특이성을 결정한다. VH 도메인과 VL 도메인은 함께 특정 항원에 특이적으로 결합하

는 부위를 형성할 수 있다.

- [0158] Fab(단편 항원 결합) 항체 단편은 중쇄 가변 영역(VH)과 중쇄 불변 영역 1(CH1) 부분으로 이루어진 폴리펩티드 및 경쇄 가변 영역(VL)과 경쇄 불변 영역(여기서, CL 부분과 CH1 부분은 바람직하게는 Cys 잔기들 간의 디설파이드 결합에 의해 함께 연결된다)으로 이루어진 펩티드로 구성된 항체의 1가 항원-결합 도메인을 포함하는 면역 반응성 폴리펩티드이다. 바람직하게는 본원에 기재된 Fab 단편에서, CH1 영역 및 CL 영역은 인간 기원의 것이다. 일 실시형태에서, CL 영역은 카파형 CL 영역이다. 일 실시형태에서, CH1 영역은 IgG1 또는 IgG2로부터 유래된다.
- [0159] 본 발명의 목적상 본원에 기재된 항체 단편과 같은 모든 항체 및 항체의 유도체는 "항체"란 용어에 포함된다. "항체 유도체"란 용어는 항체의 임의의 변형된 형태, 예를 들어 항체와 다른 체제 또는 항체, 또는 항체 단편과의 접합체를 의미한다. 추가로, 본원에 기재된 항체 및 항체의 유도체는 항체 단편과 같은 본 발명의 결합체를 제조하는 데 유용하다.
- [0160] 천연 발생 항체는 일반적으로 단일특이적인데, 즉 천연 발생 항체는 단일 항원에 결합한다. 본 발명은 T 세포(예를 들어, CD3 수용체와 맞물림으로써)와 같은 세포독성 세포 및 암 세포(예를 들어, 클라우딘과 맞물림으로써)와 같은 표적 세포에 결합하는 세포독성 세포에 결합하는 결합체를 제공한다. 본 발명의 결합체는 적어도 2종의 상이한 유형의 항원에 결합하고 적어도 이중특이적이거나 삼중특이적, 사중특이적 등과 같은 다중특이적이다.
- [0161] 본 발명의 결합체는 적어도 3가일 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "가(valent)", "결합가(valence 또는 valencies)", 또는 이의 다른 문법적 변형어는 결합체 내의 항원 결합 부위 또는 결합 도메인의 수를 의미한다. 동일한 항원에 결합하는 항원 결합 부위는 동일한 에피토프 또는 상이한 에피토프를 인식할 수 있다. 3가 이중특이적 항체 및 4가 이중특이적 항체는 당업계에 공지되어 있다. 본 발명의 결합체는 4보다 높은 결합가를 가질 수도 있다.
- [0162] 본원에 기재된 결합체는 바람직하게는 적어도 2종의 상이한 항체의 단편(적어도 2종의 상이한 결합 도메인을 형성하는 적어도 2종의 상이한 항체의 상기 단편)으로 구성될 수 있고 이에 따라 적어도 2종의 상이한 유형의 항원에 결합할 수 있는 인공 단백질(단백질 복합체를 포함)이다. 본 발명에 따른 결합체는 면역 이펙터 세포, 특히 세포독성 세포와 같은 T 세포(예를 들어, CD3에 결합함으로써)와 같은 면역 세포 및 암 세포(종양 관련 항원 클라우딘에 결합함으로써)와 같은 표적 세포에 동시에 결합하도록 조작된다.
- [0163] 몇가지 유형의 3가 항체가 개발되었고 모든 유형은 본 발명의 범위 내에 있다. 트리플바디(triplebody) 또는 단일쇄 삼중 항체(sctb)는 링커 서열에 의해 연결된 3개의 별개의 scFv 영역으로 구성된다. 또한, 중쇄(CH1 도메인) 및 경쇄(CL 도메인)의 천연 생체내 이중이량체화는 다수의 scFv가 첨가될 수 있는 스캐폴드를 형성하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 하나의 항원에 특이적인 scFv은 다른 항원에 특이적인 scFv에 역시 연결되어 있는 CH1 도메인에 연결될 수 있고 이러한 쇄는 CL 도메인(scFv3-CH1/CL)에 연결된 항원에 특이적인 scFv를 함유하는 다른 쇄와 상호작용할 수 있다. 3가 작제물의 다른 예는 각 쇄에 하나씩, 다른 에피토프에 특이적인 2개의 scFv에 C-말단에서 연결된 한 에피토프에 특이적인 Fab 단편(Fab-scFv2)의 사용을 포함한다. 3가(또는 4가) 분자의 또 다른 예는 항체의 N- 또는 C-말단에 부착된 추가적인 결합 실체를 함유하는 각종 포맷을 포함한다. 예를 들어, 하나의 포맷은 분자의 C-말단 단부에 연결된 단일쇄 Fab(scFab)를 갖는 하나의 항원에 특이적인 온전한 항체 분자(IgG-scFab)로 이루어진다. 3가 항체(DNL-F(ab)3)를 생성하기 위해 독 앤 락(dock-and-lock)(DNL) 접근법이 또한 사용되었다(Chang, C.-H. et al. In: Bispecific Antibodies. Kontermann R E (ed.), Springer Heidelberg Dordrecht London New York, pp. 199-216 (2011)). 상기 항체들 각각은 본 발명의 범위 내에 있다.
- [0164] 4가 항체가 또한 작제되었으며 모든 유형은 본 발명의 범위 내에 있다. 4가 항체의 예에는 scFv2-Fc, F(ab')2-scFv2, scFv2-H/L 및 scFv-dhlx-scFv 분자가 포함되지만 이에 한정되지는 않는다. 이중특이적 scFv2-Fc 작제물은 Fc 쇄의 N-말단에 연결된 한 분자에 대한 2개의 scFv와 Fc 쇄의 C-말단에 연결된 또 다른 분자에 대한 또 다른 2개의 scFv를 갖는 Fc 도메인을 갖는다. 이중특이적 F(ab')2-scFv2 작제물은 F(ab')2 단편의 C-말단 단부에 연결된 scFv 단편을 포함한다. scFv2-H/L 작제물은 중쇄에 연결된 하나의 분자에 특이적인 scFv를 갖는 반면에, 다른 분자에 특이적인 scFv는 경쇄에 연결된다. 마지막으로, scFv-dhlx-scFv 작제물은 나선형 이량체화 도메인에 연결된 한가지 유형의 scFv에 이어서 다른 유형의 scFv를 함유한다. 이러한 유형의 2개 쇄는 이량체화되어 4가 항체를 생성할 수 있다.
- [0165] 본 발명의 결합체는 항체 분자 또는 항체-유사 분자 또는 항체-유사 특성을 갖는 단백질 스캐폴드 또는 적어도

2가지의 결합 특이성을 갖는 사이클릭 펩티드의 형태일 수 있다. 따라서, 결합제는 본원에 기재된 하나 이상의 항체 또는 이의 단편을 포함할 수 있다.

- [0166] 일 실시형태에서, 본 발명의 결합제는 이량체화될 수 있고 추가적인 결합 기능 또는 도메인이 혼입될 수 있는 Fab 단편의 중쇄(Fd 단편) 및 경쇄(L)를 포함한다. 이러한 추가적인 결합 도메인은 scFv 결합 도메인과 같은 2개의 항체 가변 영역을 포함하는 결합 도메인, 즉 VH-VL 또는 VL-VH, 및 VH 결합 도메인 및 VHH 결합 도메인과 같은 하나의 항체 가변 영역을 포함하는 결합 도메인으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택될 수 있다.
- [0167] 일 실시형태에서, 본 발명의 결합제는 Fab-scFv2 작제물, 즉 바람직하게는 Fab 단편의 불변 영역의 C-말단에 2개의 scFv 단편이 제공된 Fab 단편의 형태이다. 일 실시형태에서, 본 발명의 결합제는 바람직하게는 디설파이드 가교에 의해 함께 결합된 2개의 폴리펩티드 쇠로 구성된 이량체로서, 제1 폴리펩티드가 CL 폴리펩티드 쇠를 통해 추가적인 VL 도메에 연결된 scFv를 포함하고 제2 폴리펩티드가 CH1 폴리펩티드 쇠를 통해 추가적인 VH 도메인에 연결된 scFv를 포함하는 이량체이다. 디설파이드 가교는 바람직하게는 CL 내의 Cys 잔기와 CH1 내의 Cys 잔기 간에 형성되고 이에 따라 제1 폴리펩티드의 추가적인 VL이 제2 폴리펩티드의 추가적인 VH와 항원-결합 입체 형태로 회합하여 결합제는 전체적으로 3개의 항원-결합 도메인을 포함한다. 따라서, 일 실시형태에서, 본 발명의 결합제는 이량체화될 수 있고 scFv 결합 도메인이 (바람직하게는 Fd/L의 C-말단에서) 혼입될 수 있는 Fab 단편의 중쇄(Fd 단편) 및 경쇄(L)를 포함한다. 본 발명에 따라, scFv 모이어티 내의 VH 도메인과 VL 도메인은 바람직하게는 펩티드 링커에 의해 연결되고/되거나 Fab 쇠와 scFv는 바람직하게는 펩티드 링커에 의해 연결된다. 본 발명에 따라, scFv 모이어티 내의 VH 도메인과 VL 도메인은 바람직하게는 아미노산 서열 (G₄S)_x을 포함하는 펩티드 링커에 의해 연결되고, 여기서 x는 3, 4, 5 또는 6이다. Fab 쇠와 scFv는 바람직하게는 아미노산 서열 DVPG₂S 또는 SGPG₃RS(G₄S)₂를 포함하는 펩티드 링커에 의해 연결된다. 일 실시형태에서, 아미노산 서열 SGPG₃RS(G₄S)₂를 포함하는 링커는 scFv 결합 도메인을 Fd 단편에 연결시키고 아미노산 서열 DVPG₂S를 포함하는 링커는 scFv 결합 도메인을 L 단편에 연결시킨다. 일 실시형태에서, scFv 모이어티는 클라우딘에 결합하고 Fab 모이어티는 T 세포-특이적 항원에 결합한다.
- [0168] 일 실시형태에서, 본 발명의 결합제는 제1 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 상기 제1 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드는 N-말단부터 C-말단까지 다음의 도메인을 포함한다: VH-CH1-scFv 및 VL-CL-scFv, 여기서, VH 및 VL은 결합 도메인을 형성하도록 회합된다.
- [0169] 일 실시형태에서 본 발명의 결합제는 제1 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드를 포함하고, 상기 제1 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드에서 VH 도메인(들), VL 도메인(들), CH1 도메인 및 CL 도메인은 N-말단부터 C-말단까지 다음의 순서로 배열된다:
- [0170] - VH(T)-CH1-VH(CLDN)-VL(CLDN) 및 VL(T)-CL-VH(CLDN)-VL(CLDN); 또는
- [0171] - VH(T)-CH1-VL(CLDN)-VH(CLDN) 및 VL(T)-CL-VL(CLDN)-VH(CLDN); 또는
- [0172] - VH(T)-CH1-VH(CLDN)-VL-(CLDN) 및 VL(T)-CL-VL(CLDN)-VH-(CLDN); 또는
- [0173] - VH(T)-CH1-VL(CLDN)-VH-(CLDN) 및 VL(T)-CL-VH(CLDN)-VL-(CLDN); 또는
- [0174] - VH(CLDN)-CH1-VH(T)-VL(T) 및 VL(CLDN)-CL-VH(CLDN)-VL(CLDN); 또는
- [0175] - VH(CLDN)-CH1-VL(T)-VH(T) 및 VL(CLDN)-CL-VL(CLDN)-VH(CLDN); 또는
- [0176] - VH(CLDN)-CH1-VL(T)-VH(T) 및 VL(CLDN)-CL-VH(CLDN)-VL(CLDN); 또는
- [0177] - VH(CLDN)-CH1-VH(T)-VL(T) 및 VL(CLDN)-CL-VL(CLDN)-VH(CLDN); 또는
- [0178] - VH(CLDN)-CH1-VH(CLDN)-VL(CLDN) 및 VL(CLDN)-CL-VH(T)-VL(T); 또는
- [0179] - VH(CLDN)-CH1-VL(CLDN)-VH(CLDN) 및 VL(CLDN)-CL-VL(T)-VH(T); 또는
- [0180] - VH(CLDN)-CH1-VL(CLDN)-VH(CLDN) 및 VL(CLDN)-CL-VH(T)-VL(T); 또는
- [0181] - VH(CLDN)-CH1-VH(CLDN)-VL(CLDN) 및 VL(CLDN)-CL-VL(T)-VH(T).
- [0182] "링커"란 용어는 2개의 별개의 기능적 단위(예를 들어, 항원 결합 모이어티)를 연결시키는 작용을 하는 임의의 수단을 지칭한다. 링커의 유형에는 화학적 링커 및 폴리펩티드 링커가 포함되지만 이에 한정되지는 않는다. 폴리펩티드 링커의 서열은 한정되지 않는다. 폴리펩티드 링커는 바람직하게는 세린 및 글리신 서열을 포함하는 것

들과 같이 비면역원성이고 유연하다. 특정 작제물에 따라, 링커는 길거나 짧을 수 있다.

[0183] 본 발명에 따라, VH 도메인과 VL 도메인을 연결시켜 VH-VL 또는 VL-VH scFv 도메인을 형성하는 링커는 바람직하게는 글리신-세린 펩티드 링커와 같은 유연한 펩티드 링커를 포함한다. 일 실시형태에서, 링커는 아미노산 서열 $(G_4S)_x$ 를 포함하고, 여기서 x는 3, 4, 5 또는 6이다. VH-VL 배향으로 VH 도메인과 VL 도메인을 포함하는 scFv 도메인의 경우에, 링커는 바람직하게는 아미노산 서열 $(G_4S)_4$ 를 포함한다. VL-VH 배향으로 VH 도메인과 VL 도메인을 포함하는 scFv 도메인의 경우에, 링커는 바람직하게는 아미노산 서열 $(G_4S)_5$ 를 포함한다.

[0184] 본 발명에 따라, 바람직하게는 CH1의 C-말단에서 scFv 도메인과 Fd 도메인을 연결시키는 링커는 바람직하게는 아미노산 서열 DVP₂G₂S 또는 SGPG₃RS(G₄S)₂, 바람직하게는 SGPG₃RS(G₄S)₂를 포함한다. 본 발명에 따라, 바람직하게는 CL의 C-말단에서 scFv 도메인과 L 도메인을 연결시키는 링커는 바람직하게는 아미노산 서열 DVP₂G₂S 또는 SGPG₃RS(G₄S)₂, 바람직하게는 DVP₂G₂S를 포함한다.

[0185] 본 발명에 따른 결합체는 N-말단 분비 신호와 같은 분자의 분비를 용이하게 하기 위한 아미노산 서열 및/또는 분자의 결합, 정제 또는 검출을 용이하게 하는 하나 이상의 에피토프 태그를 또한 포함할 수 있다.

[0186] 바람직하게는, 분비 신호는 분비 경로를 통한 충분한 통과 및/또는 결합체 또는 이의 폴리펩티드 쉼의 세포의 환경으로의 분비를 가능하게 하는 신호 서열(예를 들어, 아미노산 서열 MGWSCILFLVATATGVHS)이다. 바람직하게는, 분비 신호 서열은 절단가능하고 성숙한 결합체로부터 제거된다. 분비 신호 서열은 바람직하게는 결합체가 생산되는 세포 또는 유기체와 관련하여 선택된다.

[0187] 에피토프 태그의 아미노산 서열은 결합체의 아미노산 서열 내의 임의의 부위에 도입될 수 있고 코딩된 단백질 구조 내의 루프 형상을 취할 수 있거나, 또는 N-말단에서 또는 C-말단에서 결합체에 융합될 수 있다. 바람직하게는, 에피토프 태그는 C-말단에서 결합체에 융합된다. 에피토프 태그는 결합체로부터 태그의 제거를 가능하게 하는 절단가능한 부위를 함유할 수 있다. 상기 에피토프 태그는 고유한 및/또는 변성 조건 하에 기능적인 임의의 종류의 에피토프 태그, 바람직하게는 히스티딘 태그, 가장 바람직하게는 6개 히스티딘을 포함하는 태그일 수 있다.

[0188] 본 발명의 결합체는, 상기 제1, 제2 및 제3 결합 도메인 외에도, 예를 들어 종양 세포에 대한 선택성을 증진시키는 작용을 하는 하나 이상의 추가 결합 도메인을 함유할 수 있다. 이것은, 예를 들어, 종양 세포에서 발현되는 다른 항원에 결합하는 결합 도메인을 제공함으로써 달성될 수 있다.

[0189] 본 발명의 맥락에서, 생성된 결합체는 바람직하게는 본원에 기재된 바와 같은 면역 이펙터 기능을 유도할 수 있다. 바람직하게는, 상기 면역 이펙터 기능은 이 세포의 표면에 종양 관련 항원 클라우딩을 보유하는 세포에 대해 지시된다.

[0190] 본 발명의 맥락에서 "면역 이펙터 기능"이란 용어는 예를 들어 종양 파종(tumor dissemination) 및 전이의 억제를 포함하는 종양 증식의 억제 및/또는 종양 발달의 억제를 초래하는 면역계 성분에 의해 매개되는 임의의 기능을 포함한다. 바람직하게는, 면역 이펙터 기능은 종양 세포의 사멸을 초래한다. 이러한 기능은 보체 의존적 세포독성(CDC), 항체 의존적 세포-매개 세포독성(ADCC), 항체 의존적 세포-매개 식세포작용(ADCP), 종양 관련 항원을 보유한 세포에서 아포토시스의 유도, 종양 관련 항원을 보유한 세포의 세포용해 및/또는 종양 관련 항원을 보유한 세포의 증식의 억제를 포함한다. 결합체는 단순히 암 세포의 표면상의 종양 관련 항원에 결합함으로써 효과를 발휘할 수도 있다. 예를 들어, 항체는 종양 관련 항원의 기능을 차단할 수 있거나 단지 암 세포의 표면상의 종양 관련 항원에 결합함으로써 아포토시스를 유도할 수 있다.

[0191] 본원에 기재된 결합체는 세포독소, 약물(예를 들어, 면역억제제) 또는 방사성 동위원소와 같은 치료적 모이어티 또는 제제에 접합될 수도 있다. 세포독소 또는 세포독성제는 세포에 해롭거나 특히 세포를 사멸시키는 임의의 물질을 포함한다. 예에는 탁솔, 사이토크알라신 B(cytochalasin B), 그라미시딘 D, 에티디움 브로마이드, 에메틴, 마이토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디하이드록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤 및 푸로마이신 및 이들의 유사체 또는 동족체가 포함된다. 접합체를 형성하기 위한 적절한 치료제에는 항대사산물(예를 들어, 메토크세이트(methotrexate), 6-머캅토프린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 플루다라빈, 5-플루오로우라실 데카르바진), 알킬화제(예를 들어, 메클로레타민, 티오에프, 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴(BSNU) 및 로무스틴(CCNU), 사이클로포스파미드, 부

설관, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C 및 시스-디클로로디아민 백금(II)(DDP) 시스플라틴), 안트라사이클린(예를 들어, 다우노루비신(이전에는 다우노마이신)) 및 독소루비신), 항생제(예를 들어, 닥티노마이신 (이전에는 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신 및 안트라마이신(AMC) 및 항-유사분열제(예를 들어, 빈크리스틴 및 빈블라스틴)가 포함되나 이에 한정되지는 않는다. 바람직한 실시형태에서, 치료제는 세포독성제 또는 방사성독성제이다. 다른 실시형태에서, 치료제는 면역억제제이다. 또 다른 실시형태에서, 치료제는 GM-CSF이다. 바람직한 실시형태에서, 치료제는 독소루비신, 시스플라틴, 블레오마이신, 셀레이트, 카르무스틴, 클로람부실, 사이클로포스파미드 또는 리신 A이다.

[0192] 결합제를 또한 방사성 동위원소, 예를 들어 요오드-131, 이트륨-90, 인듐-111에 접합시켜 세포독성 방사성 의약품을 생산할 수 있다.

[0193] 이러한 치료적 모이어티를 항체에 접합시키는 기술은 익히 공지되어 있다. 예를 들어 문헌들[Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), 및 Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982)]을 참조.

[0194] 본 발명에 따른 "결합"이란 용어는 바람직하게는 특이적 결합에 관한 것이다.

[0195] 본 발명에 따라, 항체와 같은 제제는 소정의 표적에 대한 유의적인 친화성을 갖고 표준 분석법에서 상기 소정의 표적에 결합할 경우, 상기 소정의 표적에 결합할 수 있다. "친화성" 또는 "결합 친화성"은 종종 평형 해리 상수 (K_D)에 의해 측정된다. 바람직하게는, "유의적 친화성"이란 용어는 10^{-5} M 이하, 10^{-6} M 이하, 10^{-7} M 이하, 10^{-8} M 이하, 10^{-9} M 이하, 10^{-10} M 이하, 10^{-11} M 이하 또는 10^{-12} M 이하의 해리 상수(K_D)로 소정의 표적에 결합하는 것을 의미한다.

[0196] 제제는 표적에 대한 유의적인 친화성을 갖지 않고 표준 분석법에서 상기 표적에 실질적으로 결합하지 않는, 특히 검출가능하게 결합하지 않을 경우, 상기 표적에 (실질적으로) 결합할 수 없다. 바람직하게는, 제제는 2 이하, 바람직하게는 10, 보다 바람직하게는 20, 특히 50 또는 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도로 존재할 경우, 상기 표적에 검출 가능하게 결합하지 않는다. 바람직하게는, 제제가 결합할 수 있는 소정의 표적에의 결합에 대한 K_D 보다 적어도 10배, 100배, 10^3 배, 10^4 배, 10^5 배 또는 10^6 배 높은 K_D 로 상기 표적에 결합할 경우, 제제는 표적에 대한 유의적인 친화성을 갖지 않는다. 예를 들면, 제제가 결합할 수 있는 표적에의 제제의 결합에 대한 K_D 가 10^{-7} M일 경우, 제제가 유의적인 친화성을 갖지 않는 표적에의 결합에 대한 K_D 는 적어도 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M, 10^{-2} M 또는 10^{-1} M일 수 있다.

[0197] 항체와 같은 제제는, 소정의 표적에 결합할 수 있지만 다른 표적에는 (실질적으로) 결합할 수 없는, 즉 다른 표적에 대한 유의적인 친화성을 갖지 않고 표준 분석법에서 다른 표적에 유의적으로 결합하지 않는 경우, 상기 소정의 표적에 대해 특이적이다. 본 발명에 따라, 제제는 클라우딘에 결합할 수 있지만 다른 표적에 (실질적으로) 결합할 수 없는 경우 클라우딘에 특이적인 것이다. 바람직하게는, 제제는, 이러한 다른 표적에 대한 친화성 및 결합이 소 혈청 알부민(BSA), 카세인, 인간 혈청 알부민(HSA)과 같은 클라우딘-비관련 단백질 또는 MHC 분자 또는 트랜스페린 수용체 또는 임의의 다른 특정 폴리펩티드와 같은 비-클라우딘 막관통 단백질에 대한 친화성 또는 결합을 유의적으로 초과하지 않는 경우, 클라우딘에 대해 특이적이다. 바람직하게는, 제제는, 특이적이지 않은 표적에의 결합에 대한 K_D 보다 적어도 10배, 100배, 10^3 배, 10^4 배, 10^5 배 또는 10^6 배 미만인 K_D 로 소정의 표적에 결합할 경우, 제제는 상기 소정의 표적에 대해 특이적이다. 예를 들어, 특이적인 표적에의 제제의 결합에 대한 K_D 가 10^{-7} M일 경우, 특이적이지 않은 표적에의 결합에 대한 K_D 는 적어도 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M, 10^{-2} M 또는

10^{-1} M일 수 있다.

- [0198] 표적에의 제제의 결합은 임의의 적합한 방법을 사용하여 실험적으로 결정될 수 있다; 예를 들어, 문헌 [Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions" In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company New York, N Y (1992)] 및 본원에 기재된 방법을 참조한다. 친화성은 평형 투석법에 의하거나; 제조업체가 설명한 일반적 절차를 사용하는 BIAcore 2000 기기를 사용하거나; 방사성표지된 표적 항원을 사용하는 방사면역측정법에 의하거나; 또는 당업자에게 공지된 다른 방법에 의해서와 같은 통상적인 기술을 사용하여 용이하게 결정될 수 있다. 친화성 데이터는 예를 들어 문헌[Scatchard et al., Ann N.Y. Acad. Sci., 51:660 (1949)]의 방법에 의해 분석될 수 있다. 특정 항체-항원 상호작용의 측정된 친화성은 상이한 조건, 예를 들어 염 농도, pH 하에 측정될 경우 달라질 수 있다. 따라서, 친화성 및 다른 항원-결합 매개변수, 예를 들어 K_D , IC_{50} 은 바람직하게는 항체 및 항원의 표준화된 용액 및 표준화된 완충액으로 측정된다.
- [0199] "경쟁하다"란 용어는 표적 항원에의 결합에 대한 두 항체 간의 경쟁을 지칭한다. 두 항체가 표적 항원에의 결합에 대해 서로 차단하지 않는 경우, 이러한 항체들은 비경쟁적이고 이것은 상기 항체들이 동일한 부분, 즉 표적 항원 에피토프에 결합하지 않음을 의미한다. 표적 항원에의 결합에 대해 항체들의 경쟁을 시험하는 방법은 당업자에게 익히 공지되어 있다. 이러한 방법의 예는 이른바 교차-경쟁 분석법이며, 이는 예를 들어 ELISA로서 또는 유세포계측법에 의해 실시될 수 있다. 예를 들어, ELISA 기반 분석법은 ELISA 플레이트 웰을 각각의 항체로 코팅하고; 경쟁 항체 및 항원/표적의 His-태그된 세포의 도메인을 첨가하고 항온배양하여 수행할 수 있고; 첨가된 항체가 His-태그된 단백질의 코팅된 항체에 대한 결합을 억제하였는지 여부를 검출하는 것은 바이오티닐화된 항-His 항체에 이어서 스트렙타비딘-폴리-HRP를 첨가하고 추가로 ABTS와의 반응을 전개시키고 405nm에서 흡광도를 측정하여 실시할 수 있다. 예를 들어, 유세포계측 분석법은 항원/표적을 발현하는 세포를 과량의 비표지된 항체와 함께 항온배양하고 세포를 최적 이하의 농도의 바이오틴 표지된 항체와 함께 항온배양하고 이어서 형광 표지된 스트렙타비딘과 함께 항온배양하고 유세포계측법에 의해 분석하여 실시할 수 있다.
- [0200] 두 항체가 동일한 항원에 항원 및 동일한 에피토프에 결합하는 경우, 그들은 "동일한 특이성"을 갖는다. 시험될 항체가 특정의 항원 결합 항체와 동일한 에피토프를 인지하는지 여부, 즉 항체들이 동일한 에피토프에 결합하는지 여부는 동일한 에피토프에 대한 그들의 경쟁에 기반하여 분석될 수 있다. 항체들 간의 경쟁은 교차-차단 분석법에 의해 검출될 수 있다. 예를 들어, 경쟁적 ELISA 분석법을 교차-차단 분석법으로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 표적 항원을 마이크로티터 플레이트의 웰상에 코팅할 수 있고 항원-결합 항체 및 후보 경쟁 시험 항체를 첨가할 수 있다. 웰 내의 항원에 결합된 항원-결합 항체의 양은 동일한 에피토프에의 결합에 대해 상기 항체와 경쟁하는 후보 경쟁 시험 항체의 결합 능력과 간접적으로 상관관계가 있다. 구체적으로, 동일한 에피토프에 대한 후보 경쟁 시험 항체의 친화성이 클수록 항원-코팅된 웰에 결합된 항원-결합 항체의 양은 적어진다. 웰에 결합된 항원-결합 항체의 양은 항체를 검출 가능한 또는 측정 가능한 표지 물질로 표지하여 측정할 수 있다.
- [0201] 항원에의 결합에 대해 다른 항체, 예를 들어 본원에 기재된 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 경쟁하는 항체 또는 다른 항체, 예를 들어 본원에 기재된 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체의 항원에 대한 특이성을 갖는 항체는 본원에 기재된 상기 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역의 변이체, 예를 들어 CDR의 변형 및/또는 본원에 기재된 특정의 동일성 정도를 포함하는 항체일 수 있다.
- [0202] 본원에서 사용되는 바와 같이, "이소형"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 코딩되는 항체 클래스(예를 들어, IgM 또는 IgG1)를 지칭한다.
- [0203] 본원에서 사용되는 바와 같이, "이소형 스위칭(itching)"은 항체의 클래스 또는 이소형이 한 Ig 클래스로부터 다른 Ig 클래스들 중 하나로 변하는 현상을 지칭한다.
- [0204] 본원에서 사용되는 바와 같이, 대상에 적용되는 "천연 발생"이란 용어는 대상이 천연에서 발견될 수 있다는 사실을 의미한다. 예를 들어, 천연의 공급원으로부터 단리될 수 있고 사람이 실험실에서 의도적으로 변형시키지 않은 (바이러스를 비롯한) 유기체에 존재하는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열은 천연 발생적인 것이다.
- [0205] 본원에서 사용되는 바와 같이, "재배열된(rearranged)"이란 용어는 V 세그먼트가 D-J 또는 J 세그먼트에 바로 인접하여 위치하며 본질적으로는 완전한 VH 또는 VL 도메인을 각각 코딩하는 입체형태인, 중쇄 또는 경쇄 면역글로불린 좌위의 입체배치를 나타낸다. 재배열된 면역글로불린(항체) 유전자 좌위는 생식계열(germline) DNA와 비교함으로써 확인할 수 있고; 재배열된 좌위는 적어도 하나의 재조합 7량체/9량체 상동성 요소를 가질 것이다.

- [0206] V 세그먼트와 관련하여 본원에서 사용되는 "재배열되지 않은" 또는 "생식계열 입체배치(germline configuration)"는 V 세그먼트가 D 또는 J 세그먼트에 바로 인접하도록 재조합되지 않은 입체배치를 나타낸다.
- [0207] 일 실시형태에서, 본 발명의 결합체는 CLDN18.2에 결합하는 능력, 즉 CLDN18.2에 존재하는 에피토프, 바람직하게는 CLDN18.2의 세포외 도메인 내에 위치하는 에피토프, 특히 제1 세포의 루프, 바람직하게는 CLDN18.2의 아미노산 위치 29번 내지 78번에 결합하는 능력을 갖는다. 특정 실시형태에서, CLDN18.2에 결합하는 능력을 갖는 제제는 CLDN18.1에 존재하지 않는 CLDN18.2상의 에피토프에 결합한다.
- [0208] CLDN18.2에 결합하는 능력을 갖는 제제는 바람직하게는 CLDN18.2에 결합하지만 CLDN18.1에는 결합하지 않는다. 바람직하게는, CLDN18.2에 결합하는 능력을 갖는 제제는 CLDN18.2에 대해 특이적이다. 바람직하게는, CLDN18.2에 결합하는 능력을 갖는 제제는 세포 표면에서 발현되는 CLDN18.2에 결합한다. 특정한 바람직한 실시형태에서, CLDN18.2에 결합하는 능력을 갖는 제제는 살아있는 세포의 표면에 존재하는 CLDN18.2의 고유한 에피토프에 결합한다.
- [0209] 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 결합체의 CLDN18.2에 결합하는 결합 도메인은 서열번호 20, 21, 24 또는 이들의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함한다.
- [0210] 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 결합체의 CLDN18.2에 결합하는 결합 도메인은 서열번호 22, 23, 25 또는 이들의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함한다.
- [0211] 특정의 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 결합체의 CLDN18.2에 결합하는 결합 도메인은 다음의 가능성들로부터 선택된 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)의 조합을 포함한다:
- [0212] (i) VH는 서열번호 20으로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하고 VL은 서열번호 22로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함한다;
- [0213] (ii) VH는 서열번호 20으로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하고 VL은 서열번호 23으로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함한다;
- [0214] (iii) VH는 서열번호 21로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하고 VL은 서열번호 22로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함한다;
- [0215] (iv) VH는 서열번호 21로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하고 VL은 서열번호 23으로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함한다;
- [0216] (v) VH는 서열번호 24로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하고 VL은 서열번호 25로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함한다.
- [0217] 특히 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 결합체의 CLDN18.2에 결합하는 결합 도메인은 다음의 중쇄 가변 영역(VH)과 경쇄 가변 영역(VL)의 조합을 포함한다:
- [0218] VH는 서열번호 20으로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하고 VL은 서열번호 22로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함한다.
- [0219] 특히 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 결합체의 CLDN18.2에 결합하는 결합 도메인은 다음의 중쇄 가변 영역(VH)과 경쇄 가변 영역(VL)의 조합을 포함한다:
- [0220] VH는 서열번호 21로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하고 VL은 서열번호 23으로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함한다.

- [0221] "단편"이란 용어는 특히 중쇄 가변 영역(VH) 및/또는 경쇄 가변 영역(VL)의 상보성 결정 영역(CDR)들 중 하나 이상, 바람직하게는 적어도 CDR3 가변 영역을 지칭한다. 일 실시형태에서, 상기 상보성 결정 영역(CDR)들 중 하나 이상은 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3의 세트로부터 선택된다. 특히 바람직한 실시형태에서, "단편"이란 용어는 중쇄 가변 영역(VH) 및/또는 경쇄 가변 영역(VL)의 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3을 지칭한다.
- [0222] 일 실시형태에서, 본원에 기재된 하나 이상의 CDR, 한 세트의 CDR 또는 CDR 세트들의 조합을 포함하는 결합 도메인은 상기 CDR을 이들의 사이에 있는 프레임워크 영역과 함께 포함한다. 바람직하게는, 상기 부분은 또한 제1 프레임워크 영역 및 제 4 프레임워크 영역 중 어느 하나 또는 둘 다의 적어도 약 50%를 포함할 것이며, 50%는 제1 프레임워크 영역의 C-말단의 50% 및 제 4 프레임워크 영역의 N-말단의 50%이다. 재조합 DNA 기술에 의해 실시되는 결합체의 작제는 클로닝 또는 다른 조작 단계를 용이하게 하기 위해 도입된 링커에 의해 코딩되는 가변 영역으로 N-말단 또는 C-말단에서 잔기를 도입시킬 수 있으며, 여기에는 번역글로불린 중쇄, 다른 가변 도메인 또는 단백질 표지를 포함하는 추가의 단백질 서열에 본 발명의 가변 영역을 결합시키는 링커의 도입이 포함된다.
- [0223] 일 실시형태에서, 본원에 기재된 하나 이상의 CDR, 한 세트의 CDR 또는 CDR 세트들의 조합을 포함하는 결합 도메인은 인간 항체 프레임워크 내에 상기 CDR을 포함한다.
- [0224] 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 결합체의 CLDN18.2에 결합하는 결합 도메인은 다음의 중쇄 가변 영역(VH)과 경쇄 가변 영역(VL)의 조합을 포함한다:
- [0225] VH는 서열번호 58에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)을 포함하고,
- [0226] VL은 서열번호 64에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(LCDR3)을 포함한다.
- [0227] 일 실시형태에서, VH는 서열번호 56에 제시된 서열을 포함하는 HCDR1 및/또는 서열번호 57에 제시된 서열을 포함하는 HCDR2를 추가로 포함하고/하거나 VL은 서열번호 62에 제시된 서열을 포함하는 LCDR1 및/또는 서열번호 63에 제시된 서열을 포함하는 LCDR2를 추가로 포함한다.
- [0228] 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 결합체의 CLDN18.2에 결합하는 결합 도메인은 다음의 중쇄 가변 영역(VH)과 경쇄 가변 영역(VL)의 조합을 포함한다:
- [0229] VH는 서열번호 56에 제시된 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 57에 제시된 서열을 포함하는 HCDR2 및 서열번호 58에 제시된 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고 VL은 서열번호 62에 제시된 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 63에 제시된 서열을 포함하는 LCDR2 및 서열번호 64에 제시된 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.
- [0230] 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 결합체의 CLDN18.2에 결합하는 결합 도메인은 다음의 중쇄 가변 영역(VH)과 경쇄 가변 영역(VL)의 조합을 포함한다:
- [0231] VH는 서열번호 61에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3)을 포함하고,
- [0232] VL은 서열번호 65에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3)을 포함한다.
- [0233] 일 실시형태에서, VH는 서열번호 59에 제시된 서열을 포함하는 HCDR1 및/또는 서열번호 60에 제시된 서열을 포함하는 HCDR2를 추가로 포함하고/하거나 VL은 서열번호 62에 제시된 서열을 포함하는 LCDR1 및/또는 서열번호 63에 제시된 서열을 포함하는 LCDR2를 추가로 포함한다.
- [0234] 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 결합체의 CLDN18.2에 결합하는 결합 도메인은 다음의 중쇄 가변 영역(VH)과 경쇄 가변 영역(VL)의 조합을 포함한다:
- [0235] VH는 서열번호 59에 제시된 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 60에 제시된 서열을 포함하는 HCDR2 및 서열번호 61에 제시된 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고 VL은 서열번호 62에 제시된 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 63에 제시된 서열을 포함하는 LCDR2 및 서열번호 65에 제시된 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.
- [0236] 일 실시형태에서, 상기 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 프레임워크 영역 내에 산재해 있는 상기 상보성 결정 영역을 포함한다. 일 실시형태에서, 각각의 가변 영역은 3종의 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3) 및 4종의 프레임워크 영역(FR1, FR2, FR3 및 FR4)을 포함한다. 일 실시형태에서, 상기 상보성 결정 영역 및 상기 프레임워크 영역은 아미노 말단부터 카복시 말단까지 다음의 순서로 배열된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

- [0237] 추가의 실시형태에서, 본 발명의 결합체의 CLDN18.2에 결합하는 결합 도메인은 (i) CLDN18.2 결합에 대해 본원에 기재된 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 경쟁하고/하거나 (ii) 상기 기재된 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체의 CLDN18.2에 대한 특이성을 갖는 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0238] 일 실시형태에서, 본 발명의 결합체의 CLDN18.2에 결합하는 결합 도메인의 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)은 scFv 분자의 포맷을 갖는다. 이러한 실시형태에서, 본 발명의 결합체의 CLDN18.2에 결합하는 결합 도메인은 서열번호 26, 27, 28, 29로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함한다.
- [0239] 본 발명의 결합체의 CLDN18.2에 결합하는 결합 도메인은 동일하거나 본질적으로 동일하거나 상이할 수 있고 따라서 동일하거나 본질적으로 동일한 에피토프 또는 상이한 에피토프에 결합할 수 있는 것으로 이해될 것이다. 따라서, 본 발명의 결합체의 CLDN18.2에 결합하는 결합 도메인 둘 다는 본원에 기재된 본 발명의 결합체의 CLDN18.2에 결합하는 결합 도메인들 중 하나에 대응하거나 본질적으로 대응할 수 있거나 또는 본원에 기재된 본 발명의 결합체의 CLDN18.2에 결합하는 결합 도메인들로부터 독립적으로 선택될 수 있다.
- [0240] 일 실시형태에서, 본 발명의 결합체는 CLDN6에 결합하는 능력, 즉 CLDN6에 존재하는 에피토프, 바람직하게는 CLDN6의 세포외 도메인 내에 존재하는 에피토프, 특히 제1 세포외 루프, 바람직하게는 CLDN6의 아미노산 위치 28번 내지 76번 또는 29번 내지 81번 또는 제2 세포외 루프, 바람직하게는 CLDN6의 아미노산 위치 141번 내지 159번에 결합하는 능력을 갖는다. 특정한 실시형태에서, CLDN6에 결합하는 능력을 갖는 제제는 CLDN9상에 존재하지 않는 CLDN6상의 에피토프에 결합한다. 바람직하게는, CLDN6에 결합하는 능력을 갖는 제제는 CLDN4 및/또는 CLDN3상에 존재하지 않는 CLDN6상의 에피토프에 결합한다. 가장 바람직하게는, CLDN6에 결합하는 능력을 갖는 제제는 CLDN6 외의 클라우딘 단백질상에 존재하지 않는 CLDN6상의 에피토프에 결합한다.
- [0241] CLDN6에 결합하는 능력을 갖는 제제는 바람직하게는 CLDN6에는 결합하지만 CLDN9에는 결합하지 않고 바람직하게는 CLDN4 및/또는 CLDN3에 결합하지 않는다. 바람직하게는, CLDN6에 결합하는 능력을 갖는 제제는 CLDN6에 대해 특이적이다. 바람직하게는, CLDN6에 결합하는 능력을 갖는 제제는 세포 표면에서 발현되는 CLDN6에 결합한다. 특히 바람직한 실시형태에서, CLDN6에 결합하는 능력을 갖는 제제는 살아있는 세포의 표면에 존재하는 CLDN6의 고유한 에피토프에 결합한다.
- [0242] 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 결합체의 CLDN6에 결합하는 결합 도메인은 서열번호 7, 8, 11로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함한다.
- [0243] 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 결합체의 CLDN6에 결합하는 결합 도메인은 서열번호 9, 10, 12로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함한다.
- [0244] 특정의 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 결합체의 CLDN6에 결합하는 결합 도메인은 다음의 가능성들로부터 선택된 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)의 조합을 포함한다:
- [0245] (i) VH는 서열번호 7로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하고 VL은 서열번호 9로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함한다;
- [0246] (ii) VH는 서열번호 7로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하고 VL은 서열번호 10으로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함한다;
- [0247] (iii) VH는 서열번호 8로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하고 VL은 서열번호 9로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함한다;
- [0248] (iv) VH는 서열번호 8로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하고 VL은 서열번호 10으로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함한다;
- [0249] (v) VH는 서열번호 11로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를

포함하고 VL은 서열번호 12로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함한다;

[0250] (vi) VH는 서열번호 7로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하고 VL은 서열번호 12로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함한다;

[0251] (vii) VH는 서열번호 8로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하고 VL은 서열번호 12로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함한다.

[0252] 특히 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 결합체의 CLDN6에 결합하는 결합 도메인은 다음의 중쇄 가변 영역(VH)과 경쇄 가변 영역(VL)의 조합을 포함한다:

[0253] VH는 서열번호 8로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하고 VL은 서열번호 10으로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함한다.

[0254] 특히 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 결합체의 CLDN6에 결합하는 결합 도메인은 다음의 중쇄 가변 영역(VH)과 경쇄 가변 영역(VL)의 조합을 포함한다:

[0255] VH는 서열번호 7로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하고 VL은 서열번호 12로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함한다.

[0256] "단편"이란 용어는 특히 중쇄 가변 영역(VH) 및/또는 경쇄 가변 영역(VL)의 상보성 결정 영역(CDR)들 중 하나 이상, 바람직하게는 적어도 CDR3 가변 영역을 지칭한다. 일 실시형태에서, 상기 상보성 결정 영역(CDR)들 중 하나 이상은 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3의 세트로부터 선택된다. 특히 바람직한 실시형태에서, "단편"이란 용어는 중쇄 가변 영역(VH) 및/또는 경쇄 가변 영역(VL)의 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3을 지칭한다.

[0257] 일 실시형태에서, 본원에 기재된 하나 이상의 CDR, 한 세트의 CDR 또는 CDR 세트들의 조합을 포함하는 결합 도메인은 상기 CDR을 이들의 사이에 있는 프레임워크 영역과 함께 포함한다. 바람직하게는, 상기 부분은 또한 제1 프레임워크 영역 및 제 4 프레임워크 영역 중 어느 하나 또는 둘 다의 적어도 약 50%를 포함할 것이며, 50%는 제1 프레임워크 영역의 C-말단의 50% 및 제 4 프레임워크 영역의 N-말단의 50%이다. 재조합 DNA 기술에 의해 실시되는 결합체의 작제는 클로닝 또는 다른 조작 단계를 용이하게 하기 위해 도입된 링커에 의해 코딩되는 가변 영역으로 N-말단 또는 C-말단에 잔기를 도입시킬 수 있으며, 여기에는 면역글로불린 중쇄, 다른 가변 도메인 또는 단백질 표지를 포함하는 추가의 단백질 서열에 본 발명의 가변 영역을 결합시키는 링커의 도입이 포함된다.

[0258] 일 실시형태에서, 본원에 기재된 하나 이상의 CDR, 한 세트의 CDR 또는 CDR 세트들의 조합을 포함하는 결합 도메인은 인간 항체 프레임워크 내에 상기 CDR을 포함한다.

[0259] 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 결합체의 CLDN6에 결합하는 결합 도메인은 다음의 중쇄 가변 영역(VH)과 경쇄 가변 영역(VL)의 조합을 포함한다:

[0260] VH는 서열 Ala Arg Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp Tyr을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)을 포함하고, 여기서 Xaa1은 임의의 아미노산, 바람직하게는 방향족 아미노산, 보다 바람직하게는 Phe 또는 Tyr, 가장 바람직하게는 Tyr이고, Xaa2는 임의의 아미노산, 바람직하게는 방향족 아미노산, 보다 바람직하게는 Phe 또는 Tyr, 가장 바람직하게는 Tyr이고, Xaa3은 임의의 아미노산, 바람직하게는 Leu 또는 Phe, 보다 바람직하게는 Leu이다. 일 실시형태에서, HCDR3은 서열번호 46 또는 47에 제시된 서열을 포함한다; 및

[0261] VL은 서열 Gln Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro Trp Thr을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(LCDR3)을 포함하고, 여기서 Xaa1은 임의의 아미노산, 바람직하게는 Ser 또는 Asn, 가장 바람직하게는 Ser이고, Xaa2는 임의의 아미노산, 바람직하게는 Tyr, Ser, Ile, Asn 또는 Thr, 보다 바람직하게는 Ile, Asn 또는 Thr, 가장 바람직하게는 Ile 또는 Asn이고, Xaa3은 임의의 아미노산, 바람직하게는 Ser 또는 Tyr, 보다 바람직하게는 Tyr이다. 일 실시형태에서, LCDR3은 서열번호 52 또는 53에 제시된 서열을 포함한다.

[0262] 일 실시형태에서, VH는 서열번호 44에 제시된 서열을 포함하는 HCDR1 및/또는 서열번호 48에 제시된 서열(여기

서, Xaa는 임의의 아미노산, 바람직하게는 Thr, Ser 또는 Ile, 가장 바람직하게는 Thr이다), 예컨대 서열번호 45에 제시된 서열을 포함하는 HCDR2를 추가로 포함하고/하거나 VL은 서열번호 54에 제시된 서열(여기서, Xaa는 임의의 아미노산, 바람직하게는 Ser 또는 Asn, 가장 바람직하게는 Ser이다), 예컨대 서열번호 50에 제시된 서열을 포함하는 LCDR1 및/또는 서열번호 51에 제시된 서열을 포함하는 LCDR2를 추가로 포함한다.

- [0263] 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 결합체의 CLDN6에 결합하는 결합 도메인은 다음의 중쇄 가변 영역(VH)과 경쇄 가변 영역(VL)의 조합을 포함한다:
- [0264] VH는 서열번호 44에 제시된 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 45에 제시된 서열을 포함하는 HCDR2 및 서열번호 46에 제시된 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고 VL은 서열번호 50에 제시된 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 51에 제시된 서열을 포함하는 LCDR2 및 서열번호 52에 제시된 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.
- [0265] 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 결합체의 CLDN6에 결합하는 결합 도메인은 다음의 중쇄 가변 영역(VH)과 경쇄 가변 영역(VL)의 조합을 포함한다:
- [0266] VH는 서열번호 44에 제시된 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 45에 제시된 서열을 포함하는 HCDR2 및 서열번호 47에 제시된 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고 VL은 서열번호 50에 제시된 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 51에 제시된 서열을 포함하는 LCDR2 및 서열번호 53에 제시된 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.
- [0267] 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 결합체의 CLDN6에 결합하는 결합 도메인은 다음의 중쇄 가변 영역(VH)과 경쇄 가변 영역(VL)의 조합을 포함한다:
- [0268] VH는 서열번호 44에 제시된 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 45에 제시된 서열을 포함하는 HCDR2 및 서열번호 46에 제시된 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고 VL은 서열번호 50에 제시된 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 51에 제시된 서열을 포함하는 LCDR2 및 서열번호 53에 제시된 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.
- [0269] 일 실시형태에서, 상기 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 프레임워크 영역 내에 산재해 있는 상기 상보성 결정 영역을 포함한다. 일 실시형태에서, 각각의 가변 영역은 3종의 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3) 및 4종의 프레임워크 영역(FR1, FR2, FR3 및 FR4)을 포함한다. 일 실시형태에서, 상기 상보성 결정 영역 및 상기 프레임워크 영역은 아미노 말단부터 카복시 말단까지 다음의 순서로 배열된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.
- [0270] 추가의 실시형태에서, 본 발명의 결합체의 CLDN6에 결합하는 결합 도메인은 (i) CLDN6 결합에 대해 본원에 기재된 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 경쟁하고/하거나 (ii) 본원에 기재된 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체의 CLDN6에 대한 특이성을 갖는 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0271] 일 실시형태에서, 본 발명의 결합체의 CLDN6에 결합하는 결합 도메인의 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)은 scFv 분자의 포맷을 갖는다. 이러한 실시형태에서, 본 발명의 결합체의 CLDN6에 결합하는 결합 도메인은 서열번호 13에 제시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편을 포함한다.
- [0272] 본 발명의 결합체의 CLDN6에 결합하는 결합 도메인은 동일하거나 본질적으로 동일하거나 상이할 수 있고 따라서 동일하거나 본질적으로 동일한 에피토프 또는 상이한 에피토프에 결합할 수 있는 것으로 이해될 것이다. 따라서, 본 발명의 결합체의 CLDN6에 결합하는 결합 도메인 둘 다는 본원에 기재된 본 발명의 결합체의 CLDN6에 결합하는 결합 도메인들 중 하나에 대응하거나 본질적으로 대응할 수 있거나 또는 본원에 기재된 본 발명의 결합체의 CLDN6에 결합하는 결합 도메인들로부터 독립적으로 선택될 수 있다.
- [0273] 본 발명에 따른 결합체를 제공하는 데 유용한 항-CD3 항체에는 UCHT1-HS(인간화 mAB), UCHT1-MM (뮤린 mAB), CLB-T3, TR66, 145-2C11이 포함되지만 이에 한정되지는 않는다.
- [0274] UCHT1은 인간 및 영장류 샘플 유형에서 CD3을 검출하는 단일클론 IgG1 항-CD3 단일클론 항체이다. CLB-T3은 CD3 항원에 대해 지시되고 80 내지 90% 인간 말초 T 림프구 및 수질 흉선세포와 반응하는 마우스 단일클론 항-CD3 항체이다. TR66은 인간 CD3의 엡실론-쇄를 인식하는 마우스 IgG1 단일클론 항-CD3 항체이다. 145-2C11은 아르메니아 햄스터 단일클론 항-마우스 CD3 항체이다.
- [0275] 바람직하게는, CD3-결합 도메인의 VH 영역 및 VL 영역은 이의 고유한 입체배치로 TCR을 발현하는 활성화된 1차 인간 T 세포에 존재하는 다른 TCR 서브유닛의 범주에서 인간 CD3을 특이적으로 인식할 수 있는 항체/항체 분자 및 항체-유사 분자로부터 유래된다. CD3-ε 쇄에 특이적인 항체로부터 유래된 VH 영역 및 VL 영역이 가장 바람

직하고 상기 (모(母)) 항체는 고유한 또는 거의 고유한 구조를 반영하는 에피토프 또는 TCR 복합체의 범주에서 제시된 인간 CD3의 입체형태적 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있어야 한다. 본 발명의 바람직한 실시형태에서, CD3-결합 도메인의 VH 영역 및 VL 영역은 UCHT1-HS, UCHT1-MM, CLB-T3 및 TR66, 바람직하게는 TR66으로 이루어진 군으로부터 선택된 CD3-특이적 항체로부터 유래된다.

[0276] 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 결합체의 CD3에 결합하는 결합 도메인은 서열번호 5에 제시된 아미노산 서열 또는 이의 단편, 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함한다.

[0277] 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 결합체의 CD3에 결합하는 결합 도메인은 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열 또는 이의 단편, 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함한다.

[0278] 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 결합체의 CD3에 결합하는 결합 도메인은 다음의 중쇄 가변 영역(VH)과 경쇄 가변 영역(VL)의 조합을 포함한다:

[0279] VH는 서열번호 5로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함하고 VL은 서열번호 6으로 표시된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 상기 아미노산 서열 또는 단편의 변이체를 포함한다.

[0280] "단편"이란 용어는 특히 중쇄 가변 영역(VH) 및/또는 경쇄 가변 영역(VL)의 상보성 결정 영역(CDR)들 중 하나 이상, 바람직하게는 적어도 CDR3 가변 영역을 지칭한다. 일 실시형태에서, 상기 상보성 결정 영역(CDR)들 중 하나 이상은 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3의 세트로부터 선택된다. 특히 바람직한 실시형태에서, "단편"이란 용어는 중쇄 가변 영역(VH) 및/또는 경쇄 가변 영역(VL)의 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3을 지칭한다.

[0281] 일 실시형태에서, 본원에 기재된 하나 이상의 CDR, 한 세트의 CDR 또는 CDR 세트들의 조합을 포함하는 결합 도메인은 상기 CDR을 이들의 사이에 있는 프레임워크 영역과 함께 포함한다. 바람직하게는, 상기 부분은 또한 제1 프레임워크 영역 및 제 4 프레임워크 영역 중 어느 하나 또는 둘 다의 적어도 약 50%를 포함할 것이며, 50%는 제1 프레임워크 영역의 C-말단의 50% 및 제 4 프레임워크 영역의 N-말단의 50%이다. 재조합 DNA 기술에 의해 실시되는 결합체의 작제는 클로닝 또는 다른 조작 단계를 용이하게 하기 위해 도입된 링커에 의해 코딩되는 가변 영역으로 N-말단 또는 C-말단에서 잔기를 도입시킬 수 있으며, 여기에는 번역글로불린 중쇄, 다른 가변 도메인 또는 단백질 표지를 포함하는 추가의 단백질 서열에 본 발명의 가변 영역을 결합시키는 링커의 도입이 포함된다.

[0282] 일 실시형태에서, 본원에 기재된 하나 이상의 CDR, 한 세트의 CDR 또는 CDR 세트들의 조합을 포함하는 결합 도메인은 인간 항체 프레임워크 내에 상기 CDR을 포함한다.

[0283] 본 발명에서 설명되는 결합체는 이 결합체를 코딩하는 RNA와 같은 핵산을 투여함으로써 및/또는 이 결합체를 코딩하는 RNA와 같은 핵산을 포함하는 숙주 세포를 투여함으로써 환자에게 전달될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 결합체가 1개 초과인 폴리펩티드 쇄를 포함할 경우, 상이한 폴리펩티드 쇄는 동일한 핵산 또는 상이한 핵산상에 코딩될 수 있다. 따라서, 투여될 핵산은 상이한 핵산 분자들의 혼합물일 수 있다. 결합체를 코딩하는 핵산은 환자에게 투여될 때 리조솜 또는 나노입자 또는 바이러스 입자의 형태와 같은 적합한 전달 비히클 중에 또는 나형(naked) 형태로 존재하거나 숙주 세포 내에 존재할 수 있다. 제공된 핵산은 적어도 부분적으로 치료적 항체에 대해 관찰된 불안정성을 완화하는 지속적 방식으로 장기간에 걸쳐 결합체를 생산할 수 있다. 환자에게 전달될 핵산은 재조합 방식에 의해 제조될 수 있다. 핵산이 숙주 세포 내에 존재하지 않은 상태로 환자에게 투여될 경우, 그 핵산이 핵산에 의해 코딩되는 결합체가 발현될 수 있도록 환자의 세포에 의해 흡수되는 것이 바람직하다. 핵산이 숙주 세포 내에 존재하는 상태로 환자에게 투여될 경우, 그 핵산에 의해 코딩되는 결합체를 생산하기 위해 핵산이 환자 내에서 그 숙주 세포에 의해 발현되는 것이 바람직하다.

[0284] 본 발명의 맥락에서 "재조합"이란 용어는 "유전공학을 통해 제조된" 것을 의미한다. 바람직하게는, 본 발명의 맥락에서 재조합 핵산과 같은 "재조합 대상"은 천연 발생적인 것이 아니다.

[0285] 본원에서 사용되는 바와 같이 "천연 발생"이란 용어는 대상이 천연에서 발견될 수 있다는 사실을 의미한다. 예를 들어, 유기체(바이러스를 포함)에 존재하고 천연 공급원으로부터 단리될 수 있고 사람이 실험실에서 의도적으로 변형시키지 않은 펩티드 또는 핵산은 천연 발생적인 것이다.

[0286] 본원에서 사용된 바와 같이, "핵산"이란 용어는 게놈 DNA, cDNA, mRNA, 재조합적으로 생산된 분자 및 화학적으로 합성된 분자와 같은 DNA 및 RNA를 포함하는 것으로 의도된다. 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다.

RNA에는 시험관내 전사된 RNA(IVT RNA) 또는 합성 RNA가 포함된다.

