(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0090298
(43) 공개일자 2021년07월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/68 (2017.01) *C07K 16/28* (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01) *C07K 19/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/6817 (2017.08)
A61K 47/6849 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2021-7021848(분할)
(22) 출원일자(국제) 2013년10월30일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2015-7014177
원출원일자(국제) 2013년10월30일
심사청구일자 2018년10월18일
(85) 번역문제출일자 2021년07월12일
(86) 국제출원번호 PCT/US2013/067621
(87) 국제공개번호 WO 2014/070957
국제공개일자 2014년05월08일
(30) 우선권주장
61/720,257 2012년10월30일 미국(US)

(71) 출원인
에스퍼란스 파마슈티컬스, 인코포레이티드
미국 루이지애나 바톤 로우지 이. 파커 불러바드 340 (우:70803)
(72) 발명자
로이슈너, 카롤라
미국 70809 루이지애나 바톤 루즈 # 8104 커머스 서클 6929
알릴라, 헥터
미국 70808 루이지애나 바톤 루즈 유닛 7 콘그레스 블러바드 5255
(74) 대리인
특허법인 남앤남

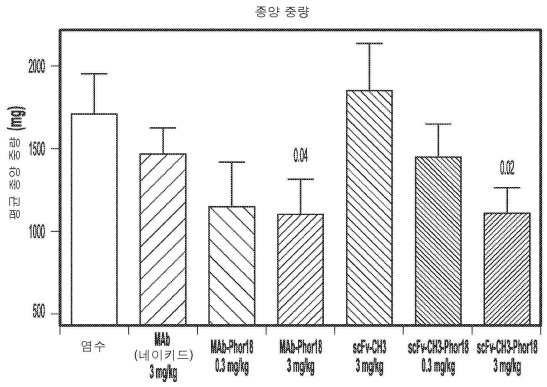
전체 청구항 수 : 총 88 항

(54) 발명의 명칭 **항체/약물 컨쥬게이트 및 이의 사용 방법**

(57) 요 약

본 발명은 표적에 결합하는 컨쥬게이트, 표적에 결합하는 컨쥬게이트를 이용하는 방법 및 표적을 발현하는 요망되지 않거나 비정상적인 세포증식 또는 과증식 장애, 예를 들어, 종양, 암, 신생물 및 악성종양을 치료하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
C07K 16/2887 (2013.01)
C07K 16/32 (2013.01)
C07K 19/00 (2013.01)
C07K 2317/62 (2013.01)
C07K 2319/95 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

표적에 결합하는 항체를 포함하는 항체 컨쥬게이트로서, 상기 항체가 용해 도메인에 연결되어 있고, 상기 용해 도메인이 KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAKKFAKFAKKF, KFAKFAKKFAKFAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKFAKKFAKFAKKFAKF 및 KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA로부터 선택된 펩티드, 또는 K 잔기 중 하나 이상이 F 또는 L 잔기 중 임의의 것으로 치환되거나, F 잔기 중 하나 이상이 K, A 또는 L 잔기 중 임의의 것으로 치환되거나, A 잔기 중 하나 이상이 K, F 또는 L 잔기 중 임의의 것으로 치환된 KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAKKFAKFAKKF, KFAKFAKKFAKFAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKFAKKFAKFAKKFAKF 및 KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA로부터 선택된 펩티드를 포함하거나 이들로 구성되고, 상기 용해 도메인이 항체의 중쇄(H) 또는 항체의 경쇄(L)에 연결된, 항체 컨쥬게이트.

청구항 2

표적에 결합하는 항체의 중쇄(H) 또는 경쇄(L)를 포함하는 폴리펩티드 컨쥬게이트로서, 상기 중쇄(H) 또는 경쇄(L)가 용해 도메인에 연결되어 있고, 상기 용해 도메인이 KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAKKFAKFAKKF, KFAKFAKKFAKFAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKFAKKFAKFAKKFAKF 및 KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA로부터 선택된 펩티드, 또는 K 잔기 중 하나 이상이 F 또는 L 잔기 중 임의의 것으로 치환되거나, F 잔기 중 하나 이상이 K, A 또는 L 잔기 중 임의의 것으로 치환되거나, A 잔기 중 하나 이상이 K, F 또는 L 잔기 중 임의의 것으로 치환된 KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAKKFAKFAKKF, KFAKFAKKFAKFAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKFAKKFAKFAKKFAKF 및 KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA로부터 선택된 펩티드를 포함하거나 이들로 구성되는, 폴리펩티드 컨쥬게이트.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 용해 도메인이 중쇄(H)의 아미노(NH_2)-말단에 연결되거나, 중쇄(H)의 카르복시(C)-말단에 연결된 컨쥬게이트.

청구항 4

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 용해 도메인이 경쇄(L)의 아미노(NH_2)-말단에 연결되거나, 경쇄(L)의 카르복시(C)-말단에 연결된 컨쥬게이트.

청구항 5

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 컨쥬게이트가 중쇄(H) 또는 경쇄(L)에 연결된 복수의 용해 도메인을 포함하고, 상기 용해 도메인 중 적어도 하나가 중쇄(H)의 아미노(NH_2)-말단에 연결되거나, 경쇄(L)의 아미노(NH_2)-말단에 연결된 컨쥬게이트.

청구항 6

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 컨쥬게이트가 중쇄(H) 또는 경쇄(L)에 연결된 복수의 용해 도메인을 포함하고, 상기 용해 도메인 중 적어도 하나가 중쇄(H)의 카르복시(C)-말단에 연결되거나, 경쇄(L)의 카르복시(C)-말단에 연결된 컨쥬게이트.

청구항 7

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 컨쥬게이트가 중쇄(H) 또는 경쇄(L)에 연결된 복수의 용해 도메인을 포함하고, 상기 용해 도메인 중 적어도 하나가 중쇄(H)의 아미노(NH_2)-말단에 연결되고, 상기 용해 도메인 중 적어도 하나가 경쇄(L)의 아미노(NH_2)-말단에 연결된 컨쥬게이트.

청구항 8

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 컨쥬게이트가 중쇄(H) 또는 경쇄(L)에 연결된 복수의 용해 도메인을 포함하고,

상기 용해 도메인 중 적어도 하나가 중쇄(H)의 아미노(NH_2)-말단에 연결되고, 상기 용해 도메인 중 적어도 하나가 경쇄(L)의 아미노(NH_2)-말단에 연결되고, 상기 용해 도메인 중 적어도 하나가 중쇄(H)의 카르복시(C)-말단에 연결되거나, 경쇄(L)의 카르복시(C)-말단에 연결된 컨쥬게이트.

청구항 9

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 컨쥬게이트가 중쇄(H) 또는 경쇄(L)에 연결된 복수의 용해 도메인을 포함하고, 상기 용해 도메인 중 적어도 하나가 중쇄(H)의 아미노(NH_2)-말단에 연결되고, 상기 용해 도메인 중 적어도 하나가 경쇄(L)의 아미노(NH_2)-말단에 연결되고, 상기 용해 도메인 중 적어도 하나가 중쇄(H)의 카르복시(C)-말단에 연결되고, 상기 용해 도메인 중 적어도 하나가 경쇄(L)의 카르복시(C)-말단에 연결된 컨쥬게이트.

청구항 10

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 중쇄(H) 또는 경쇄(L)에 연결된 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 용해 도메인을 포함하는 컨쥬게이트.

청구항 11

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 중쇄(H) 및/또는 경쇄(L)에 연결된 2, 4, 6, 또는 8개의 용해 도메인을 포함하는 컨쥬게이트.

청구항 12

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 중쇄 또는 경쇄 당 적어도 하나의 용해 도메인을 복수로 포함하는 컨쥬게이트.

청구항 13

제 12항에 있어서, 중쇄(H) 또는 경쇄(L)에 연결된 용해 도메인이 동일한 아미노산 서열 또는 상이한 아미노산 서열을 갖는 컨쥬게이트.

청구항 14

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 용해 도메인이 중쇄(H) 또는 경쇄(L)의 아미노(NH_2)-말단 또는 카르복시(C)-말단의 마지막 아미노산 바로 뒤에서 중쇄(H) 또는 경쇄(L)에 연결됨으로써, 용해 도메인과 중쇄(H) 또는 경쇄(L) 사이에 연속적 아미노산 서열을 형성하는 컨쥬게이트.

청구항 15

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 중쇄(H) 또는 경쇄(L) 및 상기 용해 도메인이 공유 결합에 의해 연결된 컨쥬게이트.

청구항 16

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 중쇄(H) 또는 경쇄(L) 및 상기 용해 도메인이 펩티드 서열 또는 비-펩티드 링커 또는 스페이서(spacer)에 의해 연결된 컨쥬게이트.

청구항 17

제 16항에 있어서, 상기 링커 또는 스페이서가 선형 탄소 사슬을 포함하는 컨쥬게이트.

청구항 18

제 16항에 있어서, 상기 펩티드 링커 또는 스페이서 서열이 하나 이상의 A, S 또는 G 아미노산 잔기를 포함하고/하거나, 1 내지 25개의 아미노산 잔기를 갖는 서열을 포함하는 항체 컨쥬게이트.

청구항 19

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 용해 도메인이 약 10 내지 약 15개의 L-아미노산 또는 D-아미노산, 약 15 내지 약 20개의 L-아미노산 또는 D-아미노산, 약 10 내지 약 28개의 L-아미노산 또는 D-아미노산, 약 10 내지

약 50개의 L-아미노산 또는 D-아미노산, 또는 약 15 내지 약 100개의 L-아미노산 또는 D-아미노산으로부터의 서열로 구성되는 컨쥬게이트.

청구항 20

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 중쇄(H) 또는 경쇄(L)가 약 20 내지 약 50개의 L-아미노산 또는 D-아미노산, 약 50 내지 약 100개의 L-아미노산 또는 D-아미노산, 또는 약 50 내지 약 150개의 L-아미노산 또는 D-아미노산으로부터의 서열을 포함하는 컨쥬게이트.

청구항 21

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 용해 도메인이 양이온성 용해 도메인인 컨쥬게이트.

청구항 22

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 용해 도메인이 양친매성 알파 헬리칼 구조를 형성하는 컨쥬게이트.

청구항 23

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 용해 도메인이 연속적 또는 불연속 PNNPNNP 반복 모티프를 형성하고, 여기서 P가 양성으로 하전된 아미노산이고, N이 중성 아미노산인 컨쥬게이트.

청구항 24

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 표적이 단백질 또는 다당류를 포함하는 컨쥬게이트.

청구항 25

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 표적이 수용체 또는 항원을 포함하는 컨쥬게이트.

청구항 26

제 25항에 있어서, 수용체가 Her2/neu(인간 표피 성장 인자 수용체 2, ErbB-2), 황체형성 호르몬 분비 호르몬 수용체(LHRH-R), 표피 성장 인자 수용체(EGF-R), 또는 폴레이트 또는 성장호르몬-(GH) 수용체를 포함하는 컨쥬게이트.

청구항 27

제 25항에 있어서, 수용체가 종양 괴사 인자(TNF) 패밀리 일원 수용체(예를 들어, TNF-알파, TNF-베타(림프독소, LT), TRAIL, Fas, LIGHT, 또는 4-1BB) 또는 온코페토프로테인(oncofetoprotein) 또는 포스파티딜세린 함유 막을 포함하는 컨쥬게이트.

청구항 28

제 25항에 있어서, 수용체가 면역글로불린-유사 수용체, 호르몬 수용체, 사이토카인 수용체, 성장 인자 수용체, 또는 케모카인 수용체를 포함하는 컨쥬게이트.

청구항 29

제 28항에 있어서, 면역글로불린-유사 수용체가 CD19, CD20, CD23, CD27, CD28, CD30, CD33, CD40, CD52, CD56, CD70, CD123, CD138, 또는 CD154를 포함하는 컨쥬게이트.

청구항 30

제 25항에 있어서, 항원이 바이러스, 박테리아, 진균 또는 기생충 항원을 포함하는 컨쥬게이트.

청구항 31

제 25항에 있어서, 항원이 종양 관련 항원(TAA)을 포함하는 컨쥬게이트.

청구항 32

제 31항에 있어서, TAA가 암배아 항원(CEA), 알파-태아단백질(AFP), 전립선 특이적 항원(PSA), 전립선 특이적 막 항원(PSMA), CA-125(상피성 난소암), 가용성 인터루킨-2(IL-2) 수용체, RAGE-1, 티로시나제, MAGE-1, MAGE-2, NY-ESO-1, Melan-A/MART-1, 당단백질(gp) 75, gp100, 베타-카테닌, PRAME, MUM-1, ZFP161, 유비퀼린-1, HOX-B6, YB-1, 오스테오넥틴(Osteonectin), ILF3, 또는 IGF-1을 포함하는 컨쥬게이트.

청구항 33

제 1항에 있어서, 항체가 표적에 결합하는 항체 단편 또는 부분서열(subsequence)을 포함하는 컨쥬게이트.

청구항 34

제 33항에 있어서, 상기 항체 단편 또는 부분서열이 Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, Fd, 단일쇄 Fv(scFv), 이황화-결합된 Fvs(sdFv), V_L, V_H, 낙타 Ig, V-NAR, VHH, 삼중특이적 (Fab_3), 이중특이적 (Fab_2), 디아바디(diabody)((V_L-V_H)$_2$ 또는 (V_H-V_L)$_2$), 트리아바디(triabody)(3가), 테트라바디(tetrabody)(4가), 미니바디(minibody)((scF_V-C_H3)$_2$), 이중특이적 단일쇄 Fv(비스-scFv), IgG델타C_H2, scFv-Fc, $(scFv)_2$-Fc, 어피바디(affibody), 앱타머(aptamer), 아비머(avimer) 또는 나노바디(nanobody)를 포함하는 컨쥬게이트.

청구항 35

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 항체 또는 상기 중쇄(H) 또는 경쇄(L)가 모노클로날 항체를 포함하는 컨쥬게이트.

청구항 36

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 항체 또는 상기 중쇄(H) 또는 경쇄(L)가 포유동물 항체를 포함하는 컨쥬게이트.

청구항 37

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 항체 또는 상기 중쇄(H) 또는 경쇄(L)가 인간, 인간화, 영장류화, 또는 키메라 항체를 포함하는 컨쥬게이트.

청구항 38

제 1항에 있어서, 상기 항체가 트라스투주맙(trastuzumab) 또는 퍼투주맙(pertuzumab)을 포함하는 컨쥬게이트.

청구항 39

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 중쇄(H) 또는 경쇄(L) 또는 항체가 표 A, B, C, D, 4, 5, 또는 실시예 14, 15, 18, 20 또는 21 중 임의의 곳에 기재된 임의의 중쇄(H) 또는 경쇄(L) 또는 항체 또는 어느 하나 이상의 CDR 서열로부터 선택되는 컨쥬게이트.

청구항 40

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 컨쥬게이트가 표 3, 4, 5 또는 실시예 14, 15, 18, 20 또는 21 중 임의의 곳에 기재된 임의의 중쇄(H) 컨쥬게이트, 임의의 경쇄(L) 컨쥬게이트, 임의의 전체 항체 컨쥬게이트 서열을 포함하는 컨쥬게이트.

청구항 41

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 표적이 실시예 23에 기재된 임의의 표적 서열 중 전부 또는 일부를 포함하는 컨쥬게이트.

청구항 42

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 표적이 세포에 의해 발현되거나, 세포 상에서 발현되는 컨쥬게이트.

청구항 43

제 42항에 있어서, 상기 세포가 과증식 세포인 컨쥬게이트.

청구항 44

제 42항에 있어서, 상기 세포가 유방, 난소, 자궁, 자궁경부, 복부, 폐, 위, 결장, 방광, 아교, 피부, 혈액 또는 자궁내막 세포인 컨쥬게이트.

청구항 45

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 항체 또는 폴리펩티드 컨쥬게이트가 분리되거나 정제된 것인 컨쥬게이트.

청구항 46

제 1항 또는 제 2항의 컨쥬게이트를 포함하는 조성물.

청구항 47

제 43항에 있어서, 제형 또는 혼합물을 포함하는 조성물.

청구항 48

제 1항 또는 제 2항의 항체 또는 폴리펩티드 컨쥬게이트를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 49

제 1항 또는 제 2항의 컨쥬게이트, 및 세포 증식 억제제(anti-cell proliferative agent) 또는 면역자극제를 포함하는 조성물.

청구항 50

제 1항 또는 제 2항의 컨쥬게이트를 발현하는 형질전환된 숙주 세포.

청구항 51

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 컨쥬게이트가 요망되지 않는 세포 증식 또는 과증식 장애를 치료하는데 효과적인 양으로 존재하는, 단위 투여량을 포함하는 컨쥬게이트.

청구항 52

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 신생물, 종양 또는 암을 치료하는데 효과적인 양의 단위 투여량을 포함하는 컨쥬게이트.

청구항 53

제 1항 또는 제 2항의 컨쥬게이트, 및 세포의 증식을 감소시키거나 억제하거나, 과증식 세포의 증식을 감소시키거나 억제하거나, 신생물, 종양 또는 암 세포의 증식을 감소시키거나 억제하거나, 과증식 장애를 갖는 대상체를 치료하거나, 신생물, 종양 또는 암을 갖는 대상체를 치료하기 위한 설명서를 포함하는 키트.

청구항 54

1) 항체 중쇄(H)의 아미노(NH_2)-말단에 연결된 용해 도메인; 2) 항체 경쇄(L)의 아미노(NH_2)-말단에 연결된 용해 도메인; 3) 항체 중쇄(H)의 카르복시(C)-말단에 연결된 용해 도메인; 또는 4) 항체 경쇄(L)의 카르복시(C)-말단에 연결된 용해 도메인을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 55

1) 항체 중쇄(H)의 아미노(NH_2)-말단에 연결된 용해 도메인; 2) 항체 경쇄(L)의 아미노(NH_2)-말단에 연결된 용해 도메인; 3) 항체 중쇄(H)의 카르복시(C)-말단에 연결된 용해 도메인; 또는 4) 항체 경쇄(L)의 카르복시(C)-말단에 연결된 용해 도메인을 포함하는 폴리펩티드로서, 상기 중쇄(H) 또는 경쇄(L) 또는 항체가 표 A, B, C, D, 4, 5, 또는 실시예 14, 15, 18, 20 또는 21 중 임의의 곳에 기재된 임의의 중쇄(H), 임의의 경쇄(L), 임의의 항체

또는 어느 하나 이상의 CDR 서열로부터 선택되는, 폴리펩티드.

청구항 56

제 1항 또는 제 2항의 컨쥬게이트 또는 제 54항 또는 제 55항의 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 분자.

청구항 57

제 1항 또는 제 2항의 항체 또는 폴리펩티드 컨쥬게이트의 1) 항체 중쇄(H)의 아미노(NH_2)-말단에 연결된 용해 도메인; 2) 항체 경쇄(L)의 아미노(NH_2)-말단에 연결된 용해 도메인; 3) 항체 중쇄(H)의 카르복시(C)-말단에 연결된 용해 도메인; 또는 4) 항체 경쇄(L)의 카르복시(C)-말단에 연결된 용해 도메인을 인코딩하는 핵산 분자.

청구항 58

제 56항 또는 제 57항의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 59

제 56항 또는 제 57항의 핵산, 또는 제 58항의 벡터로 형질전환된 숙주 세포.

청구항 60

세포의 증식을 감소시키거나 억제하기에 충분한 양의 제 1항 또는 제 2항의 컨쥬게이트 또는 제 51항의 폴리펩티드와 세포를 접촉시키는 것을 포함하는, 세포의 증식을 감소시키거나 억제하는 방법.

청구항 61

세포 증식을 감소시키거나 억제하기에 충분한 양의 제 1항 또는 제 2항의 컨쥬게이트 또는 제 51항의 폴리펩티드와 세포를 접촉시키는 것을 포함하는, 세포 증식을 감소시키거나 억제하는 방법.

청구항 62

제 1항의 항체 컨쥬게이트가 결합하는 표적을 발현하는 세포의 증식을 감소시키거나 억제하기에 충분한 양의 제 1항 또는 제 2항의 컨쥬게이트 또는 제 54항 또는 제 55항의 폴리펩티드와 세포를 접촉시키는 것을 포함하는, 제 1항의 항체 컨쥬게이트가 결합하는 표적을 발현하는 세포의 증식을 선택적으로 감소시키거나 억제하는 방법.

청구항 63

과증식하는 세포의 증식을 감소시키거나 억제하기에 충분한 양의 제 1항 또는 제 2항의 컨쥬게이트 또는 제 54항 또는 제 55항의 폴리펩티드와 세포를 접촉시키는 것을 포함하는, 과증식하는 세포의 증식을 감소시키거나 억제하는 방법.

청구항 64

신생물, 종양, 암 또는 악성종양 세포의 증식을 감소시키거나 억제하기에 충분한 양의 제 1항 또는 제 2항의 컨쥬게이트 또는 제 54항 또는 제 55항의 폴리펩티드와 세포를 접촉시키는 것을 포함하는, 신생물, 종양, 암 또는 악성종양 세포의 증식을 감소시키거나 억제하는 방법.

청구항 65

제 60항 내지 제 64항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 Her2/neu를 발현하는 방법.

청구항 66

과증식 장애를 치료하기에 충분한 양의 제 1항 또는 제 2항의 컨쥬게이트 또는 제 54항 또는 제 55항의 폴리펩티드를 대상체에 투여하는 것을 포함하는, 과증식 장애를 갖는 대상체를 치료하는 방법.

청구항 67

신생물, 종양, 암 또는 악성종양의 증식을 감소시키거나 억제하기에 충분한 양의 제 1항 또는 제 2항의 컨쥬게이트 또는 제 51항의 폴리펩티드를 대상체에 투여하는 것을 포함하는, 신생물, 종양, 암 또는 악성종양을 갖는

대상체를 치료하는 방법.

청구항 68

제 64항, 제 66항 또는 제 67항에 있어서, 신생물, 종양, 암 또는 악성종양이 전이성, 비-전이성 또는 양성 신생물, 종양, 암 또는 악성종양인 방법.

청구항 69

제 64항, 제 66항 또는 제 67항에 있어서, 신생물, 종양, 암 또는 악성종양이 고형 세포 덩어리를 포함하는 방법.

청구항 70

제 64항, 제 66항 또는 제 67항에 있어서, 신생물, 종양, 암 또는 악성종양이 조혈 세포를 포함하는 방법.

청구항 71

제 64항, 제 66항 또는 제 67항에 있어서, 신생물, 종양, 암 또는 악성종양이 암종, 육종, 림프종, 백혈병, 샘종, 샘암종, 흑색종, 신경아교종, 아교모세포종, 수막종, 신경모세포종, 망막모세포종, 별아교세포종, 핍지세포종, 중피종, 그물내피, 림프 또는 조혈 신생물, 종양, 암 또는 악성종양을 포함하는 방법.

청구항 72

제 71항에 있어서, 육종이 림프육종, 지방육종, 뼈육종, 연골육종, 평활근육종, 횡문근육종 또는 섬유육종을 포함하는 방법.

청구항 73

제 71항에 있어서, 조혈 신생물, 종양, 암 또는 악성종양이 골수종, 림프종 또는 백혈병을 포함하는 방법.

청구항 74

제 64항, 제 66항 또는 제 67항에 있어서, 신생물, 종양, 암 또는 악성종양이 폐, 갑상샘, 두경부, 코인두, 인후, 코 또는 굴, 뇌, 척추, 유방, 부신, 뇌하수체, 갑상샘, 림프, 위장(구강, 식도, 위, 십이지장, 회장, 공장(소장), 결장, 직장), 비뇨생식관(자궁, 난소, 자궁경부, 자궁내막, 방광, 고환, 음경, 전립선), 신장, 췌장, 간, 뼈, 골수, 림프, 혈액, 근육, 또는 피부, 윌름즈 종양, 담관, B-ALL(B-세포 림프모구 백혈병), 또는 혈액 신생물, 종양, 또는 암을 포함하는 방법.

청구항 75

제 74항에 있어서, 폐 신생물, 종양, 암 또는 악성종양이 소세포폐암 또는 비소세포폐암을 포함하는 방법.

청구항 76

제 64항, 제 66항 또는 제 67항에 있어서, 신생물, 종양, 암 또는 악성종양이 줄기세포 신생물, 종양, 암 또는 악성종양을 포함하는 방법.

청구항 77

제 64항, 제 66항 또는 제 67항에 있어서, 상기 방법이 신생물, 종양, 암 또는 악성종양의 재발 또는 진행을 억제하거나 감소시키는 방법.

청구항 78

제 64항, 제 66항 또는 제 67항에 있어서, 항-세포 증식, 항-신생물, 항-종양, 항-암 또는 면역-증강 치료 또는 요법을 제공하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 79

제 78항에 있어서, 치료 또는 요법이 외과적 절제, 방사선요법, 이온화 또는 화학적 방사선 요법, 화학요법, 면

역요법, 국소 또는 국부 열(고열) 요법, 또는 예방접종을 포함하는 방법.

청구항 80

제 78항에 있어서, 컨쥬게이트가 항-세포 증식, 항-신생물, 항-종양, 항-암 또는 면역-증강 치료 또는 요법의 제공 전, 이들의 제공과 동시에 또는 이들의 제공 후에 투여되는 방법.

청구항 81

제 64항, 제 66항 또는 제 67항에 있어서, 대상체가 외과적 절제, 화학요법, 면역요법, 이온화 또는 화학적 방사선요법, 국소 또는 국부 열(고열) 요법, 또는 예방접종을 받은 적이 있는 방법.

청구항 82

제 64항, 제 66항 또는 제 67항에 있어서, 대상체가 외과적 절제, 화학요법, 면역요법, 이온화 또는 화학적 방사선요법, 국소 또는 국부 열(고열) 요법, 또는 예방접종에 대한 후보인 방법.

청구항 83

제 64항, 제 66항 또는 제 67항에 있어서, 대상체가 외과적 절제, 화학요법, 면역요법, 이온화 또는 화학적 방사선요법, 국소 또는 국부 열(고열) 요법, 또는 예방접종에 대한 후보가 아닌 방법.

청구항 84

제 64항, 제 66항 또는 제 67항에 있어서, 치료가 신생물, 종양, 암 또는 악성종양 세포 질량, 부피, 크기 또는 세포의 수의 부분적 또는 완전한 파괴를 발생시키거나, 신생물, 종양, 암 또는 악성종양 세포 괴사, 용해 또는 아폽토시스를 자극하거나, 유도하거나, 증가시키거나, 신생물, 종양, 암 또는 악성종양 부피 크기, 세포 질량을 감소시키거나, 신생물, 종양, 암 또는 악성종양 부피, 질량, 크기 또는 세포 수의 진행 또는 증가를 억제하거나 예방하거나, 수명을 연장시키는 방법.

청구항 85

제 64항, 제 66항 또는 제 67항에 있어서, 치료가 신생물, 종양, 암 또는 악성종양과 관련되거나 이에 의해 야기된 유해 증상 또는 합병증의 중증도, 기간 또는 빈도를 감소시키거나 저하시키는 방법.

청구항 86

제 64항, 제 66항 또는 제 67항에 있어서, 치료가 동통, 불쾌, 구역, 쇠약 또는 기면을 감소시키거나 저하시키거나, 증가된 에너지, 식욕, 개선된 움직임 또는 심리적 웰빙(well being)을 발생시키는 방법.

청구항 87

제 66항 또는 제 67항에 있어서, 대상체가 포유동물인 방법.

청구항 88

제 66항 또는 제 67항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본 출원은 전체내용이 참조로서 본원에 명백히 포함되는 2012년 10월 30일에 출원된 출원 일련 번호 61/720,257호에 대한 우선권을 주장한다.

[0003] **기술 분야**

[0004] 본 발명은 약물, 예를 들어, 용해 펩티드 컨쥬게이트에 융합되거나 컨쥬게이션된 항체, 및 항체의 중쇄(H) 및/또는 경쇄(L), 예를 들어, 요망되지 않거나 비정상적인 세포 증식 또는 과증식 장애, 예를 들어, 상기 항체, 및

항체의 중쇄(H) 및/또는 경쇄(L)에 결합하는 표적을 발현하는 비-전이성 및 전이성 신생물, 암, 종양 및 악성종양을 치료하는 방법에서 컨쥬게이트를 사용하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] 서론

[0006] 암 환자의 5년 생존률을 고려하는 경우 원발성 종양 및 전이의 치료를 위한 새로운 치료법을 개발할 필요가 의심할 여지 없이 명백하며, 원격 전이 질병으로 진단되는 경우에 폐암, 결장직장암, 유방암 및 전립선암을 갖는 환자의 단지 10-40%가 생존한다.

발명의 내용

[0007] 개요

[0008] 본 발명은 표적(예를 들어, Her2/neu, ErbB-2로도 공지된 인간 표피 성장 인자 수용체 2, CD20)에 결합하는 항체에 융합된 용해 도메인, 항체의 중쇄(H) 및/또는 경쇄(L)에 융합되거나 컨쥬게이션된 용해 도메인, 및 항체 단편에 융합되거나 컨쥬게이션된 용해 도메인을 적어도 부분적으로 기초로 한다. 상기 융합체는 또한 항체 또는 폴리펩티드 컨쥬게이트 또는 융합 작제물로 본원에서 언급될 수 있다. 세포와 용해 도메인의 접촉은 세포 사멸을 발생시키는 세포막의 파열을 야기시키는 것으로 생각된다. 표적에 결합하는 항체, 또는 항체의 중쇄(H) 및/또는 경쇄(L)는 용해 도메인이 항체 또는 중쇄(H) 및/또는 경쇄(L)가 결합하는 표적을 발현하는 요망되지 않거나 비정상적인 증식 세포 도는 과증식 세포, 예를 들어, 비-전이성 및 전이성 신생물, 암, 종양 및 악성종양을 포함하는 표적 발현 세포를 파괴하는 것을 가능케 한다. 다수의 비-전이성 및 전이성 신생물, 암, 종양 및 악성종양 세포는 표적, 예를 들어, 수용체 또는 리간드를 과발현한다. 예를 들어, 많은 비-전이성 및 전이성 신생물, 암, 종양 및 악성종양은 항체 또는 폴리펩티드 컨쥬게이트 또는 융합 작제물의 표적으로 사용될 수 있는 수용체 표적(예를 들어, Her2/neu 또는 CD20)을 발현한다.

[0009] 컨쥬게이트는 관심 표적을 발현하는 임의의 세포 또는 세포 집단에 결합하도록 설계될 수 있다. 결합하는 표적을 기초로 하여 선택된 항체, 이의 단편, 또는 항체 또는 이의 단편의 중쇄(H) 및/또는 경쇄(L)는 용해 도메인에 연결될 수 있다. 생성된 항체 또는 폴리펩티드 컨쥬게이트 또는 융합 작제물은 차례로 표적을 발현하는 세포의 증식을 감소시키거나 억제함으로써 표적 발현 세포의 증식 또는 성장을 감소시키거나 억제할 수 있다.

[0010] 컨쥬게이트는 표적 세포를 사멸시키기 위해 분열하는 세포를 필요로 하지 않는다. 따라서, 컨쥬게이트는 분열 및 비-분열 세포에 대해 유용하다.

[0011] 본 발명에 따르면, 용해 도메인을 포함하는 항체 및 폴리펩티드 컨쥬게이트가 제공된다. 한 구체예에서, 항체 컨쥬게이트는, 예를 들어, KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAKKFAKFAKKF, KFAKFAKKFAKFAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKFAKKFAKFAKKFAKF, KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA 및 KFAKFAKKFAKFAKKFAKFAKKFAKFAK(SEQ ID NOs.:1-7)로부터 선택된 펩티드 서열을 포함하는 L-아미노산 또는 D-아미노산 서열, 또는 K 잔기 중 하나 이상이 F 또는 L 잔기 중 임의의 것으로 치환되거나, F 잔기 중 하나 이상이 K, A 또는 L 잔기 중 임의의 것으로 치환되거나, A 잔기 중 하나 이상이 K, F 또는 L 잔기 중 임의의 것으로 치환된 KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAKKFAKFAKKF, KFAKFAKKFAKFAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKFAKKFAKFAKKFAKF 및 KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA(SEQ ID NOs.:1-6)로부터 선택된 펩티드를 포함하는 L-아미노산 또는 D-아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된 용해 도메인에 연결된, 표적에 결합하는 항체(또는 이의 단편)을 포함하거나 이로 구성된다. 또 다른 구체예에서, 폴리펩티드 컨쥬게이트는, 예를 들어, KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAKKFAKFAKKF, KFAKFAKKFAKFAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKFAKKFAKFAKKFAKF, KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA 및 KFAKFAKKFAKFAKKFAKFAKKFAKFAK(SEQ ID NOs.:1-7)로부터 선택된 L-아미노산 또는 D-아미노산 서열, 또는 K 잔기 중 하나 이상이 F 또는 L 잔기 중 임의의 것으로 치환되거나, F 잔기 중 하나 이상이 K, A 또는 L 잔기 중 임의의 것으로 치환되거나, A 잔기 중 하나 이상이 K, F 또는 L 잔기 중 임의의 것으로 치환된 KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAKKFAKFAKKF, KFAKFAKKFAKFAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKFAKKFAKFAKKFAKF 및 KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA(SEQ ID NOs.:1-6)로부터 선택된 펩티드를 포함하는 서열을 포함하거나 이들로 구성된 용해 도메인에 연결된, 표적에 결합하는 항체 또는 이의 단편의 중쇄(H) 및/또는 경쇄(L)를 포함하거나 이로 구성된다.

[0012] 더욱 특정한 구체예에서, 항체 또는 폴리펩티드 컨쥬게이트는 KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAKKFAKFAKKF, KFAKFAKKFAKFAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKFAKKFAKFAKKFAKF, KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA 및 KFAKFAKKFAKFAKKFAKFAKKFAKFAK(SEQ ID NOs.:1-7)로부터 선택된 L-아미노산 또는 D-아미노산 서열, 또는 K 잔기

중 하나 이상이 F 또는 L 잔기 중 임의의 것으로 치환되거나, F 잔기 중 하나 이상이 K, A 또는 L 잔기 중 임의의 것으로 치환되거나, A 잔기 중 하나 이상이 K, F 또는 L 잔기 중 임의의 것으로 치환된 KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAKKFAKFAKKF, KFAKFAKKFAKFAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKFAKKFAKFAKKFAKF 및 KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA(SEQ ID NOs.:1-6)로부터 선택된 펩티드를 포함하는 서열을 포함하거나 이들로 구성된 용해 도메인에 연결된, Her2/neu에 결합하는 항체(또는 이의 단편) 또는 항체(예를 들어, 트라스투주맙(trastuzumab) 또는 퍼투주맙(pertuzumab)) 또는 이의 단편(트라스투주맙 또는 퍼투주맙 단편)의 중쇄(H) 및/또는 경쇄(L)를 포함한다.

[0013] 본 발명에 따르면, 표적에 결합하는 항체(또는 이의 단편) 또는 항체 또는 이의 단편의 중쇄(H) 및/또는 경쇄(L), 및 제 2의 도메인을 포함하거나 이들로 구성된 분리되고 정제된 컨쥬게이트가 또한 제공된다. 다양한 구체예에서, 제 2의 도메인은 용해 도메인 KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAKKFAKFAKKF, KFAKFAKKFAKFAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKFAKKFAKFAKKFAKF 또는 KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA(SEQ ID NOs.:1-7)를 포함하거나 이들로 구성된다. 추가 구체예에서, 제 2의 도메인은 K 잔기 중 하나 이상이 F 또는 L 잔기 중 임의의 것으로 치환되거나, F 잔기 중 하나 이상이 K, A 또는 L 잔기 중 임의의 것으로 치환되거나, A 잔기 중 하나 이상이 K, F 또는 L 잔기 중 임의의 것으로 치환된 KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAKKFAKFAKKF, KFAKFAKKFAKFAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKFAKKFAKFAKKFAKF 또는 KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA(SEQ ID NOs.:1-6)를 포함하거나 이들로 구성된다.

[0014] 본 발명에 따르면, 하나 이상의 용해 도메인을 포함하는 폴리펩티드가 추가로 제공된다. 다양한 구체예에서, 폴리펩티드는 1) 항체 중쇄(H)의 아미노(NH_2)-말단에 연결된 용해 도메인; 2) 항체 경쇄(L)의 아미노(NH_2)-말단에 연결된 용해 도메인; 3) 항체 중쇄(H)의 카르복시(C)-말단에 연결된 용해 도메인; 또는 4) 항체 경쇄(L)의 카르복시(C)-말단에 연결된 용해 도메인을 포함하거나 이들로 구성된다. 추가의 다양한 구체예에서, 폴리펩티드는 1) 항체 중쇄(H)의 아미노(NH_2)-말단에 연결된 용해 도메인 및 카르복시(C)-말단에 연결된 용해 도메인; 또는 2) 항체 경쇄(L)의 아미노(NH_2)-말단에 연결된 용해 도메인 및 카르복시(C)-말단에 연결된 용해 도메인을 포함하거나 이들로 구성된다.

[0015] 표적의 특정한 비제한적인 예는 아미노산 서열(예를 들어, 폴리펩티드, 펩티드, 단백질), 다당류, 올리고당류, 탄수화물, 및 지질을 포함한다. 표적의 특정한 비제한적인 부류는 수용체 및 항원을 포함한다.

[0016] 표적은 호르몬, 성장 인자, 분화의 클러스터(집합적으로 CD 분자 또는 CD 마커로 공지됨), 호르몬 및 성장 인자 유사체, 및 호르몬, 호르몬 유사체, 성장 인자, 성장 인자 유사체의 단편, 및 성장 인자 및 유사체의 단편을 포함하는 항원, 수용체 또는 리간드에 결합하는 수용체를 포함한다. 수용체 표적의 특정한 비제한적인 예는 Her2/neu(ErbB-2로도 공지된 인간 표피 성장 인자 수용체 2), 황체형성 호르몬 분비 호르몬 수용체(LHRH-R), 표피 성장 인자(EGF) 수용체, 폴레이트, 및 성장 호르몬(GH) 수용체를 포함한다. CD 도메인의 특정한 비제한적인 예는 CD19, CD20, CD22, CD23, CD27, CD28, CD30, CD31, CD33, CD34, CD40, CD52, CD56, CD70, CD123, CD138, 또는 CD154, 및 기타 CD 도메인을 포함한다.

[0017] 항원 표적은 바이러스, 박테리아, 진균 및 기생충 항원을 포함한다. 항원 표적은 또한 종양 관련 항원(TAA)을 포함한다.

[0018] 항원은 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L) 뿐만 아니라 항체 단편을 포함한다. 항체의 중쇄(H) 및/또는 경쇄(L) 또는 중쇄(H) 또는 경쇄(L)의 단편을 포함하거나 이들로 구성된 폴리펩티드는 단일한 H 또는 L 사슬 또는 단일한 H 또는 L 사슬 단편, 또는 복수(2, 3, 4개 또는 그 초과)의 중쇄(H) 및/또는 경쇄(L), 또는 복수의 중쇄(H) 및/또는 경쇄(L)의 단편을 포함할 수 있다. 항체 또는 단편의 중쇄(H) 및/또는 경쇄(L)를 포함하는 폴리펩티드는 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)를 포함할 수 있으나, 이들을 필요로 하지는 않으며, 따라서 본원에 기재된 폴리펩티드 컨쥬게이트는 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)를 포함하는 자연 항체를 배제할 수 있다.

[0019] 항체 또는 이의 단편은 올리고머(더 높은 차수 또는 원자가) 형태, 예를 들어, 삼합체, 사합체, 오합체, 육합체, 칠합체 등과 함께 다른 항체, 이의 단편, 중쇄(H), 경쇄(L), 또는 항체 중쇄(H) 또는 경쇄(L)와 다른 폴리펩티드 서열일 수 있다. 항체는 모노클로날 항체 및 모노클로날 항체의 단편을 포함한다. 항체는 포유동물, 인간, 인간화, 영장류화 및 키메라 서열을 포함한다.

[0020] 아미노산 서열(예를 들어, 폴리펩티드, 펩티드, 단백질, 항체, 중쇄(H), 경쇄(L), 용해 도메인 등)은 자연(L-) 또는 비-자연(예를 들어, L-) 아미노산을 포함하거나 이들로 구성된다. 특정 양태에서, 아미노산 서열은 약 2 내지 10개, 10 내지 14개, 15 내지 20개(즉, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 아미노산), 10 내지 20개, 20 내

지 30개, 30 내지 40개, 40 내지 50개, 60 내지 70개, 70 내지 80개, 80 내지 90개, 90 내지 100개, 100 내지 125개, 125 내지 150개, 150 내지 175개, 175 내지 200개, 200 내지 250개, 250 내지 300개, 또는 그 초과의 아미노산 잔기를 갖는다. 전장 항체 중쇄(H) 및 경쇄(L)는 통상적으로 90 내지 130개의 아미노산 길이이나, 더 짧을 수 있고, 예를 들어, 프레임워크 영역을 갖거나 갖지 않는 1, 2, 또는 3개의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 가변 중쇄(H), 또는 경쇄(L) 서열을 포함한다. 용해 도메인은 통상적으로 10 내지 14개, 15 내지 20개(즉, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 아미노산), 10 내지 20개, 20 내지 30개, 30 내지 40개, 또는 40 내지 50개이나, 임의로 더 길거나(50개 또는 그 초과), 더 짧을(10개 미만) 수 있다. 아미노산 서열은 선형 또는 고리형 구조를 포함할 수 있거나, 이로 구성될 수 있다.

[0021] 용해 도메인을 포함하는 컨쥬게이트는 항체(또는 이의 단편) 또는 항체의 중쇄(H) 또는 경쇄(L)의 임의의 위치에서 용해 도메인을 가질 수 있다. 따라서, 용해 도메인은 항체(또는 이의 단편) 또는 항체의 중쇄(H) 또는 경쇄(L)의 임의의 아미노산 위치(아미노산 잔기)에 위치될 수 있다. 또한, 컨쥬게이트는 다수의 용해 도메인을 포함할 수 있다. 따라서, 중쇄(H) 또는 경쇄(L) 용해 도메인에 연결된 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8개 또는 그 초과)의 용해 도메인이 본 발명의 컨쥬게이트에 포함될 수 있다.

[0022] 용해 도메인은 또한 폴리펩티드 서열의 C-말단, NH_2-말단, 또는 C-말단 및 NH_2-말단 둘 모두에 위치될 수 있다. 특정 구체예에서, 컨쥬게이트는 항체(또는 이의 단편) 중쇄(H) 또는 경쇄(L)의 NH_2-말단 또는 C-말단, 또는 중쇄(H) 또는 경쇄(L) 중 어느 하나(또는 둘 모두)에 위치된 용해 도메인을 갖는다. 특정 양태에서, 용해 도메인은 중쇄(H)의 아미노(NH_2)-말단에 연결되거나, 중쇄(H)의 카르복시(C)-말단에 연결되고, 용해 도메인은 경쇄(L)의 아미노(NH_2)-말단에 연결되거나, 경쇄(L)의 카르복시(C)-말단에 연결된다. 복수의 용해 도메인과의 컨쥬게이트에서, 상기 도메인은 중쇄(H) 또는 경쇄(L), 중쇄(H)의 아미노(NH_2)-말단, 중쇄(H)의 카르복시(C)-말단, 경쇄(L)의 아미노(NH_2)-말단, 또는 경쇄(L)의 카르복시(C)-말단에 연결될 수 있다. 더욱 특정한 양태에서, 복수의 용해 도메인 중 적어도 하나는 중쇄(H)의 아미노(NH_2)-말단에 연결되고, 적어도 하나는 경쇄(L)의 아미노(NH_2)-말단에 연결되고; 용해 도메인 중 적어도 하나는 중쇄(H)의 아미노(NH_2)-말단에 연결되고, 용해 도메인 중 적어도 하나는 경쇄(L)의 아미노(NH_2)-말단에 연결되고, 용해 도메인 중 적어도 하나는 중쇄(H)의 카르복시(C)-말단에 연결되거나, 경쇄(L)의 카르복시(C)-말단에 연결되고; 복수의 용해 도메인 중 적어도 하나는 중쇄(H)의 아미노(NH_2)-말단에 연결되고, 용해 도메인 중 적어도 하나는 경쇄(L)의 아미노(NH_2)-말단에 연결되고, 용해 도메인 중 적어도 하나는 중쇄(H)의 카르복시(C)-말단에 연결되고, 용해 도메인 중 적어도 하나는 경쇄(L)의 카르복시(C)-말단에 연결된다.

[0023] 컨쥬게이트가 복수의 용해 도메인을 포함하는 구체예에서, 용해 도메인은 동일한 아미노산 서열을 갖거나, 상이한 아미노산 서열을 갖는다. 따라서, 컨쥬게이트는 2, 3, 4, 5, 6, 7개의 용해 도메인 등을 포함할 수 있고, 이중 일부 또는 전부는 서로 동일하거나 상이할 수 있다.

[0024] 특정 구체예에서, 용해 도메인은, 예를 들어, 공유(예를 들어, 펩티드 또는 비펩티드) 결합에 의해 중쇄(H) 또는 경쇄(L)의 아미노(NH_2)-말단 또는 카르복시(C)-말단의 마지막 아미노산 바로 뒤의 중쇄(H) 또는 경쇄(L)에 연결됨으로써 용해 도메인과 중쇄(H) 또는 경쇄(L) 사이에서 연속적 아미노산 서열을 형성한다. 추가 구체예에서, 항체, 중쇄(H) 및 경쇄(L) 및 용해 도메인은 펩티드 또는 비-펩티드 링커 또는 스페이서에 의해 연결될 수 있다. 특정 양태에서, 항체, 중쇄(H) 및 경쇄(L) 및 용해 도메인 및 용해 도메인은 약 1 내지 25개의 아미노산 잔기를 갖는 펩티드 서열에 의해 연결되거나, 선형 탄소 사슬, 예를 들어, C_N (여기서, N=1-100개의 탄소 원자, 예를 들어, C, CC, CCC, CCCC, CCCCC, CCCCCC, CCCCCCC, CCCCCCCC 등)에 의해 연결된다. 더욱 특정한 양태에서, 항체, 중쇄(H) 및 경쇄(L) 및 용해 도메인 및 용해 도메인은 하나 이상의 A, S 또는 G 아미노산 잔기를 포함하거나 이로 구성되는 펩티드 서열(예를 들어, GSGGS(SEQ ID No.:8), ASAAS(SEQ ID No.:9), GS, AF, FK, VK, FFK, FA, GSGRSA(SEQ ID NO.:10), RVRRSV(SEQ ID NO.:11), SS, Cit-V(Cit = 시트룰린($H_2NC(O)NH(CH_2)_3CH(NH_2)CO_2H$); Val = 발린), F-Cit(F=페닐알라닌, Cit = 시트룰린)을 포함하거나 이로 구성되는 펩티드 서열)에 의해 연결된다.

[0025] 컨쥬게이트는 추가(예를 들어, 비-용해) 도메인을 추가로 포함하거나 이로 구성된다. 따라서, 다양한 양태에서, 컨쥬게이트는 컨쥬게이트에 포함된 하나 이상(또는 전부)의 용해 도메인과 다를 수 있는 제 2, 제 3, 제 4, 제 5, 제 6, 제 7의 도메인 등을 포함한다.

[0026] 컨쥬게이트는 분리된 형태 및/또는 정제된 형태를 포함하거나 이로 구성된다. 컨쥬게이트는 또한 제형 또는 혼합물을 포함하거나 이로 구성된다. 이러한 제형 및 혼합물은 컨쥬게이트 및 대상체에서 사용하거나, 대상체로 투여하거나, 대상체와 생체내 접촉시키기에 적절한 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제의 혼합물 또는 컨쥬게이트 및 항-세포 증식 또는 면역자극제의 혼합물과 같은 조성물을 포함한다.

[0027] 컨쥬게이트는 단위 투여 형태, 예를 들어, 대상체에 사용하거나 대상체에 투여하기 위한 단위 투여 형태를 포함하거나 이로 구성된다. 일 구체예에서, 컨쥬게이트는 요망되지 않는 세포 증식 또는 과증식 장애를 갖는 대상체에 투여하거나 상기 대상체를 치료하기에 효과적인 양의 단위 투여 형태이다. 또 다른 구체예에서, 컨쥬게이트는 신생물, 종양 또는 암을 갖는 대상체에 투여하거나 상기 대상체를 치료하기에 효과적인 양의 단위 투여 형태이다. 추가의 구체예에서, 컨쥬게이트는 대상체에 투여하거나 상기 대상체의 생식능력을 감소시키기에 효과적인 양의 단위 투여 형태이다.

[0028] 컨쥬게이트는 임의로 본 발명의 방법을 실시하거나 본 발명에서 사용하기 위한 설명서와 함께 키트 내에 포함될 수 있다. 일 구체예에서, 키트는 세포의 증식을 감소시키거나 억제하거나, 과증식 세포의 증식을 감소시키거나 억제하거나, 신생물, 종양 또는 암 세포의 증식을 감소시키거나 억제하거나, 과증식 장애를 갖는 대상체를 치료하거나, 신생물, 종양 또는 암을 갖는 대상체를 치료하거나, 동물의 생식능력을 감소시키기 위한 컨쥬게이트 및 설명서를 포함한다.

[0029] 컨쥬게이트를 인코딩하는 핵산이 또한 제공된다. 다양한 구체예에서, 핵산 서열은 항체 또는 폴리펩티드 컨쥬게이트의 1) 항체 중쇄(H)의 아미노(NH_2)-말단에 연결된 용해 도메인; 2) 항체 경쇄(L)의 아미노(NH_2)-말단에 연결된 용해 도메인; 3) 항체 중쇄(H)의 카르복시(C)-말단에 연결된 용해 도메인; 또는 4) 항체 경쇄(L)의 카르복시(C)-말단에 연결된 용해 도메인을 인코딩한다. 또 다른 구체예에서, 핵산 서열은 항체 또는 폴리펩티드 컨쥬게이트의 1) 항체 중쇄(H)의 아미노(NH_2)-말단에 연결된 용해 도메인 및 카르복시(C)-말단에 연결된 용해 도메인; 2) 항체 경쇄(L)의 아미노(NH_2)-말단에 연결된 용해 도메인 및 카르복시(C)-말단에 연결된 용해 도메인을 인코딩한다.

[0030] 핵산은 벡터, 예를 들어, 세포 내에서 발현되는 경우 컨쥬게이트를 인코딩하는 발현 벡터에 포함될 수 있다. 숙주 세포는 벡터 내의 핵산(예를 들어, 컨쥬게이트의 전부 또는 일부, 예를 들어, 용해 도메인에 연결된 중쇄(H) 및/또는 경쇄(L) 서열)으로 형질전환될 수 있어, 상기 세포는 상기 핵산에 의해 인코딩된 컨쥬게이트를 발현한다.

[0031] 본원에 개시된 바와 같이, 표적은 세포 내 또는 세포 상에서 발현될 수 있다. 컨쥬게이트가 결합하는 표적을 발현하는 세포가 본 발명의 컨쥬게이트에 의한 결합에 대해 표적화될 수 있다. 따라서, 상기 세포는 상기 세포에 의해 발현된 표적에 결합하는 컨쥬게이트를 선택함으로써 선택적으로 표적화될 수 있다.

[0032] 비제한적 표적 발현 세포는, 예를 들어, 과증식 세포를 포함한다. 표적을 발현하는 추가 세포는, 예를 들어, 유방, 난소, 자궁, 자궁경부, 복부, 폐, 위, 결장, 방광, 아교, 피부(예를 들어, 멜라닌세포), 혈액 및 자궁내막 세포를 포함한다.

[0033] 컨쥬게이트는 특히 세포의 증식을 감소시키거나 억제하고, 세포 증식을 감소시키거나 억제하고, 과증식 세포의 증식을 감소시키거나 억제하고, 신생물, 종양, 암 또는 악성종양 세포의 증식을 감소시키거나 억제하고, 과증식 세포 또는 과증식 장애과 같은 요망되지 않거나 비정상적인 세포 증식을 치료하는데 유용하다. 과증식 장애의 비제한적인 예는 양성 과다형성, 비-전이성 및 전이성 신생물, 암 종양 및 악성종양을 포함한다.

[0034] 본 발명에 따르면, 세포의 증식을 감소시키거나 억제하는 방법; 세포 증식을 감소시키거나 억제하는 방법; 과증식 세포의 증식을 감소시키거나 억제하는 방법; 및 신생물, 종양, 암 또는 악성종양 세포의 증식을 감소시키거나 억제하는 방법이 추가로 제공된다. 다양한 구체예에서, 상기 방법은 세포의 증식을 감소시키거나 억제하기에 충분한 양의 컨쥬게이트와 세포를 접촉시키고; 세포 증식을 감소시키거나 억제하기에 충분한 양의 컨쥬게이트와 세포를 접촉시키고; 과증식 세포의 증식을 감소시키거나 억제하기에 충분한 양의 컨쥬게이트와 세포를 접촉시키고; 신생물, 종양, 암 또는 악성종양 세포의 증식을 감소시키거나 억제하기에 충분한 양의 컨쥬게이트와 세포를 접촉시키는 것을 포함한다.

[0035] 본 발명에 따르면, 컨쥬게이트가 결합하는 표적을 발현하는 세포의 증식을 선택적으로 감소시키거나 억제하고; 컨쥬게이트가 결합하는 표적을 발현하는 과증식 세포의 증식을 선택적으로 감소시키거나 억제하고; 컨쥬게이트가 결합하는 표적을 발현하는 신생물, 종양, 암 또는 악성종양의 증식을 선택적으로 감소시키거나 억제하는 방

법이 또한 제공된다. 다양한 구체예에서, 상기 방법은 세포의 증식을 감소시키거나 억제하기에 충분한 양의 컨쥬게이트와 표적 발현 세포를 접촉시키고; 과증식 세포의 증식을 감소시키거나 억제하기에 충분한 양의 컨쥬게이트와 표적 발현 세포를 접촉시키고; 신생물, 종양, 암 또는 악성종양 세포의 증식을 감소시키거나 억제하기에 충분한 양의 컨쥬게이트와 표적 발현 세포를 접촉시키는 것을 포함하며, 상기 컨쥬게이트는 세포에 의해 발현된 표적에 결합한다.

[0036] 본 발명의 용도 및 방법에 따라 표적화되는 예시적 세포는 임의의 요망되는 표적을 발현하는 세포를 포함한다. 따라서, 상기 비제한적인 세포는, 예를 들어, 유방, 난소, 자궁, 자궁경부, 복부, 폐, 위, 결장, 방광, 아교, 피부(예를 들어, 멜라라닌세포), 혈액 및 자궁내막 세포를 포함한다. 더욱 특정한 비제한적인 세포는 수용체, 예를 들어, Her2/neu, 항원(예를 들어, 종양 관련 항원) 또는 분화 도메인(CD)의 클러스터를 발현한다.

[0037] 수행된 방법은 특히 세포, 예를 들어, 과증식 세포 또는 요망되지 않게 증식하는 세포의 증식, 생존, 분화, 사멸, 또는 활성을 억제하거나, 감소시키거나, 예방할 필요가 있는 대상체에 투여하거나 접촉시키는 것을 포함한다. 예시적 대상체는 요망되지 않거나 비정상적인 세포 증식을 갖거나 가질 위험이 있는 대상체; 및 양성 과다형성, 또는 비-전이성 또는 전이성 신생물, 암, 종양 또는 악성종양(예를 들어, 유방, 난소, 자궁, 자궁경부, 복부, 폐, 위, 결장, 방광, 아교, 피부(예를 들어, 멜라닌세포), 혈액 또는 자궁내막 세포 중 어느 하나에서의 고형 또는 액형 종양)을 갖거나, 가질 위험이 있는 대상체를 포함한다.

[0038] 본 발명에 따르면, 과증식 장애를 갖는 대상체를 치료하는 용도 및 방법, 및 신생물, 종양, 암 또는 악성종양(전이성, 비-전이성 또는 양성)을 갖는 대상체를 치료하는 용도 및 방법이 추가로 제공된다. 다양한 구체예에서, 상기 용도 또는 방법은 과증식 장애를 치료하기에 충분한 컨쥬게이트의 양을 대상체에 투여하고; 신생물, 종양, 암 또는 악성종양의 증식을 감소시키거나 억제하기에 충분한 컨쥬게이트의 양을 대상체에 투여하는 것을 포함한다.

[0039] 상기 방법 및 용도는 전이를 갖거나 전이를 가질 위험이 있는 대상체를 치료하는 것을 포함한다. 컨쥬게이트의 양은 종양, 암 또는 신생물의 대상체 내의 다른 부위, 위치 또는 영역으로의 확산 또는 파종을 감소시키거나 억제하는데 효과적이다. 다양한 구체예에서, 상기 방법 및 용도는 원발성 종양 또는 암의 하나 이상의 다른 부위로의 전이, 하나 이상의 다른 부위, 위치 또는 영역에서 전이의 형성 또는 확립을 감소시키거나 억제함으로써 종양 또는 암의 재발 또는 종양 또는 암의 진행을 감소시키거나 억제한다. 추가의 구체예에서, 상기 방법 또는 용도는 전이를 발생시키거나 전이를 잠재적으로 발생시키는 종양 또는 암세포(예를 들어, 파종된 종양 세포)의 성장, 증식, 이동성 또는 침습성을 감소시키거나 억제하거나; 원발성 종양 또는 암으로부터 원발성 종양 또는 암과 별개인 하나 이상의 다른 부위, 위치 또는 영역으로 발생하는 전이의 형성 또는 확립을 감소시키거나 억제하거나; 전이가 형성되거나 확립된 후 원발성 종양 또는 암과 별개인 하나 이상의 다른 부위, 위치 또는 영역에서 전이의 성장 또는 증식을 감소시키거나 억제하거나; 전이가 형성되거나 확립된 후 추가 전이의 형성 또는 확립을 감소시키거나 억제한다. 또 다른 구체예에서, 상기 방법 또는 용도는 신생물, 종양, 암 또는 악성종양의 재발 또는 진행을 감소시키거나 억제한다.

[0040] 본 발명에 따르면, 신생물, 종양, 암 또는 악성종양의 다른 부위로의 전이를 감소시키거나 억제하는 방법 및 용도, 또는 원발성 신생물, 종양, 암 또는 악성종양으로부터 원위에 있는 다른 부위에서 전이성 신생물, 종양, 암 또는 악성종양의 형성 또는 확립을 감소시키거나 억제하는 방법이 또한 추가로 제공된다. 다양한 구체예에서, 상기 방법은 신생물, 종양, 암 또는 악성종양의 다른 부위로의 전이, 또는 원발성 신생물, 종양, 암 또는 악성종양으로부터 원위에 있는 다른 부위에서 전이성 신생물, 종양, 암 또는 악성종양의 형성 또는 확립을 감소시키거나 억제하기에 충분한 양의 컨쥬게이트를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0041] 따라서, 본 발명에 따라 치료가능한 신생물, 종양, 암 및 악성종양은 전이성, 및 비-전이성 또는 양성 형태를 포함한다. 비제한적인 예로 고형 세포 덩어리, 조혈 세포, 또는 암종, 육종(예를 들어, 림프육종, 지방육종, 뼈육종, 연골육종, 평활근육종, 횡문근육종 또는 섬유육종), 림프종, 백혈병, 샘종, 샘암종, 흑색종, 신경아교종, 아교모세포종, 수막종, 신경모세포종, 망막모세포종, 별아교세포종, 핍지세포종, 중피종, 그물내피, 림프 또는 조혈(예를 들어, 골수종, 림프종 또는 백혈병) 신생물, 종양, 암 또는 악성종양을 포함한다.

[0042] 본 발명에 따라 치료가능한 신생물, 종양, 암 및 악성종양은 폐(소세포폐암 또는 비소세포폐암), 갑상샘, 두경부, 코인두, 인후, 코 또는 굴, 뇌, 척추, 부신, 뇌하수체, 유방, 난소, 자궁, 자궁경부, 위장(구강, 식도, 위, 십이지장, 회장, 공장(소장), 결장, 직장), 폐, 비뇨생식관(자궁, 난소, 자궁경부, 자궁내막, 방광, 고환, 음경, 전립선), 아교, 혈액, 자궁내막, 림프, 혈액, 근육, 피부(예를 들어, 멜라닌세포) 또는 피부 세포, 신장, 췌장, 간, 뼈, 골수, 윌름즈 종양, 담관, B-ALL(B-세포 림프모구 백혈병), 줄기 세포, 또는 혈액 신생물, 종양,

암, 또는 악성종양에 존재할 수 있거나, 이들에 침범할 수 있다.

[0043] 상기 방법 및 용도는, 예를 들어, 다른 요법(예를 들어, 외과적 절제, 화학요법, 면역요법, 방사선요법, 열 요법, 예방접종 등)에 대한 후보가 아닌 대상체에서 단독으로 실시될 수 있다. 상기 방법 및 용도는 또한 다른 치료 또는 요법(예를 들어, 외과적 절제, 방사선요법, 이온화 또는 화학 방사선 요법, 화학요법, 면역요법, 국소 또는 국부 열(고열) 요법, 또는 예방접종)과 함께 실시될 수 있다. 상기 치료 또는 요법은 컨쥬게이트의 투여 전, 투여와 동시에(별개로 또는 혼합하여), 또는 투여 후에 제공될 수 있다. 한 구체예에서, 상기 방법 또는 용도는 항-세포 증식, 항-신생물, 항-종양, 항-암 또는 면역-증강 치료 또는 요법을 제공하는 것을 포함한다. 추가 구체예에서, 상기 방법 또는 용도는 알킬화제, 항-대사물, 식물 추출물, 식물 알칼로이드, 니트로소우레아, 호르몬, 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드 유사체; 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 아자티오프린(azathioprine), 사이클로스포린 A(cyclosporin A), 프레드니솔론(prednisolone), 멜팔란(melphalan), 클로람부실(chlorambucil), 메클로르에타민(mechlorethamine), 부술판(busulphan), 메토트렉세이트(methotrexate), 6-머캅토퓨린(6-mercaptopurine), 티오구아닌(thioguanine), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 시토신 아라비노시드(cytosine arabinoside), 5-아자시티딘(5-azacytidine)(5-AZC) 및 5-아자시티딘 관련 화합물, 블레오마이신(bleomycin), 액티노마이신 D(actinomycin D), 미트라마이신(mithramycin), 미토마이신 C(mitomycin C), 카르무스틴(carmustine), 로무스틴(lomustine), 세무스틴(semustine), 스트렙토조토신(streptozotocin), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 옥시플라틴(oxiplatin), 미토탄(mitotane), 프로카르바진(procarbazine), 다카르바진(dacarbazine), 탁산(taxane)(예를 들어, 탁솔(taxol) 또는 파클리탁셀(paclitaxel)), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 독소루비신(doxorubicin) 또는 디브로모만니톨(dibromomannitol), 국소이성화효소 억제제(이리노테칸(irinotecan), 토포테칸(topotecan), 에토포시드(etoposide), 테니포시드(teniposide)), 젬시타빈(gemcitabine), 페메트렉세드(pemetrexed) 등을 투여하는 것을 포함한다.

[0044] 세포 또는 면역요법은 림프구, 형질 세포, 대식세포, 수지상 세포, T-세포, NK 세포 또는 B-세포; 항체, 세포 성장 인자, 세포 생존 인자, 세포 분화 인자, 사이토카인 또는 케모카인을 포함한다. 본 발명의 조성물, 방법 또는 용도에서 컨쥬게이트와 함께 적용가능한 추가 작용제는 표적화된 약물 또는 생물학적 약제, 예를 들어, 항체(모노클로날) 또는 수분자를 포함한다.

[0045] 본 발명의 방법은 대상체에 이점을 제공하는 것을 포함한다. 특정 구체예에서, 치료 방법은 신생물, 종양, 암 또는 악성종양 세포 질량, 부피, 크기 또는 세포의 수의 부분적 또는 완전한 파괴, 신생물, 종양, 암 또는 악성종양 세포 괴사, 용해 또는 아폽토시스의 자극, 유도 또는 증가, 신생물, 종양, 암 또는 악성종양 부피 크기, 세포 질량의 감소, 신생물, 종양, 암 또는 악성종양 부피, 질량, 크기 또는 세포 수의 진행 또는 증가의 억제 또는 예방, 또는 수명의 연장을 발생시키거나; 신생물, 종양, 암 또는 악성종양과 관련되거나 이에 의해 야기된 유해한 증상 또는 합병증의 중증도, 기간 또는 빈도를 감소시키거나 저하시키거나; 동통, 불쾌, 구역, 쇠약 또는 기면을 감소시키거나 저하시키거나; 증가된 에너지, 식욕, 개선된 움직임 또는 심리적 웰빙을 발생시킨다.

[0046] 본 발명에 방법에 따라 치료가능한 대상체는 포유동물을 포함한다. 특정 구체예에서, 대상체는 인간이다.

도면의 간단한 설명

[0047] **도면의 설명**

도 1A 및 1B는 48시간 후에 결정된 Her2-neu 수용체 양성 **A)** 유방(SKBR-3); 및 **B)** 난소(SKOV-3) 암 세포주에 대한 재조합 scFv-C_H3(네이키드 항체), scFv-C_H3 -GS-Phor18 및 scFv-C_H3-GS-$(KLAKLAK)_2KLAK$(SEQ ID NO.:74)의 세포독성을 도시한다.

도 2A 및 2B는 염수 주사된 마우스와 비교한 SKOV-3 이종이식 마우스에서의 64일의 연구 기간 동안 네이키드 모노클로날 항체(MAb), **A)** MAb-Phor18 및 **B)** 재조합 scFv-C_H3 네이키드 항체 및 scFv-C_H3-Phor18 컨쥬게이트로 처리된 마우스로부터의 중간 종양 부피를 도시한다.

도 3은 염수 주사된 마우스와 비교한 SKOV-3 이종이식 마우스에서 64일에서 MAb(네이키드), MAb-Phor18 및 재조합 scFv-C_H3 네이키드 항체 및 scFv-C_H3-Phor18 컨쥬게이트로 처리된 마우스로부터의 평균 종양 중량을 도시한다.

도 4는 염수 주사된 마우스와 비교한 SKOV-3 이종이식 마우스에서 64일의 연구 기간 동안의 MAb(네이키드),

MAb-Phor18 및 재조합 scFv-C_H3 네이키드 항체 및 scFv-C_H3-Phor18 컨쥬게이트로 처리된 마우스로부터의 평균 체중을 도시한다.

도 5는 ADC 중쇄(H) 및 경쇄(L) 발현에 사용된 pCMVTnT 발현 벡터(Promega)를 도시한다.