[0287] 핵산은 벡터에 포함될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "벡터"란 용어는 플라스미드 벡터, 코스미드 벡터, 람다 파아지와 같은 파아지 벡터, 아데노바이러스 또는 배큘로바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터, 또는 세균 인공 염색체(BAC), 효모 인공 염색체(YAC) 또는 P1 인공 염색체(PAC)와 같은 인공 염색체 벡터를 포함하여 당업자에게 공지된 임의의 벡터를 포함한다. 상기 벡터는 발현 벡터뿐만 아니라 클로닝 벡터를 포함한다. 발현 벡터는 플라스미드뿐만 아니라 바이러스 벡터를 포함하고, 일반적으로 목적하는 코딩 서열, 및 특정 숙주 유기체(예를 들어, 세균, 효모, 식물, 곤충 또는 포유동물) 또는 시험관내 발현 시스템에서의 작동 가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필수적인 적절한 DNA 서열을 함유한다. 클로닝 벡터는 일반적으로 특정의 목적하는 DNA 단편을 조작하고 증폭시키는 데 사용되며, 목적하는 DNA 단편의 발현에 필요한 기능적 서열이 결여될 수 있다.

[0288] 본 발명의 맥락에서, "RNA"란 용어는 리보뉴클레오타이드 잔기를 포함하고 바람직하게는 완전히 또는 실질적으로 리보뉴클레오타이드 잔기로 이루어진 분자에 관한 것이다. "리보뉴클레오타이드"는 β -D-리보푸라노실 기의 2'-위치에 하이드록실기를 갖는 뉴클레오타이드에 관한 것이다. 상기 용어는 이중가닥 RNA, 단일가닥 RNA, 부분적으로 정제된 RNA와 같은 단리된 RNA, 본질적으로 순수한 RNA, 합성 RNA, 재조합적으로 생산된 RNA뿐만 아니라 하나 이상의 뉴클레오타이드의 부가, 결실, 치환 및/또는 변경에 의해 천연 발생 RNA와 상이한 변형된 RNA를 포함한다. 이러한 변경은 예를 들어, RNA의 하나 이상의 뉴클레오타이드에서, RNA의 말단(들)에 또는 내부적으로, 비-뉴클레오타이드 물질을 첨가하는 것을 포함할 수 있다. RNA 분자의 뉴클레오타이드는 비-천연 발생 뉴클레오타이드 또는 화학적으로 합성된 뉴클레오타이드 또는 테옥시뉴클레오타이드와 같은 비-표준 뉴클레오타이드도 포함할 수 있다. 이러한 변형된 RNA들은 유사체 또는 천연 발생 RNA의 유사체로서 지칭될 수 있다.

[0289] 본 발명에 따라, "RNA"란 용어는 "메신저 RNA"를 의미하는 "mRNA"를 포함하고 바람직하게는 이에 관한 것이며, 주형으로서 DNA를 사용하여 생산될 수 있는 "전사체"에 관한 것이고, 펩티드 또는 단백질을 코딩한다. mRNA는 전형적으로 5' 비번역 영역(5'-UTR), 단백질 또는 펩티드 코딩 영역 및 3' 비번역 영역(3'-UTR)을 포함한다. mRNA는 세포내 및 시험관내에서는 제한된 반감기를 갖는다. 바람직하게는, mRNA는 DNA 주형을 사용하여 시험관내 전사에 의해 생성된다. 본 발명의 일 실시형태에서, RNA는 시험관내 전사 또는 화학적 합성에 의해 획득된다. 시험관내 전사 방법론은 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 시판되는 다양한 시험관내 전사 키트가 있다.

[0290] 본 발명의 일 실시형태에서, RNA는 단일 가닥 자가-복제 RNA와 같은 자가-복제 RNA이다. 일 실시형태에서, 자가-복제 RNA는 포지티브 센스의 단일 가닥 RNA이다. 일 실시형태에서, 자가-복제 RNA는 바이러스 RNA 또는 바이러스 RNA로부터 유래된 RNA이다. 일 실시형태에서, 자가-복제 RNA는 알파바이러스 게놈 RNA이거나 알파바이러스 게놈 RNA로부터 유래된 것이다. 일 실시형태에서, 자가-복제 RNA는 바이러스 유전자 발현 벡터이다. 일 실시형태에서, 바이러스는 셈리키 삼립열 바이러스(Semliki forest virus)이다. 일 실시형태에서, 자가-복제 RNA는 본원에 기재된 결합제를 코딩하는 상기 전이유전자 중 적어도 하나, 하나 이상의 전이유전자를 함유한다. 일 실시형태에서, RNA가 바이러스 RNA이거나 바이러스 RNA로부터 유래되는 경우, 전이유전자는 구조 단백질을 코딩하는 바이러스 서열과 같은 바이러스 서열을 부분적으로 또는 완전히 대체할 수 있다. 일 실시형태에서, 자가-복제 RNA는 시험관내 전사된 RNA이다.

[0291] 알파바이러스의 게놈은 큰 폴리단백질의 2개의 오픈 리딩 프레임(ORF)을 코딩하는 포지티브 센스의 단일가닥 RNA(ssRNA(+))이다. 게놈의 5'-말단의 ORF는 비구조 단백질인 nsP1 내지 nsP4(nsP1 내지 nsP4)를 코딩하는데, 이들은 번역되고 RNA-의존적 RNA-폴리머라제(레플리카제)로 프로세싱되고; 3'-말단의 ORF는 구조 단백질 - 캡시드 및 당단백질들을 코딩한다. 2개의 ORF 모두는 구조적 ORF의 전사를 통제하는 소위 서브게놈 프로모터(SGP)에 의해 분리되어 있다. 유전자 벡터로서 이용될 경우, SGP 뒤의 구조적 단백질은 흔히 전이유전자에 의해 대체된다. 이러한 벡터들을 바이러스 입자들 내로 패키징하기 위해, 구조 단백질은 헬퍼 작제물로부터 트랜스 발현된다. 알파바이러스는 감염된 세포들의 세포질에서 오로지 RNA 수준에서만 복제된다. 감염 후, ssRNA(+) 게놈은 nsP1234 폴리-단백질 전구체의 번역을 위한 mRNA로서 작용하고, 상기 전구체는 바이러스 생명 주기의 초기 단계에서 자가단백질분해에 의해 단편 nsP123 및 nsP4로 프로세싱된다. 단편 nsP123 및 nsP4는 (-)가닥 레플리카제 복합체를 형성하고 이것은 게놈 RNA 주형으로부터 (-)가닥 RNA를 전사한다. 후기 단계에서, nsP1234 폴리단백질은 단일 단백질들로 완전히 절단되고 이러한 단일 단백질들은 새로운 (+)가닥 게놈뿐만 아니라 구조 단백질 또는 전이유전자를 코딩하는 서브게놈 전사체를 합성하는 (+)가닥 레플리카제 복합체로 조립된다. 서브게놈 RNA뿐만 아니라 새로운 게놈 RNA는 캡핑 및 폴리아데닐화되고 이에 따라 표적 세포 감염 후에 mRNA로서 인식된다. 오직 새로운 게놈 RNA만이 패키징 시그널을 함유하고 이는 게놈 RNA만이 발아 비리온 내로 패키징되는 것을 보장한다. 벡터학에 있어서 알파바이러스 레플리콘의 매력은 캡핑 및 폴리아데닐화된 RNA 게놈의 포지티브 배향에

기초한다. 번역가능한 레플리콘 RNA는 시험관내에서 용이하게 합성될 수 있고, 이로 인해 캡핑은 시험관내 전사 반응에 첨가된 캡-유사체에 의해 달성될 수 있고 폴리-A 테일은 플라스미드 주형상에서 폴리-T 트랙으로서 코딩될 수 있다. 시험관내 전사된(IVT) 레플리콘은 통상적인 형질감염 기술에 의해 형질감염되고 심지어 적은 양의 출발 IVT RNA라도 급속히 배가된다. 전달 후 수시간 이내에, SGP의 하류에 위치하는 전이유전자들은 세포당 서브게놈 RNA 약 40,000 내지 200,000개 카피의 매우 높은 카피수로 전사되므로, 재조합 단백질들이 강력하게 발현되는 것은 놀라운 일이 아니다. 구체적 목적에 따라, IVT 레플리콘은 표적 세포 내로 직접 형질감염되거나 또는 트랜스 내에서 구조 유전자를 제공하는 헬퍼 벡터와 함께 알파바이러스 입자 내로 패키징될 수 있다. 피부 또는 근육 내로의 전달은 고도의 지속적인 국소 발현으로 이어지며 체액성 및 세포성 면역반응의 강력한 유도과 병행된다.

- [0292] 본 발명에 따라 사용되는 RNA의 발현 및/또는 안정성을 증가시키기 위해, 바람직하게는 발현된 펩티드 또는 단백질의 서열을 변경하지 않으면서 상기 RNA를 변형시킬 수 있다.
- [0293] 본 발명에 따라 사용되는 바와 같이 RNA와 관련하여 "변형" 이란 용어는 상기 RNA에 천연적으로 존재하지 않는 RNA의 임의의 변형을 포함한다.
- [0294] 본 발명의 일 실시형태에서, 발명에 따라 사용되는 RNA는 캡핑되지 않은 5'-트리포스페이트를 갖지 않는다. 이러한 캡핑되지 않은 5'-트리포스페이트의 제거는 포스파타아제에 RNA를 처리함으로써 달성될 수 있다.
- [0295] 본 발명에 따른 RNA는 이의 안정성을 증가시키고/시키거나 세포독성을 감소시키기 위해 변형된 천연 발생 또는 합성 리보뉴클레오타이드를 가질 수 있다. 예를 들어, 일 실시형태에서, 본 발명에 따라 사용되는 RNA에서 5-메틸 시티딘은 부분적으로 또는 완전히, 바람직하게는 완전히 시티딘을 대체한다. 대안으로 또는 부가적으로, 일 실시형태에서, 본 발명에 따라 사용되는 RNA에서 슈도우리딘은 부분적으로 또는 완전히, 바람직하게는 우리딘을 대체한다.
- [0296] 일 실시형태에서, "변형" 이란 용어는 5'-캡 또는 5'-캡 유사체를 RNA에 제공하는 것에 관한 것이다. "5'-캡" 이란 용어는 mRNA 분자의 5'-말단에서 발견되는 캡 구조를 지칭하며 일반적으로 혼치 않은 5'에서 5'로의 트리포스페이트 결합을 통해 mRNA에 연결된 구아노신 뉴클레오타이드로 이루어진다. 일 실시형태에서, 이러한 구아노신은 7-위치에서 메틸화된다. "통상적인 5'-캡"이란 용어는 천연 발생 RNA 5'-캡, 바람직하게는 7-메틸구아노신 캡(m7G)을 지칭한다. 본 발명의 맥락에서, "5'-캡"이란 용어는 RNA 캡 구조와 유사한 5'-캡 유사체를 포함하고, 바람직하게는 생체내 및/또는 세포내에서 RNA에 부착된 경우 RNA를 안정화시키는 능력을 갖도록 변형된다.
- [0297] 5'-캡 또는 5'-캡 유사체를 RNA에 제공하는 것은 상기 5'-캡 또는 5'-캡 유사체의 존재 하에 DNA 주형의 시험관내 전사에 의해 달성할 수 있으며, 여기서 상기 5'-캡은 공동전사에 의해 생성된 RNA 가닥 내에 혼입하거나, RNA를 예를 들어 시험관내 전사에 의해 생성하고 5'-캡을 캡핑 효소, 예를 들어 백시니아 바이러스의 캡핑 효소를 사용하여 전사후 RNA에 부착시킬 수 있다.
- [0298] RNA는 추가의 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에서 사용되는 RNA의 추가 변형은 천연 발생 폴리(A) 테일의 연장, 또는 상기 RNA의 코딩 영역과 관련이 없는 UTR의 도입, 예를 들어 알파2-글로빈, 알파1-글로빈, 베타-글로빈, 바람직하게는 베타-글로빈, 보다 바람직하게는 인간 베타-글로빈과 같은 글로빈 유전자로부터 유래된 3'-UTR의 하나 이상, 바람직하게는 2개 카피의 삽입과 같은 절두 또는 5'- 또는 3'-비번역 영역(UTR)의 변경일 수 있다.
- [0299] 따라서, 본 발명에 따라 사용된 RNA의 안정성 및/또는 발현을 증가시키기 위해, 상기 RNA를 바람직하게는 10 내지 500개, 보다 바람직하게는 30 내지 300개, 더욱 바람직하게는 65 내지 200개, 특히 바람직하게는 100 내지 150개의 아데노신 잔기의 길이를 갖는 폴리-A 서열과 함께 존재하도록 변형시킬 수 있다. 특히 바람직한 실시형태에서, 폴리-A 서열은 약 120개 아데노신 잔기의 길이를 갖는다. 또한, 2개 이상의 3'-비번역 영역(UTR)을 RNA 분자의 3'-비번역 영역 내에 혼입하면 번역 효율이 향상될 수 있다. 하나의 특정 실시형태에서, 3'-UTR은 인간 β -글로빈 유전자로부터 유래된다.
- [0300] 바람직하게는, RNA는 세포, 특히 생체내에 존재하는 세포로 절단, 즉 형질감염될 경우 그것이 코딩하는 단백질, 펩티드 또는 항원을 발현한다.
- [0301] "형질감염" 이란 용어는 세포 내로의 핵산, 특히 RNA의 도입에 관한 것이다. 또한, 본 발명의 목적상, "형질감염"이란 용어는 세포 내로의 핵산의 도입 또는 이러한 세포에 의한 핵산의 흡수를 포함하며, 여기서 세포는 대상체, 예를 들어 환자에 존재할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따라, 본원에 기재된 핵산의 형질감염을 위한 세포는 시험관내 또는 생체내에 존재할 수 있고, 예를 들어 상기 세포는 환자의 장기, 조직 및/또는 유기체의 일부

분을 형성할 수 있다. 본 발명에 따라, 형질감염은 일시적이거나 안정적인 수 있다. 형질감염의 일부 적용을 위해, 형질감염된 유전 물질이 일시적으로만 발현되는 것으로 충분하다. 형질감염 과정에서 도입된 핵산은 일반적으로 핵 계층에 통합되지 않기 때문에, 외래 핵산은 유사분열을 통해 희석되거나 분해될 것이다. 핵산의 에피솜 증폭을 허용하는 세포는 희석 속도를 크게 감소시킨다. 형질감염된 핵산이 실제로 세포 및 이의 딸 세포의 계층에 남아있는 것이 바람직한 경우, 안정한 형질감염이 발생해야만 한다. RNA는 이의 코딩된 단백질을 일시적으로 발현하기 위해 세포로 형질감염될 수 있다.

[0302] RNA의 "안정성"이란 용어는 RNA의 "반감기"에 관한 것이다. "반감기"는 분자의 활성, 양 또는 수의 절반을 제거하는 데 필요한 시간에 관한 것이다. 본 발명의 맥락에서, RNA의 반감기는 상기 RNA의 안정성을 나타내는 지표이다. RNA의 반감기는 RNA의 "발현 지속 시간"에 영향을 줄 수 있다. 반감기가 긴 RNA는 장시간 동안 발현될 것으로 예상될 수 있다.

[0303] 본 발명의 맥락에서, "전사"란 용어는 DNA 서열 내의 유전자 암호가 RNA로 전사되는 과정에 관한 것이다. 이어서, RNA는 단백질로 번역될 수 있다. 본 발명에 따라, "전사"란 용어는 "시험관내 전사"를 포함하며, 여기서 "시험관내 전사"란 용어는 RNA, 특히 mRNA가 무세포계에서, 바람직하게는 적절한 세포 추출물을 사용하여 시험관내 합성되는 과정에 관한 것이다. 바람직하게는, 클로닝 벡터가 전사체의 생성을 위해 적용된다. 이러한 클로닝 벡터들은 일반적으로 전사 벡터로서 지정되며 본 발명에 따라 "벡터"란 용어에 포함된다.

[0304] 본 발명에 따라, "번역"이란 용어는 메신저 RNA의 가닥이 아미노산 서열의 조립을 지시하여 펩티드 또는 단백질을 생산되게 하는, 세포의 리보솜에서의 과정에 관한 것이다.

[0305] "발현"이란 용어는 이의 가장 일반적인 의미로 본 발명에 따라 사용되며, 예를 들어 전사 및/또는 번역에 의한 RNA 및/또는 펩티드 또는 단백질의 생성을 포함한다. RNA와 관련하여, "발현" 또는 "번역"이란 용어는 특히 펩티드 또는 단백질의 생산에 관한 것이다. 상기 용어는 또한 핵산의 부분적 발현도 포함한다. 또한, 발현은 일시적이거나 안정적인 수 있다. 본 발명에 따라, 발현이란 용어는 또한 "이상 발현" 또는 "비정상적 발현"을 포함한다.

[0306] "이상 발현" 또는 "비정상적 발현"은 본 발명에 따라 발현이 예를 들면 특정의 단백질, 예를 들면 종양 항원의 이상 발현 또는 비정상적 발현과 연관된 질환을 갖지 않은 대상체의 상태를 참조와 비교해 변경, 바람직하게는 증가되는 것을 의미한다. 발현의 증가는 적어도 10%, 특히 적어도 20%, 적어도 50% 또는 적어도 100% 이상의 증가를 지칭한다. 일 실시형태에서, 발현은 이화된 조직에서만 발견되는 반면, 건강한 조직의 발현은 억제된다.

[0307] "특이적으로 발현된"이란 용어는 단백질이 본질적으로 특정 조직 또는 장기에서만 발현된다는 것을 의미한다. 예를 들어, 위 점막에서 특이적으로 발현되는 종양 항원은 상기 단백질이 위 점막에서 주로 발현되고 다른 조직에서는 발현되지 않거나 다른 조직 또는 장기 유형에서 유의적인 정도로 발현되지 않는다는 것을 의미한다. 따라서, 위 점막의 세포에서만 독점적으로 발현되고, 고환과 같은 임의의 다른 조직에서 유의적으로 낮은 정도로 발현되는 단백질은 위 점막의 세포에서 특이적으로 발현된다. 일부 실시형태에서, 종양 항원은 또한 2종 또는 3종의 조직 유형 또는 장기에서와 같이 1종 초과 조직 유형 또는 장기에서 정상 조건 하에 특이적으로 발현될 수 있지만, 바람직하게는 3종 초과 다른 조직 또는 장기 유형에서 특이적으로 발현될 수 없다. 이러한 경우, 종양 항원은 이러한 장기들에서 특이적으로 발현된다. 예를 들어, 종양 항원이 폐 및 위에서 바람직하게는 대략 동등한 정도로 정상 조건 하에 발현되는 경우, 상기 종양 항원은 폐 및 위에서 특이적으로 발현된다.

[0308] 본 발명에 따라, "RNA 코딩"이란 용어는 RNA가 적절한 환경, 바람직하게는 세포 내에 존재하는 경우, 발현되어 그것이 코딩하는 단백질 또는 펩티드를 생산할 수 있음을 의미한다.

[0309] 본 발명의 일부 양상은 숙주 세포를 본원에 기재된 결합제를 코딩하는 RNA와 같은 핵산으로 시험관내 형질감염시키고 바람직하게는 낮은 전구체 빈도로부터 임상적으로 타당한 세포 수까지 생체의 증대시킨 후, 환자와 같은 수용자에게 전달하는 숙주 세포의 입양 전달(adoptive transfer)에 의존한다. 본 발명에 따라 치료를 위해 사용되는 숙주 세포는 치료된 수용자에 대해서 자가(autologous), 동종이계(allogeneic), 또는 동계(syngeneic)일 수 있다.

[0310] "자가"란 용어는 동일한 대상체로부터 유래된 임의의 것을 설명하는 데 사용된다. 예를 들어, "자가 이식"은 동일한 대상체로부터 유래된 조직 또는 장기의 이식을 지칭한다. 이러한 절차는 그렇지 않다면 거부반응을 일으키는 면역 장벽을 극복하기 때문에 유리하다.

[0311] "동종이계"란 용어는 동일한 종의 다른 개체로부터 유래된 임의의 것을 설명하는 데 사용된다. 하나 이상의 유

전자좌의 유전자들이 동일하지 않은 경우 둘 이상의 개체가 서로에 대해 동종이계라고 한다.

- [0312] "동계"란 용어는 동일한 유전자형을 갖는 개체 또는 조직, 즉 일란성 쌍생아 또는 동일한 동계교배계의 동물 또는 이들의 조직으로부터 유래되는 임의의 것을 설명하는 데 사용된다.
- [0313] "이종"이란 용어는 다수의 상이한 요소들로 구성된 어떤 것을 설명하기 위해 사용된다. 일례로서, 한 개체의 골수를 다른 개체로 이전하는 것은 이종 이식을 구성한다. 이종 유전자는 대상체 이외의 공급원으로부터 유래된 유전자이다.
- [0314] 본 발명에 따른 "펩티드"란 용어는 올리고펩티드 및 폴리펩티드를 포함하고, 펩티드 결합에 의해 공유결합된 2개 이상, 바람직하게는 3개 이상, 바람직하게는 4개 이상, 바람직하게는 6개 이상, 바람직하게는 8개 이상, 바람직하게는 9개 이상, 바람직하게는 10개 이상, 바람직하게는 13개 이상, 바람직하게는 16개 이상, 바람직하게는 21개 이상 및 바람직하게는 최대 8개, 10개, 20개, 30개, 40개 또는 50개, 특히 100개의 아미노산을 포함하는 물질을 지칭한다. "단백질"이란 용어는 큰 펩티드, 바람직하게는 100개 초과 아미노산 잔기를 갖는 펩티드를 지칭하지만, 일반적으로 "펩티드" 및 "단백질"이란 용어는 동의어이며 본원에서 상호교환적으로 사용된다.
- [0315] 특정 아미노산 서열, 예를 들어 서열목록에 제시된 아미노산 서열에 관한 본원에 기재된 교시내용은 상기 특정 서열과 기능적으로 동등한 서열, 예를 들어 상기 특정 아미노산 서열과 동일하거나 유사한 특성을 갖는 아미노산 서열을 야기하는 상기 특정 서열의 변이체에 관한 것으로 이해될 것이다. 한 가지 중요한 특성은 표적에 대한 결합을 보유하거나 이펙터 기능을 유지하는 것이다. 바람직하게는, 특정 서열에 대해 변이체인 서열은 이것이 항체 내의 상기 특정 서열을 대체하는 경우 클라우딘 및/또는 CD3에 대한 상기 항체의 결합 및 바람직하게는 본원에 기재된 상기 항체의 기능, 예를 들어 CDC 매개 용해 또는 ADCC 매개 용해를 유지한다. 더욱이, 바람직하게는, 특정 서열에 대해 변이체인 서열은 이것이 결합제 내의 상기 특정 서열을 대체하는 경우 클라우딘 및/또는 CD3에 대한 상기 결합제의 결합 및 바람직하게는 본원에 기재된 상기 결합제의 기능, 예를 들어 세포독성 T 세포 매개 용해를 보유한다.
- [0316] 예를 들어, 서열목록에 제시된 서열은 특히 시스테인 잔기를 시스테인 이외의 아미노산, 바람직하게는 세린, 알라닌, 트레오닌, 글리신, 티로신, 트립토판, 류신 또는 메티오닌으로 대체함으로써 하나 이상, 바람직하게는 모든 유리 시스테인 잔기를 제거하도록 변형될 수 있다.
- [0317] 특히 CDR, 추가변 영역 및 가변 영역의 서열이 클라우딘 및/또는 CD3에 결합하는 능력을 상실하지 않으면서 변형될 수 있다는 것은 당업자에 의해 이해될 것이다. 예를 들어, CDR 영역은 본원에 명시된 항체의 영역과 동일하거나 고도로 상동일 수 있다. "고도로 상동인"이란, CDR 내에서 1 내지 5개, 바람직하게는 1 내지 4개, 예컨대 1 내지 3개 또는 1개 또는 2개의 치환이 이루어질 수 있는 것으로 의도된다. 또한, 추가변 영역 및 가변 영역은 본원에서 구체적으로 개시된 영역과 실질적인 상동성을 나타내도록 변형될 수 있다. 일 실시형태에서, 가변 영역 서열은 프레임워크 서열에서만 본원에 구체적으로 개시된 가변 영역 서열로부터 벗어나 있다.
- [0318] 본 발명의 목적상, 아미노산 서열의 "변이체"는 아미노산 삽입 변이체, 아미노산 부가 변이체, 아미노산 결실 변이체 및/또는 아미노산 치환 변이체를 포함한다. 단백질의 N-말단 및/또는 C-말단에서의 결실을 포함하는 아미노산 결실 변이체는 N-말단 및/또는 C-말단 절두 변이체라고도 불린다.
- [0319] 아미노산 삽입 변이체는 특정 아미노산 서열에서 단일 또는 2종 이상의 아미노산의 삽입을 포함한다. 삽입을 갖는 아미노산 서열 변이체의 경우, 하나 이상의 아미노산 잔기가 아미노산 서열의 특정 부위에 삽입되지만, 산출된 생성물의 적절한 스크리닝을 통한 무작위 삽입이 또한 가능하다.
- [0320] 아미노산 첨가 변이체는 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50개 또는 그 이상의 아미노산과 같은 하나 이상의 아미노산의 아미노-말단 및/또는 카복시-말단 융합체를 포함한다.
- [0321] 아미노산 결실 변이체는 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50개 또는 그 이상의 아미노산의 제거와 같은 서열로부터 하나 이상의 아미노산의 제거를 특징으로 한다. 결실은 단백질의 임의의 위치에 있을 수 있다.
- [0322] 아미노산 치환 변이체는 서열 내의 적어도 1개의 잔기가 제거되고 또 다른 잔기가 그 자리에 삽입되는 것을 특징으로 한다. 상동성 단백질 또는 펩티드 간에 보존되지 않은 아미노산 서열 내 위치들에 있는 변형 및/또는 아미노산을 유사한 특성을 갖는 다른 아미노산으로 대체하는 변형이 바람직하다. 바람직하게는, 단백질 변이체에서의 아미노산 변화는 보존적 아미노산 변화, 즉 유사하게 하전되거나 비하전된 아미노산의 치환이다. 보존적 아미노산 변화는 이들의 측쇄와 관련된 아미노산 패밀리 중 하나로의 치환을 포함한다. 천연 발생 아미노산은 일반적으로 4가지 패밀리: 산성 아미노산(아스파테이트, 글루타메이트), 염기성 아미노산(라이신, 아르기닌, 히

스티딘), 비극성 아미노산(알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판) 및 비하전된 극성 아미노산(글리신, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 세린, 트레오닌, 티로신)으로 세분된다. 페닐알라닌, 트립토판, 및 티로신은 때때로 공동으로 방향족 아미노산으로도 같이 분류된다.

[0323] 바람직하게는 소정의 아미노산과 상기 소정의 서열의 변이체인 아미노산 서열 간의 유사성 정도, 바람직하게는 동일성은 적어도 약 60%, 65%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%일 것이다. 유사성 또는 동일성 정도는 바람직하게는 참조 아미노산 서열의 전체 길이의 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90% 또는 약 100%인 아미노산 영역에 대해 부여된다. 예를 들어, 참조 아미노산 서열이 200개의 아미노산으로 구성되는 경우, 유사성 또는 동일성 정도는 바람직하게는 적어도 약 20개, 적어도 약 40, 적어도 약 60, 적어도 약 80, 적어도 약 100, 적어도 약 120, 적어도 약 140, 적어도 약 160, 적어도 약 180 또는 약 200개의 아미노산, 바람직하게는 연속적인 아미노산에 대해 부여된다. 바람직한 실시형태에서, 유사성 또는 동일성 정도는 참조 아미노산 서열의 전체 길이에 대해 부여된다. 서열 유사성, 바람직하게는 서열 동일성을 결정하기 위한 정렬은 당업계에 공지된 도구를 사용하여, 바람직하게는 가장 우수한 서열 정렬을 사용하여, 예를 들어, Align을 사용하여, 표준 설정, 바람직하게는 EMBOS::needle, Matrix: Blosom62, Gap Open 10.0, Gap Extend 0.5를 사용하여 실시할 수 있다.

[0324] "서열 유사성"은 동일하거나 보존적 아미노산 치환을 나타내는 아미노산의 퍼센트를 나타낸다. 두 아미노산 서열 간의 "서열 동일성"은 서열들 간의 동일한 아미노산의 퍼센트를 나타낸다.

[0325] "퍼센트 동일성"이란 용어는 최상의 정렬 후에 수득된 비교될 두 서열 간의 동일한 아미노산 잔기의 백분율을 나타내고, 이 백분율은 순전히 통계적이며, 두 서열 간의 차이는 무작위로 그 전체 길이에 걸쳐 분포된다. 두 아미노산 서열 간의 서열 비교는 통상적으로 이들 서열을 최적으로 정렬시킨 후 이들 서열을 비교함으로써 실시하며, 상기 비교는 서열 유사성의 국소 영역을 동정하고 비교하기 위해 세그먼트에 의해 또는 "비교 윈도우"에 의해 실시한다. 비교를 위한 서열의 최적 정렬은, 수동에 의한 것 외에도, 문헌[Smith and Waterman, 1981, *Ads App. Math.* 2, 482]의 국소 상동성 알고리즘에 의해, 문헌[Neddleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443]의 국소 상동성 알고리즘에 의해, 문헌[Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 2444]의 유사성 검색 방법에 의해 또는 이들 알고리즘(GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N and TFASTA in Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.)을 사용하는 컴퓨터 프로그램에 의해 생성될 수 있다.

[0326] 퍼센트 동일성은 비교될 두 서열 간의 동일한 위치의 수를 결정하고, 이 수를 비교된 위치의 수로 나누고, 얻어진 결과에 100을 곱하여 이들 두 서열 간의 퍼센트 동일성을 수득함으로써 계산된다.

[0327] 본 발명의 결합체는 세포내에서(예를 들어, 세포질 내, 주변 세포질 내 또는 봉입체 내에서) 생성된 다음, 숙주 세포로부터 단리되고 임의로 추가 정제될 수 있거나; 본 발명의 결합체는 세포외에서(예를 들어, 숙주 세포가 배양되는 배지에서) 생성된 다음, 숙주 세포로부터 단리되고 임의로 추가 정제될 수 있다. 특이적인 적합한 발현 벡터, 형질전환 또는 형질감염 방법, 선택 마커, 단백질 발현의 유도 방법, 배양 조건 등과 같은 폴리펩티드의 재조합 생성을 위해 사용되는 방법 및 시약은 당업계에 공지되어 있다. 마찬가지로, 단백질 단리 및 정제 기술은 당업자에게 익히 공지되어 있다.

[0328] "세포" 또는 "숙주 세포"라는 용어는 바람직하게는 온전한 세포, 즉 효소, 세포 소기관 또는 유전 물질과 같은 정상적인 세포내 성분을 방출하지 않은 온전한 막을 갖는 세포에 관한 것이다. 온전한 세포는 바람직하게는 생존 가능한 세포, 즉 정상적인 대사 기능을 수행할 수 있는 살아 있는 세포이다. 바람직하게는 상기 용어는 본 발명에 따라 외인성 핵산으로 형질감염될 수 있는 임의의 세포에 관한 것이다. 바람직하게는, 세포는 외인성 핵산으로 형질감염되어 수용자에게 전달될 때 수용자에서 상기 핵산을 발현할 수 있다. "세포"란 용어는 세균 세포를 포함하고; 다른 유용한 세포는 효모 세포, 진균 세포 또는 포유동물 세포이다. 적합한 세균 세포는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 프로테우스(*Proteus*) 및 슈도모나스(*Pseudomonas*)의 균주와 같은 그람-음성 세균 균주 및 바실러스(*Bacillus*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 스태필로코커스(*Staphylococcus*) 및 락토코커스(*Lactococcus*)의 균주와 같은 그람-양성 세균 균주 유래의 세포를 포함한다. 적합한 진균 세포는 트리코테르마(*Trichoderma*), 뉴로스포라(*Neurospora*) 및 아스페질러스(*Aspergillus*)의 종 유래의 세포를 포함한다. 적합한 효모 세포는 사카로마이세스(*Saccharomyces*)(예를 들어, 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)), 스킴조사카로마이세스(*Schizosaccharomyces*)(예를 들어, 스킴조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*)), 피치아(*Pichia*)(예를 들어, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 및 피치아 메

탄올리치(*Pichia methanolic*) 및 한세놀라(*Hansenula*) 중 유래의 세포를 포함한다. 적합한 포유동물 세포는 예를 들어 CHO 세포, BHK 세포, HeLa 세포, COS 세포 및 293 HEK 등을 포함한다. 그러나, 양서류 세포, 곤충 세포, 식물 세포 및 이중 단백질의 발현을 위해 당업계에서 사용되는 임의의 다른 세포 역시 사용할 수 있다. 인간, 마우스, 햄스터, 돼지, 염소 및 영장류 유래의 세포와 같은 포유동물 세포가 입양 전달에 특히 바람직하다. 상기 세포는 다수의 조직 유형으로부터 유래될 수 있고 면역계의 세포, 특히 수지상 세포 및 T 세포와 같은 항원 제시 세포, 조혈모세포 및 중간엽 줄기세포와 같은 줄기세포 및 기타 세포 유형과 같은 1차 세포 및 세포주를 포함한다. 항원-제시 세포는 주요 조직적합성 복합체의 범주에서 이의 표면에 항원을 나타내는 세포이다. T 세포는 이의 T세포 수용체(TCR)를 이용하여 상기 복합체를 인식할 수 있다.

[0329] 본원에서 사용되는 "감소시키다", "저감시키다", "억제하다"는 수준, 예를 들어 발현 수준 또는 세포 증식의 수준의 바람직하게는 5% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 보다 바람직하게는 50% 이상 및 가장 바람직하게는 75% 이상의 전반적 감소 또는 전반적 감소를 유발하는 능력을 의미한다.

[0330] "증가시키다" 또는 "증진시키다"란 용어는 바람직하게는 약 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 20%, 바람직하게는 적어도 30%, 보다 바람직하게는 적어도 40%, 보다 바람직하게는 적어도 50%, 보다 더욱 바람직하게는 적어도 80% 및 가장 바람직하게는 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 500%, 적어도 1000%, 적어도 10000% 또는 그 이상 증가 또는 증대시키는 것에 관한 것이다.

[0331] 항체 의존적 세포-매개 세포독성

[0332] ADCC는 본원에 기재된 이펙터 세포, 특히 림프구의 세포 사멸 능력을 설명하고, 이것은 바람직하게는 항체에 의해 표시되는 표적 세포를 필요로 한다.

[0333] ADCC는 바람직하게는 항체가 종양 세포상의 항원에 결합하고 항체 Fc 도메인이 면역 이펙터 세포의 표면상의 Fc 수용체와 맞물릴 때 일어난다. Fc 수용체의 몇몇 패밀리가 동정되었고, 특이적 세포 집단은 규정된 Fc 수용체를 특징적으로 발현한다. ADCC는 항원 제시 및 종양-지시된 T 세포 반응의 유도를 초래하는 다양한 정도의 즉각적인 종양 파괴를 직접 유도하기 위한 기전으로서 여겨질 수 있다. 바람직하게는, ADCC의 생체내 유도는 종양-지시된 T 세포 반응 및 숙주 유래의 항체 반응으로 이어질 것이다.

[0334] 보체 의존적 세포독성

[0335] CDC는 항체에 의해 지시될 수 있는 또 다른 세포 사멸 방법이다. IgM은 보체 활성화를 위한 가장 효과적인 이소형이다. IgG1와 IgG3 둘 다도 고전적 보체 활성화 경로를 통해 CDC를 지시하는 데 있어서 매우 효과적이다. 바람직하게는, 이러한 캐스케이드(cascade)에서, 항원-항체 복합체의 형성은 IgG 분자와 같은 참여 항체 분자의 CH₂ 도메인상에서 가깝게 근접해 있는 다수의 C1q 결합 부위의 노출(uncloaking)을 일으킨다(C1q는 보체 C1의 3종의 하위성분 중 하나이다). 바람직하게는, 이러한 노출된 C1q 결합 부위는 이전의 낮은 친화성 C1q-IgG 상호작용을 높은 결합력(avidity)의 것으로 전환시키고, 이것은 일련의 다른 보체 단백질이 관련된 사건의 캐스케이드를 촉발하고 이펙터 세포 화학주성제/활성화제 C3a 및 C5a의 단백질분해적 방출을 초래한다. 바람직하게는, 막의 형성에서 보체 캐스케이드 말단은 복합체를 공격하고, 이것은 세포 내외로의 용질 및 물의 자유로운 통과를 촉진하는 세포 막 내의 구멍을 형성한다.

[0336] 예를 들어, VL 영역 및 VH 영역을 제공하기 위한 본원에 기재된 항체는 통상적인 단일클론 항체 방법론, 예를 들어 문헌[Kohler and Milstein, Nature 256: 495 (1975)]의 표준 체세포 하이브리드화 기술을 포함하는 다양한 기술에 의해 생산될 수 있다. 원칙적으로 체세포 하이브리드화 절차가 바람직하지만, 단일클론 항체를 생산하기 위한 다른 기술, 예를 들어 B 림프구의 바이러스 또는 종양발생형 형질전환 또는 항체 유전자의 라이브리리를 이용한 파아지 디스플레이 기술을 사용할 수 있다.

[0337] 단일클론 항체를 분비하는 하이브리도마를 생산하기 위한 바람직한 동물 시스템은 무린 시스템이다. 마우스에서의 하이브리도마 생산은 매우 잘 확립된 절차이다. 융합을 위한 면역화된 비장세포의 단리를 위한 면역화 프로토콜 및 기술은 당업계에 공지되어 있다. 융합 파트너(예를 들어, 무린 골수종 세포) 및 융합 절차도 공지되어 있다.

[0338] 단일클론 항체를 분비하는 하이브리도마를 제조하기 위한 다른 바람직한 동물 시스템은 래트 및 토끼 시스템이다(예를 들어, 문헌[Spieker-Polet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:9348 (1995)]에 기재되어 있으며, 또한 문헌[Rossi et al., Am. J. Clin. Pathol. 124: 295 (2005)]을 참조).

[0339] 또 다른 바람직한 실시형태에서, 인간 단일클론 항체는 마우스 면역계보다는 인간 면역계의 부분을 보유하는 유

전자이식(transgenic) 또는 염색체이식(transchromosomal) 마우스를 이용하여 생성될 수 있다. 이러한 유전자이식 및 염색체이식 마우스는 각각 HuMab 마우스 및 KM 마우스로서 공지된 마우스를 포함하고, "유전자이식 마우스"로서 본원에서 총칭하여 언급된다. 이러한 유전자이식 마우스에서의 인간 항체의 생산은 W02004 035607에서 CD20에 대해 상세히 설명된 바와 같이 수행될 수 있다.

- [0340] 단일클론 항체를 생성하기 위한 또 다른 전략은 규정된 특이성의 항체를 생산하는 림프구로부터 항체를 코딩하는 유전자를 직접 단리하는 것이다. 예를 들어, 문헌[Babcock et al, 1996: A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined strategy]을 참고한다. 재조합 항체 조작의 자세한 내용에 대해서는 문헌[Welschof 및 Kraus, Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN-0-89603-918-8 및 Benny K.C. Lo 항체 Engineering ISBN 1-58829-092-1]을 참고한다.
- [0341] 항체를 생성하기 위해, 기재된 바와 같이 항원 서열, 즉 그에 대해 항체를 지향시키고자 하는 서열로부터 유래된 운반체-접합된 펩티드, 재조합적으로 발현된 항원 또는 이의 단편의 농축된 조제물 및/또는 기재된 항원을 발현하는 세포로 마우스를 면역화할 수 있다. 대안적으로, 마우스를 항원 또는 이의 단편을 코딩하는 DNA로 면역화될 수 있다. 항원의 정제된 또는 농축된 조제물을 이용한 면역화가 항체를 생성하지 않는 경우에, 면역반응을 촉진하기 위해 마우스를 항원을 발현하는 세포, 예를 들어 세포주로 면역화할 수도 있다.
- [0342] 면역반응은 꼬리 정맥 또는 안와후 채혈에 의해 수득되는 혈장 및 혈청 샘플을 이용한 면역화 프로토콜의 과정에 걸쳐 모니터링할 수 있다. 충분한 역가의 면역글로불린을 갖는 마우스가 융합을 위해 이용될 수 있다. 마우스를 희생시켜 비장을 제거하기 3일 전에 항원 발현 세포로 복강내 또는 정맥내 부스트(boost)시켜 특이적 항체 분비 하이브리도마의 비율을 증가시킬 수 있다.
- [0343] 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마를 생성하기 위해, 면역화된 마우스 유래의 비장세포 및 림프절 세포를 단리하고 마우스 골수종 세포주와 같은 적절한 불멸화 세포주에 융합시킬 수 있다. 이어서, 생성된 하이브리도마를 항원 특이적 항체의 생산을 위해 스크리닝할 수 있다. 이어서, 각각의 웰을 항체 분비 하이브리도마에 대해 ELISA에 의해 스크리닝할 수 있다. 항원 발현 세포를 이용하여 면역형광 및 FACS에 의해, 항원에 대한 특이성을 갖는 항체를 동정할 수 있다. 항체 분비 하이브리도마를 재플레이트팅하고 다시 스크리닝할 수 있고, 단일클론 항체에 대해 여전히 양성이라면 제한 희석에 의해 서브클로닝 할 수 있다. 이어서, 안정한 서브클론을 시험관내에서 배양하여 특성규명을 위한 조직 배양 배지 중에서 항체를 생성할 수 있다.
- [0344] 항체는 또한 예를 들어 당업계에서 익히 공지된 재조합 DNA 기술과 유전자 형질감염 방법의 조합을 사용하여 숙주 세포 형질감염종에서 생산할 수 있다(Morrison, S. (1985) Science 229: 1202).
- [0345] 예를 들어, 일 실시형태에서, 관심대상의 유전자(들), 예를 들어 항체 유전자를 WO 87/04462, WO 89/01036 및 EP 338 841에 개시되어 있는 GS 유전자 발현 시스템 또는 당업계에 공지된 다른 발현 시스템에 의해 사용되는 것과 같은 진핵 발현 플라스미드와 같은 발현 벡터에 연결할 수 있다. 클로닝된 항체 유전자를 갖는 정제된 플라스미드를 CHO 세포, NS/O 세포, HEK293T 세포 또는 HEK293 세포와 같은 진핵 숙주 세포 또는 식물 유래의 세포, 진균 또는 효모 세포와 같은 다른 진핵 세포에 도입할 수 있다. 이러한 유전자들을 도입하는 데 사용되는 방법은 전기천공, 리포펙틴, 리포펙타민 또는 기타의 것과 같은 당업계에서 설명된 방법들일 수 있다. 숙주 세포에 이러한 항체 유전자를 도입한 후 항체를 발현하는 세포를 동정하고 선택할 수 있다. 이러한 세포들은 그 발현 수준에 대해 증폭되고 항체를 생산하기 위해 규모확대될 수 있는 형질감염종을 대표한다. 이러한 배양 상청액 및/또는 세포로부터 재조합 항체를 단리 및 정제할 수 있다.
- [0346] 대안적으로, 클로닝된 항체 유전자를 미생물과 같은 원핵 세포, 예를 들어 이. 콜라이(*E.coli*)를 포함하는 다른 발현 시스템에서 발현시킬 수 있다. 또한, 항체는 양 및 토끼의 유즙 또는 암탉의 계란에서와 같은 형질전환 비인간 동물 또는 형질전환 식물에서 생산될 수 있다; 예를 들어, 문헌[Verma, R., et al. (1998) J. Immunol. Meth. 216: 165-181; Pollock, et al. (1999) J. Immunol. Meth. 231: 147-157; 및 Fischer, R., et al. (1999) Biol. Chem. 380: 825-839]을 참고한다.
- [0347] 키메라화
- [0348] 비표지된 마우스 항체는 반복 적용될 경우 인간에서 고도로 면역원성이어서 치료 효과의 감소를 초래한다. 주요 면역원성은 중쇄 불변 영역에 의해 매개된다. 인간에서 무린 항체의 면역원성은 각각의 항체가 키메라화 또는 인간화될 경우 감소되거나 완전히 방지될 수 있다. 키메라 항체는 무린 항체로부터 유래된 가변 영역과 인간 면역글로불린 불변 영역을 갖는 것과 같은, 그의 상이한 부분들이 상이한 동물들로부터 유래되는 항체이다. 항체의 키메라화는 무린 항체 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 인간 중쇄 및 경쇄의 불변 영역과 연결함으로써 달성된다

(예를 들어, 문헌[Kraus et al., in Methods in Molecular Biology series, Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN-0-89603-918-8]에 의해 기재됨). 바람직한 실시형태에서, 키메라 항체는 인간 κ -경쇄 불변 영역을 무린 경쇄 가변 영역에 연결하여 생성한다. 또한 바람직한 실시형태에서, 키메라 항체는 인간 λ 경쇄 불변 영역을 무린 경쇄 가변 영역에 연결하여 생성한다. 키메라 항체의 생성을 위한 바람직한 중쇄 불변 영역은 IgG1, IgG3 및 IgG4이다. 키메라 항체의 생성을 위한 다른 바람직한 중쇄 불변 영역은 IgG2, IgA, IgD 및 IgM이다.

[0349] 인간화

[0350] 항체는 주로 6개의 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역(CDR)에 위치하는 아미노산 잔기를 통해 표적 항원과 상호작용한다. 이러한 이유로, CDR 내의 아미노산 서열들은 CDR 외부의 서열보다 개별 항체 사이에 더 다양하다. CDR 서열이 대부분의 항체-항원간 반응에 관여하기 때문에, 상이한 특성들을 갖는 상이한 항체 유래의 프레임워크 서열에 이식된 특이적 천연 발생 항체 유래의 CDR 서열을 포함하는 발현 벡터를 작제함으로써 특이적 천연 발생 항체의 특성들을 모방하는 재조합 항체를 발현시킬 수 있다(예를 들어, 문헌[Riechmann, L. et al. (1998) Nature 332: 323-327; Jones, P. et al. (1986) Nature 321: 522-525]; 및 문헌[Queen, C. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86: 10029-10033]을 참조). 이러한 프레임워크 서열은 생식계열 항체 유전자 서열을 포함하는 공개된 DNA 데이터베이스로부터 얻을 수 있다. 이러한 생식계열 서열은 B 세포 성숙화 동안 V(D) J 연결에 의해 형성되는 완전히 조립될 수 있는 가변 유전자를 포함하지 않을 것이기 때문에 성숙한 항체 유전자 서열과 상이할 것이다. 생식계열 유전자 서열은 또한 가변 영역에 걸쳐 고르게 분포된 각각의 고친화성 이차 레퍼토리 항체의 서열과도 상이할 것이다.

[0351] 항원에 결합하는 항체 및 다른 결합체의 능력은 표준 결합 분석법(예를 들어, ELISA, 웨스턴 블롯, 면역형광법 및 유세포계측 분석)을 이용하여 결정할 수 있다.

[0352] 항체를 정제하기 위해, 선택된 생산자 세포주를 재조합 항체 정제용 2-리터 스피너-플라스크에서 증식시킬 수 있다. 대안적으로, 항체는 투석 기반 생물반응기에서 생산할 수 있다. 상청액을 정제하고, 필요에 따라 단백질 L-세파로스를 이용한 친화성 크로마토그래피 전에 농축할 수 있다. 용출된 항체를 겔 전기영동 및 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 점검하여 순도를 보장할 수 있다. 완충액을 PBS로 교체할 수 있고, 각각의 흡광 계수를 이용하여 OD280에 의해 농도를 측정할 수 있다. 재조합 항체를 분취하여 -65°C 내지 -80°C에서 저장할 수 있다.

[0353] 항원을 발현하는 살아있는 세포들에의 단일클론 항체들의 결합을 증명하기 위해, 유세포계측법이 사용될 수 있다. 천연적으로 또는 형질감염 후 항원을 발현하는 세포주 및 항원 발현이 결여된 음성 대조군(표준 성장 조건 하에 성장함)을 하이브리도마 상청액 또는 1% FBS 함유 PBS 중의 다양한 농도의 단일클론 항체와 혼합할 수 있고, 4°C에서 30분 동안 항온배양할 수 있다. 세척 후, 형광-표지된 검출 시약(예컨대, 형광 접합된 항 IgG 항체, 항 Fab 항체 또는 단백질-L)을 1차 항체 염색과 동일한 조건 하에 항원-결합된 단일클론 항체에 결합시킬 수 있다. 샘플을 살아있는 단일 세포상에서 개폐하는 측방 광산란(light and side scatter) 특성을 이용한 FACS 기기로 유세포계측법에 의해 분석할 수 있다. 단일 측정에서 비-특이적 결합체를 항원-특이적 단일클론 항체와 구별하기 위해, 공동-형질감염 방법이 이용될 수 있다. 항원을 코딩하는 플라스미드로 일시적으로 형질감염된 세포들 및 형광 마커는 상술한 바와 같이 염색될 수 있다. 형질감염된 세포는 항체-염색된 세포와는 다른 형광 채널에서 검출될 수 있다. 형질감염된 세포의 대부분은 두 이식유전자 모두를 발현하므로, 항원-특이적 단일클론 항체는 형광 마커 발현 세포들에 우선적으로 결합하는 반면, 비특이적 항체는 유사한 비율로 비형질감염된 세포에 결합한다. 유세포계측법 이외에 또는 그 대신에 형광 현미경을 사용하는 대안적인 분석법이 사용될 수 있다. 세포를 상술한 바와 같이 정확하게 염색하고 형광 현미경에 의해 검사할 수 있다.

[0354] 항원을 발현하는 살아있는 세포에의 단일클론 항체의 결합을 증명하기 위해, 면역형광 현미경 분석이 사용될 수 있다. 예를 들어, 자발적으로 또는 형질감염 후에 항원을 발현하는 세포주 및 항원 발현이 결여된 음성 대조군을 10% 소 태아 혈청(FCS), 2 mM L-글루타민, 100 IU/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신이 보충된 DMEM/F12 배지에서 표준 성장 조건 하에 챔버 슬라이드에서 성장시킨다. 그 다음, 세포를 메탄올 또는 파라포름 알데하이드로 고정하거나 미처리한채 방치한다. 이어서, 세포를 30분 동안 25°C에서 그 항원에 대한 단일클론 항체와 반응시킬 수 있다. 세척 후, 세포를 동일 조건 하에 Alexa555 표지된 항-마우스 IgG 2차 항체(Molecular Probes)와 반응시킬 수 있다. 이어서, 세포를 형광 현미경으로 조사할 수 있다.

[0355] 항원을 발현하는 세포 및 적절한 음성 대조군으로부터 세포 추출물을 제조하고 나트륨 도데실 설페이트(SDS) 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동에 적용할 수 있다. 전기영동 후, 분리된 항원을 니트로셀룰로오스 막으로 전이시키고 차단하고 시험될 단일클론 항체로 프로빙한다(probed). 항-마우스 IgG 퍼옥시다아제를 사용하여 IgG 결합

을 검출하고 ECL 기질로 전개시킬 수 있다.

- [0356] 항체는 당업자에게는 익히 공지된 방식으로 면역조직화학에 의해, 예를 들어, 일반 외과 수술 동안 환자로부터 얻은 또는 자발적으로 또는 형질감염 후에 항원을 발현하는 세포주가 접종된 이중 이식된 종양을 보유하는 마우스로부터 얻은 비-암 조직 또는 암 조직 샘플로부터 파라포름알데히드 또는 아세트론 고정된 동결절편 또는 파라핀 포매된 조직 절편을 사용하여 항원과의 반응성을 추가로 시험할 수 있다. 면역염색을 위해, 항원에 대해 반응성인 항체를 항온배양하고 이어서 공급자의 지시에 따라 호스레디쉬-퍼옥시다제 접합된 염소 항-마우스 또는 염소 항-토끼 항체(DAKO)와 함께 항온배양할 수 있다.
- [0357] **전임상 연구**
- [0358] 클라우딘 발현 종양 세포의 성장을 제어하는데 있어 효능을 결정하기 위해, 본원에 기재된 결합제를 생체내 모델(예를 들어, 클라우딘을 발현하는 세포주가 접종된 이중이식된 종양을 보유하는 면역결핍 마우스)에서도 시험할 수 있다.
- [0359] 생체내 연구는 클라우딘 발현 종양 세포를 면역약화된 마우스 또는 다른 동물에 이종이식한 후 본원에 기재된 결합제를 사용하여 실시할 수 있다. 결합제를 종양 비함유 마우스에게 투여한 다음, 종양 세포를 주사하여 종양 또는 종양 관련 증상의 형성을 예방하는 결합제의 효과를 측정할 수 있다. 결합제를 종양 보유 마우스에게 투여하여 종양 성장, 전이 또는 종양 관련 증상을 감소시키는 각각의 결합제의 치료 효능을 결정할 수 있다. 결합제의 적용을 세포증식 억제 약물(cystostatic drug), 성장 인자 억제제, 세포주기 차단제, 혈관신생 억제제 또는 항체로서 다른 물질의 적용과 조합하여, 조합의 시너지 효과 및 잠재적 독성을 결정할 수 있다. 결합제에 의해 매개되는 독성 부작용을 분석하기 위해 동물에게 결합제 또는 대조 시약을 접종하고 클라우딘-결합제 요법과 관련된 가능한 증상에 대해 충분히 조사할 수 있다.
- [0360] 항체에 의해 인식되는 에피토프의 맵핑은 문헌["Epitope Mapping Protocols (Methods in Molecular Biology) by Glenn E. Morris ISBN-089603-375-9] 및 문헌["Epitope Mapping: A Practical Approach" Practical Approach Series, 248 by ISBN-089603-375-9] 및 문헌["Epitope Mapping: A Practical Approach" Practical Approach Series, 248 by Olwyn M. R. Westwood, Frank C. Hay]에 상세히 설명된 바와 같이 실시할 수 있다.
- [0361] 본원에 기재된 화합물 및 제제는 임의의 적합한 약학 조성물의 형태로 투여될 수 있다.
- [0362] 본 발명의 약학 조성물은 바람직하게는 멸균되고 목적하는 반응 또는 목적하는 효과를 발생하기 위해 본원에 기재된 결합제 및 임의로 본원에서 논의되는 추가의 제제의 유효량을 함유한다.
- [0363] 약학 조성물은 일반적으로 균일한 투여 형태로 제공되며 공지된 방식으로 제조될 수 있다. 약학 조성물은 예를 들어 용액 또는 현탁액의 형태일 수 있다.
- [0364] 약학 조성물은 염, 완충 물질, 방부제, 담체, 희석제 및/또는 부형제를 포함할 수 있고, 이들 모두는 바람직하게는 약학적으로 허용된다. "약학적으로 허용되는"이란 용어는 약학 조성물의 활성 성분의 작용과 상호작용하지 않는 물질의 무독성을 의미한다.
- [0365] 약학적으로 허용되지 않는 염은 약학적으로 허용되는 염을 제조하는 데 사용될 수 있으며 본 발명에 포함된다. 이러한 종류의 약학적으로 허용되는 염은 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산, 말레산, 아세트산, 살리실산, 시트르산, 포름산, 말론산, 석신산 등의 산으로부터 제조된 것들을 비제한적으로 포함한다. 약학적으로 허용되는 염은 또한 나트륨염, 칼륨염 또는 칼슘염과 같은 알칼리 금속 염 또는 알칼리 토금속 염으로서 제조될 수 있다.
- [0366] 약학 조성물에서 사용하기에 적합한 완충 물질은 염의 아세트산, 염의 시트르산, 염의 붕산 및 염의 인산을 포함한다.
- [0367] 약학 조성물에서 사용하기에 적합한 방부제는 염화벤잘코늄, 클로로부탄올, 파라벤 및 티메로살을 포함한다.
- [0368] 주사 가능한 제형은 링거 락테이트(Ringer Lactate)와 같은 약학적으로 허용되는 부형제를 포함할 수 있다.
- [0369] "담체"란 용어는 적용을 촉진, 증진 또는 적용 가능하게 하기 위해 그 안에 활성 성분이 조합되는 천연 또는 합성 성질의 유기 또는 무기 성분을 지칭한다. 본 발명에 따라, "담체"란 용어는 또한 환자에게 투여하기에 적합한 하나 이상의 양립가능한 고체 또는 액체 충전제, 희석제 또는 캡슐화 물질을 포함한다.
- [0370] 비경구 투여용으로 가능한 담체 물질은 예를 들어, 멸균수, 링거, 링거 락테이트, 멸균 염화나트륨 용액, 폴리

알킬렌 글리콜, 수소화 나프탈렌 및 특히 생체적합성 락티드 중합체, 락티드/글리콜리드 공중합체 또는 폴리옥시에틸렌/폴리옥시프로필렌 공중합체를 포함한다.

- [0371] 본원에서 사용되는 "부형제"란 용어는 약학 조성물에 존재할 수 있고 예를 들어 담체, 결합제, 윤활제, 증점제, 표면활성제, 방부제, 유화제, 완충제, 향미제 또는 착색제와 같은, 활성 성분이 아닌 모든 물질을 나타내는 것으로 의도된다.
- [0372] 본원에 기재된 제제 및 조성물은 주사 또는 주입에 의한 것을 포함하는 경구 투여에 의한 것과 같은 임의의 통상적인 경로를 통해 투여될 수 있다. 투여는 바람직하게는 비경구, 예를 들어, 정맥내, 동맥내, 피하, 피내 또는 근육내로 투여될 수 있다.
- [0373] 비경구 투여에 적합한 조성물은 일반적으로 활성 화합물의 멸균 수성 또는 비수성 조제물을 포함하며, 이는 바람직하게는 수용자의 혈액과 등장성이다. 양립가능한 담체 및 용매의 예는 링거액 및 등장성 염화나트륨 용액이다. 또한, 일반적으로 멸균된 고정유가 용액 또는 현탁 매질로서 사용된다.
- [0374] 본원에 기재된 제제 및 조성물은 유효량으로 투여된다. "유효량"은 목적하는 반응 또는 목적하는 효과를 단독으로 또는 추가 투여량과 함께 달성하는 양을 지칭한다. 특정 질환 또는 특정 병태를 치료하는 경우에, 목적하는 반응은 바람직하게는 상기 질환의 경과의 억제에 관한 것이다. 이는 질환의 진행을 늦추고, 특히 질환의 진행을 방해하거나 역전시키는 것을 포함한다. 질환 또는 병태의 치료에서 목적하는 반응은 또한 상기 질환 또는 상기 병태의 개시의 지연 또는 개시의 예방일 수 있다.
- [0375] 본원에 기재된 제제 또는 조성물의 유효량은 치료될 병태, 질환의 중증도, 연령, 생리적 상태, 신장 및 체중, 치료 기간, 동반 요법의 종류(있는 경우), 특정 투여 경로 및 유사한 인자들을 포함하는 환자의 개별 매개변수에 따라 달라질 것이다. 따라서, 본원에 기재된 제제의 투여 용량은 이러한 매개변수의 다양성에 의해 좌우될 수 있다. 환자에서의 반응이 초기 용량으로 불충분한 경우에는, 보다 많은 용량(또는 보다 국소화된 상이한 투여 경로에 의해 달성되는 효과적으로 더 높은 용량)이 사용될 수 있다.
- [0376] 본원에 기재된 제제 및 조성물은 본원에 기재된 것과 같은 다양한 장애를 치료 또는 예방하기 위해 환자에게, 예를 들어, 생체내 투여될 수 있다. 바람직한 환자는 본원에 기재된 제제 및 조성물을 투여함으로써 교정되거나 개선될 수 있는 장애를 갖는 인간 환자를 포함한다. 이는 CLDN18.2 및/또는 CLDN6과 같은 클라우딘의 변경된 발현 패턴을 특징으로 하는 세포를 수반하는 장애를 포함한다.
- [0377] 예를 들어, 일 실시형태에서, 본원에 기재된 제제는 암 질환, 예를 들어 클라우딘을 발현하는 암 세포의 존재를 특징으로 하는 본원에 기재된 암 질환을 갖는 환자를 치료하기 위해 사용될 수 있다.
- [0378] 본 발명에 따라 설명되는 약학 조성물 및 치료 방법은 또한 본원에 기재된 질환을 예방하기 위한 면역화 또는 백신접종을 위해 사용될 수 있다.
- [0379] 본 발명의 약학 조성물은 하나 이상의 어쥬번트와 같은 면역-증강 물질을 보충하면서 투여될 수 있으며, 그 효율성을 더욱 증가시키기 위해, 바람직하게는 면역자극의 상승 효과를 달성하기 위해, 하나 이상의 면역-증강 물질을 포함할 수 있다. "어쥬번트"란 용어는 면역반응을 연장하거나 증강시키거나 가속화시키는 화합물에 관한 것이다. 이와 관련하여, 어쥬번트의 다양한 유형에 따라, 다양한 메커니즘이 가능하다. 예를 들어, DC의 성숙을 가능하게 하는 화합물, 예를 들어 지질다당류 또는 CD40 리간드는 적절한 어쥬번트의 제1 부류를 형성한다. 일반적으로, "위험 신호"(LPS, GP96, dsRNA 등) 또는 GM-CSF와 같은 사이토킨 유형의 면역계에 영향을 미치는 임의의 제제를 제어된 방식으로 면역반응을 강화시키고/시킴거나 영향 미칠 수 있는 어쥬번트로서 사용할 수 있다. 또한, 이러한 맥락에서 CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드가 임의로 사용될 수 있지만, 상기 설명한 바와 같이 특정 상황 하에 발생하는 부작용이 고려되어야 한다. 특히 바람직한 어쥬번트는 모노킨, 림포킨, 인터류킨 또는 케모킨과 같은 사이토킨, 예를 들어 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IFN α , IFN γ , GM-CSF, LT- α 또는 성장 인자, 예를 들어 hGH이다. 추가의 공지된 어쥬번트는 수산화알루미늄, 프로인트(Freund) 어쥬번트 또는 Montanide®, 가장 바람직하게는 Montanide® ISA51과 같은 오일이다. Pam3Cys와 같은 지질펩티드도 본 발명의 약학 조성물에서 어쥬번트로서 사용하기에 적합하다.
- [0380] 본원에서 제공되는 제제 및 조성물은 단독으로 또는 수술, 방사선조사, 화학요법 및/또는 골수 이식(자가, 동계, 동종이계 또는 비관련)과 같은 통상적인 치료 방식과 조합하여 사용될 수 있다.
- [0381] 암 치료는 병용 전략이 특히 바람직한 분야를 대표하며, 이는 종종 2가지, 3가지, 4가지 또는 그 이상의 암 약물/요법의 조합된 작용이 단독치료 방법의 영향보다 상당히 강력한 시너지 효과를 발생시키기 때문이다.

따라서, 본 발명의 다른 실시형태에서, 본 발명의 방법 및 약학 조성물과 같은 면역- 또는 백신접종-기반 기전을 이용하는 암 치료는 유사한 또는 다른 특이적 기전을 표적으로 하는 다양한 다른 약물 및/또는 방법과 효과적으로 병용될 수 있다. 특히, 이들은 예를 들어, 통상적인 종양 요법, 다중-에피토프 요법, 추가적인 면역요법 및 혈관신생 또는 아폽토시스를 표적으로 하는 치료 방법과 병용될 수 있다(검토를 위해, 예를 들어 문헌 [Andersen et al. 2008: Cancer treatment: the combination of vaccination with other therapies. Cancer Immunology Immunotherapy, 57(11): 1735-1743]을 참조). 상이한 제제들의 순차적 투여는 상이한 체크 포인트에서 암 세포 성장을 억제할 수 있는 반면, 다른 제제들은 예를 들어 신혈관형성, 악성 세포의 생존 또는 전이를 억제하여, 잠재적으로 암을 만성 질환으로 전환시킬 수 있다. 다음 목록은 본 발명과 함께 사용될 수 있는 항암 약물 및 요법의 일부 비제한적 예를 제공한다:

[0382]

1. 화학요법

[0383]

화학요법은 여러 종류의 암에 대한 관리 표준이다. 가장 일반적인 화학요법제는 암 세포의 주요 특성 중 하나인 급속히 분열하는 세포들을 사멸시킴으로써 작용한다. 따라서, 예를 들어 알킬화제, 항대사물질, 안트라사이클린, 식물 알칼로이드, 토포이소머라제 억제제 및 세포 분열 또는 DNA 합성에 영향을 미치는 기타 항종양제와 같은 통상적인 화학치료 약물과의 병용은 억제자 세포들을 제거하거나, 면역계를 재시작하거나, 종양 세포를 면역 매개 사멸에 대해 보다 감수성이 되게 하거나, 면역계의 세포의 추가적인 활성화에 의해 본 발명의 치료 효과를 현저하게 향상시킬 수 있다. 화학치료 약물과 백신접종-기반 면역치료 약물의 시너지 항암 작용은 다수의 연구를 통해 입증되었다(예를 들어, 문헌[Quoix et al. 2011: Therapeutic vaccination with TG4010 and first-line chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a controlled phase 2B trial. Lancet Oncol. 12(12): 1125-33]을 참조; 또한 문헌[Liseth et al. 2010: Combination of intensive chemotherapy and anticancer vaccines in the treatment of human malignancies: the hematological experience. J Biomed Biotechnol. 2010: 6920979]을 참조; 또한 문헌[Hirooka et al 2009: A combination therapy of gemcitabine with immunotherapy for patients with inoperable locally advanced pancreatic cancer. Pancreas 38(3): e69-74]을 참조). 병용 요법에 기본적으로 적합한 이용 가능한 수백가지의 화학치료 약물이 존재한다. 본 발명과 병용될 수 있는 화학치료 약물의 일부 (비제한적) 예에는 카르보플라틴(파라플라틴), 시스플라틴(플라티놀, 플라티놀-AQ), 사이클로포스파미드(시톡산, 네오사르), 도세탁셀(탁소테레), 독소루비신(아드리아마이신), 에를로티닙(타르세바), 에토포시드(베페시드), 플루오로우라실(5-FU), 겐시타빈(겔자), 이마티닙 메실레이트(글리벡), 이리노테칸(캄토사르), 메토티렉세이트(폴렉스, 맥세이트, 아메토프테린), 파클리탁셀(탁술, 아브락산), 소라피닙(넥사바), 수니티닙(수텐트), 토포테칸(하이캄틴), 빈크리스틴(온코빈, 빈카사르 PFS) 및 빈블라스틴(벨반)이 있다.

[0384]

2. 수술

[0385]

암 수술 - 종양을 제거하는 수술 - 은 여전히 암 치료의 근간이 된다. 수술은 어떠한 잔류하는 종양 세포라도 제거하기 위해 다른 암 치료법과 병용될 수 있다. 수술 방법과 후속적인 면역치료 처치의 병용은 수없이 많이 입증된 유망한 접근법이다.

[0386]

3. 방사선

[0387]

방사선 요법은 여전히 암 치료의 중요한 요소이며, 모든 암 환자의 대략 50%가 그들의 투병 기간 동안 방사선 요법을 받는다. 방사선 요법의 주 목적은 암 세포로부터 그의 증식(세포 분열) 잠재성을 제거하는 것이다. 암 치료에 사용되는 방사선의 종류에는 광자 방사선(x-선 및 γ -선) 및 입자 방사선(전자, 양성자 및 중성자 빔)이 있다. 암 부위로 방사선을 전달하기 위한 2가지 방법이 있다. 외부 빔 방사선은 고에너지 선(광자, 양성자 또는 입자 방사선)을 종양 위치로 조준함으로써 신체 외부에서 전달된다. 내부 방사선 또는 근접치료는 카테터 또는 시드(seed)에 밀봉된 방사성 선원에 의해 신체 내부로부터 직접 종양 부위로 전달된다. 본 발명과 함께 적용 가능한 방사선 요법 기술은 예를 들어 분할(분할된 용법으로 전달되는 방사선 요법, 예를 들어, 수주에 걸쳐서 1.5 내지 3 Gy의 분할 선량을 매일 조사), 3D 원체 방사선요법(3DCRT; 방사선을 육안적 종양 체적으로 전달); 강도 조정 방사선 요법(IMRT; 다수의 방사선 빔의 컴퓨터 제어된 강도 조정), 영상 유도 방사선 요법(IGRT; 보정이 허용되는 방사선 요법 전의 영상화를 포함하는 기술) 및 체부 정위 방사선 요법(SRBT, 매우 높은 개별 선량의 방사선을 단지 몇 번의 분할된 처리에 걸쳐서 전달함)이다. 방사선 요법 검토에 대해서는 문헌[Baskar et al. 2012: Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. Int. J Med Sci. 9(3): 193-199]을 참조한다.

[0388]

4. 항체

[0389]

항체(바람직하게는 단일클론 항체)는 다양한 기전을 통해 암 세포들에 대한 치료 효과를 성취한다. 이들은 아포토시스 또는 프로그램된 세포 사멸을 발생하는데 있어 직접적인 효과를 갖는다. 이들은 예를 들어 성장인자 수용체와 같은 신호전달 경로의 성분들을 차단하여 종양 세포의 증식을 효과적으로 정지시킬 수 있다. 단일클론 항체를 발현하는 세포에서, 이들은 항이디오타입 항체 형성을 야기할 수 있다. 간접 효과에는 단핵구 및 대식구와 같은 세포독성을 갖는 세포들을 동원(recruiting)하는 것이 포함된다. 이러한 유형의 항체-매개 세포 사멸은 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC)이라 불린다. 항체는 또한 보체에 결합하여, 보체 의존성 세포독성(CDC)으로서 공지된 직접적인 세포독성을 유도한다. 외과적 방법을 면역치료 약물 또는 방법과 조합하는 것은 예를 들어 문헌[Gadri et al. 2009: Synergistic effect of dendritic cell vaccination and anti-CD20 antibody treatment in the therapy of murine lymphoma. J Immunother. 32(4): 333-40]에서 입증된 바와 같이 성공적인 접근법이다. 다음의 목록은 본 발명과 함께 사용될 수 있는 항암 항체 및 잠재적인 항체 표적(관호)의 일부 비제한적 예를 제공한다: 아바그마프(CA-125), 아브식시마프(CD41), 아베카투무마프(EpCAM), 아푸투주마프(CD20), 알라시주마프 페글(VEGFR2), 알투모마 펜테테이트(CEA), 아마톡시마프(MORAb-009), 아나투모마 마페나톡스(TAG-72), 아폴리주마프(HLA-DR), 아르시투모마프(CEA), 바비톡시마프(포스포티딜세린), 벡투모마프(CD22), 벨리무마프(BAFF), 베바시주마프(VEGF-A), 비바투주마프 메르탄신(CD44 v6), 블리나투모마프(CD19), 브렌톡시마프 베도틴(CD30 TNFRSF8), 칸투주마프 메르탄신(뮤신 CanAg), 칸투주마프 라브탄신(MUC1), 카프로마 펜테타이드(전립선 암종 세포들), 칼루마프(CNT0888), 카투막소마프(EpCAM, CD3), 세톡시마프(EGFR), 시타투주마프 보가톡스(EpCAM), 식수투무마프(IGF-1 수용체), 클라우딕시마프(클라우딘), 클리바투주마프 테트라세탄(MUC1), 코나투무마프(TRAIL-R2), 다세투주마프(CD40), 달로투주마프(인슐린-유사 성장인자 I 수용체), 데노수마프(RANKL), 데투모마프(B-림프종 세포), 드로지투마프(DR5), 에크로멕시마프(GD3 강글리오사이드), 에드레콜로마프(EpCAM), 엘로투주마프(SLAMF7), 에나바투주마프(PDL192), 엔시톡시마프(NPC-1C), 에프라투주마프(CD22), 에르투막소마프(HER2/neu, CD3), 에드라시주마프(인테그린 $\alpha v \beta 3$), 팔레투주마프(폴레이트 수용체 1), FBT05(CD20), 피클라투주마프(SCH 900105), 피지투무마프(IGF-1 수용체), 플란보투마프(당단백질 75), 프레솔리무마프(TGF- β), 갈릭시마프(CD80), 가니투마프(IGF-I), 겐투주마프 오조가미신(CD33), 게보키주마프(IL-1 β), 기렌톡시마프(탄산탈수효소 9(CA-IX)), 글렘바투무마프 베도틴(GPNMB), 이브리투모마프 티옥세탄(CD20), 이크루쿠마프(VEGFR-1), 이고보마(CA-125), 인다톡시마프 라브탄신(SDC1), 인테투무마프(CD51), 이노투주마프 오조가미신(CD22), 이필리무마프(CD152), 이라투무마프(CD30), 라베투주마프(CEA), 렉사투무마프(TRAIL-R2), 리비비루마프(B형 표면 항원), 린투주마프(CD33), 로보투주마프 메르탄신(CD56), 루카투무마프(CD40), 루밀릭시마프(CD23), 마파투무마프(TRAIL-R1), 마투주마프(EGFR), 메폴리주마프(IL-5), 밀라투주마프(CD74), 미투모마프(GD3 강글리오사이드), 모가물리주마프(CCR4), 목세투모마프 파수도톡스(CD22), 나콜로마프 타페나톡스(C242 항원), 남투모마프 에스타페나톡스(5T4), 나르나투마프(RON), 네시투무마프(EGFR), 니모투주마프(EGFR), 니볼루마프(IgG4), 오파투무마프(CD20), 올라라투마프(PDGF-R 알파), 오나르투주마프(인간 스캐터 인자 수용체 키나제), 오포르투주마프 모나톡스(EpCAM), 오레고보마프(CA-125), 옥셀루마프(OX-40), 파니투무마프(EGFR), 파트리투마프(HER3), 펠투모마(MUC1), 페르투주마프(HER2/neu), 핀투모마프(선암 항원), 프리투무마프(비멘틴), 라코투모마프(N-글리코실 뉴라민산), 라드레투마프(피브로넥틴 엑스트라 도메인-B), 라피비루마프(라비에스 바이러스 당단백질), 라무시루마프(VEGFR2), 릴로투무마프(HGF), 리톡시마프(CD20), 로바투무마프(IGF-1 수용체), 사말리주마프(CD200), 시브로투주마프(FAP), 실톡시마프(IL-6), 타발루마프(BAFF), 타카투주마프 테트라세탄(알파-태아단백질), 타폴리투모마프 캄톡스(CD19), 테나투모마프(테나신 C), 테프로투무마프(CD221), 티실리무마프(CTLA-4), 티가투주마프(TRAIL-R2), TNX-650(IL-13), 토시투모마프(CD20), 트라스투주마프(HER2/neu), TRBS07(GD2), 트레멜리무마프(CTLA-4), 투모투주마프 셀모류킨(EpCAM), 유블리톡시마프(MS4A1), 유렐루마프(4-1BB), 볼로식시마프(인테그린 알파5 β 1), 보투무마프(종양 항원 CTA16.88), 잘루투무마프(EGFR), 자눌리루마프(CD4).

[0390]

5. 사이토킨, 케모킨, 공자극 분자, 융합 단백질

[0391]

유익한 면역조절 또는 종양 억제 효과를 일으키기 위해 본 발명의 항원-코딩 약학 조성물과 사이토킨, 케모킨, 공자극 분자 및/또는 융합 단백질을 병용 용법은 본 발명의 또 다른 실시형태이다. 면역 세포의 종양 내로의 침윤을 증가시키고 항원-제시 세포의 종양-배출 림프절(tumor-draining lymph node)로의 이동을 용이하게 하기 위해, C, CC, CXC 및 CX3C 구조를 갖는 다양한 케모킨이 이용될 수 있다. 가장 유망한 케모킨의 일부는 예를 들어 CCR7 및 그의 리간드 CCL19 및 CCL21, 또한 CCL2, CCL3, CCL5 및 CCL16이다. 다른 예는 CXCR4, CXCR7 및 CXCL12이다. 또한, 예를 들어 B7 리간드(B7.1 및 B7.2)와 같은 공자극 또는 조절 분자가 유용하다. 예를 들어 인터류킨, 특히(예를 들어, IL-1 내지 IL17), 인터페론(예를 들어, IFN알파1 내지 IFN알파8, IFN알파10, IFN알파13, IFN알파14, IFN알파16, IFN알파17, IFN알파21, IFN베타1, IFNW, IFNE1 및 IFNK)와 같은 다른 사이토킨, 조절 인자, TGF(예를 들어, TGF-알파, TGF- β , 및 TGF 패밀리의 기타 구성원), 마지막으로 수용체의 종양괴사인자 패밀리 구성원 및 이들의 리간드뿐만 아니라, 4-1BB, 4-1BB-L, CD137, CD137L, CTLA-4GITR, GITRL, Fas, Fas-L, TNFR1, TRAIL-R1, TRAIL-R2, p75NGF-R, DR6, LT. β .R, RANK, EDAR1, XEDAR, Fn114, Troy/Trade, TAJ,

TNFR1, HVEM, CD27, CD30, CD40, 4-1BB, OX40, GITR, GITRL, TACI, BAFF-R, BCMA, RELT, 및 CD95(Fas/APO-1), 당질코르티코이드-유도성 TNFR-관련 단백질, TNF 수용체-관련 아폴토시스-매개 단백질(TRAMP) 및 사멸 수용체-6(DR6)를 포함하나 이에 한정되지 않는 다른 자극 분자도 유용하다. 특히 CD40/CD40L 및 OX40/OX40L은 T 세포 생존 및 증식에 대한 이들의 직접적인 영향으로 인해 병용 면역요법에서 중요한 표적이 된다. 검토를 위해 문헌[Lechner et al. 2011: Chemokines, costimulatory molecules and fusion proteins for the immunotherapy of solid tumors. Immunotherapy 3 (11), 1317-1340]을 참조한다.

[0392] 6. 세균 치료

[0393] 연구자들은 클로스트리듐 노비이(*Clostridium novyi*)와 같은 혐기성 세균을 사용하여 저산소 종양의 내부를 소비시켰다. 이러한 세균들은 종양의 산소화된 측면과 접촉할 때 사멸하는데, 이는 이러한 세균들이 신체의 나머지 부분에 무해하다는 것을 의미한다. 다른 전략은 비독성 프로드럭을 독성 약물로 전환시킬 수 있는 효소로 형질전환된 혐기성 세균을 이용하는 것이다. 종양의 괴사 및 저산소 영역에서 세균이 증식함에 따라, 이 효소는 종양에서만 발현된다. 따라서, 전신에 적용된 프로드럭은 종양에서만 독성 약물로 대사된다. 이것은 비병원성 혐기성 미생물인 클로스트리듐 스포로제네스(*Clostridium sporogene*)를 이용할 때 효과적인 것으로 입증되었다.

[0394] 7. 키나제 억제제

[0395] 암 세포의 성장과 생존이 키나제 활성의 조절해제와 밀접히 연관되기 때문에, 보완적인 암 요법을 위한 잠재적인 표적의 다른 큰 그룹은 키나제 억제제이다. 정상적인 키나제 활성을 회복시켜 종양 성장을 감소시키기 위해 광범위한 억제제가 사용되고 있다. 표적이 되는 키나제 그룹은 수용체 티로신 키나제, 예를 들어 BCR-ABL, B-Raf, EGFR, HER-2/ErbB2, IGF-1R, PDGFR-알파, PDGFR-β, c-Kit, Flt-4, Flt3, FGFR1, FGFR3, FGFR4, CSF1R, c-Met, RON, c-Ret, ALK, 세포질 티로신 키나제, 예를 들어 c-SRC, c-YES, Abl, JAK-2, 세린/트레오닌 키나제, 예를 들어 ATM, 오로라(Aurora) A & B, CDK, mTOR, PKC, PLK, b-Raf, S6K, STK11/LKB1 및 지질 키나제, 예를 들어 PI3K, SK1을 포함한다. 소분자 키나제 억제제는 예를 들어 PHA-739358, 닐로티닙, 다사티닙 및 PD166326, NSC 743411, 라파티닙(GW-572016), 카네르티닙(CI-1033), 세막시닙(SU5416), 바탈라닙(PTK787/ZK222584), 수텐트(SU11248), 소라페닙(BAY 43-9006) 및 레플루노마이드(SU101)이다. 보다 자세한 정보에 대해서는 예를 들어 문헌[Zhang et al. 2009: Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. Nature Reviews Cancer 9, 28-39]을 참조한다.

[0396] 8. Toll-유사 수용체

[0397] Toll-유사 수용체(TLRs) 패밀리의 구성원은 선천성 면역과 후천성 면역 간의 중요한 연결고리이며 많은 어쥬번트의 효과는 TLR의 활성화에 달려있다. 암에 대하여 확립된 다수의 백신은 백신 반응을 강화하기 위해 TLR에 대한 리간드를 포함한다. TLR2 외에, TLR3, TLR4 특히 TLR7 및 TLR8이 수동 면역요법 방법에서 암 요법용으로 조사되었다. 밀접하게 관련된 TLR7 및 TLR8은 면역 세포, 종양 세포, 및 종양의 미세환경에 영향을 미침으로써 항종양 반응에 기여하고 뉴클레오타이드 유사체 구조에 의해 활성화될 수 있다. 모든 TLR은 단독형 면역치료제로서 또는 암 백신 어쥬번트로서 사용되어 왔으며 본 발명의 제형 및 방법과 상승작용적으로 조합될 수 있다. 보다 자세한 정보에 대해서는 문헌[van Duin et al. 2005: Triggering TLR signaling in vaccination. Trends in Immunology, 27(1):49-55]을 참조한다.

[0398] 9. 혈관신생 억제제

[0399] 종양-매개 탈출 기전 및 면역 억제에 의해 영향을 받는 면역조절 수용체를 표적으로 하는 요법 이외에도, 종양 환경을 표적으로 하는 요법이 있다. 혈관신생 억제제는 종양이 성장하는데 필요한 혈관의 과도한 성장(혈관신생)을 예방한다. 예를 들어 종양 세포의 증가하는 영양분 및 산소 요구성을 만족시키기 위해 종양 세포에 의해 촉진되는 혈관신생은 상이한 분자들을 표적화함으로써 차단될 수 있다. 본 발명과 조합될 수 있는 혈관신생-매개 분자 또는 혈관신생 억제제의 비제한적인 예는 가용성 VEGF(VEGF 동형 VEGF121 및 VEGF165, 수용체 VEGFR1, VEGFR2 및 공유수용체 뉴로필린-1 및 뉴로필린-2) 1 및 NRP-1, 안지오프로테틴 2, TSP-1 및 TSP-2, 안지오프로테틴 및 관련 분자, 엔도스타틴, 바소스타틴, 칼레티쿨린, 혈소판 인자-4, TIMP 및 CDAI, Meth-1 및 Meth-2, IFN-알파, -β 및 -γ, CXCL10, IL-4, -12 및 -18, 프로트롬빈(크리글 도메인-2), 항트롬빈 III 단편, 프로락틴, VEGI, SPARC, 오스테오펀틴, 마스핀, 칸스타틴, 프롤리페린-관련 단백질, 레스틴 및 약물, 예를 들어 베바시주맙, 이트라코나졸, 카르복시아미도트리아졸, TNF-470, CM101, IFN-알파, 혈소판 인자-4, 수라민, SU5416, 트롬보스폰틴, VEGFR 길항제, 혈관신생억제(angiostatic) 스테로이드 + 헤파린, 연골-유래의 혈관신생 억제성 인자, 매트릭스 메탈로프로테이나제 억제제, 2-메톡시에스트라디올, 테코갈란, 테트라티오몰리브데이트,

탈리도마이드, 트롬보스폰딘, 프롤락틴 Vβ3 억제제, 리노마이드, 타스퀴니모드이다. 검토를 위해 예를 들어 문헌[Schoenfeld and Dranoff 2011: Anti-angiogenesis immunotherapy. Hum Vaccin. (9):976-81]을 참조한다.

[0400] 10. 소분자 표적화 요법 약물

[0401] 소분자 표적화 요법 약물은 일반적으로 암 세포 내의 돌연변이된, 과발현된 또는 그 밖의 중요한 단백질의 효소 도메인의 억제제이다. 중요한 비제한적인 예는 티로신 키나제 억제제 이마티닙(글리벡(Gleevec/Glivec)) 및 게 피티닙(이레사)이다. 암 요법을 위한 백신과 조합된, 일부 키나제를 표적으로 하는 소분자, 예를 들어 수니티닙 말레이트 및/또는 소라페닙 토실레이트의 사용도 또한 이전의 특허출원 US2009004213에 설명되어 있다.

[0402] 11. 바이러스-기반 백신

[0403] 조합된 치료 접근법에서 본 발명의 제형과 함께 사용될 수 있는 현재 입수가가능하거나 개발 중인 다수의 바이러스-기반 암 백신이 있다. 이러한 바이러스 벡터 사용시의 한 가지 장점은 면역 활성화를 위해 필요한 위험 신호를 발생시키는 바이러스 감염의 결과로서 일어나는 염증 반응과 동시에 면역 반응을 개시하는 이들의 고유한 능력이다. 이상적인 바이러스 벡터는 안전해야 하고 항종양 특이적인 반응을 증강시킬 수 있도록 항벡터 면역반응을 도입하지 않아야 한다. 백시니아 바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 레트로바이러스 및 아비폭스 바이러스와 같은 재조합 바이러스는 동물 종양 모델에서 사용되어 왔으며 이들의 고무적인 결과에 기초하여, 인간 임상 시험이 시작되었다. 특히 중요한 바이러스-기반 백신은 바이러스의 외피 유래의 특정의 단백질을 함유하는 소형 입자인 바이러스-유사 입자(VLP)이다. 바이러스-유사 입자는 바이러스 유래의 어떠한 유전 물질도 함유하지 않으며 감염을 유발하지 못하지만 그들의 외피상에 종양 항원들을 제시하도록 작제될 수 있다. VLP는 예를 들어 B형 간염 바이러스, 또는 파코바이러스 과(예를 들어, 아데노-관련 바이러스), 레트로바이러스 과(예를 들어, HIV) 및 플라비바이러스 과(예를 들어, C형 간염 바이러스)를 포함하는 다른 바이러스 과와 같은 다양한 바이러스로부터 유래할 수 있다. 전반적인 검토를 위해 문헌[Sorensen and Thompsen 2007: Virus-based immunotherapy of cancer: what do we know and where are we going? APMIS 115(11):1177-93; virus-like particles against cancer are reviewed in Buonaguro et al. 2011: Developments in virus-like particle-based vaccines for infectious diseases and cancer. Expert Rev Vaccines 10(11):1569-83; and in Guillou et al. 2010: Virus-like particles as vaccine antigens and adjuvants: application to chronic disease, cancer immunotherapy and infectious disease preventive strategies. Procedia in Vaccinology 2 (2), 128-133]을 참조한다.

[0404] 12. 다중- 에피토프 전략

[0405] 다중 에피토프의 사용은 백신접종을 위한 유망한 결과를 보여준다. 지능적 알고리즘 시스템과 조합된 패스트 시퀀싱 기술은 종양 뮤타놈(mutanome)을 이용할 수 있게 하고 본 발명과 조합될 수 있는 개별화된 백신에 대한 다중 에피토프를 제공할 수 있다. 보다 자세한 정보에 대해서는 문헌[2007: Vaccination of metastatic colorectal cancer patients with matured dendritic cells loaded with multiple major histocompatibility complex class I peptides. J Immunother 30: 762-772; furthermore Castle et al. 2012: Exploiting the mutanome for tumor vaccination. Cancer Res 72 (5):1081-91]을 참조한다.

[0406] 13. 양자 T 세포 전달

[0407] 예를 들어, 종양 항원 백신접종과 T 세포 전달의 조합은 다음 문헌에 설명되어 있다: Rapoport et al. 2011: Combination immunotherapy using adoptive T-cell transfer and tumor antigen vaccination on the basis of hTERT and survivin after ASCT for myeloma. Blood 117(3):788-97.

[0408] 14. 펩티드-기반 표적 요법

[0409] 펩티드는 세포 표면 수용체 또는 종양을 둘러싼 영향을 받은 세포의 매트릭스에 결합할 수 있다. 이러한 펩티드(예를 들어, RGD)에 부착된 방사성핵종은 이러한 방사성핵종이 암 세포 근방에서 붕괴할 경우 결국에는 그 암 세포를 사멸시킨다. 특히 이러한 결합 모티프의 올리고머 또는 다량체는 매우 흥미로운데, 그 이유는 이것이 증진된 종양 특이성 및 결합력을 유도할 수 있기 때문이다. 비제한적 예에 대해서는 문헌[Yamada 2011: Peptide-based cancer vaccine therapy for prostate cancer, bladder cancer, and malignant glioma. Nihon Rinsho 69(9): 1657-61]을 참조한다.

[0410] 15. 기타 요법

[0411] 시너지 효과를 창출하기 위해 본 발명의 제형 및 방법과 조합될 수 있는 수많은 기타 암 요법이 있다. 비제한적

예에는 아포토시스를 표적으로 하는 치료, 온열요법, 호르몬 요법, 텔로머라제 요법, 인슐린 강화 치료법, 유전자 요법 및 광역학 요법이 있다.

[0412] 본 발명은 본 발명의 범위를 한정하는 것으로 해석되지 않는 하기 실시예에 의해 추가로 설명된다.

[0413] 실시예

[0414] 실시예 1: CLDN6 및 CD3를 표적으로 하는 이중특이적 항체 유도체의 생성, 정제 및 분석(CLDN6 x CD3)

[0415] a. 서열 기원, bstb 작제물의 설계 및 발현 벡터로의 클로닝

[0416] 이중특이적 키메라 TriMAB(bstb) 작제물을 불변 영역의 C 말단에 2개의 단일쇄 가변 단편(scFv)을 갖는 항원 결합 단편(Fab)으로서 설계하였다. Fab 결합 도메인은 인간 T 세포 수용체 성분 CD3에 특이적이다. 항-CD3 가변 중쇄 영역(V_H) 및 대응하는 가변 경쇄 영역(V_L) 도메인은 뮤린 IgG TR66으로부터 유래한다(Lanzavecchia und Scheidegger 1987). 114번 위치의 시스테인(IMGT 명명법에 따름)은 세린으로 치환되었다. 불변 중쇄(C_H1) 및 불변 경쇄 영역(C_L)은 인간 기원의 것이다. 본 발명자들은 본 발명자들의 작제물을 위해 카파형 불변 경쇄 영역을 선택하였다. 2개의 scFv 결합 모이어티는 인간 종양 관련 항원(TAA) CLDN6에 특이적이다. 대응하는 V_H 와 V_L 영역은 키메라 IgG11MAB206-SUBW(가니메드 파마슈티칼스 게엠베하(Ganymed Pharmaceuticals AG), 독일 마인츠)로부터 유래한다. 도 18은 본 발명의 과정에서 사용된 V_H 도메인과 V_L 도메인의 아미노산 서열을 도시한다.

[0417] 두 bstb 분자는 그들의 C_H1 영역에서 상이하게 생성되었다. bstb_369/367은 인간 IgG1 유래의 C_H1 영역을 함유하는 반면에, bstb_371/367은 인간 IgG2 유래의 C_H1 영역을 함유한다. 이론적 설명은 상이한 서브클래스의 C_H1 및 C_L 에 의한 상이한 디설파이드 결합 형성으로 인한 이종이량체 형성의 비교였다(Rothlisberger et al. 2005). 카파형 C_L 의 서열이 IgG1 및 IgG2에서 보존되어 있기 때문에, 동일한 C_L 작제물을 2개의 작제물의 형성을 위해 사용하였다. 다음의 분자들이 bstb 분자의 형성에 대해 단백질 수준에서 수득되었다:

[0418] bstb_369/367:

[0419] $N - V_H^{\alpha CD3} - C_H1(IgG1) - V_H^{\alpha CLDN6} - V_L^{\alpha CLDN6} - 6xHis\text{-태그} - C$ (Fd bstb_369/367)

[0420] $N - V_L^{\alpha CD3} - C_L - V_H^{\alpha CLDN6} - V_L^{\alpha CLDN6} - Strep\text{-태그} - C$ (L bstb_369/367)

[0421] bstb_371/367:

[0422] $N - V_H^{\alpha CD3} - C_H1(IgG2) - V_H^{\alpha CLDN6} - V_L^{\alpha CLDN6} - 6xHis\text{-태그} - C$ (Fd bstb_371/367)

[0423] $N - V_L^{\alpha CD3} - C_L - V_H^{\alpha CLDN6} - V_L^{\alpha CLDN6} - Strep\text{-태그} - C$ (L bstb_371/367)

[0424] C = C-말단, C_H = 불변 중쇄 영역, C_L = 불변 경쇄 영역, Fd = 분해 가능한 단편(Fab의 중쇄 부분), L = Fab의 경쇄 부분, N = N-말단, V_H = 가변 중쇄 도메인, V_L = 가변 경쇄 도메인.

[0425] 표 1은 본 발명의 과정에서 생성된 TAA CLDN6에 특이적인 bstb 작제물에 관한 정보를 요약한 것이다. bstb 작제물 단편은 대응하는 IgG 항체의 V_H 및 V_L 서열 및 보존된 인간 C_H 및 C_L 서열을 GeneArt String으로서 사용하는 GeneArt AG(GeneArt/Thermo Fisher Scientific, 독일 레겐스 부르크)에 의한 유전자 합성에 의해 생성되었다. CHO 코돈 최적화를 GeneArt의 GeneOptimizer[®] 소프트웨어에 의해 실시하였다. 특이성, 단일클론 항체(mAb) 유래의 서열 기원, 코돈 이용도 최적화를 위한 매개변수 및 추가적인 서열 특징에 관한 정보는 표 1에 열거되어 있다. 표적 세포 결합 모이어티의 가변 도메인을 코딩하는 서열은 원래 가니메드 파마슈티칼스 게엠베하의 것이었다.

[0426] DNA 클로닝 및 발현 벡터 작제는 당업자에게 공지된 Seamless PLUS 클로닝 및 조립 키트(GeneArt/Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 실시하였다. MGWSCIILFLVATATGVHS를 코딩하는 인간 IgG 분비 신호 서열을 배양 배지로의 단백질 분비를 위해 Fd- 및 L-bstb V-영역 서열의 5' 말단 상류에 도입하였다. 20 아미노산(AA) 유연한 글리신-세린(GS) 펩티드 링커((GGGS)₄)를 코딩하는 서열을 삽입하여 항-TAA scFv의 조성을 위해 V_H 도메

인과 V_L 도메인을 결합시켰다. scFv 안정화 디설파이드 가교의 형성을 위해, V_H -도메인 및 V_L -도메인당 각 시스테인으로의 하나의 치환을 도입하였다. 하나의 scFv 도메인 서열은 18 AA 링커(SGPGGGRS(GGGGS)₂)를 코딩하는 서열에 의해 Fd-부분(C_H1 의 C-말단)에 연결시키고 다른 scFv 도메인 서열은 6 AA 링커(DVPGGS)를 코딩하는 서열에 의해 L-부분(C_L 의 C-말단)에 연결시켰다. 상이한 링커 길이는 크기에 의해 Fd-부분과 L-부분을 구별할 수 있게 하였다. 제1 세대의 순수한 이중이량체 bstb의 정제를 용이하게 하기 위해 6xHis-태그 서열을 Fd-scFv 모이어티의 3'-말단에 첨가하고 Strep-태그를 L-scFv 모이어티의 3'-말단에 첨가하였다. 표 2에는 전체 bstb 단백질을 코딩하는 DNA 서열이 열거되어 있다. 표 3은 참조로서 사용된 bi-(scFv)₂를 코딩하는 DNA 서열을 나타낸다.

[0427]

bstb 항체 작제물을 NaeI 및 PmlI 의해 절단된 표준 포유동물 pCEP4-기반 발현 벡터(Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, 독일 다름슈타트)에 클로닝하여 평활 말단화된 선형 플라스미드를 얻었다. C-말단 6xHis 태그 및 Strep-태그는 단백질의 친화성 크로마토그래피 정제 및 검출 목적을 위해 사용되었다. 태그 없는 작제물도 생성시켰다. 모든 작제물은 외부 시퀀싱 서비스에 의해 검증되었다. 작제물 및 단백질 개략도는 도 1에 예시되어 있다.

표 1

CLDN6 x CD3-bstb 항체 특징의 요약

내부 명칭	특이성	scFv V_H - V_L 영역의 기원	Fab V_H - V_L 영역의 기원	코돈 이용도	C_H1	태그	scFv 모이어티 내의 ds 가교
Bstb_369/367 (서열번호 14/16)	HS	IMAB206-SUBW	TR66(C114S)	CG	IgG1	His/Strp	+
Bstb_371/367 (서열번호 15/16)	HS	IMAB206-SUBW	TR66(C114S)	CG	IgG2	His/Strp	+
Bstb_5726/5725 (서열번호 17/19)	HS	IMAB206-SUBW	TR66(C114S)	CG	IgG1	-	+
Bstb_5727/5725 (서열번호 18/19)	HS	IMAB206-SUBW	TR66(C114S)	CG	IgG2	-	+

[0428]

[0429]

bstb는 이중특이적 TriMAB를 나타내고; C는 시스테인을 나타내고; CH1은 불변 중쇄 영역 1을 나타내고; CG는 크리세툴루스 그리세우스(*Cricetulus griseus*)를 나타내고; IMAB는 이상적인 단일클론 항체를 나타내고; His는 6xHis 태그를 나타내고; HS는 호모 사피엔스(*Homo sapiens*)를 나타내고; IgG는 면역 글로불린을 나타내고; S는 세린을 나타내고; Strp는 Strep-태그를 나타내고; W는 트립토판을 나타낸다.

표 2

CLDN6 x CD3-bstb DNA 코딩 서열

플라스미드 내부 명칭	대응하는 bstb 단편	DNA 코딩 서열
#367	L bstb_369/367, L bstb_371/367	ATGGGCTGGTCTGCATCATCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGT GCACTCTCAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGCCATCATGTCTGCTAGCC CTGGCGAGAAAGTGACAATGACCTGCCGGGCCTCCTCCTCCGTGTCTTAC ATGAACTGGTATCAGCAGAAGTCCGGCACCTCCCCAAGCGGTGGATCTA CGACACCTCCAAGGTGGCCTCTGGCGTGCCCTACAGATTCTCCGGCTCTG GCTCTGGCACCTCCTACAGCCTGACCATCTCCAGCATGGAAGCCGAGGAT GCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAACCCCTGACCTTTGG CGCTGGCACCAAGCTGGAAGTGAAGCGGACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGT TCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTG GTGTGCCCTGCTGAACAACCTTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAA GGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCAGGAAAGCGTCACCGAGC AGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCTGTCTCCACCTGACCCGTGTCC AAGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCA GGCCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCTTCAACCGGGCGAGTGTGACG TGCTTGGTGGTAGCGAAGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCTGAGCTGGTG AAACCCGGCGCTAGCATGAAGATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACAGCTT CACCGCTACACCATGAACTGGGTGAAACAGAGCCACGGCAAGTGCCTGG AATGGATCGGCCCTGATCAACCCCTACAACGGCGGCACCATCTACAACCAG AAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACCGTGGACAAGAGCAGCAGCACC CTACATGGAAGTGTGAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACT GCGCCAGAGACTACGGCTTCGTGCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACC CTGACAGTGTCTAGCGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGCGGATCTGGCGG CGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCCAGATCGTGTGACCCAGTCCCCCT CCATCATGTCCGTGTCTCCCGGCGAGAAAGTGACAATTACCTGCTCCGCC TCCTCCTCCGTGTCTTACATGCACTGGTTCAGCAGAAAGCCCGGCACCTC CCCCAAGCTGTGGATCTACTCCACCTCCAACCTGGCCTCCGGCGTGCCCG CCAGATTCTCCGAAGAGGCTCCGGCACAGCTACTCCCTGACCATCTCC AGAGTGGCCGCGGAGGACGCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGCGGTCCAA CTACCCCCCTGGACCTTTGGCTGCGGCACCAAGCTGGAAATCAAGTCTG CCTGGAGCCACCCACAGTTCGAGAAGTGA
#369	Fd bstb_369/367	ATGGGCTGGTCTGCATCATCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGT GCACTCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTG GCGCCTCCGTGAAGATGTCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTTACCCGG TACACCATGCACTGGGTCAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT

[0430]

		CGGGCTACATCAACCCCTCCCGGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCCTGACAACCGACAAGTCCTCCTCCACCGCCTACATG CAGCTGTCTCCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCGGTGTACTACTGGCGCCG GTACTACGACGACCCTACTCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACAC TGACAGTGTCTAGCGCCTCCACCAAGGGGCCCTCCGTGTTCCTCTGGCC CCTTCTCCAAGTCCACCTCCGGCGGACCGCGCTCTGGGCTGGCTGGT GAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAAGTCTGGCGCC TGACCAGCGCGGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTG TACTCCCTGTCTCCGTGGTGACCGTGCCCTTCTCCTCCTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAACCAACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACA AGCGGGTGGAGCCTAAGTCCTGCTCCGGCCCTGGGGGCGGACGACGCGG GGAGCGGATCCGGCGGAGGAGGCTCTGAAGTGACGCTGCAGCAGAGCGG CCCTGAGCTGGTGAACCCGGCGCTAGCATGAAGATCAGCTGCAAGGCCA GCGGCTACAGCTTCACCGGCTACACCATGAAGTGGGTGAAACAGAGCCAC GGCAAGTGCCCTGGAATGGATCGGCCTGATCAACCCCTACAACGGCGGCAC CATCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACCGTGGACAAGA GCAGCAGCACCCTACATGGAAGTGTGAGCCTGACGAGCGAGGACAGC GCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGGCTTCGTGCTGGACTACTGGG CCAGGGCACCACCCTGACAGTGTCTAGCGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTG GCGGATCTGGCGGCGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCCAGATCCTGCTG ACCCAGTCCCCTCCATCATGTCCGTGTCTCCGGCGAGAAAGTGACAAT TACCTGCTCCGCTCCTCCTCCGTGTCTACATGCACTGGTTCAGCAGA AGCCCGGCACCTCCCCAAGCTGTGGATCTACTCCACCTCCAACCTGGCC TCCGGCGTGCCCGCCAGATTCTCCGGAAGAGGCTCCGGCACCAGCTACTC CCTGACCATCTCCAGAGTGGCGCGGAGGACGCCGCCACCTACTACTGCC AGCAGCGGTCCAACCTACCCCCCTGGACCTTTGGCTGCGGCACCAAGCTG GAAATCAAGGGCGGCTCCCACCACCACCATCACCCTGA
#371	Fd bstb_371/367	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGCGCT GCACTCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTG GCGCCTCCGTGAAGATGTCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTTCACCCGG TACACCATGCACTGGGTCAAGCAGAGGCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCCTCCCGGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCCTGACAACCGACAAGTCCTCCTCCACCGCCTACATG CAGCTGTCTCCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCGGTGTACTACTGGCGCCG GTACTACGACGACCCTACTCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACAC TGACAGTGTCTAGCGCCTCCACCAAGGGGCCCTCCGTGTTCCTCTGGCC CCTTGTCTCCAAGTCCACCTCCGAAGGCACCGCGCTCTGGGCTGGCTGGT GAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAAGTCTGGCGCC TGACCAGCGCGGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTG TACTCCCTGTCTCCGTGGTGACCGTGCCCTTCTCCAACCTCCGGCACC GACCTACACCTGCAACGTGGACCAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACA AGACCGTGGAGCCTAAGTCCGCTCCGGCCCTGGGGCGGACGACGCGGC GGAGCGGATCCGGCGGAGGAGGCTCTGAAGTGACGCTGCAGCAGAGCGG CCCTGAGCTGGTGAACCCGGCGCTAGCATGAAGATCAGCTGCAAGGCCA GCGGCTACAGCTTCACCGGCTACACCATGAAGTGGGTGAAACAGAGCCAC GGCAAGTGCCCTGGAATGGATCGGCCTGATCAACCCCTACAACGGCGGCAC CATCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACCGTGGACAAGA GCAGCAGCACCCTACATGGAAGTGTGAGCCTGACGAGCGAGGACAGC GCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGGCTTCGTGCTGGACTACTGGG CCAGGGCACCACCCTGACAGTGTCTAGCGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTG GCGGATCTGGCGGCGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCCAGATCCTGCTG ACCCAGTCCCCTCCATCATGTCCGTGTCTCCGGCGAGAAAGTGACAAT TACCTGCTCCGCTCCTCCTCCGTGTCTACATGCACTGGTTCAGCAGA AGCCCGGCACCTCCCCAAGCTGTGGATCTACTCCACCTCCAACCTGGCC TCCGGCGTGCCCGCCAGATCTCTCCGGAAGAGGCTCCGGCACCAGCTACTC CCTGACCATCTCCAGAGTGGCGCGGAGGACGCCGCCACCTACTACTGCC AGCAGCGGTCCAACCTACCCCCCTGGACCTTTGGCTGCGGCACCAAGCTG GAAATCAAGGGCGGCTCCCACCACCACCATCACCCTGA
#5725	L bstb_5726/5725, L bstb_5727/5725	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGCGCT GCACTCTCAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGCATCATGTCTGCTAGCC CTGGCGAGAAAGTGACAATGACCTGCCGGCCTCCTCCTCCGTGTCTAC ATGAAGTGGTATCAGCAGAAGTCCGGCACCTCCCCAAGCGGTGGATCTA

[0431]

		CGACACCTCCAAGGTGGCCTCTGGCGTGCCCTACAGATTCTCGGCTCTG GCTCTGGCACCTCCTACAGCCTGACCATCTCCAGCATGGAAGCCGAGGAT GCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAAACCCCTGACCTTTGG CGCTGGCACCAGCTGGAACCTGAAGCGGACCGTGGCGGCTCCTTCCGTGT TCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTCCGTG GTGTGCTCTGTAACAACTTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAA GGTGGCAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAAAGCGTCAACGAGC AGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCTGTCTCCACCTGACCTGTCC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCACCA GGCCTGTCCAGCCTGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGCGAGTGTGACG TGCCTGGTGGTAGCGAAGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCTGAGCTGGTG AAACCCGGCGCTAGCATGAAGATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACAGCTT CACCGGCTACCCATGAACCTGGGTGAAACAGAGCCACGGCAAGTGCCTGG AATGGATCGGCCCTGATCAACCCCTACAACGGCGGCAACCATCTACAACCA AAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACCGTGGACAAGAGCAGCAGCACCGC CTACATGGAATGCTGAGCCTGACAGCGAGGACAGCGCGCTGTACTACT GCGCCAGAGACTACGGCTTCGTGTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAAC CTGACAGTGTCTAGCGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGCGGATCTGGCGG CGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCCAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCCT CCATCATGTCCGTGTCTCCCGGCGAGAAAGTGACAATTACCTGCTCCGCC TCCTCCTCCGTGTCTACATGCACTGGTTCCAGCAGAAGCCCGGCACCTC CCCCAAGCTGTGGATCTACTCCACCTCCAACCTGGCCTCCGGGCTGCCCG CCAGATTCTCCGGAAGAGGCTCCGGCACCAAGTACTCCCTGACCATCTCC AGAGTGGCCGCGGAGGACGCGGCCACCTACTACTGCCAGCAGCGGTCCAA CTACCCCCCTGGACCTTTGGCTGCGGCGACCAAGCTGGAATCAAGTGA
#5726	Fd bstb_5726/5725	ATGGGCTGGTCTGTCATCATCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGCGT GCACTCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTG GCGCCTCCGTGAAGATGTCCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTTACCCCGG TACACCATGCACTGGGTCAAGCAGAGGCTGGACAGGGCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCCTCCCGGGCTACACCAACTACAACCAAGATTCA AGGACAAGGCCACCTGACAACCGACAAGTCTCTCCACCGCTACATG CAGCTGTCTCCTGACCTCCGAGGACTCCGCGGTGTACTACTGCGCCCG GTACTACGAGCACTACTCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACACAC TGACAGTGTCTAGCGCTCCACCAAGGGCCCTCCGTGTCTCCTCTGGCC CCTTCTCCAAGTCCACCTCCGGCGGCAACCGCGCTCTGGGCTGCCTGGT GAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAATCTGGCGCCC TGACAGCGCGCTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTG TACTCCTGTCTCCGTGGTGACCGTGCTTCTCCTCCTCCCTGGGCAACCA GACCTACATCTGCAACGTGAACCAACGCTTCCAACACCAAGGTGGACA AGCGGGTGGAGCCTAAGTCTGCTCCGGCCTGGGGGGGAGCAGCAGCGG GGAGGGGATCCGGCGGAGGAGCTCTGAAGTGACGCTGCAGCAGAGCGG CCCTGAGCTGGTGAAACCCGGCGCTAGCATGAAGATCAGCTGCAAGGCCA GCGGCTACAGCTTACCCGGCTACACCATGAACCTGGGTGAAACAGAGCCAC GGCAAGTGCCTGGAATGGATCGGCCTGATCAACCCCTACAACGGCGGCAC CATCTACAACCAAGATTCAAGGGCAAGGCCCACTGACCGTGAGCAAGA GCAGCAGCACCCTACATGGAAGTGTGAGCCTGACCAAGCAGGACAGC GCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGGCTTCGTGCTGGACTAGGGG CCAGGGCACCACCTGACAGTGTCTAGCGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTG GCGGATCTGGCGCGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCCAGATCGTGCTG ACCCAGTCCCCCTCCATCATGTCCGTGTCTCCGGCGAGAAAGTGACAAT TACCTGCTCCGCCTCCTCCTCCGTGTCTACATGCACTGGTTCCAGCAGA AGCCCCGACCTCCCCCAAGCTGTGGATCTACTCCACCTCCAACCTGGCC TCCGGCGTGCCCGCCAGATTCTCCGGAAGAGGCTCCGGCACCAAGTACTC CCTGACCATCTCCAGAGTGGCGGCCGAGGACGCGGCCACCTACTACTGCC AGCAGCGGTCCAACCTACCCCCCTGGACCTTTGGCTGCGGCGACCAAGCTG GAAATCAAGTGA
#5727	Fd bstb_5727/5725	ATGGGCTGGTCTGTCATCATCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGCGT GCACTCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTG GCGCCTCCGTGAAGATGTCCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTTACCCCGG TACACCATGCACTGGGTCAAGCAGAGGCTGGACAGGGCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCCTCCCGGGCTACACCAACTACAACCAAGATTCA AGGACAAGGCCACCCTGACAACCGACAAGTCTCCTCCACCGCTACATG

[0432]

		CAGCTGTCTCCTGACCTCCGAGGACTCCGCGGTGTACTACTGCGCCCG GTACTACGACGACCACTACTCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAAC TGACAGTGTCTAGCGCTCCACCAAGGGCCCTTCCGTGTCTCCTCTGGCC CCTTGTCTCAAGTCCACCTCCGAAGGCACCGCGCTCTGGGCTGCTGGT GAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAATCTGGCGCCC TGACAGCGCGCTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTG TACTCCTGTCTCCTCCGTGGTGACCGTGCTTCTCCTCAACTTCGGCACCA GACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACA AGACCGTGGAGCCTAAGTCCGCCTCCGGCCCTGGGGGCGGAGCAGCGGC GGAGCGGATCCGGCGGAGGAGGCTCTGAAGTGACGCTGCAGCAGAGCGG CCCTGAGCTGGTGAAACCCGGCGCTAGCATGAAGATCAGCTGCAAGGCCA GCGGCTACAGCTTACCCGGCTACACCATGAACCTGGGTGAAACAGAGCCAC GGCAAGTGCCTGGAATGGATCGGCCTGATCAACCCCTACAACGGCGGCAC CATCTACAACCAAGATTCAAGGGCAAGGCCCACTGACCGTGGAACAAGA GCAGCAGCACCCTACATGGAAGTGTGAGCCTGACCAAGCAGGACAGC GCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGGCTTCGTGCTGGACTACTGGGG CCAGGGCACCACCTGACAGTGTCTAGCGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTG GCGGATCTGGCGCGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCCAGATCGTGCTG ACCCAGTCCCCCTCCATCATGTCCGTGTCTCCGGCGAGAAAGTGACAAT TACCTGCTCCGCCTCCTCCTCCGTGTCTACATGCACTGGTTCCAGCAGA AGCCCCGACCTCCCCAAGCTGTGGATCTACTCCACCTCCAACCTGGCC TCCGGCGTGCCCGCCAGATTCTCCGGAAGAGGCTCCGGCACCAAGTACTC CCTGACCATCTCCAGAGTGGCGGCCGAGGACGCGGCCACCTACTACTGCC AGCAGCGGTCCAACCTACCCCCCTGGACCTTTGGCTGCGGCGACCAAGCTG GAAATCAAGTGA
--	--	--

[0433]

표 3

CLDN6 x CD3-bi-(scFv)₂ DNA 코딩 서열

플라스미드 내부 명칭	대응하는 bi-(scFv) ₂	DNA 코딩 서열
#123	bi-scFv "참조"	ATGGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGT GCACAGCGACATCAAGCTGCAGCAGAGCGGAGCCGAGCTGGCCAGACCTG GGGCCAGCGTGAAGATGAGCTGCAAGACCAGCGGCTACACCTTCACCCGG TACACCATGCACCTGGGTGAAACAGCGGCCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCAGCCGGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCCCTGACCACCGACAAGAGCAGCAGCACCAGCCTACATG CAGCTGAGCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCGCCCG GTACTACGACGACCACTACAGCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCC TGACAGTGTCTAGCGTGAAGGAGGAAGCGGAGGATCTGGCGGCTCTGGG GGAAGCGGTGGCGTGGACGACATCCAGCTGACCCAGAGCCCCGCCATCAT GTCTGCCAGCCCTGGCGAGAAAGTGACCATGACCTGCCGGGCCAGCAGCA GCGTGTCTACATGAAGTGGTATCAGCAGAAGTCCGGCACCAGCCCCAAG CGGTGGATCTACGACACCAGCAAGGTGGCAAGCGGCGTGCCCTACAGATT CAGCGGCGAGCGGCTCCGGCACCTCCTACTCCCTGACCATCAGCAGCATGG AAGCCGAGGACGCGGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCCAGCAAGCC CTGACCTTCGGAGCCGGCACCAAGCTGGAAGTGAAGTCTGGCGGGGAGG ATCCGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCCGGCCCTGAGCTGGTGAACCCGGCG CTAGCATGAAGATCTCTTGCAAGGCTCCGGCTACAGCTTACCGGCTAC ACAATGAATTGGTGGAAGCAGAGCCACGGCAAGAATCTGGAATGGATTGG CCTGATCAACCCCTTACAACGGCGGCACAATCTATAATCAGAAGTTTAAAG GGAAGGCCACACTGACAGTGGACAAGTCCAGCTCCACAGCCTACATGGAA CTGCTGAGCCTGACCTCCGAGGACTCTGCCGTGTATTACTGTGCCAGAGA CTACGGCTTCGTCTGGATTATTGGGGACAGGGAACAACACTGACCGTGT CCTCCGGGGGAGGGGGATCAGGTGGGGGAGGTAGTGGGGGTGGCGGCTCT GATATCGTGCTGACCCAGTCCCTTAGCATCATGAGCGTGTCCCCAGGCGA AAAAGTGACAATCACTTGCAGCGCCAGCTCCTCCGTGTCTATATGCATT GGTTCCAGCAGAAGCCTGGCACATCCCCCAAAGTGTAACTACAGCACC TCCAACCTGGCTTCGGCGGTGCCCGCCAGATTTCTGGCAGAGGCAGCGG CACCAGTACAGCCTGACAATCAGCCGGGTGGCCGCCGAAGATGCCGCCA CATATTATTGTGAGCAGCGGAGCAACTACCCCCCTGGACATTGGGGGA GGAACAAAGCTGGAAATCAAGCACCACCACCACCACCTGA

[0434]

[0435]

b. 일시적 형질감염 및 생산

[0436]

CLDN6 특이적 bstb 단백질의 일시적 생산을 위해, Expi293TM 발현 시스템(Thermo Fisher Scientific, 독일 다름슈타트) - 인간 배아 신장 세포주 HEK293의 유도체 -을 제조업체의 설명서에 따라 사용하였다. 이를 위해, Expi293FTM 세포를 세포 배양 현탁액 플라스크에서 2일 동안 Expi293TM 발현 배지 ml당 2.0×10^6 의 밀도까지 예비배양하였다. 형질감염 당일에, 신선한 Expi293TM 발현 배지 1 ml 당 2.5×10^6 Expi293FTM 세포를 5배 용적의 용량을 갖는 멸균 에rlenmeyer 유리 플라스크로 옮겼다. Fd-단편 및 L-단편 함유 pCEP4 플라스미드를 Opti-MEM (Gibco/Thermo Fisher Scientific)에 1:1의 비율로 혼합하였다. 세포 현탁액 ml당 1 µg DNA 혼합물을 50 µl의 Opti-MEM에 사전희석시키고 세포 현탁액 ml당 2.7 µl ExpiFectamineTM 293 Reagent를 별도의 튜브 내의 50 µl Opti-MEM에 사전희석시키고 RT에서 5분 동안 항온배양하였다. 이어서, 사전희석된 DNA 혼합물을 사전희석된 ExpiFectamineTM 293 Reagent에 첨가하여 혼합하고, 세포 현탁액에 첨가하기 전에 RT에서 20분 동안 항온배양하였다. 세포 배양 플라스크를 8% CO₂, 37°C 가습된 Multitron Cell 진탕기(Infors HT, 스위스 보트밍겐)에서 125rpm으로 16 내지 18시간 동안 교반하였다. 이어서, 세포 현탁액 ml당 3.9 µl 인헨서 1 및 39 µl 인헨서 2를 첨가하고 세포 배양 플라스크를 추가로 항온배양하였다. 단백질 함유 상청액을 형질감염한지 7일 후에 회수하였다. 상청액을 0.22 µm Nalgene Rapid Flow 90mm Filter Units, Low Protein Binding(Thermo Fisher Scientific)로 여과하였다. 제조업체의 프로토콜에 따라 Protein L 바이오센서(Pall/ForteBio, 독일 드라이아이히)를 이용하여 BLItz 정량하여 분비된 단백질 함량을 추정하였다. 정제할 때까지 상청액을 2 내지 8°C에서 보관하였다.