도 6은 생성된 ADC의 항-Phor18 면역블롯을 도시한다: H1L1(IgG1), H3L1(C_H3-Phor18-IgG1), H1L3(C_L-Phor18-IgG1), H2L2(Phor18-V_L-Phor18-V_H-IgG1) 및 H1L2(Phor18-V_L-Phor18-IgG).

도 7A 및 7B는 생성된 ADC의 품질 분석을 도시한다: 환원된 단백질의 A) 항-Phor18 프로브; 및 B) 항-카파 경쇄(L) 프로브를 이용한 항 Her2-항체, H1L1(네이키드), H1L3(C_L-Phor18-IgG1) 및 H3L1(C_H3-Phor18-IgG1).

도 8은 생성된 ADC의 항 IgG 및 항-Phor18 면역블롯을 도시한다: H1L3(C_L-Phor18-IgG1), H1L2(Phor18-V_L-Phor18-IgG1 및 H2L2(Phor18-V_L-Phor18-V_H-IgG1).

도 9는 Daudi 세포에서의 카스파제 3/7 활성에 대한 화학적으로 연결된 전체 항체 CD20 및 항체 CD20-Phor18 컨쥬게이트의 효과를 도시한다.

도 10A 및 10B는 CD20 발현 Daudi 세포에서의 네이키드 scFv에 비한 재조합적으로 생성된 scFv-Phor18의 시험관내 활성을 도시한다. A) 세포막 온전성은 2시간 후에 결정되었고, B) 세포 생활력은 각각의 네이키드 및 컨쥬게이션된 AB와의 인큐베이션 24시간 후에 결정되었다. 네이키드 scFv는 세포막을 분해시키지 않았거나, 표적 세포를 사멸시키지 않은 반면, scFv-Phor18 컨쥬게이트는 막 분해 및 세포 사멸을 나타내었다.

도 11은 네이키드 scFv 및 scFv-Phor18 컨쥬게이트에 대해 측정된 시험관내 카스파제 3/7 활성화를 도시한다. scFv-Phor 18은 농도 의존 방식으로 카스파제 3/7 활성을 증가시켰다. 스타우로스포린을 카스파제 활성화에 대한 대조군으로 제공하였다. 네이키드 scFv는 카스파제를 검출가능하게 활성화시키지 않았다.

도 12는 효모 시스템에서의 트랜스펙션에 사용된 항-CD20 ADC 및 네이키드 항체 발현을 위한 발현 벡터를 예시한다.

도 13A-13D는 A) 4시간 및 B) 24시간 후의 CD20 양성 Daudi 세포주, 및 C) 4시간 및 D) 24시간 후의 CD20 음성 U937 세포에서의 scFvFc 및 Phor18-V_L-scFvFc-C_H3-Phor18의 시험관내 활성을 도시한다.

도 14는 항-CD20 ADC 및 네이키드 항체 발현을 위한 발현 벡터를 예시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] **상세한 설명**

[0049] 본 발명은 제 2 용해 도메인에 연결되거나 융합된 표적에 결합하는 부분을 포함하는 컨쥬게이트를 적어도 부분적으로 기초로 한다. 통상적인 형태에서, 컨쥬게이트는 제 1 표적 결합 도메인(예를 들어, 항체, 또는 항체의 중쇄(H) 및/또는 경쇄(L)) 및 세포에 직접적 또는 간접적으로 독성이어서 세포 증식 또는 생존을 감소시킬 수 있거나, 세포 죽음, 사멸 또는 아폽토시스를 자극하거나, 유도하거나, 증가시키거나, 향상시킬 수 있는 용해 부분을 포함하는 제 2 도메인을 포함한다.

[0050] 본 발명에 따르면, 표적에 결합하는 항체, 또는 항체의 중쇄(H) 및/또는 경쇄(L), 및 제 2 용해 또는 독성 도메인을 포함하거나 이들로 구성되는 컨쥬게이트가 제공된다. 한 구체예에서, 컨쥬게이트는 항체 또는 이의 단편 및 펩티드 서열(리신 = K, 페닐알라닌 = F 및 알라닌 = A과 같은 아미노산으로부터 선택됨), 예를 들어, KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAKKFAKFAKKF, KFAKFAKKFAKFAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKFAKKFAKFAKKFAKF, KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA 및 KFAKFAKKFAKFAKKFAKFAKKFAKFAK(SEQ ID NO.:1-7)를 포함하는 10-100개의 잔기 L-아미노산 또는 D-아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된 용해 도메인을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 컨쥬게이트는 항체의 중쇄(H) 및/또는 경쇄(L) 및 KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAKKFAKFAKKF, KFAKFAKKFAKFAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKFAKKFAKFAKKFAKF, KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA 및 KFAKFAKKFAKFAKKFAKFAKKFAKFAK(SEQ ID NOs.:1-7)로부터 선택된 10-100개의 잔기 L-아미노산 또는 D-아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된 용해 도메인을 포함한다.

[0051] 본원에서 사용되는 용어 "컨쥬게이트" 또는 "융합 작제물" 및 이들의 문법적 변형은 작제물이 서로 다르고 통상적으로 자연에서 함께 존재하지 않는 2개의 상이한 분자 존재물로부터 유래되거나, 수득되거나, 분리되거나, 이

들을 기초로 하거나 이후에 모델링되는 부분 또는 구획을 함유하는 것을 의미한다. 즉, 예를 들어, 컨쥬게이트의 제 1 부분은 항체 또는 항체 단편, 또는 항체의 중쇄(H) 및/또는 경쇄(L)를 포함하거나 이들로 구성되고, 컨쥬게이트의 제 2 부분은 용해 부분 또는 도메인을 포함하거나 이들로 구성되며, 제 1 및 제 2 부분/도메인 각각은 구조적으로 다르다. 컨쥬게이트는 "융합 작제물"로 언급될 수 있으며, 상기 컨쥬게이트는 표적에 결합하는 항체 또는 항체 단편, 또는 항체의 중쇄(H) 및/또는 경쇄(L), 및 제 2의 용해 도메인 또는 부분을 포함하거나 이들로 구성된다.

[0052] 컨쥬게이트의 제 1 도메인 및/또는 제 2 (용해) 도메인은 아미노산 서열(펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 렉틴), 핵산(DNA, RNA) 및 탄수화물(당류, 시알산, 갈락토스, 만노스, 푸코스, 아세틸뉴리민산 등)을 포함하거나 이들로 구성된다. 용어 "아미노산 서열", "단백질", "폴리펩티드" 및 "펩티드"는 아미드 결합 또는 동등물에 의해 공유적으로 연결된 2개 이상의 아미노산, 또는 "잔기"를 나타내기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 아미노산 서열은, 예를 들어, 글루타르알데하이드, N-하이드록시숙신이미드 에스테르, 이기능성 말레이미드, 또는 N,N'-디사이클로헥실카르보디이미드(DCC)와 함께 형성된 것을 포함하는 비-자연 및 비-아미드 화학 결합에 의해 연결될 수 있다. 비-아미드 결합은, 예를 들어, 케토메틸렌, 아미노메틸렌, 올레핀, 에테르, 티오에티르 등을 포함한다(예를 들어, 문헌[Spatola in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 7, pp 267-357 (1983), "Peptide and Backbone Modifications," Marcel Decker, NY] 참조).

[0053] 컨쥬게이트 또는 융합 작제물의 제 1 및 제 2 (용해) 도메인은 L-아미노산 서열, D-아미노산 서열 및 L-아미노산 및 D-아미노산의 혼합물을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 제 1 및 제 2 도메인의 아미노산 서열의 컨쥬게이트는 선형 또는 고리형 구조일 수 있고, 또 다른 별개의 모이어티(예를 들어, 제 3, 제 4, 제 5, 제 6, 제 7 등의 도메인)에 추가로 컨쥬게이션될 수 있고, 분자내 또는 분자간 이황화 결합을 형성할 수 있고, 또한 동일하거나 상이한 항체, 중쇄(H), 경쇄(L) 또는 용해 서열을 갖는 다른 컨쥬게이트, 또는 다른 전적으로 다른 분자와 함께 더 높은 차수의 다합체 또는 올리고머(삼합체, 사합체, 오합체, 육합체, 칠합체 등)을 형성할 수 있다.

[0054] 컨쥬게이트의 예시적 길이는 약 10 내지 15개, 15 내지 20개, 20 내지 25개, 25 내지 50개, 50 내지 100개, 100 내지 150개, 150 내지 200개, 또는 200 내지 300개 또는 그 초과의 아미노산 잔기 길이이다. 특정 구체예에서, 제 1 또는 제 2 도메인은 약 1 내지 10개, 10 내지 20개, 15 내지 20개, 20 내지 30개, 30 내지 40개, 40 내지 50개, 60 내지 70개, 70 내지 80개, 80 내지 90개, 90 내지 100개 또는 그 초과의 잔기의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된다. 더욱 특정한 구체예에서, 용해 도메인은 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28개, 또는 그 초과의 잔기의 아미노산 서열, 또는 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 그 초과의 잔기의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된다.

[0055] 컨쥬게이트는 표적(예를 들어, 수용체)에 결합하는 제 1 부분의 항체 또는 항체 단편, 또는 항체의 중쇄(H) 및/또는 경쇄(L), 및 용해 도메인을 포함하거나 이로 구성되는 제 2 부분을 포함하며, 상기 용해 도메인은 양친매성 알파-헬릭스를 형성할 수 있다. 양친매성 알파-헬릭스는 알파-헬릭스의 한 측면에 대부분 친수성 아미노산을 함유하고, 나머지 측면은 대부분 소수성 아미노산을 함유한다. 알파 헬릭스는 3.6개의 잔기마다 완전한 턴(turn)을 만드므로, 양친매성 알파 헬릭스의 아미노산 서열은 3 내지 4개의 잔기마다 친수성 잔기와 소수성 잔기가 번갈아 나타난다. PNNPNNP 반복 패턴 또는 모티프는 양친매성 알파-헬릭스를 형성하는 것으로 예측되며, 여기서 P는 양성으로 하전된 아미노산 잔기이고, N은 중성 아미노산 잔기이다. PNNPNNP 반복 패턴은 음성으로 하전된 세포막과 상호작용하는 용해 펩티드에 대한 양이온성 결합 부위 및 막 상호작용/침투를 위한 소수성 부위를 제공한다. 따라서, 컨쥬게이트는 양친매성 알파-헬릭스를 형성할 수 있는 하나 이상의 연속된 PNNPNNP 반복 패턴 또는 모티프, 또는 하나 이상의 불연속 PNNPNNP 반복 패턴 또는 모티프를 갖는 용해 도메인을 갖는 것을 포함한다. 예를 들어, 15 또는 18개의 잔기의 아미노산 서열, 예를 들어, KFAKFAKKFAKFAKK(SEQ ID NO.:1) 및 KFAKFAKKFAKFAKKFAK(SEQ ID NO.:4)가 연속 및 불연속 PNNPNNP 반복 모티프를 갖는다.

[0056] 본원에 개시된 바와 같이, 컨쥬게이트는 표적에 결합하는 항체 및 항체 단편을 포함한다. "항체"는 임의의 모노클로날 또는 폴리클로날 면역글로불린 분자, 예를 들어, IgM, IgG, IgA, IgE, IgD, 및 이의 임의의 서브클래스를 나타낸다. IgG에 대한 예시적 서브클래스는 IgG_1, IgG_2, IgG_3 및 IgG_4, 예를 들어, 조작된 항체 서브클래스 및 다양한 당화 패턴을 갖는 재조합 항체이다.

[0057] 컨쥬게이트는 또한 표적에 결합하는 항체의 중쇄(H) 또는 경쇄(L), 또는 항체의 중쇄(H) 또는 경쇄(L)의 단편을 포함한다. 상기 컨쥬게이트는 표적에 결합하는 항체의 복수의 중쇄(H) 및/또는 경쇄(L), 또는 항체의 중쇄(H) 및/또는 경쇄(L)의 단편을 가질 수 있다.

[0058] 항체 단편, 항체의 중쇄(H) 및/또는 경쇄(L)의 단편은 과가변(표적 결합) 영역, 또는 표적 결합을 제공하기에 충분한 항체의 중쇄(H) 및/또는 경쇄(L) 내의 상보성 결정 영역(CDR) 또는 프레임워크 영역(FR) 중 어느 하나 또는 전부를 포함한다. 항체 단편의 특정한 비제한적인 예는 Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, Fd, 단일쇄 Fv(scFv), 이황화-결합된 Fvs(sdFv), V_L, V_H, 낙타 Ig, V-NAR, VHH, 삼중특이적(Fab_3), 이중특이적(Fab_2), 디아바디(diabody)($(V_L-V_H)_2$ 또는 $(V_H-V_L)_2$), 트리아바디(triabody)(3가), 테트라바디(tetrabody)(4가), 미니바디(minibody)($(scF_V-C_H3)_2$), 이중특이적 단일쇄 Fv(Bis-scFv), IgGdeltaCH2, scFv-Fc, $(scFv)_2$-Fc, 어피바디(affibody)(예를 들어, ZHer2-neu:2, ZHer2-neu:4 ZHer2-neu:7 ZHer2-neu:8), 앱타머(aptamer), 아비머(avimer) 또는 나노바디(nanobody)를 포함한다.

[0059] 항체, 항체의 중쇄(H) 및 경쇄(L), 및 이들의 단편은 세포, 예를 들어, B 세포에 의해 생성되거나 세포, 예를 들어, B 세포에서 발현되거나, 다른 세포, 예를 들어, CHO 세포에 의해 생성되도록 합성되거나 조작된 것을 포함한다. 상기 항체, 항체의 중쇄(H) 및 경쇄(L), 및 이들의 단편은 개선된 특징, 예를 들어, 증가된 혈청 안정성 및/또는 생체내 반감기, PK 등을 갖는 것을 포함한다(예를 들어, 문헌[Antibody Engineering Vol 1, Konterman R and Duebel S, eds., 2010, Springer, WO 2006/130834 and Horton et al., Cancer Res 68:8049 (2008)]에 기재된 바와 같음). Fc에서의 비제한적인 돌연변이는, 예를 들어, I253A, H310A, H435R, H435Q, G236R, L328R, S239D, I332E를 포함한다. IgG1에서의 비제한적인 돌연변이는 Fc 영역의 잔기 238, 252, 253, 254, 255, 256, 265, 272, 289, 288, 303, 305, 307, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 400, 413, 415, 424, 433, 434, 435, 439 및/또는 477에 존재할 수 있다.

[0060] 항체, 항체의 중쇄(H) 및 경쇄(L), 및 이들의 단편은 표적에 결합한다. 표적의 특정한 비제한적인 예는 아미노산 서열(예를 들어, 폴리펩티드, 펩티드, 단백질), 다당류, 올리고당류, 탄수화물, 및 지질을 포함한다. 표적의 특정한 비제한적인 부류는 수용체 및 항원을 포함한다. 상기 표적은 세포에 의해 또는 세포 상(예를 들어, 세포막 상)에서 발현될 수 있다.

[0061] 표적은 호르몬, 성장 인자, 호르몬 및 성장 인자 유사체, 및 호르몬, 호르몬 유사체, 성장 인자, 성장 인자 유사체의 단편, 및 성장 인자 및 유사체의 단편에 결합하는 수용체를 포함한다. 수용체 표적의 특정한 비제한적인 예는 Her2/neu(ErbB-2로도 공지된 인간 표피 성장 인자 수용체 2), 황체형성 호르몬 분비 호르몬 수용체(LHRH-R), 표피 성장 인자 수용체(EGF-R), 폴레이트-, 및 성장 호르몬(GH) 수용체를 포함한다. 수용체 표적의 추가의 특정한 비제한적인 예는 종양 괴사 인자(TNF) 패밀리 일원 수용체(예를 들어, TNF-알파, TNF-베타(림프독소, LT), TRAIL, Fas, LIGHT, 또는 4-1BB) 또는 온코페토프로테인(oncofetoprotein)(5T4)을 포함한다. 수용체 표적의 추가의 특정한 비제한적인 예는 면역글로불린-유사 수용체(예를 들어, CD19, CD20, CD22, CD23, CD27, CD28, CD30, CD31, CD33, CD34, CD40, CD52, CD56, CD70, CD123, CD138, CD123, CD138, 또는 CD154), 또는 다른 수용체(예를 들어, 호르몬 수용체, 사이토카인 수용체, 성장 인자 수용체, 또는 케모카인 수용체)를 포함한다.

[0062] 항원 표적은 바이러스, 박테리아, 진균 및 기생충 항원을 포함한다. 항원 표적은 또한 종양 관련 항원(TAA)을 포함한다. TAA 표적의 특정한 비제한적인 예는 암배아 항원(CEA), 알파-태아단백질(AFP), 전립선 특이적 항원(PSA), 전립선 특이적 막 항원(PSMA), CA-125(상피성 난소암), 가용성 인터루킨-2(IL-2) 수용체, RAGE-1, 티로시나제, MAGE-1, MAGE-2, NY-ESO-1, Melan-A/MART-1, 당단백질(gp) 75, gp100, 베타-카테닌, PRAME, MUM-1, ZFP161, 유비퀼린-1, HOX-B6, YB-1, 오스테오넥틴(Osteonectin), ILF3, IGF-1, 온코페토프로테인, 황체형성 호르몬 분비 호르몬 수용체(LHRH-R), 성장 호르몬 수용체, 포스파티딜세린, 소포 자극 호르몬 수용체, VGEF 수용체, 폴레이트 수용체, CD19, CD20, CD22, CD23, CD27, CD28, CD30, CD31, CD33, CD34, CD40, CD52, CD56, CD70, CD123, CD138, 또는 CD154를 포함한다.

[0063] 본원에 개시된 바와 같은 수용체, 예를 들어, Her2/neu 또는 CD20은 통상적으로 세포에 의해 발현되거나, 세포 상(예를 들어, 막 수용체) 또는 세포 내에 존재한다. 수용체, 예를 들어, Her2/neu는 세포막 표면과 회합될 수 있거나, 세포막을 가로지를 수 있다. CD20은 통상적으로 내재화되지 않고, B 세포 및 B-세포 악성종양의 표면에서 발현된다. 따라서, 수용체는 세포외, 막횡단 또는 세포질 부분을 함유하는 전장의 온전한 자연 수용체, 뿐만 아니라 이의 트렁케이션된 형태 또는 단편(예를 들어, 수용체의 세포외, 막횡단 또는 세포질 부분 또는 하위서열, 예를 들어, 단독이거나 조합된 Her2/neu)을 포함한다. 예를 들어, 가용성 수용체, 예를 들어, Her2/neu에는 통상적으로 막횡단 영역이 결핍되어 있으며, 임의로 또한 자연 세포외 또는 세포질 영역의 전부 또는 일부(자연 수용체에 존재시, 예를 들어, Her2/neu)가 결핍되어 있을 수 있다. 상기 트렁케이션된 형태 및

단편은 컨쥬게이트에 대한 적어도 부분적인 결합을 보유할 수 있다.

[0064] 예시적 항체, 중쇄(H), 경쇄(L), 및 이들의 단편은 수용체에 존재하는 에피토프에 결합하는 것을 포함한다. 항체, 항체의 중쇄(H) 또는 경쇄(L), 또는 이들의 단편이 결합하는 예시적 Her2/neu 에피토프는 HER-2 (p5-13) A2, HER-2 (p8-16) A24, HER-2 (p48-56) A2, HER-2 (p63-71) A24, HER-2 (p106-114) A2, HER-2 (p369-377) A2, A3, A26, HER-2 (p435-443) A2, HER-2 (p654-662) A2, HER-2 (p665-673) A2, HER-2 (p689-697) A2, HER-2 (p754-762) A3, A11, A33, HER-2 (p773-782) A2, HER-2 (p780-788) A24, HER-2 (p785-794) A2, HER-2 (p789-797) A2, HER-2 (p799-807) A2, HER-2 (p952-961) A2 및 HER-2 (p1023-1032) A2 (Her2/neu 에피토프의 아미노산 위치 번호는 "p" 뒤에 아라비아 숫자에 의해 언급됨)를 포함한다.

[0065] Her2/neu에 결합하는 예시적 항체는 미국 특허 번호 5,821,337호에 기재된 바와 같은 인간화 항-ErbB2 항체 huMAb4D1-1, huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 및 huMAb4D5-8(HERCEPTIN™); 미국 특허 번호 7,097,840호에 기재된 바와 같은 인간화 520C9(WO 93/21319) 및 인간화 2C4(퍼투주맙) 및 US2009/0285837A1호에 기재된 바와 같은 퍼투주맙 변이체를 포함한다. Her2/neu에 결합하는 비제한적인 대표적 항체, 중쇄(H), 경쇄(L), 및 이들의 단편은 표 A에 기재되어 있다.

[0066] **표 A** (SEQ ID NOs.:12-39)

[0067] huMAb4D5-1:

[0068] V_L (경쇄):

[0069]
```
1               10                  20                  30                  40
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPG
            50                  60                  70                  80
KAPKLLIYSASFLESGVPSRFS GSGSGTDFTLTISS LQPEDF
        90                  100
ATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK
```

[0070] V_H (중쇄):

[0071]
```
1               10                  20                  30                  40
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP
            50                  60                  70                  80
GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ
        90                  100                 110                 120
MNSLRAEDTAVYYCARWGGDGFYAMDVWGQGTLVTVSS
```

[0072] huMAb4D5-2:

[0073] V_L (경쇄):

[0074]
```
1               10                  20                  30                  40
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPG
            50                  60                  70                  80
KAPKLLIYSASFLESGVPSRFS GSGSGTDFTLTISS LQPEDF
        90                  100
ATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK
```

[0075] V_H (중쇄):

[0076]
```
1               10                  20                  30                  40
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP
            50                  60                  70                  80
GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADDSKNTLYLQ
        90                  100                 110                 120
MNSLRAEDTAVYYCARWGGDGFYAMDVWGQGTLVTVSS
```

[0077] huMAb4D5-3:

[0078] V_L (경쇄):

```
1               10                  20                  30                  40
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPG
            50                  60                  70                  80
KAPKLLIYSASFLESGVPSRFS GSGSGTDFTLTISS LQPEDF
        90                  100
ATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK
```

[0079]

[0080] V_H (중쇄):

```
1               10                  20                  30                  40
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP
            50                  60                  70                  80
GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ
        90                  100                 110                 120
MNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDVWGQGTLVTVSS
```

[0081]

[0082] huMAb4D5-4:

[0083] V_L (경쇄):

```
1               10                  20                  30                  40
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPG
            50                  60                  70                  80
KAPKLLIYSASFLESGVPSRFS GSRSGTDFTLTISS LQPEDF
        90                  100
ATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK
```

[0084]

[0085] V_H (중쇄):

```
1               10                  20                  30                  40
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP
            50                  60                  70                  80
GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTLYLQ
        90                  100                 110                 120
MNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDVWGQGTLVTVSS
```

[0086]

[0087] huMAb4D5-5:

[0088] V_L (경쇄):

```
1               10                  20                  30                  40
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPG
            50                  60                  70                  80
KAPKLLIYSASFLESGVPSRFS GSRSGTDFTLTISS LQPEDF
        90                  100
ATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK
```

[0089]

[0090] V_H (중쇄):

```
1               10                  20                  30                  40
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP
            50                  60                  70                  80
GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ
        90                  100                 110                 120
MNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDVWGQGTLVTVSS
```

[0091]

[0092] huMAb4D5-6:

[0093] V_L (경쇄):

```
1               10                  20                  30                  40
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPG
            50                  60                  70                  80
KAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSRSGTDFTLTISS LQPEDF
            90                  100
ATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK
```

[0094]

[0095] V_H (중쇄):

```
1               10                  20                  30                  40
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP
            50                  60                  70                  80
GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ
            90                  100                 110                 120
MNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDVWGQGTLVTVSS
```

[0096]

[0097] huMAb4D5-7:

[0098] V_L (경쇄):

```
1               10                  20                  30                  40
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPG
            50                  60                  70                  80
KAPKLLIYSASFLESGVPSRFS GSRSGTDFTLTISS LQPEDF
            90                  100
ATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK
```

[0099]

[0100] V_H (중쇄):

```
1               10                  20                  30                  40
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP
            50                  60                  70                  80
GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ
            90                  100                 110                 120
MNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
```

[0101]

[0102] huMAb4D5-8:

[0103] V_L (경쇄):

```
1               10                  20                  30                  40
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPG
            50                  60                  70                  80
KAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSRSGTDFTLTISS LQPEDF
            90                  100
ATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK
```

[0104]

[0105] V_H (중쇄):

```
1               10                  20                  30                  40
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP
            50                  60                  70                  80
GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ
            90                  100                 110                 120
MNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
```

[0106]

[0107] huMAb4D5:

[0108] V_L (경쇄):

```
1               10                  20                  30                  40
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPG
            50                  60                  70                  80
KAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSRSGTDFTLTISS LQPEDF
            90                  100
ATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK
```

[0109]

[0110] V_H (중쇄):

```
1               10                  20                  30                  40
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP
            50                  60                  70                  80
GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ
            90                  100                 110                 120
MNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
```

[0111]

[0112] 항체 서열 과돌연변이(permutation)(미국 특허 번호 7,435,797호 SQ 1 및 2))

[0113] huMAb4D5:

[0114] V_L (경쇄):

```
1               10                  20                  30                  40
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPG
            50                  60                  70                  80
KAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSRSGTDFTLTISS LQPEDF
            90                  100
ATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK
```

[0115]

[0116] V_H (중쇄):

```
1               10                  20                  30                  40
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP
            50                  60                  70                  80
GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ
            90                  100                 110                 120
MNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
```

[0117]

[0118] huMAb4D5-8

[0119] (VL에 대해: Q27, D28, N30, T31, A32, Y49, F53, Y55, R66 H91, Y92, T94; VH에 대해: W95, D98, F100, Y100, Y102):

[0120] V_L (경쇄): 청구항 1 돌연변이

```
1               10                  20                  30                  40
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSSAVAWYQQKPG
            50                  60                  70                  80
KAPKLLID/WSASFLYSGVPSRFS GSRSGTDFTLTISS LQPEDF
            90                  100
ATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK
```

[0121]

[0122] V_H (중쇄):

```
1               10                  20                  30                  40
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP
            50                  60                  70                  80
GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ
            90                  100                 110                 120
MNSLRAEDTAVYYCSRWGGWGPK/LAMDYWGQGTLVTVSS
```

[0123]

[0124] 퍼투주맙 서열(US 2010/0015157A1)

[0125] V_L (경쇄):

```
1               10                  20                  30                  40
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPG
            50                  60                  70                  80
KAPKLLIYSASYRYTGVPSRFS GSGSGTDFTLTISS LQPED
            90                  100                 110                 120
FATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
        130                 140                 150                 160
LKSGTASVVCLLNNNFYPREAKVQWKVDNALQSGENSQES
            170                 180                 190                 200
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
        210
PVTKSFNRGEC
```

[0126]

[0127] V_H (중쇄):

```
1               10                  20                  30                  40
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQA
            50                  60                  70                  80
PGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYL
            90                  100                 110                 120
QMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSSAST
            130                 140                 150                 160
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
            170                 180                 190                 200
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
        210                 220                 230                 240
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
        250                 260                 270                 280
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
    290                 300                 310                 320
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
    330                 340                 350                 360
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
370                 380                 390                 400                 410
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
                420                 430                 440
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
```

[0128]

[0129] 퍼투주맙 변이체(US2009/0285837 A1)

[0130] V_L (경쇄):

```
1               10                  20                  30                  40
VHSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQ
            50                  60                  70                  80
KPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
            90                  100                 110                 120
EDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
        130                 140                 150                 160
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
        170                 180                 190                 200
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
        210
PVTKSFNRGEC
```

[0131]

[0132] V_H (중쇄):

```
1               10                  20                  30                  40
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQA
                50                  60                  70                  80
PGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYL
                90                  100                 110                 120
QMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSSAS
            130                 140                 150                 160
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
        170                 180                 190                 200
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV
    210                 220                 230                 240
NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLV
250                 260                 270                 280
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
290                 300                 310                 320
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
330                 340                 350                 360
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
370                 380                 390                 400
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
410                 420                 430                 440
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALNHYTQKSLSLSPGK
```

[0133]

[0134] 퍼투주맙 서열: 인간화 2C4, 7C2, 7F3, 7D3, 3E8, 4D5, 2H11, 3H4 (미국 특허 번호 7,097,840호)

[0135] V_L (경쇄):

```
1               10                  20                  30                  40
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPG
            50                  60                  70                  80
KAPKLLIYSASYRYTGVPSRFS GSGSGTDFTLTISS LQPED
            90                  100                 110                 120
FATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
        130                 140                 150                 160
LKSGTASVVCLLNNNFYPREAKVQWKVDNALQSGENSQES
            170                 180                 190                 200
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
        210
PVTKSFNRGEC
```

[0136]

[0137] V_H (중쇄):

```
1               10                  20                  30                  40
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQA
                50                  60                  70                  80
PGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYL
            90                  100                 110                 120
QMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSSAST
            130                 140                 150                 160
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
        170                 180                 190                 200
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
    210                 220                 230                 240
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
250                 260                 270                 280
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
290                 300                 310                 320
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
330                 340                 350                 360
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
370                 380                 390                 400                 410
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
                420                 430                 440
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
```

[0138]

[0139] 다양한 특성을 갖는 추가 항-ErbB2 항체가 문헌[Tagliabue et al. *Int. J. Cancer* 47:933-937 (1991); McKenzie et al. *Oncogene* 4:543 (1989); Maier et al. *Cancer Res.* 51:5361 (1991); Bacus et al. *Molecular*

Carcinogenesis 3:350 (1990); Stancovski et al. *PNAS (USA)* 88:8691 (1991); Bacus et al. *Cancer Research* 52:2580 (1992); Xu et al. *Int. J Cancer* 53:401-408 (1993); WO 94/00136; Kasprzyk et al. *Cancer Research* 52:2771 (1992); Hancock et al. *Cancer Res.* 51:4575 (1991); Shawver et al. *Cancer Res.* 54:1367 (1994); Arteaga et al. *Cancer Res.* 54:3758 (1994); Harwerth et al. *J Biol Chem.* 267:15160 (1992); U.S. Patent No. 5,783,186; 및 Klapper et al. *Oncogene* 14:2099 (1997)]에 기재되어 있다. 상기 항체, 항체의 중쇄(H) 및/또는 경쇄(L), 및 이들의 단편을 기초로 한 컨쥬게이트가 본 발명에 포함된다.

[0140] 본원에 개시된 바와 같이, 표적(예를 들어, 수용체)에 결합하는 다른 스캐폴드 유사 구조가 본 발명의 컨쥬게이트에 포함될 수 있다. 상기 구조는 어피바디, 앱타머, 아비머 및 나노바디를 포함한다. 상기 어피바디, 앱타머, 아비머 및 나노바디를 포함하는 컨쥬게이트가 또한 본 발명에 포함된다.

[0141] 예시적 Her2/neu 결합 어피바디는 ZHer2-neu:2, ZHer2-neu:4 ZHer2-neu:7 ZHer2-neu:8 및 Fab63을 포함하며, 상기 어피바디 서열은 표 B에 기재된다.

[0142] **표 B** (SEQ ID NOs.:40-47)

[0143]

Z_{wt}	VDNKFNK EQQNAFYEILH LPNLNE EQRNAFIQSLKD DPSQ SANLLAEAKKLNDA QAPK
$Z_{her2:4}$	VDNKFNK ELRQAYWEIQA LPNLNW TQSRAFIRSLYD DPSQ SANLLAEAKKLNDA QAPK
$Z_{her2:7}$	VDNKFNK EPKTAYWEIVK LPNLNP EQRRAFIRSLYD DPSQ SANLLAEAKKLNDA QAPK
$Z_{her2:24}$	VDNKFNK EPREAYWEIQR LPNLNN KQKAAFIRSLYD DPSQ SANLLAEAKKLNDA QAPK
$Z_{her2:79}$	VDNKFNK EWMTAGKEIYR LPNLNG TQVRAFIQSLSD DPSQ SANLLAEAKKLNDA QAPK
$Z_{her2:2}$	VDNKFNK EWVQAGSEIYN LPNLNR AQMRAFIRSLSD DPSQ SANLLAEAKKLNDA QAPK
$Z_{her2:8}$	VDNKFNK EIKQAFHEIVR LPNLNA DQVRAFIYSLGD DPSQ SANLLAEAKKLNDA QAPK
$Z_{her2:25}$	VDNKFNK EMVDAGAEIWR LPNLNA KQM*AFIDSLGD DPSQ SANLLAEAKKLNDA QAPK

[0144] CD20 표적화 항체는 문헌[Teeling et al. (US 2004/0167919)]에 기재된 바와 같은 리툭시맙(Rituximab), 오파투무맙(Ofatumumab)(Arzerra®), 토시투무맙(Tositumumab)(GSK), 이브리투모맙(Ibritumomab)(IDEC)(참고문헌[Ivanov 2008]), 2F2(HuMax-CD20), 7D8, IgM2C6, IgG1 2C6, 11B8, B1, 2H7, LT20, 1F5 및 AT80을 포함한다. 예시적 항-CD20 V_L 및 V_H 사슬 및 완전한 항체가 하기 표 C에 기재되어 있다(**굵은** 글자체는 각각의 상보성 결정 영역, CDR, 각각의 사슬에 대해, CDR1, CDR2 및 CDR3를 나타낸다):

[0145] **표 C** (SEQ ID NOs.:48-69)

[0146] V_L (경쇄):

[0147] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSSVSYIH**WYQQKPGKAPKLLIY**ATSNLAS**GVPSRFSGS
RSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ**WTSN**PPTFGQGTKVEIK

[0148] V_H (중쇄):

[0149] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFT**SYNMH**WVRQAPGKGLEWVA**AIYPGNGDTSY**
NQKFKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR**STYYGGDWYFDV**WGQGTLVTVS
S

[0150] Rituxan® V_L 및 V_H 사슬:

[0151] V_L (경쇄):

[0152] QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTC**RASSSVSYIH**WFQQKPGSSPKPWIY**ATSNLAS**GVPVRFSGS
GSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQ**WTSN**PPTFGGGTKLEIK

[0153] V_H (중쇄):

[0154] QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFT**SYNMH**WVKQTPGRGLEWIG**AIYPGNGDTSY**
NQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR**STYYGGDWYFNV**WGAGTTVTVS

[0155] 이브리투모맙(Ibritumomab)(IDEC)

[0156] V_L (경쇄):

[0157] QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTC**RASSSVSYMH**WYQQKPGSSPKPWIY**APSNLAS**GVPARFSG
SGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQ**WSFN**PPTFGAGTKLELK

[0158] V_H (중쇄):

[0159] QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFT**SYNMH**WVKQTPRQGLEWIG**AIYPGNGDTSY**
NQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAR**VVYYSNSYWYFDV**WGTGTTVTVS

[0160] 토시투모맙(Tositumomab): >마우스-인간 키메라 항-CD20(이브리투모맙과 동일한 V 도메인 - 이들은 불변 영역만 상이하다)

[0161] V_L (경쇄):

[0162] QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTC**RASSSVSYMH**WYQQKPGSSPKPWIY**APSNLAS**GVPARFSG
SGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQ**WSFN**PPTFGAGTKLELK

[0163] V_H (중쇄):

[0164] QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFT**SYNMH**WVKQTPRQGLEWIG**AIYPGNGDTSY**
NQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAR**VVYYSNSYWYFDV**WGTGTTVTVS

[0165] 2C6 US7850962 B2 (Teeling et al)

[0166] V_H (중쇄):

[0167] AVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFGDYTM**H**WVRQAPGLGLEWVSGISWNSGSIGYAD
SVLGRFTISRDNALNSLYLQMNSLRAEDTALYYCTLDNQYGSGSTYGLGVWGQGTLVTVSS

[0168] V_L (경쇄):

[0169] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS
GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGGGTKVEIL

[0170] 2F2 US2004/0167319A1 (Teeling et al)

[0171] V_H (중쇄):

[0172] MFLGLSWIFLLAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTF**NDYAMH**WVRQAPGK
GLEWVS**TISWNSGSIGYADSVKG**RFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAK**DIQYGN**
YYYGMDVWGQGTTVTVSS

[0173] V_L (경쇄):

[0174] MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSC**RASQSVSSYLA**WYQQKPGQA
PRLLIY**DASNRAT**GIPARFSGSGSTDFTLTISSLEPEDFAVYYC**QQRSNWPIT**FGQGTRLEIK

[0175] 11B8 US2004/0167319A1 (Teeling, et al.)

[0176] V_H (중쇄):

[0177] MELGLSWVFLVAILKGVQCEVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCTGSGFTF**SYHAMH**WVRQAP
GKGLEWVS**IIGTGGVTYYADSVKG**RFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDMAVYYCAR**DYYG**
AGSFYDGLYGMDVWGQGTTVTVSS

[0178] V_L (경쇄):

[0179] MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSC**RASQSVSSYLA**WYQQKPGQA
PRLLIY**DASNRAT**GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC**QQRSDWPLT**FGGGTKVEIK

[0180] 7D8 US2004/0167319A1 (Teeling et al)

[0181] V_H (중쇄):

[0182] MELGLSWIFLLAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPDRSLRLSCAASGFTFHDYAMHWVRQAPGK
GLEWVSTISWNSGTIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNY
YYGMDVWGQGTTVTVSS

[0183] V_L (경쇄):

[0184] MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP
RLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIK

[0185] **전체 항체 약물 서열:**

[0186] 이브리투모맙(IDEC)(참고문헌[Ivanov 2008])

[0187] 마우스 항-CD20 중쇄 1:

[0188] QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPRQGLEWIGAIYPGNGDTSYN
QKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARVVYYSNSYWYFDVWGTGTTVTVSA
PSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVT
VTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLM
ISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMS
GKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIY
VEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTK
SFSR

[0189] 마우스 항-CD20 경쇄 1:

[0190] QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMHWYQQKPGSSPKPWIYAPSNLASGVPARFSGS
GSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGAGTKLELKRADAAPTVFIFPPSDEQLKSGT
ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFN

[0191] **리툭시맙**

[0192] 중쇄 키메라:

[0193] QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYN
QKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

[0194] 경쇄 키메라:

[0195] QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSG
SGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA
CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0196] **토시투무맙**

[0197] 마우스-인간 키메라 항-CD20 중쇄 1:

QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPRQGLEWIGAIYPGNGDTSYN
QKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARVVYYSNSYWYFDVWGTGTTVTVSG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
[0198] QKSLSLSPGK

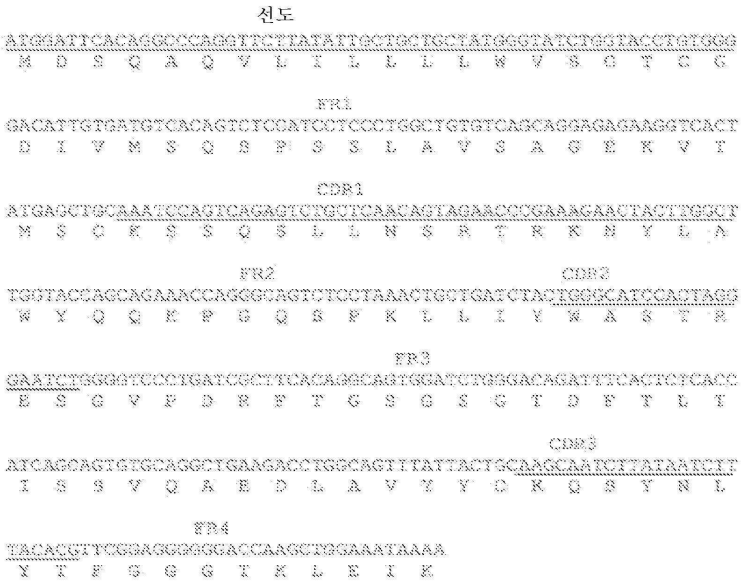
[0199] 마우스-인간 키메라 항-CD20 경쇄 1:

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMHWYQQKPGSSPKPWIYAPSNLASGVPARFSGS
GSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
[0200] YACEVTHQGLSSPVTKSFNR

[0201] 비제한적인 예시적 항-황체형성 호르몬 분비 호르몬 수용체(LHRH-R) 항체 경쇄(V_L) 및 중쇄(V_H) 서열이 표 D에 기재되어 있다:

[0202] **표 D** (SEQ ID NOs.:70-73)

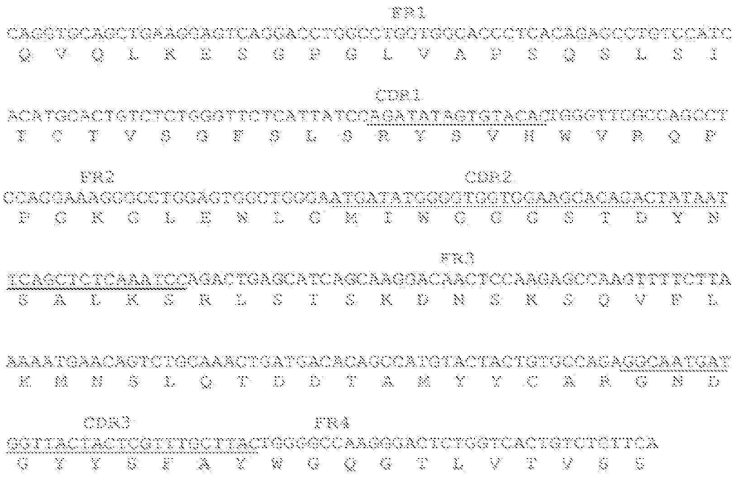
[0203] (A) GHR-106의 면역글로불린 경쇄(κ)



[0204]

[0205] **도 1A**

[0206] (B) GHR-106의 면역글로불린 중쇄



[0207]

[0208] **도 1B**

[0209] 본 발명은 항체, 중쇄(H), 경쇄(L), 또는 이들의 단편 부분, 용해 도메인, 또는 컨쥬게이트의 임의의 다른 도메인 내에 컨쥬게이트의 아미노산 변형(예를 들어, 보존성 또는 비-보존성 치환, 첨가 또는 결실)과 같은 변형 또는 변화를 포함한다. 따라서, 항체, 항체 중쇄(H), 항체 경쇄(L), 이들의 단편, 또는 용해 도메인의 하나 이상의 잔기의 변형을 포함하는 컨쥬게이트는 변형 또는 변화가 표적 결합 및/또는 용해 활성을 파괴하지 않는 한 임의의 수의 변형 또는 변화를 포함할 수 있다. 따라서, 예를 들어, 표적, 예를 들어, 수용체(예를 들어, Her2/neu 또는 CD20)에 결합하는 변형된 항체, 중쇄(H), 경쇄(L), 또는 이들의 단편은 적어도 부분적 표적(수용체) 결합을 보유할 수 있거나, 변형된 용해 도메인은 적어도 부분적 용해 활성, 예를 들어, 세포 사멸 또는 아폽토시스를 보유할 수 있다.

[0210] "보존성 치환"은 하나의 아미노산의 생물학적, 화학적 또는 구조적으로 유사한 잔기에 의한 대체이다. 생물학적으로 유사하다는 것은 치환이 생물학적 활성, 예를 들어, 용해 활성과 양립되는 것을 의미한다. 구조적으로 유사하다는 것은 아미노산이 알라닌, 글리신 및 세린과 같이 유사한 길이를 갖거나, 유사한 크기를 갖는 측쇄를 갖거나, 제 1, 제 2 또는 추가 도메인의 구조가 양친매성 알파 헬릭스과 같이 유지됨을 의미한다. 화학적 유사성은 잔기가 동일한 전하를 갖거나 친수성 또는 소수성 둘 모두임을 의미한다. 특정 예로는 이소류신, 발린, 류신 또는 메티오닌과 같은 하나의 소수성 잔기의 다른 소수성 잔기로의 치환, 또는 하나의 극성 잔기의 다른 극성 잔기로의 치환, 예를 들어, 리신 대신 아르기닌, 아스파르트산 대신 글루탐산, 또는 아스파라긴 대신 글루타민, 트레오닌 대신 세린의 치환 등을 포함한다. 통상적인 검정을 이용하여 컨쥬게이트 변이체가 활성, 예를 들어, 표적 결합 활성 또는 용해 활성을 갖는 지를 결정할 수 있다.

[0211] 따라서, 변형 및 변화는 본원에 기재된 다양한 서열, 예를 들어, 항체, 항체의 중쇄(H) 및 경쇄(L), 및 이들의 단편, 뿐만 아니라 용해 도메인(또는 존재시 추가 도메인)의 다양한 서열의 변형 및 변화를 포함한다. 용해 도메인의 비제한적인 변형은 KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAKKFAKFAKKF, KFAKFAKKFAKFAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKFAKKFAKFAKKFAKF, KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA 및 KFAKFAKKFAKFAKKFAKFAKKFAKFAK(SEQ ID NOs.:1-7), 또는 상기 용해 도메인을 포함하거나 이로 구성되는 서열이다.

[0212] 특정 구체예에서, 항체, 중쇄(H), 경쇄(L), 이들의 단편, 또는 용해 도메인의 하위서열은 참조 서열과 동일한 적어도 1 내지 5개, 5 내지 10개, 10 내지 15개, 15 내지 20개, 20 내지 25개, 25 내지 30개, 30 내지 35개, 35 내지 40개, 40 내지 50개, 50 내지 60개, 60 내지 70개, 70 내지 80개, 80 내지 90개, 90 내지 100개, 또는 그 초과의 아미노산 잔기를 갖는다. 추가의 특정 구체예에서, 항체, 중쇄(H), 경쇄(L), 이들의 단편, 및/또는 용해 도메인의 하나 이상의 아미노산(예를 들어, 1-3개, 3-5개, 5-10개, 10-20개, 20-30개, 또는 그 초과)의 치환 또는 결실은 참조 서열(예를 들어, 항체, 중쇄(H), 경쇄(L), 이들의 단편, 또는 용해 도메인, 예를 들어, KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAKKFAKFAKKF, KFAKFAKKFAKFAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKFAKKFAKFAKKFAKF, KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA 또는 KFAKFAKKFAKFAKKFAKFAKKFAKFAK(SEQ ID NOs.:1-7))과 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 그 초과의 동일성을 갖는 서열을 가질 수 있다.

[0213] 특정 구체예에서, 컨쥬게이트는 표적(예를 들어, 수용체, 예를 들어, Her2/neu 또는 CD20)에 결합하는 항체, 중

쇄(H), 경쇄(L), 또는 이들의 단편, 및 K 잔기 중 하나 이상이 F 또는 L 잔기로 치환되거나, F 잔기 중 하나 이상이 K, A 또는 L 잔기로 치환되거나, A 잔기 중 하나 이상이 K, F 또는 L 잔기로 치환된 KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAKKFAKFAKKF, KFAKFAKKFAKFAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKFAKKFAKFAKKFAKF, KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA 또는 KFAKFAKKFAKFAKKFAKFAKKFAKFAK(SEQ ID NOs.:1-7)와 같이 기재된 L-아미노산 또는 D-아미노산 서열을 포함하거나 이들로 구성된 제 2 용해 도메인을 포함한다. 또 다른 특정 구체예에서, 컨쥬게이트는 표적(예를 들어, 수용체, 예를 들어, Her2/neu 또는 CD20)에 결합하는 항체, 중쇄(H), 경쇄(L), 또는 이들의 단편, 및 K 잔기 중 하나 이상이 F 또는 L 잔기로 치환되거나, F 잔기 중 하나 이상이 K, A 또는 L 잔기로 치환되거나, A 잔기 중 하나 이상이 K, F 또는 L 잔기로 치환된 KFAKFAKKFAKFAKK, KFAKFAKKFAKFAKKF, KFAKFAKKFAKFAKKFA, KFAKFAKKFAKFAKKFAK, KFAKFAKKFAKFAKKFAKF, KFAKFAKKFAKFAKKFAKFA 및 KFAKFAKKFAKFAKKFAKFAKKFAKFAK(SEQ ID NOs.:1-7)(예를 들어, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28개의 잔기 길이)로부터 선택된 L-아미노산 또는 D-아미노산 서열로부터 선택된 L-아미노산 또는 D-아미노산 서열로 구성되는 제 2 도메인을 포함한다.

[0214] 용어 "동일성" 및 "상동성" 및 이의 문법상의 변형은 2개 이상의 언급된 존재물이 동일함을 의미한다. 따라서, 두 아미노산 서열이 동일한 경우, 이들은 동일한 아미노산 서열을 지닌다. "동일성 구역, 영역 또는 도메인"은 2개 이상의 언급된 존재물의 부분이 동일함을 의미한다. 따라서, 2개의 아미노산 서열이 하나 이상의 서열 영역에 걸쳐 동일하거나 상동인 경우, 이들은 이러한 영역에서 동일성을 공유한다. 핵산 서열에 관하여 사용될 때 용어 "상보적인"은 언급된 영역이 100% 상보적이고, 즉 미스매치 없이 100% 염기쌍 형성을 나타냄을 의미한다.

[0215] 구조적 및 기능적으로 관련된 단백질 사이에 서열 보존량의 변화로 인해, 기능 또는 활성(예를 들어, 표적 결합 또는 용해)을 보유하는데 요구되는 서열 동일성 양은 단백질, 영역 및 기능 또는 그 영역의 활성에 의존적이다. 예를 들어, 용해 펩티드 서열에 대해, 다수의 PNNPNNP 서열 반복 패턴 또는 모티프가 존재할 수 있으나, 하나 이상의 연속된 또는 불연속 PNNPNNP 서열 반복 패턴 또는 모티프가 존재할 필요는 없다.

[0216] 2개의 서열 사이의 동일성의 정도는 당 분야에 공지된 컴퓨터 프로그램 및 수학적 알고리듬을 이용하여 확인될 수 있다. 퍼센트 서열 동일성(상동성)을 계산하는 이러한 알고리듬은 일반적으로 비교 영역 상에서 서열 갭 및 미스매치를 설명한다. 예를 들어, BLAST(예를 들어, BLAST 2.0) 검색 알고리듬(예를 들어, 문헌[Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403 (1990)] 참조, NCBI를 통해 공개적으로 이용가능함)은 하기와 같은 예시적인 검색 파라미터를 지닌다: 미스매치 -2; 갭 오픈 5; 갭 연장 2. 폴리펩티드 서열 비교를 위해, BLASTP 알고리듬은 통상적으로 PAM100, PAM 250, BLOSUM 62 또는 BLOSUM 50과 같은 스코어링 매트릭스와 함께 사용된다. FASTA(예를 들어, FASTA2 및 FASTA3) 및 SSEARCH 서열 비교 프로그램을 또한 사용하여 동일성 정도를 정량한다(Pearson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988); Pearson, *Methods Mol Biol.* 132:185 (2000); 및 Smith et al., *J. Mol. Biol.* 147:195 (1981)). 델라우니(Delaunay)-기재 위상 맵핑을 이용하여 단백질의 구조적 유사성을 정량하기 위한 프로그램이 또한 개발되었다(Bostick et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 304:320 (2003)).

[0217] 컨쥬게이트 아미노산 잔기는 공유 또는 비공유 결합에 의해 연결될 수 있다. 공유 결합의 비제한적인 예는 아미드 결합, 비-자연 및 비-아미드 화학 결합이며, 이는, 예를 들어, 글루타르알데하이드, N-하이드록시숙신이미드 에스테르, 이기능성 말레이미드, N,N'-디사이클로헥실카르보디이미드(DCC) 또는 N,N'-디이소프로필카르보디이미드(DIC)를 포함한다. 아미드 결합에 대안적인 결합기는, 예를 들어, 케토메틸렌(예를 들어, -C(=O)-NH-에 대해 -C(=O)-CH_2-), 아미노메틸렌(CH_2-NH), 에틸렌, 올레핀(CH=CH), 에테르(CH_2-O), 티오에테르(CH_2-S), 테트라졸(CN_4-), 티아졸, 레트로아미드, 티오아미드, 또는 에스테르를 포함한다(예를 들어, 문헌[Spatola (1983) in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 7, pp 267-357, "Peptide and Backbone Modifications," Marcel Decker, NY] 참조).

[0218] 용해 도메인(및 존재시 추가 도메인)은 항체, 항체 단편, 중쇄(H), 경쇄(L), 또는 항체의 중쇄(H) 또는 경쇄(L)의 단편 어디에도 위치될 수 있으나, 단, 용해 도메인(또는 임의의 추가 도메인)은 표적에 대한 결합을 파괴하지 않아야 한다. 비제한적인 위치는 항체 중쇄(H) 또는 경쇄(L)의 아미노-말단 또는 카르복실-말단에 위치된 용해 도메인을 포함한다. 추가 도메인이 존재하는 경우(예를 들어, 제 3, 제 4, 제 5, 제 6, 제 7 등의 도메인), 추가 도메인(들)은 또한 어디에도 위치될 수 있다.

[0219] 제 1 부분 항체, 중쇄(H), 경쇄(L), 및 이들의 단편, 및 제 2 (용해) 도메인(및 존재시 추가 도메인)은 공유 또는 비공유 결합에 의해 서로 융합되거나 연결될 수 있다. 제 1 부분 항체, 중쇄(H), 경쇄(L), 및 이들의 단편,

및 제 2 (용해) 도메인(및 존재시 추가 도메인)은 서로 바로 인접하여 존재할 수 있거나, 2개의 도메인 사이에 개재된 영역, 예를 들어, 힌지, 스페이서 또는 링커에 의해 떨어져 존재할 수 있다.

[0220] 링커 또는 스페이서의 예는 비-펩티드 링커 또는 스페이서, 예를 들어, 연속 탄소 원자(C) 사슬(예를 들어, CCCCC)을 포함한다. 다중-탄소 사슬은 카르복실산(예를 들어, 디카르복실산), 예를 들어, 글루타르산, 숙신산 및 아디프산을 포함한다. 특정한 비제한적인 예는 6 탄소 링커, 예를 들어, α-아미노-카프로산이다.

[0221] 링커 또는 스페이서의 추가 예는 하나 이상의 아미노산 잔기, 예를 들어, 항체, 중쇄(H), 경쇄(L), 또는 이들의 단편, 및 제 2 (용해) 도메인(또는 존재시 추가 도메인) 사이에 위치된 하나 이상의 아미노산 잔기, 예를 들어, 펩티드 스페이서 또는 링커를 포함한다. 펩티드 스페이서 또는 링커 서열은 임의의 길이일 수 있으나, 통상적으로 약 1-10개, 10-20개, 20-30개, 30-40개, 또는 40-50개의 아미노산 잔기 범위일 수 있다. 특정 구체예에서, 2개(또는 그 초과)의 도메인 사이에 위치된 펩티드 스페이서 또는 링커는 1 내지 5개, 1 내지 10개, 1 내지 20개, 1 내지 25개의 L-아미노산 또는 D-아미노산 잔기, 또는 1 내지 4개, 1 내지 6개 또는 1 내지 8개의 L-아미노산 또는 D-아미노산 잔기이다. 제 1 및 제 2 도메인 사이에 위치된 서열 내에 포함되는 특정 아미노산 잔기는 A, S 또는 G 아미노산 잔기 중 하나 이상을 포함한다. 제 1 및 제 2 도메인 사이에 위치된 펩티드의 특정한 비제한적인 예는 GSGGS(SEQ ID NO.:9), ASAAS(SEQ ID NO.:8) 또는 다수의 특정 링커 서열(GSGGS(SEQ ID NO.:9))n 또는 (ASAAS(SEQ ID NO.:8))n(여기서, n=1-5, 5-10, 10-20 등임)로 기재되거나 이들 내의 서열을 포함한다. 아미노산 및 펩티드의 유도체는 2개(또는 그 초과)의 도메인 사이에 위치될 수 있다. 아미노산 유도체의 특정한 비제한적인 예는 리신 유도체이다.

[0222] 스페이서 또는 링커, 또는 제 3, 제 4, 제 5, 제 6, 제 7 등의 도메인을 갖거나 이들을 갖지 않는 컨쥬게이트는 자연 아미노산 또는 합성의 비-자연 아미노산 또는 아미노산 유사체로 전적으로 구성될 수 있거나, 유도체화된 형태를 포함할 수 있다. 다양한 구체예에서, 컨쥬게이트는 항체, 중쇄(H), 경쇄(L), 또는 이들의 단편, 및/또는 제 2 (용해) 도메인(및 존재시 추가 도메인) 내에 하나 이상의 D-아미노산, D-아미노산 및 L-아미노산의 혼합물, 또는 D-아미노산 잔기로 전적으로 구성된 서열을 포함한다.

[0223] 컨쥬게이트는 a) 자연 아미드 결합("펩티드 결합") 결합이 아닌 잔기 결합 그룹; b) 자연 발생 아미노산 대신의 비-자연 잔기; 또는 c) 이차 구조 모방을 유도하는, 즉, 이차 구조, 예를 들어, 알파 헬릭스 형태를 유도하거나 안정화시키는 잔기의 통상적으로 3개의 구조적 그룹으로부터 유래되는 비-자연 성분의 임의의 혼합물을 함유할 수 있다. 컨쥬게이트는 고리형 구조, 예를 들어, 분자의 아미노-말단과 카르복시-말단 사이의 말단-말단 아미드 결합 또는 분자내 또는 분자간 이황화 결합(들)을 포함한다. 컨쥬게이트는 시험관내 또는 생체내에서 변형될 수 있고, 예를 들어, 당 또는 탄수화물 잔기, 포스페이트기, 지방산, 지질 등을 포함하도록, 예를 들어, 번역후 변형될 수 있다.

[0224] 첨가의 특정 예는 제 3, 제 4, 제 5, 제 6 또는 제 7 도메인을 포함한다. 따라서, 2개의 도메인을 갖는 컨쥬게이트는 별개 또는 상보적 기능 또는 활성을 제공하기 위해 이에 공유적으로 연결된 하나 이상의 추가 도메인(제 3, 제 4, 제 5, 제 6, 제 7 등)을 포함할 수 있다. 예시적인 추가 도메인은, 예를 들어, 고정된 금속에 대한 정제를 가능케 하는 금속 킬레이트화 펩티드, 예를 들어, 폴리히스티딘 트랙 및 히스티딘-트립토판 모듈; 고정된 면역글로불린에 대한 정제를 가능케 하는 단백질 A 결합 도메인; 및 FLAGS 연장/친화성 정제 시스템(Immunex Corp, Seattle WA)에서 이용되는 도메인을 포함하는 분리를 촉진하는 도메인을 포함한다. 정제 도메인과 컨쥬게이트 사이의 분해성 서열, 예를 들어, 인자 Xa 또는 엔테로키나제의 임의의 포함이 정제를 촉진하기 위해 이용될 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터는 6개의 히스티딘 잔기에 연결된 컨쥬게이트-인코딩 핵산 서열, 및 그 뒤에 티오레독신 및 엔테로키나제 분해 부위를 포함할 수 있다. 히스티딘 잔기는 컨쥬게이트의 검출 및 정제를 촉진하는 한편, 엔테로키나제 분해 부위는 나머지 단백질로부터 작제물을 정제하기 위한 수단을 제공한다(예를 들어, 문헌[roll, *DNA Cell. Biol.* 12:441 (1993)] 참조).

[0225] 컨쥬게이트 활성은 다양한 요인에 의해 영향을 받을 수 있고, 따라서 컨쥬게이트는 하나 이상의 상기 요인을 고려하여 설계되거나 최적화될 수 있다. 상기 요인은, 예를 들어, 세포에 대한 독성에 영향을 미칠 수 있는 길이를 포함한다. 알파 헬릭스 형성 용해 펩티드 도메인의 세포 사멸 활성은 또한 헬릭스의 안정성에 좌우될 수 있다. 링커 및 스페이서는 용해 도메인의 막 상호작용 및 용해 도메인의 헬리칼 구조에 영향을 미칠 수 있다. 도메인에 존재하는 특정 아미노산 잔기에 의해 부분적으로 결정되는 용해 펩티드 도메인의 전하가 또한 세포 사멸 효능에 영향을 미친다. 용해 도메인(특정 아미노산 잔기, 또는 N-말단 또는 C-말단)과 비교한 항체, 중쇄(H), 경쇄(L), 및 제 2(용해) 도메인의 위치결정은 또한 컨쥬게이트의 세포 사멸 활성에 영향을 미칠 수 있다.

[0226] 컨쥬게이트 생체내 반감기는 하나 이상의 비-자연 발생 아미노산 또는 유도체를 갖는 용해 펩티드 도메인을 작

제함으로써 증가될 수 있다. 예를 들어, D-아미노산을 갖는 컨쥬게이트(예를 들어, 모든 잔기의 30%, 40%, 50%, 60% 또는 그 초과까지가 D-거울상 이성질체임)는 혈청 단백질분해에 내성이 있으며, 따라서 더 긴 시간 동안 활성일 수 있어, 이에 의해 생체내 효능이 증가할 수 있다. 또한, 하나 이상의 비-자연 발생 아미노산 또는 유도체를 갖는 용해 펩티드 도메인을 작제하는 것은 용혈 활성을 감소시킬 수 있다. 이러한 D-거울상 이성질체를 갖는 컨쥬게이트는 또한 용액 중에서 단량체가 되는 더 큰 경향을 가지며, 이들은 유의하게 응집되지 않는다.

[0227] 펩티드 및 펩티도미메틱이 당 분야에 공지된 방법을 이용하여 생성되고 분리될 수 있다. 펩티드는 당 분야에 공지된 화학적 방법을 이용하여 전체적으로 또는 부분적으로 합성될 수 있다(예를 들어, 문헌[Caruthers (1980). *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* 215; Horn (1980); and Banga, A.K., Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems (1995) Technomic Publishing Co., Lancaster, PA] 참조). 펩티드 합성은 다양한 고체상 기술을 이용하여 수행될 수 있고(예를 들어, 문헌[Roberge *Science* 269:202 (1995); Merrifield, *Methods Enzymol.* 289:3(1997)] 참조), 자동화된 합성은, 예를 들어, 제조업체의 설명서에 따라 ABI 431A Peptide Synthesizer(Perkin Elmer)를 이용하여 달성될 수 있다. 펩티드 및 펩티드 모방체는 또한 조합 방법을 이용하여 합성될 수 있다. 합성 잔기 및 폴리펩티드 포함 모방체는 당 분야에 공지된 다양한 절차 및 방법을 이용하여 합성될 수 있다(예를 들어, 문헌[Organic Syntheses Collective Volumes, Gilman, *et al.* (Eds) John Wiley & Sons, Inc., NY] 참조). 변형된 펩티드는 화학적 변형 방법에 의해 생성될 수 있다(예를 들어, 문헌[Belousov, *Nucleic Acids Res.* 25:3440 (1997); Frenkel, *Free Radic. Biol. Med.* 19:373 (1995); 및 Blommers, *Biochemistry* 33:7886 (1994)] 참조).

[0228] 본 발명은 본 발명의 컨쥬게이트(및 이의 일부, 중쇄(H), 경쇄(L), 및 이들의 단편, 및 제 2 (용해) 도메인, 및 존재시 추가 도메인)를 인코딩하는 핵산, 및 컨쥬게이트를 인코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 추가로 제공한다. 유전자, 폴리뉴클레오티드, 뉴클레오티드 서열, 프라이머, 올리고뉴클레오티드 또는 프로브로 또한 언급될 수 있는 핵산은 임의의 길이의 자연 또는 변형된 퓨린-함유 및 피리미딘-함유 중합체, 폴리리보뉴클레오티드 또는 폴리데옥시리보뉴클레오티드 또는 이들의 혼합된 폴리리보-폴리데옥시리보 뉴클레오티드 및 α-아노머 형태를 나타낸다. 2개 이상의 퓨린-함유 및 피리미딘-함유 중합체는 통상적으로 포스포에스테르 결합 또는 이의 유사체에 의해 결합된다. 상기 용어는 데옥시리보핵산(DNA) 및 리보핵산(RNA)을 포함하는 핵산의 모든 형태를 나타낸다. 핵산은 단일 가닥, 이중 가닥, 또는 삼중가닥, 선형 또는 원형일 수 있다. 핵산은 유전체 DNA, cDNA, 및 안티센스를 포함한다. RNA 핵산은 스플라이싱되거나 스플라이싱되지 않은 mRNA, rRNA, tRNA 또는 안티센스일 수 있다. 핵산은 자연 발생, 합성, 뿐만 아니라 뉴클레오티드 유사체 및 유도체를 포함한다.

[0229] 유전 부호의 축퇴의 결과로서, 핵산은 본 발명의 컨쥬게이트를 인코딩하는 서열과 관련된 서열 축퇴를 포함한다. 따라서, 컨쥬게이트를 인코딩하는 축퇴 핵산 서열이 제공된다.

[0230] 핵산은 임의의 다양한 공지된 표준 클로닝 및 화학적 합성 방법을 이용하여 생성될 수 있고, 당업자에게 공지된 부위-특이적 돌연변이유발 또는 다른 재조합 기술에 의해 고의로 변화될 수 있다. 폴리뉴클레오티드의 순도는 서열분석, 젤 전기영동, UV 분광법을 통해 결정될 수 있다.

[0231] 핵산은 핵산의 발현이 본원에서 "발현 카세트"로서 언급되는 "발현 조절 요소"에 의해 영향을 받거나 조절되는 핵산 작제물로 삽입될 수 있다. 용어 "발현 조절 요소"는 작동 가능하게 연결된 핵산 서열의 발현을 조절하거나 영향을 미치는 하나 이상의 핵산 서열 요소를 나타낸다. 발현 조절 요소는 적절한 경우 단백질-인코딩 유전자 앞에 프로모터, 인핸서, 전사 종료자, 유전자 사일런서(silencer), 개시 코돈(예를 들어, ATG) 등을 포함할 수 있다.

[0232] 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 발현 조절 요소는 핵산 서열의 전사 및 적절한 경우 번역을 조절한다. 용어 "작동 가능하게 연결된"은 언급된 구성요소가 이들의 의도된 방식으로 기능하도록 하는 관계에 있는 근접위치를 나타낸다. 통상적으로, 발현 조절 요소는 유전자의 5' 또는 3' 말단에 나란히 놓여지나 또한 인트론에 존재할 수 있다.

[0233] 발현 조절 요소는 유도성이거나(즉, 활성화를 위해 외부 시그널을 필요로 함) 또는 탈억제성인(즉, 전사를 전환시키기 위해 시그널을 필요로 함; 시그널이 더 이상 존재하지 않는 경우, 전사는 활성화되거나 "탈억제됨"), 항시적으로 전사를 활성화시키는 요소를 포함한다. 또한, 본 발명의 발현 카세트에는 유전자 발현이 특이적 세포-유형 또는 조직에 대해 조절가능하도록 하기에 충분한 조절 요소(즉, 조직-특이적 조절 요소)가 포함된다. 통상적으로, 상기 요소는 코딩 서열의 업스트림 또는 다운스트림(즉, 5' 및 3')에 위치된다. 프로모터는 일반적으로 코딩 서열의 5' 측에 위치된다. 재조합 DNA 또는 합성 기술에 의해 생성된 프로모터를 이용하여 본 발명

의 폴리뉴클레오티드의 전사를 제공할 수 있다. "프로모터"는 전사를 유도하기에 충분한 최소의 서열 요소를 의미한다.

[0234] 핵산은 숙주 세포로의 증식을 위해 그리고 요망되는 경우 후속하는 유전적 조작을 위해 플라스미드에 삽입될 수 있다. 플라스미드는 숙주 세포에서 안정적으로 증식될 수 있는 핵산이며, 플라스미드는 핵산의 발현을 유도하기 위해 발현 조절 요소를 임의로 함유할 수 있다. 벡터는 본원에서 플라스미드와 동의어로 사용되며, 또한 숙주 세포에서의 발현을 위한 발현 조절 요소를 포함할 수 있다. 플라스미드 및 벡터는 일반적으로 세포 및 프로모터에서의 증식을 위한 복제 기점을 적어도 함유한다. 따라서 플라스미드 및 벡터는 핵산을 인코딩하는 컨쥬게이트의 유전적 조작에 유용하여, 컨쥬게이트 또는 안티센스 핵산을 생성하고, 예를 들어, 숙주 세포 및 유기체에서 컨쥬게이트를 발현시킨다.

[0235] 박테리아 시스템 프로모터는 T7 및 유도성 프로모터, 예를 들어, 박테리오파지 λ의 pL, plac, ptrp, ptac(ptrp-lac 하이브리드 프로모터) 및 테트라사이클린 반응성 프로모터를 포함한다. 곤충 세포 시스템 프로모터는 항시성 또는 유도성 프로모터(예를 들어, 엑디손(ecdysone))를 포함한다. 포유동물 세포 항시성 프로모터는 SV40, RSV, 소 유두종 바이러스(BPV) 및 기타 바이러스 프로모터, 또는 포유동물 세포의 유전체(예를 들어, 메탈로티오네인 IIA 프로모터; 열 충격 프로모터) 또는 포유동물 바이러스(예를 들어, 아데노바이러스 후기(late) 프로모터; 유도성 마우스 유암 바이러스 긴 말단 반복)로부터 유래된 유도성 프로모터를 포함한다. 대안적으로, 레트로바이러스 유전체는 적절한 숙주 세포에서 컨쥬게이트를 도입하고 이의 발현을 유도하도록 유전학적으로 변형될 수 있다.

[0236] 발현 시스템은 생체내 사용을 위해 설계된 벡터를 추가로 포함한다. 특정한 비제한적인 예는 아데노바이러스 벡터(U.S. Patent Nos. 5,700,470 및 5,731,172), 아데노-관련 벡터(U.S. Patent No. 5,604,090), 단순 헤르페스 바이러스 벡터(U.S. Patent No. 5,501,979), 레트로바이러스 벡터(U.S. Patent Nos. 5,624,820, 5,693,508 및 5,674,703), BPV 벡터(U.S. Patent No. 5,719,054) 및 CMV 벡터(U.S. Patent No. 5,561,063)을 포함한다.

[0237] 효모 벡터는 항시성 및 유도성 프로모터(예를 들어, 문헌[Ausubel et al., In: Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Ch. 13, ed., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, 1988; Grant et al. Methods in Enzymology, 153:516 (1987), eds. Wu & Grossman; Bitter Methods in Enzymology, 152:673 (1987), eds. Berger & Kimmel, Acad. Press, N.Y.; 및, Strathern et al., The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces (1982) eds. Cold Spring Harbor Press, Vols. I and II] 참조)를 포함한다. ADH 또는 LEU2와 같은 항시성 효모 프로모터 또는 GAL과 같은 유도성 프로모터가 이용될 수 있다(R. Rothstein In: DNA Cloning, A Practical Approach, Vol.11, Ch. 3, ed. D.M. Glover, IRL Press, Wash., D.C., 1986). 예를 들어 동종 재조합을 통한 외래 핵산 서열의 효모 염색체로의 통합을 촉진하는 벡터가 당 분야에 공지되어 있다. 삽입된 폴리뉴클레오티드가 더 통상적인 벡터에 비해 지나치게 큰 경우(예를 들어, 약 12 Kb 초과), 효모 인공 염색체(YAC)가 통상적으로 사용된다.

[0238] 발현 벡터는 또한 선택압 또는 인식가능한 마커(예를 들어, 베타-갈락토시다제)에 내성을 부여하는 선택가능한 마커를 함유할 수 있어, 벡터를 갖는 세포가 선택되고, 성장하고, 확장되도록 한다. 대안적으로, 선택가능한 마커는 컨쥬게이트를 인코딩하는 핵산을 함유하는 제 1 벡터와 함께 숙주 세포로 공트랜스펙션되는 제 2 벡터 상에 있을 수 있다.

[0239] 선택 시스템은 각각 tk-, $hgprt^-$ 또는 $aprt^-$ 세포에서 이용될 수 있는 단순 헤르페스 바이러스 티미딘 키나제 유전자(Wigler et al., *Cell* 11:223 (1977)), 하이포잔틴-구아닌 포스포리보실트랜스페라제 유전자(Szybalska et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:2026 (1962)), 및 아데닌 포스포리보실트랜스페라제(Lowy et al., *Cell* 22:817 (1980)) 유전자를 포함하나 이로 제한되지 않는다. 추가로, 항대사물 내성은 메토트렉세이트에 대해 내성을 부여하는 *dhfr*(O'Hare et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1527 (1981)); 미코페놀산에 대해 내성을 부여하는 *gpt* 유전자(Mulligan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2072 (1981)); 아미노글리코시드 G-418에 대해 내성을 부여하는 *네오마이신* 유전자(Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.* 150:1(1981)); *푸로마이신*; 및 하이그로마이신에 대해 내성을 부여하는 *하이그로마이신* 유전자(Santerre et al., *Gene* 30:147 (1984))에 대한 선택의 기초로서 사용될 수 있다. 추가의 선택가능한 유전자는, 세포가 트립토판 대신 인돌을 사용하도록 하는 trpB; 세포가 히스티딘 대신 히스티놀을 사용하도록 하는 hisD(Hartman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8047 (1988)); 및 오르니틴 데카르복실라제 억제제인 2-(디플루오로메틸)-DL-오르니틴, DFMO에 대해 내성을 부여하는 ODC(오르니틴 데카르복실라제)를 포함한다(McConlogue (1987) In: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory).

[0240] 컨쥬게이트를 발현하는 숙주 세포, 및 컨쥬게이트를 인코딩하는 핵산(예를 들어, 항체, 중쇄(H), 경쇄(L), 및 이들의 단편, 및 제 2 (용해) 도메인, 및 존재시 추가 도메인) 및 컨쥬게이트를 인코딩하는 핵산을 포함하는 벡터로 형질전환된 숙주 세포가 또한 제공된다. 한 구체예에서, 숙주 세포는 원핵생물 세포이다. 또 다른 구체예에서, 숙주 세포는 진핵생물 세포이다. 다양한 양태에서, 진핵생물 세포는 효모 또는 포유동물(예를 들어, 사람, 영장류 등) 세포이다.

[0241] 본원에서 사용되는 "숙주 세포"는 증식될 수 있거나, 전사될 수 있거나, 컨쥬게이트를 발현하도록 인코딩될 수 있는 핵산이 도입되는 세포이다. 상기 용어는 또한 숙주 세포의 임의의 자손 또는 서브클론을 포함한다. 숙주 세포는 컨쥬게이트를 발현하는 세포를 포함한다.

[0242] 숙주 세포는 박테리아 및 효모와 같은 미생물; 및 식물, 곤충 및 포유동물 세포를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 재조합 박테리오파지 핵산, 플라스미드 핵산 또는 코스미드 핵산 발현 벡터로 형질전환된 박테리아; 재조합 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모; 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 양배추꽃 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV)로 감염되거나 재조합 플라스미드 발현 벡터(예를 들어, Ti 플라스미드)로 형질전환된 식물 세포 시스템; 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 배큘로바이러스)로 감염된 곤충 세포 시스템; 및 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 백시니아 바이러스)로 감염된 동물 세포 시스템, 또는 일시적이거나 안정한 증식 또는 발현을 위해 조작된 형질전환된 동물 세포 시스템이 있다.

[0243] 항체 및 폴리펩티드 컨쥬게이트, 컨쥬게이트를 인코딩하는 핵산, 및 벡터 및 컨쥬게이트를 발현시키거나 컨쥬게이트를 인코딩하는 핵산으로 형질전환된 숙주 세포는 분리되거나 정제된 형태를 포함한다. 본 조성물의 수식어구로서 사용된 용어 "분리된"은 조성물이 실제로 완전히 또는 적어도 부분적으로 자연 발생 생체내 환경으로부터 사람 손에 의해 만들어지거나 분리됨을 의미한다. 일반적으로, 분리된 조성물에는 자연상태에서 이와 정상적으로 회합되는 하나 이상의 물질, 예를 들어, 하나 이상의 단백질, 핵산, 지질, 탄수화물, 세포막이 실제로 없다. 용어 "분리된"은 다합체/올리고머, 변이체, 변형체 또는 유도체화된 형태와 같은 조성물의 대안적인 물리적 형태, 또는 사람 손에 의해 생성된 숙주 세포에서 발현된 형태를 배제하지 않는다. 용어 "분리된"은 또한 그 중 어느 하나가 사람 손에 의해 제조된, 조합물로서 존재하는 형태(예를 들어, 약학적 제형 및 조합 조성물)를 배제하지 않는다.

[0244] "분리된" 조성물은 또한 자연상태에서 이와 통상적으로 회합되는 물질들 중 일부, 실질적인 수, 대부분 또는 전부가 없을 때 "정제"된 것일 수 있다. 따라서, 실질적으로 순수한 분리된 컨쥬게이트는, 예를 들어, 단백질 라이브러리의 단백질 또는 유전체 또는 cDNA 라이브러리에 있는 핵산과 같이, 수 백만의 다른 서열 중에 존재하는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않는다. "정제된" 조성물은 하나 이상의 다른 분자와 조합될 수 있다.

[0245] 본 발명에 따르면, 컨쥬게이트과 조합 조성물의 혼합물이 제공된다. 한 구체예에서, 혼합물은 하나 이상의 컨쥬게이트과 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 혼합물은 하나 이상의 컨쥬게이트과 항-세포 증식, 항-종양, 항-암 또는 항-신생물 치료제 또는 작용제를 포함한다. 추가의 구체예에서, 혼합물은 하나 이상의 컨쥬게이트과 면역 향상제를 포함한다. 항-세포 증식, 항-종양, 항-암 또는 항-신생물 치료제 또는 작용제, 및 면역 향상 치료제 또는 작용제 중 하나 이상과 함께, 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제에 존재하는 하나 이상의 컨쥬게이트과 같은 조합물이 또한 제공된다.

[0246] 본 발명의 컨쥬게이트, 예를 들어, 표적(예를 들어, 수용체)에 결합하는 항체, 중쇄(H), 경쇄(L), 및 이들의 단편, 및 제 2 (용해) 도메인이 용해, 세포 사멸 또는 아폽토시스를 위해 표적 세포에 대해 사용될 수 있다. 상기 세포는 선택적으로 표적화될 수 있다. 예를 들어, 수용체, 예를 들어, Her2/neu 또는 CD20을 발현하는 세포는 컨쥬게이트에 의해 표적화될 수 있어서, 임의의 수용체를 덜 발현하는 세포에 비해 우선적으로 사멸될 수 있다.

[0247] 본 발명에 따르면, 표적(예를 들어, 수용체)을 발현하는 세포의 증식을 감소시키거나 억제하는 방법 및 용도, 및 세포 증식을 감소시키거나 억제하는 방법이 제공된다. 한 구체예에서, 상기 방법 또는 용도는 표적 발현 세포와 세포의 증식을 감소시키거나 억제하기에 충분한 양의 컨쥬게이트를 접촉시키는 것을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 상기 방법은 표적 발현 세포와 세포 증식을 감소시키거나 억제하기에 충분한 양의 컨쥬게이트를 접촉시키는 것을 포함한다.

[0248] 또한, 표적(예를 들어, 수용체)을 발현하는 과증식 세포의 증식을 감소시키거나 억제하는 방법 및 용도, 및 표

적(예를 들어, 수용체)을 발현하는 과증식하는 세포의 증식을 감소시키거나 억제하는 방법 및 용도가 제공된다. 한 구체예에서, 상기 방법 또는 용도는 과증식 표적 발현 세포 또는 과증식하는 표적 발현 세포와 증식을 감소시키거나 억제하기에 충분한 양의 컨쥬게이트를 접촉시키는 것을 포함한다.

[0249] 표적(예를 들어, 수용체)을 발현하는 비-전이성 또는 전이성 신생물, 암, 종양 및 악성종양 세포의 증식을 감소시키거나 억제하는 방법 및 용도가 추가로 제공된다. 한 구체예에서, 상기 방법 또는 용도는 신생물, 암, 종양 또는 악성종양 표적 발현 세포와 표적 발현 세포의 증식을 감소시키거나 억제하기에 충분한 양의 컨쥬게이트를 접촉시키는 것을 포함한다.

[0250] 표적(예를 들어, 수용체)를 발현하는 잠복 또는 분열하지 않는 비-전이성 또는 전이성 신생물, 암, 종양 및 악성종양 세포의 증식을 감소시키거나 억제하는 방법 및 용도가 또한 추가로 제공된다. 한 구체예에서, 상기 방법 또는 용도는 잠복 또는 분열하지 않는 신생물, 암, 종양 또는 악성종양 표적 발현 세포와 잠복 또는 분열하지 않는 세포의 증식을 감소시키거나 억제하기에 충분한 양의 컨쥬게이트를 접촉시키는 것을 포함한다.

[0251] 표적(예를 들어, 수용체)를 발현하는 세포(예를 들어, 과증식하는 세포)의 증식을 선택적으로 감소시키거나 억제하는 방법 및 용도가 추가로 제공된다. 한 구체예에서, 상기 방법 또는 용도는 표적 발현 세포와 세포(예를 들어, 과증식하는 세포)의 증식을 감소시키거나 억제하기에 충분한 양의 컨쥬게이트를 접촉시키는 것을 포함하며, 상기 컨쥬게이트는 세포에 의해 발현된 표적(예를 들어, 수용체)에 결합한다.

[0252] 표적(예를 들어, 수용체)을 발현하는 신생물, 종양, 암 또는 악성종양 세포의 증식을 선택적으로 감소시키거나 억제하는 방법 및 용도가 또한 추가로 제공된다. 한 구체예에서, 상기 방법 또는 용도는 세포와 신생물, 종양, 암 또는 악성종양 세포의 증식을 감소시키거나 억제하기에 충분한 양의 컨쥬게이트를 접촉시키는 것을 포함하며, 상기 컨쥬게이트는 세포에 의해 발현된 표적(예를 슬어, 수용체)에 결합한다.

[0253] 용어 "접촉시키는"은 두개 이상의 존재물 사이(예를 들어, 컨쥬게이트와 표적 및/또는 세포 사이)의 직접적 또는 간접적 결합 또는 상호작용을 의미한다. 본원에서 사용되는 접촉은 용액에서, 고체 상에서, 시험관내에서, 생체외에서, 세포에서 및 생체내에서의 접촉을 포함한다. 생체내에서의 접촉은 투여하는, 또는 투여 또는 전달로 언급될 수 있다.

[0254] 증식을 비선택적으로 또는 선택적으로 감소시키거나 억제하기 위해 표적화되는 세포는 표적(예를 들어, 수용체)를 발현하는 세포를 포함한다. 비제한적인 예시적 세포는 유방, 난소, 자궁, 자궁경부, 복부, 폐, 위, 결장, 방광, 아교, 피부(예를 들어, 멜라닌세포), 혈액 및 자궁내막 세포를 포함한다.

[0255] 본 발명의 컨쥬게이트 및 방법 및 용도는 또한 표적(예를 들어, 수용체)를 발현하는 세포를 포함하는 요망되지 않거나 비정상적인 세포 증식 및 과증식 장애를 치료하는데 적용가능하다. 따라서, 본 발명에 따르면, 요망되지 않거나 비정상적인 세포 증식 및 과증식 장애를 치료하는 방법 및 용도가 제공된다. 한 구체예에서, 상기 방법 또는 용도는 요망되지 않거나 비정상적인 세포 증식 또는 과증식 장애를 치료하기에 충분한 컨쥬게이트의 양을 대상체(치료를 필요로 함)에 투여하는 것을 포함한다.

[0256] 용어 "과증식 장애"는 임의의 요망되지 않거나 비정상적인 세포 생존(예를 들어, 프로그램화된 세포 사멸 또는 아폽토시스를 겪는데 실패), 성장 또는 증식을 나타낸다. 상기 장애는 양성 과다형성, 비-전이성 및 전이성 신생물, 암, 종양 및 악성종양을 포함한다. 요망되지 않거나 비정상적인 세포 증식 및 과증식 장애는 임의의 대상체의 세포, 조직, 기관에 영향을 미칠 수 있다. 요망되지 않거나 비정상적인 세포 증식 및 과증식 장애가 대상체에 국소적, 국부적 또는 전신적으로 존재할 수 있다. 과증식 장애는 다른 이차 부위, 영역 또는 위치로 전이되거나 전이되지 않을 수 있는 유방, 폐(예를 들어, 소세포 또는 비소세포), 갑상샘, 두경부, 뇌, 코인두, 인후, 코 또는 굴, 림프, 부신, 뇌하수체, 갑상샘, 림프, 위장(구강, 식도, 위, 십이지장, 회장, 공장(소장), 결장, 직장), 비뇨생식관(자궁, 난소, 질, 자궁경부, 자궁내막, 난관, 방광, 고환, 음경, 전립선), 신장, 췌장, 간, 뼈, 골수, 림프, 피(혈액), 뇌(아교), 근육, 피부, 피부(멜라닌세포), 및 줄기 세포를 포함하나, 이에 제한되지는 않는 다수의 조직 및 기관으로부터 발생할 수 있다.

[0257] 본 발명의 컨쥬게이트 및 방법 및 용도는 또한 임의의 세포, 기관 또는 조직 기원의 전이성 또는 비전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물에 적용가능하다. 상기 장애는 임의의 세포 또는 조직 유형, 예를 들어, 암종, 육종, 흑색종, 신경, 및 그물내피 또는 조혈 신생물 장애(예를 들어, 골수종, 림프종 또는 백혈병)에 실질적으로 영향을 미칠 수 있다.

[0258] 본원에서 사용되는 용어 "신생물" 및 "종양"은 정상 대응부 세포의 성장, 증식 또는 생존보다 성장, 증식 또는 생존이 더 큰 세포 또는 세포의 집단, 예를 들어, 세포 증식 또는 분화 장애를 나타낸다. 종양은 별개의 덩어

리 또는 성장을 형성하는 신생물이다. "암" 또는 "악성종양"은 인접한 공간, 조직 또는 기관을 침습할 수 있는 신생물 또는 종양을 나타낸다. "전이"는 이의 원발성 부위로부터 대상체 내의 하나 이상의 이차 부위, 위치 또는 영역으로 전이되거나 퍼지는 신생물, 종양, 암 또는 악성종양이며, 상기 부위, 위치 또는 영역은 원발성 종양 또는 암과 별개이다. 상기 세포의 전부 또는 일부는 표적(예를 들어, 수용체)를 발현할 수 있고, 따라서 본 발명에 따른 컨쥬게이트로 표적화될 수 있다.

[0259] 신생물, 종양, 암 및 악성종양 세포(전이성 또는 비-전이성)는 잠복 또는 남아있는 신생물, 종양, 암 및 악성종양 세포를 포함하며, 이의 전부 또는 일부는 표적(예를 들어, 수용체)을 발현한다. 상기 세포는 통상적으로 분열되지 않은(G0-G1 정지) 잔유물 종양 세포로 구성된다. 이들 세포는 최소 한도의 남아 있는 질병으로서 원발성 부위에 또는 전이된 신생물, 종양, 암 또는 악성종양 세포로서 존속할 수 있다. 이들 잠복 신생물, 종양, 암 또는 악성종양 세포는 증상이 없는 (unsymptomatic) 채로 남아 있으나, 일단 이들 잠복 세포가 증식하면 심각한 증상 및 사멸을 초래할 수 있다. 본 발명의 방법을 이용하여 잠복 신생물, 종양, 암 또는 악성종양 세포의 증식을 감소시키거나 억제시킬 수 있고, 이는 차례로 종양 또는 암 재발이나 종양 또는 암 전이 또는 진행을 억제하거나 감소시킬 수 있다.

[0260] 본 발명에 따르면, 전이성 또는 비-전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물을 갖는 대상체를 치료하는 방법이 제공된다. 한 구체예에서, 상기 방법은 전이성 또는 비-전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물을 치료하기에 (예를 들어, 증식을 감소시키거나 억제하기에) 충분한 컨쥬게이트의 양을 대상체(치료를 필요로 함)에 투여하는 것을 포함한다.

[0261] 전이성 또는 비-전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물은 예를 들어, 초기이거나 진행된 것과 같은 임의의 단계일 수 있고, 예를 들어, I, II, III, IV 또는 V기 종양이다. 전이성 또는 비-전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물은 사전 치료될 수 있거나 안정화되거나(진행하지 않음) 또는 소실될 수 있다.

[0262] 전이와 관련하여, 본 발명의 방법을 이용하여 원발성 종양 또는 암의 다른 부위로의 전이, 또는 원발성 종양 또는 암으로부터 원위에 있는 다른 부위에서 전이성 종양 또는 암의 형성 또는 확립을 감소시키거나 억제함으로써 종양 또는 암 재발이나 종양 또는 암 진행을 억제하거나 감소시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 특히 1) 잠재적으로 전이를 발생시키거나 전이를 발생시키는(예컨대, 전이된 종양 세포, DTC) 종양 또는 암 세포의 성장, 증식, 운동성 또는 침습성의 감소 또는 억제; 2) 원발성 종양 또는 암으로부터 원발성 종양 또는 암과 별개인 하나 이상의 다른 부위, 위치 또는 영역으로 발생하는 전이의 형성 또는 확립의 감소 또는 억제; 3) 전이가 형성되거나 확립된 후에 원발성 종양 또는 암과 별개인 하나 이상의 다른 부위, 위치 또는 영역에서의 전이의 성장 또는 증식의 감소 또는 억제; 및 4) 전이가 형성되거나 확립된 후 추가 전이의 형성 또는 확립의 감소 또는 억제를 포함한다.

[0263] 전이성 또는 비-전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물의 세포(이의 전부 또는 일부는 표적(예를 들어, 수용체)을 발현함)는 "고형" 세포 덩어리로 응집될 수 있거나 분산되거나 확산될 수 있다. "고형" 종양은 통상적으로 함께 응집하여 덩어리를 형성하는 암, 신생물 또는 전이를 나타낸다. 특정한 비제한적인 예는 유방, 난소, 자궁, 자궁경부, 복부, 폐, 위, 결장, 방광, 아교, 피부(예를 들어, 멜라닌세포) 및 자궁내막 종양/암을 포함한다.

[0264] 상피 또는 내분비 조직의 악성종양을 나타내는 암종은 호흡계 암종, 위장계 암종, 비뇨생식계 암종, 고환 암종, 유방 암종, 전립선 암종, 내분비계 암종, 및 흑색종을 포함한다. 예시적인 암종으로는 자궁, 자궁경부, 폐, 전립선, 유방, 두경부, 결장, 췌장, 고환, 부신, 신장, 식도, 위, 간 및 난소로부터 형성된 것들을 포함한다. 상기 용어는 또한, 예를 들어, 암종성 및 육종성 조직으로 구성된 악성종양을 포함하는 암육종을 포함한다. 샘암종은 샘 조직의 암종을 포함하거나, 종양이 샘 유사 구조를 형성한다.

[0265] 육종은 중간엽 세포 기원의 악성종양을 나타낸다. 예시적인 육종은, 예를 들어, 림프육종, 지방육종, 뼈육종, 연골육종, 평활근육종, 횡문근육종 및 섬유육종을 포함한다.

[0266] 신경 신생물은 신경아교종, 아교모세포종, 수막종, 신경모세포종, 망막모세포종, 별아교세포종 및 핍지세포종을 포함한다.

[0267] "액상 종양"은 통상적으로 고형 덩어리를 형성하지 않으므로, 자연상태에서 분산되거나 확산된 신생물을 나타낸다. 특정 예는 그물내피 또는 조혈계의 신생물, 예를 들어, 림프종, 골수종 및 백혈병을 포함한다. 백혈병의 비제한적인 예는 급성 및 만성 림프모구, 골수모구 및 다발 골수종을 포함한다. 통상적으로, 상기 질병은 충분하지 않게 분화된 급성 백혈병, 예를 들어, 적혈모구 백혈병 및 급성 거핵모구성 백혈병으로부터 발생한다. 특

정한 골수성 장애는 급성 전골수성 백혈병(APML), 급성 골수 백혈병(AML) 및 만성 골수 백혈병(CML)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 림프구 악성종양은 B-직계성 ALL(B-ALL) 및 T-직계성 ALL(T-ALL)을 포함하는 급성 림프모구 백혈병(ALL), 만성 림프성 백혈병(CLL), 전림프구성 백혈병(PLL), 털세포 백혈병(HLL) 및 발덴스트롬 마크로글로불린혈증(WM)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 특정한 악성 림프종은 비-호지킨 림프종 및 변이체, 말초 T 세포 림프종, 성인 T 세포 백혈병/림프종(ATL), 피부 T-세포 림프종(CTCL), 대과립 림프구성 백혈병(LGF), 호지킨병 및 리드-슈테르베르크병을 포함한다.

[0268] 본원에 개시된 바와 같이, 요망되지 않거나 비정상적인 세포 증식 또는 과증식 장애는 자궁, 유방, 질, 자궁경부, 자궁내막 및 자궁관에서 발생할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따르면, 자궁, 유방, 질, 자궁경부, 자궁내막 및 자궁관 과증식 장애를 치료하는 방법 및 용도가 제공된다. 한 구체예에서, 상기 방법 또는 용도는 자궁, 유방, 질, 자궁경부, 자궁내막 또는 자궁관 과증식 장애를 치료하기에 충분한 컨쥬게이트의 양을 대상체에 투여하는 것을 포함한다.

[0269] 항-세포 증식 활성 또는 효과를 갖는 임의의 조성물, 치료, 프로토콜, 요법 또는 섭생은 컨쥬게이트와 조합될 수 있거나, 본 발명의 방법 또는 용도와 조합하여 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 컨쥬게이트 및 방법 및 용도는 과증식 장애, 예를 들어, 종양, 암, 악성종양 또는 신생물 성장, 진행, 전이, 증식 또는 생존이나 시험관내 또는 생체내 악화를 억제하거나, 감소시키거나, 지연시키거나, 늦추거나, 감소시키거나 예방하는 임의의 다른 조성물, 치료, 프로토콜 또는 치료 섭생을 포함하는, 항-증식, 항-종양, 항-암, 항-신생물 및 항-전이 치료를 포함한다. 항-증식(예를 들어, 종양) 요법의 특정한 비제한적인 예는 화학요법, 면역요법, 방사선요법(이온화 또는 화학적), 국소 열(고열) 요법, 외과적 절제 및 예방접종을 포함한다. 컨쥬게이트는 항-세포 증식, 항-신생물, 항-종양, 항-암, 항-전이 또는 면역-향상 치료 또는 요법의 투여 또는 사용 전에, 실질적으로 동시에, 또는 이후에 투여될 수 있다. 컨쥬게이트는 항-세포 증식성, 항-신생물, 항-종양, 항-암, 항-전이 또는 면역-향상 치료 또는 요법, 전이성 또는 비-전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물과의 조합 조성물로서 투여되거나 사용될 수 있다.

[0270] 항-증식, 항-신생물, 항-종양, 항-암 및 항-전이 조성물, 요법, 프로토콜 또는 치료는 세포 주기 진행 또는 세포 증식을 예방하거나, 붕괴시키거나, 방해하거나, 억제하거나, 지연시키거나; 아폽토시스 또는 세포 사멸을 자극하거나 향상시키거나, 핵산 또는 단백질 합성 또는 대사를 억제하거나, 세포 분열을 억제하거나, 세포 생존 또는 필요한 세포 생존 인자, 성장 인자 또는 신호전달 경로(세포외 또는 세포내)의 생성 또는 이용을 저하시키거나, 감소시키거나, 억제하는 것들을 포함한다. 항-세포 증식, 항-신생물, 항-종양, 항-암 및 항-전이 활성을 갖는 화학제 부류의 비제한적인 예는 알킬화제, 항-대사물, 식물 추출물, 식물 알칼로이드, 니트로소우레아, 호르몬, 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드 유사체를 포함한다. 항-세포 증식, 항-신생물, 항-종양, 항-암 및 항-전이 활성을 갖는 약물의 특정 예는 사이클로포스파미드, 아자티오프린, 사이클로스포린 A, 프레드니솔론, 멜팔란, 클로람부실, 메클로르에타민, 부술판, 메토트렉세이트, 6-머캅토퓨린, 티오구아닌, 5-플루오로우라실, 시토신 아라비노시드, AZT, 5-아자시티딘(5-AZC) 및 5-아자시티딘 관련 화합물, 예를 들어, 데시타빈(5-아자-2'데옥시시티딘), 시타라빈, 1-베타-D-아라비노푸라노실-5-아자시토신 및 디히드로-5-아자시티딘, 블레오마이신, 악티노마이신 D, 미트라마이신, 미토마이신 C, 카르무스틴, 로무스틴, 세무스틴, 스트렙토조토신, 하이드록시우레아, 시스플라틴, 미토탄, 프로카르바진, 다카르바진, 탁산(예를 들어, 탁솔 또는 파클리탁셀), 빈블라스틴, 빈크리스틴, 독소루비신 및 디브로모만니톨 등을 포함한다.

[0271] 컨쥬게이트 및 방법 및 용도에 적용가능한 추가의 작용제가 당업자에게 공지되어 있고, 이용될 수 있다. 예를 들어, 생물학적 약제, 예를 들어, 컨쥬게이션, 세포 성장 인자, 세포 생존 인자, 세포 분화 인자, 사이토카인 및 케모카인에 사용되는 항체와 상이한 항체가 투여되거나 사용될 수 있다. 모노클로날 항체의 비제한적인 예는 특히 본 발명에 따른 컨쥬게이트와 조합하여 사용될 수 있는 리툭시맙(Rituxan®), 트라스투주맙(Herceptin®), 퍼투주맙(Perjeta®), 베바시주맙(Avastin®), 라니비주맙(Lucentis®), 세툭시맙(Erbitux®), 알렘투주맙(Campath®), 파니투무맙(Vectibix®), 이브리투모맙 티욱세탄(Zevalin®), 토시투모맙(Bexxar®), 이필리무맙(ipilimumab), 잘루투무맙(zalutumumab), 달로투주맙(dalotuzumab), 피지투무맙(figitumumab), 라무시루맙(ramucirumab), 갈릭시맙(galiximab), 파를레투주맙(farletuzumab), 오크렐리주맙(ocrelizumab), 오파투무맙(Arzerra®), 토시투무맙, 이브리투모맙, 2F2(HuMax-CD20), 7D8, IgM2C6, IgG1 2C6, 11B8, B1, 2H7, LT20, 1F5 또는 AT80 다클리주맙(Zenapax®), 항-LHRH 수용체 항체, 예를 들어, 클론 A9E4, F1G4, AT2G7, GNRH03, GNRHR2 등을 포함한다.

[0272] 컨쥬게이트와의 사용에 적용가능한 다른 표적화된 약물은 키나제 억제제, 예를 들어, 이마티니브(imatinib)(Gleevec®), 제피티니브(gefitinib)(Iressa®), 보르트조미브(bortzomib)(Velcade®), 라파티니브

(lapatinib)(Tykerb®), 수니티니브(sunitinib)(Sutent®), 소라페니브(sorafenib)(Nevaxar®), 닐로티니브(nilotinib)(Tasigna®) 등이다. 세포 성장 인자, 세포 생존 인자, 세포 분화 인자, 사이토카인 및 케모카인의 비제한적인 예는 IL-2, IL-1a, IL-1b, IL-3, IL-6, IL-7, 과립구-대식세포-집락 자극 인자(GMCSF), IFN-γ, IL-12, TNF-α, TNFβ, MIP-1α, MIP-1β, RANTES, SDF-1, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, 에오탁신(eotaxin), 에오탁신-2, I-309/TCA3, ATAC, HCC-1, HCC-2, HCC-3, LARC/MIP-3α, PARC, TARC, CKb, CKb6, CKb7, CKb8, CKb9, CKb11, CKb12, C10, IL-8, GROα, GROβ, ENA-78, GCP-2, PBP/CTAPIII-TG/NAP-2, Mig, PBSF/SDF-1 및 림포탁틴(lymphotactin)을 포함한다.

[0273] 추가의 비제한적인 예는 세포 기반 요법을 포함하는 면역-향상 치료 및 요법을 포함한다. 특히, 면역-향상 치료 및 요법은 림프구, 형질 세포, 대식세포, 수지상 세포, NK 세포 및 B-세포를 투여하는 것을 포함한다.

[0274] 전이성 또는 비-전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물을 치료하는 방법 및 용도, 전이성 또는 비-전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물을 갖거나 가질 위험이 있기 때문에 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법 및 용도, 및 항-증식성, 항-종양, 항-암, 항-신생물 또는 항-악성종양 요법의 효과를 증가시키거나 개선시키는 방법 및 용도가 제공된다. 각각의 구체예에서, 상기 방법 또는 용도는 전이성 또는 비-전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물을 갖거나 그러한 위험이 있는 대상체에게 전이성 또는 비-전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물을 치료하기에 충분한 양의 컨쥬게이트를 투여하고; 대상체에게 대상체를 치료하기에 충분한 컨쥬게이트의 양을 투여하고; 전이성 또는 비-전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물 요법을 받고 있거나 받았던 대상체에게 항-증식, 항-종양, 항-암, 항-신생물 또는 항-악성종양 요법의 효과를 증가시키기에 충분한 컨쥬게이트의 양을 투여하는 것을 포함한다.

[0275] 본 발명의 방법 및 용도는 요망되지 않거나 비정상적인 세포 증식 또는 과증식 장애, 질병 또는 질환이 존재한다는 증거(예를 들어, 하나 이상의 증상)가 시작되기 전에(즉, 예방), 이와 동시에 또는 이후에 실시될 수 있다. 요망되지 않거나 비정상적인 세포 증식 또는 과증식 장애의 증상이 발생하기 전에, 동시에 또는 직후에 컨쥬게이트를 투여하거나 이용하는 것은 대상체에서 요망되지 않거나 비정상적인 세포 증식 또는 과증식 장애, 질병 또는 질환의 하나 이상의 증상의 발생, 빈도, 중증도, 진행 또는 기간을 감소시킬 수 있다. 또한, 요망되지 않거나 비정상적인 세포 증식 또는 과증식 장애, 질병 또는 질환의 하나 이상의 증상의 발생 이전에, 동시에 또는 직후에 컨쥬게이트를 투여하거나 이용하는 것은 대상체의 다른 부위, 영역, 조직 또는 기관으로의 과증식하는 세포의 확산 또는 전이(예를 들어, 전이), 또는 대상체의 다른 부위, 영역, 조직 또는 기관에서의 과증식하는 세포의 확립(예를 들어, 전이)을 억제하거나, 감소시키거나, 예방할 수 있다.

[0276] 본 발명의 컨쥬게이트 및 방법 및 용도, 예를 들어, 치료 방법 및 용도는 대상체에게 검출될 수 있거나 측정가능한 치료적 이익 또는 개선을 제공할 수 있다. 치료적 이익 또는 개선은 대상체에게 임의의 측정가능하거나 검출될 수 있는 객관적이거나 주관적, 일시적, 임시적 또는 보다 긴-기간의 이익이 되거나, 대상체의 조직, 기관, 세포 또는 세포 집단에서 질환, 장애 또는 질병에서의 어느 정도의 유해한 증상, 결과 또는 근원적인 원인의 개선이다.

[0277] 치료적 이익 및 개선은 장애, 질병 또는 질환과 관련된 하나 이상의 증상 또는 합병증의 발생, 빈도, 중증도, 진행 또는 기간을 감소시키거나 저하시키거나, 장애, 질병 또는 질환의 근원적인 원인 또는 수반하는 효과를 감소시키거나 저하시키는 것을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 따라서, 본 발명의 컨쥬게이트 및 방법 및 용도는 대상체에게 치료적 이익 또는 개선을 제공하는 것을 포함한다.

[0278] 치료적 이익 또는 개선이 요망되는 결과인 본 발명의 방법 또는 용도에서, 컨쥬게이트는 치료가 필요한 대상체에게 충분하거나 효과적인 양으로 투여될 수 있다. "충분한 양" 또는 "효과적인 양"은 단일 또는 다중 용량으로, 단독으로 또는 하나 이상의 다른 조성물(치료제, 예를 들어, 화학치료제 또는 면역 자극 약물), 치료, 프로토콜 또는 치료적 섭생제와 함께, 임의의 기간(장기 또는 단기)의 검출가능한 반응, 대상체에서 임의의 측정가능하거나 검출가능한 정도의 또는 임의의 기간 동안(예를 들어, 수시간, 수일, 수개월, 수년 또는 치료됨) 요망되는 결과 또는 이익을 제공하는 것이 예상되는 양을 나타낸다. 장애, 질병 또는 질환 또는 증상의 진행 또는 악화를 감소시키거나 억제하는 것이 만족스러운 결과로 고려되나, 치료를 위한 용량 또는 "충분한 양" 또는 "효과적인 양"(예를 들어, 치료적 이익 또는 개선을 제공함)은 통상적으로 장애, 질병 또는 질환, 또는 장애, 질병 또는 질환의 하나, 다수 또는 모든 유해 증상, 결과 또는 합병증을 측정가능한 정도로 개선하는데 효과적이다.

[0279] 용어 "개선시키다"는 대상체 상태의 검출가능한 객관적이거나 주관적인 개선을 의미한다. 검출가능한 개선은 장애, 질병 또는 질환에 의해 야기되거나 이과 관련된 증상의 발생, 빈도, 중증도, 진행 또는 기간의 주관적이거나 객관적인 감소, 장애, 질병 또는 질환의 근원적인 원인 또는 결과의 개선, 또는 장애, 질병 또는 질환의

역전을 포함한다.

[0280] 따라서, 치료 또는 용도는 장애, 질병 또는 질환, 또는 관련 증상 또는 결과, 또는 근원적인 원인의 억제, 감소 또는 예방; 장애, 질병, 질환, 증상 또는 결과, 또는 근원적인 원인의 진행 또는 악화의 억제, 감소 또는 예방; 또는 장애, 질병, 질환 또는 증상의 하나 이상의 추가 증상의 추가적인 악화 또는 발생의 억제, 감소 또는 예방을 발생시킬 수 있다. 따라서, 성공적인 치료 결과는 "치료적 효과" 또는 "이익"을 발생시키거나, 하나 이상의 증상의 발생, 빈도, 중증도, 진행 또는 기간 또는 대상체의 질환, 장애, 질병 또는 증상의 근원적인 원인 또는 결과의 억제, 감소 또는 예방을 발생시킨다. 따라서, 질환, 장애, 질병 또는 증상의 하나 이상의 근원적인 원인에 영향을 미치는 치료 방법 및 용도가 이로운 것으로 간주된다. 장애 또는 질환의 진행 또는 악화를 안정화 또는 억제시키는 것이 또한 성공적인 치료 결과이다.

[0281] 따라서, 치료적 이익 또는 개선은 질환, 장애 또는 질병과 관련된 임의의 하나, 대부분 또는 모든 증상, 합병증, 결과 또는 근원적인 원인의 완전한 제거일 필요는 없다. 따라서, 만족스러운 종점은 대상체의 상태가 안정화되거나 점진적으로 개선되거나, 짧거나 긴 기간(수시간, 수일, 수주, 수개월 등)에 걸쳐 장애 또는 질병의 생리학적, 생화학적 또는 세포 소견 또는 특징 중 하나 이상의 발생, 빈도, 중증도, 진행 또는 기간의 부분적인 감소, 또는 하나 이상의 관련 유해 증상 또는 합병증 또는 결과 또는 근원적인 원인, 악화 또는 진행(예를 들어, 질환, 장애 또는 질병의 하나 이상의 증상 또는 합병증의 안정화)의 억제 또는 역전시에 달성된다.

[0282] 특정 구체예에서, 치료 방법 또는 용도는 전이성 또는 비-전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물 세포 질량, 부피, 크기 또는 세포 수의 부분적이거나 완전한 파괴를 발생시키거나; 전이성 또는 비-전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물 세포 괴사, 용해 또는 아폽토시스를 자극하거나, 유도하거나, 증가시키거나; 전이성 또는 비-전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물 부피, 크기, 세포 질량을 감소시키거나; 전이성 또는 비-전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물 부피, 질량, 크기 또는 세포 수의 증가 또는 진행을 억제하거나, 예방하거나; 과증식하는 세포의 대상체의 다른(이차) 부위, 영역, 조직 또는 기관으로의 확산 또는 전이(예를 들어, 전이), 또는 대상체의 다른(이차) 부위, 영역, 조직 또는 기관에서 과증식하는 세포(예를 들어, 전이)의 확립을 억제하거나, 감소시키거나; 대상체의 수명을 연장시킨다. 추가의 특정 구체예에서, 치료 방법 또는 용도는 전이성 또는 비-전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물과 관련되거나 이에 의해 야기된 유해 증상 또는 합병증의 중증도, 기간 또는 빈도를 감소시키거나, 저하시킨다.

[0283] 충분한 양 또는 효과적인 양이 반드시 단일 투여 또는 용량으로 제공될 필요는 없을 수 있고, 단독으로 또는 다른 조성물(예를 들어, 화학요법제 또는 면역 향상제 또는 자극제), 치료, 프로토콜 또는 치료 섭생과 함께 제공될 필요도 없을 수 있다. 예를 들어, 상기 양은 대상체의 필요, 치료하려는 장애, 질병 또는 질환의 상태 또는 치료 부작용에 의해 지정된 대로 비례적으로 증가될 수 있다. 또한, 충분한 양 또는 효과적인 양이 제 2 조성물(예를 들어, 화학요법제 또는 면역자극제), 치료, 프로토콜 또는 치료 섭생 없이 단일 또는 다중 용량으로 제공되는 경우 충분하거나 효과적일 필요가 없는데, 그 이유는 상기 용량 이상 및 이를 초과하는 추가의 용량, 양 또는 기간 또는 추가의 조성물(예를 들어, 화학요법제 또는 면역자극제), 치료, 프로토콜 또는 치료 섭생이 제공된 대상체에서 효과적이거나 충분하게 고려되도록 포함될 수 있기 때문이다. 충분하게 고려되는 양은 또한 또 다른 치료, 치료 섭생 또는 프로토콜의 사용 감소를 초래하는 양을 포함한다.

[0284] 충분한 양 또는 효과적인 양이 치료하려는 각각 및 모든 대상체에서 또는 제공된 그룹 또는 집단에 있는 치료되는 대상체의 대부분에서 예방적 또는 치료적으로 효과적일 필요는 없다. 치료 또는 치료 방법에서 통상적인 대로, 일부 대상체는 제공된 치료, 치료 섭생 또는 프로토콜에 크거나 작은 반응을 나타낼 것이다. 충분한 양 또는 효과적인 양은 그룹 또는 일반적인 집단이 아닌 특정 대상체에서의 충분함 또는 효과를 나타낸다. 상기 양은 치료하려는 상태, 예를 들어, 요망되지 않거나 비정상적인 세포 증식 또는 과증식 장애(예를 들어, 전이성 또는 비-전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물)의 유형 또는 단계, 요망되는 치료 효과 뿐만 아니라 개별적 대상체(예를 들어, 대상체 내에서의 생체이용률, 성별, 연령 등)에 부분적으로 의존적일 것이다.

[0285] 요망되지 않거나 비정상적인 세포 증식, 예를 들어, 과증식 장애(예를 들어, 전이성 또는 비-전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물)에 대한 치료 이익 또는 개선의 특정한 비제한적인 예는 세포 크기, 질량 또는 부피의 감소, 세포 크기, 질량 또는 부피의 증가 억제, 악화 또는 진행의 지연 또는 억제, 세포 괴사, 용해 또는 아폽토시스의 자극, 신생물 또는 악성종양 또는 전이의 감소 또는 억제, 사망률 감소 및 대상체의 수명 연장을 포함한다. 따라서, 세포 크기, 질량, 부피 또는 전이(안정화) 증가의 억제 또는 지연은, 전이성 또는 비-전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물의 완전한 제거가 발생하지 않더라도 비록 수일, 수주 또는 수개월에 불과할지라도 수명을 증가시킬 수 있다(사망률 감소). 감소되거나 저하될 수 있는 과증식 장애(예를 들어, 전이성 또는

비-전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물)과 관련된 유해 증상 및 합병증은, 예를 들어, 동통, 구역, 불쾌, 식욕 부족, 기면 및 쇠약을 포함한다. 따라서, 요망되지 않거나 비정상적인 세포 증식, 예를 들어, 과증식 장애(예를 들어, 전이성 또는 비-전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물)의 증상의 발생, 빈도, 중증도, 진행 또는 기간의 감소, 예를 들어, 주관적인 느낌의 개선(예를 들어, 증가된 에너지, 식욕, 감소된 구역, 개선된 운동성 또는 정신적 웰빙 등)이 치료 이익 또는 개선의 모든 예이다.

[0286] 예를 들어, 컨쥬게이트의 충분하거나 효과적인 양은, 그 투여가 더 적은 양의 화학요법 약물, 방사선 또는 면역요법이 요망되지 않거나 비정상적인 세포 증식, 예를 들어, 과증식 장애(예를 들어, 전이성 또는 비-전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물)의 치료에 요구되도록 하는 경우에 치료 효과를 갖는 것으로 간주된다.

[0287] 용어 "대상체"는 동물, 통상적으로 포유동물, 예를 들어, 인간, 비인간 영장류(유인원, 긴팔원숭이, 침팬지, 오랑우탄, 짧은꼬리원숭이), 애완 동물(개 및 고양이), 농장 동물(말, 소, 염소, 양, 돼지) 및 실험 동물(마우스, 래트, 토끼, 키니아 피그)을 나타낸다. 대상체는 동물 질병 모델, 예를 들어, 생체내 컨쥬게이트의 분석을 위한 요망되지 않거나 비정상적인 세포 증식, 예를 들어, 과증식 장애(예를 들어, 전이성 또는 비-전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물)의 동물 모델을 포함한다.

[0288] 치료에 적절한 대상체는 종양이 완화된 대상체를 포함하여, 전이성 또는 비-전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물 세포를 갖거나 가질 위험이 있는 대상체, 진행하고 있는 대상체 뿐만 아니라 항-증식(예를 들어, 전이성 또는 비-전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물) 요법을 받고 있거나 받았던 대상체를 포함한다. "위험이 있는"의 대상체는 통상적으로 과다형성의 발생(예를 들어, 종양)인 요망되지 않거나 비정상적인 세포 증식과 관련된 위험 요인을 갖는다.

[0289] 위험이 있거나 후보가 되는 대상체의 특정 예는 컨쥬게이트가 결합할 수 있는 표적(예를 들어, 수용체)을 발현시키는 세포를 갖는 대상체를 포함하며, 특히 괴사, 용해, 사멸 또는 파괴를 위해 표적화된 세포는 비-표적 세포보다 더 많은 수 또는 더 많은 양의 표적(예를 들어, 수용체)을 발현시킨다. 상기 세포는 괴사, 용해 또는 사멸을 위해 선택적으로 또는 우선적으로 표적화될 수 있다.

[0290] 위험이 있는 대상체는 또한 외과적 절제, 화학요법, 면역요법, 이온화 또는 화학적 방사선요법, 국소 또는 국부 열(고열) 요법, 또는 예방접종, 또는 예방접종에 대한 후보인 대상체 및 외과적 절제, 화학요법, 면역요법, 이온화 또는 화학적 방사선요법, 국소 또는 국부 열(고열) 요법, 또는 예방접종, 또는 예방접종을 받은 대상체를 포함한다. 따라서, 본 발명은, 예를 들어, 안정 또는 완화의 기간 이후에 전이성 또는 비-전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물 재발 또는 재성장으로 인한 전이성 또는 비-전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물, 또는 전이성 또는 비-전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물과 관련된 합병증의 위험이 있는 대상체를 치료하는데 적용될 수 있다.

[0291] 위험 인자는 성별, 생활 방식(식이, 흡연), 직업(의학 및 임상 직원, 농업 및 축산업 종사자), 환경 인자(발암원 노출), 가족력(자가면역 장애, 당뇨병 등), 유전적 소인 등을 포함한다. 예를 들어, 흑색종이 발생할 위험이 있는 대상체는 과도한 일광 노출(자외선 조사), 창백한 피부(fair skin), 많은 수의 반점(형성이상 반점), 환자 표현형, 가족력, 또는 이전 흑색종 병력을 포함한다. 따라서, 암이 발생할 위험이 있는 대상체는 생활 방식, 직업, 환경 인자, 가족력, 및 종양 관련 유전자, 유전자 결실 또는 유전자 변이에 대한 유전적 스크린에 의해 확인될 수 있다. 유방암이 발생할 위험이 있는 대상체는, 예를 들어, *Brca1*이 결핍되어 있다. 결장암이 발생할 위험이 있는 대상체는 이른 연령 또는 고 빈도의 폴립 형성, 또는 결실되거나 변이된 종양 억제 유전자, 예를 들어, 선종성 결장폴립증(*APC*)을 갖는다.

[0292] 대상체는 또한 다른 치료에서 제외된 대상체를 포함한다. 예를 들어, 특정 대상체는 외과적 절제, 화학요법, 면역요법, 이온화 또는 화학적 방사선요법, 국소 또는 국부 열(고열) 요법, 또는 예방접종, 또는 예방접종에 대해 양호한 후보가 아닐 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 치료를 위한 후보 대상체는 외과적 절제, 화학요법, 면역요법, 이온화 또는 화학적 방사선요법, 국소 또는 국부 열(고열) 요법, 또는 예방접종, 또는 예방접종에 대한 후보가 아닌 대상체를 포함한다.

[0293] 컨쥬게이트는 단위 용량 또는 단위 투여량 형태로 제형화될 수 있다. 특정 구체예에서, 컨쥬게이트는 요망되지 않거나 비정상적인 세포 증식 또는 과증식 장애를 갖는 대상체를 치료하는데 효과적인 것으로 예상되는 양으로 존재한다. 추가의 특정 구체예에서, 컨쥬게이트는 전이성 또는 비전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물을 갖는 대상체를 치료하는데 효과적인 것으로 예상되는 양으로 존재한다. 예시적인 단위 용량은 약 1-25, 25-250, 250-500, 500-1000, 1000-2500, 2500-5000, 5000-25,000, 5000-50,000 μg; 및 약 1-25, 25-250, 250-500,

500-1000, 1000-2500 또는 2500-5000, 5000-25,000, 5000-50,000 또는 50,000-100,000 mg의 범위이다.

[0294] 본 발명의 컨쥬게이트 및 방법 및 용도는 시험관내, 생체외 또는 생체내에서 접촉되거나 제공될 수 있다. 컨쥬게이트는를 투여하여, 예를 들어, 효과적이거나 충분한 양으로, 단일 또는 다중 투여량으로서 의도된 효과를 제공할 수 있다. 예시적 용량은 연속하는 날, 또는 격일이나 간헐적으로 약 1-25, 25-250, 250-500, 500-1000, 1000-2500 또는 2500-5000, 5000-25,000, 5000-50,000, 또는 50,000-100,000 μg/kg의 범위이다. 단일 또는 다중 용량은 연속하는 날, 또는 격일이나 간헐적으로 투여될 수 있다.

[0295] 컨쥬게이트는 전신, 국부 또는 국소 투여를 통해 임의의 경로로 투여될 수 있고, 방법 또한 그렇게 실시될 수 있다. 예를 들어, 컨쥬게이트는 전신, 국부 또는 국소, 정맥내, 경구(예를 들어, 섭취 또는 흡입), 근내, 복막내, 피내, 피하, 공동내, 두개내, 경피(국소), 비경구, 예를 들어, 경점막 또는 직장으로 투여될 수 있다. 약학적 제형을 포함하는 본 발명의 조성물 및 방법 및 용도는 (미세)캡슐화된 전달 시스템을 통해 투여되거나, 투여용 임플란트로 패키징될 수 있다.

[0296] 본 발명은 컨쥬게이트 및 컨쥬게이트가 약학적 조성물에 포함되는 방법 및 용도를 추가로 제공한다. 약학적 조성물은 "약학적으로 허용되는" 및 "생리학적으로 허용되는" 담체, 희석제 또는 부형제를 나타낸다. 본원에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용되는" 및 "생리학적으로 허용되는"은 담체, 희석제 또는 부형제를 언급할 때 약학적 투여 및 제형의 다른 성분과 상용되는 용매(수성 또는 비수성), 세제, 용액, 에멀젼, 분산 매질, 코팅, 등장화제 및 흡수 촉진제 또는 지연제를 포함한다. 상기 제형은 정제(코팅되거나 비코팅됨), 캡슐(경질 또는 연질), 마이크로비드, 에멀젼, 분말, 과립, 결정, 현탁액, 시럽 또는 엘릭서(elixir)에 함유될 수 있다.

[0297] 약학적 조성물은 특정 투여 경로 또는 용도와 상용되도록 제형화될 수 있다. 비경구, 피내, 또는 피하 투여용 조성물은 멸균 희석제, 예를 들어, 물, 염수 용액, 고정유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 합성 용매를 포함할 수 있다. 제조물은 미생물 성장을 예방하기 위한 하나 이상의 보존제를 함유할 수 있다(예를 들어, 벤질 알코올 또는 메틸 파라벤과 같은 항균제; 아스코르브산 또는 소듐 바이설파이트와 같은 항산화제; 에틸렌디아민테트라아세트산과 같은 킬레이트화제; 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트와 같은 완충제 및 염화나트륨 또는 덱스토로스와 같은 긴장성 조정제).

[0298] 주사용 약학적 조성물은 주사가능한 멸균 용액 또는 분산액의 즉시 제조를 위한 멸균 용액(수용성인 경우) 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다. 정맥내 투여를 위해, 적합한 담체는 생리학적 염수, 정균수, 크레모포르(Cremophor) EL™(BASF, Parsippany, NJ) 또는 인산염 완충된 염수(PBS)를 포함한다. 담체는, 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 폴리에틸렌 글리콜), 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 유동성은, 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅을 사용하거나, 계면활성제를 이용하여 유지될 수 있다. 항균제 및 항진균제는, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산 및 티메로살을 포함한다. 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함시켜 주사가능한 조성물의 흡수를 연장시킬 수 있다. 폴리소르베이트 20 및 폴리소르베이트 80이, 예를 들어, 1% 이하로 제형 혼합물에 첨가될 수 있다. 다른 비제한적인 첨가제는 히스티딘 HCl, α,α-트레할로스 데하이드레이트를 포함한다.

[0299] 추가의 약학적 제형 및 전달 시스템이 당업자에게 공지되어 있고, 본 발명의 방법에 적용될 수 있다(예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA; The Merck Index (1996) 12th ed., Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ; Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms, Technonic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa., (1993); and Poznansky, *et al.*, Drug Delivery Systems, R. L. Juliano, ed., Oxford, N.Y. (1980), pp. 253-315] 참조).

[0300] 본 발명은 적합한 패키징 재료에 패키징된 본 발명의 컨쥬게이트, 조합 조성물 및 이의 약학적 제형을 포함하는 키트를 제공한다. 키트는 성분들의 설명 또는 그 안에 있는 성분들의 시험관내, 생체내 또는 생체외 사용을 위한 설명서를 포함하는 라벨 또는 패키징 삽입물을 임의로 포함한다. 예시적인 설명서는 세포의 증식을 감소시키거나 억제하거나, 요망되지 않거나 비정상적인 세포, 예를 들어, 과증식하는 세포의 증식을 감소시키거나 억제하거나, 전이성 또는 비-전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물 세포의 증식을 감소시키거나 억제하거나, 과증식 장애를 갖는 대상체를 치료하거나, 전이성 또는 비-전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물을 갖는 대상체를 치료하거나, 동물의 생식능력을 감소시키기 위한 설명서를 포함한다.

[0301] 키트는 이러한 성분들의 수집물, 예를 들어, 둘 이상의 컨쥬게이트를 단독으로 또는 치료적으로 유용한 또 다른 조성물과 함께(예를 들어, 항-증식 또는 면역-향상 약물) 함유할 수 있다.

[0302] 용어 "패키징 재료"는 키트의 성분들을 담고 있는 물리적 구조를 나타낸다. 패키징 재료는 성분들을 멸균상태로 유지할 수 있고, 상기 목적에 일반적으로 이용되는 재료로 이루어질 수 있다(예를 들어, 종이, 파형 섬유, 유리, 플라스틱, 호일, 앰풀, 바이얼, 튜브 등).

[0303] 본 발명의 키트는 라벨 또는 삽입물을 포함할 수 있다. 라벨 또는 삽입물은 "인쇄된 물질", 예를 들어, 종이 또는 카드보드를 포함하거나, 분리되거나, 성분, 키트 또는 패키징 재료(예를 들어, 박스)에 고정되거나, 키트 성분을 함유하는 앰플, 튜브 또는 바이알에 부착된다. 라벨 또는 삽입물은 컴퓨터 판독가능한 매체, 광학 디스크, 예를 들어, CD- 또는 DVD-ROM/RAM, DVD, MP3, 자기 테이프, 또는 전기 저장 매체, 예를 들어, RAM 및 ROM 또는 이들의 하이브리드, 예를 들어, 자기/광학 저장 매체, FLASH 매체 또는 기억 유형 카드를 추가로 포함할 수 있다.

[0304] 라벨 또는 삽입물은 그 안에 있는 하나 이상의 성분들의 정보, 용량, 작용 메카니즘을 포함하는 활성 성분(들)의 임상적 약리학, 약동학 및 약역학을 규명하는 것을 포함할 수 있다. 라벨 또는 삽입물은 제조업체 정보, 로트 번호, 제조업체 위치 및 날짜를 확인하는 정보를 포함할 수 있다.

[0305] 라벨 및 삽입물은 키트 성분이 사용될 수 있는 질환, 장애, 질병 또는 증상에 대한 정보를 포함할 수 있다. 라벨 또는 삽입물은 방법, 치료 프로토콜 또는 치료 섭생에 키트 성분 중 하나 이상을 임상의 또는 대상체가 사용하도록 하는 설명서를 포함할 수 있다. 설명서는 투여량, 빈도 또는 기간, 및 본원에 기재된 임의의 방법, 치료 프로토콜 또는 치료 섭생을 실시하기 위한 설명들을 포함할 수 있다. 예시적인 설명서는 요망되지 않거나 비정상적인 세포 증식, 과증식하는 세포 및 장애(예를 들어, 전이성 또는 비-전이성 종양, 암, 악성종양 또는 신생물)을 치료하기 위한 설명서를 포함한다. 따라서, 본 발명의 키트는 본원에 기재된 본 발명의 임의의 방법 및 용도를 실시하기 위한 라벨 또는 설명서를 추가로 포함할 수 있다.

[0306] 라벨 또는 삽입물은 성분이 제공할 수 있는 임의의 이익, 예를 들어, 예방적 또는 치료적 이익에 대한 정보를 포함할 수 있다. 라벨 또는 삽입물은 특정 조성물을 사용하는 것이 적절하지 않을 상황들과 관련하여 대상체 또는 임상의에 대한 경고와 같은 잠재적인 유해한 부작용에 대한 정보를 포함할 수 있다. 유해한 부작용은 또한 대상체가 조성물과 상용되지 않을 수 있는 하나 이상의 다른 약물을 지니거나, 섭취할 것이거나 현재 섭취하고 있는 경우, 또는 대상체가 조성물과 상용되지 않을 또 다른 치료 프로토콜 또는 치료 섭생을 받고 있거나, 받을 것이거나 현재 받고 있는 경우에 발생할 수 있으므로, 따라서 설명서는 그러한 비상용성에 대한 정보를 포함할 수 있었다.

[0307] 본 발명의 키트는 다른 성분을 추가로 포함할 수 있다. 키트의 각각의 성분은 개별적 컨테이너에 동봉될 수 있거나, 다양한 컨테이너가 모두 단일 패키지 내에 있을 수 있다. 본 발명의 키트는 냉장 저장을 위해 설계될 수 있다. 본 발명의 키트는 본 발명의 컨쥬게이트를 발현시키는 숙주 세포를 함유하거나, 컨쥬게이트를 인코딩하는 핵산을 함유하도록 추가로 설계될 수 있다. 키트의 세포는 세포가 사용 준비가 될 때까지 적합한 저장 조건하에 유지될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 세포를 포함하는 키트는 세포가 해동 및 성장할 수 있도록 적절한 세포 저장 매질을 함유할 수 있다.

[0308] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 개시된 것들과 유사하거나 동등한 방법 및 물질들이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있으나, 적합한 방법 및 물질은 본원에 기재되어 있다.

[0309] 본원에 인용된 모든 출원, 공개, 특허 및 기타 참조문헌, GenBank 인용 및 ATCC 인용은 그 전체내용이 본원에 참조로서 포함된다. 상충되는 경우, 정의를 포함하는 본 명세서가 우선할 것이다.

[0310] 본원에서 사용된 단수 형태는 문맥에서 명확히 달리 지시되지 않는 한 복수의 지시 대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어 "컨쥬게이트" 또는 "표적(예를 들어, 수용체)" 또는 "용해 도메인"은 복수의 그러한 컨쥬게이트, 표적, 또는 용해 도메인 등을 포함한다.

[0311] 본원에서 사용되는 숫자 값은 본 문헌 전체에 걸쳐 범위 형식으로 종종 제공된다. 범위 형식의 사용은 단지 편의 및 간결함을 위한 것으로, 문맥에서 명확히 달리 지시되지 않는 한 본 발명의 범위에 대한 변치않는 제한으로 해석되어선 안 된다. 따라서, 범위는, 문맥에서 명확히 달리 지시되지 않는 한 모든 가능한 하위범위, 상기 범위 내의 모든 개별적 숫자 값, 및 상기 범위 내의 정수 및 범위 내의 값 또는 정수의 분획을 포함하는 모든 숫자 값 또는 숫자 범위를 명백히 포함한다. 상기 구성은 범위의 폭과 상관없이 본 특허 문헌 전체에 걸친 모든 상황에서 적용된다. 따라서, 예를 들어, 90-100%의 범위에 대한 언급은 91-99%, 92-98%, 93-95%, 91-98%, 91-97%, 91-96%, 91-95%, 91-94%, 91-93% 등을 포함한다. 90-100%의 범위에 대한 언급은 또한 91%, 92%, 93%,

94%, 95%, 95%, 97% 등, 뿐만 아니라 91.1%, 91.2%, 91.3%, 91.4%, 91.5% 등, 92.1%, 92.2%, 92.3%, 92.4%, 92.5% 등을 포함한다.

[0312] 또한, 1-5,000배의 범위에 대한 언급은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20배 등, 뿐만 아니라 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5배 등, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5배 등, 및 상기 범위 내의 임의의 숫자 범위, 예를 들어, 1-2, 5-10, 10-50, 50-100, 100-500, 100-1000, 500-1000, 1000-2000, 1000-5000배 등을 포함한다. 추가 예에서, KD 10^{-5} M 내지 약 KD 10^{-13} M의 범위에 대한 언급은 상기 값 내이거나 상기 값을 포함하는 임의의 숫자 값 또는 범위를 포함한다.

[0313] 또한, 본원에서 사용되는 바와 같은 일련의 범위가 본 문헌 전체에 걸쳐 개시된다. 일련의 범위의 사용은 또 다른 범위를 제공하기 위해 상한 및 하한 범위의 조합을 포함한다. 상기 구성은 범위의 폭과 상관없이 본 특허 문헌 전체에 걸친 모든 상황에서 적용된다. 따라서, 예를 들어, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-75, 75-100, 100-150, 및 150-171과 같은 일련의 범위에 대한 언급은 5-20, 5-30, 5-40, 5-50, 5-75, 5-100, 5-150, 5-171, 및 10-30, 10-40, 10-50, 10-75, 10-100, 10-150, 10-171, 및 20-40, 20-50, 20-75, 20-100, 20-150, 20-171 등과 같은 범위를 포함한다.

[0314] 본 발명은 다수의 구체예를 기재하기 위해 단정적인 언어를 이용하여 본원에 일반적으로 개시되었다. 본 발명은 또한 물질 또는 재료, 방법 단계 및 조건, 프로토콜, 절차, 검정 또는 분석과 같이 특정 대상 물질이 완전히 또는 부분적으로 제외된 구체예를 특히 포함한다. 따라서, 본 발명은 일반적으로 본 발명이 포함하지 않는 것과 관련하여 본원에서 표현되지 않지만, 그럼에도 불구하고 본 발명에서 명백하게 포함되지 않은 양태가 본원에 개시된다.

[0315] 본 발명의 다수의 구체예가 기재되었다. 그럼에도 불구하고, 다양한 변형이 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않으며 이루어질 수 있는 것으로 이해될 것이다. 따라서, 하기 실시예는 청구범위에 기재된 본 발명의 범위를 설명하기 위한 것이며 이를 제한하지 않는다.

[0316] **실시예**

[0317] *실시예 1*

[0318] 본 실시예는 시험관내 연구에서 용해 펩티드 Phor18(KFAKFAK KFAKFAK KFAK) 또는 $(KLAKLAK)_2KLAK$(SEQ ID NO.:74)에 컨쥬게이션된 Her-2 수용체에 대한 재조합적으로 생성된 항체(항체로서) scFv-C_H3의 세포독성을 결정하기 위한 것이었다. 다양한 링커(GS 및 NRVRRS(SEQ ID NO.:75)) 및 항체 분자 당 용해 펩티드의 1 또는 2개의 분자를 연구하였다.