[0437]

c. 태그된 단백질 bstb_{369/367} 및 bstb_{371/367}의 정제

[0438]

단백질 bstb_{369/367} 또는 bstb_{371/367}(실시예 1b 하에 기재됨)를 함유하는 일시적으로 형질감염된 Expi293FTM 세포의 세포 배양 상청액을 표준 절차를 이용하여 고정화 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC)에 적용하였다(Coligan et al. 2001b). 간략하게 설명하면, 10mM 이미다졸이 보충된 세포 배양 상청액을 ÄKTA 순수 25 FPLC 시스템(둘 다, GE Healthcare Life Sciences, 독일 프라이부르크)에 연결된 HisTrap HP 1ml 컬럼에 로딩하고

세척 완충액(20mM NaH_2PO_4 , 500mM NaCl, 10mM 이미다졸, pH 7.5)으로 평형화하였다. 샘플을 1ml/분의 속도로 로딩 하였다. 용출 완충액은 이미다졸 농도가 500mM란 점에서 세척 완충액과 상이하였다. 10 컬럼 용적(CV)으로 세척한 후, 단백질을 0 내지 100% 용출 완충액의 선형 구배를 사용하여 용출하였다. 용출액을 1ml/분의 속도에서 1ml 분획으로 모았다. 고분자량(HMW) 및 단량체 종(주 피크)을 모았다(도 2a). 용출된 bstb 단백질을 폴링하고 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na_2HPO_4 , 2mM KH_2PO_4 (pH 7.4)을 함유하는 Strep-Tactin[®] 결합 완충액 DPBS(둘베코 인산염 완충 식염수 Gibco/Thermo Fisher Scientific)에 대해 Slide-A-Lyzer G2 투석 카세트 10K MWCO(Pierce/Thermo Fisher Scientific, 미국 일리노이주 록포드)를 이용하여 즉시 투석하였다. IMAC 주 피크로부터 투석된 bstb 단백질을 추가의 Strep-Tactin[®] 친화성 크로마토그래피(GE Healthcare Life Sciences)에 의해 정제하였다. 모든 후속 Strep-Tactin[®] 정제 단계는 1ml/분의 유속으로 수행하였다.

[0439] Strep-Tactin[®] 컬럼은 bstb 단백질의 적용 전에 결합 완충액으로 평형화하였다. bstb 단백질의 용출은 5 CV 결합 완충액의 세척 단계 후 결합 완충액을 함유하는 2.5mM 테스티오마이오틴(SigmaAldrich, 독일 토이프키르헨)을 이용하여 0 내지 100%의 선형 구배에 의해 실시하였다(도 2b). 1ml 분획 중의 용출된 bstb 단백질을 폴링하고 평형화된 크기 배제 크로마토그래피(SEC) HiLoad 16/600 Superdex 200pg 컬럼(GE Healthcare Life Sciences)에 보조-주입(sub-inject)한 다음, 1 CV DPBS로 등용매 용출하였다. 용출된 HMW 및 단량체 bstb 종을 1ml 분획(도 2c)에 모으고 폴링하였다.

[0440] Bstb 농도는 ProtParam 툴(<http://web.expasy.org/protparam/>)를 통해 결정된 흡광 계수 및 이론적 분자량을 고려하여 NanoDrop 2000c를 이용하여 280nm에서 측정함으로써 결정하였다. 정제된 단백질을 분취하고 2 내지 8 °C에서 보관하였다.

[0441] **d. 태그 없는 단백질 bstb_5726/5725 및 bstb_5727/5725의 정제**

[0442] 단백질 bstb_5726/5725 및 bstb_5727/5725- 둘 다 태그 없음-을 함유하는 일시적으로 형질감염된 Expi293F[™] 세포의 세포 배양 상정액을 Supracap[™] 50 깊이 필터 캡슐(Pall corporation, 독일 크라일스하임)를 이용하여 여과하고 이어서 단백질 정제 과정에 적용하였다. 정제된 bstb 단백질을 크기 배제 고성능 액체 크로마토그래피, 짧은 SE-HPLC에 의해 분석하였다 (도 2d).

[0443] SE-HPLC는 크기 배제 TSKgel G3000SWx1 컬럼(300×7.8mm, Tosoh Bioscience, 독일 그리스하임)를 갖춘 Dionex Ultimate 3000(Thermo Scientific)를 사용하여 실시하였다. 100 μ l까지 주입하였다. 컬럼을 SE - HPLC 완충액(0.3M Na_2HPO_4 , pH 7.2)로 세정하고 bstb 단백질을 등용매 용출에 의해 분리하였다.

[0444] bstb_5726/5725 및 bstb_5727/5725(데이터 미제시) 둘 다는 확립된 방법으로 효율적으로 정제할 수 있었고 단량체 함량은 정제 과정 후 >93%까지 증가하였다(도 2d). 단량체 분획을 약 100%까지 추가 농축하기 위해, PBS에 대해 투석한 샘플을 마지막으로 HiLoad 26/600 Superdex 200pg 컬럼(GE Healthcare Life Sciences)을 사용하는 분취용 SEC에 적용하였다. 이와 함께 태그 없는 bstb에 대한 정제 전략을 제시할 수 있었다.

[0445] **e. 태그된 단백질 bstb_369/367 및 bstb_371/367의 분석**

[0446] 태그를 갖는 bstb 단백질의 품질과 순도는 담당자에게 익히 공지된 표준 절차에 따라 4 내지 15% Criterion[™] TGX Stain-Free[™] Gel(Bio-Rad Laboratories, Dreieich, Germany)을 이용하는 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 이어서 무염색 겔(도 3a) 및 웨스턴 블롯 분석(도 3b)에 의해 시험하였다. 웨스턴 블롯 분석에 사용된 항체는 항-6xHis tag[®] 항체(HRP)(1:10,000, Abcam, 미국 마이애미주 캄브리지) 및 StrepMAB-Classic, HRP 접합체(1:10,000, IBA GmbH, 독일 괴팅겐)였다. 겔 및 웨스턴 블롯 막을 바이오-라드(Bio-Rad)사의 Chemidoc MP Imaging System을 이용하여 기록하였다. bstb 단백질의 신호는 내부 분자량 표준과 비교하여 환원 조건(DTT 첨가) 하에 50 내지 55 kD 및 비환원 조건 하에 약 100 kD에서 검출되었다(도 3). bstb의 이중량체 조성은 무염색 겔 중에서 Fd-단편과 L-단편의 분리에 의해 환원 조건 하에 명백해졌다.

[0447] 정제 단백질의 응집 상태는 시간 경과에 따라 분석용 SE-HPLC에 의해 결정하였다. 크기 배제 TSKgel G3000SWx1 컬럼(300×7.8mm, Tosoh Bioscience)을 갖춘 Agilent 1260 Infinity 시스템(Agilent Technologies, 독일 발트브론)을 사용하여 SE-HPLC를 실시하였다. 100 μ l까지 주입하였다. 컬럼을 SE-HPLC 완충액(0.3M Na_2HPO_4 , pH 7.2)로 세정하고, bstb 단백질을 등용매 용출에 의해 분리하였다. 표 4에 요약된 바와 같이, 정제된 bstb_369/367 단백질은 6개월이 넘는 과정에 걸쳐서 분석용 SE-HPLC에 의해 시험되었고 DPBS 중에서 2 내지 8 °C

에서 어떠한 응집 또는 분해 징후 없이 높은 안정성을 나타냈다.

표 4

SE-HPLC에 의해 분석된 bstb_369/367의 안정성

DPBS 중 2 내지 8°C에서 저장 시간[일수]	HMW [%]	단량체 [%]	LMW [%]
0	0.59	99.41	0
7	0.54	99.46	0
30	0.76	99.24	0
56	0.74	99.26	0
203	0.66	99.34	0

이와 함께, bstb 분자의 높은 안정성이 나타날 수 있었다. 추후 정제하여 심지어 100%의 단량체 bstb_369/367 단백질을 얻었다.

실시예 2: 시험관내 세포독성 분석법에서 bstb_369/367 및 bstb_371/367의 특이적 용해 활성의 결정

특이적 용해 효과의 결정을 위해, 본 발명자들은 시험관내 루시페라제 세포독성 분석을 사용하였다. 표적 세포 주로서 안정하게 루시페라제를 발현하게 내생적으로 CLDN6을 발현하는 인간 난소암 세포주 OV-90(ATCC CRL-11732) 및 기형암종 세포주 PA-1(ATCC CRL-1572)을 사용하였다. 또한 안정적으로 루시페라제를 발현하는 인간 CLDN6 음성 유방 암종 세포주 MDA-MB-231(ATCC HTB-26)은 특이성(표적 이탈(off target)) 대조군으로서 사용하였다.

건강한 공여자의 인간 혈액으로부터 분리된 인간 말초혈 단핵세포(PBMC) (University Medicine of the JGU Mainz, Blood Transfusion Center, 독일 마인츠)를 표준 절차(Coligan et al.2001a)에 따라 이펙터 세포로서 선택하였다.

a. EC50 결정

고도의 단량체 bstb_369/367의 최대 유효 농도의 절반(EC 50)을 결정하기 위해, 단백질의 적정 열(titration row)을 시험관내 루시페라제 세포독성 분석법에서 시험하였다. 기재된 기재된 실시예에서, 이펙터(E) 세포와 표적(T) 세포를 5:1의 E:T 비율로 혼합하고 웰당 최종 세포 수가 1×10^4 개의 표적 세포 및 5×10^4 개의 이펙터 세포가 되게 백색 96웰 세포 배양 플레이트(Nunc® Delta Surface, Thermo Scientific, 독일 브라운슈바이크)에 접종하였다. 세포를 bstb_369/367 또는 bstb_371/367 단백질의 10포인트, 10배 연속 희석액 결과 함께 4.85 aM 내지 48.50 nM의 농도 범위에서 항온배양하였다. L_{min} 값과 L_{max} 값으로서 기능하는 웰(아래 참조)에 bstb 단백질 대신 DPBS를 보충하였다.

세포 배양 마이크로플레이트를 37 °C, 5% CO₂에서 48시간 동안 항온배양하였다. 분석을 위해, 웰당 1 mg/ml 루시페린(BD Monolight, BD Biosciences, 독일 하이델베르크)을 함유하는 50 µl의 수용액을 첨가하고 이어서 플레이트를 37°C의 암실에서 30분 동안 항온배양하였다. 루시페라제-발현 생존 가능한 세포에 의한 루시페린 산화으로부터 발생하는 발광을 Infinite M200 Tecan 마이크로플레이트 리더(Tecan, 스위스 만네도르프)를 이용하여 측정하였다. 특이적 표적 세포 용해 비율을 다음 식에 의해 계산하였다: 특이적 용해% = $[1 - (발광_{시험} - L_{max}) / (L_{min} - L_{max})] \times 100$, 여기서, "L"은 용해를 나타낸다. L_{min} 은 bstb의 부재 하에 최대 용해에서의 발광을 나타내고 L_{max} 는 Triton X-100(최종 농도 2%)의 첨가에 의해 달성된 bstb의 부재 하에 최대 용해에서의 발광(자발적 발광 카운트와 동등함)을 나타낸다.

EC50 값은 PRISM 6 소프트웨어(GraphPad Software, 미국 캘리포니아주 샌디에고)에 통합된 시그모이드 용량-반응 알고리즘(log(작용제) 대 반응(3가지 매개 변수))을 사용하여 계산하였다.

bstb_369/367의 결정된 EC50은 39.71 pM이었고 이와 함께 CLDN6 양성 OV-90 세포에서 117.00pM인 bstb_371/367의 EC50(도 4a)보다 3배 낮았다. CLDN6-음성 대조군 세포주 MDA-MB-231의 경우에 용해는 관찰되지 않았다. 본 분석법의 결과는 다른 이들에 의해서도 보고된 바와 같이 공여자의 면역 상태에 따라 변화하는 인간 PBMC의 효

력에 크게 의존한다(예를 들어, 문헌[Lutterbilities et al. 2010]을 참조). 따라서, 8명의 상이한 PBMC 공여자를 사용하여 본 발명자들은 0.98 fM 내지 39.71 pM의 bstb_369/367 단백질의 EC50 값 범위를 결정하였다(데이터 미제시).

[0458] **b. bstb_369/367과 CLDN6 x CD3 bi-(scFv)₂의 비교**

[0459] 2가 CLDN6-결합 bstb_369/367을 사내에서 생성된 고도의 단량체(99.5%) CDLN6 x CD3 bi-(scFv)₂(BioNTech AG, Stadler et al. 2015)과 비교하여 용해 효력에 미치는 2가 항-중양 표적화의 유익한 결합력 효과를 조사하였다.

[0460] 이러한 목적을 위해, bstb 및 bi-(scFv)₂를 등몰 농도로 사용하고 용해 효과를 실시예 2a에서 기본적으로 설명된 바와 같이 PA-1, OV-90 및 MDA-MB-231에서 세포독성 분석법(도 4b)으로 시험하였다. PA-1 세포는 24시간 동안만 공동-항온배양하였다. 두드리지게, bstb_369/367은 PA-1에 대해 사용된 최저 농도인 단지 0.24 pM에서도 58%의 PA-1 세포 사멸을 매개한 반면에, bi-(scFv)₂ 참조물은 0% 사멸에서 시작하는 용해 곡선을 나타냈다. OV-90의 경우, b-(scFv)₂와 비교하여 bstb_369/367의 높은 효력은 bstb의 55배 낮은 EC50에 의해 명백해졌다. 두 분자 모두 표적 이탈 용해 효과를 발휘하지 않았다.

[0461] 따라서 bstb 분자에 의한 2가 CLDN6 결합은 bi-(scFv)₂ 분자에 의한 일가 CLDN6 결합과 비교하여 표적 세포 사멸능을 강력하게 상승시킨다.

[0462] **c. 용해 활성에 미치는 bstb_369/367 고분자량 종의 영향의 조사**

[0463] 이량체 또는 다량체와 같은 HMW 종은 해당 항원에 대한 그들의 다가성으로 인해 단량체 종과 비교하여 상이한 활성을 발휘할 수 있다. 분자가 이의 단량체 상태에서 안정적인 것으로 나타났지만, 활성에 미치는 HMW 종의 영향을 장래의 안정성 측면에서 시험하였다.

[0464] 이를 위해, HMW 종을 정제 공정 동안에 수집하고 SEC에 의해 농축시키고 5%의 규정량까지 단량체 조제물에 추가 첨가하였다. 이어서, 5% HMW 종이 보충된 99.3% 단량체 및 94.3% 단량체를 실시예 2a에서 설명한 바와 같되, 15 포인트, 20배 연속 희석액 열에서 세포독성 분석법으로 비교하였다. PA-1 및 OV-90은 표적 세포로서 기능하였다. bstb_369/367와의 공동-항온배양을 다소 민감한 세포주 PA-1을 사용하여 16 시간 동안 및 더 견고한 세포주 OV-90을 이용하여 48시간 동안 실시하였다. 도 4c에 도시된 바와 같이, PRISM 6 소프트웨어(GraphPad Software)에 통합된 시그모이드 용량 반응 알고리즘(log(작용제) 대 반응 - 가변 기울기(4가지 매개변수))을 사용하여 EC50 값을 계산하였다. 5% HMW bstb_369/367 샘플의 계산된 EC50은 PA-1의 경우는 1.5배 높고, OV-90의 경우는 2.3배 낮았다. 따라서 PA-1에서 약간의 활성 감소가 관찰되었고 OV-90에서 약간의 활성 상승이 관찰되었다. 전체적으로, 활성에 미치는 5% HMW 종의 영향은 낮고 표적 세포주 및/또는 항온배양 시간에 좌우될 가능성이 있다. bstb 단백질의 안정성 및 다소 높은 비율의 HMW 종의 낮은 영향과 관련하여, bstb 분자는 치료용 제품 개발에 적격하다.

[0465] **d. bstb_369/367과 태그 없는 변이체 bstb_5726/5725 및 bstb_5727/5725의 비교**

[0466] 태그 없는 bstb 돌연변이체들을 세포독성 분석법에서 평가하고 bstb_369/367과 비교하였다. 또한, 활성에 미치는 HMW 종의 영향을 시험하였다. 분석법 설정은 실시예 2c에서 설명한 바와 같지만, 시험 항목은 CLDN6⁺ 표적 세포로서 OV-90에 대해서만 10포인트, 5배 연속 희석액에서 적용하였다.

[0467] bstb_369/367 및 이의 태그 없는 유사체 bstb_5726/5725(99.9% 단량체)은 동등한 용해 효율을 나타냈으며 EC50 값은 약 9.3 pM이었다(도 4d, 좌측 플롯). 5%의 HMW은 1.4배 낮은 EC50 값을 초래하였다. C_H1(IgG2) 보유 변이체 bstb_5727/5725(100% 단량체)의 EC50은 참조물 bstb_369/367보다 약 1.6배 높았고 이는 실시예 2a의 태그 없는 변이체에 대해서도 도시된 바와 같이 이러한 돌연변이체의 다소 낮은 효력을 확인시켜 준다. bstb_5727/5725의 경우, 5% HMW은 효력에 거의 영향을 미치지 않았다(도 4d, 우측 플롯). 이러한 예시적인 연구에서 추가 첨가된 HMW를 이용한 경우의 EC50은 단량체를 이용한 경우에 비해 불과 1.1배 낮았다.

[0468] 결론적으로, 태그된 C_H1(IgG1) 보유 bstb 및 태그없는 C_H1(IgG1) 보유 bstb는 그들의 기능성면에서 동일하고 C_H1(IgG2) 보유 bstb에 비해 약간 높은 효력을 발휘한다. HMW 종의 영향은 두 변이체 모두에 대해 낮다.

[0469] **실시예 3: bstb_369/367 및 bstb_371/367에 의해 매개되는 T 세포 조정**

[0470] bstb_369/367 및 bstb_371/367에 의해 매개되는 T 세포의 조절, 정확히는 T 세포의 활성화 및 증식을 동일한 표

적 세포주들을 이용하여 실시예 2에서 설명한 바와 유사한 설정에서 조사하였다. 간략히 언급하면, CLDN6⁺ 표적 세포 OV-90 및 PA-1, 및 CLDN6⁻ MDA-MB-231 대조 세포를 인간 PBMC와 함께 24웰 플레이트 내의 0.5ml 완전 배지에 5:1의 E:T 비율로 접종하였다. 표적 의존성을 추가 확인하기 위해, PBMC를 표적 세포 없이 bstb 단백질과 함께 공동-항온배양하였다. bstb 단백질 bstb_369/367 및 bstb_371/367을 0.005 내지 5000 ng/ml의 농도 범위로 4포인트 100배 연속 희석액 열에서 첨가하였다. 양성 대조군으로서 표적 독립적 T 세포 활성화 무린 IgG인 100 ng/ml 인간 항-CD3 IgG2a 클론 OKT3(BioXCell, 미국 뉴햄프셔주 웨스트 레바논)을 적용하였다. 음성 대조군으로서 본 발명자들은 bstb 완충액 DPBS를 첨가하였다.

a. T-세포 활성화

이펙터 세포 및 표적 세포를 48시간 동안 bstb와 함께 공동-항온배양하고 환저 96웰(Fisher Scientific, 독일 슈베르테)로 옮기고 원심분리하고 세척하였다. 세포를 항-인간 형광-표지된 항체 항-CD5-PE-Cy7(Abcam), CD69-APC, CD25-PE(BD Biosciences) 및 생/사 염료 eFluor506(eBioscience, 독일 푸랑크푸르트 암 마인)으로 염색하였다. 샘플을 BD FACSCantoII로 측정하고 10,000개의 CD5⁺ 생존 가능 일중항 림프구(singlet lymphocyte)를 기록하였다. 데이터를 FlowJo 소프트웨어 V10(Tree Star, 미국 캘리포니아주 산 카를로스) 및 Microsoft Excel 2010 (Microsoft Deutschland GmbH, 독일 운터스클라임스하임)으로 분석하였다. 모의 샘플 유래의 배경 신호는 통제하였다.

도 5a에 도시된 바와 같이, 두 bstb 모두 강력한 CLDN6-의존적 T 세포 활성화를 매개한다. 48시간 후, T 세포는 조기 활성화 마커 CD69 및 후기 활성화 마커 CD25에 대한 높은 비율의 이중 양성 및 CD25 단독 양성 T 세포의 부재에 의해 결정되는 바와 같이 중간 활성화 단계에 있다. 또한, 데이터는 bstb 농도가 낮아수록 활성화 상태가 더 빨라진다는 것을 나타낸다. 5,000 ng/ml의 고농도에서만 bstb 단백질은 5.5% 미만인 측정가능한 표적 독립적 T 세포 활성화를 유도하였다. bstb_369/367은 표적-의존적 T 세포 활성화의 매개에 있어 bstb_371/367보다 약간 높지만 유의적으로 높지 않은 효력을 나타낸다(표 5를 또한 참조).

표 5

bstb_369/367 및 bstb_371/367에 의한 T 세포 활성화

세포주	PA-1-SCI12				OV-90-SCI12				MDA-MB-231				표적 세포 없음			
CLDN6 발현	+				+				-				-			
시험 항목	Bstb_369/367		Bstb_371/367		Bstb_369/367		Bstb_371/367		Bstb_369/367		Bstb_371/367		Bstb_369/367		Bstb_371/367	
농도 [ng/ml]	0.5	5000	0.5	5000	0.5	5000	0.5	5000	0.5	5000	0.5	5000	0.5	5000	0.5	5000
총 활성화 [%]	67.1	70.6	60.4	70.9	17.4	83.1	2.8	80.1	0.0	4.2	0.5	3.8	1.4	4.4	0.6	5.4
CD69 ⁺ /CD25 ⁻ [%]	33.6	25.0	43.6	27.2	16.2	15.7	2.8	18.8	0.0	3.6	0.4	3.5	1.1	3.4	0.6	3.9
CD69 ⁺ /CD25 ⁺ [%]	33.5	45.6	16.9	43.7	1.2	67.4	0.0	61.2	0.0	0.3	0.0	0.3	0.2	0.2	0.0	0.2
CD69 ⁺ /CD25 ⁺ [%]	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.3	0.1	0.0	0.0	0.8	0.0	1.3

b. T-세포 증식

분석법 설정 전에 제조업체의 프로토콜에 따라서 PBMC를 CellTrace™ CFSE 세포 증식 키트(Thermo Fisher Scientific, 다름슈타트, 독일)를 이용하여 표지하였다. 이펙터 세포 및 표적 세포를 72 시간 동안 bstb와 함께 항온배양하였다. PBMC를 상기 실시예 3a에서 설명한 바와 같이 수거하였다. 세포를 항-인간 형광 표지된 항체 항-CD5-APC(BD Biosciences) 및 생/사 염료 eFluor506(eBioscience)으로 염색하였다. 샘플을 BD FACSCantoII로 측정하고 10,000개의 CD5⁺ 생존 가능 일중항 림프구를 기록하였다. 데이터는 FlowJo 소프트웨어 V10(제조원: Tree Star) 및 Microsoft Excel 2010을 사용하여 분석하였다.

도 5b에 도시된 바와 같이, 두 bstb 모두는 세포 분열을 나타내는 CFSE 양성이 퇴색됨으로써 결정되는 바와 같이 강력한 CLDN6 의존적 T 세포 증식을 매개한다. 더 강력한 증식의 측면에서 2개의 bstb 분자의 효력의 명백한 차이는 PA-1의 존재 하에서는 결정할 수 없었다. OV-90의 존재 하에 T 세포 활성화에 대해서도 보여지는 바와 같이, bstb_369/367은 bstb_371/367보다 강력한 효과를 매개하였다. 비특이적 또는 표적 독립적 T 세포 증식은

검출되지 않았다.

[0478] 요약하면, 두 bstb 분자는 모두 엄격한 표적 의존성으로 강력한 T 세포 조절을 매개한다.

[0479] **실시예 4: CLDN6에의 bstb_369/367 및 bstb_5726/5725의 결합**

[0480] 유세포계측 분석을 사용하여 bi-(scFv)₂ 참조 단백질, bstb_369/367 및 이의 태그 없는 유사체 bstb_5726/5725의 상대적인 결합 친화성을 결정하였다. 내생적으로 CLDN6을 발현하는 PA-1 세포를 0.05% 트립신/EDTA로 회수하고 PBS로 세척하고, 2×10^6 개 세포/ml의 농도에서 FACS 완충액(2% FCS 및 0.1% 아지드화나트륨을 함유하는 PBS)에 재현탁시켰다. 100 μ l의 세포 현탁액을 FACS 완충액에 희석된 일련의 농도가 상이한 각각의 항체(11포인트, 2배 희석액 시리즈 9.77 내지 10,000 ng/ml)와 함께 항온배양하고 4°C에서 45분 동안 항온배양하였다. 이어서, 세포를 FACS 완충액으로 3회 세척하고 4 μ g/ml의 농도에서 Squarix(Squarix Biotechnology, 독일 마를)에 의해 FITC와 접합된 단백질 L(Pierce/Thermo Scientific)과 함께 4°C에서 45분 동안 항온배양하였다. 이어서, 세포를 2회 세척하고 100 μ l FACS 완충액에 재현탁하였다. BD FACSArray(BD Biosciences)를 이용하여 유세포계측법에 의해 결합을 분석하였다. GraphPad Prism 6 One site-Specific binding을 이용하여 최대 결합의 절반의 EC50을 결정하였다.

[0481] 일가 CLDN6 결합 부위를 지니는 bi-(scFv)₂ 단백질은 낮은 상대적 결합 친화성을 나타냈다(EC50: 약 150 nM에 해당하는 약 8.3 μ g/ml). 비교하면 bstb_369/367 및 bstb_5726/5725는 약 19 nM에 해당하는 약 1.9 μ g/ml의 농도에서 최대 결합의 절반을 나타냈고 따라서 상대적 결합 친화성은 bi-(scFv)₂ 참조 단백질에 비해 약 8 배 높았다(도 6a). 이것은 표적 CLDN6에 대한 결합이 2가 결합 부위를 사용하고 이에 따라 결합력 효과를 실행하여 결합 친화성을 증가시킴으로써 강력하게 개선되었다는 것을 나타낸다. 주목할 만한 것은, 태그된 bstb 및 태그 없는 bstb의 결합 곡선이 일치한다는 것이다.

[0482] 본 발명자들은 2차 검출 시약으로서 4 μ g/ml의 농도의 단백질 L-FITC 또는 6 μ g/ml의 농도의 PE-접합된 마우스 항-인간 IgG(Fab 영역) 항체(antikoerper-online, 독일 아헨)를 사용하여 유세포계측법에서 bstb_5726/5725 단량체의 결합 특성에 미치는 HMW 종의 영향을 추가로 분석하였다. 최대 결합의 절반의 EC50은 100% 단량체, 97% 단량체/3% HMW 및 95% 단량체/5% HMW 간에 상이하지 않았다(이차 검출 시약에 따라 28 nM와 31 내지 34nM 사이에서 변동함). 도 6b에는 단백질 L-FITC에 의한 검출만이 예시적으로 도시되어 있다. 이러한 데이터는, 5% HMW가 bstb_369/367 분자의 활성화에 적절한 영향을 주지 않고 이에 따라 이러한 포맷이 제품 개발을 뒷받침함을 명백히 입증하는 세포독성 분석법의 데이터(실시예 2c 참조)에 따른다.

[0483] **실시예 5: 마우스 이종이식 모델에서의 효능**

[0484] 생체내에서 단백질 bstb_369/367의 치료 잠재성을 조사하기 위해, 면역 결핍 마우스 계통 NOD.Cg - Prkdc^{scid} IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ 또는 짧은 NSG(Jackson laboratory, Bar Harbour, 미국 메인주)를 선택하였다. 모든 마우스는 독일 마인츠 소재의 요하네스 구텐베르크 대학의 시설 동물 관리위원회(Institutional Animal Care Committee)의 지침에 따라 사용하였다.

[0485] **a. 단백질 bstb_369/367에 의한 마우스의 진행성 CLDN6 발현 종양의 치료**

[0486] 예시적인 시험에서, 체중이 21 내지 36g인 8주령의 수컷 및 암컷 NSG 마우스를 사용하였다. CLDN6-양성 OV-90 세포는 종양 세포로서 기능하였고 PBMC는 이펙터 세포로서 기능하였다.

[0487] 5×10^6 개 종양 세포를 피하(s.c.) 접종하고 이로부터 8일 후에 1×10^7 개의 PBMC를 복강내(i.p.) 투여하였다. PBMC를 주사한지 5일 후 말초혈에서 분석된 바와 같이 PBMC 생착된 마우스만을 종양 체적 및 성별(모든 군에서 두 성별 모두)에 따라 군으로 분류하였다. 처리는 군당 약 30mm³의 평균 종양 체적에서 시작하였다. 마우스를 주 3회(월요일-수요일-금요일) 복강내 주사에 의해 비히클(DPBS) 31 μ g/kg bstb(저용량) 또는 308 μ g/kg bstb(고용량)로 처리하였다. 군 "G1- 비히클"은 4마리의 마우스(n = 4)를 포함하였고, "G2 - bstb_369/367(저용량)"은 8마리의 마우스(n = 8)를 포함하였고 "G3 - bstb_369/367(고용량)"은 9 마리의 마우스 (n = 9)를 포함하였다. 처리군은 표 6에 요약되어 있다. 투여는 종양 체적의 관독에 따라 5주(G1), 6주(G2) 또는 4주(G3) 연속해서 복강내 실시하였다(도 7a). 주 2회 종양 치수를 디지털 눈금 캘리퍼(digital calibrated caliper)로 측정하고 종양 체적을 다음 식에 의해 계산하였다: 종양 체적[mm³] = 길이[mm] × (폭[mm])²/2. 종양 체적이 1500 mm³에 도달했을 때 또는 심각한 이환율(주로 이식편 대 숙주질환(GVHD)의 증상)의 경우 경추 탈골에 의해 마우스를

희생시켰다.

[0488] 도 7b는 bstb-처리군 G2 및 G3의 모든 마우스에서의 종양 증식 억제를 나타낸다. 항종양 효능은 비히클 대조군 G1과 비교한 종양 증식 억제/제거 및 생존으로서 측정하였다. 시험 항목 bstb_369/367로의 처리는 대조군과는 대조적으로 두 투약군 모두에서 종양 제거를 초래하였다. 더 높은 bstb_369/367 용량 군(G3)의 모든 9마리 마우스는 7회 주사 후 종양이 없었다. 더 낮은 bstb_369/367 용량 군 (G2)의 모든 8마리 마우스는 15회 주사 후 종양이 없었다. 종양이 없는 마우스를 GVHD 증상이 일어날 때까지 종양 재발에 대해 관찰하였다. 이 기간 동안 종양 재발의 발생률은 등록되지 않았다.

[0489] 카플란-마이어 생존 플롯(도 7c)의 작성을 위해, 치료 시작일을 0일째로서 간주하였다. 생존은 쌍별 비교를 위한 만텔-콕스 로그 순위 검정(Mantel-Cox log-rank test)과 조합된 카플란-마이어 생존 통계에 의해 결정된 바와 같이 대조군 G1에 비해서 두 bstb_369/367 처리군 모두에서 유의적으로 연장되었다. G2를 G1과 비교한 결과, p 값은 $p < 0.0001$ 이었고 G3을 G1과 비교한 결과 $p = 0.0043$ 이었다. 대조군 G1의 종양 생존기간은 31일인 것에 비해 처리군 G2 및 G3의 종양 생존기간은 각각 52일 및 42일이었다. 요약하면, bstb_369/367은 GVHD-제한 마우스 모델에서 종양 제거의 측면에서 매우 효율적이며 또한 생존의 측면에서도 유익한 것으로 입증되었다.

표 6

처리군

처리군(G)	마우스의 수 (n)	종양 세포	이펙터 세포	Bstb 단백질	Bstb 단백질 용량 [μg/kg]
G1	4	OV-90	PBMC	-	0
G2	8	OV-90	PBMC	369/367	31
G3	9	OV-90	PBMC	369/367	308

[0490]

b. 체중에 미치는 요법 영향의 결정

[0492] 각 마우스의 체중을 실험실 규모를 사용하여 주 2회 검사하였다. 어떤 군의 마우스라도 처리 기간에 걸쳐 유의적인 체중 감소를 나타내지 않았다(데이터는 미제시).

c. 비장세포 분리

[0494] 마우스를 안락사시킨 후, 비장을 해부하여 유세포계측 분석에 의해 인간 세포의 생착을 검출하였다. 비장세포 단리는 3 내지 5 ml 주사기의 멸균 플런저를 갖춘 50 ml 반응 튜브에 위치된 70 μm 세포 여과기(cell strainer)를 통해 비장을 분쇄하고 RT DPBS로 세포 여과기를 반복 플러싱하여 비장을 적출한 직후에 실시하였다. 단리된 비장세포를 원심분리하고 DPBS를 경사 분리하고 비장세포 펠렛을 10% DMSO가 보충된 1ml의 열 불활성화된 소 태아 혈청에 재현탁시켰다. 샘플을 즉시 -65 내지 -85℃에서 동결시키고 모든 마우스의 비장 세포 샘플이 완성될 때까지 저장하였다.

d. 마우스 비장에서 인간 T 림프구 생착의 분석

[0496] 비장세포 샘플의 완전한 수집물을 한번에 해동시키고, 모든 세포를 가온된 DPBS로 2회 세척하고 샘플당 1×10^6 개 비장세포를 형광-접합된 항체(BD Biosciences)와 함께 암실에서 4℃에서 20분 동안 항온배양하여, 항-hCD45-APC 염색에 의해 인간 세포의 생착을 검출하고 항-hCD3-FITC 염색에 의해 인간 T 세포의 비율을 검출하였다. 유세포계측 분석은 FACSCanto II(BD Biosciences)를 이용하여 실시하였다. 인간 T 세포 생착은 50 내지 95% hCD45/hCD3 이중 양성 일중항 비장세포의 비율에 의해 확인할 수 있었다(데이터 미제시).

실시예 6: 면역결핍 마우스에서 약동학적 거동의 추정

[0498] 마우스의 bstb_369/367 단백질의 대략적인 반감기 및 청소율(clearance)을 결정하기 위해, 본 발명자들은 9 내지 49주령의 암컷 NSG 마우스를 사용하였다. DPBS 중의 5 mg/kg 고도의 단량체(100%) bstb_369/367을 마우스마다 복강내 주사하였다. 군 크기는 3마리의 마우스로 구성되었으며, 각 군은 채혈의 한 시점에 대응하였다. 기본 값("주사 후 시간" = 0시간)으로서, 한 군에 비히클 완충액(DPBS)만을 주사하였다. 채혈을 위한 추가 시점은 15분, 1시간, 2시간, 3시간, 6시간 및 8시간으로서 설정하였다. 혈액을 직접 Li-헤파린 튜브(Microvette 300 LH, 독일 사르슈테트 뉴름브레흐트)에 수집하고 혈장을 당업자에게 공지된 바와 같이 원심분리하여 분리하였다. 혈장을 수거하고 즉시 액체 질소로 급속 냉동하고 사용하기 전까지 -65℃ 내지 -85℃에서 저장하였다.

- [0499] 혈장 중의 bstb_369/367의 정량을 위해 ELISA를 실시하였다. 이를 위해, 각 군의 혈장 분취액을 RT에서 해동하고, PBS/0.2% BSA에 희석시켰다. 희석된 bstb_369/367 함유 혈장 및 표준 열로서 bstb_369/367 단백질(0.39 ng/ml 내지 3.41 μ g/ml)을 염소 항-인간 IgG F(ab')₂(Abd Serotec, 영국 옥스포드)로 코팅된 MaxiSorp™ 플레이트(Thermo Scientific)에 첨가하고 3% 우유로 차단하였다. 세척 단계 후, 3.5 μ g/ml의 농도의 bstb_369/367 (가니메드 파마슈티칼스 게엠베하)의 항 CLDN6 결합 부위에 특이적인 마우스 IgG를 항온배양한 다음, 세척 단계 및 1:500 희석액 중의 알칼리-포스파타제 접합된 염소-항-마우스 IgG (Fc) 항체(Dianova, 독일 함부르크)와의 항온배양을 실시하였다. 마지막으로, 4-니트로페닐 포스페이트 이나트륨 염 6-수화물, 짧은 PNPP(PanReac AppliChem, 독일 다름슈타트)를 알칼리 포스파타제에 대한 기질로서 첨가하고 30분 후에 3M 수산화 칼륨으로 반응을 정지시켰다. ELISA를 405/492nm에서 마이크로플레이트 리더 M200 Pro(Tecan)를 사용하여 측정하였다. bstb_369/367 표준 곡선에 기반하여, 측정된 흡수 값을 농도 값으로 변환하였다.
- [0500] 도 8에 나타난 바와 같이, 34 μ g/ml의 최대 bstb_369/367 혈장 농도는 복강내 주사 후 1시간 이내에 도달하였다. 분석의 중점에서, 복강내 주사 후 8 시간째에 bstb_369/367 단백질은 여전히 혈청 중에서 검출 가능하였다(8 ng/ml).
- [0501] 장기간의 순환을 보장하는 환자에서의 종양 표적 및 T 세포에 대한 결합을 고려하면, 주 1회 또는 2회의 bstb 분자 주사 사이클을 생각할 수 있다.
- [0502] **실시예 7: 태그 없는 bstb_5726/5725를 이용한 생체내 용량 결정 연구**
- [0503] 이중 이식 모델을 도 9a에 예시된 스케줄에 따라 실시예 5에 설명된 바와 같이 설정하였다. 간략하게 언급하면, 10 내지 36주령의 44마리의 수컷 및 암컷 NSG에 OV-90(피하) 및 인간 PBMC(복강)를 생착시켰다. 6개의 처리군에는 한 군에 6마리씩 및 하나의 PBS 대조군에는 한 군에 8마리씩의 마우스로 하여 마우스를 7개의 군으로 무작위로 나누었다. 최적의 bstb_5726/5725 용량을 결정하기 위해, 실시예 5에서 사용된 bstb_369/367의 유효 용량(약 300 및 30 μ g/kg)을 상회 및 하회하는 농도, 정확히는 1,000 μ g/kg, 300 μ g/kg, 100 μ g/kg, 30 μ g/kg, 10 μ g/kg 및 3 μ g/kg을 선택하였다. 치료 시작일에 무작위로 나뉜 군의 평균 종양 체적은 약 150 mm³이었다. 처리는 종양 세포 접종 후 28일째부터 주 3회 복강내 적용하였다. 군당 총 11회 주사를 실시하였다. 종양을 디지털 캘리퍼를 사용하여 주 2회 측정하였다.
- [0504] 도 9b에 도시된 바와 같이, 종양 감소율은 용량과 상관관계가 있다. 치료 시작시 약 400 mm³의 종양 체적은 30 μ g/kg을 초과하는 bstb 용량에 의해서만 제거되는 임계 크기를 나타내는 것으로 보인다. 흥미롭게도, 종괴에서의 bstb의 축적 효과를 가정하면, 3 μ g/kg 이라도 시간 경과에 따라 종양 성장 및 크기 감소를 유도하였다.
- [0505] 이러한 설정에서, 100 μ g/kg은 매우 유효하고 안전한 용량으로서 결정되었다. 1,000 μ g/kg의 최고 용량 군에서는 본 발명자들은 피부의 황변 및 체중 감소와 같은 유해 효과를 관찰하였다.
- [0506] **실시예 8 : CLDN18.2 및 CD3를 표적으로 하는 이중특이적 항체 유도체의 생성, 정제 및 분석**
- [0507] **a. 서열 기원, bstb 작제물의 설계 및 발현 벡터로의 클로닝**
- [0508] 이중특이적 키메라 TriMAB(bstb) 작제물을 불변 영역의 C 말단에 2개의 단일쇄 가변 단편(scFv)를 갖춘 항원 결합 단편(Fab)으로서 설계하였다. Fab 결합 도메인은 인간 T 세포 수용체 성분 CD3 ϵ 에 특이적이다. 항-CD3 가변 중쇄 영역(V_H) 및 대응하는 가변 경쇄 영역(V_L) 도메인은 마우스 IgG TR66으로부터 유래한다(Lanzavecchia und Scheidegger 1987). 114번 위치의 시스테인(IMGT 명명법에 따름)은 세린으로 치환되었다. 불변 중쇄(C_H1) 및 불변 경쇄 영역(C_L)은 인간 기원의 것이다. 본 발명자들은 본 발명자들의 작제물을 위해 카파형 불변 경쇄 영역을 선택하였다. 2개의 scFv 결합 모이어티는 인간 종양 관련 항원(TAA) CLDN18.2에 특이적이다. 대응하는 V_H 영역과 V_L 영역은 NCT01630083 및 NCT01671774와 같은 현재 임상 시험 중인 키메라 IgG1IMAB361(가니메드 파마슈티칼스 게엠베하, 독일 마인츠)(예를 들어, Woll et al. 2014)로부터 유래한다. V_H 영역 및 V_L 영역의 배향 및 scFv 모이어티의 링커의 선택은 특허 출원 PCT/EP2013/003399에 기재되어 있는 bi-(scFv)₂ 분자 5506 및 5538와 상관관계가 있다. 도 18은 본 발명의 과정에서 사용된 V_H 도메인과 V_L 도메인의 아미노산 서열을 도시한다.
- [0509] 4개의 bstb 분자는 이들의 C_H1 영역 및 IMAB362 scFv 모이어티가 상이한 제1 세대로서 생성되었다. bstb_5730/5728 및 bstb_5731/5729은 인간 IgG1 유래의 C_H1 영역을 함유하고 bstb_5732/5728 및

bstb_5733/5729은 인간 IgG2 유래의 C_H1 영역을 함유한다. 또한, bstb_5730/5728 및 bstb_5732/5728은 V_H-V_L 배향으로 IMAB362 scFv 모이어티를 보유하는 반면, bstb_5731/5729 및 bstb_5733/5728은 V_L-V_H 배향으로 IMAB362 scFv 모이어티를 보유한다. 다음의 분자들이 bstb 분자의 형성에 대해 단백질 수준에서 획득되었다:

[0510] Bstb_5730/5728:

[0511] N - V_H^{αCD3}-C_H1(IgG1)-V_H^{αCLDN18.2}-V_L^{αCLDN18.2}-6xHis-태그 - C (Fd bstb_5730/5728)

[0512] N - V_L^{αCD3}-C_L-V_H^{αCLDN18.2}-V_L^{αCLDN18.2}-Strep-태그 - C (L bstb_5730/5728)

[0513] Bstb_5732/5728:

[0514] N - V_H^{αCD3}-C_H1(IgG2)-V_H^{αCLDN18.2}-V_L^{αCLDN18.2}-6xHis-태그 - C (Fd bstb_5732/5728)

[0515] N - V_L^{αCD3}-C_L-V_H^{αCLDN18.2}-V_L^{αCLDN18.2}-Strep-태그 - C (L bstb_5732/5728)

[0516] Bstb_5731/5729:

[0517] N - V_H^{αCD3}-C_H1(IgG1)-V_L^{αCLDN18.2}-V_H^{αCLDN18.2}-6xHis-태그 - C (Fd bstb_5731/5729)

[0518] N - V_L^{αCD3}-C_L-V_L^{αCLDN18.2}-V_H^{αCLDN18.2}-Strep-태그 - C (L bstb_5731/5729)

[0519] Bstb_5733/5729:

[0520] N - V_H^{αCD3}-C_H1(IgG2)-V_L^{αCLDN18.2}-V_H^{αCLDN18.2}-6xHis-태그 - C (Fd bstb_5733/5729)

[0521] N - V_L^{αCD3}-C_L-V_L^{αCLDN18.2}-V_H^{αCLDN18.2}-Strep-태그 - C (L bstb_5733/5729)

[0522] C = C-말단, C_H = 불변 중쇄 영역, C_L = 불변 경쇄 영역, Fd = 분해 가능한 단편(Fab의 중쇄 부분), L = Fab의 경쇄 부분, N = N-말단, V_H = 가변 중쇄 도메인, V_L = 가변 경쇄 도메인.

[0523] 표 7은 본 발명의 과정에서 생성된 TAA CLDN 18.2에 특이적인 bstb 작제물에 대한 정보를 요약한 것이다. 특이성, 단클론 항체(mAB) 유래의 서열, 기원, 코돈 이용도(codon usage) 및 추가적인 서열 특징에 관한 정보가 기재되어 있다. 표적 세포 결합 모이어티의 가변 도메인을 코딩하는 서열은 원래 가니메트 파마슈티칼스 게놈배하에서 입수하였다.

[0524] DNA 클로닝 및 pCEP4 발현 벡터 작제는 진아트(GeneArt)(GeneArt/Thermo Fisher Scientific)에 의해 수행되었다. MGWSCIIILFLVATATGVHS를 코딩하는 인간 IgG 분비 신호 서열을 배양 배지로의 단백질 분비를 위해 Fd 및 Lbstb V-영역 서열의 5' 말단 상류에 도입하였다. 20 아미노산(AA) 유연한 글리신-세린(GS) 펩티드 링커((GGGGS)₄)를 코딩하는 서열을 삽입하여 V_H - V_L 배향으로 항-TAA scFv의 조성물에 대한 V_H 및 V_L 도메인을 결합시킨 반면에, 25AA 유연한 (GGGGS)₅-펩티드 링커를 V_L - V_H 배향의 항-TAA scFv의 조성물을 위해 삽입하였다. 하나의 scFv 도메인 서열은 18 AA 링커(SGPGGGRS(GGGGS)₂)를 코딩하는 서열에 의해 Fd 부분(C_H1의 C 말단)에 연결시키고 다른 scFv 도메인 서열은 6 AA 링커(DVPGGS)를 코딩하는 서열에 의해 L-부분(C_L의 C 말단)에 연결시켰다. 상이한 링커 길이는 크기에 의해 Fd-부분과 L-부분을 구별할 수 있게 하였다. 제1 세대의 순수한 이중이량체 bstb의 정제를 용이하게 하기 위해 6xHis 태그 서열을 Fd-scFv 모이어티의 3' 말단에 첨가하고 Strep-태그를 L-scFv 모이어티의 3' 말단에 첨가하였다. 표 8에는 전체 bstb 단백질을 코딩하는 DNA 서열이 열거되어 있다. 표 9에는 시험관내 연구를 위해 사용된 모체 bi-(scFv)₂ 및 참조 bi-(scFv)₂의 단백질 코딩 DNA 서열이 열거되어 있다.

[0525] C-말단 6xHis 태그 및 Strep-태그는 단백질의 친화성 정제 및 검출 분석을 위해 사용되었다. 모든 작제물은 외부 시퀀싱 서비스에 의해 검증되었다. 작제 도식은 도 10a에 예시되어 있다. 제2 세대 bstb는 태그 없이 설계하고 디설파이드 가교를 scFv 모이어티에 도입하였다.

표 7

CLDN18.2 x CD3-bstb 항체 특징의 요약

내부 명칭	특이성	scFv V _H -V _L 영역의 기원	CLDN18.2- scFv V _H /V _L 배향	CDLN18.2-scFv 참조 bi-(scFv) ₂	Fab V _H -V _L 영역의 기원	코돈 이용도	C _H 1	태그	scFv 모이어티 내의 ds 가교
Bstb_5730/5728 (서열번호 30/32)	HS	IMAB362	V _H -V _L	5506 (서열번호 76)	TR66(C114S)	CG	IgG1	His/Strp	-
Bstb_5732/5728 (서열번호 31/32)	HS	IMAB362	V _H -V _L	5506 (서열번호 76)	TR66(C114S)	CG	IgG2	His/Strp	-
Bstb_5731/5729 (서열번호 33/35)	HS	IMAB362	V _L -V _H	5538 (서열번호 77)	TR66(C114S)	CG	IgG1	His/Strp	-
Bstb_5733/5729 (서열번호 34/35)	HS	IMAB362	V _L -V _H	5538 (서열번호 77)	TR66(C114S)	CG	IgG2	His/Strp	-
Bstb_5745/5747 (서열번호 36/37)	HS	IMAB362	V _H -V _L	5506 (서열번호 76)	TR66(C114S)	CG	IgG1	-	-
Bstb_5746/5748 (서열번호 38/39)	HS	IMAB362	V _L -V _H	5538 (서열번호 77)	TR66(C114S)	CG	IgG1	-	-
Bstb_5749/5751 (서열번호 40/41)	HS	IMAB362	V _H -V _L	5506 (서열번호 76)	TR66(C114S)	CG	IgG1	-	+
Bstb_5750/5752 (서열번호 42/43)	HS	IMAB362	V _L -V _H	5538 (서열번호 77)	TR66(C114S)	CG	IgG1	-	+

[0526]

[0527]

C_H1은 중쇄 불변 영역 1을 나타내고; CG는 크리스탈루스 그리세우스를 나타내고; ds는 디설파이드를 나타내고; IMAB는 이상적인 단일클론 항체를 나타내고; His는 6xHis-태그를 나타내고; HS는 호모 사피엔스를 나타내고; IgG는 면역글로불린 G를 나타내고; Strp는 *Strep*-태그를 나타낸다.