[0319] 연구된 펩티드는 다음과 같다: Phor18-scFv-C_H3-Phor18 (항체의 N-말단 및 C-말단에서 연결된 Phor-18의 2개의 분자), scFv-C_H3-GS-Phor18 (GS 링커에 의해 C-말단에서 항체에 연결된 Phor18의 한 분자), scFv-C_H3-GS-$(KLAKLAK)_2KLAK$ (SEQ ID NO.:74)(GS 링커에 의해 C-말단에서 항체에 연결된 $(KLAKLAK)_2KLAK$(SEQ ID NO.:74)의 한 분자), scFv-C_H3--NRVRRS(SEQ ID NO.:75)-Phor18 (NRVRRS 링커에 의해 C-말단에서 항체에 연결된 Phor18의 한 분자), 및 scFv-C_H3-NRVRRS-$(KLAKLAK)_2KLAK$(SEQ ID NO.:74)(NRVRRS 링커에 의해 C-말단에서 항체에 연결된 $(KLAKLAK)_2KLAK$(SEQ ID NO.:74)의 한 분자). 세포독성을 Her-2 수용체 양성 세포(SKBR-3 및 SKOV-3, 각각 인간 유방암 및 난소암 세포) 및 Her-2 수용체 음성 유방암 세포(MDA-MB-231)에서 네이키드 항체(용해 펩티드가 없는 항체)와 비교하였다.

[0320] *실시예 2*

[0321] 본 실시예는 본원에 기재된 연구에서 사용되는 다양한 재료 및 방법을 기재한다.

[0322] 재료: 에스케리키아 콜리(*Escherichia coli*)에서 재조합 항체로서 항-Her2/neu 항체를 합성하기 위해 재조합 DNA 기술을 이용하였다. scFv-C_H3 항체(Olafsen T. et al Protein Engineering, Design & Selection 17, 315-323, 2004)를 표 1에 기재된 바와 같이 펩티드 링커를 통해 또는 링커 없이 Phor18 또는 양친매성 알파-헬리칼 용해 펩티드 $(KLAKLAK)_2KLAK$(SEQ ID NO.:74)에 컨쥬게이션시키고, 시험관 내에서 세포독성에 대해 분석하였다. 플라스미드를 유전자 코돈 최적화를 통해 획득하였다. 유전자를 N-His 태그 서열을 갖도록 합성하고, 플라스미드를 E. 콜리 박테리아 발현 벡터 pUC57로 서브클로닝하였다. 발현 최적화 및 평가 후, His-태그 생성물을 선

택하고, 1 L의 박테리아 발현 생성물을 1-단계 친화성 정제로 정제하였다. 각각의 작제물에 대한 플라스미드 유전자 삽입물의 서열은 표 1에 기재되어 있다.

[0323] **표 1:** 각각의 재조합 Her2/neu 항체 및 항체 컨쥬게이트의 생성을 위한 플라스미드 삽입물의 뉴클레오티드 서열.

[0324] 1. Her2/neu scFv-C_H3: (SEQ ID NO.:76)

```
1       CATATGCATC ACCACCACCA CCACGACGAC GACGACAAAG ATATTCAAAT GACCCAGTCC
61      CCGAGCAGCC TGAGTGCCTC CGTTGGCGAC CGCGTGACCA TTACGTGCCG TGCGAGCCAG
121     GATGTCAACA CCGCGGTGGC CTGGTATCAG CAAAAACCGG GCAAAGCGCC GAAACTGCTG
181     ATCTATTCAG CCTCGTTTCT GTACAGCGGT GTTCCGTCTC GTTTCAGCGG CTCTCGCAGT
241     GGTACCGATT TTACCCTGAC GATTAGCTCT CTGCAGCCGG AAGACTTTGC GACGTATTAC
301     TGCCAGCAAC ATTACACCAC GCCGCCGACC TTCGGCCAGG GTACGAAAGT GGAAATCAAA
361     GGTTCCACCT CAGGCGGTGG CAGTGGTGGC GGTTCCGGCG GTGGCGGTAG TTCCGAAGTT
421     CAGCTGGTCG AAAGTGGCGG TGGCCTGGTT CAACCGGGTG GCTCACTGCG TCTGTCGTGT
481     GCAGCAAGCG GTTTCAACAT CAAAGATACC TACATCCACT GGGTTCGTCA GGCGCCGGGC
541     AAAGGTCTGG AATGGGTCGC CCGCATTTAC CCGACCAATG GCTATACGCG TTACGCAGAT
601     AGCGTGAAAG GTCGCTTTAC CATCTCTGCG GACACCAGTA AAAACACGGC CTATCTGCAG
661     ATGAATAGCC TGCGTGCGGA AGATACGGCC GTTTATTACT GCTCTCGCTG GGGTGGCGAT
721     GGCTTCTATG CTATGGACTA CTGGGGCCAG GGTACCCTGG TGACGGTTTC ATCGGGTCAG
781     CCGCGTGAAC CGCAAGTGTA TACCCTGCCG CCGTCACGCG ATGAACTGAC GAAAAACCAG
841     GTGTCGCTGA CGTGTCTGGT TAAAGGCTTT TACCCGAGCG ACATCGCGGT TGAATGGGAA
901     TCTAATGGTC AACCGGAAAA CAATTATAAA ACCACGCCGC CGGTCCTGGA TAGTGACGGC
961     TCCTTTTTCC TGTACAGTAA ACTGACCGTG GATAAATCCC GTTGGCAGCA GGGTAACGTC
1021    TTCTCGTGTA GCGTGATGCA TGAAGCCCTG CATAATCACT ATACCCAGAA ATCTCTGAGT
1081    CTGTCCCCGG GCAAAGGTTC AACGTCGGGT GGCGGTTCCG GCGGTGGCTC AGGTGGCGGT
1141    GGCAGCTCTG GCCAACCGCG CGAACCGCAG GTTTACACCC TGCCGCCGAG CCGTGACGAA
1201    CTGACCAAAA ACCAAGTCAG CCTGACGTGC CTGGTGAAAG GCTTTTACCC GAGTGACATT
1261    GCAGTTGAAT GGGAATCCAA TGGTCAGCCG GAAAATAACT ACAAAACGAC GCCGCCGGTT
1321    CTGGATTCAG ACGGCTCGTT TTTCCTGTAC TCAAAACTGA CCGTCGATAA ATCGCGCTGG
1381    CAACAGGGTA ACGTTTTCAG CTGCTCTGTC ATGCACGAAG CCCTGCACAA CCATTATACC
1441    CAGAAAAGTC TGTCCCTGTC ACCGGGCAAA GAAGTGCAGC TGGTTGAATC TGGTGGCGGT
1501    CTGGTGCAAC CGGGCGGTTC GCTGCGTCTG AGCTGTGCAG CTTCTGGCTT TAATATTAAA
1561    GACACGTACA TCCACTGGGT GCGTCAGGCA CCGGGTAAAG GCCTGGAATG GGTTGCTCGT
1621    ATCTATCCGA CGAACGGTTA TACGCGTTAC GCCGATAGCG TCAAAGGCCG TTTTACCATC
1681    AGTGCAGACA CCTCCAAAAA CACGGCTTAT CTGCAGATGA ATAGTCTGCG TGCAGAAGAT
1741    ACCGCTGTTT ATTACTGCAG CCGCTGGGGC GGTGATGGCT TCTATGCAAT GGATTATTGG
1801    GGTCAAGGTA CCCTGGTCAC CGTGAGTTCC GGTTCGACCA GCGGCGGTGG CTCAGGTGGC
1861    GGTTCGGGCG GTGGCGGTTC ATCGGACATT CAGATGACGC AAAGCCCGAG CTCTCTGTCT
1921    GCGAGTGTTG GCGATCGTGT CACCATCACG TGTCGCGCCT CTCAGGACGT GAATACCGCA
1981    GTTGCTTGGT ACCAACAAAA ACCGGGCAAA GCACCGAAAC TGCTGATTTA CTCCGCTTCA
2041    TTCCTGTACA GCGGTGTGCC GTCTCGTTTT TCGGGCAGCC GCTCTGGTAC CGATTTCACC
2101    CTGACGATTA GTTCCCTGCA ACCGGAAGAT TTCGCCACCT ACTACTGCCA GCAACACTAT
2161    ACGACCCCGC CGACGTTTGG TCAGGGCACG AAAGTGGAAA TTAAATAATG AAAGCTT
```

[0325]

[0326] 2. scFv-C_H3-GS-Phor18: (SEQ ID NO.:77)

```
1       CATATGCATC ACCACCACCA CCACGACGAC GACGACAAAG ATATTCAAAT GACCCAGTCC
61      CCGAGCAGCC TGAGTGCCTC CGTTGGCGAC CGCGTGACCA TTACGTGCCG TGCGAGCCAG
121     GATGTCAACA CCGCGGTGGC CTGGTATCAG CAAAAACCGG GCAAAGCGCC GAAACTGCTG
181     ATCTATTCAG CCTCGTTTCT GTACAGCGGT GTTCCGTCTC GTTTCAGCGG CTCTCGCAGT
241     GGTACCGATT TTACCCTGAC GATTAGCTCT CTGCAGCCGG AAGACTTTGC GACGTATTAC
301     TGCCAGCAAC ATTACACCAC GCCGCCGACC TTCGGCCAGG GTACGAAAGT GGAAATCAAA
361     GGTTCCACCT CAGGCGGTGG CAGTGGTGGC GGTTCCGGCG GTGGCGGTAG TTCCGAAGTT
421     CAGCTGGTCG AAAGTGGCGG TGGCCTGGTT CAACCGGGTG GCTCACTGCG TCTGTCGTGT
481     GCAGCAAGCG GTTTCAACAT CAAAGATACC TACATCCACT GGGTTCGTCA GGCGCCGGGC
541     AAAGGTCTGG AATGGGTCGC CCGCATTTAC CCGACCAATG GCTATACGCG TTACGCAGAT
601     AGCGTGAAAG GTCGCTTTAC CATCTCTGCG GACACCAGTA AAAACACGGC CTATCTGCAG
661     ATGAATAGCC TGCGTGCGGA AGATACGGCC GTTTATTACT GCTCTCGCTG GGGTGGCGAT
721     GGCTTCTATG CTATGGACTA CTGGGGCCAG GGTACCCTGG TGACGGTTTC ATCGGGTCAG
781     CCGCGTGAAC CGCAAGTGTA TACCCTGCCG CCGTCACGCG ATGAACTGAC GAAAAACCAG
841     GTGTCGCTGA CGTGTCTGGT TAAAGGCTTT TACCCGAGCG ACATCGCGGT TGAATGGGAA
901     TCTAATGGTC AACCGGAAAA CAATTATAAA ACCACGCCGC CGGTCCTGGA TAGTGACGGC
961     TCCTTTTTCC TGTACAGTAA ACTGACCGTG GATAAATCCC GTTGGCAGCA GGGTAACGTC
1021    TTCTCGTGTA GCGTGATGCA TGAAGCCCTG CATAATCACT ATACCCAGAA ATCTCTGAGT
1081    CTGTCCCCGG GCAAAGGTTC AACGTCGGGT GGCGGTTCCG GCGGTGGCTC AGGTGGCGGT
1141    GGCAGCTCTG GCCAACCGCG CGAACCGCAG GTTTACACCC TGCCGCCGAG CCGTGACGAA
1201    CTGACCAAAA ACCAAGTCAG CCTGACGTGC CTGGTGAAAG GCTTTTACCC GAGTGACATT
1261    GCAGTTGAAT GGGAATCCAA TGGTCAGCCG GAAAATAACT ACAAAACGAC GCCGCCGGTT
1321    CTGGATTCAG ACGGCTCGTT TTTCCTGTAC TCAAAACTGA CCGTCGATAA ATCGCGCTGG
1381    CAACAGGGTA ACGTTTTCAG CTGCTCTGTC ATGCACGAAG CCCTGCACAA CCATTATACC
1441    CAGAAAAGTC TGTCCCTGTC ACCGGGCAAA GAAGTGCAGC TGGTTGAATC TGGTGGCGGT
1501    CTGGTGCAAC CGGGCGGTTC GCTGCGTCTG AGCTGTGCAG CTTCTGGCTT TAATATTAAA
1561    GACACGTACA TCCACTGGGT GCGTCAGGCA CCGGGTAAAG GCCTGGAATG GGTTGCTCGT
1621    ATCTATCCGA CGAACGGTTA TACGCGTTAC GCCGATAGCG TCAAAGGCCG TTTTACCATC
1681    AGTGCAGACA CCTCCAAAAA CACGGCTTAT CTGCAGATGA ATAGTCTGCG TGCAGAAGAT
1741    ACCGCTGTTT ATTACTGCAG CCGCTGGGGC GGTGATGGCT TCTATGCAAT GGATTATTGG
1801    GGTCAAGGTA CCCTGGTCAC CGTGAGTTCC GGTTCGACCA GCGGCGGTGG CTCAGGTGGC
1861    GGTTCGGGCG GTGGCGGTTC ATCGGACATT CAGATGACGC AAAGCCCGAG CTCTCTGTCT
1921    GCGAGTGTTG GCGATCGTGT CACCATCACG TGTCGCGCCT CTCAGGACGT GAATACCGCA
1981    GTTGCTTGGT ACCAACAAAA ACCGGGCAAA GCACCGAAAC TGCTGATTTA CTCCGCTTCA
2041    TTCCTGTACA GCGGTGTGCC GTCTCGTTTT TCGGGCAGCC GCTCTGGTAC CGATTTCACC
2101    CTGACGATTA GTTCCCTGCA ACCGGAAGAT TTCGCCACCT ACTACTGCCA GCAACACTAT
2161    ACGACCCCGC CGACGTTTGG TCAGGGCACG AAAGTGGAAA TTAAAGGCAG CAAATTTGCG
2221    AAATTCGCCA AAAAATTCGC AAAATTCGCG AAAAAATTCG CGAAATAATG AAAGCTT
```

[0327]

[0328] 3. scFv-C_H3-GS-(KLAKLAK)$_2$KLAK: (SEQ ID NO.:78)

```
1       CATATGGAAA ATCTGTATTT CCAAGGTGAT ATTCAAATGA CCCAGTCCCC GAGCAGCCTG
61      AGTGCCTCCG TTGGCGACCG CGTGACCATT ACGTGCCGTG CGAGCCAGGA TGTCAACACC
121     GCGGTGGCCT GGTATCAGCA AAAACCGGGC AAAGCGCCGA AACTGCTGAT CTATTCAGCC
181     TCGTTTCTGT ACAGCGGTGT TCCGTCTCGT TTCAGCGGCT CTCGCAGTGG TACCGATTTT
241     ACCCTGACGA TTAGCTCTCT GCAGCCGGAA GACTTTGCGA CGTATTACTG CCAGCAACAT
301     TACACCACGC CGCCGACCTT CGGCCAGGGT ACGAAAGTGG AAATCAAAGG TTCCACCTCA
361     GGCGGTGGCA GTGGTGGCGG TTCCGGCGGT GGCGGTAGTT CCGAAGTTCA GCTGGTCGAA
421     AGTGGCGGTG GCCTGGTTCA ACCGGGTGGC TCACTGCGTC TGTCGTGTGC AGCAAGCGGT
481     TTCAACATCA AAGATACCTA CATCCACTGG GTTCGTCAGG CGCCGGGCAA AGGTCTGGAA
541     TGGGTCGCCC GCATTTACCC GACCAATGGC TATACGCGTT ACGCAGATAG CGTGAAAGGT
601     CGCTTTACCA TCTCTGCGGA CACCAGTAAA AACACGGCCT ATCTGCAGAT GAATAGCCTG
661     CGTGCGGAAG ATACGGCCGT TTATTACTGC TCTCGCTGGG GTGGCGATGG CTTCTATGCT
721     ATGGACTACT GGGGCCAGGG TACCCTGGTG ACGGTTTCAT CGGGTCAGCC GCGTGAACCG
781     CAAGTGTATA CCCTGCCGCC GTCACGCGAT GAACTGACGA AAAACCAGGT GTCGCTGACG
841     TGTCTGGTTA AAGGCTTTTA CCCGAGCGAC ATCGCGGTTG AATGGGAATC TAATGGTCAA
901     CCGGAAAACA ATTATAAAAC CACGCCGCCG GTCCTGGATA GTGACGGCTC CTTTTTCCTG
961     TACAGTAAAC TGACCGTGGA TAAATCCCGT TGGCAGCAGG GTAACGTCTT CTCGTGTAGC
1021    GTGATGCATG AAGCCCTGCA TAATCACTAT ACCCAGAAAT CTCTGAGTCT GTCCCCGGGC
1081    AAAGGTTCAA CGTCGGGTGG CGGTTCCGGC GGTGGCTCAG GTGGCGGTGG CAGCTCTGGC
1141    CAACCGCGCG AACCGCAGGT TTACACCCTG CCGCCGAGCC GTGACGAACT GACCAAAAAC
1201    CAAGTCAGCC TGACGTGCCT GGTGAAAGGC TTTTACCCGA GTGACATTGC AGTTGAATGG
1261    GAATCCAATG GTCAGCCGGA AAATAACTAC AAAACGACGC CGCCGGTTCT GGATTCAGAC
1321    GGCTCGTTTT TCCTGTACTC AAAACTGACC GTCGATAAAT CGCGCTGGCA ACAGGGTAAC
1381    GTTTTCAGCT GCTCTGTCAT GCACGAAGCC CTGCACAACC ATTATACCCA GAAAAGTCTG
1441    TCCCTGTCAC CGGGCAAAGA AGTGCAGCTG GTTGAATCTG GTGGCGGTCT GGTGCAACCG
1501    GGCGGTTCGC TGCGTCTGAG CTGTGCAGCT TCTGGCTTTA ATATTAAAGA CACGTACATC
1561    CACTGGGTGC GTCAGGCACC GGGTAAAGGC CTGGAATGGG TTGCTCGTAT CTATCCGACG
1621    AACGGTTATA CGCGTTACGC CGATAGCGTC AAAGGCCGTT TTACCATCAG TGCAGACACC
1681    TCCAAAAACA CGGCTTATCT GCAGATGAAT AGTCTGCGTG CAGAAGATAC CGCTGTTTAT
1741    TACTGCAGCC GCTGGGGCGG TGATGGCTTC TATGCAATGG ATTATTGGGG TCAAGGTACC
1801    CTGGTCACCG TGAGTTCCGG TTCGACCAGC GGCGGTGGCT CAGGTGGCGG TTCGGGCGGT
1861    GGCGGTTCAT CGGACATTCA GATGACGCAA AGCCCGAGCT CTCTGTCTGC GAGTGTTGGC
1921    GATCGTGTCA CCATCACGTG TCGCGCCTCT CAGGACGTGA ATACCGCAGT TGCTTGGTAC
1981    CAACAAAAAC CGGGCAAAGC ACCGAAACTG CTGATTTACT CCGCTTCATT CCTGTACAGC
2041    GGTGTGCCGT CTCGTTTTTC GGGCAGCCGC TCTGGTACCG ATTTCACCCT GACGATTAGT
2101    TCCCTGCAAC CGGAAGATTT CGCCACCTAC TACTGCCAGC AACACTATAC GACCCCGCCG
2161    ACGTTTGGTC AGGGCACGAA AGTGGAAATT AAAGGCAGCA AACTGGCGAA ACTGGCCAAA
2221     AAACTGGCAA AACTGGCGAA AAAACTGGCG AAATAATGAA AGCTT
```

[0329]

[0330] 4. scFv-C_H3-NRVRRS-Phor18: (SEQ ID NO.:79)

```
1       CATATGGAAA ATCTGTATTT CCAAGGTGAT ATTCAAATGA CCCAGTCCCC GAGCAGCCTG
61      AGTGCCTCCG TTGGCGACCG CGTGACCATT ACGTGCCGTG CGAGCCAGGA TGTCAACACC
121     GCGGTGGCCT GGTATCAGCA AAAACCGGGC AAAGCGCCGA AACTGCTGAT CTATTCAGCC
181     TCGTTTCTGT ACAGCGGTGT TCCGTCTCGT TTCAGCGGCT CTCGCAGTGG TACCGATTTT
241     ACCCTGACGA TTAGCTCTCT GCAGCCGGAA GACTTTGCGA CGTATTACTG CCAGCAACAT
301     TACACCACGC CGCCGACCTT CGGCCAGGGT ACGAAAGTGG AAATCAAAGG TTCCACCTCA
361     GGCGGTGGCA GTGGTGGCGG TTCCGGCGGT GGCGGTAGTT CCGAAGTTCA GCTGGTCGAA
421     AGTGGCGGTG GCCTGGTTCA ACCGGGTGGC TCACTGCGTC TGTCGTGTGC AGCAAGCGGT
481     TTCAACATCA AAGATACCTA CATCCACTGG GTTCGTCAGG CGCCGGGCAA AGGTCTGGAA
541     TGGGTCGCCC GCATTTACCC GACCAATGGC TATACGCGTT ACGCAGATAG CGTGAAAGGT
601     CGCTTTACCA TCTCTGCGGA CACCAGTAAA AACACGGCCT ATCTGCAGAT GAATAGCCTG
661     CGTGCGGAAG ATACGGCCGT TTATTACTGC TCTCGCTGGG GTGGCGATGG CTTCTATGCT
721     ATGGACTACT GGGGCCAGGG TACCCTGGTG ACGGTTTCAT CGGGTCAGCC GCGTGAACCG
781     CAAGTGTATA CCCTGCCGCC GTCACGCGAT GAACTGACGA AAAACCAGGT GTCGCTGACG
841     TGTCTGGTTA AAGGCTTTTA CCCGAGCGAC ATCGCGGTTG AATGGGAATC TAATGGTCAA
901     CCGGAAAACA ATTATAAAAC CACGCCGCCG GTCCTGGATA GTGACGGCTC CTTTTTCCTG
961     TACAGTAAAC TGACCGTGGA TAAATCCCGT TGGCAGCAGG GTAACGTCTT CTCGTGTAGC
1021    GTGATGCATG AAGCCCTGCA TAATCACTAT ACCCAGAAAT CTCTGAGTCT GTCCCCGGGC
1081    AAAGGTTCAA CGTCGGGTGG CGGTTCCGGC GGTGGCTCAG GTGGCGGTGG CAGCTCTGGC
1141    CAACCGCGCG AACCGCAGGT TTACACCCTG CCGCCGAGCC GTGACGAACT GACCAAAAAC
1201    CAAGTCAGCC TGACGTGCCT GGTGAAAGGC TTTTACCCGA GTGACATTGC AGTTGAATGG
1261    GAATCCAATG GTCAGCCGGA AAATAACTAC AAAACGACGC CGCCGGTTCT GGATTCAGAC
1321    GGCTCGTTTT TCCTGTACTC AAAACTGACC GTCGATAAAT CGCGCTGGCA ACAGGGTAAC
1381    GTTTTCAGCT GCTCTGTCAT GCACGAAGCC CTGCACAACC ATTATACCCA GAAAAGTCTG
1441    TCCCTGTCAC CGGGCAAAGA AGTGCAGCTG GTTGAATCTG GTGGCGGTCT GGTGCAACCG
1501    GGCGGTTCGC TGCGTCTGAG CTGTGCAGCT TCTGGCTTTA ATATTAAAGA CACGTACATC
1561    CACTGGGTGC GTCAGGCACC GGGTAAAGGC CTGGAATGGG TTGCTCGTAT CTATCCGACG
1621    AACGGTTATA CGCGTTACGC CGATAGCGTC AAAGGCCGTT TTACCATCAG TGCAGACACC
1681    TCCAAAAACA CGGCTTATCT GCAGATGAAT AGTCTGCGTG CAGAAGATAC CGCTGTTTAT
1741    TACTGCAGCC GCTGGGGCGG TGATGGCTTC TATGCAATGG ATTATTGGGG TCAAGGTACC
1801    CTGGTCACCG TGAGTTCCGG TTCGACCAGC GGCGGTGGCT CAGGTGGCGG TTCGGGCGGT
1861    GGCGGTTCAT CGGACATTCA GATGACGCAA AGCCCGAGCT CTCTGTCTGC GAGTGTTGGC
1921    GATCGTGTCA CCATCACGTG TCGCGCCTCT CAGGACGTGA ATACCGCAGT TGCTTGGTAC
1981    CAACAAAAAC CGGGCAAAGC ACCGAAACTG CTGATTTACT CCGCTTCATT CCTGTACAGC
2041    GGTGTGCCGT CTCGTTTTTC GGGCAGCCGC TCTGGTACCG ATTTCACCCT GACGATTAGT
2101    TCCCTGCAAC CGGAAGATTT CGCCACCTAC TACTGCCAGC AACACTATAC GACCCCGCCG
2161    ACGTTTGGTC AGGGCACGAA AGTGGAAATT AAAAACCGTG TGCGTCGCAG CAAATTTGCG
2221    AAATTCGCCA AAAAATTTGC AAAATTCGCT AAAAAATTTG CGAAATAATG AAAGCTT
```

[0331]

[0332] 5. scFv-C_H3-NRVRRS-$(KLAKLAK)_2$KLAK: (SEQ ID NO.:80)

```
1       CATATGCATC ACCACCACCA CCACGACGAC GACGACAAAG ATATTCAAAT GACCCAGTCC
61      CCGAGCAGCC TGAGTGCCTC CGTTGGCGAC CGCGTGACCA TTACGTGCCG TGCGAGCCAG
121     GATGTCAACA CCGCGGTGGC CTGGTATCAG CAAAAACCGG GCAAAGCGCC GAAACTGCTG
181     ATCTATTCAG CCTCGTTTCT GTACAGCGGT GTTCCGTCTC GTTTCAGCGG CTCTCGCAGT
241     GGTACCGATT TTACCCTGAC GATTAGCTCT CTGCAGCCGG AAGACTTTGC GACGTATTAC
301     TGCCAGCAAC ATTACACCAC GCCGCCGACC TTCGGCCAGG GTACGAAAGT GGAAATCAAA
361     GGTTCCACCT CAGGCGGTGG CAGTGGTGGC GGTTCCGGCG GTGGCGGTAG TTCCGAAGTT
421     CAGCTGGTCG AAAGTGGCGG TGGCCTGGTT CAACCGGGTG GCTCACTGCG TCTGTCGTGT
481     GCAGCAAGCG GTTTCAACAT CAAAGATACC TACATCCACT GGGTTCGTCA GGCGCCGGGC
541     AAAGGTCTGG AATGGGTCGC CCGCATTTAC CCGACCAATG GCTATACGCG TTACGCAGAT
601     AGCGTGAAAG GTCGCTTTAC CATCTCTGCG GACACCAGTA AAAACACGGC CTATCTGCAG
661     ATGAATAGCC TGCGTGCGGA AGATACGGCC GTTTATTACT GCTCTCGCTG GGGTGGCGAT
721     GGCTTCTATG CTATGGACTA CTGGGGCCAG GGTACCCTGG TGACGGTTTC ATCGGGTCAG
781     CCGCGTGAAC CGCAAGTGTA TACCCTGCCG CCGTCACGCG ATGAACTGAC GAAAAACCAG
841     GTGTCGCTGA CGTGTCTGGT TAAAGGCTTT TACCCGAGCG ACATCGCGGT TGAATGGGAA
901     TCTAATGGTC AACCGGAAAA CAATTATAAA ACCACGCCGC CGGTCCTGGA TAGTGACGGC
961     TCCTTTTTCC TGTACAGTAA ACTGACCGTG GATAAATCCC GTTGGCAGCA GGGTAACGTC
1021    TTCTCGTGTA GCGTGATGCA TGAAGCCCTG CATAATCACT ATACCCAGAA ATCTCTGAGT
1081    CTGTCCCCGG GCAAAGGTTC AACGTCGGGT GGCGGTTCCG GCGGTGGCTC AGGTGGCGGT
1141    GGCAGCTCTG GCCAACCGCG CGAACCGCAG GTTTACACCC TGCCGCCGAG CCGTGACGAA
1201    CTGACCAAAA ACCAAGTCAG CCTGACGTGC CTGGTGAAAG GCTTTTACCC GAGTGACATT
1261    GCAGTTGAAT GGGAATCCAA TGGTCAGCCG GAAAATAACT ACAAAACGAC GCCGCCGGTT
1321    CTGGATTCAG ACGGCTCGTT TTTCCTGTAC TCAAAACTGA CCGTCGATAA ATCGCGCTGG
1381    CAACAGGGTA ACGTTTTCAG CTGCTCTGTC ATGCACGAAG CCCTGCACAA CCATTATACC
1441    CAGAAAAGTC TGTCCCTGTC ACCGGGCAAA GAAGTGCAGC TGGTTGAATC TGGTGGCGGT
1501    CTGGTGCAAC CGGGCGGTTC GCTGCGTCTG AGCTGTGCAG CTTCTGGCTT TAATATTAAA
1561    GACACGTACA TCCACTGGGT GCGTCAGGCA CCGGGTAAAG GCCTGGAATG GGTTGCTCGT
1621    ATCTATCCGA CGAACGGTTA TACGCGTTAC GCCGATAGCG TCAAAGGCCG TTTTACCATC
1681    AGTGCAGACA CCTCCAAAAA CACGGCTTAT CTGCAGATGA ATAGTCTGCG TGCAGAAGAT
1741    ACCGCTGTTT ATTACTGCAG CCGCTGGGGC GGTGATGGCT TCTATGCAAT GGATTATTGG
1801    GGTCAAGGTA CCCTGGTCAC CGTGAGTTCC GGTTCGACCA GCGGCGGTGG CTCAGGTGGC
1861    GGTTCGGGCG GTGGCGGTTC ATCGGACATT CAGATGACGC AAAGCCCGAG CTCTCTGTCT
1921    GCGAGTGTTG GCGATCGTGT CACCATCACG TGTCGCGCCT CTCAGGACGT GAATACCGCA
1981    GTTGCTTGGT ACCAACAAAA ACCGGGCAAA GCACCGAAAC TGCTGATTTA CTCCGCTTCA
2041    TTCCTGTACA GCGGTGTGCC GTCTCGTTTT TCGGGCAGCC GCTCTGGTAC CGATTTCACC
2101    CTGACGATTA GTTCCCTGCA ACCGGAAGAT TTCGCCACCT ACTACTGCCA GCAACACTAT
2161    ACGACCCCGC CGACGTTTGG TCAGGGCACG AAAGTGGAAA TTAAAAACCG TGTGCGTCGC
2221    AGCAAACTGG CGAAACTGGC CAAAAAACTG GCAAAACTGG CTAAAAAACT GGCGAAATAA
2281    TGAAAGCTT
```

[0333]

[0334] 6. Phor18-scFv-C_H3-Phor18: (SEQ ID NO.:81)

```
1       CATATGGAAA ATCTGTATTT CCAAGGTAAA TTTGCGAAAT TCGCCAAAAA ATTCGCAAAA
61      TTCGCGAAAA AATTCGCGAA AGATATTCAA ATGACCCAGT CCCCGAGCAG CCTGAGTGCC
121     TCCGTTGGCG ACCGCGTGAC CATTACGTGC CGTGCGAGCC AGGATGTCAA CACCGCGGTG
181     GCCTGGTATC AGCAAAAACC GGGCAAAGCG CCGAAACTGC TGATCTATTC AGCCTCGTTT
241     CTGTACAGCG GTGTTCCGTC TCGTTTCAGC GGCTCTCGCA GTGGTACCGA TTTTACCCTG
301     ACGATTAGCT CTCTGCAGCC GGAAGACTTT GCGACGTATT ACTGCCAGCA ACATTACACC
361     ACGCCGCCGA CCTTCGGCCA GGGTACGAAA GTGGAAATCA AAGGTTCCAC CTCAGGCGGT
421     GGCAGTGGTG GCGGTTCCGG CGGTGGCGGT AGTTCCGAAG TTCAGCTGGT CGAAAGTGGC
481     GGTGGCCTGG TTCAACCGGG TGGCTCACTG CGTCTGTCGT GTGCAGCAAG CGGTTTCAAC
541     ATCAAAGATA CCTACATCCA CTGGGTTCGT CAGGCGCCGG GCAAAGGTCT GGAATGGGTC
601     GCCCGCATTT ACCCGACCAA TGGCTATACG CGTTACGCAG ATAGCGTGAA AGGTCGCTTT
661     ACCATCTCTG CGGACACCAG TAAAAACACG GCCTATCTGC AGATGAATAG CCTGCGTGCG
721     GAAGATACGG CCGTTTATTA CTGCTCTCGC TGGGGTGGCG ATGGCTTCTA TGCTATGGAC
781     TACTGGGGCC AGGGTACCCT GGTGACGGTT TCATCGGGTC AGCCGCGTGA ACCGCAAGTG
841     TATACCCTGC CGCCGTCACG CGATGAACTG ACGAAAAACC AGGTGTCGCT GACGTGTCTG
901     GTTAAAGGCT TTTACCCGAG CGACATCGCG GTTGAATGGG AATCTAATGG TCAACCGGAA
961     AACAATTATA AAACCACGCC GCCGGTCCTG GATAGTGACG GCTCCTTTTT CCTGTACAGT
1021    AAACTGACCG TGGATAAATC CCGTTGGCAG CAGGGTAACG TCTTCTCGTG TAGCGTGATG
1081    CATGAAGCCC TGCATAATCA CTATACCCAG AAATCTCTGA GTCTGTCCCC GGGCAAAGGT
1141    TCAACGTCGG GTGGCGGTTC CGGCGGTGGC TCAGGTGGCG GTGGCAGCTC TGGCCAACCG
1201    CGCGAACCGC AGGTTTACAC CCTGCCGCCG AGCCGTGACG AACTGACCAA AAACCAAGTC
1261    AGCCTGACGT GCCTGGTGAA AGGCTTTTAC CCGAGTGACA TTGCAGTTGA ATGGGAATCC
1321    AATGGTCAGC CGGAAAATAA CTACAAAACG ACGCCGCCGG TTCTGGATTC AGACGGCTCG
1381    TTTTTCCTGT ACTCAAAACT GACCGTCGAT AAATCGCGCT GGCAACAGGG TAACGTTTTC
1441    AGCTGCTCTG TCATGCACGA AGCCCTGCAC AACCATTATA CCCAGAAAAG TCTGTCCCTG
1501    TCACCGGGCA AAGAAGTGCA GCTGGTTGAA TCTGGTGGCG GTCTGGTGCA ACCGGGCGGT
1561    TCGCTGCGTC TGAGCTGTGC AGCTTCTGGC TTTAATATTA AAGACACGTA CATCCACTGG
1621    GTGCGTCAGG CACCGGGTAA AGGCCTGGAA TGGGTTGCTC GTATCTATCC GACGAACGGT
1681    TATACGCGTT ACGCCGATAG CGTCAAAGGC CGTTTTACCA TCAGTGCAGA CACCTCCAAA
1741    AACACGGCTT ATCTGCAGAT GAATAGTCTG CGTGCAGAAG ATACCGCTGT TTATTACTGC
1801    AGCCGCTGGG GCGGTGATGG CTTCTATGCA ATGGATTATT GGGGTCAAGG TACCCTGGTC
1861    ACCGTGAGTT CCGGTTCGAC CAGCGGCGGT GGCTCAGGTG GCGGTTCGGG CGGTGGCGGT
1921    TCATCGGACA TTCAGATGAC GCAAAGCCCG AGCTCTCTGT CTGCGAGTGT TGGCGATCGT
1981    GTCACCATCA CGTGTCGCGC CTCTCAGGAC GTGAATACCG CAGTTGCTTG GTACCAACAA
2041    AAACCGGGCA AAGCACCGAA ACTGCTGATT TACTCCGCTT CATTCCTGTA CAGCGGTGTG
2101    CCGTCTCGTT TTTCGGGCAG CCGCTCTGGT ACCGATTTCA CCCTGACGAT TAGTTCCCTG
2161    CAACCGGAAG ATTTCGCCAC CTACTACTGC CAGCAACACT ATACGACCCC GCCGACGTTT
2221    GGTCAGGGCA CGAAAGTGGA AATTAAAAAA TTTGCGAAAT TCGCCAAAAA ATTCGCAAAA
2281    TTCGCGAAAA AATTCGCGAA ATAATGAAAG CTT
```

[0335]

[0336] 모노클로날 항-Her2/neu 항체 IgG1(MAb)에 대한 Phor18의 화학적 컨쥬게이션: 인산염 완충 염수(PBS) 중 정제된 항체를 약 2 mg/mL의 농도로 농축시켰다. N-숙시니딜-3-(2-피리딜로티오)프로피오네이트(SPDP)의 20 mM 용액을 디메틸설폭시드(DMSO)에서 새로이 제조하고, 20배 과량으로 항체 용액에 첨가하였다. 혼합물을 약 30분 동안 실온에서 인큐베이션하여, 항체-링커 중간체를 생성시켰다. 과량의 반응되지 않은 SPDP를 크기 배제에 의해 제거하였다. 시스테인을 함유하는 세포독성 분자를 10배 과량의 리덕타크릴(reductacryl) 시약과의 반응에 의해 충분히 환원시킨 후, 10배 과량으로 항체-링커 작제물과 혼합하였다. 반응물을 18시간 동안 실온에서 인큐베이션시킨 후, 제염시켜 반응되지 않은 세포독성 분자를 제거하였다. 용액을 저장 전에 필터-멸균시켰다.

[0337] 시험관내: 재조합 항체 제조물(컨쥬게이션된 재조합 항체 제조물 및 컨쥬게이션되지 않은 재조합 항체 제조물)의 세포독성을 결정하기 위해 시험관내 세포독성 연구를 수행하였고, 용해 펩티드 Phor18을 대조군 인큐베이션으로 사용하였다. 세포를 2,000 세포/웰을 이용하여 96 웰 플레이트에서 제조하고, 48시간 동안 부착시켰다. 동결건조된 형태의 Phor18을 염수에 새로이 용해시키고, 0, 0.00001, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 25, 및 100 μM의 증가하는 농도로 다중-웰 플레이트에 첨가하였다. Tris/HCL-완충액 중 Her2/neu-항체-Phor18 컨쥬게이트(Phor18-scFv-C_H3-Phor18, scFv-C_H3-GS-Phor18, scFv-C_H3-NRVRRS(SEQ ID NO.:75)-Phor18, Her2/neu-항체-$(KLAKLAK)_2KLAK$(SEQ ID NO.:74)(scFv-C_H3-GS-$(KLAKLAK)_2KLAK$(SEQ ID NO.:74), 및 scFv-C_H3-NRVRRS(SEQ ID NO.:75)-$(KLAKLAK)_2KLAK$)(SEQ ID NO.:74), 또는 scFv-C_H3- 수용체 항체(네이키드)를 염수에 희석시키고, 0, 0.0012, 0.012, 0.12, 1.2, 6.0, 12.0, 120, 360 및 720 nM의 증가하는 농도로 세포에 첨가하였다. 인큐베이션을 37℃에서 48시간 동안 수행하였다. 세포 생활력을 포르마잔 전환 검정(MTT 검정)을 이용하여 결정하였다. 대조군은 0% 및 100% 세포 사멸 각각에 대한 참조로서 USP 염수 또는 0.1% TritonX-100™을 함유하였다. 모든 데이터를 처리하고, Graph Pad Prizm 4™ 소프트웨어(Graph Pad Prizm, Inc)를 이용하여 분석하였다.

[0338] *실시예 3*

[0339] 본 실시예는 항-Her2-Phor18 항체 컨쥬게이트가 Her2 발현 유방암 세포를 사멸한 것을 나타내는 연구를 기재한다.

[0340] 표 2에 제시된 바와 같이, 항-Her2-Phor18 항체 컨쥬게이트(Phor18-scFv-C_H3 -Phor18, scFv-C_H3-GS-Phor18, scFv-C_H3-NRVRRS(SEQ ID NO.:75)-Phor18)는 48시간까지 Her2/neu 양성 인간 유방암 SKBR-3 및 난소암 SKOV-3 세포주를 사멸시킨 반면, Her2/neu 음성 인간 유방암 MDA-MB-231 세포주는 사멸되지 않았다. 24시간의 인큐베이션만큼 초기에 현미경에 의해 세포독성의 증거가 관찰되었다. 예상된 바와 같이, 컨쥬게이션되지 않은 Phor18은 단지 약간의 세포독성을 나타내었다.

[0341] Phor18에 컨쥬게이션된 HER2/neu 항체는 용해 펩티드 $(KLAKLAK)_2KLAK$(SEQ ID NO.:74)에 컨쥬게이션된 항체보다 유의하게 더 세포독성이었다(도 1, 표 2). Her2/neu 음성 MDA-MB-231 세포는 어떠한 재조합 항체-용해 펩티드 컨쥬게이트에 의해 사멸되지 않았고, 이는 항체의 세포독성이 Her2/neu 수용체를 통해 매개된 것을 나타낸다. "네이키드"(컨쥬게이션되지 않은) 항체(scFv-C_H3)는 3개 모두의 세포주에서 세포독성이 아니었는데, 이는 항체-용해 펩티드 컨쥬게이트의 세포-사멸 특성이 용해 펩티드 페이로드(payload) 및 용해 펩티드의 서열의 존재로 인한 것임을 나타낸다. 또한, 예상된 바와 같이, 컨쥬게이션되지 않은 Phor18은 모든 세포주에서 매우 최소의 비특이적 세포독성을 나타내었다(표 2).

[0342] **표 2:** Her2/neu 수용체 양성 SKOV-3, SKBR-3 및 Her2/neu 수용체 음성 MDA-MB-231 암세포에서의 항-Her2-Phor18 항체 컨쥬게이트(scFv-C_H3-Phor18 및 -scFv-C_H3-$(KLAKLAK)_2KLAK$(SEQ ID NO.:74) 컨쥬게이트, Her2/neu scFv-C_H3 및 컨쥬게이션되지 않은 Phor18의 시험관내 세포독성. 값은 nM으로 표현된 IC_{50}이다.

재조합 항체 컨쥬게이트	IC_{50} [nM] SKOV-3	IC_{50} [nM] SKBR-3	IC_{50} [nM] MDA-MB-231
Phor18-scFv-C_H3-Phor18	44.33±9.2	51.56±6.1	> 1000
scFv-C_H3-GS-Phor18	27±2.5	30±1.9	> 1000
scFv-C_H3-GS-$(KLAKLAK)_2KLAK$	235±6.5	246±41	> 1000
scFv-C_H3-NRVRRS-Phor18	29.3±3.5	76.3±16	> 1000
scFv-C_H3-NRVRRS-$(KLAKLAK)_2KLAK$	247±40.5	338±8.7	> 1000
Her2/neu scFv-C_H3	> 1000	> 1000	> 1000
Phor18	18,180	11,455	9,258

[0343]

[0344] 결과는 재조합적으로 생성된 Her2 항체 scFv-C_H3-Phor18 및 Her2 항체 scFv-C_H3-$(KLAKLAK)_2KLAK$(SEQ ID NO.:74) 컨쥬게이트가 Her2/neu 수용체 발현 세포주에 대해 나노몰 범위에서 활성인 것을 나타낸다. 컨쥬게이션되지 않은 항체 또는 자유 용해 펩티드(Phor18)는 효과가 없었는데, 이는 Her2/neu 수용체에 결합하는 리간드(예를 들어, 항체)에 대한 용해 펩티드의 컨쥬게이션이 세포 세포독성 효능을 향상시키는 것을 나타낸다.

[0345] *실시예 4*

[0346] 본 실시예는 Her2 양성 난소암 세포주 SKOV-3에 대한 용해 펩티드 Phor18(KFAKFAK KFAKFAK KFAK(SEQ ID NO.:4))에 컨쥬게이션된 Her-2 수용체에 대한 재조합적으로 생성된 항체(scFv-C_H3-GS-Phor18), 및 화학적으로 컨쥬게이션된 MAb-Phor18 컨쥬게이트의 시험관내 세포독성 연구의 설명을 포함한다.

[0347] 세포를 5,000 세포/웰을 이용하여 96 웰 플레이트에서 제조하고, 48시간 동안 부착시켰다. MAb-Phor18, scFv-C_H3-GS-Phor18, scFv-C_H3를 염수에 희석시키고, 0, 0.0012, 0.012, 0.12, 1.2, 6.0, 12, 120, 360 및 720 nM의 증가하는 농도로 첨가하였다, 농도 당 N=8 데이터 포인트. 인큐베이션을 37℃에서 24시간 동안 수행하였다. 세포 생활력을 포르마잔 전환 검정(MTT 검정)을 이용하여 결정하였다. 대조군은 0 및 100% 세포 사멸 각각에 대한 참조로서 USP 염수 또는 0.1% TritonX-100™을 함유하였다.

[0348] 데이터를 처리하고, Graph Pad Prizm 4™ 소프트웨어(Graph Pad Prizm, Inc)를 이용하여 분석하였다. 유의성에 대한 통계적 분석을 양측 스튜던츠 T-검정(two-tailed Student's T-test)에 의해 결정하였다. 전체 MAb-

Phor18은 60.53±3.8 nM의 IC_{50} 값을 발생시켰고, scFv-C_H3-GS-Phor18은 59.8±3.8 nM이었다. "네이키드"(컨쥬게이션되지 않음) 항체(MAb 및 scFv-C_H3)는 세포독성이 아니었다. 시험관내 화학적으로 연결된 HER2 항체(MAb-Phor18) 및 재조합 Phor18 컨쥬게이트(scFv-C_H3-GS-Phor18)는 SKOV-3 세포에 대한 유사한 독성을 나타낸 반면, 네이키드 재조합 항체(scFv-C_H3)는 독성이 아니었다.

[0349] *실시예 5*

[0350] 본 실시예는 다양한 용량의 항-Her2-Phor18 항체 컨쥬게이트(scFv-C_H3-GS-Phor18, MAb-Phor18), 네이키드 전체 항체(MAb) 및 네이키드 재조합 항체(scFv-C_H3) 처리를 이용한 인간 난소암의 마우스 이종이식 모델에서의 생체내 연구를 기재한다.

[0351] 암컷 Nu/Nu 마우스에 SKOV-3/Matrigel 현탁액($4x10^6$ 세포)을 피하 주사하였다. 42일에서 사멸된 마우스로부터의 종양 중량을 기준선으로 제공하였다. 요컨대, 처리를 130.3±10.25 mm^3의 중간 종양 부피의 종양에 대해 종양 세포 주사 43일 후에 시작하였고, 가쪽 꼬리 정맥으로의 단일 볼루스 주사로서 47, 50, 54, 57 및 60일에 지속시켰다.

[0352] 전체 연구 동안, 종양 부피를 주 당 2회 측정하였고, 체중을 결정하였다. 최종 부검을 종양 세포 주사 64일 후에 수행하였고, 이때 종양을 절제하고, 칭량하고, 조직학적 평가를 위해 포르말린에서 고정시켰다.

[0353] 처리는 다음과 같다: 염수 대조군, 전체 네이키드 모노클로날 항-Her2-항체, MAb, (3 mg/kg), 재조합 네이키드-Her2-항체(scFv-C_H3)(3 mg/kg), scFv-C_H3-GS-Phor18(0.3 및 3 mg/kg), MAb-Phor18(0.3 및 3mg/kg). 처리 시작시에 희생된 마우스로부터의 종양에 대해 Her2/neu 수용체의 면역조직화학 평가를 수행하였다. 각각의 그룹은 8-9마리의 마우스로 구성되었다.

[0354] 모든 그룹의 마우스는 주사에 잘 용인되었다. 주사 결과로 사망한 마우스는 없었다.

[0355] 원발성 종양에 대한 항체 컨쥬게이션된 Phor18 주사 및 네이키드 항체의 효과(부피 및 종양 중량, 도 2A, 2B, 및 3) 및 체중이 도 4에 예시되어 있다. 도 2A 및 2B는 염수 대조군, 및 MAb(네이키드)(3 mg/kg), scFv-C_H3(3 mg/kg), scFv-C_H3-GS-Phor18(0.3 및 3 mg/kg), MAb-Phor18(0.3 및 3mg/kg)로 처리된 마우스에 대한 각각의 개별적 처리 그룹에 대한 연구 과정 동안의 평균 종양 부피 및 64일에서의 평균 종양 중량을 도시한다.

[0356] 종양 부피 및 중량은 3 mg/kg의 화학적으로 연결된 MAb-Phor18($p<0.04$) 또는 재조합적으로 생성된 scFv-C_H3-Phor18 컨쥬게이트($p<0.02$)로 처리된 모든 동물에서 유의하게 감소하였다. 네이키드 MAb 또는 scFv-C_H3는 3 mg/kg의 용량에서 염수 대조군에 비해 종양 부피 또는 종양 중량을 감소시키지 않았다(도 2A, 2B, 및 3). 윌콕슨 부호 순위 검정(Wilcoxon signed rank test)을 이용하여 Graphpad prizm 4에서 통계 분석을 수행하였다. 체중은 모든 처리 그룹 및 대조군 동물에서 안정적이었다(도 4).

[0357] *실시예 6*

[0358] 본 실시예는 난소암 세포에 대한 용해 펩티드 Phor18(KFAKFAK KFAKFAK KFAK(SEQ ID NO.:4))에 컨쥬게이션된 Her-2 수용체에 대한 재조합적으로 생성된 항체의 시험관내 세포독성 연구를 기재한다.

[0359] scFv-C_H2-C_H3-GS-Phor18(GS 링커에 의해 C-말단에서 항체에 연결된 Phor18의 한 분자)은 V_L--G 링커--V_H-C_H2-C_H3--G 링커-C_H3-C_H2--V_H---G 링커-V_L-GS-(Phor18)로 구성된다. 세포독성을 Her-2 수용체 양성 세포(SKOV-3, 인간 난소암 세포)에서 네이키드 항체(scFv-C_H2-C_H3; 용해 펩티드가 없는 항체)와 비교하였다.

[0360] 재료: 에스케리키아 콜리에서 scFv-C_H2-C_H3 항체로서 항-Her2 항체를 합성하기 위해 재조합 DNA 기술을 이용하였다. 항체(Olafsen T. et al Protein Engineering, Design & Selection 17, 315-323, 2004)를 펩티드 링커를 통해 Phor18에 컨쥬게이션시키고, 시험관내에서 세포독성에 대해 분석하였다. 플라스미드를 유전자 코돈 최적화를 통해 획득하였다. 유전자를 N-His 태그 서열을 갖도록 합성하고, 플라스미드를 E. 콜리 박테리아 발현 벡터 pUC57로 서브클로닝하였다. 발현 최적화 및 평가 후, His-태그 생성물을 선택하고, 1 L의 박테리아 발현 생성물을 1-단계 친화성 정제로 정제하였다. 각각의 작제물에 대한 아미노산 서열은 표 3에 기재되어 있다.

[0361] **표 3:** 각각의 재조합 항체, **(A)** scFv-C_H2-C_H3; 및 항체 컨쥬게이트 **(B)** scFv-C_H2-C_H3-GS-Phor18의 생성을 위한 아미노산 서열.

[0362] **A)** scFv-C_H2-C_H3; 및 항체 컨쥬게이트: (SEQ ID NO.:82)

```
        10         20         30         40         50         60
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS

        70         80         90        100        110        120
RFSGSRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ GTKVEIKGST SGGGSGGGSG

       130        140        150        160        170        180
GGGSSEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFNIKDTYIH WVRQAPGKGL EWVARIYPTN

       190        200        210        220        230        240
GYTRYADSVK GRFTISADTS KNTAYLQMNS LRAEDTAVYY CSRWGGDGFY AMDYWGQGTL

       250        260        270        280        290        300
VTVSSPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV

       310        320        330        340        350        360
EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ

       370        380        390        400        410        420
PREPQVYTLP PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG

       430        440        450        460        470        480
SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGKGSTSG GGSGGGSGGG

       490        500        510        520        530        540
GSSGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV

       550        560        570        580        590        600
LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK PCPAPELLGG

       610        620        630        640        650        660
PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN

       670        680        690        700        710        720
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKEVQLVES GGGLVQPGGS

       730        740        750        760        770        780
LRLSCAASGF NIKDTYIHWV RQAPGKGLEW VARIYPTNGY TRYADSVKGR FTISADTSKN

       790        800        810        820        830        840
TAYLQMNSLR AEDTAVYYCS RWGGDGFYAM DYWGQGTLVT VSSGSTSGGG SGGGSGGGGS

       850        860        870        880        890        900
SDIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCRASQDV NTAVAWYQQK PGKAPKLLIY SASFLYSGVP

       910        920        930        940
SRFSGSRSGT DFTLTISSLQ PEDFATYYCQ QHYTTPPTFG QGTKVEIK
```

[0363]

[0364] B) scFv-C_H2-C_H3-GS-Phor18: (SEQ ID NO.:83)

```
        10          20          30          40          50          60
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS

        70          80          90         100         110         120
RFSGSRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ GTKVEIKGST SGGGSGGGSG

       130         140         150         160         170         180
GGGSSEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFNIKDTYIH WVRQAPGKGL EWVARIYPTN

       190         200         210         220         230         240
GYTRYADSVK GRFTISADTS KNTAYLQMNS LRAEDTAVYY CSRWGGDGFY AMDYWGQGTL

       250         260         270         280         290         300
VTVSSPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV

       310         320         330         340         350         360
EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ

       370         380         390         400         410         420
PREPQVYTLP PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG

       430         440         450         460         470         480
SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGKGSTSG GGSGGGSGGG

       490         500         510         520         530         540
GSSGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV

       550         560         570         580         590         600
LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK PCPAPELLGG

       610         620         630         640         650         660
PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN

       670         680         690         700         710         720
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKEVQLVES GGGLVQPGGS

       730         740         750         760         770         780
LRLSCAASGF NIKDTYIHWV RQAPGKGLEW VARIYPTNGY TRYADSVKGR FTISADTSKN

       790         800         810         820         830         840
TAYLQMNSLR AEDTAVYYCS RWGGDGFYAM DYWGQGTLVT VSSGSTSGGG SGGGSGGGGS

       850         860         870         880         890         900
SDIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCRASQDV NTAVAWYQQK PGKAPKLLIY SASFLYSGVP

       910         920         930         940         950         960
SRFSGSRSGT DFTLTISSLQ PEDFATYYCQ QHYTTPPTFG QGTKVEIKGS KFAKFAKKFA
```

[0365] KFAKKFAK

[0366] 재조합 항체 제조물(scFv-C_H2-C_H3, scFv-C_H3, 및 scFv-C_H2-C_H3-GS-Phor18, scFv-C_H3-GS-Phor18)의 세포독성을 결정하기 위해 시험관내 세포독성 연구를 수행하였다. Her-2 수용체 양성 SKOV-3 세포를 2,000 세포/웰을 이용하여 96 웰 플레이트에서 제조하고, 48시간 동안 부착시켰다. Tris/HCL-완충액 중 Her2-항체-Phor18 컨쥬게이트(scFv-C_H2-C_H3-GS-Phor18, scFv-C_H3 GS-Phor18) 또는 네이키드 항체(scFv-C_H2-C_H3, scFv-C_H3)를 염수로 희석시키고, 0, 0.0012, 0.012, 0.12, 1.2, 6.0, 12.0, 120, 360 및 720 nM의 증가하는 농도로 세포에 첨가하였다. 인큐베이션을 37℃에서 48시간 동안 수행하였다. 세포 생활력을 Cell Titer Glo 발광 세포 생활력 검정(Promega)을 이용하여 결정하였다. 대조군은 0 및 100% 세포 사멸 각각에 대한 참조로서 USP 염수 또는 0.1% TritonX-100™을 함유하였다. 모든 데이터를 처리하고, Graph Pad Prizm 4™ 소프트웨어(Graph Pad Prizm, Inc)를 이용하여 분석하였다.

[0367] Phor18에 컨쥬게이션된 Her2 항체(scFv-C_H2-C_H3, scFv-C_H3)는 scFv-C_H3-Phor18에 대해 53.7±0.63 nM 및 scFv-C_H2-C_H3-Fv-Phor18에 대해 56.7±0.92 nM의 IC_{50} 값을 발생시켰다. "네이키드"(컨쥬게이션되지 않음) 항체 scFv-C_H2-C_H3, scFv-C_H3는 세포독성이 아니었다. 시험관내 재조합 Phor18 컨쥬게이트는 SKOV-3 세포에 대해 유사한 독성을 나타낸다.

[0368] *실시예 7*

[0369] 본 실시예는 포유동물 발현 시스템에서의 규정된 위치 용해 도메인(Phor18), 및 항체 당 2, 4 및 6 중 특정 수

의 Phor18 용해 도메인을 갖는 전체 항-Her2-IgG1-Phor18 항체 컨쥬게이트의 작제 및 발현의 설명을 포함한다. 이들 컨쥬게이트는 또한 항체-약물 컨쥬게이트(ADC)로 언급된다.

[0370] 포유동물 시스템(CHO 세포)에서의 전체 IgG1 항체-Phor18(KFAKFAKKFAKFAKKFAK(SEQ ID NO.:4)) 컨쥬게이트의 재조합 발현을 항체 중쇄 및 경쇄에 대한 독점(proprietary) 분비 신호 서열, 및 인간 IgG 카파-경쇄 분비 신호의 2개의 상이한 분비 신호 서열을 이용하여 수행하였다. 발현된 항-Her2 IgG1 항체(Her-2 수용체에 대한 인간화된 가변 경쇄 및 중쇄 도메인 영역) 및 2, 4 및 6의 Phor18:AB의 화학량적 비율을 갖는 다양한 항체-Phor18 컨쥬게이트를 SDS PAGE, 웨스턴 블롯 분석, 및 표면 플라즈몬 공명(선택된 ADC)을 이용하여 특성규명하였다.

[0371] 중쇄(H) 또는 경쇄(L) C-말단-Phor18 또는 N-말단-Phor18 컨쥬게이션을 갖는 재조합적으로 생성된 항체(전체 IgG1 항체)의 수율, 순도 및 세포독성을 분석하였다. 전체 항체 분자에 컨쥬게이션된 2, 4 및 6 분자의 용해 도메인(Phor18)이 발현되었다. 컨쥬게이션되지 않은 항-Her2 항체, 항-Her2 항체 중쇄(H) 및 경쇄(L)의 아미노산 서열은 표 4에 제시되어 있다.

[0372] **표 4:** Drugbank.ca DB00072로부터의 항-Her2/neu 항체 아미노산 서열. 인간 IgG1과 비교하여 항-Her2 항체의 C_H1 도메인에 하나의 추가의 아미노산이 존재하였다(밑줄).

[0373] 항-HER2/neu 경쇄 (네이키드 L1): (SEQ ID NO.:84)

[0374]
```
        10         20         30         40         50         60
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS

        70         80         90        100        110        120
RFSGSRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP

       130        140        150        160        170        180
SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT

       190        200        210
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
```

[0375] 항-HER2/neu 중쇄 2 (네이키드 H1): (SEQ ID NO.:85)

[0376]
```
        10         20         30         40         50         60
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY

        70         80         90        100        110        120
ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS

       130        140        150        160        170        180
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS

       190        200        210        220        230        240
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP PKSCDKTHTC PPCPAPELLG

       250        260        270        280        290        300
GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY

       310        320        330        340        350        360
NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD

       370        380        390        400        410        420
ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR

       430        440        450
WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K
```

[0377] 항체-용해 펩티드 컨쥬게이트 중쇄(H) 및 경쇄(L)의 아미노산 서열은 표 5에 제시되어 있다. 유전자 합성을 차이니즈 햄스터 난소 세포에 대한 바람직한 코돈 사용빈도를 이용하여 Genewiz, Inc(South Plainfield, NJ)에서 수행하였다. 전사물을 pUC57 박테리아 플라스미드로 라이게이션시켰다.

[0378] **표 5:** 용해-펩티드(Phor18, KFAKFAKKFAKFAKKFAK (SEQ ID NO.:4))-항체 중쇄 및 경쇄 컨쥬게이트의 아미노산 서열

[0379] **Phor18-V_L 경쇄 (L2):** (SEQ ID NO.:86)

```
        10          20          30          40          50          60
KFAKFAKKFA KFAKKFAKGS DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVN TAVAWYQQKP

        70          80          90         100         110         120
GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS RFSGSRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ

       130         140         150         160         170         180
GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ

       190         200         210         220         230
ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
```

[0380]

[0381] **C_L-Phor18 경쇄 (L3):** (SEQ ID NO.:87)

```
        10          20          30          40          50          60
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS

        70          80          90         100         110         120
RFSGSRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP

       130         140         150         160         170         180
SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT

       190         200         210         220         230
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGECGSKFAK FAKKFAKFAK KFAKA
```

[0382]

[0383] **Phor18-V_L-C_L-Phor18 경쇄 (L4):** (SEQ ID NO.:88)

```
        10          20          30          40          50          60
KFAKFAKKFA KFAKKFAKGS DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVN TAVAWYQQKP

        70          80          90         100         110         120
GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS RFSGSRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ

       130         140         150         160         170         180
GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ

       190         200         210         220         230         240
ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGECGSKFAK

       250
FAKKFAKFAK KFAKA
```

[0384]

[0385] **Phor18-V_H 중쇄 (H2):** (SEQ ID NO.:89)

```
        10          20          30          40          50          60
KFAKFAKKFA KFAKKFAKGS EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA

        70          80          90         100         110         120
PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG

       130         140         150         160         170         180
GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS

       190         200         210         220         230         240
WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP

       250         260         270         280         290         300
PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN

       310         320         330         340         350         360
WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI

       370         380         390         400         410         420
SKAKGQPREP QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP

       430         440         450         460         470
VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K
```

[0386]

[0387] **C_H3-Phor18 중쇄 (H3):** (SEQ ID NO.:90)

```
        10          20          30          40          50          60
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY

        70          80          90         100         110         120
ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS

       130         140         150         160         170         180
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS

       190         200         210         220         230         240
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP PKSCDKTHTC PPCPAPELLG

       250         260         270         280         290         300
GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY

       310         320         330         340         350         360
NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD

       370         380         390         400         410         420
ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR

       430         440         450         460         470
WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG KGSKFAKFAK KFAKFAKKFA KA
```

[0388]

[0389] **Phor18-V_H-C_H3-Phor18 중쇄 (H4):** (SEQ ID NO.:91)

```
        10          20          30          40          50          60
KFAKFAKKFA KFAKKFAKGS EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA

        70          80          90         100         110         120
PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG

       130         140         150         160         170         180
GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS

       190         200         210         220         230         240
WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP

       250         260         270         280         290         300
PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN

       310         320         330         340         350         360
WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI

       370         380         390         400         410         420
SKAKGQPREP QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP

       430         440         450         460         470         480
VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG KGSKFAKFAK

       490
KFAKFAKKFA KA
```

[0390]

[0391] 중쇄(H) 및 경쇄(L) 전사물을 pCMVTnT 포유동물 발현 플라스미드(도 5, Promega, Madison, WI, L5620, lot 14524919)의 다중 클로닝 부위로의 방향적 라이게이션을 위한 5' EcoR1 및 3' Xba1 제한 부위를 함유하는 프라이머를 이용한 PCR을 이용하여 Genewiz pUC57 플라스미드의 외부에서 합성하였다. 각각의 전사물은 5' 말단에서 Kozak 컨센서스 서열 및 분비 신호를 포함하였다.

[0392] 항-Her2/neu 항체를 Lonza Inc.(Cambridge, UK)에 의해 생성시켰다. 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포 포유동물 발현 시스템을 네이키드(즉, 용해 도메인이 없는) 항-Her2/neu IgG1, 및 규정된 위치(N-말단 또는 C-말단)에서 전체 항체 당 2, 4 및 6의 용해 도메인의 비로 용해 도메인(Phor18)을 갖는 ADC를 생성시키기 위해 이용하였다.

[0393] 요컨대, Free-style CHO Suspension Cell Expression System(Invitrogen Life Sciences, Carlsbad, CA, cat# K9000-20)을 8mM 글루타맥스(glutamax) 및 5 ml/L 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 FreeStyle CHO 발현 배지에서 FS-CHO 세포를 성장(제조업체의 지시에 따름)시키기 위해 이용하였다. 세포를 37℃로 미리 가온된 페니실린/스트렙토마이신이 없는 성장 배지로 해동시키고, 8% CO_2 대기에서 평형화시키고, 125-135 rpm에서 교반기 플

라스크 내에서 30ml로 성장시켰다. 응집을 피하기 위해 세포 밀도를 $1x10^6$ 세포/ml 또는 그 미만으로 유지시켰다.

[0394] FS-CHO 세포를 Invitrogen 프로토콜에 따라 트랜스펙션시켰다. FS CHO 세포를 해동 7일 후 또는 그 초과 동안 확장시켰다. 세포는 24시간마다 배가되었다. 트랜스펙션 전날, 응집물을 제거하고, 세포를 펠렛화시키고, P/S-비함유 배지에 $5x10^5$/ml로 재현탁시켰다. 트랜스펙션일에, 필요시 세포를 $9x10^5$/ml로 조정하였고, 생활력은 99%에 가까웠다. 180ml의 세포의 각각의 500ml 스피너 플라스크(VWR, cat# PBV125)를 180㎕의 FSMax 트랜스펙션 시약(Invitrogen, cat# 16447-100)과 혼합된 180㎍의 전체 플라스미드 DNA로 트랜스펙션시켰다. DNA 혼합물을 천천히 첨가하면서 세포를 신속히 소용돌이치도록 하였다. 분석된 H:L 사슬의 비는 3:2, 1:1, 및 2:3이었다.

[0395] 트랜스펙션 4일 내지 6일 후에 수거된 세포 배지로 분비된 ADC를 단백질 A 컬럼을 이용하여 정제하였다. 제공된 Genscript 생성물 프로토콜 및 완충제 설명을 이용하여 FS CHO 배지로부터 분비된 ADC를 분리시키기 위해 약 0.25ml의 단백질 A 수지(Genscript L00210, 용적 수지 ml 당 >20mg IgG)를 이용하였다. ADC를 0.5 ml의 0.1M 글리신 pH 2.5의 저 pH 용리 완충액으로 1회 용리시키고, 용리액을 컬럼에 재적용시키고, 두번째로 수거하였다. 1M Tris pH 8을 이용하여 pH를 6.5로 조정하였다.

[0396] 단백질의 존재를 확인하기 위해, SDS-PAGE(4-15% TGX 젤, Bio-Rad Labs, Hercules, CA, cat# 456-1084) 분석을 이용하였다. 젤 상에서 분리된 ADC를 은-염색시켰다(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Prot Sil1 kit). 항-Phor18 토끼 폴리클로날을 Covance(Denver, PA, cat# 338983)로부터 구입하였고, 검출을 위해 항-토끼-HRP를 이용하였다(cat# 111-035-046, Jackson ImmunoResearch, Philadelphia, PA). Jackson ImmunoResearch로부터의 항-인간 IgG(cat# 109-035-088)로 ADC의 검출을 수행하였다. 경쇄(L)의 존재를 HRP-마우스 항-인간 카파(Invitrogen, cat#053920)를 이용하여 환원된 ADC에서 확인하였다.

[0397] ADC를 제형화시키기 위해, 20X 용액 중 DPBS 염 및 폴리소르베이트 20(PS20)을 4℃에서의 저장 및 동결-해동 주기 동안 안정화시키기 위해 하기 최종 농도로 단백질 A 용리 완충액(Tris-글리신, 50mM-100mM)에 첨가하였다: $CaCl_2$ 100mg/L, $MgCl_2$ (· 6H2O) 100mg/L, KCl 200mg/L, NaCl 8g/L, 및 0.09 mg/ml PS20. 단백질 농도를 결정하기 위해, 일부 배치(batch)에 대해, 각각의 샘플에 대한 OD280을 분광광도계에서 결정하였다. ADC 농도[mg/ml]를 1.4의 흡광 계수(아미노산 서열을 기초로 함)를 이용하여 계산하였다. 더 큰 정확성을 위해, 항-인간 IgG Elisa 검정(Genway, 40-374-130037)에 의해 ADC 농도를 결정하였다.

[0398] 첫번째 항-Her2/neu 항체-기반 ADC를 신호 서열의 조절하에서 생성시키고, 발현 분석을 수행하였다. 생성된 ADC는 다음과 같다: H1L1(네이키드), H2L2(Phor18-V_L-Phor18-V_H-IgG1), H2L1(Phor18-V_H-IgG1), H1L2(Phor18-V_L-IgG1), H1L3(C_L-Phor18-IgG1), H3L1(C_H3-Phor18-IgG1), H3L3(C_L-Phor18-C_H3-Phor18-IgG1), H3L4(Phor18-V_L-C_L-Phor18-C_H3-Phor18-IgG1), 및 H4L3(Phor18-V_H-C_L-Phor18-C_H3-Phor18-IgG1). 분광광도(OD_{280}) 분석을 기초로 하여, ADC에 대한 평균 수율은 H2L2 = 0.12mg/L 및 H1L3 = 0.8mg/L였다.

[0399] 표 6은 개별적 ADC 설명, 약어, 및 용해 도메인(Phor18)의 수 및 위치를 나타낸다.

[0400] **표 6:** ADC 설명 및 약어

ADC 의 명칭	ADC 약어 (H L)	Phor18 위치	Phor18 용해 서열의 수/항체
IgG1	H1 L1	없음 ('네이키드')	0
Phor18-V_L-IgG1	H1 L2	N-말단 경쇄 (V_L)	2
C_L-Phor18- IgG1	H1 L3	C-말단 경쇄 (C_L)	2
Phor18-V_L-IgG1-C_L-Phor18	H1L 4	N-말단 및 C-말단 경쇄 (V_L,C_L)	4
Phor18-V_L-Phor18-V_H-IgG1	H2 L2	N-말단 중쇄 및 경쇄 (V_H,V_L)	4
Phor18-V_H-IgG1	H2 L1	N-말단 중쇄 (V_H)	2
Phor18-V_H-C_L-Phor18-IgG1	H2 L3	N-말단 중쇄 및 C-말단 경쇄 (V_H,C_L)	4
C_H3-Phor18-IgG1	H3 L1	C-말단 중쇄 (C_H3)	2
Phor18-V_L- C_H3-Phor18-IgG1	H3 L2	N-말단 경쇄, C-말단 중쇄 (V_L, C_H3)	4
C_L-Phor18-C_H3-Phor18-IgG1	H3 L3	C-말단 경쇄 및 중쇄 (C_L, C_H3)	4
Phor18-V_L-C_L-Phor18-C_H3-Phor18-IgG1	H3 L4	N-말단 경쇄 및 C-말단 경쇄 및 중쇄 (V_L,C_L, C_H3)	6
Phor18-V_H-C_L-Phor18-C_H3-Phor18-IgG1	H4 L3	N-말단 중쇄; C-말단 중쇄 및 경쇄 (V_H,C_L, C_H3)	6
Phor18-V_H-C_H3-Phor18-IgG1	H4 L1	N- 및 C-말단 중쇄 (V_H, C_H3)	4
Phor18-V_H-Phor18V_L-C_H3-Phor18-IgG1	H4L2	N-말단 중쇄 및 경쇄, C-말단 중쇄 (V_H, V_L, C_H3)	6

[0401]

[0402] 환원된 항체의 면역블롯에서 ADC의 품질을 분석하여, 중쇄 및 경쇄를 시각화시켰다. Phor18의 존재가 H1L2 Phor18-V_L-IgG1(H1L2)의 경쇄(L), H1L3(C_L-Phor18-IgG1)의 경쇄(L) 및 H3L1(C_H3-Phor18-IgG1)의 중쇄(H)에서 확인되었고, 경쇄의 C-말단에만 Phor18을 가졌다(도 6).

[0403] 중쇄 및 경쇄에서의 Phor18의 존재가 Phor18 컨쥬게이션을 갖는 중쇄에 대한 웨스턴 블롯 분석(도 7A)에서 확인되었다. H1L1 및 항-Her2/neu 항체, 네이키드 항체를 음성 대조군으로 제공하였으며, 이들은 Phor18을 탐지하는 밴드를 나타내지 않았다. 재조합적으로 생성된 항체 및 항체 컨쥬게이트에서의 경쇄의 존재가 H1L1(IgG1), H3L1(C_H3-Phor18-IgG1), H1L3(IgG1-C_L-Phor18)에 대한 웨스턴 블롯 분석에서 확인되었고(카파 경쇄), H2L2(Phor18-V_L-Phor18-V_H-IgG1)는 IgG 웨스턴 블롯 분석, 카파-경쇄 웨스턴 블롯 분석(도 7B) 및 항-Phor18 면역 블롯(도 6 및 7A)을 기초로 하여 중쇄 및 경쇄 둘 모두를 가졌다.

[0404] 본 데이터는 2, 4 및 6의 용해 도메인(Phor18):AB의 소정의 화학량론, 및 소정의 위치의 용해 도메인(Phor18)을 갖는 전체 항체-용해 도메인(Phor18) 컨쥬게이트가 포유동물 발현 시스템에서 재조합적으로 생성될 수 있는 것을 나타낸다.

[0405] *실시예 8*

[0406] 본 실시예는 8개의 ADC의 효능 및 특이성의 설명을 포함한다.

[0407] N-말단 또는 C-말단에서 2, 4 또는 6개의 Phor18 분자에 컨쥬게이션된 항-Her-2 수용체(IgG1)를 갖는 ADC를 Her2/neu 양성 난소암 세포주(SKOV-3 인간 난소암 세포)를 이용하여 시험관 내에서 분석하였고, "네이키드"항체와 비교하였다. Her-2 수용체 음성, ER 음성, PR 음성 인간 유방암 세포(MDA-MB-231)를 대조군으로 제공하였다.

[0408] 요컨대, SKOV-3(Her2/neu 양성, 계대 번호 pU51) 및 MDA-MB-231(Her2/neu 음성, ER 음성, PR 음성, pu 14) 세포를 세포 해리 완충액을 이용하여 열 비활성화 완전 배지 내에 불투명한 플레이트에 웰 당 2,000개 세포의 밀도로 시딩하였다. 2일 후, 세포에 새로운 배지(75 ㎕)를 공급하고, 25㎕의 각각의 ADC의 4x 연속 희석액과 함께 인큐베이션하고, 세포 배양 배지에서 제조된 네이키드 항체를 첨가하였다.

[0409] 4시간 동안 인큐베이션된 세포를 발광측정 검정 키트(Promega, Cytotox Glo G9292 lot # 317872)를 이용하여 막 온전성에 대해 검정하였다. 세포 생활력을 발광 검정 키트(Promega, W, Cell Titer Glo, G 7572, lot 31511202)를 이용하여 24, 48 및 72시간 후에 결정하였다. 100% 세포 생활력(배양 배지) 및 100% 세포 사멸(0.1% Triton X 100)에 대한 대조군을 동일 조건하에서 인큐베이션하였다.

[0410] Windows용 Graph Pad Prizm version 5.00, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com(Graph Pad Prizm, Inc)을 이용하여 데이터를 처리하고 분석하여 IC_{50} 값을 수득하였다. 유의성에 대한 통계 분석을 양측 스튜던츠 T-검정에 의해 결정하였다. 각각의 검정을 각각 2-3웰의 이중 플레이트를 이용하여 수행하여, 시점 당 4-6 데이터 포인트의 N을 수득하였다.

[0411] 각각의 ADC의 농도를 분광광도(OD_{280}) 결정하였고, 일부 경우에 ELISA 검정을 이용한 IgG 결정에 의해 결정하였다. 각각의 ADC 및 네이키드 항체를 동결된 스톡으로부터 제조하여 최초 농도에 따라 가장 높은 농도로서 800 nM 또는 그 미만을 발생시켰다.

[0412] 분광광도 결정된 농도에 대한 0.00015, 0.0015, 0.015, 0.15, 1.5, 15, 30 및 60 ㎍/ml에 상응하는 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 및 200 nM의 웰 당 최종 농도를 달성하도록 연속 희석액을 세포 배양 배지에서 제조하였다. IgG 내용물을 갖는 연구를 위해, 가장 높은 가능한 농도를 시험한 후, 각각의 ADC에 대한 1:1 및 1:10 희석액을 시험하였다.

[0413] 재조합적으로 발현된 ADC의 활성을 결정하기 위해 다양한 시점을 포함시켰다. 활성의 가장 이른 표시를 Her2/neu 양성 SKOV-3 세포에서의 ADC 노출 4시간 후의 막 통합에 대한 효과로서 측정하였다.

[0414] 가변 경쇄에서 Phor18을 갖는 N-말단 컨쥬게이션된 ADC(Phor18-V_L-IgG1)는 표적 세포막을 분해시켰다(IC_{50} = 187.9±12.8 nM). 하나의 Phor18 분자를 갖는 C-말단 컨쥬게이션된 ADC(C_H3-Phor18-IgG1)는 검출가능한 막 활성을 갖지 않았다. 네이키드 항-Her2-IgG1은 또한 막 온전성에 검출가능하게 영향을 미치지 않았다.

[0415] 표 7에는 상기 활성 연구의 결과가 요약되어 있다. ADC는 음성 대조군(Her2/neu 음성) MDA-MB-231에 비해 표적 세포주 SKOV-3에 대한 높은 특이성을 나타내었다.

[0416] 최대 독성 수준을 48시간 후에 결정하였다. IC_{50} 값[nM]은 C-말단 컨쥬게이션된 ADC인 항체 당 2개의 Phor18 분자를 갖는 C_H3-Phor18-IgG1(27.4±5.1 nM, 2 Phor18/AB, H3L1, C-말단)에 비해 N-말단 컨쥬게이션된 ADC Phor18-V_H-IgG1(13.02±2.3 nM, 2 Phor18/AB, N-말단) 및 H2L1 Phor18-V_L-IgG1(6.9±3.4 nM, 2 Phor18/AB, N-말단)에 대해 낮은 나노몰 범위였다.

[0417] N-말단에 4개 분자의 Phor18을 갖는 N-말단 컨쥬게이션된 ADC는 C-말단 대응물 C_L-Phor18-C_H3-Phor18-IgG1(36.3±10.6 nM, 4 Phor18/AB, H3L3, C-말단, $p<0.001$)과 비교하여 0.54±0.2 nM(Phor18-V_L-Phor18-V_H-IgG1, 4 Phor18/AB, N-말단, H2L2)의 IC_{50} 값을 가졌다. N-말단에서의 용해 도메인 컨쥬게이션은 C-말단에서의 컨쥬게이션보다 70배 더 효능이 있었다.

[0418] 이들 데이터는 N-말단 Phor18 컨쥬게이션을 갖는 ADC가 항체 당 2 및 4개 분자의 화학량적 비율에 대해 C-말단 Phor18 컨쥬게이션에 비해 우수한 것을 나타낸다.

[0419] 항체 당 2개로부터 4개 분자로의 Phor18 컨쥬게이션의 증가는 N-말단에서의 컨쥬게이션을 갖는 12배 더 효능 있는 ADC를 발생시켰으나, C-말단에서는 그렇지 않았다. 항체 당 6개의 Phor18 분자와 컨쥬게이션된 ADC는 Phor18-V_L-C_L-Phor18-C_H3-Phor18-IgG1(6 Phor18, N 및 C 말단, H3L4)에 대해 1.1±0.2 nM, 및 Phor18-V_H-C_L-Phor18-C_H3-Phor18-IgG1(6 Phor18, H4L3)에 대해 1.1±0.4 nM의 IC50 값으로 대략 동일한 효능을 나타내었다.

[0420] 네이키드 항-Her2-IgG1은 48시간 후에 SKOV-3 표적 세포에서 실질적으로 덜한 세포 사멸 활성을 나타내었다(234.6±49 nM의 IC_{50} 값). ADC 중 어느 것도 동일 조건 하에서 표적 음성 MDA-MB-231 세포를 사멸시키지 않았다.

[0421] 이들 데이터는 용해 도메인 (Phor18)-컨쥬게이션된 항-Her-2 수용체 항체(ADCs)가 Her2/neu 발현 세포에 매우 특이적인 것을 나타낸다. 표적 수용체의 부재는 세포를 손상되지 않은 채로 남겨둔다.

[0422] 용해 도메인 (Phor18) 컨쥬게이션된 항체(ADC)의 효능은 컨쥬게이션의 위치 및 용해 도메인 (Phor18) 분자의 수에 좌우되었으며, 표적 세포에 대한 가장 높은 효능이 항체 당 2 및 4개의 용해 도메인(Phor18) 분자를 갖는 N-말단 용해 도메인 (Phor18)-항체 컨쥬게이트에 대해 관찰되었다. N-말단 컨쥬게이션은 C-말단 용해 도메인 (Phor18)-항체 컨쥬게이션에 비해 70배 활성 증가를 나타내었다. N-말단 Phor18 컨쥬게이션된 ADC는 항체 당 2 및 4개 Phor18 분자를 갖는 둘 모두의 C-말단 Phor18 컨쥬게이트에 비해 더욱 효능이 있었다. 또한, N-말단 컨쥬게이션은 표적 세포 SKOV-3의 막 온전성을 감소시키는 것에 대해 측정가능한 효과를 나타내었다.

[0423] 컨쥬게이션된 용해 도메인 (Phor18) 분자의 수를 항체 당 6개로 증가시키는 것은 낮은 나노몰 범위에서 최대 활성을 갖도록 하였다. Phor18 컨쥬게이션된 ADC는 네이키드 항체에 비해 433배까지 더 효능이 있었다.

[0424] **표 7**: CHO 세포에서 생성된 ADC 및 네이키드 항체의 시험관내 활성

ADC 및 네이키드 항체	ADC - ID	AB 에 대한 Phor18 의 컨쥬게이션의 말단	48 시간 후의 시험관내 활성	
			IC_{50} [nM] SKOV-3 Her2/neu (+)	IC_{50} [nM] MDA-MB-231 Her2/neu(-)
IgG1	H1L1	없음	234.6±49	독성이 아님
Phor18-V_L-IgG1	H1L2	N-말단, L 사슬	6.9±3.4	독성이 아님
Phor18-V_H-IgG1	H2L1	N-말단, H 사슬	13.02±2.3	독성이 아님
Phor18-V_L-Phor18-V_H-IgG1	H2L2	N-말단, H 및 L 사슬	0.54±0.2	독성이 아님
C_H3-Phor18-IgG1	H3L1	C 말단 H 사슬	27.4±5.1	독성이 아님
C_L-Phor18-C_H3-Phor18-IgG1	H3L3	C-말단 H 및 L 사슬	36.3±10.6	독성이 아님
Phor18-V_L-C_L-Phor18-C_H3-Phor18-IgG1	H3L4	N-말단 L 사슬 및 C 사슬 H 사슬	1.1±0.2	독성이 아님
Phor18-V_H-C_L-Phor18-C_H3-Phor18-IgG1	H4L3	N-말단 H 사슬 및 C-말단 L 사슬	1.1±0.4	독성이 아님

[0425]

[0426] *실시예 9*

[0427] 본 실시예는 IgG 카파 신호 서열을 이용한 ADC 발현의 최적화의 설명을 포함한다. 대안적 분비 신호 펩티드를 ADC의 품질 및 발현 수준의 개선에 대해 평가하였다. N-말단 Phor18을 갖는 중쇄 및 경쇄의 발현을 위한 인간 IgG 카파 신호 서열을 생성시키기 위해, 5' 말단에 새로운 신호 펩티드를 갖는 L2(Phor18-V_L), L4(Phor18-V_L-C_L-Phor18), 및 H2(Phor18-V_H) 항체 중쇄(H) 및 경쇄(L) 전사물에 대한 새로운 유전자 합성을 Genewiz, Inc.에 의해 수행하였다. 인간 IgG 카파 신호 펩티드의 아미노산 서열은 MQTDTLLLWVLLLWVPGSTGA이다(Felgenhauer M, et al.,. Nucleic Acids Res., 18:4927 (1990)).-

[0428] igk 분비 신호를 이용하여 생성된 Phor18-V_L-IgG1 및 Phor18-V_L-Phor18-V_H-IgG1 ADC는 항-C_L 카파 및 항-Phor18로 탐지된 환원된 단백질의 면역블롯에서 경쇄에 대한 강한 신호를 가졌다. IgG 카파 신호 펩티드가 더 높은 발현 및 품질을 유도하므로, ADC 생성을 위해 igk 전사물을 선택하였다. Elisa 정량을 기초로 한 IgG 카파 신호 서열을 이용하여 CHO 세포에서 발현된 ADC의 생성 수준은 다음과 같다: H1L1 = 0.8mg/L, C_L-Phor18-IgG1 = 0.8mg/L, Phor18-V_L-IgG1 = 0.3mg/L, 및 Phor18-V_L-Phor18-V_H-IgG1 = 0.15mg/L. IgG 카파 신호 서열을 이용하여 N-말단 Phor18 ADC의 여러 추가 배치를 생성시키고, 발현 수준, 품질 및 동등한 발현 수준을 이용한 시험관내에서의 효능에 대해 분석하였다.

[0429] Phor18-V_L-IgG1(H1L2), IgG1-C_L-Phor18-IgG1(H1L3) 및 Phor18-V_L-Phor18-V_H-IgG1(H2L2). 이들 N-말단 및 C-말단 컨쥬게이션된 Phor18 ADC를 항-Phor18 면역블롯, IgG 및 카파 경쇄 웨스턴 블롯 분석에 의해 품질 및 순도에 대해 분석하였다(도 8). Phor18 존재를 이들의 분자량을 통해 중쇄 및 경쇄에서 확인하였다(도 8).

[0430] ADC의 면역블롯 분석은 igk 분비 신호를 이용하여 생성된 Phor18-V_L-IgG1, C_L-Phor18-IgG1 및 Phor18-V_L-Phor18-V_H-IgG1 ADC가 Phor18과 함께 제공된 중쇄 및 경쇄를 갖는 것을 나타내었다. 발현 수준은 Phor18-V_L-IgG1 및 Phor18-V_L-Phor18-V_H-IgG1 둘 모두에 대해 0.5mg/L보다 낮았다.

[0431] *실시예 10*

[0432] 본 실시예는 항-Her2/neu 항체에 대한 Her2/neu 단백질의 결합에 비한 Phor18-V_L-IgG1 및 Phor18-V_L-Phor18-V_H-IgG1에 대한 Her2/neu 단백질의 결합 동역학을 특성규명하기 위한 연구를 기재한다.

[0433] 염소 항-인간 IgG로 코팅된 GLM 센서 칩을 이용하여 BioRad ProteOn 시스템에서 표면 플라스몬 공명 연구를 수

행하였다. ADC(Phor18-V_L-IgG1 및 Phor18-V_L-Phor18-V_H-IgG1) 및 항-Her2/neu 항체를 5 ㎍/ml의 농도로 희석시키고, 포획을 위해 항-인간 IgG 표면 상에 주입하였다. 항-Her2/neu 항체를 150 RU 내지 1000 RU로 포획하였다. Phor18-V_L-IgG1 및 Phor18-V_L-Phor18-V_H-IgG1 포획 수준은 200 내지 900 RU였다.

[0434] ErbB2/Her2/neu(Sino Biological #1004-H08H)를 3배 희석 시리즈(N=4) 중 가장 높은 농도로서 50 nM에서 분석하였다. 데이터를 25℃에서 수집하였다. 표적 표면으로부터의 반응에서 참조 표면을 공제한 후, 1:1 상호작용 모델로 전체적으로 적합화시켰다. 결합 상수를 표 8에 제시된 바와 같이 결정하였다.

[0435] **표 8**: 25℃에서 결정된 결합 상수.

[0436]

	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (pM)
Phor18-V_L-IgG1	2.20×10^5	4.43×10^{-5}	201±24
Phor18-V_L-Phor18-V_H-IgG1	2.05×10^5	3.55×10^{-5}	175 ±13
항-Her2/neu 항체	3.90×10^5	$3.28\ 10^{-5}$	84 ±13

[0437] 결과는 ErbB2가 84±13 pM의 친화성으로 항-Her2/neu 항체에 결합하였고, 200±24 및 175±13 pM으로 각각 약 2.5배 및 2배 더 약한 친화성으로 Phor18-V_L-IgG1 및 Phor18-V_L-Phor18-V_H-IgG1에 결합한 것을 나타낸다. 관찰된 가장 유의한 차이는 Phor18-V_L-IgG1 및 Phor18-V_L-Phor18-V_H-IgG1에 대한 것보다 약 2배 더 신속한 Anti-Her2/neu 항체에 대한 회합 속도였다. 따라서, 전체 항체에 컨쥬게이션된 Phor18의 결합 동역학은 항-Her2/neu 항체와 유사하며, 이는 결합 특성이 가변 경쇄 및 중쇄에서의 컨쥬게이션에 의해 거의 영향을 받지 않는 것을 나타낸다.

[0438] *실시예 11*

[0439] 본 실시예는 세포독성에 대해 ADC를 특성규명하고 평가하기 위한 연구를 기재한다.

[0440] 다양한 발현 배치를 제조하였다. ADC 농도를 분광광도 측정(OC_{280}) 및 IgG 정량 검정으로 결정하였다. 항체 당 2 및 4개의 Phor18 분자에 대한 N-말단 Phor18 컨쥬게이션을 갖는 선택 ADC(Phor18-V_L-IgG1 및 Phor18-V_L-Phor18-V_H-IgG1)의 연속 희석액을 실시예 10에 기재된 바와 같이 제조하였다. 시험관내 활성은 Phor18-V_L-IgG1 및 Phor18-V_L-Phor18-V_H-IgG1의 각각의 제조물의 IgG 내용물을 기초로 하였다.

[0441] 세포막 온전성에 대한 ADC의 효과를 결정하기 위해 4시간 시점을 분석하였다(표 8). 2의 Phor18/AB 및 4의 Phor18/AB의 화학량적 비율을 갖는 ADC는 4시간 노출 후에 SKOV-3 표적 양성 세포의 세포막을 파괴시켰고(Phor18-VL-IgG1에 대해 21.5±1 및 Phor18-V_L-Phor18-V_H-IgG1에 대해 2.51±0.2 nM의 IC50 값), 이는 막 붕괴를 나타낸다. 막 활성은 N-말단의 4개의 Phor18 컨쥬게이션된 항체보다 10배 더 높았다.

[0442] 세포 사멸을 Phor18-V_L-IgG1(3.7±0.9 nM) 및 Phor18-V_L-Phor18-V_H-IgG1(0.2±0.04 nM)에 대한 낮은 나노몰 범위 내의 IC_{50} 값으로 24시간 후에 측정하였다. Phor18-V_L-I_GG1 및 Phor18-V_L-Phor18-V_H-IgG1의 최대 효능을 Phor18-V_L-IgG1(0.54±0.2 nM) 및 Phor18-V_L-Phor18-V_H-IgG1(0.07±0.02 nM; $p<0.0001$)에 대해 48시간 후에 측정하였다. 둘 모두의 경우에서, 4 Phor18 항체 컨쥬게이트(Phor18-V_L-Phor18-V_H-IgG1)에 대한 시험관내 효능은 2 Phor18 항체 컨쥬게이트(Phor18-V_L-IgG1)보다 10-20배 더 높았다($p<0.0001$). 네이키드 항체는 24 및 48시간 후에 225.8±43 및 295.3±80.6 nM에서 Her2/neu 양성 표적 세포(SKOV-3)를 사멸시켰다.

[0443] 이전 결과와 일치하게, Phor18-V_L-Phor18-V_H-IgG1은 가장 활성의 ADC였고, Phor18-V_L-IgG1보다 10배 더 높은 활성을 나타냈다. Her2/neu 음성 대조군 세포주 MDA-MB-231은 네이키드 항체 또는 ADCs(Phor18-V_L-IgG1 또는 Phor18-V_L-Phor18-V_H-IgG1)로 사멸되지 않았다(표 9). 상기 데이터는 항체의 N-말단 도메인에 컨쥬게이션된 더 많은 수의 Phor18(4 vs 2)이 C-말단 Phor18 컨쥬게이션을 갖는 항체와 비교하여 가장 효능이 있는 것을 입증한

다.

[0444] **표 9:** Her2/neu 양성 난소암 세포주에 대한 2 및 4개의 펩티드의 N-말단 Phor18 컨쥬게이션을 갖도록 재조합적으로 생성된 ADC의 시험관내 활성.

ADC 및 mAB	*시험관내* 활성 표적 세포(SKOV-3) [IC_{50} - nM]		
	4 hr (막 온전성)	24hr	48 hr
항-Her2-IgG1	온전함	225.8±43	295.3±80.6
Phor18-V_L-IgG1	21.5±1.0	3.7±0.9	0.54±0.2
Phor18-V_L-Phor18-V_H-IgG1	2.51±0.2	0.2±0.04	0.07±0.02

[0445]

[0446] *실시예 12*

[0447] 본 실시예는 CD20에 결합하는 ADC의 생성을 기재한다.

[0448] CD20은 B-세포 악성종양의 표면 상에서 발현되며, 내재화되지 않는 표면 표적이다. 항체 단편 컨쥬게이트를 *E. 콜리*(단일쇄 단편 및 Phor18-컨쥬게이트) 및 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)(단일쇄 이합체 및 Phor18-컨쥬게이트)에서 생성시키고, 2, 4, 및 6개의 Phor18 분자를 갖는 전체 항체 컨쥬게이트를 CHO 세포에서 발현시켰다. 항-CD20 IgG1 항체 AT80 및 MS4A1을 이용하여 화학적 컨쥬게이션을 수행하였다.

[0449] 화학적 컨쥬게이션 - AT80(마우스 IgG1, Tenovus) 및 MS4A1(리툭시맙(rituximab) 유사, R&D)

[0450] 정제된 항체 IgG1 AT80 및 IgG1 MS4A1을 수득하였고, Phor18과의 화학적 컨쥬게이션에 사용하였다. 항체를 인산염 완충 염수(PBS)에서 약 2 mg/mL로 농축시켰다. SPDP의 20 mM 용액을 DMSO에서 새로이 제조하고, 20배 과량으로 항체 용액에 첨가하였다. 혼합물을 약 30분 동안 실온에서 인큐베이션하여, 항체-링커 중간체를 생성시켰다. 과량의 반응되지 않은 SPDP를 크기 배제 크로마토그래피에 의해 제거하였다. 시스테인을 함유하는 세포독소 분자를 10배 과량의 리덕타크릴 시약과의 반응에 의해 충분히 환원시킨 후, 10배 과량으로 항체-링커 작제물과 혼합하였다. 반응물을 18시간 동안 실온에서 인큐베이션시킨 후, 탈염시켜, 반응되지 않은 세포독소 분자를 제거하였다. 용액을 저장 전에 필터-멸균시켰다. 최종 ADC의 농도는 브래드포드(Bradford) 단백질 측정에 의해 결정시 AT80-Phor18 컨쥬게이트에 대해 0.76 mg/ml였고, MS4A1-Phor18 컨쥬게이트에 대해 0.34 mg/ml였다. 컨쥬게이션을 위한 SPDP 방법을 이용한 항체 당 Phor18 분자의 통상적인 수는 항체 당 3-5분자의 Phor18이다.

[0451] Phor18에 화학적으로 컨쥬게이션된 CD20에 대한 2개의 항체를 분석하였는데, 이는 이들이 세포외 CD20 루프의 다양한 도메인에 결합하기 때문이다. 시험관내 연구에서, CD20 양성 세포(Daudi 및 Raji, 버킷림프종)에서 2개의 화학적으로 컨쥬게이션된 CD20을 표적으로 하는 전체 항체 IgG1-Phor18 컨쥬게이트와 "네이키드" 항체(IgG1)의 세포독성을 비교하였다. CD20 음성 백혈병 세포(U937)를 대조군으로 제공하였다.

[0452] 네이키드 항체 항-CD20-IgG1-Phor18을 0.34 mg/ml(MS4A-Phor18) 및 0.76 mg/ml(AT-80-Phor18)의 농도로 약 158,000 g/mol의 분자량으로 화학적으로 컨쥬게이션시켰다(MS4A 및 AT80). 세포주를 미국 미생물보존센터(American Type Cell Collection)(Mannassas, VA)에서 수득하였다. 인간 비-호지킨 림프종 세포 Daudi(CD20 양성, 계대 번호 p2), Raji(CD20 양성 p 2) 및 인간 백혈병 세포주 U937(CD20 음성, p 10)을 열 비활성화된 완전 배지에서 불투명한 플레이트에 웰 당 3,000개 세포의 밀도로 시딩하였다. 24시간 후, 세포에 새로운 배지(75 ㎕)를 공급하고, 25㎕의 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 및 500 nM(N=6)의 MS4A1-Phor18 및 AT80-Phor18의 4x 연속 희석액과 함께 인큐베이션하였다. 2-5시간 동안 인큐베이션된 세포를 발광측정 검정 키트(Promega, Madison, WI, Cytotox Glo G9292 lot # 301329)를 이용하여 막 온전성에 대해 검정하였다. 세포 생활력을 발광 검정 키트(Promega, Madison, WI, Cell Titer Glo, G 7572, lot 30068102)를 이용하여 24, 및 48시간 후에 결정하였다.

[0453] 화학적으로 컨쥬게이션된 MS4A1-Phor18 및 AT80-Phor18을 이들의 막 활성에 대해 시험하였다. MS4A1-Phor18은 CD20 양성 세포주 Raji 및 Daudi에서 2 또는 5시간 후에 활성이 아니었던 반면, AT-80-Phor18은 106.1±2.9 nM

의 IC_{50} 값으로 CD20 양성 Daudi 세포에서 막 온전성을 파괴하였다. Daudi 세포는 11.9±0.9 nM의 IC_{50} 값으로 48시간 이내에 AT-80-Phor18 컨쥬게이트에 의해 사멸되었고, Raji 세포는 6.3±1.02 nM의 IC_{50} 값으로 사멸되었다. CD20 음성 대조군 세포주 U937은 네이키드 AT-80 항체 또는 AT-80-Phor18 컨쥬게이트에 의해 사멸되지 않았다.

[0454] MS4A1-Phor18 컨쥬게이트는 24 및 46시간 후에 267±13 및 227±11 nM의 IC_{50} 값으로 Raji 세포에서 낮은 활성을 나타내었다. Daudi 세포는 10.6±2.1 및 3.0±1.2 nM의 IC_{50} 값으로 MS4A1-Phor18 컨쥬게이트에 대해 훨씬 더 민감하였다. 네이키드 MS4A1 항체는 Raji 또는 Daudi 세포주에 대해 독성이 아니었다. CD20 음성 인간 백혈병 세포(U937)는 어느 ADC에 의해서도 사멸되지 않았다(표 10).

[0455] 이들 데이터는 화학적으로 컨쥬게이션된 Phor18 ADC가 접촉시 CD20 양성 세포를 사멸시키고, 내재화를 필요로 하는 것으로 보이지 않는 것을 나타낸다. 세포독성은 CD20 표적에 특이적이며, ADC의 결합 도메인에 좌우된다.

[0456] **표 10**: CD20 양성 비-호지킨 림프종 세포주 Raji 및 Daudi 및 CD20 음성 세포주 U937에서의 화학적으로 컨쥬게이션된 항-CD20 IgG1-Phor18 컨쥬게이트의 시험관내 활성

Raji	**항-CD20-Phor18 (AT80) [IC_{50} nM]**	**항-CD20 AT80 [IC_{50}nM]**	**항-CD20-Phor18 (MS4A1) [IC_{50} nM]**	**항-CD20 MS4A1 [IC_{50}nM]**
2 h	120.8± 0.45	독성이 아님	ND	ND
5 h (N=6)	138.2± 28.8	독성이 아님	ND	ND
24 h	ND	ND	267.1±13	독성이 아님
46 h	6.3± 1.02	ND	227±11	독성이 아님
Daudi	**항-CD20-Phor18 (AT80) [IC_{50} nM]**	**항-CD20 AT80 [IC_{50}nM]**	**항-CD20-Phor18 (MS4A1) [IC_{50} nM]**	**항-CD20 MS4A1 [IC_{50}nM]**
2 h	126.5± 12.1	독성이 아님	독성이 아님	독성이 아님
5 h (N=6)	106.1± 2.9	독성이 아님	독성이 아님	독성이 아님
24 h	ND	ND	10.6±2.1	독성이 아님
46 h	11.9± 0.9	115.5± 53	3.0± 1.2	독성이 아님
U937 (CD20 음성)	**항-CD20-Phor18 (AT80) [IC_{50} nM]**	**항-CD20 AT80 [IC_{50}nM]**	**항-CD20-Phor18 (MS4A1) [IC_{50} nM]**	**항-CD20 MS4A1 [IC_{50}nM]**
2-46 h	독성이 아님	독성이 아님	독성이 아님	독성이 아님

[0457]

[0458] ND = 결정되지 않음

[0459] *실시예 13*

[0460] 본 실시예는 CD20 표적화 ADC의 카스파제 활성화의 비교를 기재한다.

[0461] CD20 표적화 ADC는 내재화되지 않는다. 세포 사멸의 개시는 아폽토시스 관련 경로를 결정함으로써 측정될 수 있다. 초기 아폽토시스 과정은 카스파제 3 및 7의 활성화를 나타낸다. 카스파제는 시스테인 아스파르트산-특이적 프로테아제 패밀리의 일원이며, 포유동물 세포의 아폽토시스에서 중요한 효과기 역할을 한다. 상기 검정은 카스파제 활성, 루시페라제 활성 및 세포 용해에 최적화된 시약에서 테트라펩티드 서열 DEVD를 함유하는 루미노제닉(luminogenic) 카스파제-3/7 기질을 제공한다.

[0462] 시험관내 연구에서, CD20 양성 세포(Daudi 버킷림프종)에서 화학적으로 컨쥬게이션된 CD20을 표적으로 하는 전체 항체 IgG1-Phor18 컨쥬게이트와 "네이키드" 항체(IgG1-AT80)의 카스파제 활성화를 비교하였다.

[0463] 인간 비-호지킨 림프종 세포 Daudi(CD20 양성, 계대 번호 p2)를 열 비활성화 완전 배지 내에 불투명한 플레이트

에 웰 당 3,000개 세포의 밀도로 시딩하였다. 24시간 후, 세포에 새로운 배지(75 ㎕)를 공급하고, 15 및 75 ㎍/ml(100 및 500 nM)(N=6)의 AT80-Phor18(0.76 mg/ml) 또는 네이키드 항체 AT-80와 함께 인큐베이션하였다. 10 μM의 스타우로스포린을 카스파제 3/7 활성화에 대한 양성 대조군으로 제공하였다. 인큐베이션 5시간 후, 배양물을 발광측정 검정 키트(Promega, Madison, WI, Caspase Glo 3/7 G811C lot # 28731802)를 이용하여 카스파제 3/7 수준에 대해 검정하였다.

[0464] 카스파제 3/7 활성화를 발광측정 신호로부터의 상대 광 단위로부터 계산하였다. 스타우로스포린을 100% 카스파제 3/7 활성화로 설정하였고, 시약의 첨가가 없는 세포 현탁액 단독을 0% 카스파제 수준으로 제공하였다. AT80-Phor18은 15 ㎍/ml에서 카스파제 3/7 수준을 13±2.6%로 상승시켰고, 75 ㎍/ml에서 85.7±5에 도달시켰다. 15 또는 75 ㎍/ml 농도에서 컨쥬게이션되지 않은 AT-80은 카스파제 활성화가 결핍되었다(-12.3 및 -2.3%). AT80-Phor18의 가장 높은 용량은 스타우로스포린과 동등한 카스파제 활성화를 발생시켰다(도 9).

[0465] Phor18-컨쥬게이션된 ADC는 표적 세포에 결합된 경우 카스파제 3/7을 활성화시키고, 이에 따라 5시간 이내에 아폽토시스 세포 사멸을 촉진한다.

[0466] *실시예 14*

[0467] 본 실시예는 E. 콜리에서의 단일쇄 항-CD20 Phor18(scFv-Phor18) 컨쥬게이트의 발현 작제물 및 특성규명을 기재한다.

[0468] p185의 인간화 가변 영역으로 리툭산(Rituxan) CDR을 삽입함으로써 단일쇄 Fv 항-CD20 단편을 설계하였다. 폴리-히스티딘 태그를 정제를 위해 단백질의 N-말단에 첨가하였다. 아미노산 서열이 하기 제시되며, 삽입된 CDR은 굵은 글씨로 제시된다. 폴리-글리신 가요성 링커를 V_L과 V_H 도메인 사이에 삽입하였고, Phor18을 GS 링커 뒤의 C-말단에 두었다.

[0469] scFv 단편의 아미노산 서열 (네이키드 AB); 굵은 글씨의 CDR (SEQ ID NO.:92)

```
        10         20         30         40         50         60
HHHHHHDIQL TQSPAILSAS PGEKVTMTCR ASSSVSYIHW FQQKPGSSPK PWIYATSNLA

        70         80         90        100        110        120
SGVPVRFSGS GSGTSYSLTI SRVEAEDAAT YYCQQWTSNP PTFGGGTKLE IGSTSGGGSG

       130        140        150        160        170        180
GGSGGGGSSV QLQQPGAELV KPGASVKMSC KASGYTFTSY NMHWVKQTPG RGLEWIGAIY

       190        200        210        220        230        240
PGNGDTSYNQ KFKGKATLTA DKSSSTAYMQ LSSLTSEDSA VYYCARSTYY GGDWYFDVWG
```

[0470] QGTTVTVSS

[0471] scFv-Phor18 컨쥬게이트의 아미노산 서열 (C-말단); 굵은 글씨의 CDR (SEQ ID NO.:93)

```
        10         20         30         40         50         60
HHHHHHDIQL TQSPAILSAS PGEKVTMTCR ASSSVSYIHW FQQKPGSSPK PWIYATSNLA

        70         80         90        100        110        120
SGVPVRFSGS GSGTSYSLTI SRVEAEDAAT YYCQQWTSNP PTFGGGTKLE IGSTSGGGSG

       130        140        150        160        170        180
GGSGGGGSSV QLQQPGAELV KPGASVKMSC KASGYTFTSY NMHWVKQTPG RGLEWIGAIY

       190        200        210        220        230        240
PGNGDTSYNQ KFKGKATLTA DKSSSTAYMQ LSSLTSEDSA VYYCARSTYY GGDWYFDVWG

       250        260
QGTTVTVSSG SKFAKFAKKF AKFAKKFAK
```

[0472]

[0473] 상기 항체 단편을 E. 콜리에서의 생성을 위해 Genscript USA(Piscataway, NJ)로부터 주문하였다. Genscript는 E. 콜리 극한 발현 세포에서의 생성을 위해 이들의 pGS21a 발현 플라스미드를 사용하였다. Genscript는 E. 콜리 봉입체로부터 단백질을 분리시켰다.

[0474] 네이키드 scFv 단편은 친화성 크로마토그래피를 통해 정제하였고, 0.31 mg/ml의 농도에서 15 mg/L의 수율을 발생시켰다. 순도는 85%로 결정되었다. 분자량을 27,088 g/mol을 이용한 쿠마시 염색된 SDS PAGE 분석을 이용하여 결정하였다. Phor18 컨쥬게이트는 쿠마시 염색된 SDS-Page를 기초로 하여 15 mg/L의 유사한 수율 및 85%의

순도를 가졌다. 분자량을 29,349 g/mol에서 측정하였다. 네이키드 AB 및 ADC 둘 모두는 50 mM Tris 완충액, pH 8.0 내에 제공되었다.

[0475] 항-CD20 ScFv-Phor18은 29.3kD의 계산된 분자량을 갖는다. 항체 단편을 정제를 위해 폴리-히스티딘 태그와 함께 발현시켰다. 항-히스티딘으로 탐지된 단백질의 면역블롯 및 분자량을 나타낸 쿠마시 블루로 염색된 SDS-PAGE는 정확한 범위 내였다.

[0476] *실시예 15*

[0477] 본 실시예는 E. 콜리에서 재조합적으로 생성된 CD20 표적화 Fv-C_H3-C_H3-Fv-Phor18 컨쥬게이트의 발현 및 특성규명을 기재한다:

[0478] 2가 항-CD20 미니바디를 가변 도메인 사이 및 C_H3 도메인 사이에 가요성 글리신-세린 링커를 첨가하여 Fv-C_H3-C_H3-Fv 미니바디를 생성시킴으로써 설계하였다. 폴리-히스티딘 태그를 봉입체로부터의 정제를 위해 단백질의 N-말단으로 첨가하였고, Phor18을 GS 링커 뒤의 C-말단에 위치시켰다. 아미노산 서열은 하기 제시되며, 다양한 도메인에서 삽입된 CDR은 굵은 글씨로 제시되며, C_H3 도메인은 소문자 알파벳으로 표시된다.

[0479] 항-CD20 미니바디 Fv-C_H3-C_H3-Fv의 아미노산 서열; 굵은 글씨의 CDR (SEQ ID NO.:94)

```
        10         20         30         40         50         60
DIQLTQSPAI LSASPGEKVT MTCRASSSVS YIHWFQQKPG SSPKPWIYAT SNLASGVPVR

        70         80         90        100        110        120
FSGSGSGTSY SLTISRVEAE DAATYYCQQW TSNPPTFGGG TKLEIGSISG GGSGGGSGGG

       130        140        150        160        170        180
GSSVQLQQPG AELVKPGASV KMSCKASGYT FTSYNMHWVK QTPGRGLEWI GAIYPGNGDT

       190        200        210        220        230        240
SYNQKFKGKA TLTADKSSST AYMQLSSLTS EDSAVYYCAR STYYGGDWYF DVWGQGTTVT

       250        260        270        280        290        300
VSSGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV

       310        320        330        340        350        360
LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK GSTSGGGSGG

       370        380        390        400        410        420
GSGGGGSSGQ PREPQVYTLP PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK

       430        440        450        460        470        480
TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGKVQLQQ

       490        500        510        520        530        540
PGAELVKPGA SVKMSCKASG YTFTSYNMHW VKQTPGRGLE WIGAIYPGNG DTSYNQKFKG

       550        560        570        580        590        600
KATLTADKSS STAYMQLSSL TSEDSAVYYC ARSTYYGGDW YFDVWGQGTT VTVSSGSTSG

       610        620        630        640        650        660
GGSGGGSGGG GSSDIQLTQS PAILSASPGE KVTMTCRASS SVSYIHWFQQ KPGSSPKPWI

       670        680        690        700        710
YATSNLASGV PVFSGSGSGT SYSLTISRVE AEDAATYYCQ QWTSNPPTFG GGTKLEI
```

[0480]

[0481] 항-CD20-Phor18 미니바디 컨쥬게이트 Fv-C_H3-C_H3-Fv-Phor18의 아미노산 서열; 굵은 글씨의 CDR (SEQ ID NO.:95)

```
        10         20         30         40         50         60
DIQLTQSPAI LSASPGEKVT MTCRASSSVS YIHWFQQKPG SSPKPWIYAT SNLASGVPVR

        70         80         90        100        110        120
FSGSGSGTSY SLTISRVEAE DAATYYCQQW TSNPPTFGGG TKLEIGSTSG GGSGGGSGGG

       130        140        150        160        170        180
GSSVQLQQPG AELVKPGASV KMSCKASGYT FTSYNMHWVK QTPGRGLEWI GAIYPGNGDT

       190        200        210        220        230        240
SYNQKFKGKA TLTADKSSST AYMQLSSLTS EDSAVYYCAR STYYGGDWYF DVWGQGTTVT

       250        260        270        280        290        300
VSSGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV

       310        320        330        340        350        360
LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK GSTSGGGSGG

       370        380        390        400        410        420
GSGGGGSSGQ PREPQVYTLP PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK

       430        440        450        460        470        480
TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGKVQLQQ

       490        500        510        520        530        540
PGAELVKPGA SVKMSCKASG YTFTSYNMHW VKQTPGRGLE WIGAIYPGNG DTSYNQKFKG

       550        560        570        580        590        600
KATLTADKSS STAYMQLSSL TSEDSAVYYC ARSTYYGGDW YFDVWGQGTT VTVSSGSTSG

       610        620        630        640        650        660
GGSGGGSGGG GSSDIQLTQS PAILSASPGE KVTMTCRASS SVSYIHWFQQ KPGSSPKPWI

       670        680        690        700        710        720
YATSNLASGV PVFSGSGSGT SYSLTISRVE AEDAATYYCQ QWTSNPPTFG GGTKLEIGSK

       730
FAKFAKKFAK FAKKFAK
```

[0482]

[0483] 항체 단편을 E. 콜리에서의 생성을 위해 Genscript USA(Piscataway, NJ)로부터 수득하였다. Genscript는 E. 콜리 극한 발현 세포에서의 생성을 위해 이들의 pGS21a 발현 플라스미드를 사용하였다. Genscript는 E. 콜리 봉입체로부터 단백질을 분리시켰다.

[0484] 네이키드 항-CD20 미니바디는 친화성 크로마토그래피를 통해 정제하였고, 0.23 mg/ml의 농도에서 3 mg/L의 수율을 발생시켰다. 순도는 80%로 결정되었다. 분자량을 78,988 g/mol을 이용한 쿠마시 염색된 SDS PAGE 분석을 이용하여 결정하였다. Phor18 컨쥬게이트는 쿠마시 염색된 SDS-Page를 기초로 하여 3 mg/L의 유사한 수율 및 70%의 순도를 가졌다. 분자량을 93,515 g/mol에서 측정하였다. 네이키드 AB 및 ADC 둘 모두는 50 mM Tris 완충제, 150 mM NaCl, 15-20% 글리세롤, pH 8-9.5 내에 제공되었다.

[0485] 네이키드 단일쇄 Fv 및 항-CD20 미니바디 및 scFv-Phor18 및 항 CD20-Phor18 컨쥬게이트를 E. 콜리에서 발현시켰다. 각각의 항체 단편 백본에 해당하는 별개의 분자량이 SDS-PAGE 젤 및 웨스턴 블롯에서 입증되었다.

[0486] *실시예 16*

[0487] 본 실시예는 CD20 양성 및 CD20 음성 세포주에서의 scFv 및 항-CD20 네이키드 미니바디 및 Phor18 컨쥬게이트의 시험관내 분석을 기재한다.

[0488] 시험관내 연구에서, CD20 양성 세포(Daudi, 버킷림프종)에서 박테리아 발현 시스템에서 재조합적으로 생성된 CD20을 표적으로 하는 scFv-Phor18 및 항-CD20-Phor18 미니바디와 "네이키드" 항체(scFv 및 항-CD20 미니바디)의 세포독성을 비교하였다. CD20 음성 백혈병 세포(U937)를 대조군으로 제공하였다.

[0489] 각각의 네이키드 항체 단편 및 ADC의 농도를 브래드포드에 따라 결정하였다. 0.3 mg/ml 농도의 네이키드 항체 scFv는 Mw 27,088 g/mol이었고, 미니바디는 Mw 78,988 g/mol, 0.231 mg/ml였고; Phor 18 컨쥬게이션된 항체는 scFv-Phor18(Mw 29,349 g/mol, 0.9 mg/ml) 및 미니바디-Phor18(Mw 93,515, 0.48 mg/ml)이었다. 세포주를 미국 미생물보존센터(Mannassas,VA)에서 수득하였다. 인간 비-호지킨 림프종 세포 Daudi(CD20 양성, 계대 번호 p8) 및 인간 백혈병 세포주 U937(CD20 음성, p 16)을 열 비활성화된 완전 배지에서 불투명한 플레이트에 웰 당

2,000개 세포의 밀도로 시딩하였다. 24시간 후, 세포에 새로운 배지(75 ㎕)를 공급하고, 25㎕의 scFv-Phor18 및 미니바디-Phor18 ADC의 4x 연속 희석액과 함께 인큐베이션하고, 세포 배양 배지에서 제조된 네이키드 항체 단편(scFv 및 미니바디)을 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 200, 및 500 nM(N=6)의 농도로 첨가하였다. 4시간 동안 인큐베이션된 세포를 발광측정 검정 키트(Promega, Madison, WI, , Cytotox Glo G9292 lot # 301329)를 이용하여 막 온전성에 대해 검정하였다. 세포 생활력을 발광 검정 키트(Promega, Madison, WI, Cell Titer Glo, G 7572, lot 30062102)를 이용하여 24, 48 및 72시간 후에 결정하였다.

[0490] 100% 세포 생활력(배양 배지) 및 100% 세포 사멸(0.1% Triton X 100)에 대한 대조군을 동일 조건하에서 인큐베이션하였다.

[0491] Windows용 Graph Pad Prizm version 5.00, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com(Graph Pad Prizm, Inc)을 이용하여 데이터를 처리하고 분석하여 IC_{50} 값을 수득하였다. 유의성에 대한 통계 분석을 양측 스튜던츠 T-검정에 의해 결정하였다. 각각의 검정을 각각 2-3웰의 2개의 플레이트를 이용하여 수행하여, 시점 당 4-6 데이터 포인트의 N을 수득하였다.

[0492] 재조합 scFv-Phor18 컨쥬게이트를 E. 콜리에서 발현시켰다. 도 10, 표 11에 제시된 바와 같이, 항-CD20-scFv-Phor18 컨쥬게이트는 CD20 양성 Daudi 세포에서 막 온전성을 파괴시켰다. 인간 버킷 림프종 세포(Daudi)는 48시간 이내에 사멸된 반면, CD20 음성 인간 백혈병 세포(U937)는 사멸되지 않았다. 네이키드 scFv 항체는 어느 세포주도 사멸시키지 않았다. 세포 생활력 데이터의 힐 플롯(Hill plot) 분석은 Daudi 세포에서 24시간 후 10.02±0.5 nM 및 48시간 후 1.5±0.3 nM의 미니바디 컨쥬게이트에 대한 IC_{50} 값을 발생시켰다. 네이키드 scFv는 독성이 아니었다. CD20 음성 세포주 U937은 네이키드 scFv 또는 scFv-Phor18 또는 미니바디-Pho18 컨쥬게이트에 의해 사멸되지 않았다. 미니바디-Phor18 컨쥬게이트의 시험관내 활성은 24 및 46시간 후에 CD20 양성 Daudi 세포에서 10.5±0.5 및 3.9±1.6 nM이었다. 네이키드 미니바디는 독성이 아니었다.

[0493] **표 11**: scFv-Phor18 및 Fv-C_H3-C_H3-Fv-Phor18, 및 CD20을 표적으로 하는 scFv 및 Fv-C_H3-C_H3-Fv의 시험관내 독성. Daudi 세포(NHL)는 CD20에 대해 양성이고, U937 세포(백혈병)는 CD20에 대해 음성이다.

[0494]

Daudi	scFv [IC_{50} nM]	scFv-Phor18 [IC_{50} nM]	Fv-C_H3-C_H3-Fv [IC_{50} nM]	Fv-C_H3-C_H3-Fv-Phor18 [IC_{50} nM]
2 h	독성이 아님	109.8± 0.9	ND	ND
5 h (N=8)	독성이 아님	111.6± 15.1	ND	ND
24 h (N=6)	독성이 아님	10.02± 0.5	독성이 아님	10.5± 0.5
46 h (N=6)	독성이 아님	1.5± 0.3	독성이 아님	3.6± 1.6
U937				
2-48 h	독성이 아님	독성이 아님	독성이 아님	독성이 아님

[0495] ND= 결정되지 않음

[0496] 효능 있는 scFv-Phor18 및 Fv-C_H3-C_H3-Fv-Phor18 컨쥬게이트를 E. 콜리에서 발현시켰고, 이는 네이키드 scFv 또는 Fv-C_H3-C_H3-Fv보다 더 효능이 있었다. CD20 표적화 ADC는 표적 세포를 특이적으로 사멸시켰고, 세포 사멸은 내재화와 독립적이었다. scFv-Phor18 또는 Fv-C_H3-C_H3-Fv-Phor18 표적화 컨쥬게이트는 아폽토시스 경로를 활성화시켰으나, 네이키드 scFv 항체 단편은 그렇지 않았다. C-말단 컨쥬게이션된 scFv 및 Fv-C_H3-C_H3-Fv 컨쥬게이트는 24시간 후에 나노몰 범위의 유사한 활성을 나타내었다.

[0497] *실시예 17*

[0498] 본 실시예는 CD20 표적화 ADC의 가능한 작용 메커니즘을 기재한다.

[0499] 시험관내 연구에서, CD20 양성 세포(Daudi 버킷 림프종)에서 재조합적으로 발현된 CD20을 표적으로 하는 scFv-Phor18 컨쥬게이트와 "네이키드" 항체(scFv)의 카스파제 활성화를 비교하였다. 인간 비-호지킨 림프종 세포 Daudi(CD20 양성, p 5) 및 Raji(CD20 양성, 계대 번호 p 3)를 열 비활성화된 완전 배지에서 불투명한 플레이트에 웰 당 3,000개 세포의 밀도로 시딩하였다. 24시간 후, 세포에 새로운 배지(75 ㎕)를 공급하고, scFv-Phor18(0.365 mg/ml) 또는 5 및 15 ㎍/ml(100 및 500 nM)(N=6)의 네이키드 항체 scFv와 함께 인큐베이션하였다. 10 μM의 스타우로스포린을 카스파제 3/7 활성화를 위한 양성 대조군으로 제공하였다. 5시간 후, 발광측정 검정 키트(Promega, Madison, WI, Caspase Glo 3/7 G811C lot # 28731802)를 이용하여 카스파제 3/7 활성화에 대해 검정하였다.

[0500] 상대 카스파제 3/7 활성화를 발광측정 신호로부터의 상대 광 단위로부터 계산하였다. 스타우로스포린을 100% 카스파제 3/7 활성화로 설정하였고, 시약이 없음을 0% 활성화 대조군으로 설정하였다. 5 ㎍/ml의 scFv-Phor18은 스타우로스포린에 비해 18.3±0.8 및 29.3±0.9%의 상승된 카스파제 3/7 수준을 가졌다(도 11).

[0501] Phor18-컨쥬게이션된 ADC는 표적 세포에서 카스파제 3/7을 활성화시키고, 이에 따라 아폽토시스 세포 사멸을 촉진한다. 따라서, 단일쇄 또는 미니바디 단편으로서의 항체 Phor18 컨쥬게이트는 재조합적으로 생성될 수 있고, 표적 세포에서의 내재화 없이 활성이다. ADC를 통한 카스파제 활성화는 가능한 작용 메커니즘일 수 있다.

[0502] *실시예 18*

[0503] 본 실시예는 N 또는 C 말단에서 컨쥬게이션된 Phor18을 갖고, 항체 단편 당 1 및 2개의 Phor18 분자의 화학량론을 갖는 CD20 표적화 scFvFc Phor18 컨쥬게이트의 발현을 기재한다.

[0504] 재조합 시리즈를 원형질막 주위 분비를 이용하여 E. 콜리에서 Genscript, USA(Piscataway, NJ)에 의해 생성시켰다. 전사물을 합성하고, 코돈 사용빈도를 E. 콜리에 대해 최적화시켰다. Genscript pGS-21a 발현 벡터를 이용하였다. 발현된 단백질은 아미노산 MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA(SEQ ID NO.:101)로 구성된 분해가능한 PelB 박테리아 신호 서열의 N-말단으로의 첨가에 의해 E. 콜리 세포의 원형질막 주위공간으로 유도되었다. 리툭산 CDR을 p185 허셉틴(Herceptin)의 인간화 가변 영역으로 삽입하였고, 이는 굵은 글씨로 제시된다. 4개의 글리신 및 세린이 가요성 첨가를 위해 가변 영역에 연결되었다. Phor18을 N-말단, C-말단, 또는 둘 모두에 위치시켰다. 항체 단편의 아미노산 서열은 하기와 같다:

[0505] 분해된 PelB N-말단 신호 서열 MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA (SEQ ID NO.:96)

[0506] scFv-Fc의 아미노산 서열 (네이키드 항체); 굵은 글씨의 CDR (SEQ ID NO.:97)

```
        10         20         30         40         50         60
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASSSVS YIHWYQQKPG KAPKLLIYAT SNLASGVPSR

        70         80         90        100        110        120
FSGSRSGTDF TLTISSLQPE DFATYYCQQW TSNPPTFGQG TKVEIKGGGG SEVQLVESGG

       130        140        150        160        170        180
GLVQPGGSLR LSCAASGYTF TSYNMHWVRQ APGKGLEWVA AIYPGNGDTS YNQKFKGRFT

       190        200        210        220        230        240
ISADTSKNTA YLQMNSLRAE DTAVYYCSRS TYYGGDWYFD VWGQGTLVTV SSVQPCPAPE

       250        260        270        280        290        300
LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE

       310        320        330        340        350        360
EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP

       370        380        390        400        410        420
SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD

       430        440        450
KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK
```

[0507]

[0508] 용해-펩티드 Phor18-항체 컨쥬게이트의 아미노산 서열; 굵은 글씨의 CDR

[0509] Phor18-scFv-Fc-Phor18: N-말단 및 C-말단 컨쥬게이션 (SEQ ID NO.:98)

```
        10         20         30         40         50         60
KFAKFAKKFA KFAKKFAKGS DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASSSVS YIHWYQQKPG

        70         80         90        100        110        120
KAPKLLIYAT SNLASGVPSR FSGSRSGTDF TLTISSLQPE DFATYYCQQW TSNPPTFGQG

       130        140        150        160        170        180
TKVEIKGGGG SEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGYTF TSYNMHWVRQ APGKGLEWVA

       190        200        210        220        230        240
AIYPGNGDTS YNQKFKGRFT ISADTSKNTA YLQMNSLRAE DTAVYYCSRS TYYGGDWYFD

       250        260        270        280        290        300
VWGQGTLVTV SSVQPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV

       310        320        330        340        350        360
KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE

       370        380        390        400        410        420
KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT

       430        440        450        460        470        480
TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGKGSKFAK

       490
FAKKFAKFAK KFAK
```

[0510]

[0511] 용해-퀩티드 Phor18-항체 컨쥬게이트의 아미노산 서열; 굵은 글씨의 CDR

[0512] Phor18-scFv-Fc: N-말단 컨쥬게이션 (SEQ ID NO.:99)

```
        10         20         30         40         50         60
KFAKFAKKFA KFAKKFAKGS DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASSSVS YIHWYQQKPG

        70         80         90        100        110        120
KAPKLLIYAT SNLASGVPSR FSGSRSGTDF TLTISSLQPE DFATYYCQQW TSNPPTFGQG

       130        140        150        160        170        180
TKVEIKGGGG SEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGYTF TSYNMHWVRQ APGKGLEWVA

       190        200        210        220        230        240
AIYPGNGDTS YNQKFKGRFT ISADTSKNTA YLQMNSLRAE DTAVYYCSRS TYYGGDWYFD

       250        260        270        280        290        300
VWGQGTLVTV SSVQPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV

       310        320        330        340        350        360
KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE

       370        380        390        400        410        420
KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT

       430        440        450        460        470
TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK
```

[0513]

[0514] 용해-퀩티드 Phor18-항체 컨쥬게이트의 아미노산 서열; 굵은 글씨의 CDR

[0515] Phor18-scFv-Fc: C-말단 컨쥬게이션 (SEQ ID NO.:100)

```
         10          20          30          40          50          60
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASSSVS YIHWYQQKPG KAPKLLIYAT SNLASGVPSR

         70          80          90         100         110         120
FSGSRSGTDF TLTISSLQPE DFATYYCQQW TSNPPTFGQG TKVEIKGGGG SEVQLVESGG

        130         140         150         160         170         180
GLVQPGGSLR LSCAASGYTF TSYNMHWVRQ APGKGLEWVA AIYPGNGDTS YNQKFKGRFT

        190         200         210         220         230         240
ISADTSKNTA YLQMNSLRAE DTAVYYCSRS TYYGGDWYFD VWGQGTLVTV SSVQPCPAPE

        250         260         270         280         290         300
LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE

        310         320         330         340         350         360
EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP

        370         380         390         400         410         420
SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD

        430         440         450         460         470
KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGKGSKFAK FAKKFAKFAK KFAK
```

[0516]

[0517] ADC를 단백질 A 친화성 크로마토그래피 컬럼 상에서 정제하고, 동결 저장(-20℃)하였다. 각각의 네이키드 항체 단편 및 ADC의 농도를 분광광도(OD_{280}) 결정하였다. 1.1 mg/ml의 농도의 네이키드 항체 scFv-Fc는 Mw 52,562 g/mol이었고, Phor 18 컨쥬게이션된 항체는 Phor18-V_L-scFvFc(Mw 54,685 g/mol, 1.0 mg/ml)였고, Phor18-C_H3-scFvFc(Mw 54,685 g/mol, 0.8 mg/ml)는 단일쇄를 형성하였다.

[0518] *실시예 19*

[0519] 본 실시예는 시험관내 연구에서 scFv-Fc-Phor18 컨쥬게이트의 활성을 기재한다.

[0520] CD20 양성 세포(Daudi, 버킷 림프종)에서 N-말단 또는 C-말단 및 N-말단 및 C-말단에서 Phor18 컨쥬게이션을 갖는 E. 콜리 발현 시스템에서 재조합적으로 생성된 CD20을 표적으로 하는 scFv-Fc-Phor18 컨쥬게이트의 세포독성을 "네이키드" 항체(scFv-Fc)와 비교하였다. CD20 음성 백혈병 세포(U937)를 대조군으로 제공하였다. E. 콜리 발현된 ADC는 단일쇄이며, V_L 사슬의 N 말단의 1개의 Phor18 분자(Phor18-V_L-scFv-Fc), 및 C_H3 사슬의 C-말단의 1개의 Phor18 분자(scFv-Fc-C_H3-Phor18)에 컨쥬게이션되었다.

[0521] 각각의 네이키드 항체 단편 및 ADC의 농도를 분광광도(OD_{280}) 결정하였다. 1.1 mg/ml의 농도의 네이키드 항체 scFv-Fc는 Mw 52,562 g/mol이었고, Phor 18 컨쥬게이션된 항체는 Phor18-V_L-scFvFc(Mw 54,685 g/mol, 1.0 mg/ml)였고, scFv-Fc-C_H3-Phor18(Mw 54,685 g/mol, 0.8 mg/ml)이었다. 인간 비-호지킨 림프종 세포 Daudi(CD20 양성, 계대 번호 p7) 및 인간 백혈병 세포주 U937(CD20 음성, p 6)을 세포 해리 완충액을 이용하여 열 비활성화 완전 배지 내에 불투명한 플레이트에 웰 당 2,000개 세포의 밀도로 시딩하였다. 24시간 후, 세포에 새로운 배지(75 ㎕)를 공급하고, 25 ㎕의 각각의 ADC의 4x 연속 희석액과 함께 인큐베이션시키고, 세포 배양 배지에서 제조된 네이키드 항체를 scFvFc, Phor18-V_L-scFvFc 및 scFv-Fc-C_H3-Phor18에 대해 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 200 및 500 nM의 농도로 첨가하였다.

[0522] 4시간 동안 인큐베이션된 세포를 발광측정 검정 키트(Promega, Madison, WI, Cytotox Glo G9292 lot # 26229601)를 이용하여 막 온전성에 대해 검정하였다. 세포 생활력을 발광 검정 키트(Promega, Madison, WI, Cell Titer Glo, G 7572, lot 30731602)를 이용하여 24시간 후에 결정하였다. 100% 세포 생활력(배양 배지) 및 100% 세포 사멸(0.1% Triton X 100)에 대한 대조군을 동일 조건하에서 인큐베이션하였다.

[0523] Windows용 Graph Pad Prizm version 5.00, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com(Graph Pad Prizm, Inc)을 이용하여 데이터를 처리하고 분석하여 IC_{50} 값을 수득하였다. 유의성에 대한 통계 분석을 양측 스튜던츠 T-검정에 의해 결정하였다. 각각의 검정을 각각 2-3웰의 2개의 플레이트를 이용하여 수행하여, 시점 당 4-6 데이터 포인트의 N을 수득하였다.

[0524] N-말단 또는 C-말단에 1개의 Phor18을 갖는 재조합 ScFv-Fc-Phor18 컨쥬게이트를 E. 콜리에서 발현시켰다. 표

12에 제시된 바와 같이, 항-CD20-Phor18 컨쥬게이트 Phor18-V_L-scFvFc는 277±37.5 nM의 IC_{50} 값으로 4시간 후에 CD20 양성 Daudi 세포에서 막 온전성을 파괴하였다. scFv-Fc-C_H3-Phor18에 대한 C-말단 컨쥬게이트에 대해 2558±259 nM로 10배 더 높은 값이 수득되었다. 네이키드 scFvFc는 독성이 아니었다.

[0525] 인간 버킷 림프종 세포(Daudi)를 Phor18-V_L-scFv-Fc에 대해 21.8±0.8 nM, 및 scFv-Fc-C_H3-Phor18에 대해 422.6±47.5 nM의 IC_{50} 값으로 24시간 이내에 사멸시켰다.

[0526] 네이키드 scFv는 CD20 양성 Daudi 세포주에서 677.2±45.3 nM에서 세포 사멸을 야기시켰다. CD20 음성 인간 백혈병 세포(U937)는 4시간 후에 사멸되지 않았고, 표적 세포주와 비교하여 네이키드 scFvFc에 대해 495.4±35.2 nM, Phor18-V_L-scFv-Fc에 대해 105.3±15.6nM 및 scFv-Fc-C_H3-Phor18 컨쥬게이트에 대해 722.3±33.2 nM의 IC_{50} 값의 더 낮은 민감도를 나타내었다.

[0527] **표 12**: Phor18-V_L-scFv-Fc 및 scFv-Fc-C_H3-Phor18, 및 CD20을 표적으로 하는 scFv-Fc의 시험관내 독성. Daudi 세포(NHL)는 CD20에 대해 양성이고, U937 세포(백혈병)는 CD20에 대해 음성이다.