표 8

CLDN18.2 x CD3-bstb DNA 코딩 서열

플라스미드 내부 명칭	대응하는 bstb 단편	DNA 코딩 서열
#5728	L bstb_5730/5728, L bstb_5732/5728	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGT GCACTCTCAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGCCATCATGTCTGTAGCC CTGGCGAGAAAGTGACAATGACCTGCCGGGCTCCTCCTCCGTGTCTTAC ATGAACTGGTATCAGCAGAAAGTCCGGCACCTCCCCAAGCGGTGGATCTA CGACACCTCCAAGGTGGCTCTGGCGTGCCCTACAGATTCTCCGGCTCTG GCTCTGGCACCTCCTACAGCCTGACCATCTCCAGCATGGAAGCCGAGGAT GCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAACCCCTGACCTTTGG CGCTGGCACCAAGCTGGAAGTGAAGCGGACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGT TCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTCCGTG GTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAA GGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCAGGAAAGCGTCACCGAGC AGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCTGACCTGTCTCC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCA GGGCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCTTCAACCGGGGCGAGTGTGACG TGCTTGGTGGTAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCTGGCGCTGAATGGTCTC CGACCTGGCGCTCCGTGAAGCTGTCTGCAAGGCCCTCCGGCTACACCTT CACCAGCTACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCGGCTGGCCAGGGCTGG AATGGATCGGCAACATCTACCCCTCCGACTCCTACACCACTACACCCAG AAGTCAAGGACAAGGCCACCTGACCGTGGACAAGTCTCCTCCACCGC CTACATGCAGCTGTCCAGCCCCACCTCCGAGGACTCCGCGGTGTACTACT GCACCCGGTCTTGGCGGGCAACTCCTTCGACTATTGGGGCCAGGGCACC ACCCTGACAGTGTCTCTGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGCGGATCTGG CGGCGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCGACATCGTGATGACCCAGTCCC CCTCCAGCCTGACCGTGAACGCTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAG TCCTCCAGTCCCTGCTGAAGTCCGGCAACCAGAAGAACTACCTGACCTG GTATCAGCAGAAAGCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCT CCACCCGCGAGTGTGGCGTGCCCGATAGATTACCCGGCTCCGGCAGCGGC ACCGACTTTACCCTGACCATCTCCAGCGTGCAGGCCGAGGACTGGCCGT GTATTACTGTGCAACGACTACTCCTACCCCTTACCTTCGGCTCTGGCA CCAAGCTGGAAATCAAGTCTGCCTGGAGCCACCCACAGTTGAGAAAGTGA ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGT GCACTCTCAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGCCATCATGTCTGTAGCC CTGGCGAGAAAGTGACAATGACCTGCCGGGCTCCTCCTCCGTGTCTTAC ATGAACTGGTATCAGCAGAAAGTCCGGCACCTCCCCAAGCGGTGGATCTA CGACACCTCCAAGGTGGCTCTGGCGTGCCCTACAGATTCTCCGGCTCTG GCTCTGGCACCTCCTACAGCCTGACCATCTCCAGCATGGAAGCCGAGGAT GCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAACCCCTGACCTTTGG CGCTGGCACCAAGCTGGAAGTGAAGCGGACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGT TCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTCCGTG GTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAA GGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCAGGAAAGCGTCACCGAGC AGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCTGACCTGTCTCC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCA GGGCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCTTCAACCGGGGCGAGTGTGACG TGCTTGGTGGTAGCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCTGACC GTGACCGCTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAGTCTCCAGTCCCT GCTGAACTCCGGCAACCAGAAGAACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAAG CCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCTCCACCCGCGAGTCT GGCGTGCCCGATAGATTACCCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTTACCCT GACCATCTCCAGCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCCGTGATTACTGTGAGA ACGACTACTCTACCCCTTACCTTCGGCTCTGGCACCAAGCTGGAAATC AAGGGAGGCGGTGGTTCAGGCGGCGGAGGCAGCGGTGGAGGTGGTGTGG CGGTGGCGGTTCAGGGGGAGGTGGCTCGCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTG GCGCTGAAGTGGTCCGACCTGGCGCTCCGTGAAGTGTCTGCAAGGCC
#5729	L bstb_5731/5729, L bstb_5733/5729	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGT GCACTCTCAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGCCATCATGTCTGTAGCC CTGGCGAGAAAGTGACAATGACCTGCCGGGCTCCTCCTCCGTGTCTTAC ATGAACTGGTATCAGCAGAAAGTCCGGCACCTCCCCAAGCGGTGGATCTA CGACACCTCCAAGGTGGCTCTGGCGTGCCCTACAGATTCTCCGGCTCTG GCTCTGGCACCTCCTACAGCCTGACCATCTCCAGCATGGAAGCCGAGGAT GCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAACCCCTGACCTTTGG CGCTGGCACCAAGCTGGAAGTGAAGCGGACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGT TCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTCCGTG GTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAA GGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCAGGAAAGCGTCACCGAGC AGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCTGACCTGTCTCC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCA GGGCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCTTCAACCGGGGCGAGTGTGACG TGCTTGGTGGTAGCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCTGACC GTGACCGCTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAGTCTCCAGTCCCT GCTGAACTCCGGCAACCAGAAGAACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAAG CCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCTCCACCCGCGAGTCT GGCGTGCCCGATAGATTACCCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTTACCCT GACCATCTCCAGCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCCGTGATTACTGTGAGA ACGACTACTCTACCCCTTACCTTCGGCTCTGGCACCAAGCTGGAAATC AAGGGAGGCGGTGGTTCAGGCGGCGGAGGCAGCGGTGGAGGTGGTGTGG CGGTGGCGGTTCAGGGGGAGGTGGCTCGCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTG GCGCTGAAGTGGTCCGACCTGGCGCTCCGTGAAGTGTCTGCAAGGCC

[0528]

		TCCGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCGGCC TGGCCAGGGCCTGGAATGGATCGGCAACATCTACCCCTCCGACTCCTACA CCAACCTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCCTGACCGTGGACAAG TCCTCCTCCACCGCCTACATGCAGCTGTCCAGCCCCACCTCCGAGGACTC CGCCGTGTACTACTGCACCCGGTCTTGGCGGGCAACTCCTTCGACTATT GGGGCCAGGGCACCACCCTGACAGTGTCTCTTCTGCCTGGAGCCACCCA CAGTTCGAGAAGTGA
#5730	Fd bstb_5730/5728	ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGTACCGCCACCGGCGT GCACTCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTG GCGCCTCCGTGAAGATGTCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTTCACCCGG TACACCATGCACTGGGTCAAGCAGAGGCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCTCCCGGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCCTGACAACCGACAAGTCTCTCCACCGCCTACATG CAGCTGTCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCGGTGTACTACTGCGCCCG GTACTACGACGACCACTACTCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACAC TGACAGTGTCTAGCGCCTCCACCAAGGGCCCTCCGTGTCTCCCTCTGGCC CCTTCTCCAAAGTCCACCTCCGGCGGCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGT GAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAACCTCTGGCGCCC TGACCAAGCGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCCTG TACTCCCTGTCTCCGTGGTGACCGTGCTTCTCTCCCTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAACCAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACA AGCGGGTGGAGCCTAAGTCTGTCTCCGGCCCTGGGGGCGGACGACGCGGC GGAGGCGGATCCGGCGGAGGAGCTCTCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGG CGCTGAACTGGTCCGACCTGGCGCCTCCGTGAAGCTGTCTGCAAGGCCCT CCGGCTACACCTTCACCAAGCTACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCGGCCCT GGCCAGGGCCTGGAATGGATCGGCAACATCTACCCCTCCGACTCCTACAC CAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCCTGACCGTGGACAAGT CCTCTCCACCGCCTACATGCAGCTGTCCAGCCCCACCTCCGAGGACTCC GCCGTGTACTACTGCACCCGGTCTTGGCGGGGCAACTCCTTCGACTATTG GGGCCAGGGCACCACCCTGACAGTGTCTCTGGAGGCGGAGGATCTGGTG GTGGCGGATCTGGCGCGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCGACATCTGTG ATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGACCGTGACCGTGCGGAGAAAGTGAC CATGAGCTGCAAGTCTCCAGTCCCTGTCTGAACTCCGGCAACAGAGA ACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCCAGCCCCCAAGCTGTCTG ATCTACTGGGCCTCCACCCGCGAGTCTGGCGTGCCCGATAGATTACCGG CTCCGGCAGCGGCACCGACTTTACCCCTGACCATCTCCAGCGTGACGGCCG AGGACCTGGCGGTGATTACTGTGAGAACGACTACTCTTACCCCTTACCC TTCGGCTCTGGCACCAGCTGGAATCAAGGGCGGCTCCCAACCACCACCA TCACCACTGA
#5731	Fd bstb_5731/5729	ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGTACCGCCACCGGCGT GCACTCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTG GCGCCTCCGTGAAGATGTCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTTCACCCGG TACACCATGCACTGGGTCAAGCAGAGGCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCTCCCGGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCCTGACAACCGACAAGTCTCTCCACCGCCTACATG CAGCTGTCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCGGTGTACTACTGCGCCCG GTACTACGACGACCACTACTCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACAC TGACAGTGTCTAGCGCCTCCACCAAGGGCCCTCCGTGTCTCCCTCTGGCC CCTTCTCCAAAGTCCACCTCCGGCGGCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGT GAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAACCTCTGGCGCCC TGACCAAGCGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCCTG TACTCCCTGTCTCCGTGGTGACCGTGCTTCTCTCCCTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAACCAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACA AGCGGGTGGAGCCTAAGTCTGTCTCCGGCCCTGGGGGCGGACGACGCGGC GGAGGCGGATCCGGCGGAGGAGGCTCTGACATCGTGATGACCAAGTCCCC CTCCAGCCTGACCGTGACCGCTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAGT CCTCCAGTCCCTGCTGAACTCCGGCAACCAGAAAGTACCTGACCTGG TATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAGTGTCTGATCTACTGGGCCTC CACCCGCGAGTCTGGCGTGCCCGATAGATTACCGGCTCCGGCAGCGGCA CCGACTTTACCCCTGACCATCTCCAGCGTGACGGCCGAGGACCTGGCCGTG TATTACTGTGAGAACGACTACTCTTACCCCTTACCTTCCGGCTCTGGCAC CAAGCTGGAATCAAGGGAGGCGGTGGTTCAAGGCGCGGAGGCGAGCGGTG

[0529]

		GAGGTGGTAGTGGCGGTGGCGGTTACGGGGGAGGTGGCTCGCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCTGAACTGGTCCGACCTGGCGCCTCCGTGAAGCTGTCTTGAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACCAAGCTACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCGGCTGGCCAGGCGCTGGAATGGATCGGCAACATCTACCCCTCCGACTCCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCCTGACCGTGGACAAGTCTCTCCACCGCCTACATGCAGCTGTCCAGCCCCACCTCCGAGGACTCCGCGGTGTACTACTGCACCCGCTCTGGCGGGCAACTCCTTCGACTATTGGGGCCAGGGCACCACCTGACAGTGTCTCTTCAACACCACATCAACACTGA
#5732	Fd bstb_5732/5728	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGTGCACTCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTGGCGCTCCGTGAAGATGTCTTGAAGACCTCCGGCTACACCTTCACCCGGTACACCATGCAGTGGTCAAGCAGAGGCTGGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCAACCCCTCCCGGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCCTGACAACCGACAAGTCTCTCCACCGCCTACATGCAGTGTCTCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCGGTGTACTACTGCGCCGGTACTACGACGACCACTACTCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACATGACAGTGTCTAGCGCCTCCACCAAGGGCCCTTCGGTGTCTCTCTGGCCCTTGTCTCAAGTCCACCTCCGAAGGCACCGCCCTCTGGGTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAACCTCTGGCGCCC TGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGTGACCGTGCCCTTCCTCCAACCTCGGCACCCA GACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAGCCTAAGTCCGCTCCGGCCCTGGGGCGGACGCGAGCGGCGGAGGCGGATCCGGCGGAGGAGGCTCTCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCTGAAGTGGTCCGACCTGGCGCCTCCGTGAAGCTGTCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACCAAGTACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCGGCTGGCCAGGGCCTGGAATGGATCGGCAACATCTACCCCTCCGACTCCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCCTGACCGTGGACAAGTCTCTCTCCACCGCCTACATGCAGTGTCCAGCCCCACCTCCGAGGACTCCGCCGTGTACTACTGCACCCGGTCTGGCGGGGCAACTCCTTCGACTATTGGGGCCAGGGCACCACCTGACAGTGTCTCTGGAGGCGGAGGATCTGGTGTGGCGGATCTGGCGCGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGACCGTGACCGCTGGCGAGAAAGTGACATGAGCTGCAAGTCTCTCCAGTCCCTGCTGAACTCCGGCAACCAGAAGA ACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAGTGTCTGTACTACTGGGCTCCACCCGGAGTCTGGCGTGCCCGATAGATTACCCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTTACCCCTGACCATCTCCAGCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCCGTGTATTACTGTGAGAACGACTACTCCTACCCCTTCACCTTCGGCTCTGGCACCACCAAGCTGGAATCAAGGGCGGCTCCCAACCACCACCATCACCCTGA
#5733	Fd bstb_5733/5729	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGTGCACTCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTGGCGCTCCGTGAAGATGTCTTGAAGACCTCCGGCTACACCTTCACCCGGTACACCATGCAGTGGTCAAGCAGAGGCTGGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCAACCCCTCCCGGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCCTGACAACCGACAAGTCTCTCCACCGCCTACATGCAGTGTCTCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCGGTGTACTACTGCGCCGGTACTACGACGACCACTACTCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACATGACAGTGTCTAGCGCCTCCACCAAGGGCCCTTCGGTGTCTCTCTGGCCCTTGCTCCAAGTCCACCTCCGAAGGCACCGCCCTCTGGGTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAACCTCTGGCGCCC TGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGTGACCGTGCCCTTCCTCCAACCTCGGCACCCA GACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAGCCTAAGTCCGCTCCGGCCCTGGGGCGGACGCGAGCGGCGGAGGCGGATCCGGCGGAGGAGGCTCTGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGACCGTGACCGCTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAGTCTCCAGTCCCTGCTGAACTCCGGCAACCAGAAGAACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAGTGTCTGTACTACTGGGCTCCACCCGGAGTCTGGCGTGCCCGATAGATTACCCGGCTCCGGCAGCGGCA CCGACTTTACCCCTGACCATCTCCAGCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCCGTG

[0530]

		TATTACTGTCAGAACGACTACTCCTACCCCTTACCTTCGGCTCTGGCAG CAAGCTGGAAATCAAGGGAGGCGGTGGTTTCAAGCGGCGGAGGCAGCGGTG GAGGTGGTAGTGGCGGTGGCGGTTCAGGGGGAGGTGGCTCGCAGGTGCAG CTGCAGCAGCCTGGCGCTGAAGTGGTCCGACCTGGCGCCTCCGTGAAGCT GTCCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATCAACTGGG TCAAGCAGCGGCCTGGCCAGGGCCTGGAATGGATCGGCAACATCTACCCC TCCGACTCCTACCACTACAACCAAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCTT GACCGTGGACAAGTCTCCTCCACCGCCTACATGCAGCTGTCCAGCCCCA CCTCCGAGGACTCCGCGGTGTACTACTGCACCCGGTCTTGGCGGGGCAAC TCCTTCGACTATTGGGGCCAGGGCACCACCTGACAGTGTCTCTTCTCA CCACCACCATCACCACTGA
#5745	Fd bstb_5745/5747	ATGGGCTGGTCTGCATCATCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGT GCACTCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTG GCGCCTCCGTGAAGATGTCTTGCAGACCTCCGGCTACACCTTACCCCGG TACACCATGCAGTGGGTCAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCCTCCCGGGGCTACACCAACTACAACCAAGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCCCTGACAACCGACAAGTCTCTCTCCACCGCCTACATG CAGCTGTCTCCTGACCTCCGAGGACTCCGCGGTGTACTACTGCGCCCG GTACTACGACGACCACTACTCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACAC TGACAGTGTCTAGCGCCTCCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCC CCTTCTCCTCAAGTCCACCTCCGGCGGCACCGCGCTCTGGGCTGCCTGGT GAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAAGTCTGGCGGCC TGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCTGCGGTGCTGCAGTCTCTCGGCGCTG TACTCCCTGTCTCCGTGGTGACCGTGCCCTTCTCTCTCTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAACCAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACA AGCGGGTGGAGCCTAAGTCTGTCTCCGGCCCTGGGGGCGGACGACGCGG GGAGGCGGATCCGGCGGAGGAGGCTCTCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGG CGCTGAAGTGGTCCGACCTGGCGCCTCCGTGAAGCTGTCTTGAAGGCCT CCGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCGGCT GGCCAGGGCCTGGAATGGATCGGCAACATCTACCCCTCCGACTCTACAC CAACTACAACCAAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCTGACCGTGGACAAGT CCTCTCCACCGCCTACATGCAGCTGTCCAGCCCCACCTCCGAGGACTCC GCCGTGTACTACTGCACCCGGTCTGGCGGGGCAACTCCTTCGACTATTG GGGCCAGGGCACCACCTGACAGTGTCTCTGGAGGCGGAGGATCTGGTG GTGGCGGATCTGGCGGCGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCGACATCGTG ATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGACCGTGACCGTGGCGAGAAAGTGAC CATGAGCTGCAAGTCTCCAGTCTCTGCTGAAGTCCGGCAACCAAGAAGA ACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTG ATCTACTGGGCTCCACCCGCGAGTCTGGCGTGCCCGATAGATTACCCGG CTCCGGCAGCGGCACCGACTTTACCTTGACCATCTCCAGCGTGACGGCCG AGGACCTGGCGGTGATTACTGTGCAAGCACTACTCTACCCCTTACAC TTCGGCTCTGGCACCAAGCTGGAATCAAGTGA
#5746	Fd bstb_5746/5748	ATGGGCTGGTCTGCATCATCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGT GCACTCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTG GCGCCTCCGTGAAGATGTCTTGCAGACCTCCGGCTACACCTTACCCCGG TACACCATGCAGTGGGTCAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCCTCCCGGGGCTACACCAACTACAACCAAGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCCCTGACAACCGACAAGTCTCTCTCCACCGCCTACATG CAGCTGTCTCCTGACCTCCGAGGACTCCGCGGTGTACTACTGCGCCCG GTACTACGACGACCACTACTCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACAC TGACAGTGTCTAGCGCCTCCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCC CCTTCTCCTCAAGTCCACCTCCGGCGGCACCGCGCTCTGGGCTGCCTGGT GAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAAGTCTGGCGGCC TGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCTGCGGTGCTGCAGTCTCTCGGCGCTG TACTCCCTGTCTCCGTGGTGACCGTGCCCTTCTCTCTCTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAACCAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACA AGCGGGTGGAGCCTAAGTCTGTCTCCGGCCCTGGGGGCGGACGACGCGG GGAGGCGGATCCGGCGGAGGAGGCTCTGACATCGTGATGACCAAGTCCCC CTCCAGCCTGACCGTGACCGCTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAGT CCTCCAGTCTCTGCTGAAGTCCGGCAACCAAGAAGTACTGACCTGGTGG TATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCTC CACCCGCGAGTCTGGCGTGCCCGATAGATTACCGGCTCCGGCAGCGGCA

[0531]

		CCGACTTTACCTGACCATCTCCAGCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCCGTG TATTACTGTGAGAACGACTACTCCTACCCCTTCACCTTCGGCTCTGGCAC CAAGCTGGAAATCAAGGGAGGCGGTGGTTCAAGCGCGCGGAGGCAGCGGTG GAGGTGGTAGTGGCGGTGGCGGTTCAGGGGGAGGTGGCTCGCAGGTGCAG CTGCAGCAGCCTGGCGCTGAACCTGGTCCGACCTGGCGCCTCCGTGAAGCT GTCCCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATCAACTGGG TCAAGCAGCGCGCTGGCCAGGCGCTGGAATGGATCGGCAACATCTACCCC TCCGACTCCTACACCAACTACAACCAGAAGTCAAGGACAAGGCCACCT GACCGTGGACAAGTCTCCTCCACCGCTACATGCAGCTGTCCAGCCCCA CCTCCGAGGACTCCGCGGTGTACTACTGCACCCGGTCTTGGCGGGGCAAC TCCTTCGACTATTGGGGCCAGGGCACCACCTGACAGTGTCTCTTGA
#5747	L bstb_5745/5747	ATGGGGCTGGTCTGCATCATCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGCGT GCACTCTCAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGCCATCATGTCTGCTAGCC CTGGCGAGAAAGTGACAATGACCTGCCGGGCTCCTCCTCCGTGTCTTAC ATGAAGTGGTATCAGCAGAAGTCCGGCACCTCCCCAAGCGGTGGATCTA CGACACCTCCAAGGTGGCCTCTGGCGTGCCCTACAGATTCTCCGGCTCTG GCTCTGGCACCTCCTACAGCCTGACCATCTCCAGCATGGAAGCCGAGGAT GCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAACCCCCCTGACCTTTGG CGCTGGCACCAGCTGGAAGTGAAGCGGACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGT TCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTG GTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAA GGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCAGGAAAGCGTCACCGAGC AGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCTGACCTGTCC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCACCA GGGCCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCTTCAACCGGGGCGAGTGTGACG TGCTTGGTGGTAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCTGAAGTGGTC CGACCTGGCGCTCCTGGAAGTGTCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTT CACCAGCTACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCGGCTGGCCAGGGCTGG AATGGATCGGCAACATCTACCCCTCCGACTCCTACCCAACATACAAACAG AAGTTCAAGGACAAGGCCACCTGACCGTGGACAAGTCTCCTCCACCGC CTACATGCAGCTGTCCAGCCCCACCTCCGAGGACTCCGCGGTGTACTACT GCACCCGCTCCTGGCGGGCACTCCTTCGACTATTGGGGCCAGGGCACCC ACCCTGACAGTGTCTCTGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGCGGATCTGG CGGCGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCGACATCGTGATGACCCAGTCCC CCTCCAGCCTGACCGTGACCGCTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAG TCCTCCAGTCCCTGCTGAAGTCCGGCAACAGAGAAGTACCTGACCTG GTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCT CCACCCGCGAGTCTGGCGTGCCCGATAGATTACCGGCTCCGGCAGCGGC ACCGACTTTACCTGACCATCTCCAGCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCCGT GTATTACTGTGAGAAGCACTACTCCTACCCCTTACCTTCGGCTCTGGCA CCAAGCTGGAAATCAAGTGA
#5748	L bstb_5746/5748	ATGGGGCTGGTCTGCATCATCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGCGT GCACTCTCAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGCCATCATGTCTGCTAGCC CTGGCGAGAAAGTGACAATGACCTGCCGGGCTCCTCCTCCGTGTCTTAC ATGAAGTGGTATCAGCAGAAGTCCGGCACCTCCCCAAGCGGTGGATCTA CGACACCTCCAAGGTGGCCTCTGGCGTGCCCTACAGATTCTCCGGCTCTG GCTCTGGCACCTCCTACAGCCTGACCATCTCCAGCATGGAAGCCGAGGAT GCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAACCCCCCTGACCTTTGG CGCTGGCACCAGCTGGAAGTGAAGCGGACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGT TCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTG GTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAA GGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCAGGAAAGCGTCACCGAGC AGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCTGACCTGTCC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCACCA GGGCCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCTTCAACCGGGGCGAGTGTGACG TGCTTGGTGGTAGCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGACC GTGACCGCTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAGTCTCCAGTCCCT GCTGAAGTCCGGCAACAGAGAAGTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGC CCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCTCCACCGCGAGTCT GGCGTGCCCGATAGATTACCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTTACCT GACCATCTCCAGCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCCGTGTATTACTGTGAGA ACGACTACTCCTACCCCTTACCTTCGGCTCTGGCACCAGCTGGAAATC

[0532]

		AAGGGAGGCGGTGGTTTCAGGCGGCGGAGGCAGCGGTGGAGGTGGTAGTGG CGGTGGCGGTTTCAGGGGGAGGTGGCTCGCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTG GCGCTGAAGTGGTCCGACCTGGCGCCTCCGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCC TCCGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCGGCC TGGCCAGGGCCTGGAATGGATCGGCAACATCTACCCCTCCGACTCCTACA CCAACTACACCCAGAAGTTCAGGACAAAGGCCACCCCTGACCGTGGACAAAG TCCCTCCTCCACCGCTACTGCAGCTGTCCAGGCCACCTCCGAGGACTC CGCCGTGTACTACTGCACCGGTCTGCGCGGGCAACTCCTTCGACTATT GGGCCAGGGCACCCCTGCAGTGTCTCTTGA
#5749	Fd bstb_5749/5751	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGCGCT GCACTCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTG GCGCTCCGTGAAGATGTCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTTCACCCGG TACACCATGCAGTGGGTCAAGCAGAGGCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCCTCCGGGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCCCTGACAACCGACAAGTCTCCTCCACCGCTTACATG CAGCTGTCTCCTGACCTCCGAGGACTCCGGCGTGTACTACTGCGCCCG GTACTACGACGACCACTACTCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACACAC TGACAGTGTCTAGCGCCTCCACCAAGGGCCCTTCCGTGTCTCCTCTGGCC CCTTCTCCAAAGTCCACCTCCGGCGGCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGT GAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAACCTTGGCGCCC TGACCAGCGCGCTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCTCGGCCTG TACTCCCTGTCTCCGTGGTGACCGTGCTTCTCCTCCTCGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACA AGCGGGTGGAGCCTAAGTCTGTCTCCGGCCCTGGGGGGGACGACGAGGCC GGAGGGCGGATCCGGCGGAGGAGCTCTCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGG CGCTGAAGTGGTCCGACTTGGCGCCTCCGTGAAGCTGTCTGCAAGGCT CCGCTACACCTTCACCACTACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCGCCT GGCCAGTGCCTGGAATGGATCGGCAACATCTACCCCTCCGACTCTTACAC CAACTACAACCAGAAGTTCAGGACAAGGCCACCCCTGACCGTGGACAAGT CCTCCTCCACCGCTTACATGCAGTGTCTCAGCCCACTCCGAGGACTTCC GCGGTGTACTACTGCACCCGGTCTGCGGGGGCAACTCCTTCGACTATTG GGGCGAGGCGACCAACCCTGACAGTGTCTCTGGAGGCGGAGGATCTGGTG GTGGCGGATCTGGCGCGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCGACATCGTG ATGACCCAGTCCCGCTCCAGCCTGACCGTGACCGCTGGCGAGAAAGTGAC CATGAGCTGCAAGTCTCCAGTCCCTGCTGAAGTCCGGCAACCAAGAGA ACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTG ATCTACTGGGCCTCCACCCGCGAGTCTGGCGTGCCCGATAGATTACCGG CTCCGGCAGCGGCACCGACTTTACCCCTGACCATCTCCAGCGTGACGGCC AGGACCTGGCCGTGTATTACTGTGACAAGCACTACTCCTACCCCTTACAC TTCGGCTGCGGCGACCAAGCTGGAATCAAGTGA
#5750	Fd bstb_5750/5752	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGCGCT GCACTCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTG GCGCTCCGTGAAGATGTCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTTCACCCGG TACACCATGCAGTGGGTCAAGCAGAGGCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCCTCCGGGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCCCTGACAACCGACAAGTCTCCTCCACCGCTTACATG CAGCTGTCTCCTGACCTCCGAGGACTCCGGCGTGTACTACTGCGCCCG GTACTACGACGACCACTACTCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACACAC TGACAGTGTCTAGCGCCTCCACCAAGGGCCCTTCCGTGTCTCCTCTGGCC CCTTCTCCAAAGTCCACCTCCGGCGGCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGT GAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAACCTTGGCGCCC TGACCAGCGCGCTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCTCGGCCTG TACTCCCTGTCTCCGTGGTGACCGTGCCCTCCTCCTCCTCGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACA AGCGGGTGGAGCCTAAGTCTGTCTCCGGCCCTGGGGGGGACGACGAGCGC GGAGGGCGGATCCGGCGGAGGAGGCTCTGACATCGTGATGACCCAGTCCCC CTCCAGCCTGACCGTGACCGCTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAGT CCTCCAGTCCCTGCTGAAGTCCGGCAACCAAGAACTACCTGACCTGG TATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCTCTC CACCGCGAGTCTGGCGTGCCCGATAGATTACCGGCTCCGGCAGCGGCA CCGACTTTACCCCTGACCATCTCCAGCTGCAGGCCGAGGACCTGGCCGTG TATTAAGTGTGACAAGCACTACTCCTACCCCTTACCTTGGGCTGCGGCAC

[0533]

		CAAGCTGGAATCAAGGGAGGCGGTGGTTCAGGCGGCGGAGGCAGCGGTG GAGGTGGTAGTGGCGGTGGCGGTTCAGGGGGAGGTGGCTCGCAGGTGCAG CTGCAGCAGCCTGGCGCTGAACTGGTCCGACCTGGCGCCTCCGTGAAGCT GTCTTGCAGGGCCTCCGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATCAACTGGG TCAAGCAGCGGCTGGCCAGTGCCTGGAATGGATCGGCAACATCTACCC TCCGACTCCTACACCAACTACAACAGAGTTCAAGGACAAGGCCACCT GACCGTGGACAAGTCTCTCTCCACCGCTACATGCAGCTGTCCAGCCCA CCTCCGAGGACTCCGCGGTGTACTACTGCACCCGGTCTTGGCGGGGCAAC TCCTTCGACTATTGGGGCCAGGGCACCACCTGACAGTGTCTCTTGA
#5751	L bstb_5749/5751	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGCGGT GCACTCTCAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGCCATCATGTCTGCTAGCC CTGGCGAGAAAGTGACAATGACCTGCCGGGCTCCTCCTCCGTGTCTTAC ATGAACTGGTATCAGCAGAAGTCCGGCACCTCCCCAAGCGGTGGATCA CGACACCTCCAAGGTGGCTCTGGCGTGCCTACAGATTCTCCGGCTCTG GCTCTGGCACCTCCTACAGCCTGACCATCTCCAGCATGGAAGCCGAGGAT GCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAACCCCTGACCTTTGG CGCTGGCACCAAGCTGGAAGTGAAGCGGACCGTGGCGGCTCCTTCCGTGT TCATCTTCCCTCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTCCGTG GTGTGCCCTGCTGAACAATTCTACCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAA GGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCAGGAAAGCGTCAACGAGC AGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCTGTCTCCACCTGACCTGTCTCC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCACCA GGGCTGTCCAGCCTGTGACCAAGTCTTCAACCGGGGCGAGTGTGACG TGCTTGGTGGTAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCTGGCGCTGAAGTGGT CGACCTGGCGCTCCTGTGAAGTGTCTTCAAGGCTCCGGCTACACCTT CACCAGCTACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCGGCTGGCCAGTGCCTGG AATGGATCGGCAACATCTACCCCTCCGACTCCTACACCAACTACAACCTG AAGTTCAAGGACAAGGCCACCTGACCGTGGACAAGTCTCTCTCCACCGC CTACATGCAGCTGTCCAGCCCACTCCGAGGACTCCGCGGTGTACTGT GCACCCGGTCTTGGCGGGCAACTCCTTCGACTATTGGGGCAGGGCACC ACCTGACAGTGTCTCTGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGCGGATCTGG CGCGGCTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCGACATCGTGATGACCCAGTCCC CCTCCAGCTGACCGTGAACGCTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAG TCCTCCAGTCCCTGCTGAACCTCCGGCAACAGAAAGTACCTGACCTG GTATCAGCAGAAGCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGCGCT CCACCCGCGAGTGTGGCGTGCCTGATAGATTACCGGCTCCGGCAGCGGC ACCGACTTACCTGACCATCTCCAGCTGCAGGCCGAGGACCTGGCGCT GTATTACTGTCAAGCAGTACTCTACCCCTTACCTTCCGCTGCGGCA CCAAGCTGGAATCAAGTGA
#5752	L bstb_5750/5752	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGCGGT GCACTCTCAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGCCATCATGTCTGCTAGCC CTGGCGAGAAAGTGACAATGACCTGCCGGGCTCCTCCTCCGTGTCTTAC ATGAACTGGTATCAGCAGAAGTCCGGCACCTCCCCAAGCGGTGGATCA CGACACCTCCAAGGTGGCTCTGGCGTGCCTACAGATTCTCCGGCTCTG GCTCTGGCACCTCCTACAGCCTGACCATCTCCAGCATGGAAGCCGAGGAT GCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAACCCCTGACCTTTGG CGCTGGCACCAAGCTGGAAGTGAAGCGGACCGTGGCGGCTCCTTCCGTGT TCATCTTCCCTCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTCCGTG GTGTGCCCTGCTGAACAATTCTACCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAA GGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCAGGAAAGCGTCAACGAGC AGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCTGTCTCCACCTGACCTGTCTCC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCACCA GGGCTGTCCAGCCTGTGACCAAGTCTTCAACCGGGGCGAGTGTGACG TGCTTGGTGGTAGCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGACC GTGACCGCTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAGTCTTCCAGTCTCT GCTGAACCTCCGGCAACAGAAAGTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGC CCGGCAGCCCCCAAGCTGTGATCTACTGGGCTCCACCCGCGAGTCT GGCGTGCCGATAGATTACCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTACCT GACCATCTCCAGCTGCAGGCGGAGGACCTGGCGGTGTATTACTGTGAGA ACGACTACTCTACCCCTTACCTTCCGGCTGCGGCACCAAGCTGGAATC AAGGGAGGCGGTGGTTCAGGCGGCGGAGGCAGCGGTGGAGGTGGTAGTGG CGGTGGCGGTTTCAGGGGAGGTGGCTCGCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTG

[0534]

		GCGCTGAAGTGGTCCGACCTGGCGCTCCGTGAAGCTGTCTGCAAGGCC TCCGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCGGCC TGGCCAGTGCCTGGAATGGATCGGCAACATCTACCCCTCCGACTCCTACA CCAATAACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCTGACCGTGGACAAG TCCTCTCCACCGCTACATGCAGCTGTCCAGCCCACTCCGAGGACTC CGCGGTGTACTACTGCACCGGTCTTGGCGGGCAACTCCTTCGACTATT GGGGCCAGGGCACCACCTGACAGTGTCTCTTGA
--	--	---

[0535]

표 9

CLDN18.2 x CD3-bi-(scFv)₂ DNA 코딩 서열

플라스미드 내부 명칭	대응하는 bi-(scFv) ₂	DNA 코딩 서열
#5506	bi-scFv_5506	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGT GCACTCTCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCTGAAGTGGTCCGACCTG GCGCCTCCGTGAAGCTGTCTTCAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACCAGC TACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCGGCCTGGCCAGGGCCTGGAATGGAT CGGCAACATCTACCCCTCCGACTCCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCTGACCGTGGACAAGTCTCTCCACCGCCTACATG CAGCTGTCCAGCCCCACCTCCGAGGACTCCGCCGTGTACTACTGCACCCG GTCTTGGCGGGGCAACTCCTTCGACTATTGGGGCCAGGGCACACCTGA CAGTGTCTCTGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGCGGATCTGGCGGCGGT GGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTCCAG CCTGACCGTGACCGCTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAGTCTCC AGTCCCTGCTGAACTCCGGCAACCAGAAGAACTACCTGACCTGGTATCAG CAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCTCCACCCG CGAGTCTGGCGTGCCCGATAGATTACCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACT TTACCCTGACCATCTCCAGCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCCGTGTATTAC TGTCAAGCACTACTCTACCCCTTACCTTCGGCTCTGGCACCAAGCT GGAATCAAGTCTGGCGGAGGCGGATCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTG GCGCTGAGCTGGCTAGACTGGCGCCTCCGTGAAGATGTCTGCAAGACC TCCGGCTACACCTTACCCGGTACACCATGCACTGGGTCAAGCAGAGGCC TGGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCAACCCCTCCCGGGGCTACA CCAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCCCTGACAACCGACAAG TCCTCCTCCACCGCCTACATGCAGCTGTCTCCTGACCTCCGAGGACTC CGCCGTGTACTACTGCGCCCGGTACTACGACGACCACTACTCCTGGACT ACTGGGGCCAGGGCACCACACTGACAGTGTCTAGCGGTGGTGGAGGAAGC GGAGGGGGTGGTAGCGGTGGTGGAGGCTCTGGCGGGGGAGGAGTCAGAT CGTGCTGACCCAGTCTCCCGCCATCATGTCTGCTAGCCCTGGCGAGAAAG TGACAATGACCTGCCGGGCTCCTCCTCCGTGTCTACATGAAGTGGTAT CAGCAGAAGTCCGGCACCTCCCCAAGCGGTGGATCTACGACACCTCAA GGTGGCCTCTGGCGTGCCCTACAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCT CCTACAGCCTGACCATCTCCAGCATGGAAGCCGAGGATGCCGCCACCTAC TACTGCCAGCAGTGGTCTCCTCAACCCCTGACCTTTGGCGCTGGCACCAA GCTGGAAGTGAAGGGCGGCTCTCACCACCACCATCACCCTGA
#5538	bi-scFv_5538	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGT GCACTCTGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGACCGTGACCG CTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAGTCTCCAGTCCCTGCTGAAC TCCGGCAACCAGAAGAACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCA GCCCCCAAGCTGTGTACTACTGGGCTCCACCCGCGAGTCTGGCGTGC CCGATAGATTACCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTTACCCTGACCATC TCCAGCGTGACGCGGAGGACCTGGCCGTGTATTACTGTGACAACGACTA CTCTACCCCTTACCTTCGGCTCTGGCACCAAGCTGGAATCAAGGGAG GCGGTGGTTGAGCGGCGGAGGAGCGGTGGAGGTGGTGGTGGCGGTGGC GGTTCAGGGGGAGGTGGCTCGCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCTGA ACTGGTCCGACCTGGCGCCTCCGTGAAGCTGTCTGCAAGGCCTCCGGCT ACACCTTACACGCTACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCGGCTGGCCAG GGCTGGAATGGATCGGCAACATCTACCCCTCCGACTCCTACACCAACTA

[0536]

		CAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCCTGACCGTGGACAAGTCTCCTCCACCGCCTACATGCAGCTGTCCAGCCCCACCTCCGAGGACTCCGCGGTGTACTACTGCAACCGGTCTTCCGACTATTGGGGCCAAGGACCAACCTGACAGTGTCTTCTTGGCGGAGGCGGATCCCAAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGGTGAGCTGGCTAGACCTGGCGCCTCCGTGAAGATGTCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTTACCCGGTACACCATGCATGGTCAAGCAGAGGCTGGACAGGGCTGGAAATGGATCGGCTACATCAACCCTCCCGGGGCTACACCAACTACAACAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACTGACAACCGACAAGTCTCTCCACCGCTACATGCAGCTGTCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCGGTGTACTACTGCGCCGGTACTACGACGACACTACTCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACACTGACAGTGTCTAGCGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGCGGATCTGGCGGCGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCCAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGCATCATGTGTGCTAGCCCTGGCGAGAAAGTGACAATGACCTGCCGGGCTCCTCCTCGGTGTCTTACATGAAGTGTATCAGCAGAAGTCCGGCACCTCCCCAAGCGGTGGATCTACGACACCTCCAAGGTGGCTCTGGCGTGGCTTACAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCTCCTACAGCCTGACCATCTCCAGCATGGAAGCCGAGATGCCGCCACCTTACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAACCCCTGAGTGGCGCTGGCACCAAGCTGGAAGTGAAGGCGGGCTCTACCACCAACCATCACCACTGA
#5376	bi-scFv "플레이트 참조"	ATGGGATGGTCTGTCATCATCTCTTCTGGTGGCTACCGCCACCGCGGTGCACAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGAGCTGAAGTGGTGCAGCGCTGGAGCCAGCTGAAGCTGTCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCAACGACTACTGGATCAACTGGGTGAAGCAGCGGCTGGACAGGGCTGGAAATGGATCGGCAACATCTACCCAGCGACAGCTACACCAACTACAACAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCCTGACCGTGGACAAGAGCAGCAGCAGCGCTACATGCAGCTGTCCAGCCACCTCCGAGGACAGCGCGGTGTACTACTGACCAAGTGGCGGGGCAACAGCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCACACTGACAGTGCAGCGGAGGAGGGGATCTGGCGGGGAGGAAAGCGGAGGGGGGGAAGCGCATCGTGATGACCCAGAGCCCGCAGCAGCTGACCGTGCAGCGCGGGGAAAGGTGACCATGAGCTGCAAGAGCAGCCAGAGCTGCTGAACAGCGGCAACAGAGAACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCCGGGAGAGCGGCGTGCCCGACCGGTTTACCGGCTCCGGCTCCGGCACCGACTTACCCCTGACCATCAGCGGTGCAGGCCGAGGACCTGGCGGTGTATTACTGTGAGAAGCAGTACAGCTACCCCTTACCTTCGGCAGCGGCACCAAGCTGGAAATCAAGAGCGGAGGGGAGGATCCGATATCAAGCTGCAGCAGAGCGGAGCTGAAGTGGCTAGGCCAGGCGCTCCGTGAAGATGAGCTGTAAAGCTCCGGCTATACCTTTACCCGGTACACCATGCACTGGGTGAAACAGAGGCCCGGACAGGGGCTGGAATGGATTGGCTATATCAACCCCTCCCGGGGCTACACAAATTACAATCAGAAATTCAAAGATAAAGCCACTGACAACCGACAAGTCCAGCTCCACAGCTATATGCGAGCTGTCTCCTGACCAAGCAGGAGTCTGCCGTGTACTATTGCGCCGGTACTACGACGACCACTACAGCTGGATTATTGGGGGAGGGGCAACACTGACAGTCTCCAGCGTGGAGGGCGGACGCGGAGGATCTGGCGGAGCGGCGCTCTGGGGCGTGCAGCAGATCCAGTGACCCAGTCCCCCGCATCATGAGCGCCAGCCCTGGCGAGAAGGTGACAATGACCTGCCGGGCCAGCAGCAGCGTGAGCTACATGAATTGGTATCAGCAGAAAAGCGGCACAGCCCCAAGCGGTGGATCTACGACACCAGCAAGGTGGCTCCGGCGTGCCTACAGATTCTCCGGCTCCGGCTCTGGCACAGCTACAGCTGACAATTTCTAGCATGGAAGCCGAGGACGCCGCCACTACTACTGCCAGCAGTGGAGCAGCAACCCCTGACCTTTGGCGCGGGAACAAAGCTGGAAGTGAAGTGA

[0537]

[0538]

실시예 9: 시험관내 세포독성 분석에서 4가지 CLDN18.2 x CD3-bstb의 특이 적 용해 활성의 비교

[0539]

단백질 bstb_5730/5728, bstb_5731/5729, bstb_5732/5728 및 bstb_5733/5729 (모두 태그를 포함하지만 scFv 모이어티 내에 디설파이드 가교를 포함하지 않는다)를 제조하고 실시예 1b 및 1c에서 설명된 바와 같이 정제하였다. SEC에 의해 고도의 단량체 종을 분리하기 전에, 단백질(50 내지 77% 단량체 종)의 기능성을 기본적으로 실시예 2a에서 설명된 바와 같이 시험관내 루시퍼라제 세포독성 분석에서 조사하였다. 편차에 대해서는 이하 설명한다.

[0540]

예시적인 연구에서는, 안정하게 루시퍼라제 및 CLDN18.2를 발현하는 인간 위암 세포주 NUGC-4_hCLDN18.2를 표적 세포주로서 사용하였다. 인간 CLDN18.2 음성 유방 암종 세포주 MDA-MB-231은 특이성 대조군으로서 기능하였다. PBMC 이펙터 세포 및 표적 세포를 47.44 aM 내지 47.44 nM의 농도 범위에서 bstb 단백질의 10포인트 10배 연속 희석액 결과 함께 항온배양하였다.

[0541]

도 11에 도시된 바와 같이, 모든 4종의 CLDN18.2 x CD3-bstb 분자(도 10b)는 예시적인 연구에서 48시간의 공동-항온배양 후에 NUGC-4_hCLDN18.2 세포의 효율적인 용해를 초래하였다. 최대 93%의 표적 세포가 용해되었다. CLDN18.2-음성 대조군 세포주 MDA-MB-231에서 용해는 관찰되지 않았다. SEC 전의 단량체 함량 및 세포독성 분석법에서의 효율과 관련하여, IgG1의 C_H1 모이어티를 보유하는 2종의 bstb 돌연변이체 bstb_5730/5728 및 bstb_5731/5729를 태그 없이 그리고 scFv 모이어티 내의 디설파이드 가교와 함께 또는 없이 추가 연구를 위해 선택하였다.

[0542]

실시예 10: 정제된 태그 없는 CLDN18.2 x CD3-bstb의 물리 화학적 특성의 비교

[0543]

단백질 bstb_5745/5747, bstb_5746/5748, bstb_5749/5751 또는 bstb_5750/5752를 함유하는 일시적으로 형질감염된 Expi293FTM 세포의 세포 배양 상청액을 SupracapTM 50 깊이 필터 캡슐(Pall Corporation, 미국 뉴욕주 포

트위싱턴)를 이용하여 여과하고 이어서 단백질 정제 과정에 적용하였다.

[0544] 상이한 정제된 CLDN18.2 x CD3-bstb 단백질의 응집 상태를 분석하기 위해, 본 발명자들은 크기 배제 TSK겔 G3000SWxl 컬럼(300×7.8mm, Tosoh Bioscience)을 갖춘 Dionex Ultimate 3000(Thermo Scientific)를 이용하여 크기 배제 고성능 액체 크로마토 그래피(SE-HPLC)를 실시하였다. 컬럼을 SE-HPLC 완충액(0.3M Na₂HPO₄, pH 7.2)로 세정하고 bstb 단백질을 등용매 용출에 의해 분리하였다. bstb_5745/5747 및 bstb_5746/5748은 비교적 소량의 단량체 단백질(각각 약 60% 및 약 40%)을 나타 냈지만, bstb_5749/5751 및 bstb_5750/5752는 정제 후 고도의 단량체였다(각각 약 96% 및 약 89%)(도 12a 및 도 12b). 또한, RT에서 bstb_5745/5747 및 bstb_5746/5748을 단시간 저장한 결과 가시적 응집체가 형성되었다.

[0545] bstb_5745/5747 및 bstb_5749/5751뿐만 아니라 bstb_5746/5748 및 bstb_5750/5752 각각은 각각의 항-CLDN18.2 scFv 모이어티의 2개의 아미노산만이 상이하고 이에 따라 bstb_5749/5751 및 bstb_5750/5752의 항-CLDN18.2 scFv 모이어티 내에 디설파이드 가교가 형성될 수 있다. 이러한 항-CLDN18.2 scFv 모이어티 내의 추가적인 디설파이드 가교의 도입은 단량체 단백질의 형성을 촉진하여 각각의 bstb의 물리화학적 특성을 개선시킨다.

[0546] 초기 정제 후 모든 bstb 돌연변이체를 PBS로 투석하고 마지막으로 HiLoad 26/600 Superdex 200pg 컬럼(GE Healthcare Life Sciences)을 이용하여 분취용 SEC에 적용하여, 활성 및 결합의 추가 특성분석을 위해 단량체 분획을 약 100%까지 농축시켰다.

[0547] **실시예 11 : CLDN18.2 x CD3 bstb 및 bi-(scFv)₂ 단백질의 활성의 직접 비교**

[0548] 단량체 단백질 bstb_5749/5751 및 bstb_5750/5752(모두 scFv 모이어티 내에 디설파이드 가교를 포함함) 및 이들의 각각의 bi-(scFv)₂ 유사체 bi-scFv_5506 및 bi-scFv_5538(디설파이드 가교 없음)을 실시예 9 하에 기본적으로 설명된 바와 같이 시험관내 루시퍼라제 세포독성 분석법에서 조사하였다. 이전에 설명된 것 이외에, 24.64 fM 내지 48.11 nM의 농도 범위의 10포인트, 5배 연속적 희석액 열을 적용하였다. 또한, 참조물을 정규화 이유로 각 플레이트에 포함시켰다. bstb 및 bi-(scFv)₂ 단백질을 등몰 농도로 사용하였다.

[0549] bstb_5750/5752는 bstb_5749/5751(70.94 pM)보다 1.8배 낮은 EC₅₀(40.63 pM)를 나타내고(도 13a, 좌측 플롯), 이에 따라 첫번째 bstb의 다소 높은 활성을 특정 한다. 두 bstb 단백질 모두는 가장 높은 농도에서 약 95% 표적 세포의 효율적인 용해를 초래하였다. CLDN18.2-음성 대조군 세포주 MDA-MB-231에서 용해는 관찰되지 않았다(데이터 미제시). 흥미롭게도, 각각의 bi-(scFv)₂-bi-scFv_5506 및 5538-유사체(도 13a, 우측 플롯)는 각각 9.99 pM 및 777.20 pM의 EC₅₀ 값의 유의차를 나타낸다. 이어서, EC₅₀ 값을 플레이트 참조물(bi-scFv_5376)에 대해 정규화하고 1로 설정된 bi-(scFv)₂ EC₅₀을 이용하여 배수 차이를 계산하였다. 놀랍게도, bstb_5749/5751의 EC₅₀은 bi-scFv_5506에 비해 6배 높고 이는 첫 번째 것의 약 80%의 활성의 상실을 가리킨다(도 13b, 좌측 플롯). 한편, bstb_5750/5752의 EC₅₀은 bi-scFv_5538에 비해 23배 낮고, 이는 bstb 포맷의 사용에 의한 > 2000%의 활성 증가를 시사한다(도 13b, 우측 플롯).

[0550] 종합해보면, 사용되는 결합 도메인 및 이의 배향에 따른 일가에서 이가로의 전환은 bi-scFv_5538과 비교해 bstb_5750/5752의 극적인 활성 증가로 입증되는 바와 같이 이중특이적 항체의 활성을 개선시킬 수 있다. 또한, bstb 포맷의 단백질 특성은 안정성의 측면에서 bi-(scFv)₂ 포맷보다 더 우수할 수 있다.

[0551] **실시예 12: CLDN6 및 CD3을 표적으로 하는 IVT-mRNA 기반 이중특이적 항체- 유도체의 생성**

[0552] **a. bstb IVT-mRNA 주형 벡터의 복제 및 IVT-mRNA 합성**

[0553] 시험관내 전사된 메신저 RNA(IVT-mRNA)로서 CLDN6 x CD3 이중특이적 키메라 TriMAB(bstb)의 생성을 위해, 본 발명자들은 표준 기술을 이용하여 bstb_369/367 및 bstb_371/367(실시예 1에 기재됨)의 DNA 서열을 IVT-mRNA 주형 벡터 pST1-TEV-MCS-FI(BioNTech AG, Mainz, Germany)로 서브클로닝하였다. TEV 리더 서열은 다른 곳에서 설명되었으며(Zeenko und Gallie 2005; Weingarten - Gabbay et al. 2016; Gallie et al. 1995), F-I 서열은 특허 출원 "RNA의 안정화를 위한 3'UTR 서열"(PCT/EP2015/073180)에 설명되어 있다. bstb 분자의 형성을 위해 다음의 작제물들이 수득되었다:

[0554] Bstb_435/434:

[0555] pST1-5'TEV-Sec-V_H^{CD3}-C_H1(IgG1)-V_H^{CLDN6}-V_L^{CLDN6}-6xHis-태그-F-I-A30링커A70 (Fd)

[0556] pST1-5'TEV-Sec-V_L^{CD3}-C_L-V_H^{CLDN6}-V_L^{CLDN6}-*Strep*-태그-F-I-A30링커A70 (L)

[0557] Bstb_436/434:

[0558] pST1-5'TEV-Sec-V_H^{CD3}-C_H1(IgG2)-V_H^{CLDN6}-V_L^{CLDN6}-6xHis-태그-F-I-A30링커A70 (Fd)

[0559] pST1-5'TEV-Sec-V_L^{CD3}-C_L-V_H^{CLDN6}-V_L^{CLDN6}-*Strep*-태그-F-I-A30링커A70 (L)

[0560] A = 아테닌, Fd = 분해 가능한 단편(Fab의 중쇄 부분), F-I = 3'UTR 서열, L = Fab의 경쇄 부분, Sec = 분비 신호, 5'TEV = 담배 식각 바이러스 유래의 5'UTR.

[0561] 표 10은 본 발명의 과정에서 생성된 TAA CLDN6에 특이적인 bstb 작제물에 관한 정보를 요약한 것이다. 특이성, 단일클론 항체(mAB) 유래의 서열 기원, 코돈 이용도, 추가적인 서열 특징에 관한 정보가 기재되어 있다. 표적 세포 결합 모이어티의 가변 도메인을 코딩하는 서열은 원래 가니메드 파마슈티칼스 게엠베하에서 입수하였다.

표 10

CLDN6 x CD3-bstb 항체 특징의 개요

내부 명칭	특이성	scFv V _H -V _L 영역의 기원	Fab V _H -V _L 영역의 기원	코돈 이용도	C _H 1	태그
Bstb_435/434 (서열번호 79/78)	HS	IMAB206-SUBW	TR66(C114S)	CG	IgG1	His/Strp
Bstb_436/434 (서열번호 80/78)	HS	IMAB206-SUBW	TR66(C114S)	CG	IgG2	His/Strp

[0562]

[0563] Bstb는 이중특이적 TriMAB를 나타내고; C는 시스테인을 나타내고; C_H1은 불변 중쇄 영역 1을 나타내고; CG는 크리세툴루스 그리세우스를 나타내고; IMAB는 이상적인 단일클론 항체를 나타내고; His는 6xHis-태그를 나타내고; HS는 호모 사피엔스를 나타내고; IgG는 면역글로불린 G를 나타내고; Strp는 *Strep*-태그를 나타내고; W는 트립토판을 나타낸다.

[0564] **b. IVT-mRNA 합성**

[0565] 시험관 전사를 위한 주형을 생성하기 위해, 클래스 II 제한 엔도뉴클레아제를 사용하여 플라스미드 DNA를 폴리(A) 테일-코딩 영역의 하류에서 선형화하고 이를 통해 주형을 생성하여 폴리(A)-테일을 지나서 추가적인 뉴클레오타드가 없이 RNA를 전사하였다(Holtkamp et al. 2006). 선형화된 주형 DNA를 정제하고 분광광도법으로 정량한 다음, 본질적으로 이전에 설명된 바와 같이(Grudzien - Nogalska et al. 2013) 7.5 mM의 각 ATP, CTP, UTP, 1.5 mM GTP 및 6mM 베타-S-ARCA(D2) 캡 유사체(Kuhn et al. 2010)의 존재하에 T7 RNA 폴리머라제에 의한 시험관내 전사에 적용시켰다. 자성 입자를 이용하여 RNA를 정제하였다(Berensmeier 2006). 생체내 연구를 위해, 비면역원성 RNA를 사용하였다. 이를 위해, UTP 대신에 N1-메틸슈도우리딘-5'-트리포스페이트(TriLink Biotechnologies, 미국 캘리포니아주 산디에고)을 도입하고 이중 가닥 RNA를 제거하였다. RNA를 ScriptCap m7G 캡핑 시스템 및 2'-O-메틸트랜스퍼라제(CellScript, 미국 위스콘신주 매디슨)을 이용하여 효소에 의해 캡핑하였다. RNA 농도 및 품질을 2100 바이오분석기(Agilent, 미국 캘리포니아주 산타 클라라)에서 분광광도법 및 분석에 의해 평가하였다. 완전한 bstb 분자의 형성을 위해 필요한 2가지 IVT-mRNA의 개요는 도 14에 도시되어 있다.

[0566] **실시예 13: 시험관내 세포독성 분석법에서 bstb_435/434 및 bstb_436/434의 특이적 용해 활성의 결정**

[0567] **a. 생산자 세포의 전기천공**

[0568] IVT-mRNA로부터 bstb 단백질의 생산을 위해, 대수 증식기로 증식하는 ml당 4×10^6 개 K-562 세포(ATCC CCL - 243 LGC Standard GmbH, 독일 베젤)를 다음 설정을 이용한 GenePulser MXCell(Bio-Rad Laboratories Dreieich, 독일)를 사용하여 H₂O(모의) 또는 0.4mm 큐벳 내의 bstb 쇄당 25 µg/ml의 IVT-mRNA로 전기천공시켰다: 200 V, 2 펄스, 8 ms. 이어서, 세포를 완전 배양 배지 중에 5×10^5 /ml의 밀도에서 6웰 조직 배양 플레이트로 접종하였다. 48시간 항온배양 후 상층액을 원심분리하여 수거하고 0.2 µm Minisart NML 주사기 필터(Sartorius, 독일

괴팅겐)를 이용하여 멸균 여과하였다.

[0569]

b. ELISA를 통한 생산자 세포 상청액 중 bstb의 정량

[0570]

전기천공된 K-562 유래의 상청액을 정량을 위해 사내 설계된 ELISA에 적용하였다. 간략하게 언급하면, 96웰 MaxiSorp™ 플레이트(Thermo Scientific, 독일 브라운슈바이크)를 37℃에서 DPBS 중의 4.5 μg/ml 염소 항-인간 IgG F(ab')₂ 항체(Abd Serotec, 독일 푸흐하임)로 1시간 동안 코팅하고 3회 세척하고(세척 완충액: PBS/0.05% Tween-20) 2 내지 8℃에서 DPBS 중 3% 분유로 밤새 차단하였다. 세척 단계 후, 참조로서 bstb_369/367 및 bstb_371/367 단백질의 연속 희석액 및 K-562 상청액을 함유하는 bstb_435/434 및 bstb_436/434의 연속 희석액(희석제: 0.2% BSA)을 코팅된 플레이트에 삼중으로 첨가하였다. RT에서 2시간 후, 상기 플레이트를 3회 세척하였다. 항-F(ab')₂에 결합된 bstb를 검출하기 위해, 3.5 μg/ml 뮤린 항-IMAB206(가니메드 과마슈티칼스 게엠베하, 독일 마인츠)를 첨가하고 RT에서 1시간 동안 항온배양하고 플레이트를 다시 3회 세척하였다. 1:500의 희석율의 AP-접합된 염소-항-마우스 IgG Fc 항체(Jackson ImmunoResearch, 영국 뉴마켓)를 RT에서 1시간 동안 항온배양하였다. 가시화를 위해, 플레이트를 자체 제조한 pNPP-기질 용액과 함께 암실에서 RT에서 30분 동안 항온배양하고 마지막으로 3M KOH로 반응을 정지시켰다. 분석을 405/492nm에서 Tecan M200 마이크로플레이트 리더(Tecan, 스위스 만도르프)로 실시하였다. GraphPad Prism 소프트웨어 6 및 Microsoft Excel 2010을 사용하여 데이터를 분석하였다(데이터는 미제시).

[0571]

K-562 상청액 중에서 253 ng/ml bstb_435/434 및 427 ng/ml bstb_436/434의 농도가 결정될 수 있었다. 따라서, 두 bstb는 모두 번역되고 분비되었지만 상이한 양이었다. 수득된 단백질 양은 전기천공에 크게 의존하고 매번 다르다. 다양한 실험 과정에서, bstb_435/434와 비교해 1.0배 내지 1.7배의 bstb_436/434이 생산되었다.

[0572]

c. 생산자 세포 용해물과 상청액의 웨스턴 블롯 분석

[0573]

K-562 세포의 상청액 및 세포 용해물(실시예 13a)을 bstb 단백질의 번역과 분비의 분석을 위해 사용하였다. 세포 용해물은 20단위 벤조나제(Merck Millipore, 독일 다름슈타트)를 포함하는 200 μl 4×Laemmli 완충액(Bio-Rad Laboratories) 중에서 1×10⁶ 개의 세척된 세포를 항온배양하여 수득하였다. 이어서, 샘플을 1M 디티오프라이트(DTT, 최종 농도 0.1M)과 함께(환원) 또는 없이(비환원) 95℃에서 10분 동안 가열하였다. 상청액도 마찬가지로 Laemmli 완충액으로 처리하였다. 제조된 세포 용해물과 상청액 및 대응하는 정제된 bstb 단백질을 4 내지 15% Criterion™ TGX Stain-Free™ 겔(Bio-Rad Laboratories)를 이용하는 폴리아크릴 아마이드 겔 전기영동법에 이어서 당업자에게 공지된 표준 절차에 따른 웨스턴 블롯 분석(도 15)에 의해 분리하였다. 웨스턴 블롯 분석을 위해, 호스래디쉬 퍼옥시다제(HRP) 접합된 항체 항-6xHis 태그(1:10,000, Abcam, 미국 매사추세츠주 캠프리지), StrepMAB-Classic(1:10,000, IBA GmbH, 독일 괴팅겐) 및 항 베타-액틴(1:25,000, Abcam)을 사용하였다. 웨스턴 블롯 막을 Chemidoc MP Imaging System(제조원: Bio-Rad)을 이용하여 기록하였다. bstb 단백질의 신호는 내부 분자량 표준과 비교하여 환원 조건 하에 50 내지 55 kD에서 및 비환원 조건 하에 약 100 kD에서 검출되었다. bstb_435/436(도 15a) 및 bstb_436/434(도 15b)는 주로 상청액 중에서 검출되었지만 세포 용해물 중에서도 검출되었고, 이는 수거 시점에서의 불완전한 분비를 나타낸다. bstb 단백질들의 이중이량체 조성은 환원 조건 및 항-6xHis 태그 HRP와 StrepMAB-Classic HRP의 혼합물을 이용한 검출 하에 명백해졌다(도 15c): Fd-단편과 L-단편은 크기가 약 2kD만큼 다르다(각각 약 51 kD 및 약 49 kD). 비환원 조건 하에 검출된 HMW 및 단량체 bstb에 해당하는 단백질 밴드를 정량함으로써, 본 발명자들은 3% HMW 및 88% 단량체 bstb_435/434 중 및 1.4% HMW 및 92% 단량체 bstb_436/434 중을 결정하였다. 세포 배양 동안의 약간의 분해를 나타내는 몇 개의 작은 밴드(각각 총 약 8% 및 약 6%)만이 검출되었다.

[0574]

요약하면, 두 bstb는 모두 IVT-mRNA로부터 효율적으로 번역될 수 있고 세포 배양 상청액으로 분비된다. bstb_436/434는 HMW 중 및 분해 산물에 관하여 다소 더 유리한 단백질 패턴을 보여주지만, HMW 중의 비율은 두 bstb 분자 모두에서 낮다.

[0575]

d. 루시퍼라제 세포독성 분석 및 EC50 결정

[0576]

세포독성 분석법을 원칙적으로 실시예 2a에 설명된 바와 같이 실시하였다. bstb 단백질을 참조로서 사용하였다. 실시예 13a의 K-562 상청액 샘플을 K-562 모의 상청액(IVT-mRNA 없이 전기천공)으로 희석하였다. K-562 상청액 샘플의 L_{min} 및 L_{max}에 K-562 모의 상청액을 보충하였다.