Daudi	**scFvFc 네이키드 AB**	**Phor18-V_L-scFv-Fc IC_{50} 값 [nM]**	**scFv-Fc-C_H3-Phor18 IC_{50} 값 [nM]**
4 h (N=8)	독성이 아님	277±37.5	2558± 259
24 h (N=8)	677.2 ± 45.3	21.8±0.8	422.6±47.5
U937	**scFvFc 네이키드 AB**	**Phor18-V_L-scFv-Fc IC_{50} 값 [nM]**	**scFv-Fc-C_H3-Phor18 IC_{50} 값 [nM]**
4 h (N=8)	독성이 아님	독성이 아님	독성이 아님
24 h (N=8)	495.4±35.2	105.3±15.6	722.3±33.2

[0528]

[0529] N-말단 컨쥬게이션된 Phor18 항체 단편은 C-말단 컨쥬게이션된 Phor18 항체 단편에 비해 더 독성이었다.

[0530] *실시예 20*

[0531] 본 실시예는 피키아 파스토리스(효모)에서 생성된 CD20을 표적으로 하는 scFv-Fc-Phor18 컨쥬게이트의 발현 및 활성을 기재한다.

[0532] p185의 인간화 가변 영역으로 리툭산 CDR을 삽입함으로써 4개의 항-CD20 단일쇄 Fv-Fc 항체 단편을 설계하였다. 삽입된 CDR은 하기 제시된 아미노산 서열에서 굵은 글씨로 표현된다. 가변 영역 및 인간 불변 도메인 힌지, C_H2 및 C_H3 사이에서 폴리-G 링커를 사용하였다. 하기 제시된 항체 단편 서열의 순서는 다음과 같다: 네이키드 항체, C-말단 및 N-말단 Phor18, N-말단 Phor18 단독, C-말단 Phor18 단독. 각각의 작제물에 대한 아미노산 서열은 하기에 제시된다:

[0533] 네이키드 항체의 아미노산 서열; 굵은 글씨의 CDR (SEQ ID NO.:101)

```
        10         20         30         40         50         60
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASSSVS YIHWYQQKPG KAPKLLIYAT SNLASGVPSR

        70         80         90        100        110        120
FSGSRSGTDF TLTISSLQPE DFATYYCQQW TSNPPTFGQG TKVEIKGGGG SGGGGSGGGG

       130        140        150        160        170        180
SEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGYTF TSYNMHWVRQ APGKGLEWVA AIYPGNGDTS

       190        200        210        220        230        240
YNQKFKGRFT ISADTSKNTA YLQMNSLRAE DTAVYYCSRS TYYGGDWYFD VWGQGTLVTV

       250        260        270        280        290        300
SSTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD

       310        320        330        340        350        360
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK

       370        380        390        400        410        420
GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS

       430        440        450        460
DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK
```

[0534]

[0535] 컨쥬게이션된 항체 Phor18-V_L-scFv-Fc-C_H3-Phor18의 아미노산 서열; 굵은 글씨의 CDR (SEQ ID NO.:102)

```
        10         20         30         40         50         60
KFAKFAKKFA KFAKKFAKGS DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASSSVS YIHWYQQKPG

        70         80         90        100        110        120
KAPKLLIYAT SNLASGVPSR FSGSRSGTDF TLTISSLQPE DFATYYCQQW TSNPPTFGQG

       130        140        150        160        170        180
TKVEIKGGGG SGGGGSGGGG SEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGYTF TSYNMHWVRQ

       190        200        210        220        230        240
APGKGLEWVA AIYPGNGDTS YNQKFKGRFT ISADTSKNTA YLQMNSLRAE DTAVYYCSRS

       250        260        270        280        290        300
TYYGGDWYFD VWGQGTLVTV SSTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT

       310        320        330        340        350        360
CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK

       370        380        390        400        410        420
CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

       430        440        450        460        470        480
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS

       490        500
LSLSPGKGSK AFKKAFKAFK KAFKAFK
```

[0536]

[0537] 컨쥬게이션된 항체 Phor18-V_L-scFv-Fc의 아미노산 서열; 굵은 글씨의 CDR (SEQ ID NO.: 103)

```
        10          20          30          40          50          60
KFAKFAKKFA KFAKKFAKGS DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASSSVS YIHWYQQKPG

        70          80          90          100         110         120
KAPKLLIYAT SNLASGVPSR FSGSRSGTDF TLTISSLQPE DFATYYCQQW TSNPPTFGQG

        130         140         150         160         170         180
TKVEIKGGGG SGGGGSGGGG SEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGYTF TSYNMHWVRQ

        190         200         210         220         230         240
APGKGLEWVA AIYPGNGDTS YNQKFKGRFT ISADTSKNTA YLQMNSLRAE DTAVYYCSRS

        250         260         270         280         290         300
TYYGGDWYFD VWGQGTLVTV SSTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT

        310         320         330         340         350         360
CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK

        370         380         390         400         410         420
CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

        430         440         450         460         470         480
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS
```

[0538] LSLSPGK

[0539] 컨쥬게이션된 항체 scFv-Fc-C_H3-Phor18의 아미노산 서열; 굵은 글씨의 CDR (SEQ ID NO.:104)

```
        10          20          30          40          50          60
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASSSVS YIHWYQQKPG KAPKLLIYAT SNLASGVPSR

        70          80          90          100         110         120
FSGSRSGTDF TLTISSLQPE DFATYYCQQW TSNPPTFGQG TKVEIKGGGG SGGGGSGGGG

        130         140         150         160         170         180
SEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGYTF TSYNMHWVRQ APGKGLEWVA AIYPGNGDTS

        190         200         210         220         230         240
YNQKFKGRFT ISADTSKNTA YLQMNSLRAE DTAVYYCSRS TYYGGDWYFD VWGQGTLVTV

        250         260         270         280         290         300
SSTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD

        310         320         330         340         350         360
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK

        370         380         390         400         410         420
GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS

        430         440         450         460         470         480
DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGSK AFKKAFKAFK
```

[0540] KAFKAFK

[0541] 4개의 scFv-Fc 단편에 대한 유전자 합성을 Genscript USA로부터 주문하였고, 코돈을 Genscript에서 피키아 파스토리스 효모 균주 GS115에서의 생성에 대해 최적화시켰다. Genescript는 각각의 발현 플라스미드를 InVitrogen 효모 발현 플라스미드 pPICZαA(cat#V195-20 lot#900479, 도 12)로 서브클로닝하였다. 상기 발현 플라스미드는 효모 α-인자 분비 신호를 가져, 항체 단백질이 배지로부터 분리될 수 있다.

[0542] 은 염색된 SDS PAGE에서의 CD20을 표적으로 하는 scFv-Fc-Phor18 컨쥬게이트의 특성규명은 피키아 파스토리스 발현된 ADC가 단일쇄 이합체이며, V_L 사슬의 N-말단(Phor18-V_L-scFvFc), C_H3 사슬의 C-말단(scFvFc-C_H3-Phor18) 및 V_L 사슬의 N 말단 및 C_H3 사슬의 C-말단(Phor18-V_L-scFv-Fc-C_H3-Phor18)에서 2 또는 4개의 Phor18 분자에 컨쥬게이션된 것을 나타내었다.

[0543] 각각의 네이키드 항체 단편 및 ADC의 농도를 분광광도(OD_{280}) 결정하였다. 네이키드 항체 scFv-Fc(Mw 102,078

g/mol)는 0.26 mg/ml의 농도였고, Phor 18 컨쥬게이션된 항체는 Phor18-V_L-scFvFc(Mw 106,616 g/mol, 0.5 mg/ml), scFvFc-C_H3-Phor18(Mw 106,616 g/mol, 0.17 mg/ml) 및 Phor18-V_L-scFv-Fc-C_H3-Phor18(Mw 111,154 g/mol, 0.7 mg/ml)이었다.

[0544] 시험관내 연구에서, CD20 양성 세포(Daudi, 버킷 림프종)에서 효모 발현 시스템에서 재조합적으로 생성된 CD20을 표적으로 하는 scFv-Fc-Phor18 컨쥬게이트와 "네이키드" 항체(scFv-Fc)의 세포독성을 비교하였다. CD20 음성 백혈병 세포(U937)를 대조군으로 제공하였다. 피키아 발현된 ADC는 단일쇄 이합체이며, V_L 사슬의 N-말단(Phor18-V_L-scFvFc), C_H3 사슬의 C-말단(scFvFc-C_H3-Phor18) 및 V_L 사슬의 N-말단 및 C_H3 사슬의 C-말단(Phor18-V_L-scFv-Fc-C_H3-Phor18)에서 2 또는 4개의 Phor18 분자에 컨쥬게이션되었다.

[0545] 인간 비-호지킨 림프종 세포 Daudi(CD20 양성, 계대 번호 p3) 및 인간 백혈병 세포주 U937(CD20 음성, p 12)을 세포 해리 완충액을 이용하여 열 비활성화 완전 배지 내에 불투명한 플레이트에 웰 당 2,000개 세포의 밀도로 시딩하였다. 24시간 후, 세포에 새로운 배지(75 ㎕)를 공급하고, 25㎕의 각각의 ADC의 4x 연속 희석액과 함께 인큐베이션시키고, 세포 배양 배지에서 제조된 네이키드 항체를 Phor18-V_L-scFv-Fc-C_H3-Phor18 및 Phor18-V_L-scFvFc에 대해 0.013, 0.133, 1.33, 13.3, 133, 266, 및 633 nM 및 네이키드 항체 scFv-Fc 및 scFvFc-C_H3-Phor18에 대해 0.013-266 nM의 농도로 첨가하였다.

[0546] 4시간 동안 인큐베이션된 세포를 발광측정 검정 키트(Promega, Madison, WI, Cytotox Glo G9292 lot # 26229601)를 이용하여 막 온전성에 대해 검정하였다. 세포 생활력을 발광 검정 키트(Promega, Madison, WI, Cell Titer Glo, G 7572, lot 31386501)를 이용하여 24, 및 48시간 후에 결정하였다. 100% 세포 생활력(배양 배지) 및 100% 세포 사멸(0.1% Triton X 100)에 대한 대조군을 동일 조건하에서 인큐베이션하였다.

[0547] Windows용 Graph Pad Prizm version 5.00, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com (Graph Pad Prizm, Inc)를 이용하여 데이터를 처리하고 분석하여 IC_{50} 값을 수득하였다. 유의성에 대한 통계 분석을 양측 스튜던츠 T-검정에 의해 결정하였다. 각각의 검정을 각각 2-3개의 웰을 갖는 2개의 플레이트를 이용하여 수행하여, 시점 당 4-6의 데이터 포인트의 N을 수득하였다.

[0548] 재조합 ScFv-Fc-Phor18 컨쥬게이트를 피키아 파스토리스에서 발현시켰다. 도 13 및 표 13에 제시된 바와 같이, 항-CD20-Phor18 컨쥬게이트는 Phor18-V_L-scFv-Fc-C_H3-Phor18에 대해 6.2±2 nM, 및 Phor18-V_L-scFvFc에 대해 23.5±2.5 nM 및 scFv-Fc-C_H3-Phor18에 대해 282.4±15 nM의 IC_{50} 값으로 4시간 후에 CD20 양성 Daudi 세포에서 막 온전성을 파괴하였고, 컨쥬게이션되지 않은 네이키드 scFvFc는 독성이 아니었다. 인간 버킷 림프종 세포(Daudi)는 Phor18-V_L-scFv-Fc-C_H3-Phor18에 대해 9.9±2 nM, 및 Phor18-V_L-scFvFc에 대해 18.8±4 nM 및 scFv-Fc-C_H3-Phor18에 대해 141.1±6 nM의 IC_{50} 값으로 24시간 이내에 사멸되었고, 네이키드 scFvFc는 287±28 nM의 IC_{50} 값을 가졌다. 가장 낮은 IC_{50} 값이 Phor18-V_L-scFv-Fc-C_H3-Phor18에 대해 1.6±0.3 nM, 및 Phor18-V_L-scFvFc에 대해 3.4±0.05 nM 및 scFv-Fc-C_H3-Phor18에 대해 106±10 nM로 48시간 후에 측정되었고, 네이키드 scFvFc는 339±26 nM의 IC_{50} 값을 가졌다. CD20 음성 인간 백혈병 세포(U937)는 컨쥬게이션된 ADC 및 컨쥬게이션되지 않은 ADC에 대해 동일한 반응을 나타내었고, 4시간 후에 막 온전성에 대해서는 효과가 없었고, 24시간 후의 IC_{50} 값은 298±13.4를 갖는 네이키드 scFv-Fc, Phor18-V_L-scFv-Fc-C_H3-Phor18에 대해 246.1±14.8, Phor18-V_L-scFvFc에 대해 875±81 및 scFv-Fc-C_H3-Phor18에 대해 274±154 nM로 동등하였다.

[0549] 이들 데이터는 N-말단 컨쥬게이션된 ADC가 C-말단 컨쥬게이션된 ADC보다 더 효능 있는 것을 입증한다. 4개의 Phor18 분자를 갖는 ADC가 2개의 Phor18 분자를 갖는 컨쥬게이트보다 더 활성이었다.

[0550] **표 13**: Phor18-V_L-scFv-Fc 및 scFv-Fc-C_H3-Phor18, Phor18-V_L-scFv-Fc-C_H3-Phor18 및 CD20을 표적으로 하는 scFv-Fc의 시험관내 독성. Daudi 세포(NHL)는 CD20에 대해 양성이고, U937 세포(백혈병)는 CD20에 대해 음성이다.

	scFvFc (네이키드)	Phor18-V_L-scFv-Fc-C_H3-Phor18	Phor18-V_L-scFv-Fc	scFv-Fc-C_H3-Phor18
Phor18 의 수	0	4 (N- 및 C-말단)	2 (N-말단)	2 (C-말단)
Daudi	**IC_{50} 값 [nM]**	**IC_{50} 값 [nM]**	**IC_{50} 값 [nM]**	**IC_{50} 값 [nM]**
4h (막 온전성)	독성이 아님	6.2±2	23.5±2.5	282.4±15
24 h	287±28	9.9±2	18.8±4	141.1±6
48 h	339±26	1.6±0.3	3.4±0.05	106±10
U937	**IC_{50} 값 [nM]**	**IC_{50} 값 [nM]**	**IC_{50} 값 [nM]**	**IC_{50} 값 [nM]**
4h (막 온전성)	독성이 아님	독성이 아님	독성이 아님	독성이 아님
24 h	298±13.4	246.1±14.8	875±81	274±154
48 h	112.7±4	117±7	독성이 아님	116±4.5

[0551]

[0552] N-말단 또는 C-말단 및 N-말단 및 C-말단에 2 및 4개의 Phor18 분자를 갖는 효능있는 scFv-Fc-Phor18 컨쥬게이트를 피키아 파스토리스에서 발현시켰다. ADC는 네이키드 scFv-Fc보다 더 효능이 있었다. ScFv-Fc-Phor18 컨쥬게이트는 N 및 C-말단이 컨쥬게이션되거나, N-말단이 컨쥬게이션된 경우에 표적 세포의 막 온전성을 파괴하였다. C-말단 컨쥬게이션은 N-말단, 및 C-말단 및 N-말단 컨쥬게이션된 ADC에 비해 50-100배 덜 활성이었다. CD20 표적화 ADC는 표적 세포를 특이적으로 사멸시켰고, 세포 사멸은 내재화에 독립적이었다. ADC에서 Phor18의 수를 증가시키는 것은 효능을 증가시켰다.

[0553] *실시예 21*

[0554] 본 실시예는 포유동물 시스템에서 생성된 IgG2-Phor18 컨쥬게이트를 기재한다:

[0555] CHO 세포 발현된 CD20 표적화 ADC는 전체 항체이며, 다양한 위치에서 2, 4 및 6개의 Phor18에 컨쥬게이션되었다. 생성된 ADC를 특성규명하여, 중쇄 및 경쇄에서의 Phor18 존재, 및 이들의 분자량을 확인하였다.

[0556] CHO 세포 발현 시스템으로부터의 재조합적으로 생성된 CD20 표적화 IgG2-Phor18 컨쥬게이트를 이용하여 시험관내에서 세포독성을 결정하였고, CD20 양성 세포(Daudi, 버킷 림프종)에서 "네이키드" 항체(리툭산)와 비교하였다. CD20 음성 백혈병 세포(U937)를 대조군으로 제공하였다.

[0557] 항-CD20 ADC의 V_L 및 V_H 도메인은 리툭산 항-CD20 CDR에 의해 대체된 CDR을 갖는 항-p185 허셉틴으로부터의 인간화된 서열이다. 불변 경쇄(C_L) 도메인의 λ 아이소형을 갖는 전체 항체 백본에 대해 전체 인간 IgG2를 이용하였다.

[0558] FcR 상호작용을 최소화시키고, 리툭산 ADC에 의한 면역 세포의 결합 및 사멸을 제한하기 위해 IgG2 아이소형을 선택하였다. 유전자 합성을 CHO 세포에 대해 최적화된 코돈 사용빈도를 이용하여 Genscript USA Inc., Piscataway, NJ에 의해 수행하였다. "컨쥬게이션되지 않은" 항-CD20 항체 항-CD20 항체 중쇄(H) 및 경쇄(L)의 아미노산 서열이 하기에 제시된다. 가변 도메인 내의 리툭산 CDR이 굵은 글씨체로 제시된다.

[0559] 리툭산 CDR을 갖는 경쇄 및 중쇄의 항-CD20 항체 아미노산 서열

[0560] **경쇄: V_L** (SEQ ID NO.:105)

```
         10          20          30          40          50          60
MDIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCRASSSV SYIHWYQQKP GKAPKLLIYA TSNLASGVPS

         70          80          90         100
RFSGSRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ WTSNPPTFGQ GTKVEIKR
```

[0561]

[0562] **C_L (λ)** (SEQ ID NO.:106)

```
         10          20          30          40          50          60
GQPKANPTVT LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWKADGSPVK AGVETTKPSK

         70          80          90         100
QSNNKYAASS YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS
```

[0563]

[0564] **중쇄: V_H** (SEQ ID NO.:107)

```
         10          20          30          40          50          60
MEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGYTF TSYNMHWVRQ APGKGLEWVA AIYPGNGDTS

         70          80          90         100         110         120
YNQKFKGRFT ISADTSKNTA YLQMNSLRAE DTAVYYCSRS TYYGGDWYFD VWGQGTLVTV
```

[0565] SS

[0566] **IGg2 C_H1 및 힌지** (SEQ ID NO.:108)

```
         10          20          30          40          50          60
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS

         70          80          90         100         110
GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVER KCCVECPPCP
```

[0567]

[0568] **IGg2 C_H2 및 C_H3** (SEQ ID NO.:109)

```
         10          20          30          40          50          60
APPVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP

         70          80          90         100         110         120
REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC KVSNKGLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL

        130         140         150         160         170         180
PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPMLDSD GSFFLYSKLT

        190         200         210
VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK
```

[0569]

[0570] 포유동물 시스템(CHO 세포)에서의 전체 IgG2 항체-Phor18(KFAKFAKKFAKFAK KFAK(SEQ ID NO.:4)) 컨쥬게이트의 재조합 발현. 중쇄 및 경쇄 전사물을 pSECTag2 포유동물 발현 플라스미드(Invitrogen cat# V900-20, lot 842626)로의 방향적 클로닝을 위한 Asc1 및 EcoR1 제한 부위를 갖는 PCR 프라이머를 이용하여 Genscript DNA 전사물 외부에서 합성하였다. pSecTag2 플라스미드를 선택하였는데, 이는 이것이 포유동물 CMV 프로모터 및 항체의 분비를 위한 Igk 신호 서열을 갖기 때문이다. 신호 서열에 비한 발현 플라스미드 내의 다중 클로닝 부위의 위치 때문에, 발현된 ADC 단백질 내의 신호 펩티드의 분해는 플라스미드 설계로 인해 각각의 펩티드의 N-말단에 다음과 같은 6개의 아미노산을 남긴다: DAAQPA(SEQ ID NO.:152).

[0571] Phor18(이탤릭체)을 갖는 ADC의 전체 경쇄 및 전체 중쇄에 대해 Genscript ADC 전사물 DNA 서열이 하기에 제시된다:

[0572] CHO 세포 내의 CD20 표적화 항체-Phor18 컨쥬게이트의 발현을 위한 유전자의 서열

[0573] 전체 ADC **경쇄** 표적 서열은 다음과 같다: (SEQ ID NO.:110)

[0574] ATG***AAGTTCGCAAAGTTCGCCAAAAAGTTCGCAAAGTTCGCAAAAAAGTTCGCCAAAG GGTCA***GATATTCAGATGACTCAGAGCCCCAGCTCCCTGTCCGCATCTGTGGGCGACCG AGTCACTATCACCTGCCGAGCCTCTAGTTCAGTGAGCTACATTCACTGGTATCAGCAGAA GCCTGGGAAAGCCCCAAAGCTGCTCATCTACGCCACAAGCAACCTGGCTTCCGGTGTG CCTTCTAGGTTCAGTGGGTCAAGAAGCGGTACAGACTTTACACTGACTATTAGCTCCCTC CAGCCAGAGGATTTCGCCACTTACTATTGCCAGCAGTGGACTTCCAATCCCCCTACCTTT GGCCAGGGAACAAAAGTGGAAATCAAGGGGCAGCCCAAAGCTAACCCTACCGTCACAC TGTTCCCACCCTCTAGTGAGGAACTCCAGGCAAATAAGGCCACTCTGGTGTGTCTCATTT CCGACTTTTACCCCGGAGCTGTGACCGTCGCTTGGAAGGCAGATGGCTCTCCAGTGAAA GCAGGAGTCGAGACCACAAAACCCAGTAAGCAGTCAAACAATAAGTACGCCGCTTCAAG CTATCTGAGTCTCACCCCTGAACAGTGGAAAAGCCATAGGTCCTATTCTTGCCAGGTCAC TCACGAAGGTAGCACTGTGGAAAAGACTGTCGCACCAACCGAATGTAGC***GGCTCCAAG GCTTTCAAGAAGGCCTTCAAGGCCTTCAAGAAAGCATTCAAGGCCTTTAAA***TGATAA

[0575] 전체 ADC **중쇄** 표적 서열은 다음과 같다: (SEQ ID NO.:111)

[0576] ATG***AAGTTCGCCAAATTTGCTAAGAAATTCGCAAAGTTTGCCAAGAAATTCGCTAAAG GCTCC***GAAGTGCAGCTCGTCGAAAGCGGGGGGGGACTCGTGCAGCCAGGGGGAAGCC TCAGACTCTCATGCGCCGCCTCAGGTTATACTTTCACAAGCTACAACATGCACTGGGTCA GACAGGCACCTGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTGGCCGCTATCTACCCAGGCAACGGAG ACACATCTTATAATCAGAAGTTCAAAGGCCGGTTTACTATTAGCGCAGATACATCCAAGA ACACTGCCTACCTGCAGATGAATAGCCTCCGGGCTGAAGACACTGCAGTGTACTATTGC AGTCGCTCAACCTACTATGGCGGAGACTGGTATTTCGATGTGTGGGGGCAGGGTACTCT GGTCACCGTGAGCTCCGCCTCTACCAAGGGGCCCAGTGTGTTTCCACTGGCTCCCTGC AGCCGGTCCACCTCTGAGAGTACAGCAGCCCTGGGTTGTCTCGTGAAAGATTACTTCCC TGAACCAGTCACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACCAGCGGAGTCCACACATTTC CTGCAGTGCTCCAGTCTAGTGGGCTGTACTCCCTCTCAAGCGTGGTCACAGTCCCATCC TCTAATTTCGGTACTCAGACCTATACATGCAACGTGGACCATAAGCCCTCCAATACTAAG GTCGATAAAACCGTGGAGCGCAAATGCTGTGTGGAATGCCCACCTTGTCCAGCACCACC AGTCGCTGGGCCTAGCGTGTTCCTGTTTCCTCCAAAGCCAAAAGACACTCTCATGATCTC TCGAACTCCCGAGGTCACCTGTGTGGTCGTGGACGTCAGTCACGAGGATCCTGAAGTC CAGTTTAACTGGTACGTGGATGGAGTCGAAGTGCATAATGCAAAGACCAAACCAAGGGA GGAACAGTTCAACTCAACCTTTAGAGTCGTGAGCGTGCTGACAGTCGTGCATCAGGACT GGCTCAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGTCTAATAAGGGTCTGCCCGCTCCTATC GAGAAAACAATTAGCAAGACTAAAGGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACACTGCC CCCTAGCAGGGAGGAAATGACAAAGAACCAGGTCTCCCTGACTTGTCTCGTGAAAGGCT TCTATCCCAGTGACATTGCCGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCTGAGAACAATTAC AAGACCACACCACCCATGCTGGACAGTGATGGCTCATTCTTTCTGTATTCCAAGCTCACC GTGGATAAATCTAGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTTTCATGTAGCGTGATGCACGAGGC TCTCCATAACCATTACACCCAGAAGTCCCTGTCACTCTCCCCCGGCAAA***GGCTCCAAGG CTTTCAAGAAGGCCTTCAAGGCCTTCAAGAAAGCATTCAAGGCCTTTAAA***TGATAA

[0577] 경쇄 및 중쇄를 서브클로닝하기 위해 사용된 PCR 프라이머가 하기에 제시된다.

[0578] ADC PCR 프라이머:

[0579] 정방향 프라이머는 5' 말단에 ASCI 제한 부위(GGCGCGCC)를 갖는다.

[0580] 역방향 프라이머는 5' 말단에 EcoR1 제한 부위(GAATTC)를 갖는다.

[0581] 경쇄 프라이머 (SEQ ID NOs.:112-115)

[0582] **480L for:** GGGGGCGCGCC **GATATTCAGATGACTCAGAGCC** (Tm=55.6)
485Lfor: GGGGGCGCGCC **AAGTTCGCAAAGTTCGCCAA** (Tm=63)
480Lrev: GGG GAATTC **TTATCAGCTACATTCGGTTGGT**(Tm=58.65)
487Lrev: GGG GAATTC **TTATCATTTAAAGGCCTTGAATGCT** (Tm = 61.37) Mar18

[0583] 중쇄 프라이머 (SEQ ID NOs.:116-118)

[0584] 480Hfor: GGG GGCGCGCC **GAAGTGCAGCTCGTCGAAAG (Tm=61)**
485Hfor: GGG GGCGCGCC **AAGTTCGCCAAATTTGCTAAGA(Tm=60.25)**
480Hrev: GGG GAATTC **TTATCATTTGCCGGGGGA (Tm= 62)**

[0585] 2개의 Phor18 분자(Phor18-V_L IgG2, Phor18-V_H IgG2), 4개의 Phor18 분자(Phor18-V_L-Phor18V_H-IgG2), 6개의 Phor18 분자(Phor18-V_L-C_L-Phor18-Phor18-V_H-IgG2) 및 8개의 Phor18 분자 Phor18-V_L-C_L-Phor18-V_H-Phor18-C_H3-Phor18-IgG2 및 Phor18-V_L-C_L-Phor18-V_H-Phor18-C_H3-IgG2)를 갖는 Phor18-IgG2 컨쥬게이트 및 네이키드 IgG2 항체 각각에 대한 아미노산 서열이 하기에 제시된다.

[0586] *네이키드 항체, 용해-펩티드 Phor18-항체 중쇄 및 경쇄 컨쥬게이트의 아미노산 서열*

[0587] **IgG2 (480) (네이키드)** (SEQ ID NO.:119)

[0588] 경쇄

```
        10         20         30         40         50         60
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASSSVS YIHWYQQKPG KAPKLLIYAT SNLASGVPSR

        70         80         90        100        110        120
FSGSRSGTDF TLTISSLQPE DFATYYCQQW TSNPPTFGQG TKVEIKGQPK ANPTVTLFPP

       130        140        150        160        170        180
SSEELQANKA TLVCLISDFY PGAVTVAWKA DGSPVKAGVE TTKPSKQSNN KYAASSYLSL

       190        200        210
TPEQWKSHRS YSCQVTHEGS TVEKTVAPTE CS
```

[0589]

[0590] 중쇄 (SEQ ID NO.:120)

```
        10         20         30         40         50         60
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT SYNMHWVRQA PGKGLEWVAA IYPGNGDTSY

        70         80         90        100        110        120
NQKFKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRST YYGGDWYFDV WGQGTLVTVS

       130        140        150        160        170        180
SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS

       190        200        210        220        230        240
SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP SNTKVDKTVE RKCCVECPPC PAPPVAGPSV

       250        260        270        280        290        300
FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF

       310        320        330        340        350        360
RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK

       370        380        390        400        410        420
NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG

       430        440
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK
```

[0591]

[0592] **Phor18-V_L IgG2 (481) (2 Phor18, N-말단)** (SEQ ID NO.:121)

[0593] 경쇄

```
        10         20         30         40         50         60
MKFAKFAKKF AKFAKKFAKG SDIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCRASSSV SYIHWYQQKP

        70         80         90        100        110        120
GKAPKLLIYA TSNLASGVPS RFSGSRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ WTSNPPTFGQ

       130        140        150        160        170        180
GTKVEIKGQP KANPTVTLFP PSSEELQANK ATLVCLISDF YPGAVTVAWK ADGSPVKAGV

       190        200        210        220        230
ETTKPSKQSN NKYAASSYLS LTPEQWKSHR SYSCQVTHEG STVEKTVAPT ECS
```

[0594]

[0595] 중쇄 (SEQ ID NO.:122)

```
        10          20          30          40          50          60
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT SYNMHWVRQA PGKGLEWVAA IYPGNGDTSY

        70          80          90         100         110         120
NQKFKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRST YYGGDWYFDV WGQGTLVTVS

       130         140         150         160         170         180
SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS

       190         200         210         220         230         240
SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP SNTKVDKTVE RKCCVECPPC PAPPVAGPSV

       250         260         270         280         290         300
FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF

       310         320         330         340         350         360
RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK

       370         380         390         400         410         420
NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG

       430         440
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK
```

[0596]

[0597] **Phor18-V_H IgG2 (483) (2 Phor18, N-말단)** (SEQ ID NO.:123)

[0598] 경쇄

```
        10          20          30          40          50          60
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASSSVS YIHWYQQKPG KAPKLLIYAT SNLASGVPSR

        70          80          90         100         110         120
FSGSRSGTDF TLTISSLQPE DFATYYCQQW TSNPPTFGQG TKVEIKGQPK ANPTVTLFPP

       130         140         150         160         170         180
SSEELQANKA TLVCLISDFY PGAVTVAWKA DGSPVKAGVE TTKPSKQSNN KYAASSYLSL

       190         200         210
TPEQWKSHRS YSCQVTHEGS TVEKTVAPTE CS
```

[0599]

[0600] 중쇄 (SEQ ID NO.:124)

```
        10          20          30          40          50          60
MKFAKFAKKF AKFAKKFAKG SEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGYTF TSYNMHWVRQ

        70          80          90         100         110         120
APGKGLEWVA AIYPGNGDTS YNQKFKGRFT ISADTSKNTA YLQMNSLRAE DTAVYYCSRS

       130         140         150         160         170         180
TYYGGDWYFD VWGQGTLVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT

       190         200         210         220         230         240
VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSNFGT QTYTCNVDHK PSNTKVDKTV

       250         260         270         280         290         300
ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV

       310         320         330         340         350         360
DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISKT

       370         380         390         400         410         420
KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPMLD

       430         440         450         460
SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
```

[0601]

[0602] **Phor18-V_L-Phor18V_H-IgG2 (485) (4 Phor18, 2 N-말단)** (SEQ ID NO.:125)

[0603] 경쇄

```
        10          20          30          40          50          60
MKFAKFAKKF AKFAKKFAKG SDIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCRASSSV SYIHWYQQKP

        70          80          90         100         110         120
GKAPKLLIYA TSNLASGVPS RFSGSRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ WTSNPPTFGQ

       130         140         150         160         170         180
GTKVEIKGQP KANPTVTLFP PSSEELQANK ATLVCLISDF YPGAVTVAWK ADGSPVKAGV

       190         200         210         220         230
ETTKPSKQSN NKYAASSYLS LTPEQWKSHR SYSCQVTHEG STVEKTVAPT ECS
```

[0604]

[0605] 중쇄 (SEQ ID NO.:126)

```
        10          20          30          40          50          60
MKFAKFAKKF AKFAKKFAKG SEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGYTF TSYNMHWVRQ

        70          80          90         100         110         120
APGKGLEWVA AIYPGNGDTS YNQKFKGRFT ISADTSKNTA YLQMNSLRAE DTAVYYCSRS

       130         140         150         160         170         180
TYYGGDWYFD VWGQGTLVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT

       190         200         210         220         230         240
VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSNFGT QTYTCNVDHK PSNTKVDKTV

       250         260         270         280         290         300
ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV

       310         320         330         340         350         360
DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISKT

       370         380         390         400         410         420
KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPMLD

       430         440         450         460
SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
```

[0606]

[0607] **Phor18-V_L-C_L-Phor18-Phor18-V_H-IgG2 (487) (6 Phor18, 2 N 및 1 C-말단)** (SEQ ID NO.:127)

[0608] 경쇄

```
        10          20          30          40          50          60
MKFAKFAKKF AKFAKKFAKG SDIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCRASSSV SYIHWYQQKP

        70          80          90         100         110         120
GKAPKLLIYA TSNLASGVPS RFSGSRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ WTSNPPTFGQ

       130         140         150         160         170         180
GTKVEIKGQP KANPTVTLFP PSSEELQANK ATLVCLISDF YPGAVTVAWK ADGSPVKAGV

       190         200         210         220         230         240
ETTKPSKQSN NKYAASSYLS LTPEQWKSHR SYSCQVTHEG STVEKTVAPT ECSGSKAFKK

       250
AFKAFKKAFK AFK
```

[0609]

[0610] 중쇄 (SEQ ID NO.:128)

```
        10          20          30          40          50          60
MKFAKFAKKF AKFAKKFAKG SEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGYTF TSYNMHWVRQ

        70          80          90         100         110         120
APGKGLEWVA AIYPGNGDTS YNQKFKGRFT ISADTSKNTA YLQMNSLRAE DTAVYYCSRS

       130         140         150         160         170         180
TYYGGDWYFD VWGQGTLVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT

       190         200         210         220         230         240
VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSNFGT QTYTCNVDHK PSNTKVDKTV

       250         260         270         280         290         300
ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV

       310         320         330         340         350         360
DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISKT

       370         380         390         400         410         420
KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPMLD

       430         440         450         460
SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
```

[0611]

[0612] **Phor18-V_L-C_L-Phor18-V_H-Phor18-C_H3-Phor18-IgG2 (489) (8 Phor18, 2 N 및 2 C-말단)** (SEQ ID NO.:129)

[0613] 경쇄

```
        10          20          30          40          50          60
MKFAKFAKKF AKFAKKFAKG SDIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCRASSSV SYIHWYQQKP

        70          80          90         100         110         120
GKAPKLLIYA TSNLASGVPS RFSGSRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ WTSNPPTFGQ

       130         140         150         160         170         180
GTKVEIKGQP KANPTVTLFP PSSEELQANK ATLVCLISDF YPGAVTVAWK ADGSPVKAGV

       190         200         210         220         230         240
ETTKPSKQSN NKYAASSYLS LTPEQWKSHR SYSCQVTHEG STVEKTVAPT ECSGSKAFKK

       250
AFKAFKKAFK AFK
```

[0614]

[0615] 중쇄 (SEQ ID NO.:130)

```
        10          20          30          40          50          60
MKFAKFAKKF AKFAKKFAKG SEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGYTF TSYNMHWVRQ

        70          80          90         100         110         120
APGKGLEWVA AIYPGNGDTS YNQKFKGRFT ISADTSKNTA YLQMNSLRAE DTAVYYCSRS

       130         140         150         160         170         180
TYYGGDWYFD VWGQGTLVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT

       190         200         210         220         230         240
VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSNFGT QTYTCNVDHK PSNTKVDKTV

       250         260         270         280         290         300
ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV

       310         320         330         340         350         360
DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISKT

       370         380         390         400         410         420
KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPMLD

       430         440         450         460         470         480
SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGKGS KAFKKAFKAF
```

[0616] KKAFKAFK

[0617] Invitrogen 자유-방식 현탁액 성장된 CHO 세포(Free-style MAX CHO expression system cat# K9000-20)를 Invitrogen 프로토콜을 이용하여 트랜스펙션시켰다. 간단히, FS CHO 세포를 해동 후 6 내지 7일 동안 신속한 성장기로 확장시키고, 24시간 마다 배가시켰다. 트랜스펙션일에, 응집물을 제거하고, 세포를 펠렛화시키고, P/S-비함유 배지에 $5x10^5$/ml로 재현탁시켰다. 트랜스펙션일에, 필요시 세포의 30ml의 배양물을 $9x10^5$/ml로 조정하였고, 생활력은 99%에 가까워야 한다.

[0618] 30ml의 세포의 각각의 125ml 스피너 플라스크(VWR, cat# PBV125)를 35㎕의 FSMax 트랜스펙션 시약(Invitrogen, cat# 16447-100)과 혼합된 35㎍의 전체 플라스미드 DNA로 트랜스펙션시켰다. DNA는 1mg/ml 또는 그보다 높은 농도여야 한다. DNA 혼합물을 천천히 첨가하면서 세포를 신속히 소용돌이치도록 하였다. 시험된 H:L 사슬의 비는 3:2, 1:1, 및 2:3이었다.

[0619] 단백질을 트랜스펙션 3일 및 6일 후에 수거하였다. 약 0.25ml의 단백질 A 수지(Genscript L00210, 수용량 수지 ml 당 >20mg IgG)를 제공된 Genscript 프로토콜을 이용하여 FS CHO 배지로부터 분비된 ADC를 분리시키기 위해 이용하였다. 발현된 항-CD20 IgG2 항체(CD20 수용체에 대한 인간화된 가변 경쇄 및 중쇄 도메인 영역) 및 2:1, 4:1 및 6:1의 Phor18:AB의 화학량적 비율을 갖는 다양한 항체-Phor18 컨쥬게이트를 SDS PAGE, 및 웨스턴 블롯 분석을 이용하여 특성규명하였다(표 14).

[0620] **표 14:** CD20을 표적으로 하는 ADC에 대한 ADC 설명

[0621]

ADC 의 명칭	ID	Phor18 위치	Phor18 의 수/항체
IgG2	480	없음 ('네이키드')	0
Phor18-V_L-IgG2	481	N-말단 경쇄 (V_L)	2
Phor18-V_H-IgG2	483	N-말단 중쇄 (V_H)	2
Phor18-V_L-Phor18-V_H-IgG2	485	N-말단 중쇄 및 경쇄 (V_H,V_L)	4
Phor18-V_L-Phor18-V_H-C_L-Phor18-IgG2	487	N-말단 및 C-말단 경쇄 (V_L,V_H, C_L)	6
Phor18-V_L-C_L-Phor18-V_H-Phor18-C_H3-Phor18-IgG2	489	N-말단 및 C-말단 경쇄 (V_L,C_L, V_H, C_H3)	8

[0622] ADC를 항-Phor18로 탐지되는 웨스턴 블롯 상에서 탐지하였다. 모든 ADC는 중쇄 및 경쇄에 단일한 Phor18을 갖는다. 중쇄(H) 또는 경쇄(L) C-말단 또는 N-말단-Phor18 컨쥬게이션을 갖는 재조합적으로 생성된 항체(전체 IgG2 항체)의 수율, 순도 및 세포독성을 분석하였다. 전체 항체 분자에 컨쥬게이션된 2, 4 및 6개 분자의 용해 도메인(Phor18)을 발현시켰다.

[0623] 재조합적으로 생성된 항체 및 항체-Phor18 컨쥬게이트의 농도를 분광광도 측정(OD_{280})을 이용하여 결정하였고, 이는 다음과 같다: IgG2(Mw 150,000; 1.096 mg/ml), Phor18-V_L-IgG2(Mw 154,340 g/mol, 0.561 mg/ml), Phor18-V_H-IgG2(Mw 154,340 g/mol, 0.1 mg/ml) 및 Phor18-V_L-Phor18V_H-IgG2(Mw 158,400 g/mol, 0.561 mg/ml) 및 Phor18-V_L-Phor18V_H-C_L-Phor18-IgG2(Mw 162,600, 0.07 mg/ml).

[0624] *실시예 22*

[0625] 본 실시예는 재조합적으로 생성된 IgG2-Phor18 컨쥬게이트의 시험관내 활성을 기재한다.

[0626] 포유동물 발현 시스템에서 재조합적으로 생성된 CD20을 표적으로 하는 IgG2-Phor18 컨쥬게이트의 세포독성을 CD20 양성 세포(Daudi, 버킷 림프종)에서 "네이키드" 항체(IgG2)와 비교하였다. CD20 음성 백혈병 세포(U937)를 대조군으로 제공하였다. CHO 세포 발현된 ADC는 온전한 항체였고, V_L 사슬의 N-말단, V_H 사슬의 N-말단, V_H 및 V_L 사슬의 N-말단 및 V_L, V_H의 N-말단 및 C_L 사슬의 C-말단에서 2, 4 및 6개의 Phor18 분자에 컨쥬게이션되었다. 서열 설명이 표 14에 요약되어 있다.

[0627] 인간 비-호지킨 림프종 세포 Daudi(CD20 양성, 계대 번호 p6) 및 인간 백혈병 세포주 U937(CD20 음성, p 10)을 세포 해리 완충액을 이용하여 열 비활성화 완전 배지 내에 불투명한 플레이트에 웰 당 2,000개 세포의 밀도로 시딩하였다. 24시간 후, 세포에 새로운 배지(75 ㎕)를 공급하고, 25㎕의 각각의 ADC의 4x 연속 희석액과 함께 인큐베이션하고, 세포 배양 배지에서 제조된 네이키드 항체를 IgG2, Phor18-V_L-IgG2, Phor18-V_H-IgG2 및 Phor18-V_L-Phor18V_H-IgG2에 대해 0.001-200 nM, 및 Phor18-V_L-Phor18V_H-CL-Phor18-IgG2에 대해 0.001-100 nM의 농도로 첨가하였다.

[0628] 4시간 동안 인큐베이션된 세포를 발광측정 검정 키트(Promega, Madison, WI, Cytotox Glo G9292 lot # 317872)를 이용하여 막 온전성에 대해 검정하였다. 세포 생활력을 발광 검정 키트(Promega, Madison, WI, Cell Titer Glo, G 7572, lot 336262)를 이용하여 24 및 48시간 후에 결정하였다.

[0629] 100% 세포 생활력(배양 배지) 및 100% 세포 사멸(0.1% Triton X 100)에 대한 대조군을 동일 조건하에서 인큐베이션하였다.

[0630] Windows용 Graph Pad Prizm version 5.00, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com(Graph Pad Prizm, Inc)을 이용하여 데이터를 처리하고 분석하여, IC_{50} 값을 수득하였다. 유의성에 대한 통계 분석을 양측 스튜던츠 T-검정에 의해 결정하였다. 각각의 검정을 각각 2-3웰의 이중 플레이트를 이용하여 수행하여, 시점 당 4-6 데이터 포인트의 N을 수득하였다.

[0631] **표 15**: CD20을 표적으로 하는 항-CD20 IgG2, Phor18-V_L-IgG2, Phor18-V_H-IgG2, Phor18-V_L-Phor18V_H-IgG2 및 Phor18-V_L-Phor18V_H-C_L-Phor18-IgG2의 시험관내 독성. Daudi 세포(NHL)는 CD20에 대해 양성이었고, U937 세포(백혈병)는 CD20에 대해 음성이다.

	IgG2	Phor18-V_L-IgG2 IC_{50} [nM]	Phor18-V_H-IgG2 IC_{50} [nM]	Phor18-V_L-Phor18V_H-IgG2 IC_{50} [nM]	Phor18-V_L—Phor18V_H-C_L-Phor18-IgG2 IC_{50} [nM]
	네이키드	V_L N-말단	V_H N-말단	V_L 및 V_H N-말단	V_L 및 V_H N-말단, C_L C-말단
	0	2 Phor18	2 Phor18	4 Phor18	6 Phor18
Daudi	**IC_{50} [nM]**	**IC_{50} [nM]**	**IC_{50} [nM]**	**IC_{50} [nM]**	**IC_{50} [nM]**
4h (막 온전성)	독성이 아님	ND	1108±198	109.6±20.1	71.6±29
24 h	독성이 아님	824±63	75.24±37.5	40.1±15.1	18.8±5.9
48 h	독성이 아님	>436	4.8±2	20.4±8.2	1.9±0.2
U937	**IC_{50} [nM]**	**IC_{50} [nM]**	**IC_{50} [nM]**	**IC_{50} [nM]**	**IC_{50} [nM]**
4h (막 온전성)	독성이 아님	독성이 아님	독성이 아님	독성이 아님	독성이 아님
24 h	독성이 아님	독성이 아님	독성이 아님	독성이 아님	독성이 아님
48 h	독성이 아님	>1000	독성이 아님	249.6±29	258±41

[0632]

[0633] ND=결정되지 않음

[0634] 막 온전성의 파괴를 Phor18-V_H-IgG2(2 Phor18)에 대해 1,108±198, Phor18-V_L-Phor18V_H-IgG2(4 Phor18)에 대해 109.6±20.1 및 Phor18-V_L-Phor18V_H-C_L-Phor18-IgG2(6 Phor18)에 대해 71.6±29의 나노몰 농도에서 4시간 후에 측정하였다. 네이키드 항체는 CD20 양성 Daudi 세포에 대해 24 또는 48시간 후에 독성이 아니었다.

[0635] IC_{50} 값[nM]으로 표현된 24시간 후의 표적 세포의 사멸은 824±63, 75.24±37.5, (2 Phor18), 40.1±15.1 (4 Phor18) 및 18.8±5.9 (6 Phor18) nM이었다. 최대 효과는 48시간 후에 측정되었다(각각 IC50 [nM] >436 (Phor18-V_L-IgG2), 4.8±2 Phor18-V_H-IgG2 (2 클립(Clips)) 및 20.4±8.2 nM Phor18-V_L-Phor18V_H--IgG2 (4 클립), 및 1.9±0.2 nM Phor18-V_L-Phor18V_H-C_L-Phor18-IgG2 (6 Phor18)). CD20 음성 세포주(U937)는 4 및 24시간 후에 네이키드 항체 또는 2, 4, 및 6개의 Phor18 컨쥬게이션된 ADC에 의해 사멸되지 않았다. 48시간 후의 독성 수준은 249 및 258 nM의 IC_{50} 값과 유사하였다. 이들 데이터는 Phor18의 위치가 Phor18-V_H-IgG2에 대한 증가된 효능을 갖는 CD20 ADC의 효능을 결정하는 것을 입증한다. 항체 당 Phor18 분자의 증가는 효능을 증가시켰다.

[0636] 2, 4 및 6의 Phor18:항체 화학량론을 갖는 전체 항체 Phor18 컨쥬게이트를 CHO 세포에서 재조합적으로 발현시켰다. 이들 항체 약물 컨쥬게이트는 중쇄 및 경쇄에서 Phor18 분자가 확인되었다. 이들은 4시간 후에 막 분해의 활성과 함께 시험관 내에서 CD20 양성 세포에서 활성이었다. 48시간 후, 6 및 4개의 Phor18을 갖는 ADC에서 가장 높은 한 자릿수의 나노몰 활성이 측정되었다.

[0637] 비-내재화 CD20 항체 컨쥬게이트는 4시간 이내에 표적 세포(Daudi)의 막 온전성을 파괴하였다. 세포 사멸이 낮은 나노몰 범위의 IC_{50} 값으로 24시간 후에 관찰되었다. CD20 음성 세포(U937)는 사멸되지 않았다. 4 및 6개의 클립을 갖는 전체 IgG2 ADC는 2개의 Phor18 컨쥬게이트에 비해 표적 양성 세포에 대한 증가된 효능을 가졌다. N-말단에서의 Phor18의 위치는 더 높은 효능을 갖는 ADC를 발생시켰다. 항체 당 Phor18 수의 증가는 증가된 효능을 나타내었다.

[0638] N-말단 도메인에 컨쥬게이션된 항체에서의 Phor18의 더 높은 수(6 대 4 대 2)는 네이키드 항체에 비해 더욱 효능이 있다.

[0639] *실시예 23*

[0640] 본 실시예는 본 발명의 항체 및 폴리펩티드 컨쥬게이트 및 네이키드 항체 및 이들의 Phor18 컨쥬게이트가 생성될 수 있는 대표적 표적 단백질에 대한 표적 서열 정보를 포함한다.

[0641] **ERBB2** (HER2/NEU) 아이소형(Isoform) 1 [UniParc]: (SEQ ID NO.:131)

[0642]

```
   10         20         30         40         50         60
MELAALCRWG LLLALLPPGA ASTQVCTGTD MKLRLPASPE THLDMLRHLY QGCQVVQGNL
```

[0643]

```
        70         80         90        100        110        120
ELTYLPTNAS LSFLQDIQEV QGYVLIAHNQ VRQVPLQRLR IVRGTQLFED NYALAVLDNG

       130        140        150        160        170        180
DPLNNTTPVT GASPGGLREL QLRSLTEILK GGVLIQRNPQ LCYQDTILWK DIFHKNNQLA

       190        200        210        220        230        240
LTLIDTNRSR ACHPCSPMCK GSRCWGESSE DCQSLTRTVC AGGCARCKGP LPTDCCHEQC

       250        260        270        280        290        300
AAGCTGPKHS DCLACLHFNH SGICELHCPA LVTYNTDTFE SMPNPEGRYT FGASCVTACP

       310        320        330        340        350        360
YNYLSTDVGS CTLVCPLHNQ EVTAEDGTQR CEKCSKPCAR VCYGLGMEHL REVRAVTSAN

       370        380        390        400        410        420
IQEFAGCKKI FGSLAFLPES FDGDPASNTA PLQPEQLQVF ETLEEITGYL YISAWPDSLP

       430        440        450        460        470        480
DLSVFQNLQV IRGRILHNGA YSLTLQGLGI SWLGLRSLRE LGSGLALIHH NTHLCFVHTV

       490        500        510        520        530        540
PWDQLFRNPH QALLHTANRP EDECVGEGLA CHQLCARGHC WGPGPTQCVN CSQFLRGQEC

       550        560        570        580        590        600
VEECRVLQGL PREYVNARHC LPCHPECQPQ NGSVTCFGPE ADQCVACAHY KDPPFCVARC

       610        620        630        640        650        660
PSGVKPDLSY MPIWKFPDEE GACQPCPINC THSCVDLDDK GCPAEQRASP LTSIISAVVG

       670        680        690        700        710        720
ILLVVVLGVV FGILIKRRQQ KIRKYTMRRL LQETELVEPL TPSGAMPNQA QMRILKETEL

       730        740        750        760        770        780
RKVKVLGSGA FGTVYKGIWI PDGENVKIPV AIKVLRENTS PKANKEILDE AYVMAGVGSP

       790        800        810        820        830        840
YVSRLLGICL TSTVQLVTQL MPYGCLLDHV RENRGRLGSQ DLLNWCMQIA KGMSYLEDVR
```

```
       850        860        870        880        890        900
LVHRDLAARN VLVKSPNHVK ITDFGLARLL DIDETEYHAD GGKVPIKWMA LESILRRRFT

       910        920        930        940        950        960
HQSDVWSYGV TVWELMTFGA KPYDGIPARE IPDLLEKGER LPQPPICTID VYMIMVKCWM

       970        980        990       1000       1010       1020
IDSECRPRFR ELVSEFSRMA RDPQRFVVIQ NEDLGPASPL DSTFYRSLLE DDDMGDLVDA

      1030       1040       1050       1060       1070       1080
EEYLVPQQGF FCPDPAPGAG GMVHHRHRSS STRSGGGDLT LGLEPSEEEA PRSPLAPSEG

      1090       1100       1110       1120       1130       1140
AGSDVFDGDL GMGAAKGLQS LPTHDPSPLQ RYSEDPTVPL PSETDGYVAP LTCSPQPEYV

      1150       1160       1170       1180       1190       1200
NQPDVRPQPP SPREGPLPAA RPAGATLERP KTLSPGKNGV VKDVFAFGGA VENPEYLTPQ

      1210       1220       1230       1240       1250
GGAAPQPHPP PAFSPAFDNL YYWDQDPPER GAPPSTFKGT PTAENPEYLG LDVPV
```

[0644]

[0645] CD19: B-림프구 표면 항원 B4, B-세포 공동-수용체의 성분, NCBI 참조 서열: NP_001171569.1:

[0646] 기점 (SEQ ID NO.:132)

```
  1 mppprllffl lfltpmevrp eeplvvkvee gdnavlqclk gtsdgptqql twsresplkp
 61 flklslglpg lgihmrplai wlfifnvsqq mggfylcqpg ppsekawqpg wtvnvegsge
121 lfrwnvsdlg glgcglknrs segpsspsgk lmspklyvwa kdrpeiwege ppclpprdsl
181 nqslsqdltm apgstlwlsc gvppdsvsrg plswthvhpk gpksllslel kddrpardmw
241 vmetglllpr ataqdagkyy chrgnltmsf hleitarpvl whwllrtggw kvsavtlayl
301 ifclcslvgi lhlqralvlr rkrkrmtdpt rrffkvtppp gsgpqnqygn vlsltptsg
361 lgraqrwaag lggtapsygn pssdvqadga lgsrsppgvg peeeegegye epdseedsef
421 yendsnlgqd qlsqdgsgye npedeplgpe dedsfsnaes yenedeeltq pvartmdfls
481 phgsawdpsr eatslagsqs yedmrgilya apqlrsirgq pgpnheedad syenmdnpdg
541 pdpawggggr mgtwstr
```

[0647]

[0648] CD20: B-세포 림프종, 털모양 세포 백혈병, 및 B-세포 만성 림프성 백혈병에서 발현되는, 세포 활성화에 필요한 칼슘의 유입을 가능케 하는 세포막 내의 칼슘 채널을 형성하는 B 세포에서 발견된 타입 III 막횡단 단백질. CD20에 대한 항체로서 상기 질병의 치료를 위해 중요하다: 리툭시맙. NCBI 참조 서열 NP_068769.2, **MS4A1 - P11836:** (SEQ ID NO.:133)

```
  1 mttprnsvng tfpaepmkgp iamqsgpkpl frrmsslvgp tqsffmresk tlgavqimng
 61 lfhialggll mipagiyapi cvtvwyplwg gimyiisgsl laateknsrk clvkgkmimn
121 slslfaaisg milsimdiln ikishflkme slnfirahtp yiniyncepa npseknspst
181 qycysiqslf lgilsvmlif affqelviag ivenewkrtc srpksnivll saeekkeqti
241 eikeevvglt etssqpknee dieiipiqee eeeetetnfp eppqdqessp iendssp
```

[0649]

[0650] CD22: N-말단에 위치된 면역글로불린(Ig) 도메인을 갖는, 시알산에 특이적으로 결합하는 당 결합 막횡단 단백질. 이는 면역글로불린 상과 및 SIGLEC 패밀리의 일원이다. CD22는 B 세포 수용체(BCR) 신호전달에 대한 억제 수용체로 작용한다. NCBI 참조 서열 NP_001172028.1:

[0651] 기점 (SEQ ID NO.:134)

```
  1 mhllgpwlll lvleylafsd sskwvfehpe tlyawegacv wipctyrald gdlesfilfh
 61 npeynkntsk fdgtrlyest kdgkvpseqk rvqflgdknk nctlsihpvh lndsgqlglr
121 mesktekwme rihlnvserp fpphiqlppe iqesqevtlt cllnfscygy piqlqwlleg
181 vpmrqaavts tsltiksvft rselkfspqw shhgkivtcq lqdadgkfls ndtvqlnvkh
241 tpkleikvtp sdaivregds vtmtcevsss npeyttvswl kdgtslkkqn tftlnlrevt
301 kdqsgkyccq vsndvgpgrs eevflqvqyp pkkvttviqn pmpiregdtv tlscnynssn
361 psvtryewkp hgaweepslg vlkiqnvgwd nttiacaacn swcswaspva lnvqyaprdv
421 rvrkikplse ihsgnsvslq cdfssshpke vqffweknqr llgkesqlnf dsispedags
481 yscwvnnsig qtaskawtle vlyaprrlrv smspgdqvme gksatltces danppvshyt
541 wfdwnnqslp yhsqklrlep vkvqhsgayw cqgtnsvgkg rsplstltvy yspetigrrv
601 avglgsclai lilaicglkl qrrwkrtqsq qglqenssgq sffvrnkkvr raplsegphs
661 lgcynpmmed gisyttlrfp emniprtgda essemqrppp dcddtvtysa lhkrqvgdye
721 nvipdfpede gihyseliqf gvgerpqaqe nvdyvilkh
```

[0652]

[0653] CD23: IgE와 복합체화된 항원의 포획 및 가공을 향상시키는, 성숙 B 세포, 단핵구, 활성화된 대식세포, 호산구, 혈소판, 및 수지상 세포에서 발견되는 타입 II 막횡단 단백질. NCBI 참조 서열 NP_001193948.2:

[0654] 기점 (SEQ ID NO.:135)

```
  1 mnppsqeiee lprrrccrrg tqivllglvt aalwaglltl lllwhwdttq slkqleeraa
 61 rnvsqvsknl eshhgdqmaq ksqstqisqe leelraeqqr lksqdlelsw nlnglqadls
121 sfksqelner neasdllerl reevtklrme lqvssgfvcn tcpekwinfq rkcyyfgkgt
181 kqwvharyac ddmegqlvsi hspeeqdflt khashtgswi glrnldlkge fiwvdgshvd
241 ysnwapgept srsqgedcvm mrgsgrwnda fcdrklgawv cdrlatctpp asegsaesmg
301 pdsrpdpdgr lptpsaplhs
```

[0655]

[0656] CD27: TNF-수용체. 휴지 기억 B 세포의 표면에 존재한다. NCBI 참조 서열 NP_001233.1:

[0657] 기점 (SEQ ID NO.:136)

```
  1 marphpwwlc vlgtlvglsa tpapkscper hywaqgklcc qmcepgtflv kdcdqhrkaa
 61 qcdpcipgvs fspdhhtrph cescrhcnsg llvrnctita naecacrngw qcrdkectec
121 dplpnpslta rssqalsphp qpthlpyvse mleartaghm qtladfrqlp artlsthwpp
181 qrslcssdfi rilvifsgmf lvftlagalf lhqrrkyrsn kgespvepae pcryscpree
241 egstipiqed yrkpepacsp
```

[0658]

[0659] CD28: 모든 T-세포 상에 존재하고, CD80 또는 CD86일 수 있는 적절한 리간드인 표지된 B7과 매치되는 경우, 이는 T-세포에 대한 공동자극 효과를 갖는다. 이는 또한 특히 조직 침윤 후에 호산구 과립구에서 발현된다. 이의 라이게이션은 효능 있는 신경독 IL-2 및 IL-13 뿐만 아니라 IFN-γ의 방출을 발생시킨다. Checksum 1D9B6552A5878D0F: (SEQ ID NO.:137)

```
        10         20         30         40         50         60
MLRLLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYDNAVNLSC KYSYNLFSRE FRASLHKGLD

        70         80         90        100        110        120
SAVEVCVVYG NYSQQLQVYS KTGFNCDGKL GNESVTFYLQ NLYVNQTDIY FCKIEVMYPP

       130        140        150        160        170        180
PYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS KPFWVLVVVG GVLACYSLLV TVAFIIFWVR

       190        200        210        220
```

SKRSRLLHSD YMNMTPRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAYRS

[0660]

[0661] CD30: 세포 활성화 및/또는 분화에서 역할을 할 수 있는, 활성화된 T 및 B 세포에 존재하는 타입 I 막횡단 단백질; 호지킨 질병, 일부 T-세포 림프종, 및 역형성 큰세포 림프종에서 발현됨. (SEQ ID NO.:138)

```
        10          20          30          40          50          60
MRVLLAALGL LFLGALRAFP QDRPFEDTCH GNPSHYYDKA VRRCCYRCPM GLFPTQQCPQ

        70          80          90         100         110         120
RPTDCRKQCE PDYYLDEADR CTACVTCSRD DLVEKTPCAW NSSRVCECRP GMFCSTSAVN

       130         140         150         160         170         180
SCARCFFHSV CPAGMIVKFP GTAQKNTVCE PASPGVSPAC ASPENCKEPS SGTIPQAKPT

       190         200         210         220         230         240
PVSPATSSAS TMPVRGGTRL AQEAASKLTR APDSPSSVGR PSSDPGLSPT QPCPEGSGDC

       250         260         270         280         290         300
RKQCEPDYYL DEAGRCTACV SCSRDDLVEK TPCAWNSSRT CECRPGMICA TSATNSCARC

       310         320         330         340         350         360
VPYPICAAET VTKPQDMAEK DTTFEAPPLG TQPDCNPTPE NGEAPASTSP TQSLLVDSQA

       370         380         390         400         410         420
SKTLPIPTSA PVALSSTGKP VLDAGPVLFW VILVLVVVVG SSAFLLCHRR ACRKRIRQKL

       430         440         450         460         470         480
HLCYPVQTSQ PKLELVDSRP RRSSTQLRSG ASVTEPVAEE RGLMSQPLME TCHSVGAAYL

       490         500         510         520         530         540
ESLPLQDASP AGGPSSPRDL PEPRVSTEHT NNKIEKIYIM KADTVIVGTV KAELPEGRGL

       550         560         570         580         590
AGPAEPELEE ELEADHTPHY PEQETEPPLG SCSDVMLSVE EEGKEDPLPT AASGK
```

[0662]

[0663] P28908-2, 종양 괴사 인자 수용체 상과 일원 8, 호모 사피엔스(Homo sapiens)(SEQ ID NO.:139):

```
        10          20          30          40          50          60
MSQPLMETCH SVGAAYLESL PLQDASPAGG PSSPRDLPEP RVSTEHTNNK IEKIYIMKAD

        70          80          90         100         110         120
TVIVGTVKAE LPEGRGLAGP AEPELEEELE ADHTPHYPEQ ETEPPLGSCS DVMLSVEEEG

       130
KEDPLPTAAS GK
```

[0664]

[0665] **CD31**: PECAM-1, 혈소판 및 내피 세포 상의 세포 부착 분자 (SEQ ID NO.:140).

```
        10          20          30          40          50          60
MQPRWAQGAT MWLGVLLTLL LCSSLEGQEN SFTINSVDMK SLPDWTVQNG KNLTLQCFAD

        70          80          90         100         110         120
VSTTSHVKPQ HQMLFYKDDV LFYNISSMKS TESYFIPEVR IYDSGTYKCT VIVNNKEKTT

       130         140         150         160         170         180
AEYQLLVEGV PSPRVTLDKK EAIQGGIVRV NCSVPEEKAP IHFTIEKLEL NEKMVKLKRE

       190         200         210         220         230         240
KNSRDQNFVI LEFPVEEQDR VLSFRCQARI ISGIHMQTSE STKSELVTVT ESFSTPKFHI

       250         260         270         280         290         300
SPTGMIMEGA QLHIKCTIQV THLAQEFPEI IIQKDKAIVA HNRHGNKAVY SVMAMVEHSG

       310         320         330         340         350         360
NYTCKVESSR ISKVSSIVVN ITELFSKPEL ESSFTHLDQG ERLNLSCSIP GAPPANFTIQ

       370         380         390         400         410         420
KEDTIVSQTQ DFTKIASKSD SGTYICTAGI DKVVKKSNTV QIVVCEMLSQ PRISYDAQFE

       430         440         450         460         470         480
VIKGQTIEVR CESISGTLPI SYQLLKTSKV LENSTKNSND PAVFKDNPTE DVEYQCVADN

       490         500         510         520         530         540
CHSHAKMLSE VLRVKVIAPV DEVQISILSS KVVESGEDIV LQCAVNEGSG PITYKFYREK

       550         560         570         580         590         600
EGKPFYQMTS NATQAFWTKQ KASKEQEGEY YCTAFNRANH ASSVPRSKIL TVRVILAPWK

       610         620         630         640         650         660
KGLIAVVIIG VIIALLIIAA KCYFLRKAKA KQMPVEMSRP AVPLLNSNNE KMSDPNMEAN

       670         680         690         700         710         720
SHYGHNDDVR NHAMKPINDN KEPLNSDVQY TEVQVSSAES HKDLGKKDTE TVYSEVRKAV

       730
PDAVESRYSR TEGSLDGT
```

[0666]

[0667] **CD33**: 급성 골수성 백혈병 모세포 및 성숙 단핵구를 포함하는 미성숙 골수성 세포에서 발견되는 공지되지 않은 기능의 마커. P20138: (SEQ ID NO.:141)

```
10         20         30         40         50         60
MPLLLLLPLL WAGALAMDPN FWLQVQESVT VQEGLCVLVP CTFFHPIPYY DKNSPVHGYW

        70         80         90        100        110        120
FREGAIISRD SPVATNKLDQ EVQEETQGRF RLLGDPSRNN CSLSIVDARR RDNGSYFFRM

       130        140        150        160        170        180
ERGSTKYSYK SPQLSVHVTD LTHRPKILIP GTLEPGHSKN LTCSVSWACE QGTPPIFSWL

       190        200        210        220        230        240
SAAPTSLGPR TTHSSVLIIT PRPQDHGTNL TCQVKFAGAG VTTERTIQLN VTYVPQNPTT

       250        260        270        280        290        300
GIFPGDGSGK QETRAGVVHG AIGGAGVTAL LALCLCLIFF IVKTHRRKAA RTAVGRNDTH

       310        320        330        340        350        360
PTTGSASPKH QKKSKLHGPT ETSSCSGAAP TVEMDEELHY ASLNFHGMNP SKDTSTEYSE
```

[0668] VRTQ

[0669] **CD34**: 조혈 전구체(제대혈에서 높은 농도로 발견됨), 모세관 내피, 및 배아 섬유모세포에서 발견되는 줄기 세포 마커, 부착. 아이소형 CD34-F: (SEQ ID NO.:142)

```
        10         20         30         40         50         60
MLVRRGARAG PRMPRGWTAL CLLSLLPSGF MSLDNNGTAT PELPTQGTFS NVSTNVSYQE

        70         80         90        100        110        120
TTTPSTLGST SLHPVSQHGN EATTNITETT VKFTSTSVIT SVYGNTNSSV QSQTSVISTV

       130        140        150        160        170        180
FTTPANVSTP ETTLKPSLSP GNVSDLSTTS TSLATSPTKP YTSSSPILSD IKAEIKCSGI

       190        200        210        220        230        240
REVKLTQGIC LEQNKTSSCA EFKKDRGEGL ARVLCGEEQA DADAGAQVCS LLLAQSEVRP

       250        260        270        280        290        300
QCLLLVLANR TEISSKLQLM KKHQSDLKKL GILDFTEQDV ASHQSYSQKT LIALVTSGAL

       310        320        330        340        350        360
LAVLGITGYF LMNRRSWSPT GERLGEDPYY TENGGGQGYS SGPGTSPEAQ GKASVNRGAQ

       370        380
ENGTGQATSR NGHSARQHVV ADTEL
```