[0577]

상청액 중의 20 μl bstb를 33.1 fM 내지 516.5 pM의 7-포인트, 5배 연속 희석액 열에서 이펙터 세포(E:T 5:1)로서 PBMC 함께 플레이트링된 OV-90 및 MDA-MB-231 암 세포(루시퍼라제로 안정적으로 형질도입됨)에

적용하였다. 48시간의 공동-항온배양 후, 측정을 위해 루시퍼라제 용액을 첨가하고 플레이트를 분석하였다.

[0578] 도 16에 도시된 바와 같이, 두 bstb는 모두 CLDN6⁺ OV-90의 효율적인 용해를 매개하지만 CLDN6⁻ MDA-MB-231의 용해는 매개하지 않는다. 각각 516.5 pM bstb_436/434 및 bstb_435/434의 경우에 최대 용해는 77 내지 80%에 달하였다. EC50 값은 bstb_435/434의 1.3배 높은 활성을 나타낸다. RNA 번역된 bstb의 EC50 값은 해당 단백질 항목 bstb_369/367 및 bstb_371/367에 비해 각각 4배 및 7.5배 낮았다. 이러한 효과는 임의의 추가 단백질 조작용의 부족으로 인한 더 높은 단백질 활성, HMW 종의 영향, 정량의 편차 또는 이들의 조합에서 비롯된 것일 수 있다.

[0579] 요약하면, RNA 방법은 단백질 발현, 정제, 안정성 및 분석 문제의 누락과 관련하여 실행 가능하며 매우 효율적이며 시간 절약적이다.

[0580] 실시예 14: 마우스 이중이식 모델에서 단백질 참조물과 비교한 이중특이적 항체를 코딩하는 IVT-RNA의 효능

[0581] 이중특이적 bstb 및 bi-(scFv)₂ 항체를 코딩하는 IVT-mRNA의 치료 잠재성을 생체내에서 단백질 참조물과 비교하여 조사하기 위해, 면역결핍 마우스 계통 NOD.Cg-Prkd^{scid} IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ 또는 짧은 NSG(Jackson Laboratory, 미국 메인주 바 하버)를 다시 선택하였다. 모든 마우스는 독일 마인츠 소재의 요하네스 구텐베르크 대학의 시설 동물 관리위원회의 지침에 따라 사용하였다.

[0582] a. 단백질과 비교한 bstb 및 bi-(scFv)₂ 코딩 IVT-RNA에 의한 마우스의 진행성 CLDN6 발현 종양의 치료

[0583] 예시적인 시험에서, 체중이 21 내지 36g인 8주령의 수컷 및 암컷 NSG 마우스를 사용하였다. CLDN6 양성 OV-90 세포는 종양 세포로서 기능하였고 PBMC는 이펙터 세포로서 기능하였다.

[0584] 5×10⁶개 종양 세포를 피하(s.c.) 접종하고 이로부터 19일 후에 1×10⁷개의 PBMC를 복강내(i.p.) 투여하였다. PBMC를 주사한지 6일 후 말초혈에서 분석된 바와 같이 PBMC 생착된 마우스를 종양 체적 및 성별(모든 군에서 두 성별 모두)에 따라 군으로 분류하였다. 처리는 군당 약 250mm³의 평균 종양 체적에서 시작하였다. 마우스를 주 1회 안와후 정맥총에 정맥내(i.v.) 주사하여(주사 일정 도 17a) 처리하였다. 군 "G1- RNA 대조군", "G2 - bstb RNA", "G3 - bi-scFv RNA"에는 TransIT®-mRNA 형질감염 키트(Mirus Bio, 미국 위스콘신주 매디슨)로 복합체화된 3μg IVT-mRNA를 마우스당 200 μl 용적으로 투여하였다. RNA 대조군으로서 루시퍼라제 IVT-mRNA를 사용하였고, bstb-코딩 RNA는 CLDN6×CD3 bstb Fd 및 LC 쇠 IVT-mRNA 435 및 434(1:1 혼합됨)이었으며, bi-(scFv)₂-코딩 RNA는 CLDN6×CD3 bi-(scFv)₂ IVT-RNA 123r이었다. 모든 IVT - RNA는 생체내에서 실시예 12b에 따라 합성하였다. "G4- 비히클 대조군"은 DPBS로 처리된 6마리의 마우스 및 pH 5.5의 10mM NaOAc 완충액으로 처리된 6마리의 마우스(각각 bstb 및 bi-(scFv)₂ 제형화 완충액)을 포함하였다. "G5-bstb 단백질" 및 "G6-bi-scFv 단백질"을 IVT-mRNA 항목에 대한 단백질 유사체로 처리하였다. bstb 단백질은 bstb_369/367(100 μg/kg의 용량, 5 μl/g 체중) 및 bi-(scFv)₂ 단백질 bi-scFv_123(200 μg/kg의 용량, 5 μl/g 체중)이었다. 처리군은 표 11에 요약되어 있다. 투여는 4주 연속하여 실시하였다. 주 2회 종양 치수를 디지털 눈금 캘리퍼로 측정하고 종양 체적을 다음식에 의해 계산하였다: 종양 체적[mm³] = 길이[mm]×(폭[mm])²/2. 종양 체적이 1500 mm³에 도달했을 때 또는 심각한 이환율(주로 이식편 대 숙주질환(GVHD)의 증상)의 경우 경추 탈골에 의해 마우스를 희생시켰다.

[0585] 도 17b는 종양 증식에 대한 치료 효과를 예시한다. 항-종양 효과는 RNA 대조군 G1 또는 비히클 대조군 G4과 비교한 종양 증식 억제/감소 및 생존으로서 측정하였다. 0/10마리 마우스에서 종양 증식이 감소한 대조군 G1과 대조적으로, 시험 항목 bstb_435/434(G2)로의 처리는 8/9마리 마우스에서 종양 축소를 야기하였고 시험 항목 bi-scFv_123r(G3)로의 처리는 9/9마리 마우스에서 종양 축소를 야기하였다. 단백질 유사체(G5, G6)로의 처리는 bstb의 경우 유사하였지만, bi-(scFv)₂의 경우 효율이 낮았다. 중요하게도, 직접 비교를 위해 단백질을 RNA 주사 계획(주 1회, 정맥내, 즉 안와내 주사를 의미한다)에 따라 투여하고 주 3회 복강내의 확립된 단백질 치료 일정에 따라 투여하지 않았다. RNA의 더 높은 효율은 아마 수일에 걸친 단백질의 더 장기간 번역 및 분비에 의해 발생하는 반면, 주사된 단백질은 신속하게 제거될 것이다. RNA 주사 후 생체내 단백질 혈중 농도는 알 수 없다. 유세포계측 분석에 의해 종양 침윤 림프구(TIL)를 조사하기 위해 G1 내지 G3의 3마리 마우스를 더 일찍 희생시켰다. 이를 위해, 종양의 단일 세포 현탁액을 항-인간 CD45 및 CD3 형광 표지된 항체(BD Biosciences, 독일 하일베르크)로 염색하고 전체 종양의 일중향 세포를 BD FACS CantoII 유세포계측기로 분석하였다. RNA 대조군에서는 <3%의 침윤된 인간 T 세포가 검출된 반면, bstb-RNA 군 및 bi-(scFv)₂-RNA 군에서는 각각 >7% 및 > 12%의

인간 T 세포가 검출되었다(도 17c). 이러한 데이터는 이중특이적 RNA-코딩된 항체가 관여하는 인간 T 세포의 지시된 침윤을 나타낸다.

[0586] **b. 체중에 대한 요법 영향의 결정**

[0587] 각 마우스의 체중을 실험실 규모에서 주 1회 조사하였다. 처리 관련된 체중 감소는 관찰되지 않았다(데이터 미제시)

[0588] **참고문헌**

- Berensmeier, Sonja (2006): Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. In: *Applied microbiology and biotechnology* 73 (3), S. 495–504. DOI: 10.1007/s00253-006-0675-0.
- Coligan, John E.; Bierer, Barbara E.; Margulies, David H.; Shevach, Ethan M.; Strober, Warren (2001a): *Current Protocols in Immunology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Coligan, John E.; Dunn, Ben M.; Speicher, David W.; Wingfield, Paul T. (2001b): *Current Protocols in Protein Science*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Gallie, D. R.; Tanguay, R. L.; Leathers, V. (1995): The tobacco etch viral 5' leader and poly(A) tail are functionally synergistic regulators of translation. In: *Gene* 165 (2), S. 233–238. DOI: 10.1016/0378-1119(95)00521-7.
- Grudzien-Nogalska, Ewa; Kowalska, Joanna; Su, Wei; Kuhn, Andreas N.; Slepnev, Sergey V.; Darzynkiewicz, Edward et al. (2013): Synthetic mRNAs with superior translation and stability properties. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 969, S. 55–72. DOI: 10.1007/978-1-62703-260-5_4.
- Holtkamp, S.; Kreiter, S.; Selmi, A.; Simon, P.; Koslowski, M.; Huber, C. et al. (2006): Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. In: *Blood* 108 (13), S. 4009–4017. DOI: 10.1182/blood-2006-04-015024.
- Kuhn, A. N.; Diken, M.; Kreiter, S.; Selmi, A.; Kowalska, J.; Jemielity, J. et al. (2010): Phosphorothioate cap analogs increase stability and translational efficiency of RNA vaccines in immature dendritic cells and induce superior immune responses in vivo. In: *Gene Ther* 17 (8), S. 961–971. DOI: 10.1038/gt.2010.52.
- Lanzavecchia, A.; Scheidegger, D. (1987): The use of hybrid hybridomas to target human cytotoxic T lymphocytes. In: *Eur. J. Immunol.* 17 (1), S. 105–111. DOI: 10.1002/eji.1830170118.
- Lutterbuese, Ralf; Raum, Tobias; Kischel, Roman; Hoffmann, Patrick; Mangold, Susanne; Rattel, Benno et al. (2010): T cell-engaging BiTE antibodies specific for EGFR potently eliminate KRAS- and BRAF-mutated colorectal cancer cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (28), S. 12605–12610. DOI: 10.1073/pnas.1000976107.
- Röthlisberger, Daniela; Honegger, Annemarie; Plückthun, Andreas (2005): Domain interactions in the Fab fragment: a comparative evaluation of the single-chain Fv and Fab format engineered with variable domains of different stability. In: *Journal of molecular biology* 347 (4), S. 773–789. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.01.053.
- Stadler, Christiane R.; Bähr-Mahmud, Hayat; Plum, Laura M.; Schmoldt, Kathrin; Kölsch, Anne C.; Türeci, Özlem; Sahin, Ugur (2015): Characterization of the first-in-class T-cell-engaging bispecific single-chain antibody for targeted immunotherapy of solid tumors expressing the oncofetal protein claudin 6. In: *OncoImmunology* 5 (3), S. e1091555. DOI: 10.1080/2162402X.2015.1091555.
- Weingarten-Gabbay, Shira; Elias-Kirma, Shani; Nir, Ronit; Gritsenko, Alexey A.; Stern-Ginossar, Noam; Yakhini, Zohar et al. (2016): Comparative genetics. Systematic discovery of cap-independent translation sequences in human and viral genomes. In: *Science (New York, N.Y.)* 351 (6270), DOI: 10.1126/science.aad4939.

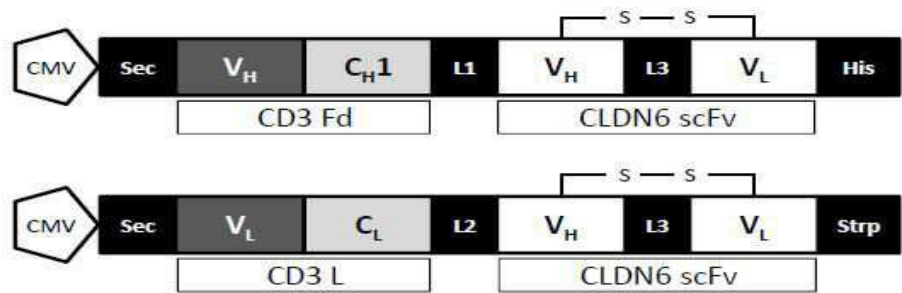
[0589]

- Woll, Stefan; Schlitter, Anna Melissa; Dhaene, Karl; Roller, Marc; Esposito, Irene; Sahin, Ugur; Tureci, Ozlem (2014): Claudin 18.2 is a target for IMAB362 antibody in pancreatic neoplasms. In: *International journal of cancer* 134 (3), S. 731–739. DOI: 10.1002/ijc.28400.
- Zenko, Vladimir; Gallie, Daniel R. (2005): Cap-independent translation of tobacco etch virus is conferred by an RNA pseudoknot in the 5'-leader. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (29), S. 26813–26824. DOI: 10.1074/jbc.M503576200.

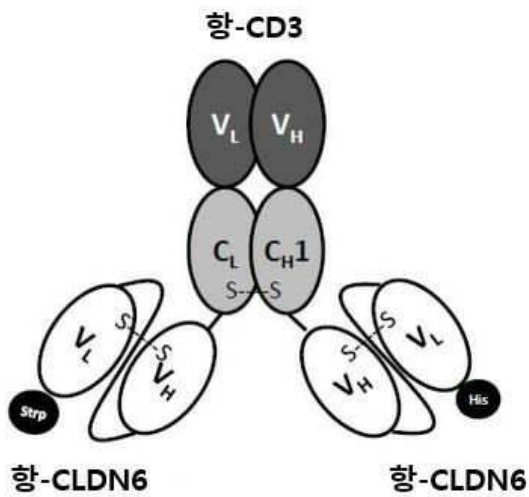
[0590]