[0670]

[0671] **CD40**: 항원 제시 세포에서 발견되는 공동자극 단백질. CD40은 T 세포 상에서 CD154(CD40L)와 조합되어 B 세포에서의 항체 아이소형 스위칭(switching)을 유도한다. 아이소형 I: (SEQ ID NO.:143)

```
        10         20         30         40         50         60
MVRLPLQCVL WGCLLTAVHP EPPTACREKQ YLINSQCCSL CQPGQKLVSD CTEFTETECL

        70         80         90        100        110        120
PCGESEFLDT WNRETHCHQH KYCDPNLGLR VQQKGTSETD TICTCEEGWH CTSEACESCV

       130        140        150        160        170        180
LHRSCSPGFG VKQIATGVSD TICEPCPVGF FSNVSSAFEK CHPWTSCETK DLVVQQAGTN

       190        200        210        220        230        240
KTDVVCGPQD RLRALVVIPI IFGILFAILL VLVFIKKVAK KPTNKAPHPK QEPQEINFPD

       250        260        270
```

[0672] DLPGSNTAAP VQETLHGCQP VTQEDGKESR ISVQERQ

[0673] **CD52**: P31358m(SEQ ID NO.:144)

```
        10         20         30         40         50         60
MKRFLFLLLT ISLLVMVQIQ TGLSGQNDTS QTSSPSASSN ISGGIFLFFV ANAIIHLFCF
```

[0674] S

[0675] Q9UJ81 (SEQ ID NO.:145)

```
        10
```

[0676] MKRFLFLLLT ISLLVMVQ

[0677] **CD 56**: 신경 세포 부착 분자 1. 짧은 명칭=N-CAM-1, *대안적 명칭(들).* CD_항원=CD56. 아이소형 1: (SEQ ID NO.:146)

```
        10         20         30         40         50         60
MLQTKDLIWT LFFLGTAVSL QVDIVPSQGE ISVGESKFFL CQVAGDAKDK DISWFSPNGE

        70         80         90        100        110        120
KLTPNQQRIS VVWNDDSSST LTIYNANIDD AGIYKCVVTG EDGSESEATV NVKIFQKLMF

       130        140        150        160        170        180
KNAPTPQEFR EGEDAVIVCD VVSSLPPTII WKHKGRDVIL KKDVRFIVLS NNYLQIRGIK

       190        200        210        220        230        240
KTDEGTYRCE GRILARGEIN FKDIQVIVNV PPTIQARQNI VNATANLGQS VTLVCDAEGF

       250        260        270        280        290        300
PEPTMSWTKD GEQIEQEEDD EKYIFSDDSS QLTIKKVDKN DEAEYICIAE NKAGEQDATI

       310        320        330        340        350        360
HLKVFAKPKI TYVENQTAME LEEQVTLTCE ASGDPIPSIT WRTSTRNISS EEKASWTRPE

       370        380        390        400        410        420
KQETLDGHMV VRSHARVSSL TLKSIQYTDA GEYICTASNT IGQDSQSMYL EVQYAPKLQG

       430        440        450        460        470        480
PVAVYTWEGN QVNITCEVFA YPSATISWFR DGQLLPSSNY SNIKIYNTPS ASYLEVTPDS

       490        500        510        520        530        540
ENDFGNYNCT AVNRIGQESL EFILVQADTP SSPSIDQVEP YSSTAQVQFD EPEATGGVPI

       550        560        570        580        590        600
LKYKAEWRAV GEEVWHSKWY DAKEASMEGI VTIVGLKPET TYAVRLAALN GKGLGEISAA

       610        620        630        640        650        660
SEFKTQPVQG EPSAPKLEGQ MGEDGNSIKV NLIKQDDGGS PIRHYLVRYR ALSSEWKPEI

       670        680        690        700        710        720
RLPSGSDHVM LKSLDWNAEY EVYVVAENQQ GKSKAAHFVF RTSAQPTAIP ANGSPTSGLS

       730        740        750        760        770        780
TGAIVGILIV IFVLLLVVVD ITCYFLNKCG LFMCIAVNLC GKAGPGAKGK DMEEGKAAFS

       790        800        810        820        830        840
KDESKEPIVE VRTEEERTPN HDGGKHTEPN ETTPLTEPEK GPVEAKPECQ ETETKPAPAE

       850
```

[0678]

```
VKTVPNDATQ TKENESKA
```

[0679] **CD70**: 종양 괴사 인자 리간드 상과 일원 7. P32970 (CD70_HUMAN): (SEQ ID NO.:147)

```
        10         20         30         40         50         60
MPEEGSGCSV RRRPYGCVLR AALVPLVAGL VICLVVCIQR FAQAQQQLPL ESLGWDVAEL

        70         80         90        100        110        120
QLNHTGPQQD PRLYWQGGPA LGRSFLHGPE LDKGQLRIHR DGIYMVHIQV TLAICSSTTA

       130        140        150        160        170        180
SRHHPTTLAV GICSPASRSI SLLRLSFHQG CTIASQRLTP LARGDTLCTN LTGTLLPSRN

       190
TDETFFGVQW VRP
```

[0680]

[0681] **CD123**: IL3RA. 아이소형 1: (SEQ ID NO.:148)

```
        10         20         30         40         50         60
MVLLWLTLLL IALPCLLQTK EDPNPPITNL RMKAKAQQLT WDLNRNVTDI ECVKDADYSM

        70         80         90        100        110        120
PAVNNSYCQF GAISLCEVTN YTVRVANPPF STWILFPENS GKPWAGAENL TCWIHDVDFL

       130        140        150        160        170        180
SCSWAVGPGA PADVQYDLYL NVANRRQQYE CLHYKTDAQG TRIGCRFDDI SRLSSGSQSS

       190        200        210        220        230        240
HILVRGRSAA FGIPCTDKFV VFSQIEILTP PNMTAKCNKT HSFMHWKMRS HFNRKFRYEL

       250        260        270        280        290        300
QIQKRMQPVI TEQVRDRTSF QLLNPGTYTV QIRARERVYE FLSAWSTPQR FECDQEEGAN

       310        320        330        340        350        360
TRAWRTSLLI ALGTLLALVC VFVICRRYLV MQRLFPRIPH MKDPIGDSFQ NDKLVVWEAG

       370
KAGLEECLVT EVQVVQKT
```

[0682]

[0683] **CD154**: CD40에 대한 리간드. 이는 B 세포 활성화가 가장 공지되어 있으나, APC 상의 MHC 분자에 의한 T 세포 수용체 자극과 관련된 APC의 활성화를 유도하는 것으로 또한 공지된, 많은 역할을 하는 공동자극 분자이다. Q3L8U2: (SEQ ID NO.:149)

```
        10         20         30         40         50         60
MIETYNQTSP RSAATGLPIS MKIFMYLLTV FLITQMIGSA LFAVYLHRRL DKIEDERNLH

        70         80         90        100        110        120
EDFVFMKTIQ RCNTGERSLS LLNCEEIKSQ FEGFVKDIML NKEETKKENS FEMQKVLQWA

       130        140        150        160        170        180
EKGYYTMSNN LVTLENGKQL TVKRQGLYYI YAQVTFCSNR EASSQAPFIA SLCLKSPGRF

       190        200        210        220        230        240
ERILLRAANT HSSAKPCGQQ SIHLGGVFEL QPGASVFVNV TDPSQVSHGT GFTSFGLLKL
```

[0684]

[0685] **CD138**: 신데칸-1(syndecan-1)으로 공지된 형질 세포-표면 당단백질인 신데칸. 신데칸은 콜라겐, 섬유결합소 및 트롬보스폰딘에 대한 알파 수용체로 작용한다. P18827: (SEQ ID NO.:150)

```
        10         20         30         40         50         60
MRRAALWLWL CALALSLQPA LPQIVATNLP PEDQDGSGDD SDNFSGSGAG ALQDITLSQQ

        70         80         90        100        110        120
TPSTWKDTQL LTAIPTSPEP TGLEATAAST STLPAGEGPK EGEAVVLPEV EPGLTAREQE

       130        140        150        160        170        180
ATPRPRETTQ LPTTHLASTT TATTAQEPAT SHPHRDMQPG HHETSTPAGP SQADLHTPHT

       190        200        210        220        230        240
EDGGPSATER AAEDGASSQL PAAEGSGEQD FTFETSGENT AVVAVEPDRR NQSPVDQGAT

       250        260        270        280        290        300
GASQGLLDRK EVLGGVIAGG LVGLIFAVCL VGFMLYRMKK KDEGSYSLEE PKQANGGAYQ

       310
KPTKQEEFYA KPTKQEEFYA
```

[0686]

[0687] **온코페토프로테인 - 5T4 영양막 당단백질.** NCBI 참조 서열 NP_001159864.1:

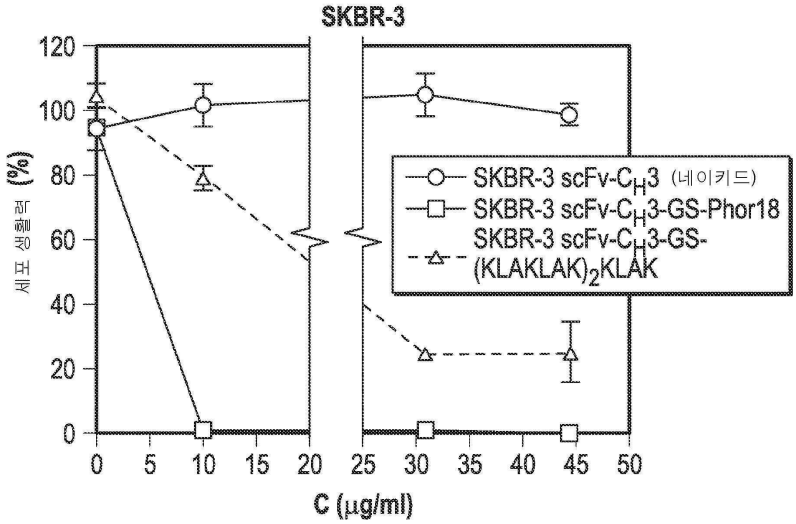
[0688] 기점 (SEQ ID NO.:151)

```
  1 mpggcsrgpa agdgrlrlar lalvllgwvs sssptssass fsssapflas avsaqpplpd
 61 qcpalcecse aartvkcvnr nltevptdlp ayvrnlfltg nqlavlpaga farrpplael
121 aalnlsgsrl devragafeh lpslrqldls hnpladlspf afsgsnasvs apsplvelil
181 nhivppeder qnrsfegmvv aallagralq glrrlelasn hflylprdvl aqlpslrhld
241 lsnnslvslt yvsfrnlthl eslhlednal kvlhngtlae lqglphirvf ldnnpwvcdc
301 hmadmvtwlk etevvqgkdr ltcaypekmr nrvllelnsa dldcdpilpp slqtsyvflg
361 ivlaligaif llvlylnrkg ikkwmhnird acrdhmegyh yryeinadpr ltnlssnsdv
```

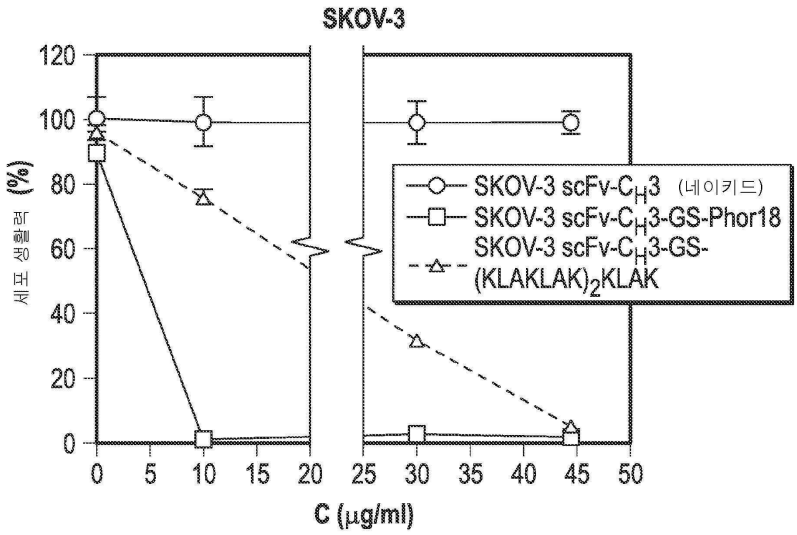
[0689]

도면

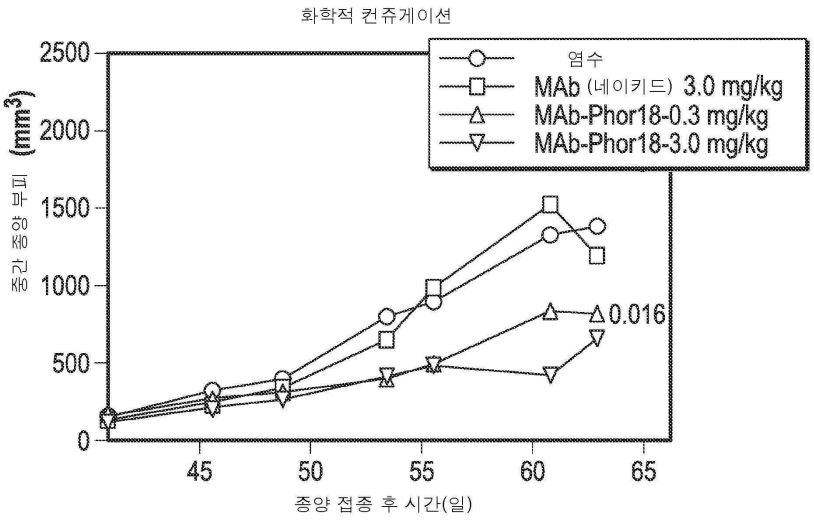
도면1a


SKBR-3
세포 생활력 (%)
C (μg/ml)
SKBR-3 scFv-CH3 (네이키드)
SKBR-3 scFv-CH3-GS-Phor18
SKBR-3 scFv-CH3-GS-(KLAKLAK)2KLAK

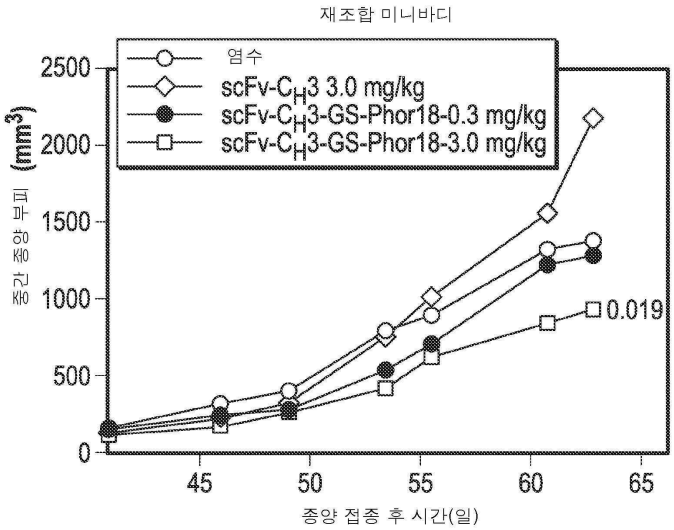
도면1b


SKOV-3
세포 생활력 (%)
C (μg/ml)
SKOV-3 scFv-CH3 (네이키드)
SKOV-3 scFv-CH3-GS-Phor18
SKOV-3 scFv-CH3-GS-(KLAKLAK)2KLAK

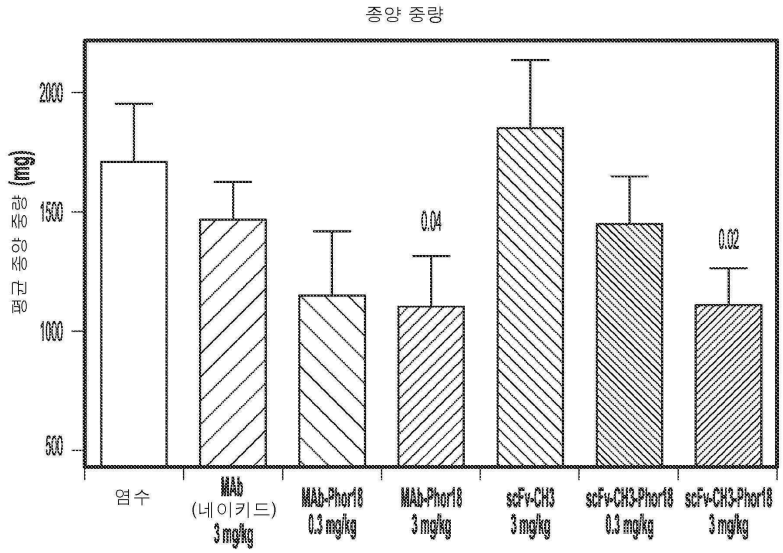
도면2a


화학적 컨쥬게이션
염수
MAb (네이키드) 3.0 mg/kg
MAb-Phor18-0.3 mg/kg
MAb-Phor18-3.0 mg/kg
0.016
중간 종양 부피 (mm3)
종양 접종 후 시간(일)

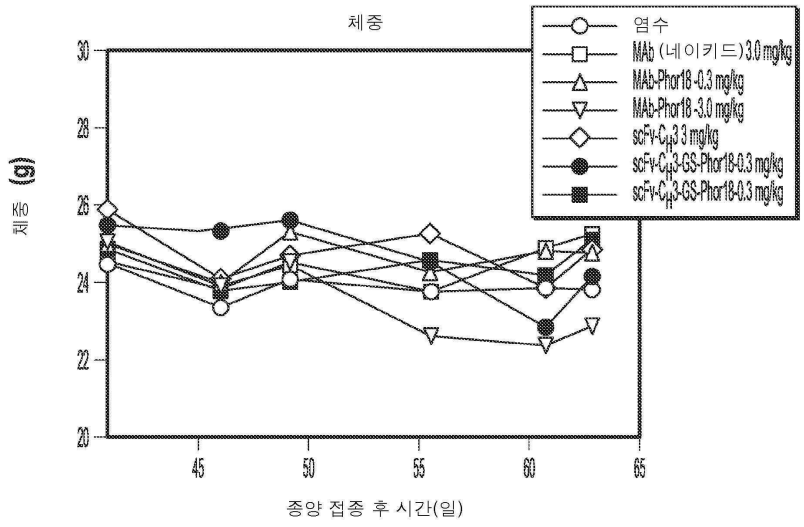
도면2b


재조합 미니바디
염수
scFv-CH3 3.0 mg/kg
scFv-CH3-GS-Phor18-0.3 mg/kg
scFv-CH3-GS-Phor18-3.0 mg/kg
0.019
중간 종양 부피 (mm3)
종양 접종 후 시간(일)

도면3

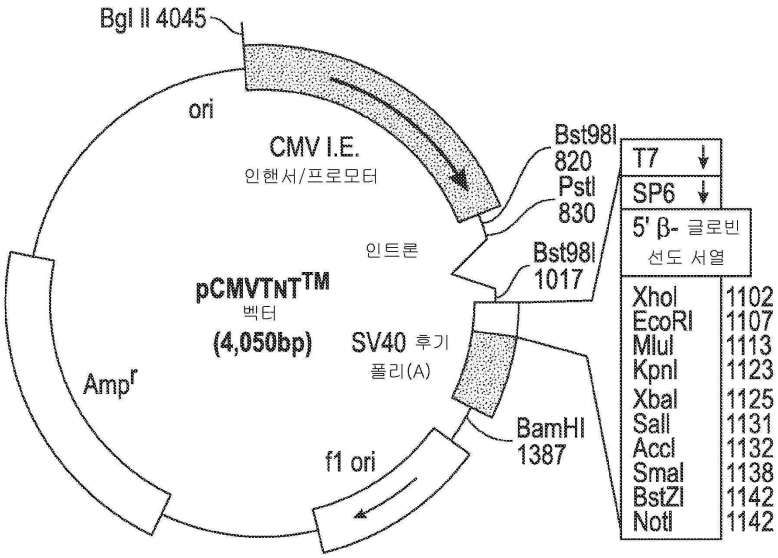

종양 중량
평균 종양 중량 (mg)
2000
1500
1000
500
0.04
0.02
염수
MAb (네이키드) 3 mg/kg
MAb-Phor18 0.3 mg/kg
MAb-Phor18 3 mg/kg
scFv-CH3 3 mg/kg
scFv-CH3-Phor18 0.3 mg/kg
scFv-CH3-Phor18 3 mg/kg

도면4


체중
체중 (g)
30
28
26
24
22
20
45
50
55
60
65
종양 접종 후 시간(일)
염수
MAb (네이키드) 3.0 mg/kg
MAb-Phor18 -0.3 mg/kg
MAb-Phor18 -3.0 mg/kg
scFv-Cμ3 3 mg/kg
scFv-Cμ3-GS-Phor18-0.3 mg/kg
scFv-Cμ3-GS-Phor18-0.3 mg/kg

도면5

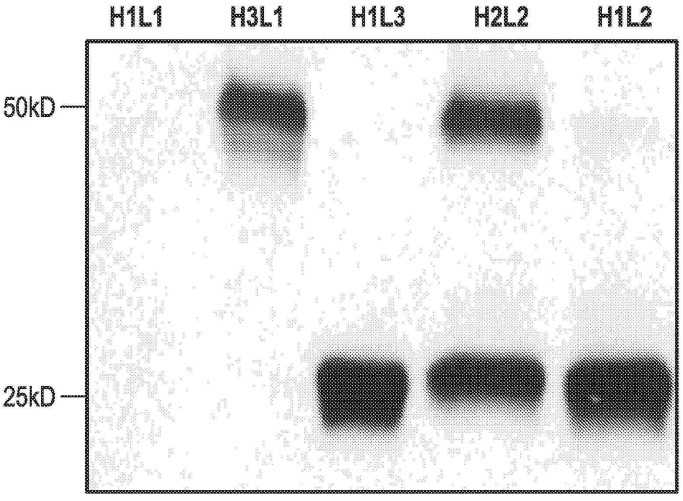
pCMVTnT™ 벡터 다중 클로닝 부위 및 원형 맵



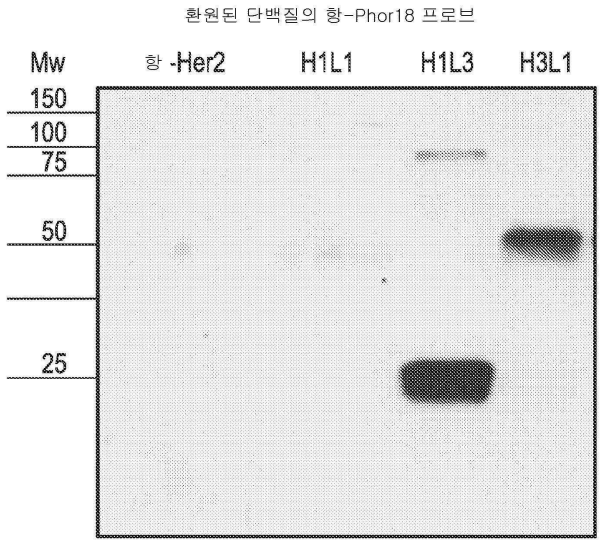
pCMVTnT™ 벡터 원형 맵 및 서열 참조 포인트

사이토메갈로바이러스 즉시-초기 인핸서/프로모터 영역	1-795
키메라 인트론	857-989
T7 RNA 중합효소 프로모터	1034-1052
SP6 RNA 중합효소 프로모터	1058-1074
5' β- 글로빈 선도 서열	1075-1101
다중 클로닝 영역	1102-1148
SV40 후기 아데닐중합체형성 신호	1155-1376
f1 단계 영역	1466-1921
β- 락타마제 (Amp^r) 코딩 영역	2358-3218

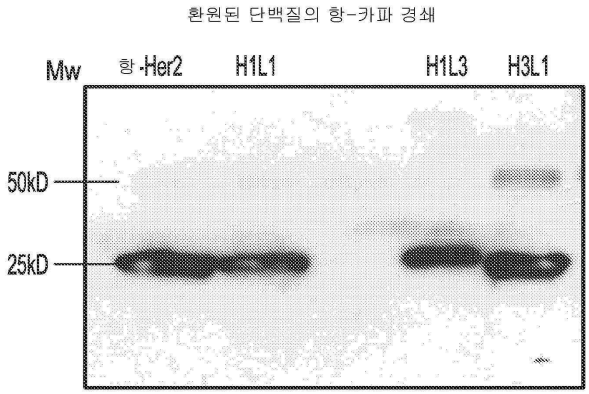
도면6



도면7a

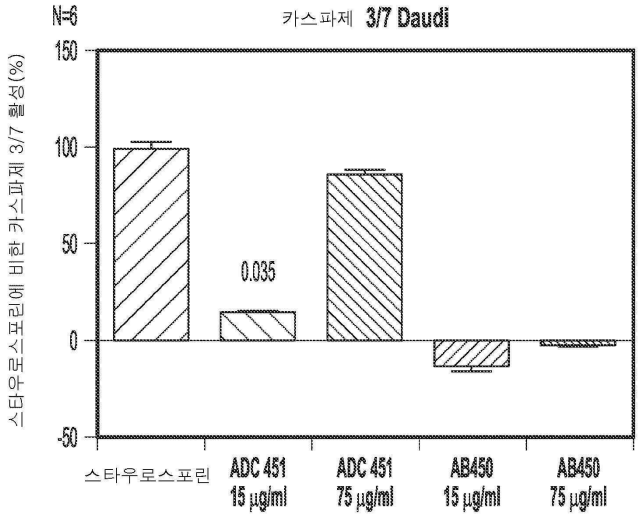


도면7b

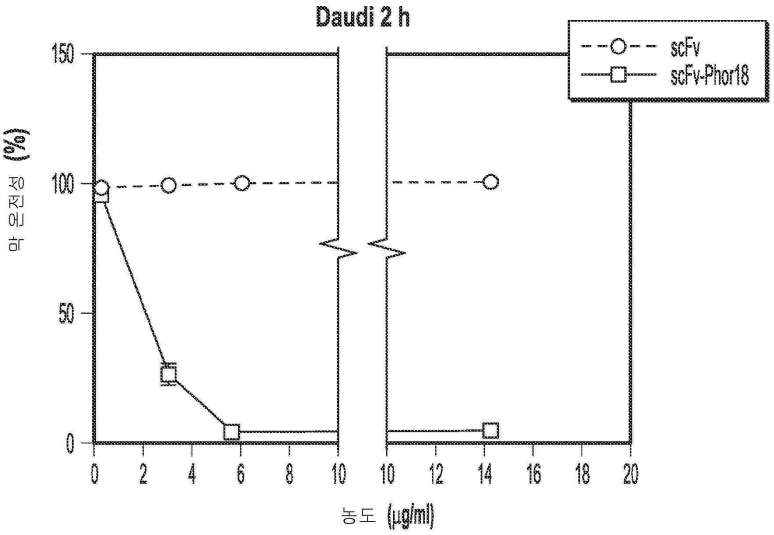


도면8

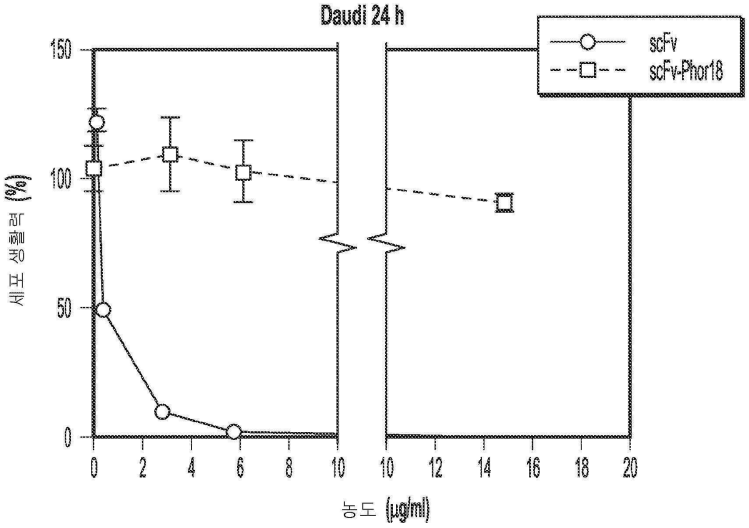
도면9


N=6
카스파제 3/7 Daudi
스타우로스포린에 비한 카스파제 3/7 활성(%)
150
100
50
0
-50
0.035
스타우로스포린
ADC 451 15 μg/ml
ADC 451 75 μg/ml
AB450 15 μg/ml
AB450 75 μg/ml

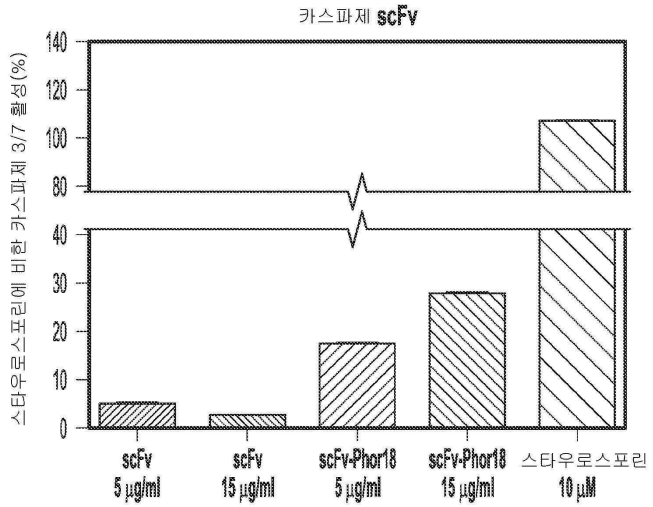
도면10a


Daudi 2 h
scFv
scFv-Phor18
막 온전성 (%)
150
100
50
0
0
2
4
6
8
10
10
12
14
16
18
20
농도 (μg/ml)

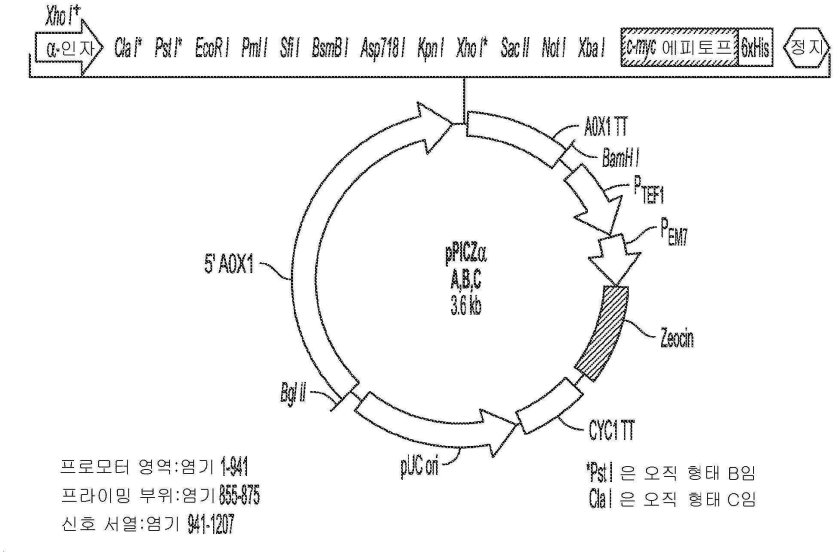
도면10b


Daudi 24 h
scFv
scFv-Phor18
세포 생활력 (%)
150
100
50
0
0
2
4
6
8
10
10
12
14
16
18
20
농도 (μg/ml)

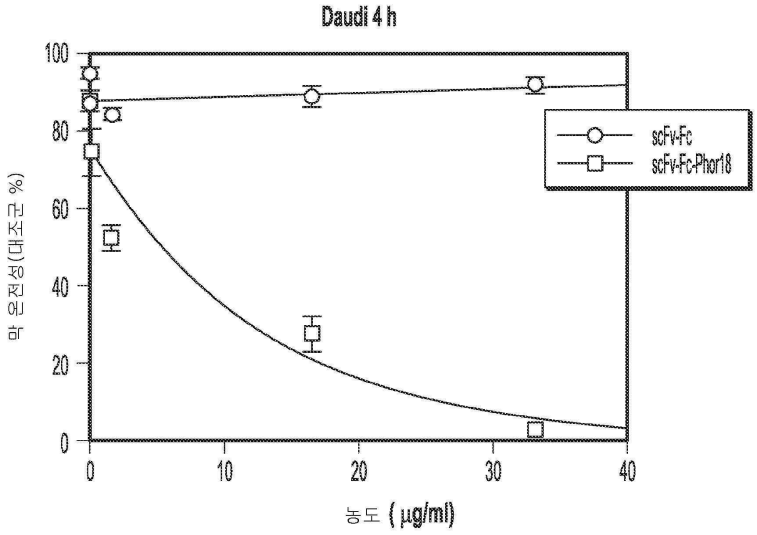
도면11


카스파제 scFv
스타우로스포린에 비한 카스파제 3/7 활성(%)
140
120
100
80
40
30
20
10
0
scFv 5 μg/ml
scFv 15 μg/ml
scFv-Phor18 5 μg/ml
scFv-Phor18 15 μg/ml
스타우로스포린 10 μM

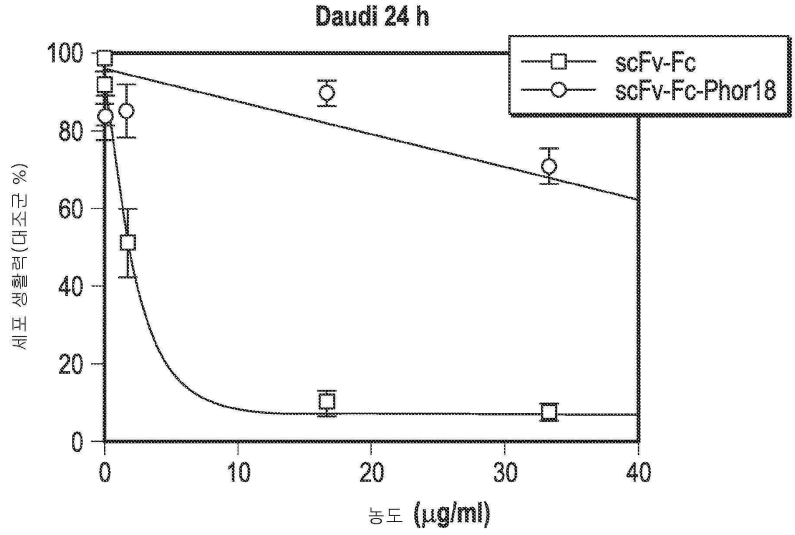
도면12


Xho I*
α-인자
Cla I* Pst I* EcoR I Pml I Sfi I BsmB I Asp718 I Kpn I Xho I* Sac II Not I Xba I
c-myc 에피토프
6xHis
정지
AOX1 TT
BamH I
P TEF1
P EM7
pPICZα
A,B,C
3.6 kb
5' AOX1
Zeocin
Bgl II
CYC1 TT
pUC ori
프로모터 영역:염기 1-941
프라이밍 부위:염기 855-875
신호 서열:염기 941-1207
*Pst I 은 오직 형태 B임
Cla I 은 오직 형태 C임

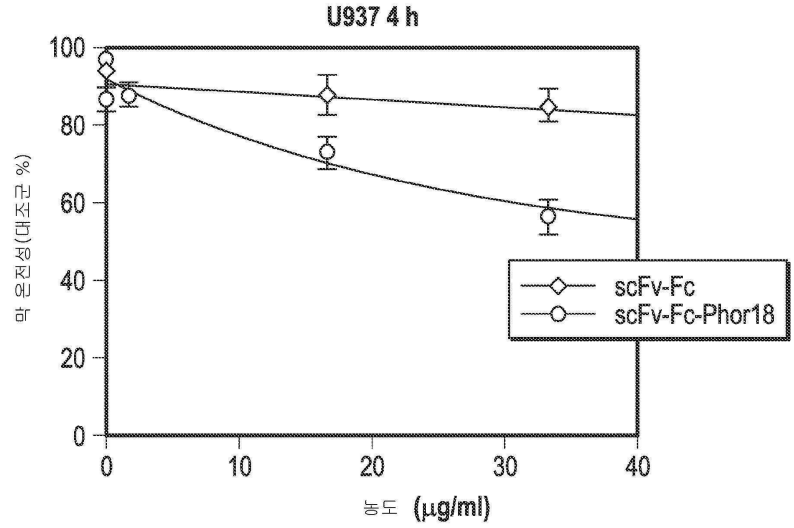
도면13a


Daudi 4 h
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
막 운전성(대조군 %)
농도 (μg/ml)
scFv-Fc
scFv-Fc-Phori8

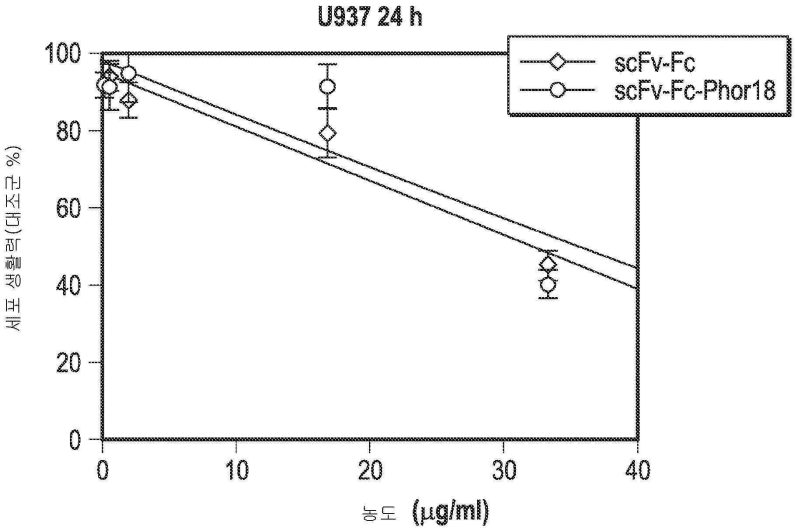
도면13b


Daudi 24 h
scFv-Fc
scFv-Fc-Phor18
세포 생활력(대조군 %)
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
농도 (μg/ml)

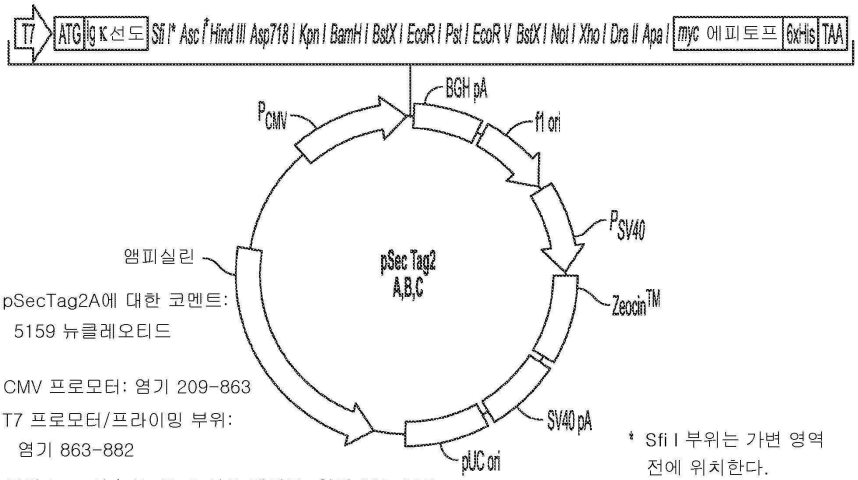
도면13c


U937 4 h
scFv-Fc
scFv-Fc-Phor18
막 온전성(대조군 %)
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
농도 (μg/ml)

도면13d



도면14



pSecTag2A에 대한 코멘트:
5159 뉴클레오티드

CMV 프로모터: 염기 209-863
T7 프로모터/프라이밍 부위:
염기 863-882
뮤린 Ig κ-사슬 V-J2-C 신호 펩티드: 염기 905-967
다중 클로닝 부위: 염기 970-1081
c-myc 에피토프: 염기 1082-1114
폴리히스티딘 태그: 염기 1127-1144
BGH 역 프라이밍 부위: 염기 1167-1184
BGH 아데닐중합체형성 서열: 염기 1166-1380
f1 기점: 염기 1443-1856
SV40 프로모터 및 기점: 염기 1924-2245
EM-7 프로모터: 염기 2261-2327
Zeocin™ 내성 유전자: 염기 2328-2702
SV40 아데닐중합체형성 서열: 염기 2832-2961
pUC 기점: 염기 3345-4018
앰피실린 내성 유전자: 염기 4163-5023 (C)

* Sfi I 부위는 가변 영역 전에 위치한다.

† 프레임-의존성 변화:
Asc I는 형태 A에서만 발견된다.

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> ESPERANCE PHARMACEUTICALS, INC.

LEUSCHNER, CAROLA

ALILA, HECTOR

<120> ANTIBODY/DRUG CONJUGATES AND METHODS OF USE

<130> 026039-0424485

<140> To Be Assigned

<141> Herewith

<150> 61/720,257

<151> 2012-10-30

<160> 152

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Lytic peptide

<400> 1

Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys

1 5 10 15

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Lytic peptide

<400> 2

Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe

1 5 10 15

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Lytic peptide

<400> 3

Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe

1 5 10 15

Ala

<210> 4

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Lytic peptide

<400> 4

Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe

1 5 10 15

Ala Lys

<210> 5

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Lytic peptide

<400> 5

Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe

1 5 10 15

Ala Lys Phe

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Lytic peptide

<400> 6

Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe

1 5 10 15

Ala Lys Phe Ala

20

<210> 7

<211> 28

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Lytic peptide

<400> 7

Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe

1 5 10 15

Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys

20 25

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Linker peptide

<400> 8

Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Linker peptide

<400> 9

Ala Ser Ala Ala Ser

1 5

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Linker peptide

<400> 10

Gly Ser Gly Arg Ser Ala

1 5

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Linker peptide

<400

> 11

Arg Val Arg Arg Ser Val

1 5

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain mammalian humanized antibody

<400> 12

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 13

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain mammalian humanized antibody

<400> 13

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain mammalian humanized antibody

<400> 14

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

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

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

<210> 15
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain mammalian humanized antibody
<400> 15
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

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

115 120

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain mammalian humanized antibody

<400> 16

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

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

<210> 17

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain mammalian humanized antibody

<400> 17

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain mammalian humanized antibody

<400> 18

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

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

<210> 19

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain mammalian humanized antibody

<400> 19

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

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

<210> 20

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain mammalian humanized antibody

<400> 20

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 21

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain mammalian

humanized antibody

<400> 21

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 22

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain mammalian humanized antibody

<400> 22

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 23

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain mammalian humanized antibody

<400> 23

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

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

<210> 24

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain mammalian humanized antibody

<400> 24

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

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

<210> 25
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain mammalian

humanized antibody
<400> 25
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

<210> 26
<211> 107
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain mammalian humanized antibody

<400> 26

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

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

<210> 27

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain mammalian humanized antibody

<400> 27

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

<210> 28
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain mammalian humanized antibody

<400> 28
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

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

<210> 29
<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain mammalian

humanized antibody

<400> 29

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 30

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain mammalian

humanized antibody

<400> 30

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 31

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain mammalian

humanized antibody

<400> 31

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 32

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain mammalian humanized antibody

<400> 32

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Asp Trp Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser

50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro
85 90 95

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

<210> 33

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain mammalian humanized antibody

<400> 33

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Trp Gly Pro Lys Leu Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 34

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain mammalian humanized antibody

<400> 34

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr

85 90 95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Glu Asn
145 150 155 160
Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
165 170 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
180 185 190
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
195 200 205
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215
<210> 35
<211> 448
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain mammalian humanized antibody
<400> 35

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

Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val 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 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

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

305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 36
<211> 217
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain mammalian humanized antibody
<400> 36
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
1 5 10 15
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val
20 25 30
Ser Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

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

50 55 60

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

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile
85 90 95

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

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
115 120 125

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130 135 140

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

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 37

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain mammalian humanized antibody

<400

> 37

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

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

Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val 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 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Val Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

325 330 335

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

340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

355 360 365

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

370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

385 390 395 400

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

405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

420 425 430

Ala Leu Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 38

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain mammalian humanized antibody

<400> 38

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Glu Asn
145 150 155 160
Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
165 170 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
180 185 190
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
195 200 205
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 39
<211> 448
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain mammalian humanized antibody
<400> 39

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

Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val 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 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 40
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Mammalian humanized antibody
<400> 40

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln

20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 41

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Mammalian humanized antibody

<400> 41

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Leu Arg Gln Ala Tyr Trp Glu Ile

1 5 10 15

Gln Ala Leu Pro Asn Leu Asn Trp Thr Gln Ser Arg Ala Phe Ile Arg

20 25 30

Ser Leu Tyr Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 42

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Mammalian humanized antibody

<400> 42

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Pro Lys Thr Ala Tyr Trp Glu Ile

1 5 10 15

Val Lys Leu Pro Asn Leu Asn Pro Glu Gln Arg Arg Ala Phe Ile Arg

20 25 30

Ser Leu Tyr Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 43

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Mammalian humanized antibody

<400> 43

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Pro Arg Glu Ala Tyr Trp Glu Ile

1 5 10 15

Gln Arg Leu Pro Asn Leu Asn Asn Lys Gln Lys Ala Ala Phe Ile Arg

20 25 30

Ser Leu Tyr Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 44

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Mammalian humanized antibody

<400> 44

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Trp Met Thr Ala Gly Lys Glu Ile

1 5 10 15

Tyr Arg Leu Pro Asn Leu Asn Gly Thr Gln Val Arg Ala Phe Ile Gln

20 25 30

Ser Leu Ser Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 45

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Mammalian humanized antibody

<400> 45

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Trp Val Gln Ala Gly Ser Glu Ile

1 5 10 15

Tyr Asn Leu Pro Asn Leu Asn Arg Ala Gln Met Arg Ala Phe Ile Arg

20 25 30

Ser Leu Ser Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 46

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Mammalian humanized antibody

<400> 46

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ile Lys Gln Ala Phe His Glu Ile

1 5 10 15

Val Arg Leu Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln Val Arg Ala Phe Ile Tyr

20 25 30

Ser Leu Gly Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 47

<211>

57

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Mammalian humanized antibody

<400> 47

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Val Asp Ala Gly Ala Glu Ile
1 5 10 15

Trp Arg Leu Pro Asn Leu Asn Ala Lys Gln Met Ala Phe Ile Asp Ser
20 25 30

Leu Gly Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys
35 40 45

Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 48

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain antibody

<400> 48

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30

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

35 40 45

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

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

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

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

<210> 49

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain antibody

<400> 49

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ser Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 50

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain antibody

<400> 50

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

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

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 51

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain antibody

<400> 51

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala 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 Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly

100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

115 120

<210> 52

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain antibody

<400> 52

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu 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

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

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

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

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

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

<210> 53

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain antibody

<400> 53

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

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

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

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser 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 Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

115 120

<210> 54

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain antibody

<400> 54

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu 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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 55

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain antibody

<400> 55

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

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

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120

<210> 56

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain antibody

<400> 56

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

35 40 45
Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Leu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Leu Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 57

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain antibody

<400> 57

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Leu

100 105

<210> 58

<211> 141

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain antibody

<400> 58

Met Phe Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

20 25 30

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

35 40 45

Asn Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Val Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala

65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys

85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met

115 120 125

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

130 135 140

<210> 59

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain antibody

<400> 59

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn

100 105 110

Trp Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

115 120 125

<210> 60

<211> 144

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain antibody

<400> 60

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His

20 25 30

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

35 40 45

Ser Tyr His Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Ser

85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr

100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Ala Gly Ser Phe Tyr Asp Gly Leu

115 120 125

Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

130 135 140

<210> 61

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain antibody

<400> 61

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser

100 105 110

Asp Trp Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

115 120 125

<210> 62

<211> 141

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain antibody

<400> 62

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

20 25 30

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

35 40 45

His Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Val Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Thr Ile Gly Tyr Ala

65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn

85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met

115 120 125

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

130 135 140

<210> 63

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain antibody

<400> 63

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser

100 105 110

Asn Trp Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

115 120 125

<210> 64

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain antibody

<400> 64

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser 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 Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu

115 120 125

Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys

130 135 140

Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp

180 185 190

Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr

195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys

210 215 220

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

225 230 235 240

Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser

245 250 255

Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp

260 265 270

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

275 280 285

Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser

290 295 300

Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys

305 310 315 320

Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile

325 330 335

Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro

340 345 350

Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met

355 360 365

Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn

370 375 380

Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser

385 390 395 400

Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn

405 410 415

Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu

420 425 430

His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg

435 440

<210> 65

<211> 209

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain antibody

<400> 65

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu 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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr 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

<210> 66

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain antibody

<400> 66

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala 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 Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly

100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115 120 125

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

130 135 140

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

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445
Pro Gly Lys
450

<210> 67
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain antibody
<400> 67
Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile 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
210

<210> 68
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220
><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain antibody
<400> 68
Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser 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 Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu

115 120 125

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

130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His

210 215 220

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

225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

275 280 285

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

290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

340 345 350

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

355 360 365

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

370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 69

<211> 210

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain antibody

<400> 69

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu 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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro 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
210

<210> 70
<211> 396
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Immunoglobulin light chain
<400> 70
atggattcac aggcccaggt tcttatattg ctgctgctat gggtatctgg tacctgtggg 60

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact 120
atgagctgca aatccagtca gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttggct 180
tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg 240
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 300
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctt 360
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 396
<210> 71
<211> 130
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Immunoglobulin light chain

<400> 71

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser Gly
1 5 10 15

Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val
20 25 30

Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45

Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys

50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Arg Glu Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys
100 105 110

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu

115 120 125

Ile Lys
130

<210> 72

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Immunoglobulin heavy chain

<400> 72

caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcac cctcacagag cctgtccatc 60

acatgcactg tctctgggtt ctcattatcc agatatagtg tacactgggt tcgccagcct 120

ccaggaaagg gcctggagtg gctgggaatg atatggggtg gtggaagcac agactataat 180

tcagctctca aatccagact gagcatcagc aaggacaact ccaagagcca agttttctta 240

aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccatgtact actgtgccag aggcaatgat 300

ggttactact cgtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtctc ttca 354

<210> 73

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Immunoglobulin heavy chain

<400> 73

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr
20 25 30

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

Gly Met Ile Trp Gly Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 74

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Lytic peptide

<400> 74

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Lys Leu Ala Lys
1 5 10

<210> 75

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Linker

<400> 75

Asn Arg Val Arg Arg Ser
1 5

<210> 76

<211> 2217

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Her2/neu antibody

<400> 76

catatgcatc accaccacca ccacgacgac gacgacaaag atattcaaat gacccagtcc 60

ccgagcagcc tgagtgcctc cgttggcgac cgcgtgacca ttacgtgccg tgcgagccag 120

gatgtcaaca ccgcggtggc ctggtatcag caaaaaccgg gcaaagcgcc gaaactgctg 180

atctattcag cctcgtttct gtacagcggt gttccgtctc gtttcagcgg ctctcgcagt 240

ggtaccgatt ttaccctgac gattagctct ctgcagccgg aagactttgc gacgtattac 300

tgccagcaac attacaccac gccgccgacc ttcggccagg gtacgaaagt ggaaatcaaa 360

ggttccacct caggcggtgg cagtggtggc ggttccggcg gtggcggtag ttccgaagtt 420

cagctggtcg aaagtggcgg tggcctggtt caaccgggtg gctcactgcg tctgtcgtgt 480

gcagcaagcg gtttcaacat caaagatacc tacatccact gggttcgtca ggcgccgggc 540

aaaggtctgg aatgggtcgc ccgcatttac ccgaccaatg gctatacgcg ttacgcagat 600

agcgtgaaag gtcgctttac catctctgcg gacaccagta aaaacacggc ctatctgcag 660

atgaatagcc tgcgtgcgga agatacggcc gtttattact gctctcgctg gggtggcgat 720

ggcttctatg ctatggacta ctggggccag ggtaccctgg tgacggtttc atcgggtcag 780

ccgcgtgaac cgcaagtgta taccctgccg ccgtcacgcg atgaactgac gaaaaaccag 840

gtgtcgctga cgtgtctggt taaaggcttt tacccgagcg acatcgcggt tgaatgggaa 900

tctaatggtc aaccggaaaa caattataaa accacgccgc cggtcctgga tagtgacggc 960

tccttttcc tgtacagtaa actgaccgtg gataaatccc gttggcagca gggtaacgtc 1020

ttctcgtgta gcgtgatgca tgaagccctg cataatcact atacccagaa atctctgagt 1080

ctgtccccgg gcaaaggttc aacgtcgggt ggcggttccg gcggtggctc aggtggcggt 1140

ggcagctctg gccaaccgcg cgaaccgcag gtttacaccc tgccgccgag ccgtgacgaa 1200

ctgaccaaaa accaagtcag cctgacgtgc ctggtgaaag gcttttaccc gagtgacatt 1260

gcagttgaat gggaatccaa tggtcagccg gaaaataact acaaaacgac gccgccggtt 1320

ctggattcag acggctcgtt tttcctgtac tcaaaactga ccgtcgataa atcgcgctgg 1380

caacagggta acgttttcag ctgctctgtc atgcacgaag ccctgcacaa ccattatacc 1440

cagaaaagtc tgtccctgtc accgggcaaa gaagtgcagc tggttgaatc tggtggcggt 1500

ctggtgcaac cgggcggttc gctgcgtctg agctgtgcag cttctggctt taatattaaa 1560

gacacgtaca tccactgggt gcgtcaggca ccgggtaaag gcctggaatg ggttgctcgt 1620

atctatccga cgaacggtta tacgcgttac gccgatagcg tcaaaggccg ttttaccatc 1680

agtgcagaca cctccaaaaa cacggcttat ctgcagatga atagtctgcg tgcagaagat 1740

accgctgttt attactgcag ccgctggggc ggtgatggct tctatgcaat ggattattgg 1800

ggtcaaggta ccctggtcac cgtgagttcc ggttcgacca gcggcggtgg ctcaggtggc 1860

ggttcgggcg gtggcggttc atcggacatt cagatgacgc aaagcccgag ctctctgtct 1920

gcgagtgttg gcgatcgtgt caccatcacg tgtcgcgcct ctcaggacgt gaataccgca 1980

gttgcttggt accaacaaaa accgggcaaa gcaccgaaac tgctgattta ctccgcttca 2040

ttcctgtaca gcggtgtgcc gtctcgtttt tcgggcagcc gctctggtac cgatttcacc 2100

ctgacgatta gttccctgca accggaagat ttcgccacct actactgcca gcaacactat 2160

acgaccccgc cgacgtttgg tcagggcacg aaagtggaaa ttaaataatg aaagctt 2217

<210> 77

<211> 2277

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Her2/neu antibody

<400> 77

catatgcatc accaccacca ccacgacgac gacgacaaag atattcaaat gacccagtcc 60

ccgagcagcc tgagtgcctc cgttggcgac cgcgtgacca ttacgtgccg tgcgagccag 120

gatgtcaaca ccgcggtggc ctggtatcag caaaaaccgg gcaaagcgcc gaaactgctg 180

atctattcag cctcgtttct gtacagcggt gttccgtctc gtttcagcgg ctctcgcagt 240

ggtaccgatt ttaccctgac gattagctct ctgcagccgg aagactttgc gacgtattac 300

tgccagcaac attacaccac gccgccgacc ttcggccagg gtacgaaagt ggaaatcaaa 360

ggttccacct caggcggtgg cagtggtggc ggttccggcg gtggcggtag ttccgaagtt 420

cagctggtcg aaagtggcgg tggcctggtt caaccgggtg gctcactgcg tctgtcgtgt 480

gcagcaagcg gtttcaacat caaagatacc tacatccact gggttcgtca ggcgccgggc 540

aaaggtctgg aatgggtcgc ccgcatttac ccgaccaatg gctatacgcg ttacgcagat 600

agcgtgaaag gtcgctttac catctctgcg gacaccagta aaaacacggc ctatctgcag 660

atgaatagcc tgcgtgcgga agatacggcc gtttattact gctctcgctg gggtggcgat 720

ggcttctatg ctatggacta ctggggccag ggtaccctgg tgacggtttc atcgggtcag 780

ccgcgtgaac cgcaagtgta taccctgccg ccgtcacgcg atgaactgac gaaaaaccag 840

gtgtcgctga cgtgtctggt taaaggcttt tacccgagcg acatcgcggt tgaatgggaa 900

tctaatggtc aaccggaaaa caattataaa accacgccgc cggtcctgga tagtgacggc 960

tccttttcc tgtacagtaa actgaccgtg gataaatccc gttggcagca gggtaacgtc 1020

ttctcgtgta gcgtgatgca tgaagccctg cataatcact atacccagaa atctctgagt 1080

ctgtccccgg gcaaaggttc aacgtcgggt ggcggttccg gcggtggctc aggtggcggt 1140

ggcagctctg gccaaccgcg cgaaccgcag gtttacaccc tgccgccgag ccgtgacgaa 1200

ctgaccaaaa accaagtcag cctgacgtgc ctggtgaaag gcttttaccc gagtgacatt 1260

gcagttgaat gggaatccaa tggtcagccg gaaaataact acaaaacgac gccgccggtt 1320

ctggattcag acggctcgtt tttcctgtac tcaaaactga ccgtcgataa atcgcgctgg 1380

caacagggta acgttttcag ctgctctgtc atgcacgaag ccctgcacaa ccattatacc 1440

cagaaaagtc tgtccctgtc accgggcaaa gaagtgcagc tggttgaatc tggtggcggt 1500

ctggtgcaac cgggcggttc gctgcgtctg agctgtgcag cttctggctt taatattaaa 1560

gacacgtaca tccactgggt gcgtcaggca ccgggtaaag gcctggaatg ggttgctcgt 1620

atctatccga cgaacggtta tacgcgttac gccgatagcg tcaaaggccg ttttaccatc 1680

agtgcagaca cctccaaaaa cacggcttat ctgcagatga atagtctgcg tgcagaagat 1740

accgctgttt attactgcag ccgctggggc ggtgatggct tctatgcaat ggattattgg 1800

ggtcaaggta ccctggtcac cgtgagttcc ggttcgacca gcggcggtgg ctcaggtggc 1860

ggttcgggcg gtggcggttc atcggacatt cagatgacgc aaagcccgag ctctctgtct 1920

gcgagtgttg gcgatcgtgt caccatcacg tgtcgcgcct ctcaggacgt gaataccgca 1980

gttgcttggt accaacaaaa accgggcaaa gcaccgaaac tgctgattta ctccgcttca 2040

ttcctgtaca gcggtgtgcc gtctcgtttt tcgggcagcc gctctggtac cgatttcacc 2100

ctgacgatta gttccctgca accggaagat ttcgccacct actactgcca gcaacactat 2160

acgaccccgc cgacgtttgg tcagggcacg aaagtggaaa ttaaaggcag caaatttgcg 2220

aaattcgcca aaaaattcgc aaaattcgcg aaaaaattcg cgaaataatg aaagctt 2277

<210> 78

<211> 2265

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Her2/neu antibody

<400> 78

catatggaaa atctgtattt ccaaggtgat attcaaatga cccagtcccc gagcagcctg 60

agtgcctccg ttggcgaccg cgtgaccatt acgtgccgtg cgagccagga tgtcaacacc 120

gcggtggcct ggtatcagca aaaaccgggc aaagcgccga aactgctgat ctattcagcc 180

tcgtttctgt acagcggtgt tccgtctcgt ttcagcggct ctcgcagtgg taccgatttt 240

accctgacga ttagctctct gcagccggaa gactttgcga cgtattactg ccagcaacat 300

tacaccacgc cgccgacctt cggccagggt acgaaagtgg aaatcaaagg ttccacctca 360

ggcggtggca gtggtggcgg ttccggcggt ggcggtagtt ccgaagttca gctggtcgaa 420

agtggcggtg gcctggttca accgggtggc tcactgcgtc tgtcgtgtgc agcaagcggt 480

ttcaacatca aagataccta catccactgg gttcgtcagg cgccgggcaa aggtctggaa 540

tgggtcgccc gcatttaccc gaccaatggc tatacgcgtt acgcagatag cgtgaaaggt 600

cgctttacca tctctgcgga caccagtaaa aacacggcct atctgcagat gaatagcctg 660

cgtgcggaag atacggccgt ttattactgc tctcgctggg gtggcgatgg cttctatgct 720

atggactact ggggccaggg taccctggtg acggtttcat cgggtcagcc gcgtgaaccg 780

caagtgtata ccctgccgcc gtcacgcgat gaactgacga aaaaccaggt gtcgctgacg 840

tgtctggtta aaggctttta cccgagcgac atcgcggttg aatgggaatc taatggtcaa 900

ccggaaaaca attataaaac cacgccgccg gtcctggata gtgacggctc ctttttcctg 960

tacagtaaac tgaccgtgga taaatcccgt tggcagcagg gtaacgtctt ctcgtgtagc 1020

gtgatgcatg aagccctgca taatcactat acccagaaat ctctgagtct gtccccgggc 1080

aaaggttcaa cgtcgggtgg cggttccggc ggtggctcag gtggcggtgg cagctctggc 1140

caaccgcgcg aaccgcaggt ttacaccctg ccgccgagcc gtgacgaact gaccaaaaac 1200

caagtcagcc tgacgtgcct ggtgaaaggc ttttacccga gtgacattgc agttgaatgg 1260

gaatccaatg gtcagccgga aaataactac aaaacgacgc cgccggttct ggattcagac 1320

ggctcgtttt tcctgtactc aaaactgacc gtcgataaat cgcgctggca acagggtaac 1380

gttttcagct gctctgtcat gcacgaagcc ctgcacaacc attataccca gaaaagtctg 1440

tccctgtcac cgggcaaaga agtgcagctg gttgaatctg gtggcggtct ggtgcaaccg 1500

ggcggttcgc tgcgtctgag ctgtgcagct tctggcttta atattaaaga cacgtacatc 1560

cactgggtgc gtcaggcacc gggtaaaggc ctggaatggg ttgctcgtat ctatccgacg 1620

aacggttata cgcgttacgc cgatagcgtc aaaggccgtt ttaccatcag tgcagacacc 1680

tccaaaaaca cggcttatct gcagatgaat agtctgcgtg cagaagatac cgctgtttat 1740

tactgcagcc gctggggcgg tgatggcttc tatgcaatgg attattgggg tcaaggtacc 1800

ctggtcaccg tgagttccgg ttcgaccagc ggcggtggct caggtggcgg ttcgggcggt 1860

ggcggttcat cggacattca gatgacgcaa agcccgagct ctctgtctgc gagtgttggc 1920

gatcgtgtca ccatcacgtg tcgcgcctct caggacgtga ataccgcagt tgcttggtac 1980

caacaaaaac cgggcaaagc accgaaactg ctgatttact ccgcttcatt cctgtacagc 2040

ggtgtgccgt ctcgtttttc gggcagccgc tctggtaccg atttcaccct gacgattagt 2100

tccctgcaac cggaagattt cgccacctac tactgccagc aacactatac gaccccgccg 2160

acgtttggtc agggcacgaa agtggaaatt aaaggcagca aactggcgaa actggccaaa 2220

aaactggcaa aactggcgaa aaaactggcg aaataatgaa agctt 2265

<210> 79

<211> 2277

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Her2/neu antibody

<400> 79

catatggaaa atctgtattt ccaaggtgat attcaaatga cccagtcccc gagcagcctg 60

agtgcctccg ttggcgaccg cgtgaccatt acgtgccgtg cgagccagga tgtcaacacc 120

gcggtggcct ggtatcagca aaaaccgggc aaagcgccga aactgctgat ctattcagcc 180

tcgtttctgt acagcggtgt tccgtctcgt ttcagcggct ctcgcagtgg taccgatttt 240

accctgacga ttagctctct gcagccggaa gactttgcga cgtattactg ccagcaacat 300

tacaccacgc cgccgacctt cggccagggt acgaaagtgg aaatcaaagg ttccacctca 360

ggcggtggca gtggtggcgg ttccggcggt ggcggtagtt ccgaagttca gctggtcgaa 420

agtggcggtg gcctggttca accgggtggc tcactgcgtc tgtcgtgtgc agcaagcggt 480

ttcaacatca aagataccta catccactgg gttcgtcagg cgccgggcaa aggtctggaa 540

tgggtcgccc gcatttaccc gaccaatggc tatacgcgtt acgcagatag cgtgaaaggt 600

cgctttacca tctctgcgga caccagtaaa aacacggcct atctgcagat gaatagcctg 660

cgtgcggaag atacggccgt ttattactgc tctcgctggg gtggcgatgg cttctatgct 720

atggactact ggggccaggg taccctggtg acggtttcat cgggtcagcc gcgtgaaccg 780

caagtgtata ccctgccgcc gtcacgcgat gaactgacga aaaaccaggt gtcgctgacg 840

tgtctggtta aaggctttta cccgagcgac atcgcggttg aatgggaatc taatggtcaa 900

ccggaaaaca attataaaac cacgccgccg gtcctggata gtgacggctc ctttttcctg 960

tacagtaaac tgaccgtgga taaatcccgt tggcagcagg gtaacgtctt ctcgtgtagc 1020

gtgatgcatg aagccctgca taatcactat acccagaaat ctctgagtct gtccccgggc 1080

aaaggttcaa cgtcgggtgg cggttccggc ggtggctcag gtggcggtgg cagctctggc 1140

caaccgcgcg aaccgcaggt ttacaccctg ccgccgagcc gtgacgaact gaccaaaaac 1200

caagtcagcc tgacgtgcct ggtgaaaggc ttttacccga gtgacattgc agttgaatgg 1260

gaatccaatg gtcagccgga aaataactac aaaacgacgc cgccggttct ggattcagac 1320

ggctcgtttt tcctgtactc aaaactgacc gtcgataaat cgcgctggca acagggtaac 1380

gttttcagct gctctgtcat gcacgaagcc ctgcacaacc attataccca gaaaagtctg 1440

tccctgtcac cgggcaaaga agtgcagctg gttgaatctg gtggcggtct ggtgcaaccg 1500

ggcggttcgc tgcgtctgag ctgtgcagct tctggcttta atattaaaga cacgtacatc 1560

cactgggtgc gtcaggcacc gggtaaaggc ctggaatggg ttgctcgtat ctatccgacg 1620

aacggttata cgcgttacgc cgatagcgtc aaaggccgtt ttaccatcag tgcagacacc 1680

tccaaaaaca cggcttatct gcagatgaat agtctgcgtg cagaagatac cgctgtttat 1740

tactgcagcc gctggggcgg tgatggcttc tatgcaatgg attattgggg tcaaggtacc 1800

ctggtcaccg tgagttccgg ttcgaccagc ggcggtggct caggtggcgg ttcgggcggt 1860

ggcggttcat cggacattca gatgacgcaa agcccgagct ctctgtctgc gagtgttggc 1920

gatcgtgtca ccatcacgtg tcgcgcctct caggacgtga ataccgcagt tgcttggtac 1980

caacaaaaac cgggcaaagc accgaaactg ctgatttact ccgcttcatt cctgtacagc 2040

ggtgtgccgt ctcgtttttc gggcagccgc tctggtaccg atttcaccct gacgattagt 2100

tccctgcaac cggaagattt cgccacctac tactgccagc aacactatac gaccccgccg 2160

acgtttggtc agggcacgaa agtggaaatt aaaaaccgtg tgcgtcgcag caaatttgcg 2220

aaattcgcca aaaaatttgc aaaattcgct aaaaaatttg cgaaataatg aaagctt 2277

<210> 80

<211> 2289

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Her2/neu antibody

<400> 80

catatgcatc accaccacca ccacgacgac gacgacaaag atattcaaat gacccagtcc 60

ccgagcagcc tgagtgcctc cgttggcgac cgcgtgacca ttacgtgccg tgcgagccag 120

gatgtcaaca ccgcggtggc ctggtatcag caaaaaccgg gcaaagcgcc gaaactgctg 180

atctattcag cctcgtttct gtacagcggt gttccgtctc gtttcagcgg ctctcgcagt 240

ggtaccgatt ttaccctgac gattagctct ctgcagccgg aagactttgc gacgtattac 300

tgccagcaac attacaccac gccgccgacc ttcggccagg gtacgaaagt ggaaatcaaa 360

ggttccacct caggcggtgg cagtggtggc ggttccggcg gtggcggtag ttccgaagtt 420

cagctggtcg aaagtggcgg tggcctggtt caaccgggtg gctcactgcg tctgtcgtgt 480

gcagcaagcg gtttcaacat caaagatacc tacatccact gggttcgtca ggcgccgggc 540

aaaggtctgg aatgggtcgc ccgcatttac ccgaccaatg gctatacgcg ttacgcagat 600

agcgtgaaag gtcgctttac catctctgcg gacaccagta aaaacacggc ctatctgcag 660

atgaatagcc tgcgtgcgga agatacggcc gtttattact gctctcgctg gggtggcgat 720

ggcttctatg ctatggacta ctggggccag ggtaccctgg tgacggtttc atcgggtcag 780

ccgcgtgaac cgcaagtgta taccctgccg ccgtcacgcg atgaactgac gaaaaaccag 840

gtgtcgctga cgtgtctggt taaaggcttt tacccgagcg acatcgcggt tgaatgggaa 900

tctaatggtc aaccggaaaa caattataaa accacgccgc cggtcctgga tagtgacggc 960

tccttttcc tgtacagtaa actgaccgtg gataaatccc gttggcagca gggtaacgtc 1020

ttctcgtgta gcgtgatgca tgaagccctg cataatcact atacccagaa atctctgagt 1080

ctgtccccgg gcaaaggttc aacgtcgggt ggcggttccg gcggtggctc aggtggcggt 1140

ggcagctctg gccaaccgcg cgaaccgcag gtttacaccc tgccgccgag ccgtgacgaa 1200

ctgaccaaaa accaagtcag cctgacgtgc ctggtgaaag gcttttaccc gagtgacatt 1260

gcagttgaat gggaatccaa tggtcagccg gaaaataact acaaaacgac gccgccggtt 1320

ctggattcag acggctcgtt tttcctgtac tcaaaactga ccgtcgataa atcgcgctgg 1380

caacagggta acgttttcag ctgctctgtc atgcacgaag ccctgcacaa ccattatacc 1440

cagaaaagtc tgtccctgtc accgggcaaa gaagtgcagc tggttgaatc tggtggcggt 1500

ctggtgcaac cgggcggttc gctgcgtctg agctgtgcag cttctggctt taatattaaa 1560

gacacgtaca tccactgggt gcgtcaggca ccgggtaaag gcctggaatg ggttgctcgt 1620

atctatccga cgaacggtta tacgcgttac gccgatagcg tcaaaggccg ttttaccatc 1680

agtgcagaca cctccaaaaa cacggcttat ctgcagatga atagtctgcg tgcagaagat 1740

accgctgttt attactgcag ccgctggggc ggtgatggct tctatgcaat ggattattgg 1800

ggtcaaggta ccctggtcac cgtgagttcc ggttcgacca gcggcggtgg ctcaggtggc 1860

ggttcgggcg gtggcggttc atcggacatt cagatgacgc aaagcccgag ctctctgtct 1920

gcgagtgttg gcgatcgtgt caccatcacg tgtcgcgcct ctcaggacgt gaataccgca 1980

gttgcttggt accaacaaaa accgggcaaa gcaccgaaac tgctgattta ctccgcttca 2040

ttcctgtaca gcggtgtgcc gtctcgtttt tcgggcagcc gctctggtac cgatttcacc 2100

ctgacgatta gttccctgca accggaagat ttcgccacct actactgcca gcaacactat 2160

acgaccccgc cgacgtttgg tcagggcacg aaagtggaaa ttaaaaaccg tgtgcgtcgc 2220

agcaaactgg cgaaactggc caaaaaactg gcaaaactgg ctaaaaaact ggcgaaataa 2280

tgaaagctt 2289

<210> 81

<211> 2313

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Her2/neu antibody

<400> 81

catatggaaa atctgtattt ccaaggtaaa tttgcgaaat tcgccaaaaa attcgcaaaa 60

ttcgcgaaaa aattcgcgaa agatattcaa atgacccagt ccccgagcag cctgagtgcc 120

tccgttggcg accgcgtgac cattacgtgc cgtgcgagcc aggatgtcaa caccgcggtg 180

gcctggtatc agcaaaaacc gggcaaagcg ccgaaactgc tgatctattc agcctcgttt 240

ctgtacagcg gtgttccgtc tcgtttcagc ggctctcgca gtggtaccga ttttaccctg 300

acgattagct ctctgcagcc ggaagacttt gcgacgtatt actgccagca acattacacc 360

acgccgccga ccttcggcca gggtacgaaa gtggaaatca aaggttccac ctcaggcggt 420

ggcagtggtg gcggttccgg cggtggcggt agttccgaag ttcagctggt cgaaagtggc 480

ggtggcctgg ttcaaccggg tggctcactg cgtctgtcgt gtgcagcaag cggtttcaac 540

atcaaagata cctacatcca ctgggttcgt caggcgccgg gcaaaggtct ggaatgggtc 600

gcccgcattt acccgaccaa tggctatacg cgttacgcag atagcgtgaa aggtcgcttt 660

accatctctg cggacaccag taaaaacacg gcctatctgc agatgaatag cctgcgtgcg 720

gaagatacgg ccgtttatta ctgctctcgc tggggtggcg atggcttcta tgctatggac 780

tactggggcc agggtaccct ggtgacggtt tcatcgggtc agccgcgtga accgcaagtg 840

tataccctgc cgccgtcacg cgatgaactg acgaaaaacc aggtgtcgct gacgtgtctg 900

gttaaaggct tttacccgag cgacatcgcg gttgaatggg aatctaatgg tcaaccggaa 960

aacaattata aaaccacgcc gccggtcctg gatagtgacg gctccttttt cctgtacagt 1020

aaactgaccg tggataaatc ccgttggcag cagggtaacg tcttctcgtg tagcgtgatg 1080

catgaagccc tgcataatca ctatacccag aaatctctga gtctgtcccc gggcaaaggt 1140

tcaacgtcgg gtggcggttc cggcggtggc tcaggtggcg gtggcagctc tggccaaccg 1200

cgcgaaccgc aggtttacac cctgccgccg agccgtgacg aactgaccaa aaaccaagtc 1260

agcctgacgt gcctggtgaa aggcttttac ccgagtgaca ttgcagttga atgggaatcc 1320

aatggtcagc cggaaaataa ctacaaaacg acgccgccgg ttctggattc agacggctcg 1380

tttttcctgt actcaaaact gaccgtcgat aaatcgcgct ggcaacaggg taacgttttc 1440

agctgctctg tcatgcacga agccctgcac aaccattata cccagaaaag tctgtccctg 1500

tcaccgggca aagaagtgca gctggttgaa tctggtggcg gtctggtgca accgggcggt 1560

tcgctgcgtc tgagctgtgc agcttctggc tttaatatta aagacacgta catccactgg 1620

gtgcgtcagg caccgggtaa aggcctggaa tgggttgctc gtatctatcc gacgaacggt 1680

tatacgcgtt acgccgatag cgtcaaaggc cgttttacca tcagtgcaga cacctccaaa 1740

aacacggctt atctgcagat gaatagtctg cgtgcagaag ataccgctgt ttattactgc 1800

agccgctggg gcggtgatgg cttctatgca atggattatt ggggtcaagg taccctggtc 1860

accgtgagtt ccggttcgac cagcggcggt ggctcaggtg gcggttcggg cggtggcggt 1920

tcatcggaca ttcagatgac gcaaagcccg agctctctgt ctgcgagtgt tggcgatcgt 1980

gtcaccatca cgtgtcgcgc ctctcaggac gtgaataccg cagttgcttg gtaccaacaa 2040

aaaccgggca aagcaccgaa actgctgatt tactccgctt cattcctgta cagcggtgtg 2100

ccgtctcgtt tttcgggcag ccgctctggt accgatttca ccctgacgat tagttccctg 2160

caaccggaag atttcgccac ctactactgc cagcaacact atacgacccc gccgacgttt 2220

ggtcagggca cgaaagtgga aattaaaaaa tttgcgaaat tcgccaaaaa attcgcaaaa 2280

ttcgcgaaaa aattcgcgaa ataatgaaag ctt 2313

<210> 82

<211> 948

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Recombinant anti-Her2 antibody