도면

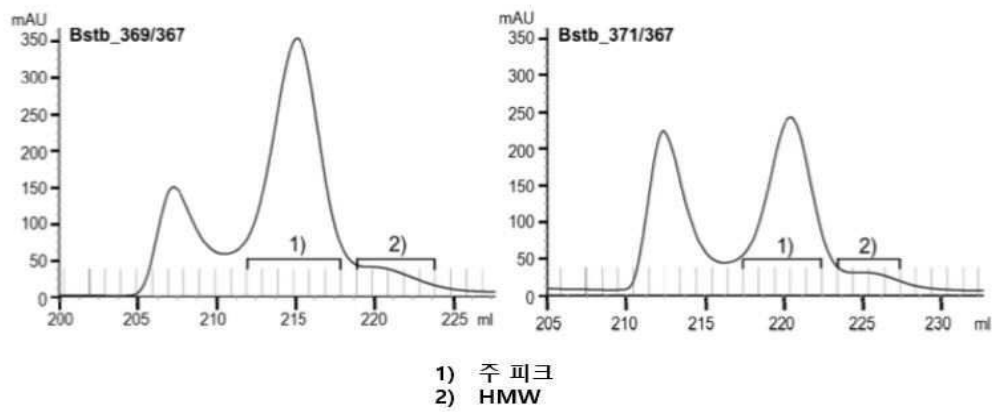
도면1a



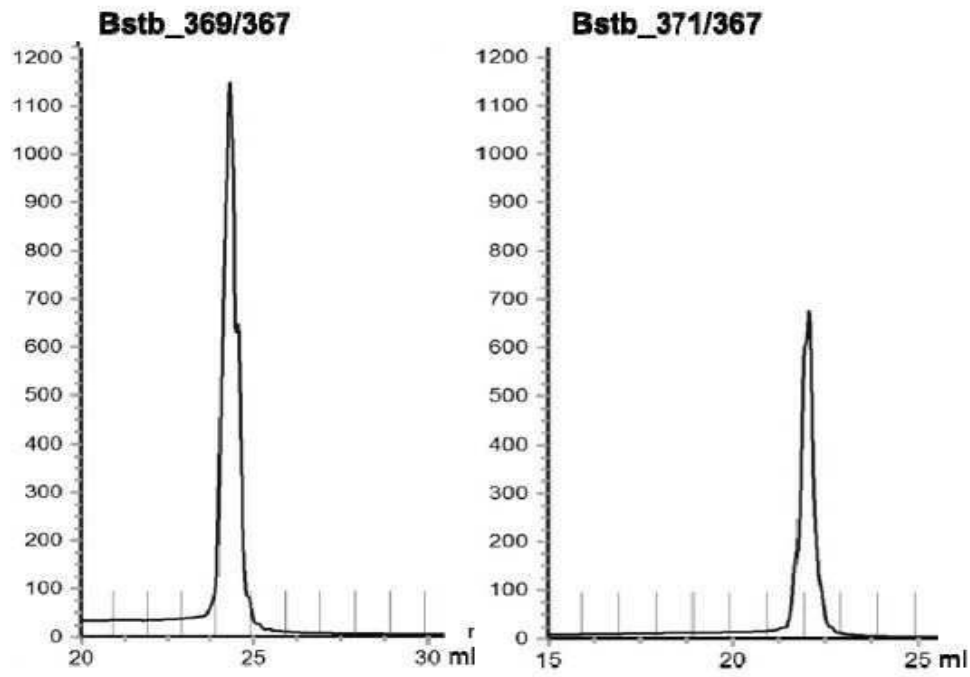
도면1b



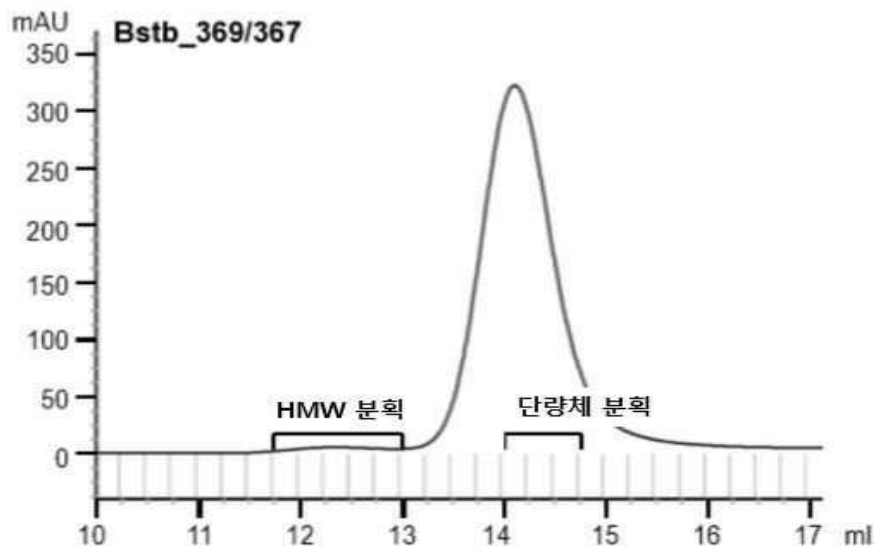
도면2a



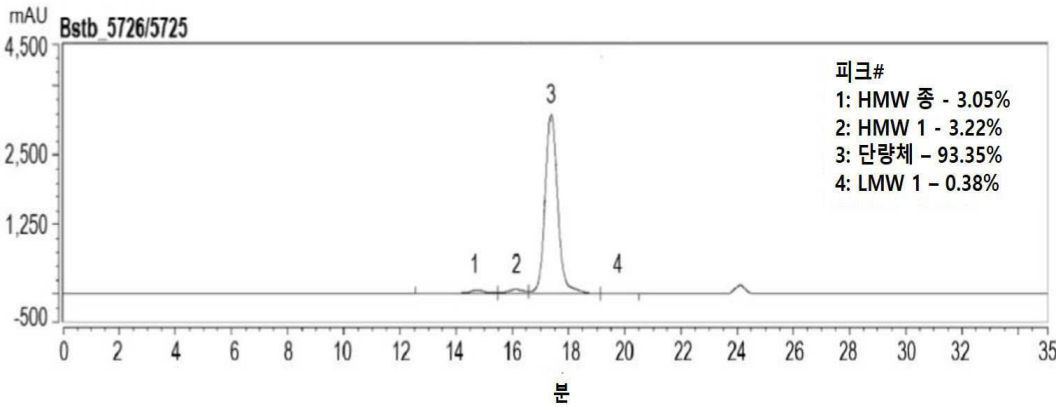
도면2b



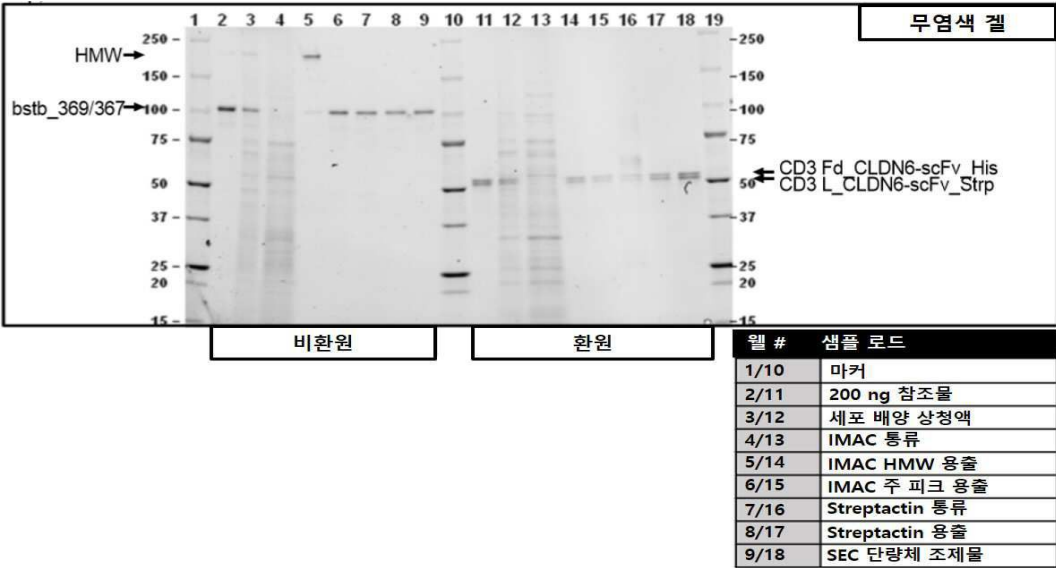
도면2c



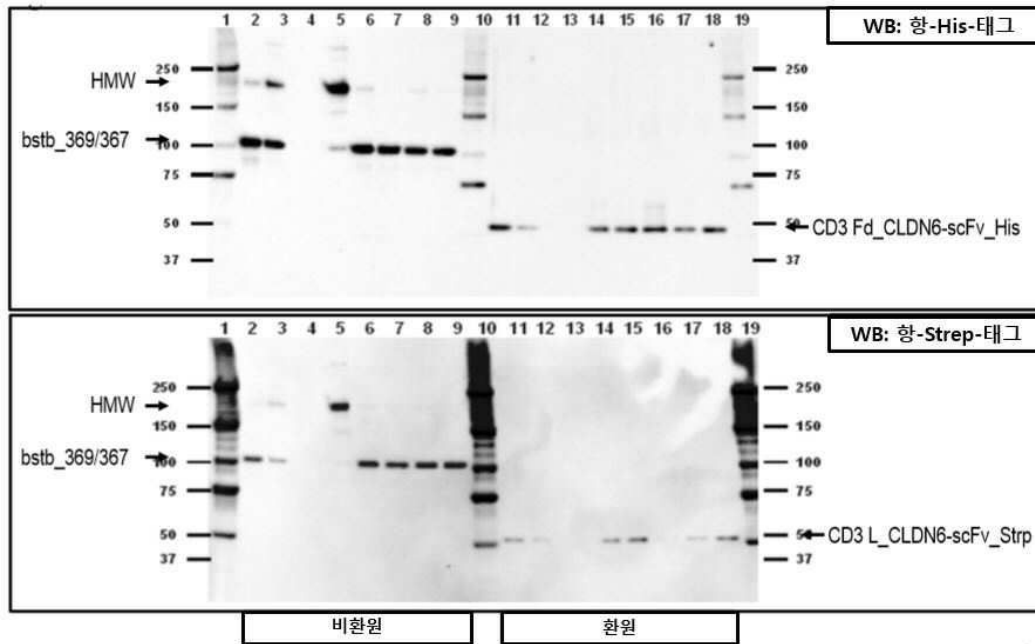
도면2d



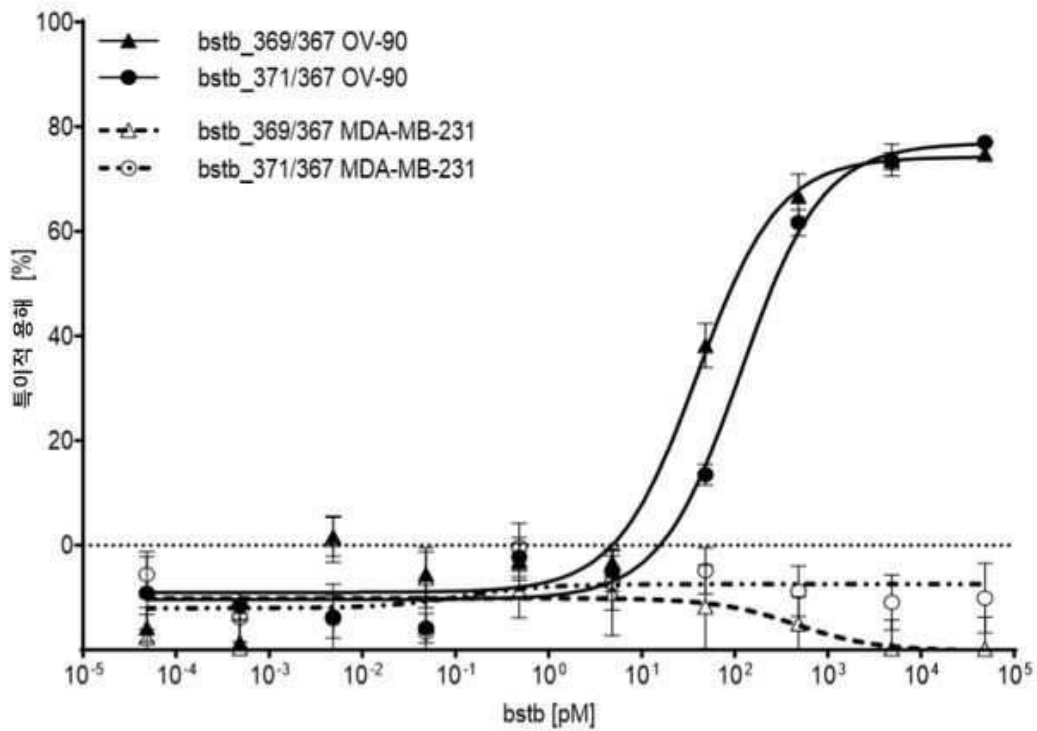
도면3a



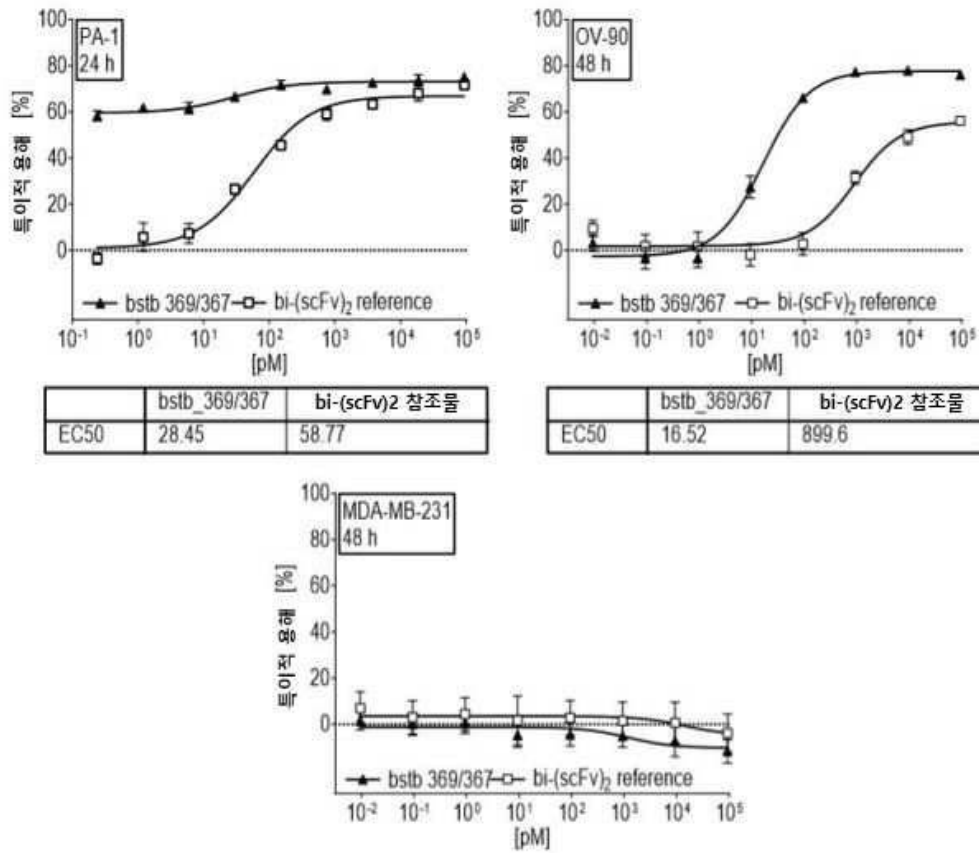
도면3b



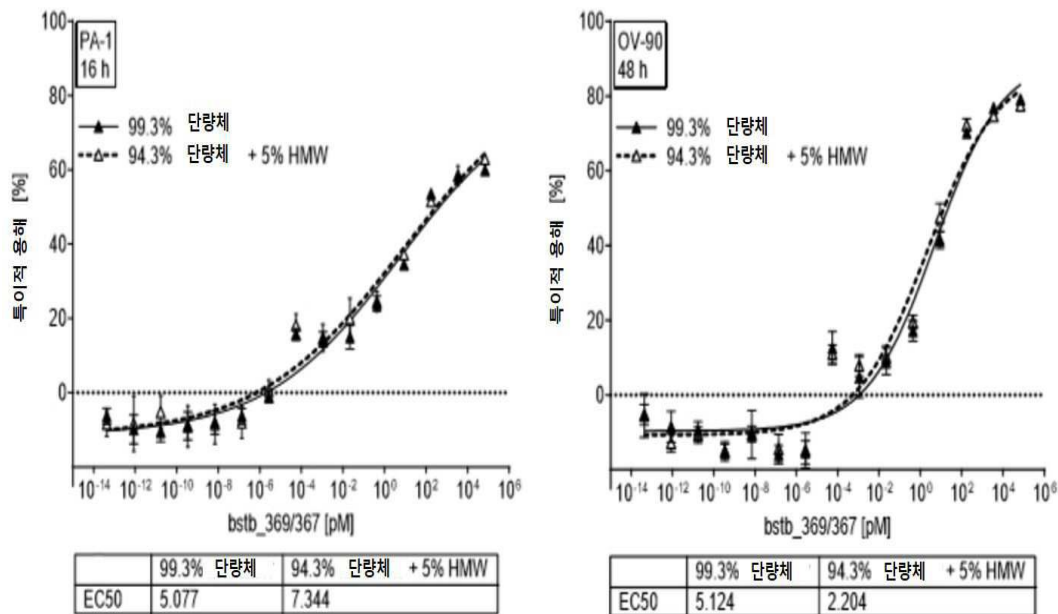
도면4a



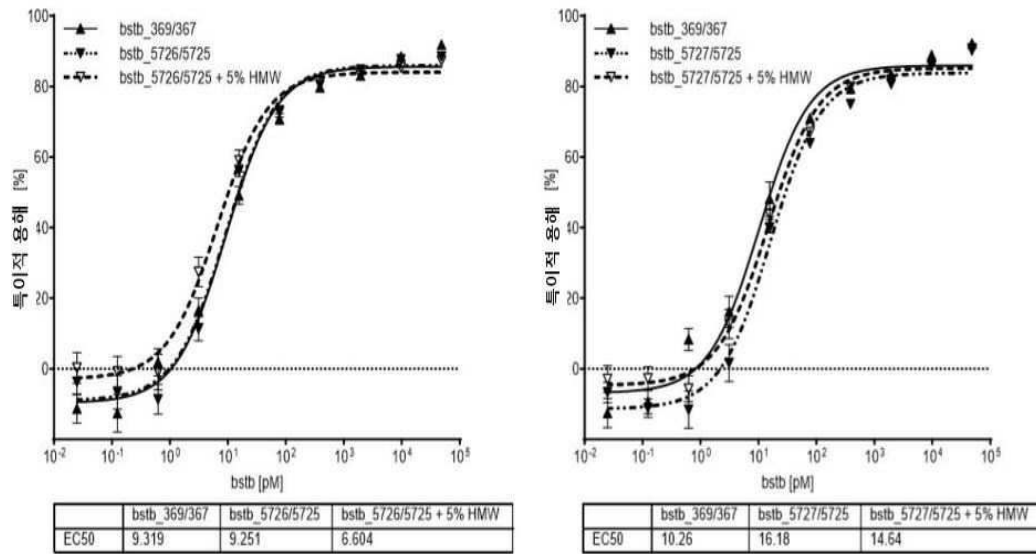
도면4b



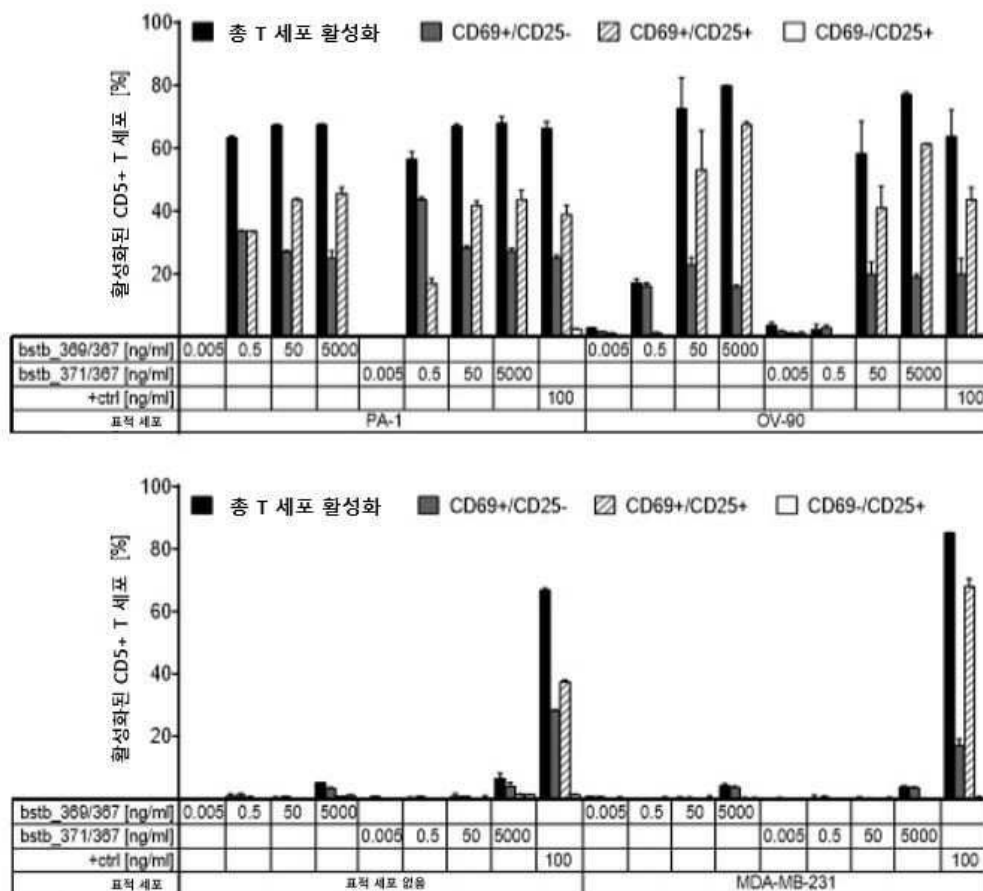
도면4c



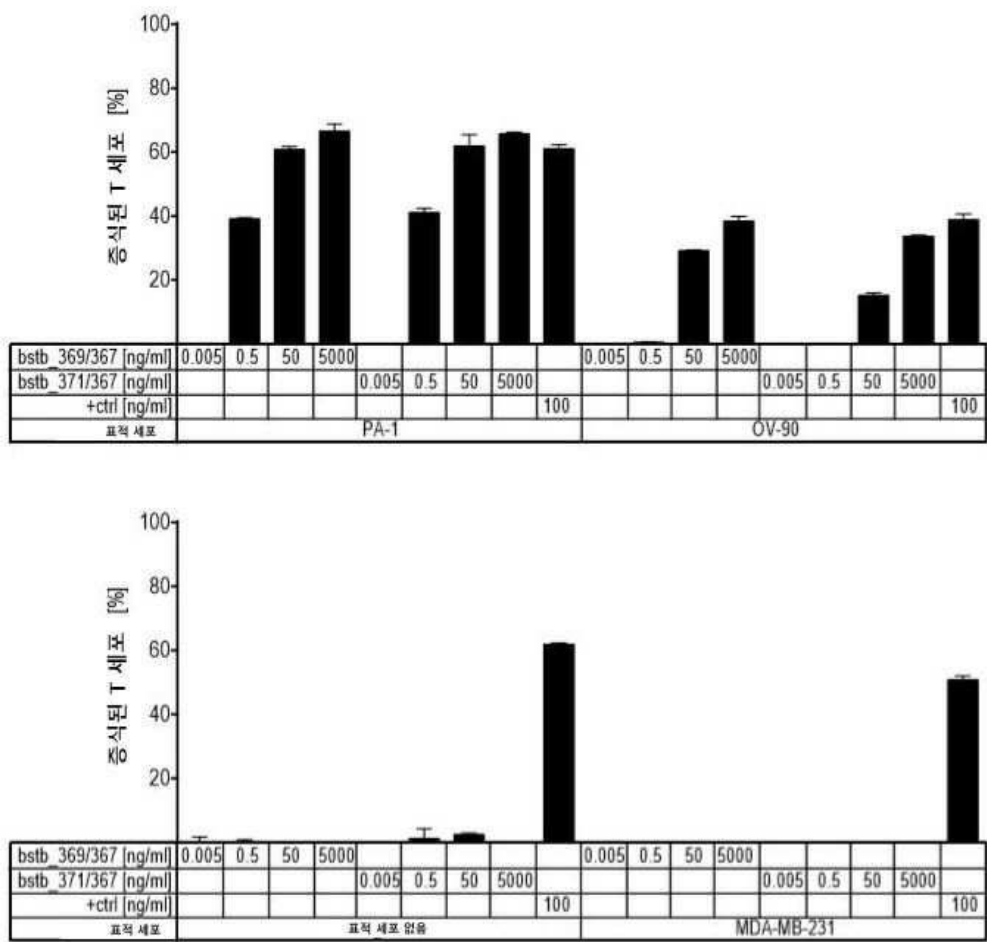
도면4d



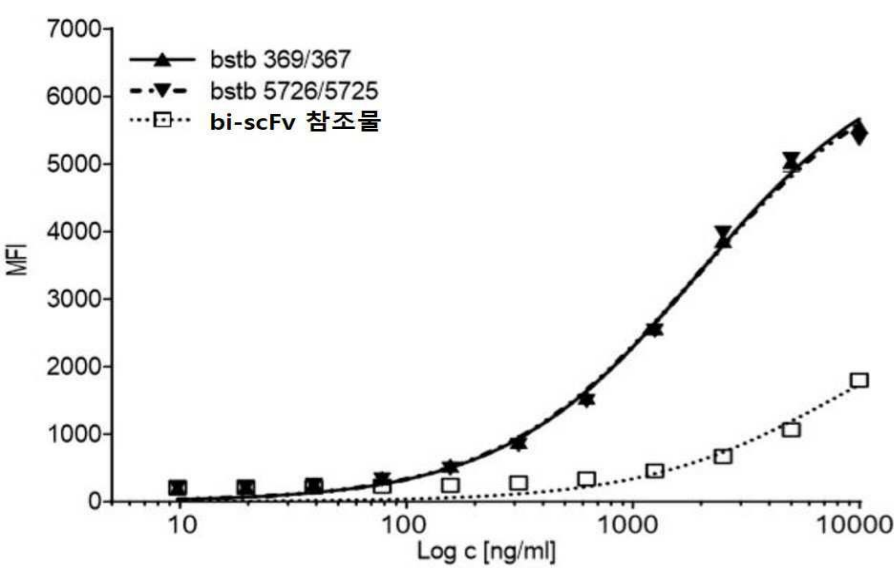
도면5a



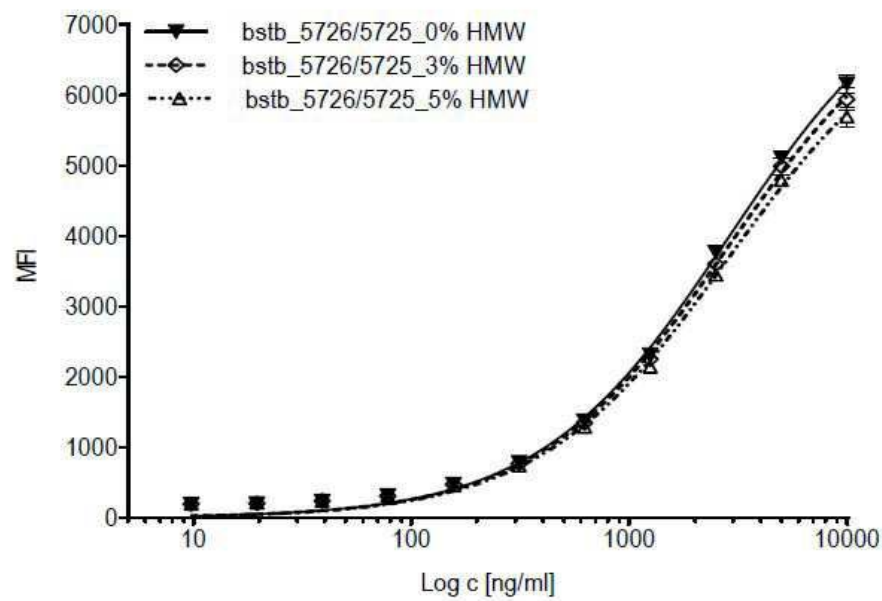
도면5b



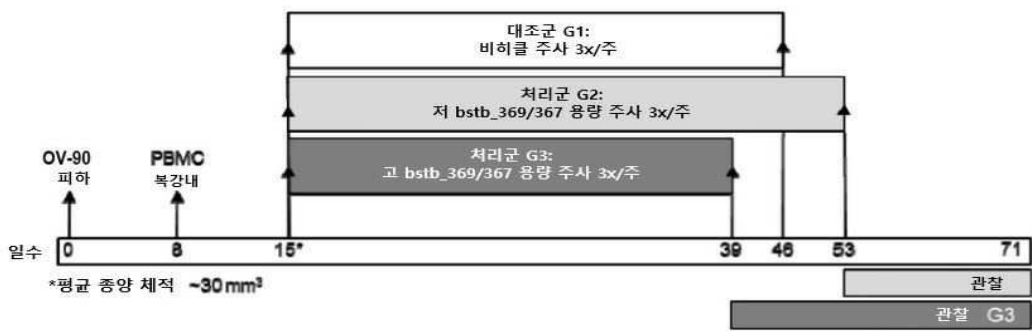
도면6a



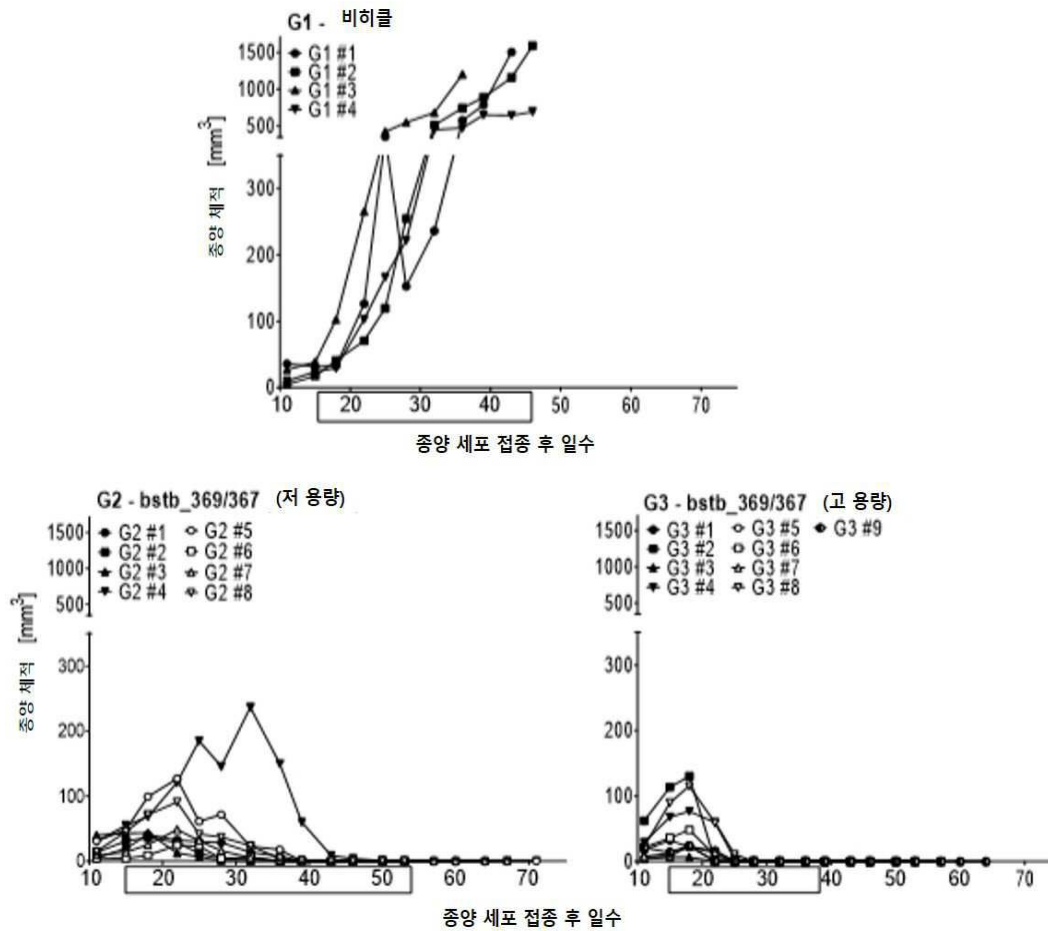
도면6b



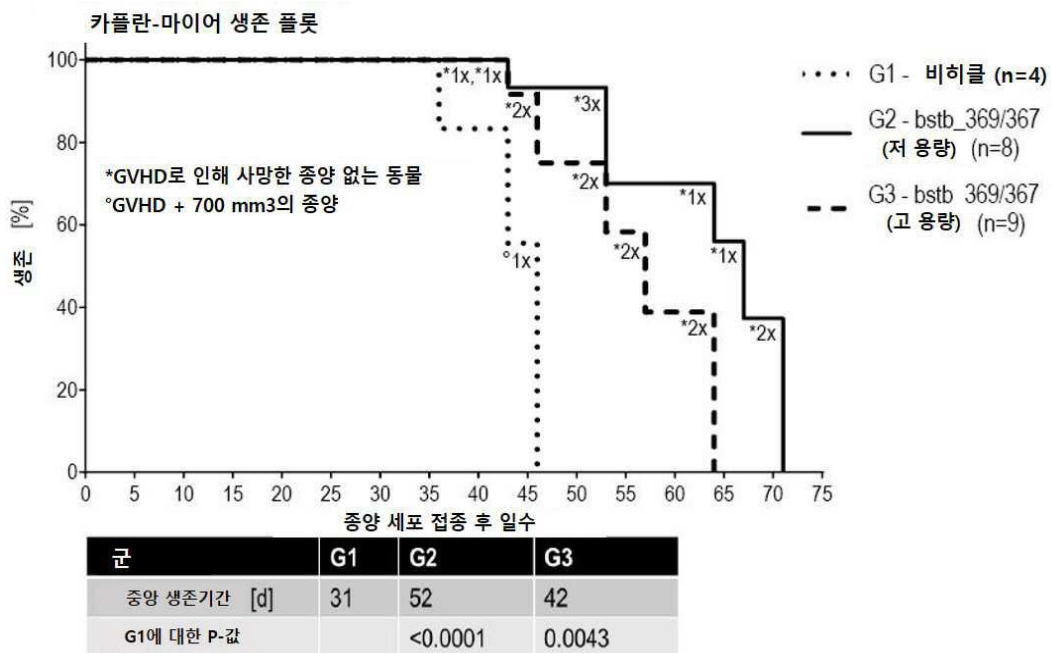
도면7a



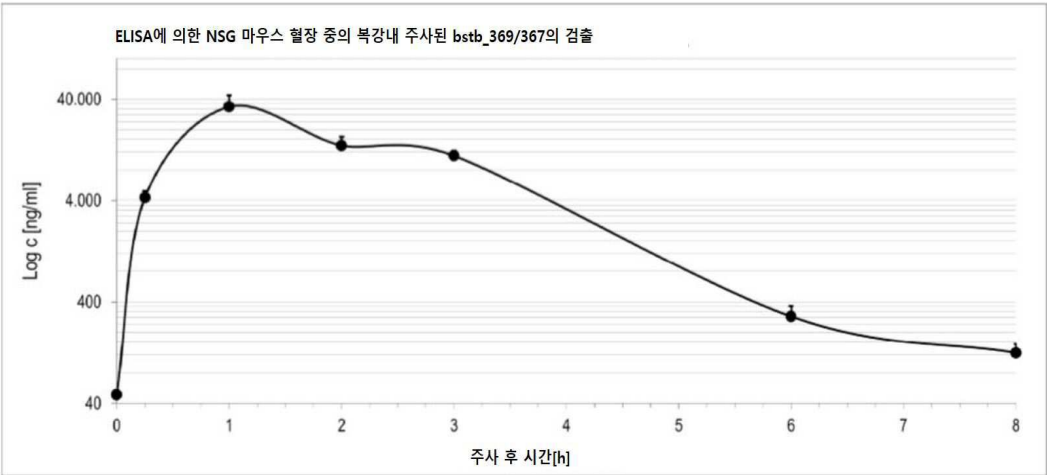
도면7b



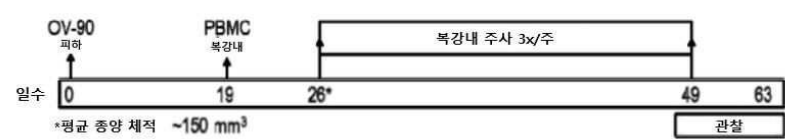
도면7c



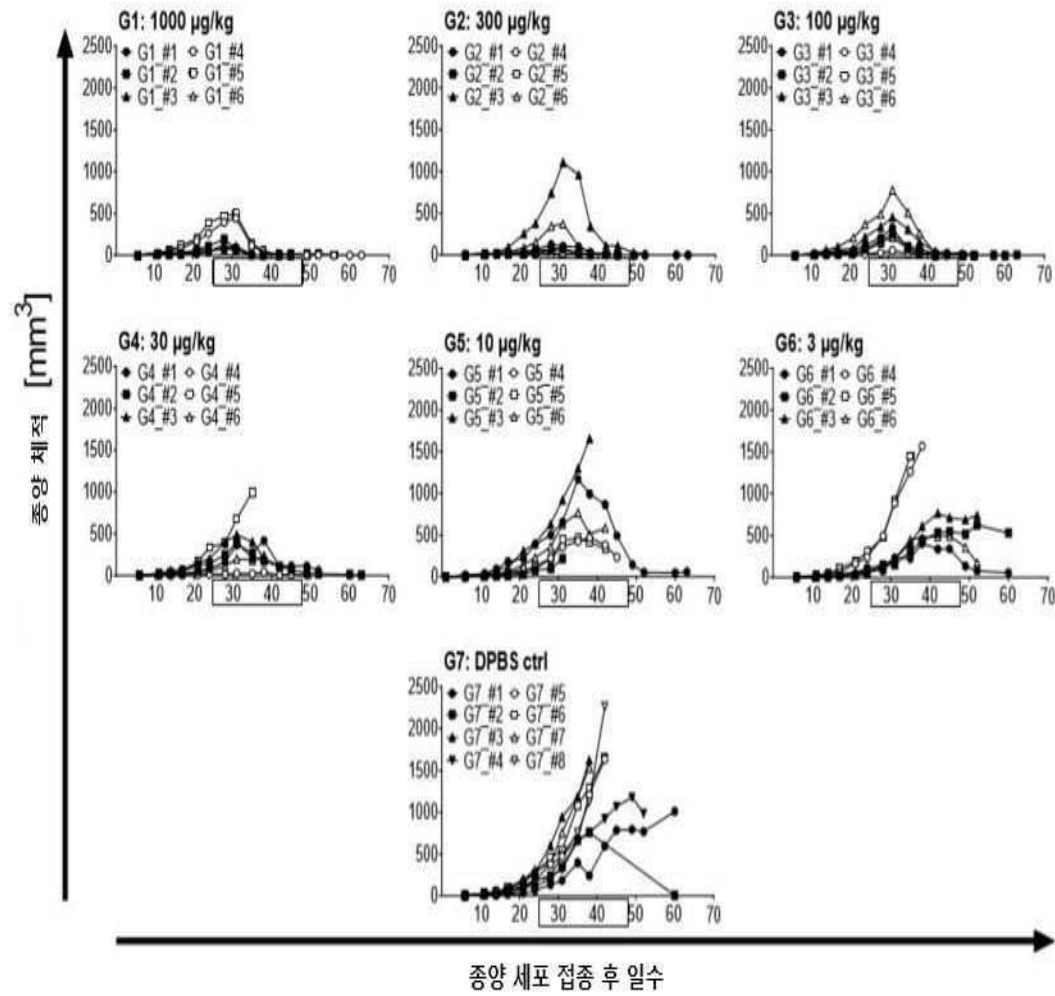
도면8



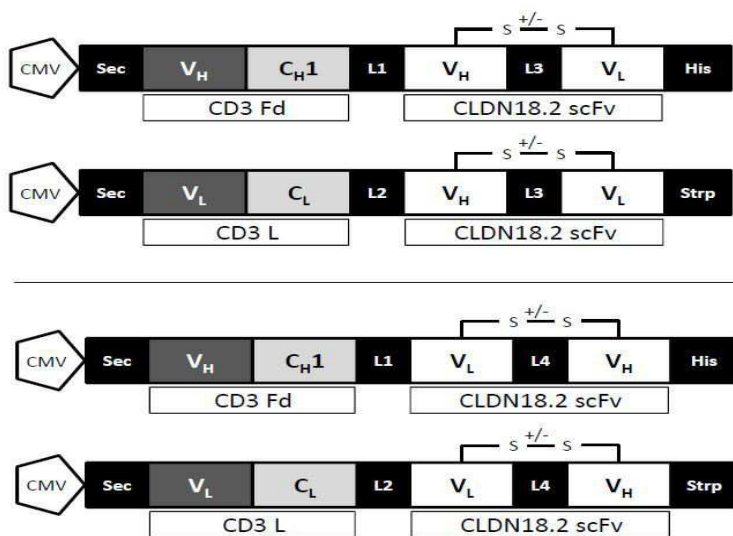
도면9a



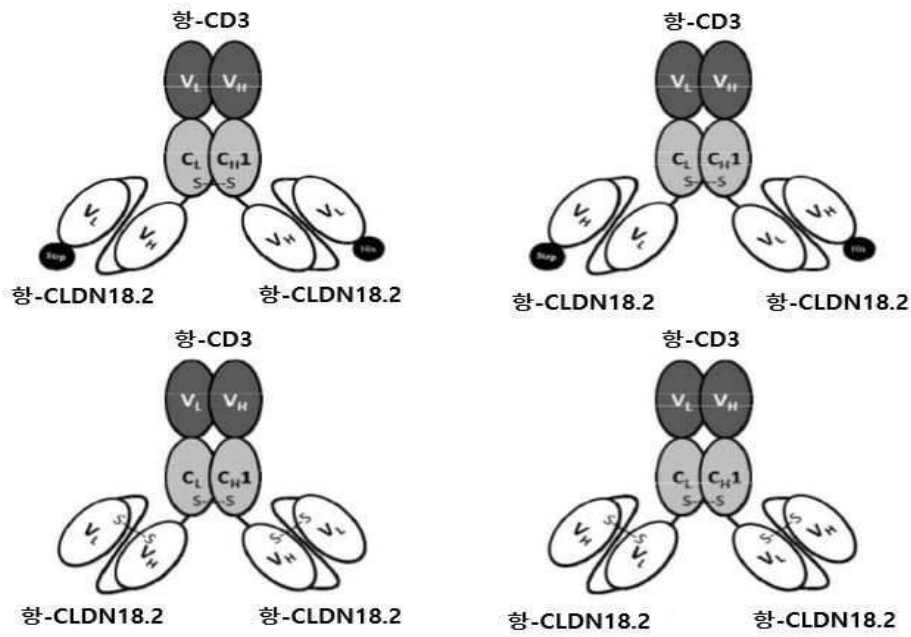
도면9b



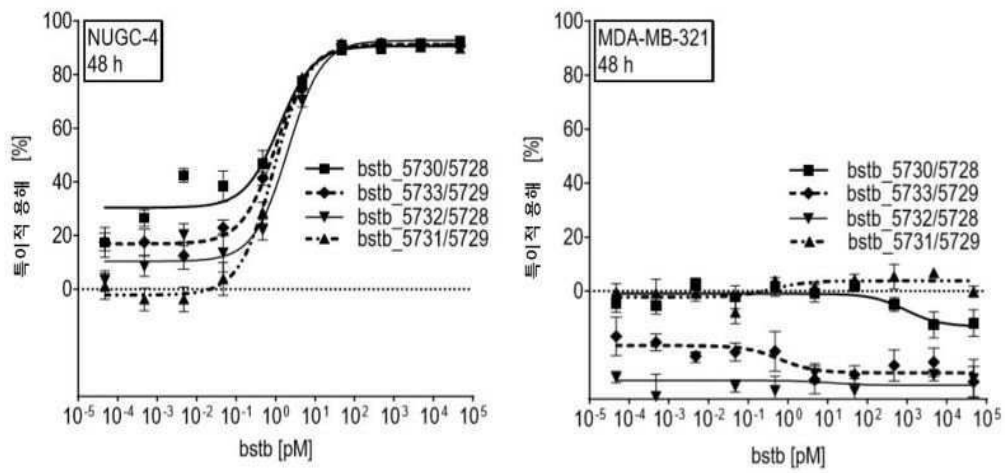
도면10a



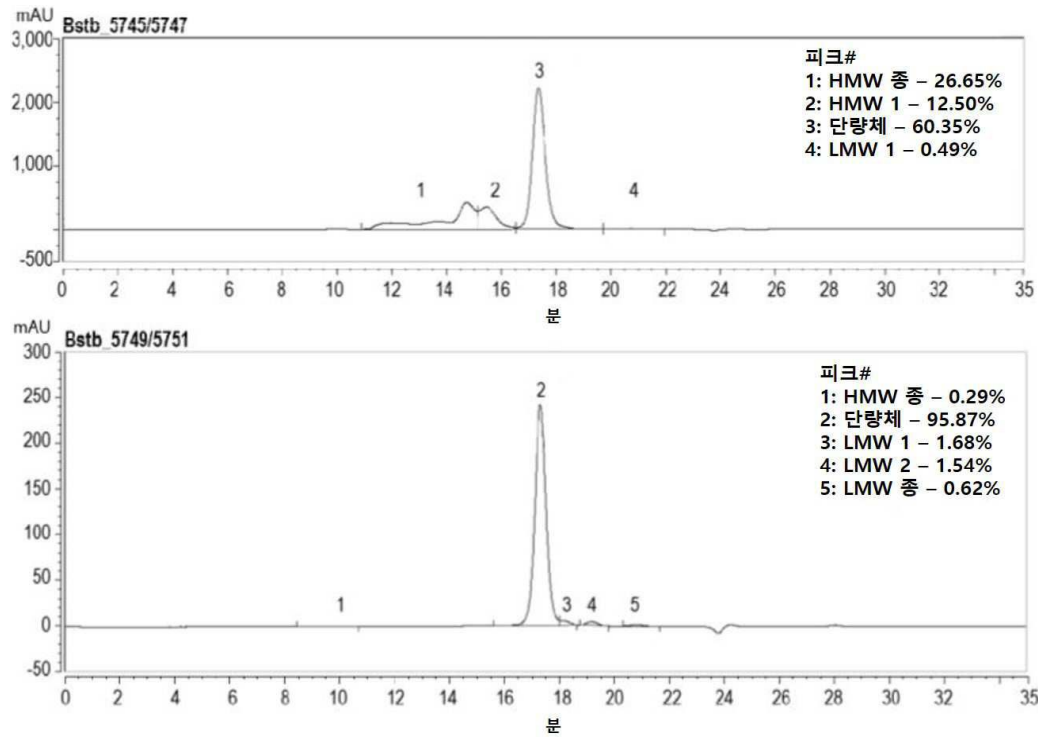
도면10b



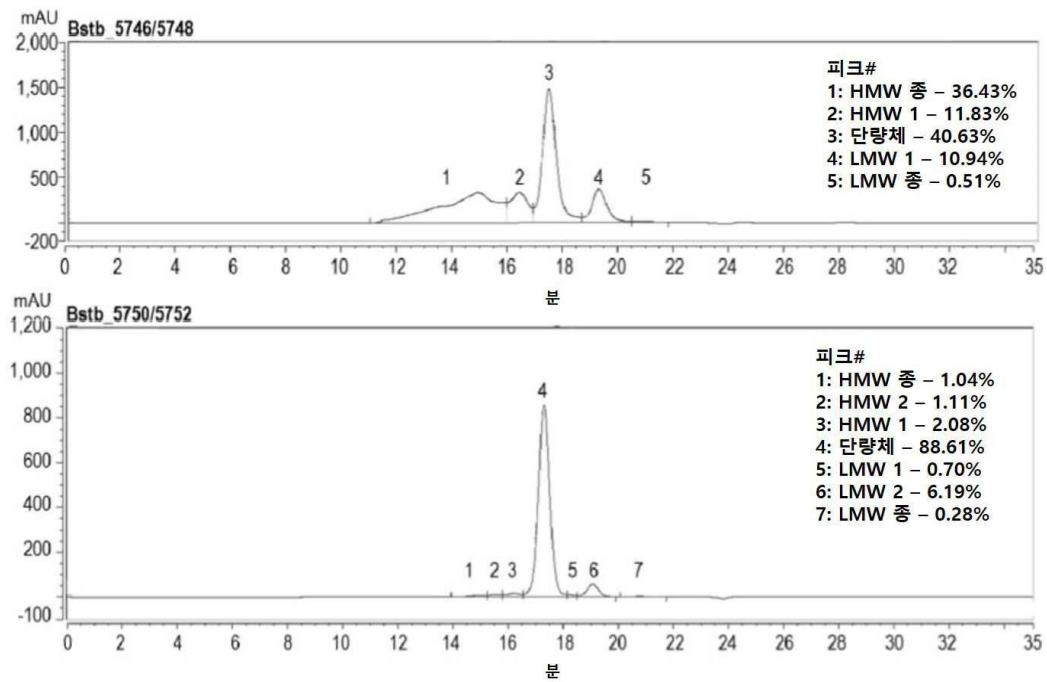
도면11



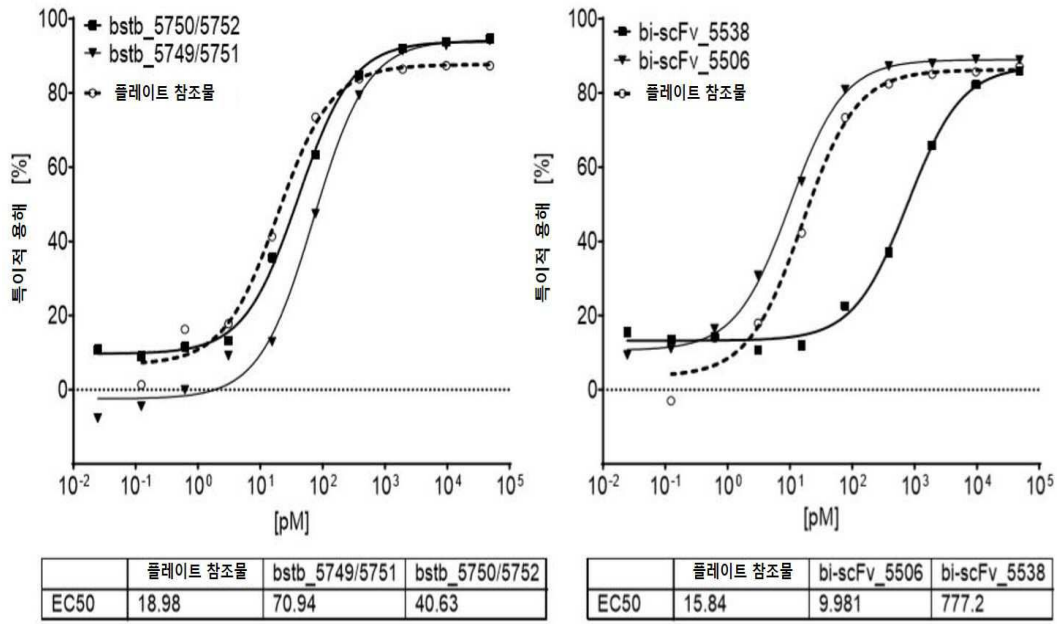
도면12a



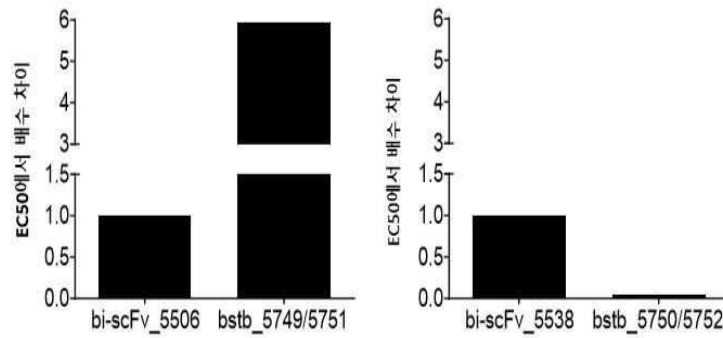
도면12b



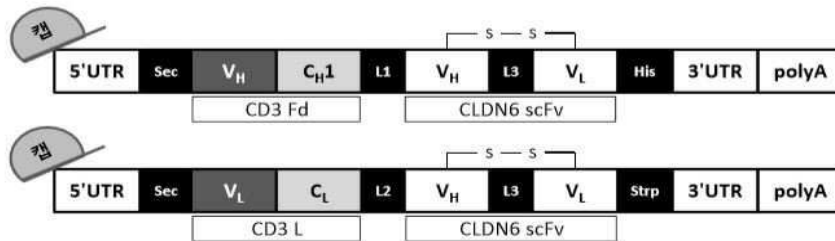
도면13a



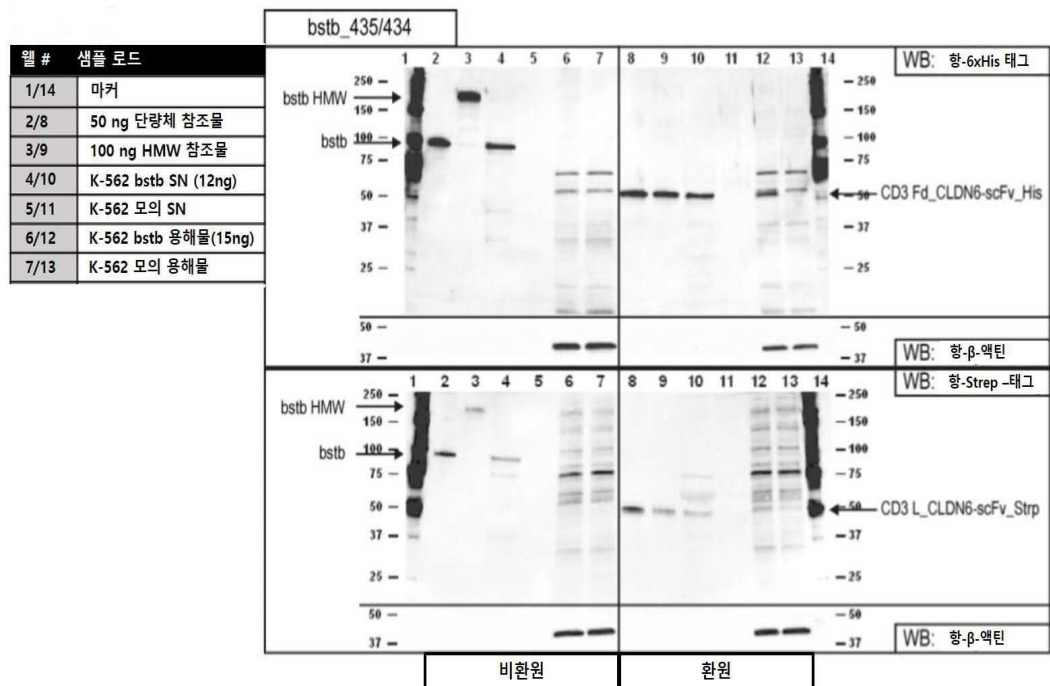
도면13b



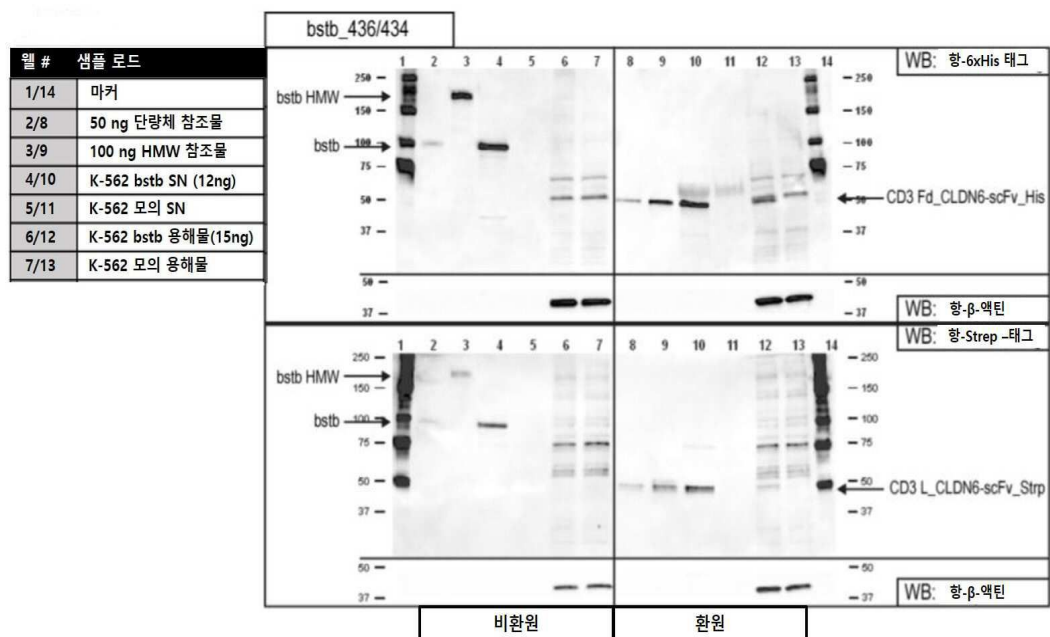
도면14



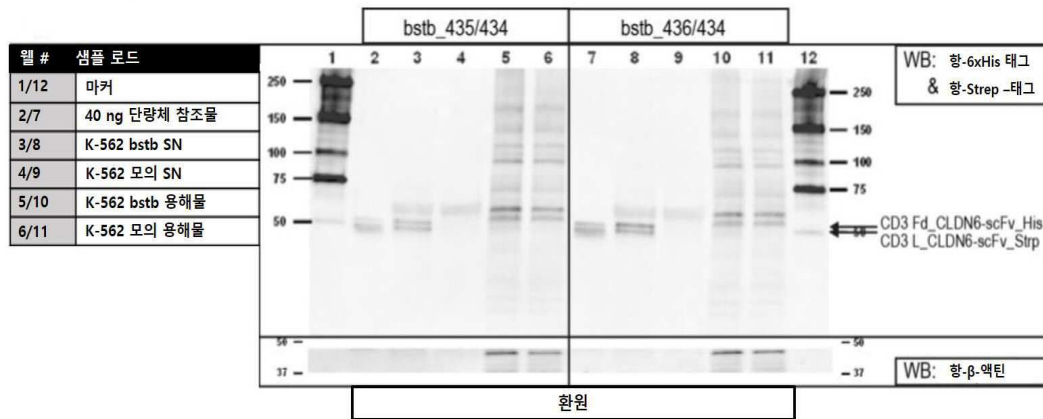
도면15a



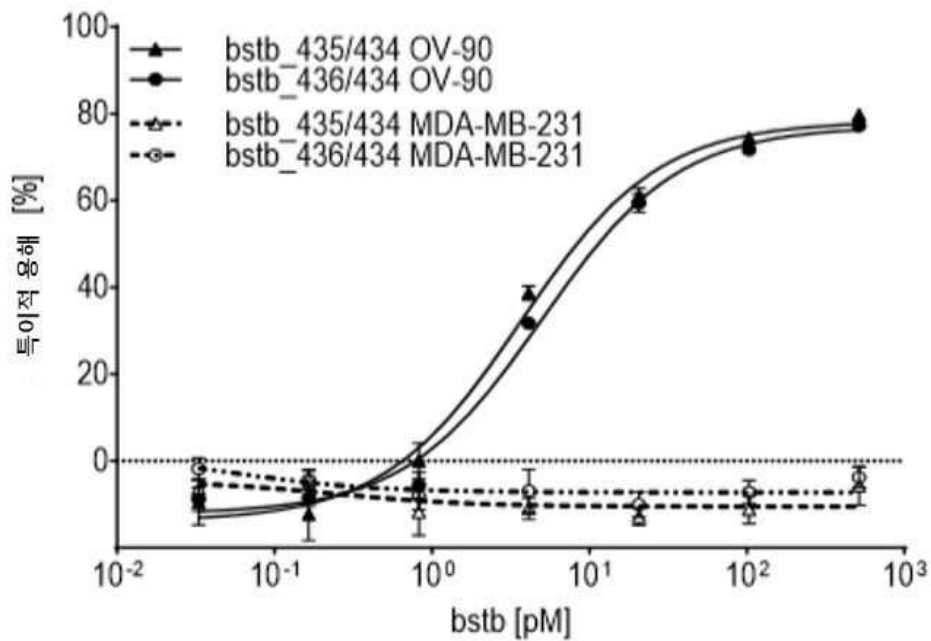
도면15b



도면15c

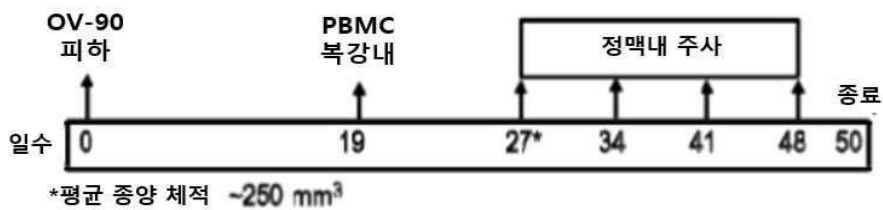


도면16

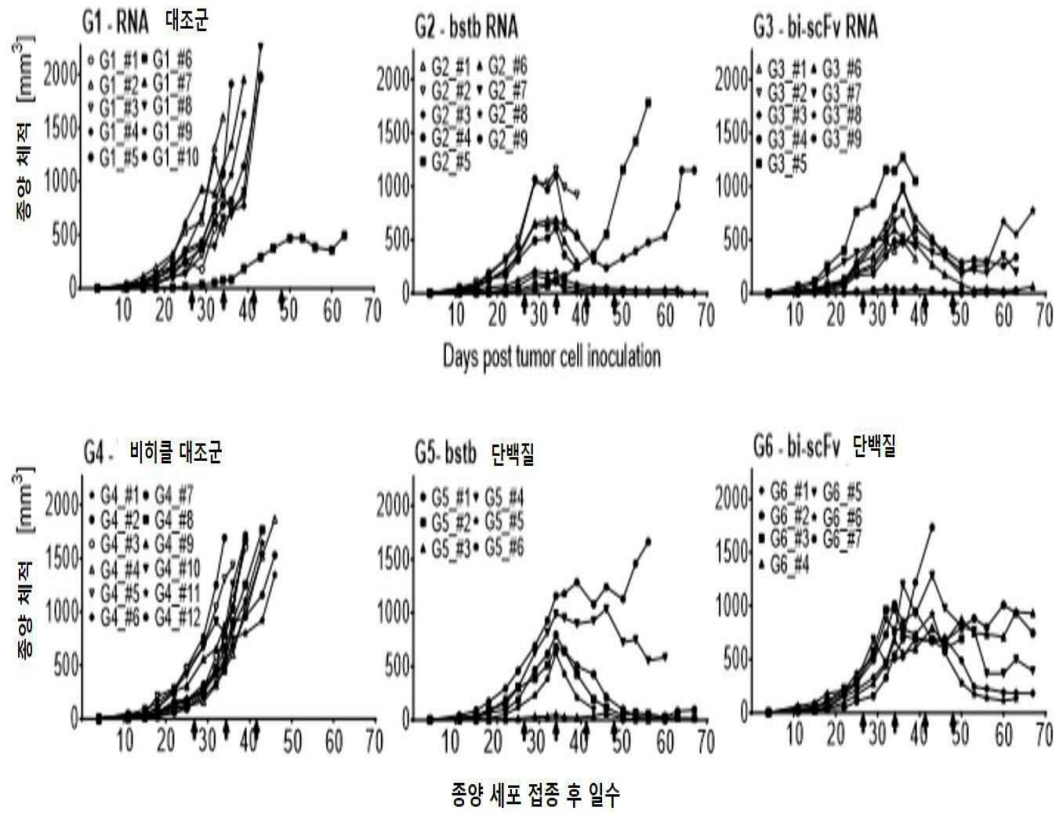


	bstb_435/434 OV-90	bstb_436/434 OV-90
EC50	3.683	4.970

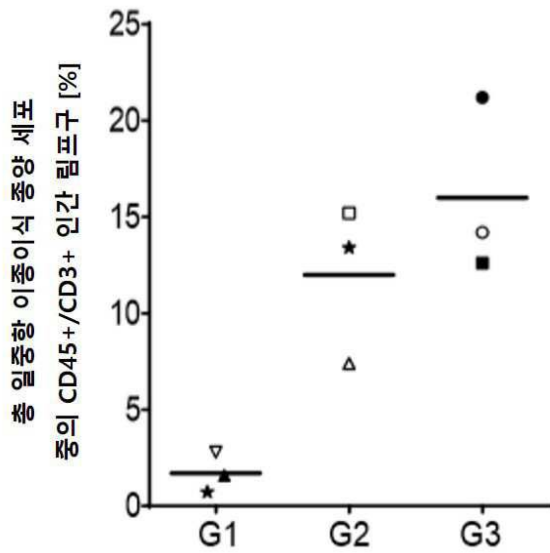
도면17a



도면17b



도면17c



도면18a

Anti-TAA

FR1-IMGT (1-26)					CDR1-IMGT (27-38) BC			FR2-IMGT (39-55) C C'				CDR2-IMGT (56-65) C' C''			FR3-IMGT (66-104) C'' D E F					CDR3-IMGT (105-117) FG			FR4-IMGT (118-128) G								
A					B			C				C'			C''					D			E			F			G		
1	10	15	16	23	26	27	38	39	41	47	53	56	65	66	74	75	84	85	89	96	97	104	105	117	118	128					
.....																															
EVQLQSPG	ELVSP	GSMTISCKAS	GVSE	TGIT	MHWVQKRP	GSLEWIGL	INPT	..NGST	LYNQKFK	G	KATLVDMSS	STAMQLLSLIS	EDSAVYIC	ARDVG	...FVLDV	WGQGTLLIVSS	1														
QIVLTQSP	IMVSP	GEKVTITCSAS	SSV	SV	MHWVQKRP	GTSPKRWIV	ST	S	NLASGVP	A	RFGSGG	..SG	TSVSLTISRVA	EDAAATVYC	QQRSN	..YFET	FGSGTKLEIK	2													
QVQLQSPGA	ELVSP	GSVKLSCKAS	GVTF	ISYW	INWVHQRP	GSLEWIGN	IYPS	..DSYT	NYNQKFK	D	KATLVDMSS	STAMQLSSPTS	EDSAVYIC	TSWRG	..NSFDV	WGQGTLLIVSS	3														
QVQLQSPGA	ELVSP	GSVKLSCKAS	GVTF	ISYW	INWVHQRP	GSLEWIGN	IYPS	..DSYT	NYNQKFK	D	KATLVDMSS	STAMQLSSPTS	EDSAVYIC	TSWRG	..NSFDV	WGQGTLLIVSS	4														
DIVMTQSP	SLITVIA	GEKVTISCKSS	QSLNLSGNQKMY	LTWYQQKP	GSPPKLLIY	WA	S		TRESGVP	D	RFGSGG	..SG	TDFTLTISVQA	EDLAVYIC	QNDVS	YPFT	FGSGTKLEIK	5													
DIVMTQSP	SLITVIA	GEKVTISCKSS	QSLNLSGNQKMY	LTWYQQKP	GSPPKLLIY	WA	S		TRESGVP	D	RFGSGG	..SG	TDFTLTISVQA	EDLAVYIC	QNDVS	YPFT	FGSGTKLEIK	6													

Domain

1: VH(IMAB206(N49C),IMAB027(N49C)) SEQ ID NO: 8

2: VL(IMAB206(C53W,G120C)) SEQ ID NO: 10

3: VH(IMAB362) SEQ ID NO: 20

4: VH(IMAB362(G49C)) SEQ ID NO: 21

5: VL(IMAB362) SEQ ID NO: 22

6: VL(IMAB362(S120C)) SEQ ID NO: 23

도면18b

Anti-CD3

FR1-IMGT (1-26)						CDR1-IMGT (27-38)			FR2-IMGT (39-55)				CDR2-IMGT (56-65)		FR3-IMGT (66-104)								CDR3-IMGT (105-117)			FR4-IMGT (118-128)					
A						B			C			C'	C''	D		E			F			FG	G								
1	10	15	16	23	26	27	38	39	41	47	53	56	65	66	74	75	84	85	89	96	97	104	105	117	118	128					
QVQLQSQSGA						ELARP			GASVRMSCKTS			GVTF	TRIT	MHWVQKRP		GSQLEWIGY	INPS	..RGYT	NYNQKFK		D	KATLVDMSS		STAMQLSSLS			EDSAVYIC	ARYYDD		HTSLDV	WGQGTLLIVSS
QIVLTQSPAIM						ASAP			GEKVTIMCRAS			SSV	SV	MHWVQKRS		GTSPKRWIV	DT	S	KVASGVP		Y	RFGSGG		..SG	TSVSLTISMEA		EDAAATVYC	QQWSS		NPLT	FGASGKLEIK

Domain
1: VH(TR66(C114S)) SEQ ID NO: 5
2: VL(TR66) SEQ ID NO: 6

서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> BioNTech AG et al.

<120> AGENTS FOR TREATMENT OF CLAUDIN EXPRESSING CANCER DISEASES

<130> 674-180 PCT2

<150> PCT/EP2016/072688

<151> 2016-09-23

<160> 101

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 261

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Val Thr Ala Cys Gln Gly Leu Gly Phe Val Val Ser Leu Ile

1 5 10 15

Gly Ile Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Cys Met Asp Gln Trp Ser Thr

20	25	30	
Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly			
35	40	45	
Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg			
50	55	60	
Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg			
65	70	75	80
Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val			
85	90	95	
Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser			
100	105	110	
Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser			
115	120	125	
Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val			
130	135	140	
Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly			
145	150	155	160
Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe			
165	170	175	
Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met			
180	185	190	
Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala			
195	200	205	
Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly			
210	215	220	
Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile			
225	230	235	240
Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser			
245	250	255	
Lys His Asp Tyr Val			
260			

<210> 2

<211> 220

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Ser Ala Gly Met Gln Ile Leu Gly Val Val Leu Thr Leu Leu

1 5 10 15

Gly Trp Val Asn Gly Leu Val Ser Cys Ala Leu Pro Met Trp Lys Val

20 25 30

Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala Gln Val Val Trp Glu

35 40 45

Gly Leu Trp Met Ser Cys Val Val Gln Ser Thr Gly Gln Met Gln Cys

50 55 60

Lys Val Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln Asp Leu Gln Ala Ala

65 70 75 80

Arg Ala Leu Cys Val Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Phe Gly Leu Leu

85 90 95

Val Tyr Leu Ala Gly Ala Lys Cys Thr Thr Cys Val Glu Glu Lys Asp

100 105 110

Ser Lys Ala Arg Leu Val Leu Thr Ser Gly Ile Val Phe Val Ile Ser

115 120 125

Gly Val Leu Thr Leu Ile Pro Val Cys Trp Thr Ala His Ala Ile Ile

130 135 140

Arg Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Glu Ala Gln Lys Arg Glu Leu

145 150 155 160

Gly Ala Ser Leu Tyr Leu Gly Trp Ala Ala Ser Gly Leu Leu Leu Leu

165 170 175

Gly Gly Gly Leu Leu Cys Cys Thr Cys Pro Ser Gly Gly Ser Gln Gly

180 185 190

Pro Ser His Tyr Met Ala Arg Tyr Ser Thr Ser Ala Pro Ala Ile Ser

195 200 205

Arg Gly Pro Ser Glu Tyr Pro Thr Lys Asn Tyr Val

210 215 220

<210> 3

<211> 220

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ala Ser Ala Gly Met Gln Ile Leu Gly Val Val Leu Thr Leu Leu

1 5 10 15

Gly Trp Val Asn Gly Leu Val Ser Cys Ala Leu Pro Met Trp Lys Val

20 25 30

Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala Gln Val Val Trp Glu

35 40 45

Gly Leu Trp Met Ser Cys Val Val Gln Ser Thr Gly Gln Met Gln Cys

50 55 60

Lys Val Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln Asp Leu Gln Ala Ala

65 70 75 80

Arg Ala Leu Cys Val Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Phe Gly Leu Leu

85 90 95

Val Tyr Leu Ala Gly Ala Lys Cys Thr Thr Cys Val Glu Glu Lys Asp

100 105 110

Ser Lys Ala Arg Leu Val Leu Thr Ser Gly Ile Val Phe Val Ile Ser

115 120 125

Gly Val Leu Thr Leu Ile Pro Val Cys Trp Thr Ala His Ala Val Ile

130 135 140

Arg Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Glu Ala Gln Lys Arg Glu Leu

145 150 155 160

Gly Ala Ser Leu Tyr Leu Gly Trp Ala Ala Ser Gly Leu Leu Leu Leu

165 170 175

Gly Gly Gly Leu Leu Cys Cys Thr Cys Pro Ser Gly Gly Ser Gln Gly

180 185 190

Pro Ser His Tyr Met Ala Arg Tyr Ser Thr Ser Ala Pro Ala Ile Ser

195 200 205
 Arg Gly Pro Ser Glu Tyr Pro Thr Lys Asn Tyr Val
 210 215 220
 <210> 4
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
 1 5 10 15

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

 His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
 85 90 95
 Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
 100 105 110
 Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
 115 120 125
 Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu
 130 135 140

 Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
 145 150 155 160
 Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn
 165 170 175
 Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
 180 185 190

Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
195 200 205

<210> 5

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 5

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

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

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 6

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 6

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 7

<211> 117

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 7

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

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser

115

<210

> 8

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 8

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

1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser

115

<210

> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 9

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Cys Ile Tyr
35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 10

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 11

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 11

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

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

65	70	75	80
Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Asp Tyr Gly Tyr Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr			
	100	105	110
Leu Thr Val Ser Ser			
	115		

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 12

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly

1	5	10	15
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Leu			
	20	25	30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Val Tyr
35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Gly Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ile Tyr Pro Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 13

<211> 244

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 13

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

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser
130 135 140

Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro
165 170 175

Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
180 185 190

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
195 200 205

Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
210 215 220

Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys
225 230 235 240

Leu Glu Ile Lys

<210> 14

<211> 493

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 14

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65	70	75	80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
	100	105	110
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe			
	115	120	125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu			
	130	135	140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp			
	145	150	155
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu			
	165	170	175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser			
	180	185	190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro			
	195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Ser Gly			
	210	215	220
Pro Gly Gly Gly Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
	225	230	235
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala			
	245	250	255
Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr			
	260	265	270
Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile			
	275	280	285
Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe			
	290	295	300
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
	305	310	315
			320

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
325 330 335

Ala Arg Asp Tyr Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
340 345 350

Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
355 360 365

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser
370 375 380

Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys
385 390 395 400

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro
405 410 415

Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
420 425 430

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
435 440 445

Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
450 455 460

Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys
465 470 475 480

Leu Glu Ile Lys Gly Gly Ser His His His His His His
485 490

<210> 15
<211> 493
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antibody-derived sequence
<400> 15

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr

20	25	30	
Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
35	40	45	
Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe			
50	55	60	
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
100	105	110	
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe			
115	120	125	
Pro Leu Ala Pro Cys Ser Lys Ser Thr Ser Glu Gly Thr Ala Ala Leu			
130	135	140	
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp			
145	150	155	160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu			
165	170	175	
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser			
180	185	190	
Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro			
195	200	205	
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Pro Lys Ser Ala Ser Gly			
210	215	220	
Pro Gly Gly Gly Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
225	230	235	240
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala			
245	250	255	
Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr			
260	265	270	

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile

275 280 285
Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
290 295 300
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
305 310 315 320
Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
325 330 335
Ala Arg Asp Tyr Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

340 345 350
Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
355 360 365
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser
370 375 380
Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys
385 390 395 400
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro

405 410 415
Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
420 425 430
Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
435 440 445
Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
450 455 460
Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys

465 470 475 480
Leu Glu Ile Lys Gly Gly Ser His His His His His His
485 490

<210> 16
<211> 473
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 16

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr

35 40 45

Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro

100 105 110

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

115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala

180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys Asp Val Pro Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln

210 215 220

Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser
 225 230 235 240
 Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val
 245 250 255
 Lys Gln Ser His Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro
 260 265 270
 Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr
 275 280 285

 Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu Ser
 290 295 300
 Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly
 305 310 315 320
 Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 325 330 335
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 340 345 350

 Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser
 355 360 365
 Val Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser
 370 375 380
 Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys
 385 390 395 400
 Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
 405 410 415

 Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg
 420 425 430
 Val Ala Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn
 435 440 445
 Tyr Pro Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser
 450 455 460
 Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 465 470

<210> 17

<211> 484

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 17

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr

20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Ser Gly
 210 215 220
 Pro Gly Gly Gly Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 225 230 235 240
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

 245 250 255
 Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 260 265 270
 Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
 275 280 285
 Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
 290 295 300
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

 305 310 315 320
 Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 325 330 335
 Ala Arg Asp Tyr Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 340 345 350
 Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 355 360 365
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser

 370 375 380
 Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys
 385 390 395 400
 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro
 405 410 415
 Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 420 425 430
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser

 435 440 445

Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 450 455 460
 Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys
 465 470 475 480
 Leu Glu Ile Lys

<210> 18

<211> 484

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 18

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala

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

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

130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Pro Lys Ser Ala Ser Gly
 210 215 220
 Pro Gly Gly Gly Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 225 230 235 240
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 245 250 255
 Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 260 265 270
 Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
 275 280 285
 Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
 290 295 300
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 305 310 315 320
 Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 325 330 335
 Ala Arg Asp Tyr Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 340 345 350
 Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 355 360 365
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser
 370 375 380
 Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys
 385 390 395 400
 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro

405 410 415
 Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 420 425 430
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
 435 440 445
 Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys

450 455 460
 Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys
 465 470 475 480
 Leu Glu Ile Lys

<210> 19

<211> 463

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 19

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

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

85 90 95
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr

115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys Asp Val Pro Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln

 210 215 220
 Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser
 225 230 235 240
 Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val
 245 250 255
 Lys Gln Ser His Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro
 260 265 270
 Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr

 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu Ser
 290 295 300
 Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly
 305 310 315 320
 Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 325 330 335
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

 340 345 350
 Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser
 355 360 365

Val Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser
370 375 380

Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys
385 390 395 400

Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg

405 410 415

Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg
420 425 430

Val Ala Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn
435 440 445

Tyr Pro Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
450 455 460

<210> 20

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 20

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 21

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 21

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 22

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 22

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

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

Lys

<210> 23

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 23

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

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

Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 24

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 24

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

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

Ser Val Thr Val
 115

<210> 25

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 25

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

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

Lys

<210> 26

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 26

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

Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln
130 135 140

Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser
145 150 155 160

Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr
165 170 175

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
180 185 190

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
195 200 205

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
210 215 220

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe
225 230 235 240

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
245 250

<210> 27
<211> 256
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antibody-derived sequence
<400> 27

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

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

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn

85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100 105 110

Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln

130 135 140

Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys

145 150 155 160

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys

165 170 175

Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser

180 185 190

Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu

195 200 205

Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro

210 215 220

Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly

225 230 235 240

Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

245 250 255

<210> 28

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 28

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln

130 135 140

Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser

145 150 155 160

Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr

165 170 175

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile

180 185 190

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

195 200 205

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

210 215 220

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe
225 230 235 240

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
245 250

<210> 29

<211> 256

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 29

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln
130 135 140

Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys
145 150 155 160

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys
165 170 175

Gln Arg Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser
180 185 190
Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu
195 200 205

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

<210> 30

<211> 500

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 30

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

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

115	120	125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		
130	135	140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
145	150	155
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
165	170	175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
180	185	190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Ser Gly		
210	215	220
Pro Gly Gly Gly Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
225	230	235
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala		
245	250	255
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr		
260	265	270
Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
275	280	285
Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe		
290	295	300
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
305	310	315
Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		
325	330	335
Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
340	345	350
Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
355	360	365

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln
370 375 380

Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser
385 390 395 400

Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr
405 410 415

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
420 425 430

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
435 440 445

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
450 455 460

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe
465 470 475 480

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Ser His His
485 490 495

His His His His
500

<210> 31

<211> 500

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 31

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50	55	60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		80
	85	90
Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		95
	100	105
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe		110
	115	120
		125
Pro Leu Ala Pro Cys Ser Lys Ser Thr Ser Glu Gly Thr Ala Ala Leu		
	130	135
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		140
	145	150
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		155
	160	165
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		170
	175	180
		185
		190
Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro		
	195	200
		205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Pro Lys Ser Ala Ser Gly		
	210	215
		220
Pro Gly Gly Gly Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
	225	230
		235
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala		240
	245	250
		255
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr		
	260	265
		270
Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
	275	280
		285
Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe		
	290	295
		300

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
305 310 315 320

Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
325 330 335

Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
340 345 350

Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
355 360 365

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln
370 375 380

Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser
385 390 395 400

Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr
405 410 415

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
420 425 430

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
435 440 445

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
450 455 460

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe
465 470 475 480

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Ser His His
485 490 495

His His His His
500

<210> 32

<211> 480

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 32

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys Asp Val Pro Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln
210 215 220

Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser
225 230 235 240

Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val

245 250 255

Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro

260 265 270

Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr

275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser

290 295 300

Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg

305 310 315 320

Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser

325 330 335

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

340 345 350

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu

355 360 365

Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln

370 375 380

Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln

385 390 395 400

Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr

405 410 415

Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr

420 425 430

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

435 440 445

Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly

450 455 460

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

465 470 475 480

<210> 33

<211> 503

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 33

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr

20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Ser Gly

210	215	220	
Pro Gly Gly Gly Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
225	230	235	240
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly			
	245	250	255
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser			
	260	265	270
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln			
	275	280	285
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val			
	290	295	300
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
305	310	315	320
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn			
	325	330	335
Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile			
	340	345	350
Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
	355	360	365
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln			
	370	375	380
Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys			
385	390	395	400
Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys			
	405	410	415
Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser			
	420	425	430
Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu			
	435	440	445
Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro			
	450	455	460

Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly
 465 470 475 480
 Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 485 490 495
 Ser His His His His His His
 500
 <210> 34
 <211> 503
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antibody-derived sequence
 <400> 34
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Lys Ser Thr Ser Glu Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205

 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Pro Lys Ser Ala Ser Gly
 210 215 220
 Pro Gly Gly Gly Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 225 230 235 240
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
 245 250 255
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 260 265 270

 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 275 280 285
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 290 295 300
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 305 310 315 320
 Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 325 330 335

 Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 340 345 350
 Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 355 360 365
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln
 370 375 380
 Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys
 385 390 395 400

 Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys

405 410 415
 Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser
 420 425 430
 Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu
 435 440 445
 Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro
 450 455 460

Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly
 465 470 475 480
 Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 485 490 495
 Ser His His His His His His

500

<210> 35

<211> 485

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 35

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

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

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
 85 90 95
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro

100	105	110	
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr			
115	120	125	
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys			
130	135	140	
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu			
145	150	155	160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser			
165	170	175	
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala			
180	185	190	
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe			
195	200	205	
Asn Arg Gly Glu Cys Asp Val Pro Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr			
210	215	220	
Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met			
225	230	235	240
Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn			
245	250	255	
Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu			
260	265	270	
Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr			
275	280	285	
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln			
290	295	300	
Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro			
305	310	315	320
Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly			
325	330	335	
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
340	345	350	

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu
 355 360 365
 Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
 370 375 380
 Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln
 385 390 395 400

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn
 405 410 415
 Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430
 Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser
 435 440 445
 Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr
 450 455 460

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ser Ala Trp Ser His
 465 470 475 480
 Pro Gln Phe Glu Lys
 485

<210> 36

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 36

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

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

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

 Pro Gly Gly Gly Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 225 230 235 240
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 245 250 255
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 260 265 270
 Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 275 280 285

 Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 290 295 300
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

305 310 315 320
 Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 325 330 335
 Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 340 345 350

 Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 355 360 365
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln
 370 375 380
 Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser
 385 390 395 400
 Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr
 405 410 415

 Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 420 425 430
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 435 440 445
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 450 455 460
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe
 465 470 475 480

 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 485 490

 <210> 37
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antibody-derived sequence
 <400> 37

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

20 25 30
 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr

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

 100 105 110
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

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

 225 230 235 240
 Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val
 245 250 255
 Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro
 260 265 270

Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser

290 295 300

Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg

305 310 315 320

Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser

325 330 335

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

340 345 350

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu

355 360 365

Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln

370 375 380

Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln

385 390 395 400

Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr

405 410 415

Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr

420 425 430

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

435 440 445

Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly

450 455 460

Thr Lys Leu Glu Ile Lys

465 470

<210> 38

<211> 496

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 38

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr

20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Ser Gly

210 215 220

Pro Gly Gly Gly Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

225 230 235 240

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly

245 250 255
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

260 265 270
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

275 280 285
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

290 295 300
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

305 310 315 320
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn

325 330 335
Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile

340 345 350
Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

355 360 365
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln

370 375 380
Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys

385 390 395 400
Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys

405 410 415
Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser

420 425 430
Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu

435 440 445
Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro

450 455 460
Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly

465 470 475 480
Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

485 490 495

<210> 39

<211> 475

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 39

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30
Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr

35 40 45
Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

65 70 75 80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr

85 90 95
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro

100 105 110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr

115 120 125
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

130 135 140
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

145 150 155 160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

165 170 175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala

180 185 190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195	200	205	
Asn Arg Gly Glu Cys Asp Val Pro Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr			
210	215	220	
Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met			
225	230	235	240
Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn			
245	250	255	
Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu			
260	265	270	
Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr			
275	280	285	
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln			
290	295	300	
Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro			
305	310	315	320
Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly			
325	330	335	
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
340	345	350	
Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu			
355	360	365	
Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr			
370	375	380	
Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln			
385	390	395	400
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn			
405	410	415	
Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser			
420	425	430	
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser			
435	440	445	

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr

450 455 460

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

465 470 475

<210> 40

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 40

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr

20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165	170	175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
180	185	190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Ser Gly		
210	215	220
Pro Gly Gly Gly Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
225	230	235
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala		
245	250	255
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr		
260	265	270
Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile		
275	280	285
Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe		
290	295	300
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
305	310	315
Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		
325	330	335
Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
340	345	350
Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
355	360	365
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln		
370	375	380
Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser		
385	390	395
Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr		
405	410	415

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
420 425 430
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
435 440 445
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
450 455 460
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe
465 470 475 480

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
485 490

<210> 41

<211> 470

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 41

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

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

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

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205
Asn Arg Gly Glu Cys Asp Val Pro Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln
210 215 220
Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser
225 230 235 240
Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val
245 250 255
Lys Gln Arg Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro
260 265 270
Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr
275 280 285
Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser
290 295 300
Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg
305 310 315 320
Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
325 330 335
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
340 345 350
Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
355 360 365
Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln

370 375 380
 Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln
 385 390 395 400
 Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr
 405 410 415
 Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr

420 425 430
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val
 435 440 445
 Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Cys Gly
 450 455 460

Thr Lys Leu Glu Ile Lys

465 470

<210> 42

<211> 496

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 42

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala

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

65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100	105	110	
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe			
115	120	125	
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu			
130	135	140	
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp			
145	150	155	160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu			
165	170	175	
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser			
180	185	190	
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro			
195	200	205	
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Ser Gly			
210	215	220	
Pro Gly Gly Gly Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
225	230	235	240
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly			
245	250	255	
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser			
260	265	270	
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln			
275	280	285	
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val			
290	295	300	
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
305	310	315	320
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn			
325	330	335	
Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile			
340	345	350	

Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
355 360 365

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln
370 375 380

Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys

385 390 395 400

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys
405 410 415

Gln Arg Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser
420 425 430

Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu
435 440 445

Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro

450 455 460

Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly
465 470 475 480

Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
485 490 495

<210> 43

<211> 475

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 43

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro

100 105 110

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

115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala

180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys Asp Val Pro Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr

210 215 220

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

225 230 235 240

Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn

245 250 255

Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu

260 265 270

Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr

275 280 285

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln

290 295 300

Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro

305 310 315 320
Phe Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly

 325 330 335
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

 340 345 350
Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu

 355 360 365
Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr

 370 375 380
Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln

385 390 395 400
Cys Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn

 405 410 415
Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser

 420 425 430
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser

 435 440 445
Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr

 450 455 460
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

465 470 475

<210> 44

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 44

Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr

1 5

<210> 45

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 45

Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr

1 5

<210> 46

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 46

Ala Arg Asp Tyr Gly Phe Val Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 47

Ala Arg Asp Tyr Gly Tyr Val Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 48

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Any amino acid, preferably Thr, Ser or Ile, most preferably Thr

<400> 48

Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Xaa

1 5

<210> 49

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDR sequence
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Any amino acid, preferably an aromatic amino acid, more preferably Phe or Tyr, most preferably Tyr
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Any amino acid, preferably an aromatic amino acid, more preferably Phe or Tyr, most preferably Tyr
 <220><221> MISC_FEATURE

 <222> (8)..(8)
 <223> Any amino acid, preferably Leu or Phe, more preferably Leu
 <400> 49
 Ala Arg Asp Xaa Gly Xaa Val Xaa Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 50
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDR sequence
 <400> 50
 Ser Ser Val Ser Tyr
 1 5
 <210> 51
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDR sequence
 <400> 51
 Ser Thr Ser
 1

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 52

Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp Thr

1 5 10

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 53

Gln Gln Arg Ser Ile Tyr Pro Pro Trp Thr

1 5 10

<210> 54

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Any amino acid, preferably Ser or Asn, most preferably Ser

<400> 54

Ser Ser Val Xaa Tyr

1 5

<210> 55

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Any amino acid, preferably Ser or Asn, most preferably Ser

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Any amino acid, preferably Tyr, Ser, Ile, Asn or Thr, more preferably Ile, Asn or Thr, most preferably Ile or Asn

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Any amino acid, preferably Ser or Tyr, more preferably Tyr

<400> 55

Gln Gln Arg Xaa Xaa Xaa Pro Pro Trp Thr

1 5 10

<210> 56

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 56

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp

1 5

<210> 57

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 57

Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr

1 5

<210> 58

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> CDR sequence

<400> 58

Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 59

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 59

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly

1 5

<210> 60

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 60

Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro

1 5

<210> 61

<211> 11

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 61

Ala Arg Leu Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 62

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 62

Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr

1 5 10

<210> 63

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 63

Trp Ala Ser

1

<210> 64

<211>

9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 64

Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 65

Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 66

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker sequence

<400> 66

Ser Gly Pro Gly Gly Gly Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

1 5 10 15

Gly Ser

<210> 67

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker sequence

<400> 67

Asp Val Pro Gly Gly Ser

1 5

<210> 68

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker sequence

<400> 68

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 69

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker sequence

<400> 69

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20

25

<210> 70

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker sequence

<220><221> REPEAT

<222> (1)..(5)

<223> Sequence repeated x times, wherein x is 3, 4, 5 or 6

<400> 70

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 71

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Secretion signal

<400> 71

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> His tag

<400> 72

Gly Gly Ser His His His His His His

1 5

<210> 73

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> His tag

<400> 73

His His His His His His

1 5

<210> 74

<211> 494

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 74

Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr

20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys

145 150 155 160

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser

165 170 175

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

180 185 190

Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser

195 200 205

Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 210 215 220

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
 225 230 235 240

Glu Leu Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser
 245 250 255

Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys
 260 265 270

Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln
 275 280 285

Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn
 290 295 300

Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
 305 310 315 320

Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr
 325 330 335

Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Phe Val
 340 345 350

Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly
 355 360 365

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
 370 375 380

Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly Glu Lys Val
 385 390 395 400

Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe
 405 410 415

Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser
 420 425 430

Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly
 435 440 445

Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp Ala Ala

450 455 460
 Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp Thr Phe Gly
 465 470 475 480

 Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys His His His His His His
 485 490
 <210> 75
 <211> 495
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antibody-derived sequence
 <400> 75
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

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

 100 105 110
 Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 130 135 140
 Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln
 145 150 155 160

Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln

165 170 175

Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr

180 185 190

Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr

195 200 205

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

210 215 220

Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp

275 280 285

Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn

290 295 300

Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala

305 310 315 320

Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser

325 330 335

Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr

340 345 350

Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr

355 360 365

Val Ser Ser Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly

370 375 380

Ser Gly Gly Val Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met

385 390 395 400

Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser

405 410 415
Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro

420 425 430
Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr

435 440 445
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser

450 455 460
Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser

465 470 475 480
Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

485 490 495

<210> 76

<211> 511

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 76

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln
 130 135 140
 Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser
 145 150 155 160
 Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr
 165 170 175
 Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 180 185 190
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 195 200 205
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 210 215 220
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe
 225 230 235 240
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly
 245 250 255
 Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly
 260 265 270
 Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg
 275 280 285
 Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 290 295 300
 Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys
 305 310 315 320
 Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
 325 330 335
 Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
 340 345 350
 Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln

355 360 365
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 370 375 380
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu
 385 390 395 400
 Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr
 405 410 415
 Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln

420 425 430
 Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys
 435 440 445
 Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 450 455 460
 Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr
 465 470 475 480
 Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly

485 490 495
 Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Ser His His His His His His
 500 505 510

<210> 77

<211> 516

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 77

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50	55	60	
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
65	70	75	80
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn			
	85	90	95
Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile			
	100	105	110
Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
	115	120	125
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln			
	130	135	140
Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys			
145	150	155	160
Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys			
	165	170	175
Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser			
	180	185	190
Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu			
	195	200	205
Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro			
	210	215	220
Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly			
225	230	235	240
Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser			
	245	250	255
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu			
	260	265	270
Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly			
	275	280	285
Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly			
	290	295	300

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr
 305 310 315 320
 Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys
 325 330 335
 Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
 340 345 350

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu
 355 360 365
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 370 375 380
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 385 390 395 400
 Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro
 405 410 415

Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr
 420 425 430
 Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile
 435 440 445
 Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly
 450 455 460
 Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala
 465 470 475 480

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu
 485 490 495
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Ser His His
 500 505 510
 His His His His
 515

<210> 78

<211> 1479

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 78

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccaccggcgt gcactctcag	60
atcgtgctga cccagttctc cgccatcatg tctgctagcc ctggcgagaa agtgacaatg	120
acctgccggg cctcctctc cgtgtcctac atgaactggt atcagcagaa gtccggcacc	180
tccccaaagc ggtggatcta cgacacctcc aagggtggcct ctggcgtgcc ctacagattc	240
tccggctctg gctctggcac ctctacagc ctgaccatct ccagcatgga agccgaggat	300
gccgccacct actactgcca gcagtggctc tccaaccccc tgacctttgg cgtggcacc	360
aagctggaac tgaagcggac cgtggccgct ccttcctgt tcatcttccc tccctccgac	420
gagcagctga agtccggcac cgcctccgtg gtgtgcctgc tgaacaactt ctaccctcgg	480
gaggccaagg tgcagtggaa ggtggacaac gccctgcagt ccggcaactc ccaggaaagc	540
gtcaccgagc aggactccaa ggacagcacc tactccctgt cctccaccct gacctgtcc	600
aaggccgact acgagaagca caaggtgtac gcctgcgagg tgaccaccca gggcctgtcc	660
agccctgtga ccaagtctt caaccggggc gagtgtgacg tgccctggtg tagcgaagtg	720
cagctgcagc agagcggccc tgagctggtg aaacccggcg ctagcatgaa gatcagctgc	780
aaggccagcg gctacagctt caccggctac accatgaact gggtgaaaca gagccacggc	840
aagtgcctgg aatggatcgg cctgatcaac cctacaacg gcggcaccat ctacaaccag	900
aagttcaagg gcaaggccac actgaccgtg gacaagagca gcagcaccgc ctacatggaa	960
ctgctgagcc tgaccagcga ggacagcgcc gtgtactact gcgccagaga ctacggcttc	1020
gtgtggact actggggcca gggcaccacc ctgacagtgt ctagcggagg cggaggatct	1080
ggtggtggcg gatctggcgg cgggtggaagt ggcgagggtg gtagccagat cgtgctgacc	1140
cagtccccct ccacatgtc cgtgtctccc ggcgagaaag tgacaattac ctgctccgcc	1200
tcctctctcg tctctacat gcactgggtc cagcagaagc ccggcacctc cccaagctg	1260
tggatctact ccacctcaa cctggcctcc ggcgtgcccg ccagattctc cggaagaggc	1320
tccggcacca gtactccct gaccatctcc agagtggccg ccgaggacgc cgccacctac	1380
tactgccage agcgggtccaa ctaccccccc tggacctttg gctgcggcac caagctggaa	1440
atcaagtctg cctggagcca cccacagttc gagaagtga	1479

<210> 79

<211> 1539

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 79

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccaccggcgt gcactcccag	60
gtgcagctgc agcagtctgg cgctgagctg gctagacctg gcgcctccgt gaagatgtcc	120
tgcaagacct cgggctacac cttcaccggg tacacatgc actgggtcaa gcagaggcct	180
ggacagggcc tggaatggat cggctacatc aaccctccc ggggctacac caactacaac	240
cagaagtcca aggacaaggc caccctgaca accgacaagt cctcctccac cgcctacatg	300
cagctgtcct cctgacctc cgaggactcc gccgtgtact actgcgccg gtactacgac	360
gaccactact cctggacta ctggggccag ggcaccacac tgacagtgtc tagcgctcc	420
accaagggcc ctccgtgtt ccctctggcc ccttcctcca agtcacctc cggcggcacc	480
gccgctctgg gctgcctggt gaaggactac ttccctgagc ctgtgaccgt gagctggaac	540
tctggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccctgccg tgctgcagtc ctccggcctg	600
tactcctgt cctccgtggt gaccgtgcct tctcctccc tgggcacca gacctacatc	660
tgcaacgtga accacaagcc ttccaacacc aaggtggaca agcgggtgga gcctaagtec	720
tgctccggcc ctggggcgcg acgcagcggc ggaggcggat ccggcggagg aggctctgaa	780
gtgcagctgc agcagagcgg ccctgagctg gtgaaaccg gcgctagcat gaagatcagc	840
tgcaaggcca ggggctacag cttcaccggc tacacatga actgggtgaa acagagccac	900
ggcaagtgcc tggaatggat cggcctgatc aaccctaca acggcggcac catctacaac	960
cagaagtcca agggcaaggc cacactgacc gtggacaaga gcagcagcac cgcctacatg	1020
gaactgctga gcctgaccag cgaggacagc gccgtgtact actgcgccag agactacggc	1080
ttcgtgctgg actactgggg ccagggcacc accctgacag tgtctagcgg aggcggagga	1140
tctggtggtg gcggatctgg cggcgggtgga agtggcggag gtggtagcca gatcgtgctg	1200
accagtccc cctccatcat gtccgtgtct cccggcgaga aagtgacaat tacctgctcc	1260
gcctcctcct cgtgtccta catgactgg ttccagcaga agcccggcac ctccccaag	1320
ctgtggatct actccactc caacctggcc tccggcgtgc ccgcagatt ctccgaaga	1380
ggctccggca ccagctactc cctgaccatc tccagagtgg ccgccgagga cggccacc	1440
tactactgcc agcagcggtc caactacccc ccctggacct ttggctgcgg caccaagctg	1500
gaaatcaagg gcggctccca ccaccacat caccactga	1539

<210> 80

<211> 1539

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 80

atgggctggg cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccaccggcgt gcactcccag	60
gtgcagctgc agcagctcgg cgctgagctg gctagacctg gcgcctccgt gaagatgtcc	120
tgcaagacct ccggctacac cttcaccggg tacacatgc actgggtcaa gcagaggcct	180
ggacaggggc tggaatggat cggctacatc aaccctccc ggggctacac caactacaac	240
cagaagtcca aggacaaggc caccctgaca accgacaagt cctcctccac cgctacatg	300
cagctgtcct cctgacctc cgaggactcc gccgtgtact actgcgccg gtactacgac	360
gaccactact cctggacta ctggggccag ggcaccacac tgacagtgtc tagcgctcc	420
accaagggcc cttccgtgtt cctctggcc cttgtctca agtccacctc cgaaggcacc	480
gccgctctgg gctgcctggt gaaggactac ttccctgagc ctgtgacctg gagctggaac	540
tctggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccctgccg tgctgcagtc ctccggcctg	600
tactcctgt cctccgtggt gaccgtgctt tcctccaact tcggcaccca gacctacacc	660
tgcaacgtgg accacaagcc ttccaacacc aagggtggaca agaccgtgga gcctaagtcc	720
gcctccggcc ctgggggcgg acgcagcggc ggaggcggat ccggcggagg aggctctgaa	780
gtgcagctgc agcagagcgg ccctgagctg gtgaaacccg gcgctagcat gaagatcagc	840
tgcaaggcca gcggctacac cttcaccggc tacacatga actgggtgaa acagagccac	900
ggcaagtgcc tggaatggat cggcctgac aaccctaca acggcggcac catctacaac	960
cagaagtcca agggcaaggc cactactgacc gtggacaaga gcagcagcac cgcctacatg	1020
gaactgctga gcctgaccag cgaggacagc gccgtgtact actgcgccag agactacggc	1080
ttcgtgctgg actactgggg ccagggcacc accctgacag tgtctagcgg aggcggagga	1140
tctggtgggt gcggatctgg cggcgggtgga agtggcggag gtggtagcca gatcgtgctg	1200
accagtcct cctccatcat gtccgtgtct cccggcgaga aagtgacaat tacctgctcc	1260
gcctcctcct ccgtgtccta catgcactgg ttccagcaga agcccgccac ctcccccaag	1320
ctgtggatct actccacctc caacctggcc tccggcgtgc ccgccagatt ctccggaaga	1380
ggctccggca ccagctactc cctgaccatc tccagagtgg ccgccgagga cgccgccacc	1440
tactactgcc agcagcggtc caactacccc cctggacct ttggctgcgg caccaagctg	1500
gaaatcaagg gcggctccca ccaccacat caccactga	1539

<210> 81

<211> 1449

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 81

```

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccaccggcgt gcactctcag      60
atcgtgctga cccagtctcc cgccatcatg tctgctagcc ctggcgagaa agtgacaatg      120
acctgccggg cctcctcttc cgtgtcctac atgaactggg atcagcagaa gtccggcacc      180
tccccaaagc ggtggatcta cgacacctcc aaggtggcct ctggcgtgcc ctacagattc      240
tccggctctg gctctggcac ctctacagc ctgacctct ccagcatgga agccgaggat      300
gccgccacct actactgcca gcagtgggtcc tccaaccccc tgacctttgg cgctggcacc      360

aagctggaac tgaagcggac cgtggccgct ccttccgtgt tcattttccc tccctccgac      420
gagcagctga agtccggcac cgcctccgtg gtgtgcctgc tgaacaactt ctaccctcgg      480
gaggccaagg tgcagtggaa ggtggacaac gcctgcagt ccggcaactc ccaggaaagc      540
gtcaccgagc aggactccaa ggacagcacc tactcctgt cctccaccct gacctgtcc      600
aaggccgact acgagaagca caaggtgtac gcctgcgagg tgaccacca gggcctgtcc      660
agccctgtga ccaagtcctt caaccggggc gagtgtgacg tgccctggtg tagcgaagtg      720
cagctgcagc agagcggccc tgagctggtg aaaccggcg ctagcatgaa gatcagctgc      780

aaggccagcg gctacagctt caccggctac accatgaact gggtgaaaca gagccacggc      840
aagtgcctgg aatggatcgg cctgatcaac ccctacaacg gcggcaccat ctacaaccag      900
aagttcaagg gcaaggccac actgaccgtg gacaagagca gcagcaccgc ctacatggaa      960
ctgctgagcc tgaccagcga ggacagcgcc gtgtactact gcgccagaga ctacggcttc      1020
gtgctggact actggggcca gggcaccacc ctgacagtgt ctagcggagg cggaggatct      1080
ggtggtggcg gatctggcgg cgggtggaagt ggcggagggt gtagccagat cgtgctgacc      1140
cagtccccct ccatcatgtc cgtgtctccc ggcgagaaag tgacaattac ctgctccgcc      1200

tcctctctcg tgtctacat gcactggttc cagcagaagc ccggcacctc cccaagctg      1260
tggatctact ccacctcaa cctggcctcc ggcgtgcccg ccagattctc cggaagaggc      1320
tccggcacca gctactccct gaccatctcc agagtggcgg ccgaggacgc cgccacctac      1380
tactgccagc agcgggtcaa ctaccccccc tggacctttg gctgcggcac caagctggaa      1440
atcaagtga                                     1449

```

<210> 82

<211> 1512

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 82

```

atgggctggg cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccaccggcgt gcactcccag      60

gtgcagctgc agcagctctgg cgctgagctg gctagacctg gcgcctccgt gaagatgtcc      120
tgcaagacct cgggctacac cttcacccgg tacacatgc actgggtcaa gcagaggcct      180
ggacagggcc tggaatggat cggctacatc aaccctccc ggggctacac caactacaac      240
cagaagtcca aggacaaggc caccctgaca accgacaagt cctcctccac cgcctacatg      300
cagctgtcct cctgacctc cgaggactcc gccgtgtact actgcgcccg gtactacgac      360
gaccactact cctggacta ctggggccag ggaccacac tgacagtgtc tagcgctcc      420
accaagggcc cttccgtgtt cctctggcc ctttctcca agtccacctc cggcggcacc      480

gccgctctgg gctgcctggg gaaggactac ttccctgagc ctgtgaccgt gagctggaac      540
tctggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccctgccg tgctgcagtc ctccggcctg      600
tactccctgt cctccgtggg gaccgtgect tctcctccc tgggcacca gacctacatc      660
tgcaacgtga accacaagcc ttccaacacc aaggtggaca agcgggtgga gcctaagtcc      720
tgctccggcc ctggggcgcg acgcagcggc ggaggcggat ccggcggagg aggctctgaa      780
gtgcagctgc agcagagcgg ccctgagctg gtgaaacccg gcgctagcat gaagatcagc      840
tgcaaggcca gcggctacag cttaccggc tacacatga actgggtgaa acagagccac      900

ggcaagtgcc tggaatggat cggcctgac aaccctaca acggcggcac catctacaac      960
cagaagtcca agggcaaggc cacctgacc gtggacaaga gcagcagcac cgcctacatg      1020
gaactgtgta gcctgaccag cgaggacagc gccgtgtact actgcgccag agactacggc      1080
ttcgtgctgg actactgggg ccagggcacc accctgacag tgtctagcgg aggcggagga      1140
tctggtgggt gcggatctgg cggcgggtgga agtggcggag gtggtagcca gatcgtgctg      1200
accagtcct cctccatcat gtccgtgtct cccggcgaga aagtacaat tacctgctcc      1260
gcctcctect ccgtgtccta catgcactgg ttccagcaga ageccggcac ctcccccaag      1320

ctgtggatct actccacctc caacctggcc tccggcgtgc ccgccagatt ctccgaaga      1380
ggctccggca ccagctactc cctgaccatc tccagagtgg ccgccgagga cgccgccacc      1440
tactactgcc agcagcggtc caactacccc cctggacct ttggctgcgg caccaagctg      1500
gaaatcaagt ga      1512

```

<210> 83

<211> 1512

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 83

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccaccggcgt gcactcccag	60
gtgcagctgc agcagctctgg cgctgagctg gctagacctg ggcctccgt gaagatgtcc	120
tgcaagacct ccggctacac cttcacccgg tacacatgc actgggtcaa gcagaggcct	180
ggacagggcc tggaatggat cggctacatc aaccctccc ggggctacac caactacaac	240
cagaagtcca aggacaaggc caccctgaca accgacaagt cctcctccac cgcctacatg	300
cagctgtcct cctgacctc cgaggactcc gccgtgtact actgcgccg gtactacgac	360
gaccactact cctggacta ctggggccag ggaccacac tgacagtgtc tagcgcctcc	420
accaagggcc cticcgtgtt ccctctggcc ccttgctcca agtccacctc cgaaggcacc	480
gccgctctgg gctgcctggt gaaggactac ttcctgagc ctgtgaccgt gagctggaac	540
tctggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcctgccc tgcctcagtc ctccggcctg	600
tactcctgt cctccgtggt gaccgtgcct tctccaact tcggcaccca gacctacacc	660
tgcaacgtgg accacaagcc ttccaacacc aaggtggaca agaccgtgga gcctaagtc	720
gcctccggcc ctggggcgcc acgcagcggc ggaggcggat ccggcgagg aggctctgaa	780
gtgcagctgc agcagagcgg ccctgagctg gtgaaaccg gcgctagcat gaagatcagc	840
tgcaaggcca gcggctacag cttcacccgc tacacatga actgggtgaa acagagccac	900
ggcaagtgcc tggaatggat cggcctgatc aaccctaca acggcggcac catctacaac	960
cagaagtcca agggcaaggc cactgacc gtggacaaga gcagcagcac cgcctacatg	1020
gaactgctga gcctgaccag cgaggacagc gccgtgtact actgcgccag agactacggc	1080
ttcgtgctgg actactgggg ccagggcacc accctgacag tgtctagcgg aggcggagga	1140
tctggtggtg gcggatctgg cggcggtgga agtggcggag gtggtagcca gatcgtgctg	1200
accagtcct cctccatcat gtccgtgtct ccggcgaga aagtgacaat tacctgctcc	1260
gcctcctcct ccgtgtccta catgactgg ttccagcaga agcccggcac ctcccccaag	1320
ctgtggatct actccacctc caacctggcc tccggcgtgc ccgccagatt ctccggaaga	1380
ggctccggca ccagctactc cctgaccatc tccagagtgg ccgccgagga cggccacc	1440
tactactgcc agcagcggtc caactacccc ccttgacct ttggtgcgg caccaagctg	1500
gaaatcaagt ga	1512

<210> 84

<211> 1542

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 84

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggccaccg ccaccggcgt gcacagcgac	60
atcaagctgc agcagagcgg agccgagctg gccagacctg gggccagcgt gaagatgagc	120
tgcaagacca gcggctacac cttcacccgg tacaccatgc actgggtgaa acagcggcct	180
ggacagggcc tggaatggat cggctacatc aaccccagcc ggggctacac caactacaac	240
cagaagtcca aggacaaggc caccctgacc accgacaaga gcagcagcac cgcctacatg	300
cagctgagca gcctgaccag cgaggacagc gccgtgtact actgcgccg gtactacgac	360
gaccactaca gcctggacta ctggggccag ggcaccaccc tgacagtgtc tagcgtggaa	420
ggaggaagcg gaggatctgg cggctctggg ggaagcgggt gcgtggacga catccagctg	480
accagagacc ccgccatcat gtctgccagc cctggcgaga aagtgacct gacctgccgg	540
gccagcagca gcgtgtccta catgaactgg tatcagcaga agtccggcac cagccccaag	600
cggtggatct acgacaccag caaggtggca agcggcgtgc cctacagatt cagcggcagc	660
ggctccggca cctcctactc cctgaccatc agcagcatgg aagccgagga cgccgccacc	720
tactactgcc agcagtggtc cagcaacccc ctgaccttcg gagccggcac caagtggaa	780
ctgaagtctg gcgggggagg atccgaggtg cagctgcagc agtccggccc tgagctggtg	840
aaaccggcgc ctagcatgaa gatctcttgc aaggcctccg gctacagctt taccggctac	900
acaatgaatt gggatgaagca gagccacggc aagaatctgg aatggattgg cctgatcaac	960
ccttacaacg gcggcacaat ctataatcag aagtttaaag ggaaggccac actgacagtg	1020
gacaagtcca gctccacagc ctacatggaa ctgctgagcc tgacctcca ggactctgcc	1080
gtgtattact gtgccagaga ctacggcttc gtgctggatt attggggaca gggaacaaca	1140
ctgaccgtgt cctccggggg aggggggatca ggtgggggag gtagtggggg tggcggctct	1200
gatatcgtgc tgaccagtc ccctagcatc atgagcgtgt cccagggcga aaaagtgaca	1260
atcacttgca gcgccagctc ctccgtgtct tatatgcatt ggttccagca gaagcctggc	1320
acatccccc aactgttaat ctacagcacc tccaacctgg cttccggcgt gcccgcgaga	1380
ttttctggca gaggcagcgg caccagctac agcctgacaa tcagccgggt ggccgccgaa	1440
gatgccgcca catattatig tcagcagcgg agcaactacc cccctggac attcggggga	1500
ggaacaaagc tggaatcaa gcaccaccac caccaccact ga	1542

<210> 85

<211> 1500

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 85

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccaccggcgt gcactctcag	60
atcgtgctga cccagtctcc cgccatcatg tctgctagcc ctggcgagaa agtgacaatg	120
acctgccggg cctcctcctc cgtgtcctac atgaactggg atcagcagaa gtccggcacc	180
tccccaagc ggtagatcta cgacacctcc aaggtagcct ctggcgtgcc ctacagattc	240
tccggtcttg gctctggcac ctctacagc ctgacctct ccagcatgga agccgaggat	300
gccgccacct actactgcca gcagtgggtcc tccaaccccc tgacctttgg cgctggcacc	360
aagctggaac tgaagcggac cgtggccgct ccttcctgt tcatcttccc tccctccgac	420
gagcagctga agtccggcac cgctccgtg gtgtgcctgc tgaacaactt ctacctcgg	480
gaggccaagg tgcagtggaa ggtggacaac gccctgcagt ccggcaactc ccaggaaagc	540
gtcaccgagc aggactccaa ggacagcacc tactcctgt cctccacct gacctgtcc	600
aaggccgact acgagaagca caaggtgtac gcctgcgagg tgaccacca gggcctgtcc	660
agccctgtga ccaagtcctt caaccggggc gagtgtgacg tgcctggtgg tagccagggtg	720
cagctgcagc agcctggcgc tgaactggtc cgacctggcg cctccgtgaa gctgtcctgc	780
aaggcctccg gctacacctt caccagctac tggatcaact gggtaagca gcggcctggc	840
cagggcctgg aatggatcgg caacatctac cctccgact cctacaccaa ctacaaccag	900
aagttaagg acaaggccac cctgaccgtg gacaagtcct cctccaccgc ctacatgcag	960
ctgtccagcc ccacctccga ggactccgcc gtgtactact gcacccggtc ctggcggggc	1020
aactccttcg actattgggg ccagggcacc accctgacag tgtcctctgg aggcggagga	1080
tctggtggtg gcggatctgg cggcgggtgga agtggcggag gtggtagcga catcgtgatg	1140
accagtgccc cctccagcct gacctgacc gctggcgaga aagtgacat gagctgcaag	1200
tcctcccagt cctgtctgaa ctccggcaac cagaagaact acctgacctg gtatcagcag	1260
aagcccgcc agcccccaa gctgtgatc tactgggcct ccacccgca gctgtgcgtg	1320
cccgatagat tcaccggctc cggcagcggc accgacttta ccctgacct ctccagcgtg	1380
caggccgagg acctggccgt gtattactgt cagaacgact actcctacc cttcaccttc	1440
ggctctggca ccaagctgga aatcaagtct gcctggagcc acccacagtt cgagaagtga	1500

<210> 86

<211> 1515

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 86

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccaccggcgt gcactctcag	60
atcgtgctga cccagtctcc cgccatcatg tctgctagcc ctggcgagaa agtgacaatg	120
acctgccggg cctcctcctc cgtgtcctac atgaactggg atcagcagaa gtccggcacc	180
tccccaaagc ggtggatcta cgacacctcc aagggtggcct ctggcgtgcc ctacagattc	240
tccggctctg gctctggcac ctctacagc ctgaccatct ccagcatgga agccgaggat	300
gccgccacct actactgcca gcagtggctc tccaaccccc tgacctttgg cgtggcacc	360
aagctggaac tgaagcggac cgtggccgct ccttcctgtg tcatcttccc tcctccgac	420
gagcagctga agtccggcac cgctccgtg gtgtgcctgc tgaacaactt ctaccctcgg	480
gaggccaagg tgcagtggaa ggtggacaac gccctgcagt ccggcaactc ccaggaaagc	540
gtcaccgagc aggactccaa ggacagcacc tactcctgt cctccaccct gaccctgtcc	600
aaggccgact acgagaagca caaggtgtac gcctgcgagg tgaccaccca gggcctgtcc	660
agccctgtga ccaagtcctt caaccggggc gagtgtgacg tgcctggtgg tagcgacatc	720
gtgatgacct agtccccctc cagcctgacc gtgaccgctg gcgagaaagt gaccatgagc	780
tgcaagtctt cccagtccct gctgaactcc ggcaaccaga agaactacct gacctggtat	840
cagcagaagc ccggccagcc cccaagctg ctgatctact gggcctccac ccgcgagtct	900
ggcgtgcccc atagattcac cggtccggc agcggcaccg actttaccct gaccatctcc	960
agcgtgcagg ccgaggacct ggccgtgtat tactgtcaga acgactactc ctacccttc	1020
accttcggct ctggcaccia gctggaaatc aaggaggcgt gtggttcagg cggcggaggc	1080
agcggtaggag gtggtagtgg cggtagcggt tcagggggag gtggtctgca ggtgcagctg	1140
cagcagcctg gcgtgaact ggtccgacct ggccgctccg tgaagctgtc ctgcaaggcc	1200
tccggctaca cttcaccag ctactggatc aactgggtca agcagcggcc tggccagggc	1260
ctggaatgga tcggcaacat ctaccctcc gactcctaca ccaactaaa ccagaagttc	1320
aaggacaagg ccaccctgac cgtggacaag tcctcctcca ccgcctacat gcagctgtcc	1380
agccccacct ccgaggactc cgccgtgtac tactgcaccc ggtcctggcg gggcaactcc	1440
ttcgactatt ggggccaggg caccacctg acagtgtcct cttctgcctg gagccaccca	1500
cagttcgaga agtga	1515

<210> 87

<211> 1560

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 87

```

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccaccggcgt gcactcccag      60
gtgcagctgc agcagctcgg cgctgagctg gctagacctg gcgcctccgt gaagatgtcc      120
tgcaagacct ccggctacac cttcaccggg tacacatgc actgggtcaa gcagaggcct      180
ggacagggcc tggaatggat cggctacatc aaccctccc ggggctacac caactacaac      240
cagaagtcca aggacaaggc caccctgaca accgacaagt cctcctccac cgcctacatg      300
cagctgtcct cctgacctc cgaggactcc gccgtgtact actgcgcccg gtactacgac      360

gaccactact ccttgacta ctggggccag ggaccacac tgacagtgtc tagcgctcc      420
accaagggcc cttccgtgtt ccctctggcc ctttctcca agtccacctc cggcggcacc      480
gccgctctgg gtgcctggt gaaggactac ttccctgagc ctgtgacctg gagctggaac      540
tctggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccctgccg tgctgcagtc ctccggcctg      600
tactccctgt cctccgtggt gaccgtgect tctcctccc tgggcacca gacctacatc      660
tgcaactga accacaagcc ttccaacacc aaggtggaca agcgggtgga gcctaagtcc      720
tgctccggcc ctggggcgcg acgcagcggc ggaggcggat ccggcggagg aggtctcag      780

gtgcagctgc agcagcctgg cgctgaactg gtccgacctg gcgcctccgt gaagctgtcc      840
tgcaaggcct ccggctacac cttcaccagc tactggatca actgggtcaa gcagcggcct      900
ggccagggcc tggaatggat cggcaacatc taccctccg actcctacac caactacaac      960
cagaagtcca aggacaaggc caccctgacc gtggacaagt cctcctccac cgcctacatg     1020
cagctgtcca gcccacctc cgaggactcc gccgtgtact actgcaccg gtcttgccgg     1080
ggcaactcct tcgactatg gggccagggc accacctga cagtgtcctc tggaggcgga     1140
ggatctgggt gtggcggatc tggcgcggt ggaagtggcg gagtggtag cgacatcgtg     1200

atgaccagct cccctccag cctgacctg accgtggcg agaaagtga catgagctgc     1260
aagtctccc agtccctgct gaactccggc aaccagaaga actacctgac ctggtatcag     1320
cagaagcccc gccagcccc caagctgtg atctactggg cctccaccg cgagtctggc     1380
gtgcccgata gattcacggg ctccggcagc ggaccgact ttacctgac catctccagc     1440
gtgcaggcgg aggacctggc cgtgtattac tgcagaacg actactccta ccccttcacc     1500

```

ttcggctctg gcaccaagct ggaaatcaag ggcggctccc accaccacca tcaccactga 1560

<210> 88

<211> 1569

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 88

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggtaccg ccaccggcgt gcactcccag 60

gtgcagctgc agcagtctgg cgctgagctg gctagacctg gcgcctccgt gaagatgtcc 120

tgcaagacct ccggctacac cttcacccgg tacaccatgc actgggtcaa gcagaggcct 180

ggacagggcc tggaatggat cggctacatc aaccctccc ggggctacac caactacaac 240

cagaagtcca aggacaaggc caccctgaca accgacaagt cctcctccac cgcctacatg 300

cagctgtcct cctgacctc cgaggactcc gccgtgtact actgcgcccg gtactacgac 360

gaccactact ccttgacta ctggggccag ggcaccacac tgacagtgtc tagcgctec 420

accaagggcc ctccgtgtt cctctggcc ccttctcca agtccacctc cggcggcacc 480

gccgctctgg gctgcctggt gaaggactac ttccctgagc ctgtgacctg gagctggaac 540

tctggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccctgccg tgctgcagtc ctccggcctg 600

tactcctgt cctccgtggt gaccgtgcct tctcctccc tgggcacca gacctacatc 660

tgcaacgtga accacaagcc ttccaacacc aaggtggaca agcgggtgga gcctaagtc 720

tgctccggcc ctgggggcgg acgcagcggc ggaggcggat ccggcggagg aggctctgac 780

atcgtgatga cccagtcctc ctccagcctg accgtgaccg ctggcgagaa agtgacctg 840

agctgcaagt cctcccagtc cctgtgaac tccggcaacc agaagaacta cctgacctgg 900

tatcagcaga agccccgcca gcccccaag ctgctgatct actgggcctc caccgcgag 960

tctggcgtgc ccgatagatt caccggctcc ggcagcggca ccgactttac cctgaccatc 1020

tccagcgtgc aggccgagga cctggccgtg tattactgtc agaacgacta ctctacccc 1080

ttcaccttcg gctctggcac caagctggaa atcaaggag gcggtggttc aggcggcgga 1140

ggcagcgggtg gaggtggtag tggcgtggc ggttcagggg gaggtggctc gcaggtgcag 1200

ctgcagcagc ctggcgctga actggtccga cctgggcct cctgaagct gtcctgcaag 1260

gcctccggt acaccttcac cagctactgg atcaactggg tcaagcagcg gcctggccag 1320

ggcctggaat ggatcgcaa catctacccc tccgactcct acaccaacta caaccagaag 1380

ttcaaggaca aggccacct gaccgtggac aagtcctcct ccaccgcta catgcagctg 1440

tccagcccca cctccgagga ctccgccgtg tactactgca cccggtcctg gcggggcaac 1500
tccttcgact attggggcca gggcaccacc ctgacagtgt cctcttctca ccaccacat 1560
caccactga 1569

<210> 89

<211> 1560

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 89

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccaccggcgt gcactcccag 60
gtgcagctgc agcagctctgg cgctgagctg gctagacctg gcgcctccgt gaagatgtcc 120
tgcaagacct ccggctacac cttcaccggg tacacatgc actgggtcaa gcagaggcct 180
ggacagggcc tggaatggat cggtacatc aaccctccc ggggctacac caactacaac 240
cagaagtcca aggacaaggc caccctgaca accgacaagt cctcctccac cgcctacatg 300
cagctgtcct cctgacctc cgaggactcc gccgtgtact actgcgcccg gtactacgac 360

gaccactact ccttgacta ctggggccag ggcaccacac tgacagtgtc tagcgcctcc 420
accaagggcc cttccgtgtt ccctctggcc cttgtctcca agtccacctc cgaaggcacc 480
gccgctctgg gctgcctggt gaaggactac ttccctgagc ctgtgaccgt gagctggaac 540
tctggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccctgccg tgctgcagtc ctccggcctg 600
tactccctgt cctccgtggt gaccgtgcct tctccaact tcggcaccca gacctacacc 660
tgcaacgtgg accacaagcc ttccaacacc aaggtggaca agaccgtgga gcctaagtcc 720
gcctccggcc ctgggggcgg acgcagcggc ggaggcggat ccggcggagg aggctctcag 780

gtgcagctgc agcagcctgg cgctgaactg gtccgacctg gcgcctccgt gaagctgtcc 840
tgcaaggcct ccggctacac cttcaccagc tactggatca actgggtcaa gcagcggcct 900
ggccagggcc tggaatggat cggaacatc taccctccg actcctacac caactacaac 960
cagaagtcca aggacaaggc caccctgacc gtggacaagt cctcctccac cgcctacatg 1020
cagctgtcca gcccacctc cgaggactcc gccgtgtact actgcaccg gtcttgccg 1080
ggcaactcct tcgactattg gggccagggc accacctga cagtgtcctc tggaggcggg 1140
ggatctgggt gtggcggatc tggcggcggg ggaagtggcg gaggtggtag cgacatcgtg 1200

atgaccagct cccctccag cctgacctg accgtggcg agaaagtgac catgagctgc 1260
aagtcctccc agtccctgct gaactccggc aaccagaaga actacctgac ctggtatcag 1320

cagaagcccg gccagccccc caagctgctg atctactggg cctccacccg cgagtctggc 1380
 gtgcccgata gattcaccgg ctccggcagc ggcaccgact ttaccctgac catctccagc 1440
 gtgcaggccg aggacctggc cgtgtattac tgtcagaacg actactccta ccccttcacc 1500
 ttcggctctg gcaccaagct ggaaatcaag ggcggctccc accaccacca tcaccactga 1560
 <210> 90
 <211> 1569
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 90

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccaccggcgt gcactcccag 60
 gtgcagctgc agcagtctgg cgctgagctg gctagacctg gcgcctccgt gaagatgtcc 120
 tgcaagacct ccggctacac cttcaccggg tacaccatgc actgggtcaa gcagaggcct 180
 ggacagggcc tggaatggat cggctacatc aaccctccc ggggctacac caactacaac 240
 cagaagtcca aggacaaggc caccctgaca accgacaagt cctcctccac cgcctacatg 300
 cagctgtcct cctgacctc cgaggactcc gccgtgtact actgcgcccg gtactacgac 360

gaccactact cctggacta ctggggccag ggcaccacac tgacagtgtc tagcgctcc 420
 accaagggcc ctccgtgtt cctctggcc ccttgtcca agtccacctc cgaaggcacc 480
 gccgctctgg gctgcctggt gaaggactac ttccctgagc ctgtgaccgt gagctggaac 540
 tctggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccctgccg tgctgcagtc ctccggcctg 600
 tactcctgt cctccgtggt gaccgtgcct tcctccaact tcggcaccca gacctacacc 660
 tgcaacgtgg accacaagcc ttccaacacc aaggtggaca agaccgtgga gcctaagtc 720
 gcctccggcc ctggggcgcg acgcagcggc ggaggcggat ccggcggagg aggctctgac 780

atcgtgatga ccagtcccc ctccagcctg accgtgaccg ctggcgagaa agtgaccatg 840
 agctgcaagt cctcccagtc cctgtgaac tccggcaacc agaagaacta cctgacctgg 900
 tatcagcaga agccccggca gcccccaag ctgctgatct actgggcctc caccgcgag 960
 tctggcgtgc ccgatagatt caccggtcc ggcagcggca ccgactttac cctgaccatc 1020
 tccagcgtgc aggccgagga cctggccgtg tattactgtc agaacgacta ctctacccc 1080
 ttcaccttcg gctctggcac caagctggaa atcaaggag gcggtggttc aggcggcgga 1140
 ggcagcggtg gaggtggtag tggcggtggc ggttcagggg gaggtggctc gcaggtgcag 1200

ctgcagcagc ctggcgctga actggtccga cctgggcct ccgtgaagct gtcctgcaag 1260

gcctccggct acaccttcac cagctactgg atcaactggg tcaagcagcg gcctggccag 1320
 ggcttgaat ggatcggaac catctacccc tccgactcct acaccaacta caaccagaag 1380
 ttcaaggaca aggccaccct gaccgtggac aagtcctcct ccaccgccta catgcagctg 1440
 tccagcccca cctccgagga ctccgccgtg tactactgca cccggtcctg gcggggcaac 1500
 tccttcgact attggggcca gggcaccacc ctgacagtgt cctctttcct caaccacat 1560
 caccactga 1569

<210> 91

<211> 1533

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 91

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccaccggcgt gcactcccag 60
 gtgcagctgc agcagctcgg cgctgagctg gctagacctg gcgcctccgt gaagatgtcc 120
 tgcaagacct ccggctacac cttcaccggg tacacatgc actgggtcaa gcagaggcct 180
 ggacagggcc tggaatggat cggctacatc aaccctccc ggggctacac caactacaac 240
 cagaagtcca aggacaaggc caccctgaca accgacaagt cctcctccac cgcctacatg 300
 cagctgtcct cctgacctc cgaggactcc gccgtgtact actgcgcccgt gtactacgac 360

gaccactact ccttgacta ctggggccag ggcaccacac tgacagtgtc tagcgcctcc 420
 accaagggcc cttccgtgtt ccctctggcc cttcctcca agtccacctc cggcggcacc 480
 gccgctctgg gtgcctggt gaaggactac ttccctgagc ctgtgacctg gagctggaac 540
 tctggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccctgccg tgctgcagtc ctccggcctg 600
 tactcctgt cctccgtggt gaccgtgcct tcctcctccc tgggcaccca gacctacatc 660
 tgcaacgtga accacaagcc ttccaacacc aaggtggaca agcgggtgga gcctaagtcc 720
 tgctccggcc ctggggggcg acgcagcggc ggaggcggat ccggcggagg aggctctcag 780

gtgcagctgc agcagcctgg cgctgaactg gtccgacctg gcgcctccgt gaagctgtcc 840
 tgcaaggcct ccggctacac cttcaccagc tactggatca actgggtcaa gcagcggcct 900
 ggccagggcc tggaatggat cggcaacatc taccctccg actcctacac caactacaac 960
 cagaagtcca aggacaaggc caccctgacc gtggacaagt cctcctccac cgcctacatg 1020
 cagctgtcca gcccacctc cgaggactcc gccgtgtact actgcaccgg gtcctggcgg 1080
 ggcaactcct tcgactattg gggccagggc accaccctga cagtgtcctc tggaggcggg 1140

ggatcttggtg gtggcggatc tggcggcggg ggaagtggcg gaggtggtag cgacatcgtg 1200

atgacccagt cccctccag cctgaccgtg accgctggcg agaaagtac catgagctgc 1260

aagtctccc agtccctgct gaactccggc aaccagaaga actacctgac ctggtatcag 1320

cagaagcccg gccagcccc caagctgctg atctactggg cctccaccg cgagtctggc 1380

gtgcccata gattcaccg ctccggcagc ggcaccgact ttacctgac catctccagc 1440

gtgcaggcgg aggacctggc cgtgtattac tgcagaacg actactccta ccccttcacc 1500

ttcggctctg gcaccaagct ggaaatcaag tga 1533

<210> 92

<211> 1548

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 92

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccaccggcgt gcactcccag 60

gtgcagctgc agcagtctgg cgctgagctg gctagacctg gcgcctccgt gaagatgtcc 120

tgcaagacct ccggctacac cttcaccggg tacaccatgc actgggtcaa gcagaggcct 180

ggacagggcc tggaatggat cggtacatc aaccctccc ggggctacac caactacaac 240

cagaagtcca aggacaaggc caccctgaca accgacaagt cctcctccac cgcctacatg 300

cagctgtcct cctgacctc cgaggactcc gccgtgtact actgcgccg gtactacgac 360

gaccactact cctggacta ctggggccag ggcaccacac tgacagtgtc tagcgctcc 420

accaagggcc ctccgtgtt cctctggcc cttctctcca agtccacctc cggcggcacc 480

gccgctctgg gctgcctggt gaaggactac ttcctgagc ctgtgacctg gagctggaac 540

tctggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcctgccg tgctgcagtc ctccggcctg 600

tactcctgt cctccgtggt gaccgtgct tctctctccc tgggcacca gacctacatc 660

tgcaacgtga accacaagcc ttccaacacc aagggtggaca agcgggtgga gcctaagtec 720

tgctccggcc ctggggcgcg acgcagcggc ggaggcggat ccggcggagg aggtctgac 780

atcgtgatga cccagtcccc ctccagcctg accgtgaccg ctggcgagaa agtgaccatg 840

agctgcaagt cctcccagtc cctgtgaac tccggcaacc agaagaacta cctgacctgg 900

tatcagcaga agcccggcca gcccccaag ctgctgatct actgggcctc caccgcgag 960

tctggcgtgc ccgatagatt caccggctcc ggcagcggca ccgactttac cctgaccatc 1020

tccagcgtgc aggccgagga cctggccgtg tattactgtc agaacgacta ctctacccc 1080

ttcaccttcg gctctggcac caagctggaa atcaaggag gcggtggttc aggcggcgga 1140
ggcagcgggt gaggtggtag tggcgggtggc ggttcagggg gaggtggctc gcaggtgcag 1200

ctgcagcagc ctggcgctga actggtccga cctggcgccct ccgtgaagct gtcctgcaag 1260
gcctccggct acaccttcac cagctactgg atcaactggg tcaagcagcg gcctggccag 1320
ggcctggaat ggatcggaac catctacccc tccgactcct acaccaacta caaccagaag 1380
ttcaaggaca aggccaccct gaccgtggac aagtcctcct ccaccgccta catgcagctg 1440
tccagcccca cctccgagga ctccgccgtg tactactgca cccggctcctg gcggggcaac 1500
tccttcgact attggggcca gggcaccacc ctgacagtgt cctcttga 1548

<210> 93
<211> 1470
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 93

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccaccggcgt gcactctcag 60
atcgtgctga cccagtctcc cgccatcatg tctgctagcc ctggcgagaa agtgacaatg 120
acctgccggg cctcctctc cgtgtcctac atgaactggg atcagcagaa gtccggcacc 180
tccccaaagc ggtggatcta cgacacctcc aaggtggcct ctggcgtgcc ctacagattc 240
tccggtctg gctctggcac ctctacagc ctgaccatct ccagcatgga agccgaggat 300
gccgccacct actactgcca gcagtgggtcc tccaaccccc tgacctttgg cgctggcacc 360

aagctggaac tgaagcggac cgtggccgct ccttccgtgt tcatttccc tccctccgac 420
gagcagctga agtccggcac cgcctccgtg gtgtgcctgc tgaacaactt ctaccctcgg 480
gaggccaagg tgagtgga ggtggacaac gcctgcagt ccggcaactc ccaggaaagc 540
gtcaccgagc aggactccaa ggacagcacc tactcctgt cctccaccct gaccctgtcc 600
aaggccgact acgagaagca caaggtgtac gcctgcgagg tgaccacca gggcctgtcc 660
agccctgtga ccaagtcctt caaccggggc gagtgtgacg tgcctggtgg tagccaggtg 720
cagctgcagc agcctggcgc tgaactggtc cgacctggcg cctccgtgaa gctgtcctgc 780

aaggcctccg gctacacctt caccagctac tggatcaact gggicaagca gcggcctggc 840
cagggcctgg aatggatcgg caacatctac cctccgact cctacaccaa ctacaaccag 900
aagttcaagg acaaggccac cctgacctg gacaagtcc cctccaccgc ctacatgcag 960
ctgtccagcc ccacctcca ggactccgcc gtgtactact gcaccgggtc ctggcggggc 1020

aactccttcg actattgggg ccagggcacc accctgacag tgtcctctgg aggcggagga 1080
tctgggtggtg gcggatctgg cggcgggtgga agtggcggag gtggtagcga catcgtgatg 1140
accagtgccc cctccagcct gaccgtgacc gctggcgaga aagtgaccat gagctgcaag 1200

tctctccagt ccctgctgaa ctccggcaac cagaagaact acctgacctg gtatcagcag 1260
aagccccggcc agccccccaa gctgctgata tactgggcct ccaccgcga gcttggcgtg 1320
cccgatagat tcaccggctc cggcagcggc accgacttta ccctgaccat ctccagcgtg 1380
caggccgagg acctggccgt gtattactgt cagaacgact actcctaccc ctacacctic 1440
ggctctggca ccaagctgga aatcaagtga 1470

<210> 94
<211> 1485
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antibody-derived sequence
<400> 94

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccaccggcgt gcactctcag 60

atcgtgctga ccagtcctcc cgccatcatg tctgctagcc ctggcgagaa agtgacaatg 120
acctgccggg cctcctctc cgtgtcctac atgaactggt atcagcagaa gtccggcacc 180
tccccaaagc ggtggatcta cgacacctcc aaggtggcct ctggcgtgcc ctacagattc 240
tccggtcttg gctctggcac ctctacagc ctgaccatct ccagcatgga agccgaggat 300
gccgccacct actactgcca gcagtggctc tccaaccccc tgacctttgg cgctggcacc 360
aagctggaac tgaagcggac cgtggccgct ccttcctgtg tcattctccc tcctccgac 420
gagcagctga agtccggcac cgctccgtg gtgtgcctgc tgaacaactt ctaccctcgg 480

gaggccaagg tgcagtggaa ggtggacaac gcctgcagt ccggcaactc ccaggaaagc 540
gtcaccgagc aggactccaa ggacagcacc tactcctgt cctccaccct gacctgtcc 600
aaggccgact acgagaagca caaggtgtac gcctgcgagg tgaccaccca gggcctgtcc 660
agccctgtga ccaagtcctt caaccggggc gactgtgacg tgcctggtgg tagcgacatc 720
gtgatgacct agtccccctc cagcctgacc gtgaccgtg gcgagaaagt gaccatgagc 780
tgcaagtcct ccagtcctt gctgaactcc ggcaaccaga agaactacct gacctggtat 840
cagcagaagc ccggccagcc cccaagctg ctgatctact gggcctccac ccgcgagtct 900

ggcgtgcccc atagattcac cggctccggc agcggcaccc actttaccct gaccatctcc 960
agcgtgcagg ccgaggacct ggccgtgtat tactgtcaga acgactactc ctacccttc 1020

accttcggct ctggcaccaa gctggaaatc aaggaggcgg gtggttcagg cggcggaggc 1080
agcgggtggag gtggtagtgg cgggtggcgggt tcagggggag gtggctcgca ggtgcagctg 1140
cagcagcctg gcgctgaact ggtccgacct ggcgccctccg tgaagctgtc ctgcaaggcc 1200
tccggctaca ctttcaccag ctactggatc aactgggtca agcagcggcc tggccagggc 1260
ctggaatgga tcggcaacat ctaccctcc gactcctaca ccaactacaa ccagaagttc 1320

aaggacaagg ccacctgac cgtggacaag tcctcctcca ccgctacat gcagctgtcc 1380
agccccacct ccgaggactc cgccgtgtac tactgcaccc ggtcctggcg gggcaactcc 1440
ttcgactatt ggggccaggg caccacctg acagtgtcct cttga 1485

<210> 95
<211> 1533
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antibody-derived sequence
<400> 95

atgggctgggt cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccaccggcgt gcactcccag 60
gtgcagctgc agcagctcgg cgctgagctg gctagacctg gcgcctccgt gaagatgtcc 120
tgcaagacct ccggctacac cttcaccggg tacacatgc actgggtcaa gcagaggcct 180

ggacagggcc tggaatggat cggctacatc aaccctccc ggggctacac caactacaac 240
cagaagtcca aggacaaggc caccctgaca accgacaagt cctcctccac cgcctacatg 300
cagctgtcct cctgacctc cgaggactcc gccgtgtact actgcgcccgt gtactacgac 360
gaccactact ccttgacta ctggggccag ggcaccacac tgacagtgtc tagcgctcc 420
accaagggcc cttccgtgtt cctctggcc cttcctcca agtccacctc cggcggcacc 480
gccgctctgg gctgcctggt gaaggactac ttccctgagc ctgtgacctg gagctggaac 540
tctggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccctgccg tgctgcagtc ctccggcctg 600

tactccctgt cctccgtgggt gaccgtgect tcctcctccc tgggcacca gacctacatc 660
tgcaactga accacaagcc ttccaacacc aaggtggaca agcgggtgga gcctaagtcc 720
tgctccggcc ctggggcgcg acgcagcggc ggaggcggat ccggcggagg aggtctcag 780
gtgcagctgc agcagcctgg cgctgaactg gtccgacctg gcgcctccgt gaagctgtcc 840
tgcaaggcct ccggctacac cttcaccagc tactggatca actgggtcaa gcagcggcct 900
ggccagtgcc tggaatggat cggcaacatc taccctccg actcctacac caactacaac 960
cagaagtcca aggacaaggc caccctgacc gtggacaagt cctcctccac cgcctacatg 1020

cagctgtcca gccccacctc cgaggactcc gccgtgtact actgcacccg gtcctggcgg 1080
ggcaactcct tcgactattg gggccagggc accaccctga cagtgtcctc tggaggcgga 1140
ggatctgggt gtggcggatc tggcggcggg ggaagtggcg gaggtggtag cgacatcgtg 1200
atgaccacgt cccctccag cctgaccgtg accgctggcg agaaagtac catgagctgc 1260
aagtcctccc agtcctgtct gaactccggc aaccagaaga actacctgac ctggtatcag 1320
cagaagcccc gccagcccc caagctgtg atctactggg cctccaccg cgagtctggc 1380
gtgcccata gattcacggc ctccggcagc ggcaccgact ttacctgac catctccagc 1440

gtgcaggccg aggacctggc cgtgtattac tgcagaacg actactecta ccccttcacc 1500
ttcggctgcg gcaccaagct ggaaatcaag tga 1533

<210> 96
<211> 1548
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antibody-derived sequence
<400> 96

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccaccggcgt gcactcccag 60
gtgcagctgc agcagctggt cgctgagctg gctagacctg gcgcctccgt gaagatgtcc 120
tgcaagacct ccggctacac cttaccccg tacacatgc actgggtcaa gcagaggcct 180
ggacagggcc tggaatggat cggctacatc aaccctccc ggggctacac caactacaac 240

cagaagtcca aggacaaggc caccctgaca accgacaagt cctcctccac cgcctacatg 300
cagctgtcct cctgacctc cgaggactcc gccgtgtact actgcgcccg gtactacgac 360
gaccactact ccttgacta ctggggccag ggcaccacac tgacagtgtc tagcgctcc 420
accaagggcc ctccgtgtt ccctctggcc ccttctcca agtcacctc cggcggcacc 480
gccgctctgg gctgcctggt gaaggactac ttccctgagc ctgtgaccgt gagctggaac 540
tctggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccctgccg tgctgcagtc ctccggcctg 600
tactcctgt cctccgtggt gaccgtgcct tctcctccc tgggcacca gacctacatc 660

tgcaactga accacaagcc ttcaacacc aaggtggaca agcgggtgga gcctaagtc 720
tgctccggcc ctggggcggg acgcagcggc ggaggcggat ccggcggagg aggctctgac 780
atcgtgatga ccagtcctc ctccagcctg accgtgaccg ctggcgagaa agtgaccatg 840
agctgcaagt cctcccagtc cctgtgaac tccggcaacc agaagaacta cctgacctgg 900
tatcagcaga agcccgcca gcccccaag ctgctgatct actgggcctc caccgcgag 960
tctggcgtgc ccgatagatt caccggctcc ggcagcggca ccgactttac cctgaccatc 1020

tccagcgtgc aggccgagga cctggccgtg tattactgtc agaacgacta ctcctacccc 1080

ttcaccttcg gctgcggcac caagctggaa atcaaggag gcggtgggtc aggcggcgga 1140

ggcagcgggtg gaggtggtag tggcgggtgc ggttcagggg gaggtggctc gcaggtgcag 1200

ctgcagcagc ctggcgctga actgggtccga cctggcgccct ccgtgaagct gtcctgcaag 1260

gcctccggct acaccttcac cagctactgg atcaactggg tcaagcagcg gcctggccag 1320

tgcttggaaat ggatcggcaa catctacccc tccgactcct acaccaacta caaccagaag 1380

ttcaaggaca aggccaccct gaccgtggac aagtcctcct ccaccgcta catgcagctg 1440

tccagcccca cctccgagga ctccgccgtg tactactgca cccggtcctg gcggggcaac 1500

tccttcgact atiggggcca gggcaccacc ctgacagtgt cctcttga 1548

<210> 97

<211> 1470

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 97

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggtaccg ccaccggcgt gcactctcag 60

atcgtctga cccagtctcc gcgcatcatg tctgtagcc ctggcgagaa agtgacaatg 120

acctgccggg cctcctctc ctgtgtcctac atgaactgg atcagcagaa gtccggcacc 180

tccccaagc ggtggatcta cgacacctcc aaggtggcct ctggcgtgcc ctacagattc 240

tccggctctg gctctggcac ctcctacagc ctgacctct ccagcatgga agccgaggat 300

gccgccacct actactgcca gcagtggctc tccaaccccc tgacctttgg cgtctgcacc 360

aagctggaac tgaagcggac cgtggccgt ccttccgtgt tcattctccc tccctccgac 420

gagcagctga agtccggcac cgcctccgtg gtgtgcctgc tgaacaactt ctaccctcgg 480

gaggccaagg tgcagtggaa ggtggacaac gcctgcagt ccggcaactc ccaggaaagc 540

gtcaccgagc aggactccaa ggacagcacc tactccctgt cctccaccct gaccctgtcc 600

aaggccgact acgagaagca caaggtgtac gcctgcgagg tgaccaccca gggcctgtcc 660

agccctgtga ccaagtcctt caaccggggc gagtgtgacg tgcttggtgg tagccaggtg 720

cagctgcagc agcctggcgc tgaactggtc cgacctggcg cctccgtgaa gctgtcctgc 780

aaggcctccg gctacacctt caccagctac tggatcaact gggtaagca gcggcctggc 840

cagtgcctgg aatggatcgg caacatctac cctccgact cctacaccaa ctacaaccag 900

aagttcaagg acaaggccac cctgaccgtg gacaagtcct cctccaccgc ctacatgcag 960

ctgtccagcc ccacctccga ggactccgcc gtgtactact gcacccggtc ctggcggggc 1020
aactccttcg actattgggg ccagggcacc accctgacag tgcctcttg aggcgaggga 1080
tctggtggtg gcggatctgg cggcgggtga agtggcggag gtggtagcga catcgtgatg 1140

accagtcctt cctccagcct gaccgtgacc gctggcgaga aagtgacat gagctgcaag 1200
tcctcccagt cctgctgaa ctccggcaac cagaagaact acctgacctg gtatcagcag 1260
aagcccgcc agcccccaa gctgctgac tactgggcct ccacccgga gtctggcgtg 1320
cccgatagat tcaccggctc cggcagcggc accgacttta cctgacat ctccagcgtg 1380
caggccgagg acctggccgt gtattactgt cagaacgact actcctaccc cttcaccttc 1440
ggctgcggca ccaagctgga aatcaagtga 1470

<210> 98

<211> 1485

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 98

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggtaccg ccaccggcgt gcactctcag 60
atcgtgctga ccagctctcc gcgcatcatg tctgctagcc ctggcgagaa agtgacaatg 120
acctgcgggg cctcctctc cgtgtcctac atgaactggt atcagcagaa gtccggcacc 180
tccccaaagc ggtggatcta cgacacctcc aaggtggcct ctggcgtgcc ctacagattc 240
tccggctctg gctctggcac ctccctacag ctgacctct ccagcatgga agccgaggat 300
gccgccacct actactgcca gcagtggctc tccaaccccc tgacctttgg cgctggcacc 360

aagctggaac tgaageggac cgtggccgt ccttccgtgt tcattttccc tcctccgac 420
gagcagctga agtccggcac cgcctccgtg gtgtgcctgc tgaacaactt ctaccctcgg 480
gaggccaagg tgcagtggaa ggtggacaac gcctgcagt ccggcaactc ccaggaaagc 540
gtcaccgagc aggactcaa ggacagcacc tactccctgt cctccacct gacctgtcc 600
aaggccgact acgagaagca caaggtgtac gcctgcgagg tgaccacca gggcctgtcc 660
agccctgtga ccaagtctt caaccggggc gagtgtgacg tgcttggtgg tagcgacatc 720
gtgatgacce agtccccctc cagcctgacc gtgaccgtg gcgagaaagt gaccatgagc 780

tgcaagtcct ccagtcctt gctgaactcc ggcaaccaga agaactacct gacctggtat 840
cagcagaagc ccggccagcc cccaagctg ctgatctact gggcctccac ccgcgagtct 900
ggcgtgcccc atagattcac cggctccggc agcggcaccg actttaccct gaccatctcc 960

agcgtgcagg ccgaggacct ggccgtgtat tactgtcaga acgactactc ctaccccttc 1020

accttcggct gcggcaccaa gctggaaatc aaggaggcg gtggttcagg cggcggaggc 1080

agcggtaggag gtggtagtgg cggtagcggt tcagggggag gtggtctgca ggtgcagctg 1140

cagcagcctg gcgtgaact ggtccgacct ggccgctccg tgaagctgtc ctgcaaggcc 1200

tccggctaca ccttcaccag ctactggatc aactgggtca agcagcggcc tggccagtgc 1260

ctggaatgga tcggcaacat ctacccctcc gactcctaca ccaactacaa ccagaagttc 1320

aaggacaagg ccacccctgac cgtggacaag tctcctcca ccgcctacat gcagctgtcc 1380

agccccacct ccgaggactc cgccgtgtac tactgcaccc ggtcctggcg gggcaactcc 1440

ttcgactatt ggggccaggc caccacctg acagtgtcct cttga 1485

<210> 99

<211> 1593

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 99

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccaccggcgt gcactctcag 60

gtgcagctgc agcagcctgg cgctgaactg gtccgacctg gcgcctccgt gaagctgtcc 120

tgcaaggcct ccggctacac cttcaccagc tactggatca actgggtcaa gcagcggcct 180

ggccagggcc tggaatggat cggcaacatc taccctccg actcctacac caactacaac 240

cagaagtcca aggacaaggc caccctgacc gtggacaagt cctcctccac cgcctacatg 300

cagctgtcca gccccacctc cgaggactcc gccgtgtact actgcaccg gtcttgccgg 360

ggcaactcct tcgactattg gggccagggc accacctga cagtgtctc tggaggcgga 420

ggatctgggt gtggcggatc tggcggcggg ggaagtggcg gaggtggtag cgacatcgtg 480

atgacccagt cccctccag cctgaccgtg accgctggcg agaaagtgc catgagctgc 540

aagtctccc agtccctgct gaactccggc aaccagaaga actacctgac ctggtatcag 600

cagaagcccg gccagcccc caagctgtg atctactggg cctccaccg cgagtctggc 660

gtgcccata gattaccggc ctccggcagc ggcaccgact ttaccctgac catctccagc 720

gtgcaggccg aggacctggc cgtgtattac tgcagaacg actactccta ccccttcacc 780

ttcggctctg gcaccaagct ggaaatcaag tctggcggag gcggatcca ggtgcagctg 840

cagcagctg gcgtgagct ggctagacct ggccgctccg tgaagatgtc ctgcaagacc 900

tccggctaca ccttcaccg gtacaccatg cactgggtca agcagaggcc tggacagggc 960

ctggaatgga tcggctacat caaccctcc cggggctaca ccaactacaa ccagaagttc 1020
aaggacaagg ccaccctgac aaccgacaag tcctctctcca ccgcctacat gcagctgtcc 1080
tccttgacct ccgaggactc cgccgtgtac tactgcgccc ggtactacga cgaccactac 1140
tccttggaact actggggcca gggcaccaca ctgacagtgt ctagcgggtg tggaggaagc 1200
ggagggggtg gtagcgggtg tggaggctct ggcgggggag ggagtcagat cgtgctgacc 1260
cagtctcccg ccatcatgtc tgctagccct ggcgagaaag tgacaatgac ctgccgggcc 1320

tcctctctcg tgcctacat gaactggat cagcagaagt ccggcacctc cccaagcgg 1380
tggatctacg acacctccaa ggtggcctct ggcgtgcctt acagattctc cggtctggc 1440
tctggcacct cctacagct gaccatctcc agcatggaag ccgaggatgc cgccacctac 1500
tactgccagc agtggctctc caacccctg acctttggcg ctggcaccaa gctggaactg 1560
aaggcgggct ctcaccacca ccatcaccac tga 1593

<210> 100

<211> 1608

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-derived sequence

<400> 100

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccaccggcgt gcactctgac 60

atcgtgatga cccagtcctc ctccagcctg accgtgaccg ctggcgagaa agtgaccatg 120
agctgcaagt cctcccagtc cctgtgaac tccggcaacc agaagaacta cctgacctgg 180
tatcagcaga agcccgcca gcccccaag ctgctgatct actgggcctc caccgcgag 240
tctggcgtgc ccgatagatt caccggctcc ggcagcggca ccgactttac cctgaccatc 300
tccagcgtgc aggccgagga cctggccgtg tattactgtc agaacgacta ctctacccc 360
ttcaccttcg gctctggcac caagctgga atcaaggag gcggtgggtc aggcggcgga 420
ggcagcgggtg gaggtggtag tggcgggtgc ggttcagggg gaggtggctc gcaggtgcag 480

ctgcagcagc ctggcgctga actggtccga cctggcgcct ccgtgaagct gtcctgcaag 540
gcctccggct acaccttcac cagctactgg atcaactggg tcaagcagcg gcctggccag 600
ggcctggaat ggatcgga catctacccc tccgactcct acaccaacta caaccagaag 660
ttcaaggaca aggccacct gaccgtggac aagtcctct ccaccgcta catgcagctg 720
tccagcccca cctccgagga ctccgccgtg tactactgca cccggtcctg gcggggcaac 780
tccttcgact attggggcca gggcaccacc ctgacagtgt cctcttctgg cggaggcgga 840

tcccagggtgc agctgcagca gtctggcgct gagctggcta gacctggcgc ctccgtgaag	900
atgtcctgca agacctccgg ctacaccttc acccggtaca ccatgactg ggtcaagcag	960
aggcctggac agggcctgga atggatcggc tacatcaacc cctcccgagg ctacaccaac	1020
tacaaccaga agttcaagga caaggccacc ctgacaaccg acaagtcctc ctccaccgcc	1080
tacatgcagc tgtcctccct gacctccgag gactccgccg tgtactactg cggccggtac	1140
tacgacgacc actactccct ggactactgg ggccagggca ccacactgac agtgtctagc	1200
ggaggcggag gatctggtag ggccggatct ggccggcggtg gaagtgccgg aggtggtagc	1260
cagatcgtgc tgaccacgtc tcccgccatc atgtctgcta gccctggcga gaaagtgaca	1320
atgacctgcc gggcctcctc ctccgtgtcc tacatgaact ggtatcagca gaagtccggc	1380
acctcccca agcgggtgat ctacgacacc tccaaggtgg cctctggcgt gccctacaga	1440
ttctccggct ctggctctgg cacctcctac agcctgacca tctccagcat ggaagccgag	1500
gatgccgcca cctactactg ccagcagtgg tctccaacc cctgacctt tggcgctggc	1560
accaagctgg aactgaaggg cggtctctac caccaccatc accactga	1608
<210> 101	
<211> 1545	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Antibody-derived sequence	
<400> 101	
atgggatggt cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccaccggcgt gcacagccag	60
gtgcagctgc agcagcctgg agctgaactg gtgcggcctg gagccagcgt gaagctgtcc	120
tgcaaggcca gcggtctaac cttcaccagc tactggatca actgggtgaa gcagcggcct	180
ggacagggcc tggaatggat cggcaacatc taccacagcg acagctaac caactacaac	240
cagaagtcca aggacaaggc caccctgacc gtggacaaga gcagcagcac cgcctacatg	300
cagctgtcca gcccacctc cgaggacagc gccgtgtact actgcaccag aagctggcgg	360
ggcaacagct tcgactactg gggccagggc accacactga cagtcagcag cggaggaggg	420
ggatctggcg ggggaggaag cggagggggg ggaagcgaca tcgtgatgac ccagagcccc	480
agcagcctga ccgtgacagc cggggaaaag gtgacctga gctgcaagag cagccagagc	540
ctgtgaaca gcggcaacca gaagaactac ctgacctggt atcagcagaa gcccggccag	600
cccccaagc tgcctgacta ctgggcccag acccgggaga gcggcgtgcc cgaccggttt	660
accggctccg gctccggcac cgacttcacc ctgacctca gcagcgtgca ggccgaggac	720

ctggccgtgt attactgtca gaacgactac agctaccctt tcaccttcgg cagcggcacc	780
aagctggaaa tcaagagcgg aggggggagga tccgatatca agctgcagca gagcggagct	840
gaactggcta ggccaggcgc ctccgtgaag atgagctgta agacctccgg ctataccttt	900
accgggtaca ccatgcactg ggtgaaacag agggccggac aggggctgga atggattggc	960
tatatcaacc cctccggggg ctacacaaat tacaatcaga aattcaaaga taaagccaca	1020
ctgacaaccg acaagtccag ctccacagcc tatatgcage tgtcctccct gaccagcgag	1080
gactctgccg tgiactattg cgcccgggtac tacgacgacc actacagcct ggattattgg	1140
gggcaggggg caaactgac agtctccagc gtggaggggc gcagcggagg atctggcggg	1200
agcggcggct ctggggggct cgacgacatc cagctgaccc agtccccgc catcatgagc	1260
gccagccctg gcgagaaggt gacaatgacc tgccggggcca gcagcagcgt gagctacatg	1320
aattggtatc agcagaaaag cggcaccagc cccaagcggg ggatctacga caccagcaag	1380
gtggcctccg gcgtgcccta cagattctcc ggctccggct ctggcaccag ctacagcctg	1440
acaatttcta gcatggaagc cgaggacgcc gccacctact actgccagca gtggagcagc	1500
aaccacctga cctttggcgc cggaacaaaag ctggaactga agtga	1545