<400> 82

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly

100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Val Gln

115 120 125

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

130 135 140

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His

145 150 155 160

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp

210 215 220

Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

225 230 235 240

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

245 250 255

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

260 265 270

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

325 330 335
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
340 345 350
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
355 360 365
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
370 375 380
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

385 390 395 400
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
405 410 415
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
420 425 430
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
435 440 445
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

450 455 460
Lys Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
465 470 475 480
Gly Ser Ser Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
485 490 495
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
500 505 510
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

515 520 525

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

530 535 540

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

545 550 555 560

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

565 570 575

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

580 585 590

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

595 600 605

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

610 615 620

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

625 630 635 640

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

645 650 655

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

660 665 670

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

675 680 685

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Glu

690 695 700

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

705 710 715 720

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr

725 730 735

Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala

740 745 750

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

755 760 765

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu

770 775 780

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
785 790 795 800
Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
805 810 815
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly
820 825 830
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser

835 840 845

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
850 855 860
Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
865 870 875 880
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr
885 890 895
Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe

900 905 910

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
915 920 925
Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
930 935 940
Val Glu Ile Lys
945

<210> 83

<211> 968

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Lytic peptide conjugate

<

400> 83

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly

100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Val Gln

115 120 125

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

130 135 140

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His

145 150 155 160

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp

210 215 220

Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

225 230 235 240

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

245 250 255

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
260 265 270
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
275 280 285
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
290 295 300
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
305 310 315 320

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
325 330 335
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
340 345 350
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
355 360 365
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
370 375 380

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
385 390 395 400
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
405 410 415
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
420 425 430
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455 460
Lys Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
465 470 475 480
Gly Ser Ser Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
485 490 495
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

500 505 510

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
515 520 525

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
530 535 540

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
545 550 555 560

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
565 570 575

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Pro Cys
580 585 590

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
595 600 605

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
610 615 620

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
625 630 635 640

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
645 650 655

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
660 665 670

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
675 680 685

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Glu
690 695 700

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
705 710 715 720

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr
725 730 735

Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
740 745 750

Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
755 760 765

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
770 775 780
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
785 790 795 800
Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
805 810 815
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly
820 825 830

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
835 840 845
Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
850 855 860
Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
865 870 875 880
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr
885 890 895

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe
900 905 910
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
915 920 925
Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
930 935 940
Val Glu Ile Lys Gly Ser Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala
945 950 955 960

Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys
965

<210> 84
<211> 214
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Anti-Her2/neu light chain antibody

<400> 84

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 85

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Her2/neu heavy chain antibody

<400> 85

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

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

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

355 360 365

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

370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

385 390 395 400

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

405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

435 440 445

Pro Gly Lys

450

<210> 86

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain antibody

<400> 86

Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp

35 40 45

Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

180 185 190

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

<210> 87

<211> 235

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain antibody

<400> 87

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

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

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Ser Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys
210 215 220
Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Ala
225 230 235
<210> 88
<211> 255

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain antibody
<400> 88
Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe
1 5 10 15
Ala Lys Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp
35 40 45

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

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Ser Lys Phe Ala Lys

225 230 235 240

Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Ala

245 250 255

<210> 89

<211> 471

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain antibody

<400> 89

Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe

1 5 10 15

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

20 25 30

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn

35 40 45

Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala

100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp

115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr

180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val

195 200 205

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

210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro

225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp

290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr

305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
325 330 335
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
340 345 350

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

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

<210> 90
<211> 472
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain antibody

<400> 90
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

355 360 365

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

370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

385 390 395 400

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

405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

435 440 445

Pro Gly Lys Gly Ser Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys

450 455 460

Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Ala

465 470

<210> 91

<211> 492

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain antibody

<400> 91

Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe

1 5 10 15

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

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

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

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

260 265 270

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Ser Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys
465 470 475 480
Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Ala
485 490

<210> 92

<211> 249

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: scFv fragment

<400> 92

His His His His His His Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
1 5 10 15

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

20 25 30

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

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

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

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

85 90 95

Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Gly
100 105 110

Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Ser Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
130 135 140

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

145 150 155 160

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
165 170 175

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
180 185 190

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 93

<211> 269

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: scFv-Phor18 conjugate

<400> 93

His His His His His His Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser

35 40 45

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

50 55 60

Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Gly

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Lys Phe Ala Lys Phe

245 250 255

Ala Lys Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys

260 265

<210> 94

<211> 717

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Anti-CD20 mimibody

<400> 94

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

1 5 10 15

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

20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Val Gln Leu Gln Gln
115 120 125

Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys
130 135 140

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys
145 150 155 160

Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly
165 170 175

Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu
180 185 190

Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu
195 200 205

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

Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
225 230 235 240

Val Ser Ser Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
245 250 255

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
260 265 270

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
275 280 285

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
290 295 300

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
305 310 315 320

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
325 330 335

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Ser
340 345 350

Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
355 360 365

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

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
435 440 445
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
450 455 460
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Val Gln Leu Gln Gln
465 470 475 480
Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys
485 490 495

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys
500 505 510
Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly
515 520 525
Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu
530 535 540
Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu
545 550 555 560

Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr
565 570 575
Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
580 585 590
Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly

595 600 605

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

610 615 620

Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser

625 630 635 640

Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro

645 650 655

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

660 665 670

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg

675 680 685

Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser

690 695 700

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile

705 710 715

<210> 95

<211> 737

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Anti-CD20-Phor18 mimibody conjugate

<400> 95

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

1 5 10 15

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

20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

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

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

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
325 330 335

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Ser
340 345 350

Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
355 360 365

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
370 375 380

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
385 390 395 400

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
405 410 415

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
420 425 430

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
435 440 445

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
450 455 460

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Val Gln Leu Gln Gln
465 470 475 480

Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys
485 490 495

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys
500 505 510

Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly
515 520 525

Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu
530 535 540

Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu
545 550 555 560

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

565 570 575

Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser

625 630 635 640

Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro

645 650 655

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

660 665 670

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg

675 680 685

Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser

690 695 700

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Gly Ser Lys

705 710 715 720

Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala

725 730 735

Lys

<210> 96

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Signal sequence

<400> 96

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala

1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala

20

<210> 97

<211> 454

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Naked antibody

<400> 97

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

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

50 55 60

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Glu
100 105 110

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

115 120 125

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn
130 135 140

Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
145 150 155 160

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
165 170 175

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Val Gln Pro Cys Pro Ala Pro Glu

225 230 235 240

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

245 250 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

260 265 270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn

290 295 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp

305 310 315 320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro

325 330 335

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu

340 345 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn

355 360 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr

385 390 395 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys

405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

450

<210> 98

<211> 494

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Lytic peptide

<400> 98

Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser

35 40 45

Val Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

165 170 175

Glu Trp Val Ala Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn

180 185 190

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn

195 200 205

Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val

210 215 220

Tyr Tyr Cys Ser Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asp

225 230 235 240

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

245 250 255

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

260 265 270

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

275 280 285

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

290 295 300

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

305 310 315 320

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

325 330 335

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

340 345 350

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

355 360 365

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

370 375 380

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

385 390 395 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

405 410 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

420 425 430

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
435 440 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Ser Lys Phe Ala Lys
465 470 475 480

Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys
485 490

<210> 99

<211> 474

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Lytic peptide

<400> 99

Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe
1 5 10 15

Ala Lys Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
35 40 45

Val Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
50 55 60

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

Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
85 90 95

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser
100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly
115 120 125

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

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
145 150 155 160

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

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

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

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
355 360 365
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
370 375 380
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

385 390 395 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

405 410 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

420 425 430

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

435 440 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

465 470

<210> 100

<211> 474

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Lytic peptide

<400> 100

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Glu

100 105 110

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
115 120 125

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn
130 135 140

Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
145 150 155 160

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
165 170 175

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
180 185 190

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
195 200 205

Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
210 215 220

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Val Gln Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290 295 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325 330 335

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn

355 360 365

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

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445
Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Ser Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys
450 455 460
Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys
465 470

<210> 101
<211> 467
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Naked antibody
<400> 101
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

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

65 70 75 80

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

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

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

260 265 270
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
275 280 285
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
290 295 300
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

370 375 380

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

385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

405 410 415

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

420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

450 455 460

Pro Gly Lys

465

<210> 102

<211> 507

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Conjugated antibody

<400> 102

Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser

35 40 45

Val Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

50 55 60

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

Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
85 90 95

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser
100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
130 135 140

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
145 150 155 160

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His
165 170 175

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Ala Ile
180 185 190

Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg
195 200 205

Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met
210 215 220

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Ser
225 230 235 240

Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
245 250 255

Leu Val Thr Val Ser Ser Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
260 265 270

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
275 280 285

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
290 295 300

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
305 310 315 320
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
325 330 335
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
340 345 350

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

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
420 425 430
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
435 440 445
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
450 455 460
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
465 470 475 480

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Ser Lys Ala Phe Lys Lys Ala Phe
485 490 495
Lys Ala Phe Lys Lys Ala Phe Lys Ala Phe Lys
500 505

<210> 103
<211> 487
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Conjugated antibody
<400> 103

Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser

35 40 45

Val Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser

100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His

165 170 175

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Ala Ile

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Ser

225 230 235 240

Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

245 250 255

Leu Val Thr Val Ser Ser Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

260 265 270

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

275 280 285

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

290 295 300

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp

305 310 315 320

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr

325 330 335

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

340 345 350

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

355 360 365

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

370 375 380

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

385 390 395 400

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

405 410 415

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

420 425 430

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

435 440 445

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser

450 455 460

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

465 470 475 480

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

485

<210> 104

<211> 487

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Conjugated antibody

<400> 104

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

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

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
130 135 140

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln
145 150 155 160

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Ala Ile Tyr Pro Gly Asn
165 170 175

Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
180 185 190

Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
195 200 205

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

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

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

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

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

450 455 460

Pro Gly Lys Gly Ser Lys Ala Phe Lys Lys Ala Phe Lys Ala Phe Lys

465 470 475 480

Lys Ala Phe Lys Ala Phe Lys

485

<210> 105

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Anti-CD20 light chain antibody

<400> 105

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 106

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Anti-CD20 light chain antibody

<400> 106

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

35 40 45
Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60
Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65 70 75 80
Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
85 90 95
Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 107

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Anti-CD20 heavy chain antibody

<400> 107

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

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

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ser Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 108

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Anti-CD20 hinge antibody

<400> 108

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

100 105 110

<210> 109

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Anti-CD20 heavy chain antibody

<400> 109

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

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

100 105 110
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
115 120 125
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
130 135 140
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
145 150 155 160
Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

165 170 175
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
180 185 190
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
195 200 205
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 110

<211> 765

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: ADC light chain target

<400> 110

atgaagttcg caaagttcgc caaaaagttc gcaaagttcg caaaaaagtt cgccaaaggg 60

tcagatattc agatgactca gagccccagc tccctgtccg catctgtggg cgaccgagtc 120

actatcacct gccgagcctc tagttcagtg agctacattc actggtatca gcagaagcct 180

gggaaagccc caaagctgct catctacgcc acaagcaacc tggcttccgg tgtgccttct 240

aggttcagtg ggtcaagaag cggtacagac tttacactga ctattagctc cctccagcca 300

gaggatttcg ccacttacta ttgccagcag tggacttcca atccccctac ctttggccag 360

ggaacaaaag tggaaatcaa ggggcagccc aaagctaacc ctaccgtcac actgttccca 420

ccctctagtg aggaactcca ggcaaataag gccactctgg tgtgtctcat ttccgacttt 480

taccccggag ctgtgaccgt cgcttggaag gcagatggct ctccagtgaa agcaggagtc 540

gagaccacaa aacccagtaa gcagtcaaac aataagtacg ccgcttcaag ctatctgagt 600

ctcacccctg aacagtggaa aagccatagg tcctattctt gccaggtcac tcacgaaggt 660

agcactgtgg aaaagactgt cgcaccaacc gaatgtagcg gctccaaggc tttcaagaag 720

gccttcaagg ccttcaagaa agcattcaag gcctttaaat gataa 765

<210> 111

<211> 1470

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: ADC heavy chain target

<400> 111

atgaagttcg ccaaatttgc taagaaattc gcaaagtttg ccaagaaatt cgctaaaggc 60

tccgaagtgc agctcgtcga aagcgggggg ggactcgtgc agccaggggg aagcctcaga 120

ctctcatgcg ccgcctcagg ttatactttc acaagctaca acatgcactg ggtcagacag 180

gcacctggga agggtctgga gtgggtggcc gctatctacc caggcaacgg agacacatct 240

tataatcaga agttcaaagg ccggtttact attagcgcag atacatccaa gaacactgcc 300

tacctgcaga tgaatagcct ccgggctgaa gacactgcag tgtactattg cagtcgctca 360

acctactatg gcggagactg gtatttcgat gtgtgggggc agggtactct ggtcaccgtg 420

agctccgcct ctaccaaggg gcccagtgtg tttccactgg ctccctgcag ccggtccacc 480

tctgagagta cagcagccct gggttgtctc gtgaaagatt acttccctga accagtcacc 540

gtgtcctgga actctggcgc tctgaccagc ggagtccaca catttcctgc agtgctccag 600

tctagtgggc tgtactccct ctcaagcgtg gtcacagtcc catcctctaa tttcggtact 660

cagacctata catgcaacgt ggaccataag ccctccaata ctaaggtcga taaaaccgtg 720

gagcgcaaat gctgtgtgga atgcccacct tgtccagcac caccagtcgc tgggcctagc 780

gtgttcctgt ttcctccaaa gccaaaagac actctcatga tctctcgaac tcccgaggtc 840

acctgtgtgg tcgtggacgt cagtcacgag gatcctgaag tccagtttaa ctggtacgtg 900

gatggagtcg aagtgcataa tgcaaagacc aaaccaaggg aggaacagtt caactcaacc 960

tttagagtcg tgagcgtgct gacagtcgtg catcaggact ggctcaacgg gaaggagtat 1020

aagtgcaaag tgtctaataa gggtctgccc gctcctatcg agaaaacaat tagcaagact 1080

aaaggacagc ctcgagaacc acaggtgtac acactgcccc ctagcaggga ggaaatgaca 1140

aagaaccagg tctccctgac ttgtctcgtg aaaggcttct atcccagtga cattgccgtg 1200

gagtgggaat caaatggaca gcctgagaac aattacaaga ccacaccacc catgctggac 1260

agtgatggct cattctttct gtattccaag ctcaccgtgg ataaatctag gtggcagcag 1320

ggaaatgtct tttcatgtag cgtgatgcac gaggctctcc ataaccatta cacccagaag 1380

tccctgtcac tctcccccgg caaaggctcc aaggctttca agaaggcctt caaggccttc 1440

aagaaagcat tcaaggcctt taaatgataa 1470

<210> 112

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: ADC light chain primer

<400> 112

gggggcgcgc cgatattcag atgactcaga gcc 33

<210> 113

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: ADC light chain primer

<400> 113

gggggcgcgc caagttcgca aagttcgcca a 31

<210> 114

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: ADC light chain primer

<400> 114

ggggaattct tatcagctac attcggttgg t 31

<210> 115

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: ADC light chain primer

<400> 115

ggggaattct tatcatttaa aggccttgaa tgct 34

<210> 116

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: ADC heavy chain primer

<400> 116

gggggcgcgc cgaagtgcag ctcgtcgaaa g 31

<210> 117

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: ADC heavy chain primer

<400> 117

gggggcgcgc caagttcgcc aaatttgcta aga 33

<210> 118

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: ADC heavy chain primer

<400> 118

ggggaattct tatcatttgc cggggga 27

<210> 119

<211> 212

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain naked antibody

<400> 119

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

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

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

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

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

Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn
115 120 125

Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val
130 135 140

Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu
145 150 155 160

Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser
165 170 175

Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser
180 185 190

Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro

195 200 205

Thr Glu Cys Ser

210

<210> 120

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain naked antibody

<400> 120

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val

225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser

290 295 300

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

325 330 335

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser

385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 121

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain naked antibody

<400> 121

Met Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys

1 5 10 15

Phe Ala Lys Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu

20 25 30

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser

35 40 45

Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr

100 105 110

Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly

115 120 125

Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu

130 135 140

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe

145 150 155 160

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val

165 170 175

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys

180 185 190

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser

195 200 205

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu

210 215 220

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

225 230

<210> 122

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain naked antibody

<400> 122

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val

225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser

290 295 300

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

325 330 335

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser

385 390 395 400

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

<210> 123
<211> 212
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain naked antibody

<400> 123
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45
Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

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

Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser

165 170 175

Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser

180 185 190

Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro

195 200 205

Thr Glu Cys Ser

210

<210> 124

<211> 468

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain naked antibody

<400> 124

Met Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr

35 40 45

Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Val Ala Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser

65 70 75 80

Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser

85 90 95

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val

180 185 190

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser

195 200 205

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr

210 215 220

Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val

225 230 235 240

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val

245 250 255

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

260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr

305 310 315 320

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn

325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro

340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val

370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

405 410 415

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr

420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

450 455 460

Ser Pro Gly Lys

465

<210> 125

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain naked antibody

<400> 125

Met Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys

1 5 10 15

Phe Ala Lys Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu

20 25 30

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser

35 40 45

Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr

100 105 110

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

Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
130 135 140

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val
165 170 175

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
180 185 190

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
195 200 205

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
210 215 220

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230

<210> 126

<211> 468

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain naked antibody

<400> 126

Met Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys
1 5 10 15

Phe Ala Lys Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr
35 40 45

Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Val Ala Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser
65 70 75 80

Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
85 90 95
Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr
115 120 125
Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
130 135 140
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
145 150 155 160
Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
165 170 175

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
180 185 190
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
195 200 205
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr
210 215 220
Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val
225 230 235 240

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

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
305 310 315 320
Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn

325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro

340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val

370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

405 410 415

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr

420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

450 455 460

Ser Pro Gly Lys

465

<210> 127

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain naked antibody

<400> 127

Met Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys

1 5 10 15

Phe Ala Lys Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu

20 25 30

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser

35 40 45

Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr

100 105 110

Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly

115 120 125

Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu

130 135 140

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe

145 150 155 160

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val

165 170 175

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys

180 185 190

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser

195 200 205

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu

210 215 220

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser Gly Ser Lys Ala Phe Lys Lys

225 230 235 240

Ala Phe Lys Ala Phe Lys Lys Ala Phe Lys Ala Phe Lys

245 250

<210> 128

<211> 468

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain naked antibody

<400> 128

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

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

115 120 125
Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
130 135 140
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
145 150 155 160
Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
165 170 175
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val

180 185 190
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
195 200 205
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr
210 215 220
Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val
225 230 235 240
Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val

245 250 255

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

260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr

305 310 315 320

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn

325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro

340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val

370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

405 410 415

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr

420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

450 455 460

Ser Pro Gly Lys

465

<210> 129

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Light chain naked antibody

<400> 129

Met Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys
1 5 10 15

Phe Ala Lys Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
20 25 30

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser
35 40 45

Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr
100 105 110

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

Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
130 135 140

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val
165 170 175

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
180 185 190

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
195 200 205

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
210 215 220

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser Gly Ser Lys Ala Phe Lys Lys
225 230 235 240
Ala Phe Lys Ala Phe Lys Lys Ala Phe Lys Ala Phe Lys
245 250

<210> 130
<211> 488
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Heavy chain naked antibody

<400> 130
Met Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Phe Ala Lys Lys
1 5 10 15
Phe Ala Lys Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30
Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr
35 40 45
Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

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

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
130 135 140
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
145 150 155 160
Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
165 170 175

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
180 185 190

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
195 200 205

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr
210 215 220

Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val
225 230 235 240

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
245 250 255

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
305 310 315 320

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn
325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro
340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
405 410 415

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr

420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

450 455 460

Ser Pro Gly Lys Gly Ser Lys Ala Phe Lys Lys Ala Phe Lys Ala Phe

465 470 475 480

Lys Lys Ala Phe Lys Ala Phe Lys

485

<210> 131

<211> 1255

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Target sequence

<400> 131

Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu

1 5 10 15

Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys

20 25 30

Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His

35 40 45

Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu

85 90 95

Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr

100 105 110

Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro

115 120 125

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

130 135 140

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

195 200 205

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

260 265 270

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

325 330 335

Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu
340 345 350
Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys
355 360 365
Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp

370 375 380

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

385 390 395 400

Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro

405 410 415

Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg

420 425 430

Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu

435 440 445

Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly

450 455 460

Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val

465 470 475 480

Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr

485 490 495

Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His

500 505 510

Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys

515 520 525

Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys

530 535 540

Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys

545 550 555 560

Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys

565 570 575

Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp

580 585 590

Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu

595 600 605

Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln

610 615 620

Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys
625 630 635 640
Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser

645 650 655
Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly
660 665 670
Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg
675 680 685
Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly
690 695 700
Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu

705 710 715 720
Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys
725 730 735
Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile
740 745 750
Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
755 760 765
Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg

770 775 780
Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu
785 790 795 800
Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg
805 810 815
Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly
820 825 830
Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala

835 840 845
Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe
850 855 860
Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp

865 870 875 880

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

885 890 895

Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val

900 905 910

Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala

915 920 925

Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro

930 935 940

Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met

945 950 955 960

Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe

965 970 975

Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu

980 985 990

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

995 1000 1005

Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr

1010 1015 1020

Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly

1025 1030 1035

Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg

1040 1045 1050

Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu

1055 1060 1065

Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser

1070 1075 1080

Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu

1085 1090 1095

Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser

1100 1105 1110

Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val

1115 1120 1125

Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro

1130 1135 1140

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

1145 1150 1155

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

1160 1165 1170

Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly

1175 1180 1185

Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly Ala

1190 1195 1200

Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp

1205 1210 1215

Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro

1220 1225 1230

Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr

1235 1240 1245

Leu Gly Leu Asp Val Pro Val

1250 1255

<210> 132

<211> 557

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Target sequence

<400> 132

Met Pro Pro Pro Arg Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Leu Thr Pro Met

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Ala Val Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln

35 40 45

Gln Leu Thr Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu
50 55 60

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

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

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

Gly Lys Tyr Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu
260 265 270
Glu Ile Thr Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly
275 280 285
Gly Trp Lys Val Ser Ala Val Thr Leu Ala Tyr Leu Ile Phe Cys Leu

290 295 300

Cys Ser Leu Val Gly Ile Leu His Leu Gln Arg Ala Leu Val Leu Arg

305 310 315 320

Arg Lys Arg Lys Arg Met Thr Asp Pro Thr Arg Arg Phe Phe Lys Val

325 330 335

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

340 345 350

Ser Leu Pro Thr Pro Thr Ser Gly Leu Gly Arg Ala Gln Arg Trp Ala

355 360 365

Ala Gly Leu Gly Gly Thr Ala Pro Ser Tyr Gly Asn Pro Ser Ser Asp

370 375 380

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

385 390 395 400

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Glu Gly Tyr Glu Glu Pro Asp Ser Glu Glu

405 410 415

Asp Ser Glu Phe Tyr Glu Asn Asp Ser Asn Leu Gly Gln Asp Gln Leu

420 425 430

Ser Gln Asp Gly Ser Gly Tyr Glu Asn Pro Glu Asp Glu Pro Leu Gly

435 440 445

Pro Glu Asp Glu Asp Ser Phe Ser Asn Ala Glu Ser Tyr Glu Asn Glu

450 455 460

Asp Glu Glu Leu Thr Gln Pro Val Ala Arg Thr Met Asp Phe Leu Ser

465 470 475 480

Pro His Gly Ser Ala Trp Asp Pro Ser Arg Glu Ala Thr Ser Leu Ala

485 490 495

Gly Ser Gln Ser Tyr Glu Asp Met Arg Gly Ile Leu Tyr Ala Ala Pro

500 505 510

Gln Leu Arg Ser Ile Arg Gly Gln Pro Gly Pro Asn His Glu Glu Asp

515 520 525

Ala Asp Ser Tyr Glu Asn Met Asp Asn Pro Asp Gly Pro Asp Pro Ala

530 535 540

Trp Gly Gly Gly Gly Arg Met Gly Thr Trp Ser Thr Arg
545 550 555

<210> 133

<211> 297

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Target sequence

<400

> 133

Met Thr Thr Pro Arg Asn Ser Val Asn Gly Thr Phe Pro Ala Glu Pro
1 5 10 15

Met Lys Gly Pro Ile Ala Met Gln Ser Gly Pro Lys Pro Leu Phe Arg
20 25 30

Arg Met Ser Ser Leu Val Gly Pro Thr Gln Ser Phe Phe Met Arg Glu
35 40 45

Ser Lys Thr Leu Gly Ala Val Gln Ile Met Asn Gly Leu Phe His Ile
50 55 60

Ala Leu Gly Gly Leu Leu Met Ile Pro Ala Gly Ile Tyr Ala Pro Ile
65 70 75 80

Cys Val Thr Val Trp Tyr Pro Leu Trp Gly Gly Ile Met Tyr Ile Ile
85 90 95

Ser Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Glu Lys Asn Ser Arg Lys Cys Leu
100 105 110

Val Lys Gly Lys Met Ile Met Asn Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala Ile
115 120 125

Ser Gly Met Ile Leu Ser Ile Met Asp Ile Leu Asn Ile Lys Ile Ser
130 135 140

His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro
145 150 155 160

Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn
165 170 175

Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr Ser Ile Gln Ser Leu Phe Leu Gly

180 185 190

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

Lys Asn Glu Glu Asp Ile Glu Ile Ile Pro Ile Gln Glu Glu Glu Glu
260 265 270
Glu Glu Thr Glu Thr Asn Phe Pro Glu Pro Pro Gln Asp Gln Glu Ser
275 280 285
Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser Ser Pro
290 295

<210> 134
<211> 759
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Target sequence
<400> 134
Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Leu Val Leu Glu Tyr Leu

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

65 70 75 80

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

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

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

260 265 270
Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser Leu Lys Lys
275 280 285
Gln Asn Thr Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr Lys Asp Gln Ser
290 295 300
Gly Lys Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val Gly Pro Gly Arg Ser
305 310 315 320
Glu Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Pro Pro Lys Lys Val Thr Thr

325 330 335

Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg Glu Gly Asp Thr Val Thr Leu

340 345 350

Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser Val Thr Arg Tyr Glu Trp

355 360 365

Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile

370 375 380

Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr Thr Ile Ala Cys Ala Ala Cys Asn

385 390 395 400

Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro Val Ala Leu Asn Val Gln Tyr Ala

405 410 415

Pro Arg Asp Val Arg Val Arg Lys Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His

420 425 430

Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro

435 440 445

Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys

450 455 460

Glu Ser Gln Leu Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser

465 470 475 480

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

485 490 495

Trp Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met

500 505 510

Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr Cys

515 520 525

Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Ser His Tyr Thr Trp Phe Asp Trp

530 535 540

Asn Asn Gln Ser Leu Pro Tyr His Ser Gln Lys Leu Arg Leu Glu Pro

545 550 555 560

Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys Gln Gly Thr Asn Ser

565 570 575

Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ser Thr Leu Thr Val Tyr Tyr Ser

580 585 590

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

595 600 605

Ala Ile Leu Ile Leu Ala Ile Cys Gly Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp

610 615 620

Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly Leu Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln

625 630 635 640

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

645 650 655

Gly Pro His Ser Leu Gly Cys Tyr Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile

660 665 670

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

675 680 685

Asp Ala Glu Ser Ser Glu Met Gln Arg Pro Pro Pro Asp Cys Asp Asp

690 695 700

Thr Val Thr Tyr Ser Ala Leu His Lys Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu

705 710 715 720

Asn Val Ile Pro Asp Phe Pro Glu Asp Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu

725 730 735

Leu Ile Gln Phe Gly Val Gly Glu Arg Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val

740 745 750

Asp Tyr Val Ile Leu Lys His

755

<210> 135

<211> 320

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Target sequence

<400> 135

Met Asn Pro Pro Ser Gln Glu Ile Glu Glu Leu Pro Arg Arg Arg Cys

1 5 10 15

Cys Arg Arg Gly Thr Gln Ile Val Leu Leu Gly Leu Val Thr Ala Ala

20 25 30

Leu Trp Ala Gly Leu Leu Thr Leu Leu Leu Leu Trp His Trp Asp Thr

35 40 45

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

50 55 60

Gln Val Ser Lys Asn Leu Glu Ser His His Gly Asp Gln Met Ala Gln

65 70 75 80

Lys Ser Gln Ser Thr Gln Ile Ser Gln Glu Leu Glu Glu Leu Arg Ala

85 90 95

Glu Gln Gln Arg Leu Lys Ser Gln Asp Leu Glu Leu Ser Trp Asn Leu

100 105 110

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

115 120 125

Glu Arg Asn Glu Ala Ser Asp Leu Leu Glu Arg Leu Arg Glu Glu Val

130 135 140

Thr Lys Leu Arg Met Glu Leu Gln Val Ser Ser Gly Phe Val Cys Asn

145 150 155 160

Thr Cys Pro Glu Lys Trp Ile Asn Phe Gln Arg Lys Cys Tyr Tyr Phe

165 170 175

Gly Lys Gly Thr Lys Gln Trp Val His Ala Arg Tyr Ala Cys Asp Asp

180 185 190

Met Glu Gly Gln Leu Val Ser Ile His Ser Pro Glu Glu Gln Asp Phe

195 200 205

Leu Thr Lys His Ala Ser His Thr Gly Ser Trp Ile Gly Leu Arg Asn

210 215 220

Leu Asp Leu Lys Gly Glu Phe Ile Trp Val Asp Gly Ser His Val Asp

225 230 235 240

Tyr Ser Asn Trp Ala Pro Gly Glu Pro Thr Ser Arg Ser Gln Gly Glu

245 250 255

Asp Cys Val Met Met Arg Gly Ser Gly Arg Trp Asn Asp Ala Phe Cys
260 265 270

Asp Arg Lys Leu Gly Ala Trp Val Cys Asp Arg Leu Ala Thr Cys Thr
275 280 285

Pro Pro Ala Ser Glu Gly Ser Ala Glu Ser Met Gly Pro Asp Ser Arg
290 295 300

Pro Asp Pro Asp Gly Arg Leu Pro Thr Pro Ser Ala Pro Leu His Ser
305 310 315 320

<210> 136
<211> 260
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Target sequence
<400> 136

Met Ala Arg Pro His Pro Trp Trp Leu Cys Val Leu Gly Thr Leu Val
1 5 10 15

Gly Leu Ser Ala Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr
20 25 30

Trp Ala Gln Gly Lys Leu Cys Cys Gln Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe
35 40 45

Leu Val Lys Asp Cys Asp Gln His Arg Lys Ala Ala Gln Cys Asp Pro
50 55 60

Cys Ile Pro Gly Val Ser Phe Ser Pro Asp His His Thr Arg Pro His
65 70 75 80

Cys Glu Ser Cys Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu Val Arg Asn Cys
85 90 95

Thr Ile Thr Ala Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn Gly Trp Gln Cys
100 105 110

Arg Asp Lys Glu Cys Thr Glu Cys Asp Pro Leu Pro Asn Pro Ser Leu
115 120 125

Thr Ala Arg Ser Ser Gln Ala Leu Ser Pro His Pro Gln Pro Thr His
130 135 140

Leu Pro Tyr Val Ser Glu Met Leu Glu Ala Arg Thr Ala Gly His Met
145 150 155 160
Gln Thr Leu Ala Asp Phe Arg Gln Leu Pro Ala Arg Thr Leu Ser Thr
165 170 175

His Trp Pro Pro Gln Arg Ser Leu Cys Ser Ser Asp Phe Ile Arg Ile
180 185 190
Leu Val Ile Phe Ser Gly Met Phe Leu Val Phe Thr Leu Ala Gly Ala
195 200 205
Leu Phe Leu His Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser
210 215 220
Pro Val Glu Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu
225 230 235 240

Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro
245 250 255
Ala Cys Ser Pro
260

<210> 137
<211> 220
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Target sequence
<400> 137
Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val
1 5 10 15
Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr

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

Lys Thr Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr

85 90 95

Phe Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys

100 105 110

Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser

115 120 125

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

130 135 140

Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly

145 150 155 160

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

165 170 175

Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met

180 185 190

Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro

195 200 205

Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

210 215 220

<210> 138

<211> 595

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Target sequence

<400> 138

Met Arg Val Leu Leu Ala Ala Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gly Ala Leu

1 5 10 15

Arg Ala Phe Pro Gln Asp Arg Pro Phe Glu Asp Thr Cys His Gly Asn

20 25 30

Pro Ser His Tyr Tyr Asp Lys Ala Val Arg Arg Cys Cys Tyr Arg Cys

35 40 45

Pro Met Gly Leu Phe Pro Thr Gln Gln Cys Pro Gln Arg Pro Thr Asp

50 55 60

Cys Arg Lys Gln Cys Glu Pro Asp Tyr Tyr Leu Asp Glu Ala Asp Arg

65 70 75 80

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

85 90 95

Pro Cys Ala Trp Asn Ser Ser Arg Val Cys Glu Cys Arg Pro Gly Met

100 105 110

Phe Cys Ser Thr Ser Ala Val Asn Ser Cys Ala Arg Cys Phe Phe His

115 120 125

Ser Val Cys Pro Ala Gly Met Ile Val Lys Phe Pro Gly Thr Ala Gln

130 135 140

Lys Asn Thr Val Cys Glu Pro Ala Ser Pro Gly Val Ser Pro Ala Cys

145 150 155 160

Ala Ser Pro Glu Asn Cys Lys Glu Pro Ser Ser Gly Thr Ile Pro Gln

165 170 175

Ala Lys Pro Thr Pro Val Ser Pro Ala Thr Ser Ser Ala Ser Thr Met

180 185 190

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

195 200 205

Thr Arg Ala Pro Asp Ser Pro Ser Ser Val Gly Arg Pro Ser Ser Asp

210 215 220

Pro Gly Leu Ser Pro Thr Gln Pro Cys Pro Glu Gly Ser Gly Asp Cys

225 230 235 240

Arg Lys Gln Cys Glu Pro Asp Tyr Tyr Leu Asp Glu Ala Gly Arg Cys

245 250 255

Thr Ala Cys Val Ser Cys Ser Arg Asp Asp Leu Val Glu Lys Thr Pro

260 265 270

Cys Ala Trp Asn Ser Ser Arg Thr Cys Glu Cys Arg Pro Gly Met Ile

275 280 285

Cys Ala Thr Ser Ala Thr Asn Ser Cys Ala Arg Cys Val Pro Tyr Pro

290 295 300

Ile Cys Ala Ala Glu Thr Val Thr Lys Pro Gln Asp Met Ala Glu Lys
305 310 315 320
Asp Thr Thr Phe Glu Ala Pro Pro Leu Gly Thr Gln Pro Asp Cys Asn
325 330 335
Pro Thr Pro Glu Asn Gly Glu Ala Pro Ala Ser Thr Ser Pro Thr Gln
340 345 350
Ser Leu Leu Val Asp Ser Gln Ala Ser Lys Thr Leu Pro Ile Pro Thr

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

420 425 430
Leu Glu Leu Val Asp Ser Arg Pro Arg Arg Ser Ser Thr Gln Leu Arg
435 440 445
Ser Gly Ala Ser Val Thr Glu Pro Val Ala Glu Glu Arg Gly Leu Met
450 455 460
Ser Gln Pro Leu Met Glu Thr Cys His Ser Val Gly Ala Ala Tyr Leu
465 470 475 480
Glu Ser Leu Pro Leu Gln Asp Ala Ser Pro Ala Gly Gly Pro Ser Ser

485 490 495
Pro Arg Asp Leu Pro Glu Pro Arg Val Ser Thr Glu His Thr Asn Asn
500 505 510
Lys Ile Glu Lys Ile Tyr Ile Met Lys Ala Asp Thr Val Ile Val Gly
515 520 525
Thr Val Lys Ala Glu Leu Pro Glu Gly Arg Gly Leu Ala Gly Pro Ala
530 535 540
Glu Pro Glu Leu Glu Glu Glu Leu Glu Ala Asp His Thr Pro His Tyr

545 550 555 560

Pro Glu Gln Glu Thr Glu Pro Pro Leu Gly Ser Cys Ser Asp Val Met

565 570 575

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

580 585 590

Ser Gly Lys

595

<210> 139

<211> 132

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Target sequence

<400> 139

Met Ser Gln Pro Leu Met Glu Thr Cys His Ser Val Gly Ala Ala Tyr

1 5 10 15

Leu Glu Ser Leu Pro Leu Gln Asp Ala Ser Pro Ala Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Pro Arg Asp Leu Pro Glu Pro Arg Val Ser Thr Glu His Thr Asn

35 40 45

Asn Lys Ile Glu Lys Ile Tyr Ile Met Lys Ala Asp Thr Val Ile Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Ala Glu Pro Glu Leu Glu Glu Glu Leu Glu Ala Asp His Thr Pro His

85 90 95

Tyr Pro Glu Gln Glu Thr Glu Pro Pro Leu Gly Ser Cys Ser Asp Val

100 105 110

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

115 120 125

Ala Ser Gly Lys

130

<210> 140

<211> 738

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Target sequence

<400> 140

Met Gln Pro Arg Trp Ala Gln Gly Ala Thr Met Trp Leu Gly Val Leu
1 5 10 15

Leu Thr Leu Leu Leu Cys Ser Ser Leu Glu Gly Gln Glu Asn Ser Phe
20 25 30

Thr Ile Asn Ser Val Asp Met Lys Ser Leu Pro Asp Trp Thr Val Gln
35 40 45

Asn Gly Lys Asn Leu Thr Leu Gln Cys Phe Ala Asp Val Ser Thr Thr
50 55 60

Ser His Val Lys Pro Gln His Gln Met Leu Phe Tyr Lys Asp Asp Val
65 70 75 80

Leu Phe Tyr Asn Ile Ser Ser Met Lys Ser Thr Glu Ser Tyr Phe Ile
85 90 95

Pro Glu Val Arg Ile Tyr Asp Ser Gly Thr Tyr Lys Cys Thr Val Ile
100 105 110

Val Asn Asn Lys Glu Lys Thr Thr Ala Glu Tyr Gln Leu Leu Val Glu
115 120 125

Gly Val Pro Ser Pro Arg Val Thr Leu Asp Lys Lys Glu Ala Ile Gln
130 135 140

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

Ile His Phe Thr Ile Glu Lys Leu Glu Leu Asn Glu Lys Met Val Lys
165 170 175

Leu Lys Arg Glu Lys Asn Ser Arg Asp Gln Asn Phe Val Ile Leu Glu
180 185 190

Phe Pro Val Glu Glu Gln Asp Arg Val Leu Ser Phe Arg Cys Gln Ala
195 200 205

Arg Ile Ile Ser Gly Ile His Met Gln Thr Ser Glu Ser Thr Lys Ser

210 215 220

Glu Leu Val Thr Val Thr Glu Ser Phe Ser Thr Pro Lys Phe His Ile
225 230 235 240

Ser Pro Thr Gly Met Ile Met Glu Gly Ala Gln Leu His Ile Lys Cys
245 250 255

Thr Ile Gln Val Thr His Leu Ala Gln Glu Phe Pro Glu Ile Ile Ile
260 265 270

Gln Lys Asp Lys Ala Ile Val Ala His Asn Arg His Gly Asn Lys Ala
275 280 285

Val Tyr Ser Val Met Ala Met Val Glu His Ser Gly Asn Tyr Thr Cys
290 295 300

Lys Val Glu Ser Ser Arg Ile Ser Lys Val Ser Ser Ile Val Val Asn
305 310 315 320

Ile Thr Glu Leu Phe Ser Lys Pro Glu Leu Glu Ser Ser Phe Thr His
325 330 335

Leu Asp Gln Gly Glu Arg Leu Asn Leu Ser Cys Ser Ile Pro Gly Ala
340 345 350

Pro Pro Ala Asn Phe Thr Ile Gln Lys Glu Asp Thr Ile Val Ser Gln
355 360 365

Thr Gln Asp Phe Thr Lys Ile Ala Ser Lys Ser Asp Ser Gly Thr Tyr
370 375 380

Ile Cys Thr Ala Gly Ile Asp Lys Val Val Lys Lys Ser Asn Thr Val
385 390 395 400

Gln Ile Val Val Cys Glu Met Leu Ser Gln Pro Arg Ile Ser Tyr Asp
405 410 415

Ala Gln Phe Glu Val Ile Lys Gly Gln Thr Ile Glu Val Arg Cys Glu
420 425 430

Ser Ile Ser Gly Thr Leu Pro Ile Ser Tyr Gln Leu Leu Lys Thr Ser
435 440 445

Lys Val Leu Glu Asn Ser Thr Lys Asn Ser Asn Asp Pro Ala Val Phe
450 455 460

Lys Asp Asn Pro Thr Glu Asp Val Glu Tyr Gln Cys Val Ala Asp Asn
465 470 475 480
Cys His Ser His Ala Lys Met Leu Ser Glu Val Leu Arg Val Lys Val
485 490 495

Ile Ala Pro Val Asp Glu Val Gln Ile Ser Ile Leu Ser Ser Lys Val
500 505 510
Val Glu Ser Gly Glu Asp Ile Val Leu Gln Cys Ala Val Asn Glu Gly
515 520 525
Ser Gly Pro Ile Thr Tyr Lys Phe Tyr Arg Glu Lys Glu Gly Lys Pro
530 535 540
Phe Tyr Gln Met Thr Ser Asn Ala Thr Gln Ala Phe Trp Thr Lys Gln
545 550 555 560

Lys Ala Ser Lys Glu Gln Glu Gly Glu Tyr Tyr Cys Thr Ala Phe Asn
565 570 575
Arg Ala Asn His Ala Ser Ser Val Pro Arg Ser Lys Ile Leu Thr Val
580 585 590
Arg Val Ile Leu Ala Pro Trp Lys Lys Gly Leu Ile Ala Val Val Ile
595 600 605
Ile Gly Val Ile Ile Ala Leu Leu Ile Ile Ala Ala Lys Cys Tyr Phe
610 615 620

Leu Arg Lys Ala Lys Ala Lys Gln Met Pro Val Glu Met Ser Arg Pro
625 630 635 640
Ala Val Pro Leu Leu Asn Ser Asn Asn Glu Lys Met Ser Asp Pro Asn
645 650 655
Met Glu Ala Asn Ser His Tyr Gly His Asn Asp Asp Val Arg Asn His
660 665 670
Ala Met Lys Pro Ile Asn Asp Asn Lys Glu Pro Leu Asn Ser Asp Val
675 680 685

Gln Tyr Thr Glu Val Gln Val Ser Ser Ala Glu Ser His Lys Asp Leu
690 695 700
Gly Lys Lys Asp Thr Glu Thr Val Tyr Ser Glu Val Arg Lys Ala Val

705 710 715 720

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

725 730 735

Gly Thr

<210> 141

<211> 364

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Target sequence

<400> 141

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala

1 5 10 15

Met Asp Pro Asn Phe Trp Leu Gln Val Gln Glu Ser Val Thr Val Gln

20 25 30

Glu Gly Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Thr Phe Phe His Pro Ile Pro

35 40 45

Tyr Tyr Asp Lys Asn Ser Pro Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Glu Gly

50 55 60

Ala Ile Ile Ser Arg Asp Ser Pro Val Ala Thr Asn Lys Leu Asp Gln

65 70 75 80

Glu Val Gln Glu Glu Thr Gln Gly Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asp Pro

85 90 95

Ser Arg Asn Asn Cys Ser Leu Ser Ile Val Asp Ala Arg Arg Arg Asp

100 105 110

Asn Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Met Glu Arg Gly Ser Thr Lys Tyr Ser

115 120 125

Tyr Lys Ser Pro Gln Leu Ser Val His Val Thr Asp Leu Thr His Arg

130 135 140

Pro Lys Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Pro Gly His Ser Lys Asn

145 150 155 160

Leu Thr Cys Ser Val Ser Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro Ile

165 170 175

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

180 185 190

His Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly Thr

195 200 205

Asn Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Ala Gly Ala Gly Val Thr Thr Glu

210 215 220

Arg Thr Ile Gln Leu Asn Val Thr Tyr Val Pro Gln Asn Pro Thr Thr

225 230 235 240

Gly Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Gly Lys Gln Glu Thr Arg Ala Gly

245 250 255

Val Val His Gly Ala Ile Gly Gly Ala Gly Val Thr Ala Leu Leu Ala

260 265 270

Leu Cys Leu Cys Leu Ile Phe Phe Ile Val Lys Thr His Arg Arg Lys

275 280 285

Ala Ala Arg Thr Ala Val Gly Arg Asn Asp Thr His Pro Thr Thr Gly

290 295 300

Ser Ala Ser Pro Lys His Gln Lys Lys Ser Lys Leu His Gly Pro Thr

305 310 315 320

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

325 330 335

Glu Leu His Tyr Ala Ser Leu Asn Phe His Gly Met Asn Pro Ser Lys

340 345 350

Asp Thr Ser Thr Glu Tyr Ser Glu Val Arg Thr Gln

355 360

<210> 142

<211> 385

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Target sequence

<400> 142

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

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

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

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

245 250 255

Leu Gln Leu Met Lys Lys His Gln Ser Asp Leu Lys Lys Leu Gly Ile
260 265 270
Leu Asp Phe Thr Glu Gln Asp Val Ala Ser His Gln Ser Tyr Ser Gln
275 280 285
Lys Thr Leu Ile Ala Leu Val Thr Ser Gly Ala Leu Leu Ala Val Leu
290 295 300
Gly Ile Thr Gly Tyr Phe Leu Met Asn Arg Arg Ser Trp Ser Pro Thr
305 310 315 320

Gly Glu Arg Leu Gly Glu Asp Pro Tyr Tyr Thr Glu Asn Gly Gly Gly
325 330 335
Gln Gly Tyr Ser Ser Gly Pro Gly Thr Ser Pro Glu Ala Gln Gly Lys
340 345 350
Ala Ser Val Asn Arg Gly Ala Gln Glu Asn Gly Thr Gly Gln Ala Thr
355 360 365
Ser Arg Asn Gly His Ser Ala Arg Gln His Val Val Ala Asp Thr Glu
370 375 380

Leu
385

<210> 143
<211> 277
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Target sequence
<400> 143
Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
1 5 10 15
Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu
20 25 30
Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val
35 40 45

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

Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly
115 120 125
Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu
130 135 140
Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys
145 150 155 160
Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln
165 170 175

Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu
180 185 190
Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile
195 200 205
Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn
210 215 220
Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp
225 230 235 240

Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His
245 250 255
Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser
260 265 270
Val Gln Glu Arg Gln
275
<210> 144
<211> 61

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Target sequence

<400> 144

Met Lys Arg Phe Leu Phe Leu Leu Leu Thr Ile Ser Leu Leu Val Met

1 5 10 15

Val Gln Ile Gln Thr Gly Leu Ser Gly Gln Asn Asp Thr Ser Gln Thr

20 25 30

Ser Ser Pro Ser Ala Ser Ser Asn Ile Ser Gly Gly Ile Phe Leu Phe

35 40 45

Phe Val Ala Asn Ala Ile Ile His Leu Phe Cys Phe Ser

50 55 60

<210> 145

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Description of Artificial Sequence: Target sequence

<400> 145

Met Lys Arg Phe Leu Phe Leu Leu Leu Thr Ile Ser Leu Leu Val Met

1 5 10 15

Val Gln

<210> 146

<211> 858

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Target sequence

<400> 146

Met Leu Gln Thr Lys Asp Leu Ile Trp Thr Leu Phe Phe Leu Gly Thr

1 5 10 15

Ala Val Ser Leu Gln Val Asp Ile Val Pro Ser Gln Gly Glu Ile Ser

20 25 30

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

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

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

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

275 280 285

Ala Glu Asn Lys Ala Gly Glu Gln Asp Ala Thr Ile His Leu Lys Val

290 295 300

Phe Ala Lys Pro Lys Ile Thr Tyr Val Glu Asn Gln Thr Ala Met Glu

305 310 315 320

Leu Glu Glu Gln Val Thr Leu Thr Cys Glu Ala Ser Gly Asp Pro Ile

325 330 335

Pro Ser Ile Thr Trp Arg Thr Ser Thr Arg Asn Ile Ser Ser Glu Glu

340 345 350

Lys Ala Ser Trp Thr Arg Pro Glu Lys Gln Glu Thr Leu Asp Gly His

355 360 365

Met Val Val Arg Ser His Ala Arg Val Ser Ser Leu Thr Leu Lys Ser

370 375 380

Ile Gln Tyr Thr Asp Ala Gly Glu Tyr Ile Cys Thr Ala Ser Asn Thr

385 390 395 400

Ile Gly Gln Asp Ser Gln Ser Met Tyr Leu Glu Val Gln Tyr Ala Pro

405 410 415

Lys Leu Gln Gly Pro Val Ala Val Tyr Thr Trp Glu Gly Asn Gln Val

420 425 430

Asn Ile Thr Cys Glu Val Phe Ala Tyr Pro Ser Ala Thr Ile Ser Trp

435 440 445

Phe Arg Asp Gly Gln Leu Leu Pro Ser Ser Asn Tyr Ser Asn Ile Lys

450 455 460

Ile Tyr Asn Thr Pro Ser Ala Ser Tyr Leu Glu Val Thr Pro Asp Ser

465 470 475 480

Glu Asn Asp Phe Gly Asn Tyr Asn Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile Gly

485 490 495

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

500 505 510

Pro Ser Ile Asp Gln Val Glu Pro Tyr Ser Ser Thr Ala Gln Val Gln

515 520 525

Phe Asp Glu Pro Glu Ala Thr Gly Gly Val Pro Ile Leu Lys Tyr Lys

530 535 540

Ala Glu Trp Arg Ala Val Gly Glu Glu Val Trp His Ser Lys Trp Tyr
545 550 555 560
Asp Ala Lys Glu Ala Ser Met Glu Gly Ile Val Thr Ile Val Gly Leu
565 570 575
Lys Pro Glu Thr Thr Tyr Ala Val Arg Leu Ala Ala Leu Asn Gly Lys
580 585 590
Gly Leu Gly Glu Ile Ser Ala Ala Ser Glu Phe Lys Thr Gln Pro Val

595 600 605

Gln Gly Glu Pro Ser Ala Pro Lys Leu Glu Gly Gln Met Gly Glu Asp
610 615 620
Gly Asn Ser Ile Lys Val Asn Leu Ile Lys Gln Asp Asp Gly Gly Ser
625 630 635 640
Pro Ile Arg His Tyr Leu Val Arg Tyr Arg Ala Leu Ser Ser Glu Trp
645 650 655
Lys Pro Glu Ile Arg Leu Pro Ser Gly Ser Asp His Val Met Leu Lys

660 665 670

Ser Leu Asp Trp Asn Ala Glu Tyr Glu Val Tyr Val Val Ala Glu Asn
675 680 685
Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala Ala His Phe Val Phe Arg Thr Ser Ala
690 695 700
Gln Pro Thr Ala Ile Pro Ala Asn Gly Ser Pro Thr Ser Gly Leu Ser
705 710 715 720
Thr Gly Ala Ile Val Gly Ile Leu Ile Val Ile Phe Val Leu Leu Leu

725 730 735

Val Val Val Asp Ile Thr Cys Tyr Phe Leu Asn Lys Cys Gly Leu Phe
740 745 750
Met Cys Ile Ala Val Asn Leu Cys Gly Lys Ala Gly Pro Gly Ala Lys
755 760 765
Gly Lys Asp Met Glu Glu Gly Lys Ala Ala Phe Ser Lys Asp Glu Ser

770 775 780

Lys Glu Pro Ile Val Glu Val Arg Thr Glu Glu Glu Arg Thr Pro Asn

785 790 795 800

His Asp Gly Gly Lys His Thr Glu Pro Asn Glu Thr Thr Pro Leu Thr

805 810 815

Glu Pro Glu Lys Gly Pro Val Glu Ala Lys Pro Glu Cys Gln Glu Thr

820 825 830

Glu Thr Lys Pro Ala Pro Ala Glu Val Lys Thr Val Pro Asn Asp Ala

835 840 845

Thr Gln Thr Lys Glu Asn Glu Ser Lys Ala

850 855

<210> 147

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Target sequence

<400> 147

Met Pro Glu Glu Gly Ser Gly Cys Ser Val Arg Arg Arg Pro Tyr Gly

1 5 10 15

Cys Val Leu Arg Ala Ala Leu Val Pro Leu Val Ala Gly Leu Val Ile

20 25 30

Cys Leu Val Val Cys Ile Gln Arg Phe Ala Gln Ala Gln Gln Gln Leu

35 40 45

Pro Leu Glu Ser Leu Gly Trp Asp Val Ala Glu Leu Gln Leu Asn His

50 55 60

Thr Gly Pro Gln Gln Asp Pro Arg Leu Tyr Trp Gln Gly Gly Pro Ala

65 70 75 80

Leu Gly Arg Ser Phe Leu His Gly Pro Glu Leu Asp Lys Gly Gln Leu

85 90 95

Arg Ile His Arg Asp Gly Ile Tyr Met Val His Ile Gln Val Thr Leu

100 105 110

Ala Ile Cys Ser Ser Thr Thr Ala Ser Arg His His Pro Thr Thr Leu
115 120 125
Ala Val Gly Ile Cys Ser Pro Ala Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg
130 135 140
Leu Ser Phe His Gln Gly Cys Thr Ile Ala Ser Gln Arg Leu Thr Pro
145 150 155 160
Leu Ala Arg Gly Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu
165 170 175

Pro Ser Arg Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg
180 185 190
Pro

<210> 148
<211> 378
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Target sequence
<400> 148
Met Val Leu Leu Trp Leu Thr Leu Leu Leu Ile Ala Leu Pro Cys Leu
1 5 10 15
Leu Gln Thr Lys Glu Asp Pro Asn Pro Pro Ile Thr Asn Leu Arg Met
20 25 30

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

Pro Glu Asn Ser Gly Lys Pro Trp Ala Gly Ala Glu Asn Leu Thr Cys
100 105 110

Trp Ile His Asp Val Asp Phe Leu Ser Cys Ser Trp Ala Val Gly Pro
115 120 125
Gly Ala Pro Ala Asp Val Gln Tyr Asp Leu Tyr Leu Asn Val Ala Asn
130 135 140
Arg Arg Gln Gln Tyr Glu Cys Leu His Tyr Lys Thr Asp Ala Gln Gly
145 150 155 160

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

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

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

Lys Leu Val Val Trp Glu Ala Gly Lys Ala Gly Leu Glu Glu Cys Leu

355 360 365

Val Thr Glu Val Gln Val Val Gln Lys Thr

370 375

<210> 149

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Target sequence

<400> 149

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu

20 25 30

Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg

35 40 45

Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val

50 55 60

Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser

65 70 75 80

Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys

85 90 95

Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu

100 105 110

Met Gln Lys Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser

115 120 125

Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg

130 135 140

Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg

145 150 155 160

Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Cys Leu Lys Ser

165 170 175

Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His Ser

180 185 190

Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val Phe

195 200 205

Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro Ser

210 215 220

Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu

225 230 235 240

<210> 150

<211> 320

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Target sequence

<400> 150

Met Arg Arg Ala Ala Leu Trp Leu Trp Leu Cys Ala Leu Ala Leu Ser

1 5 10 15

Leu Gln Pro Ala Leu Pro Gln Ile Val Ala Thr Asn Leu Pro Pro Glu

20 25 30

Asp Gln Asp Gly Ser Gly Asp Asp Ser Asp Asn Phe Ser Gly Ser Gly

35 40 45

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

50 55 60

Trp Lys Asp Thr Gln Leu Leu Thr Ala Ile Pro Thr Ser Pro Glu Pro

65 70 75 80

Thr Gly Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ser Thr Ser Thr Leu Pro Ala Gly

85 90 95

Glu Gly Pro Lys Glu Gly Glu Ala Val Val Leu Pro Glu Val Glu Pro

100 105 110

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

115 120 125

Thr Gln Leu Pro Thr Thr His Leu Ala Ser Thr Thr Thr Ala Thr Thr

130 135 140

Ala Gln Glu Pro Ala Thr Ser His Pro His Arg Asp Met Gln Pro Gly

145 150 155 160

His His Glu Thr Ser Thr Pro Ala Gly Pro Ser Gln Ala Asp Leu His

165 170 175

Thr Pro His Thr Glu Asp Gly Gly Pro Ser Ala Thr Glu Arg Ala Ala

180 185 190

Glu Asp Gly Ala Ser Ser Gln Leu Pro Ala Ala Glu Gly Ser Gly Glu

195 200 205

Gln Asp Phe Thr Phe Glu Thr Ser Gly Glu Asn Thr Ala Val Val Ala

210 215 220

Val Glu Pro Asp Arg Arg Asn Gln Ser Pro Val Asp Gln Gly Ala Thr

225 230 235 240

Gly Ala Ser Gln Gly Leu Leu Asp Arg Lys Glu Val Leu Gly Gly Val

245 250 255

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

260 265 270

Phe Met Leu Tyr Arg Met Lys Lys Lys Asp Glu Gly Ser Tyr Ser Leu

275 280 285

Glu Glu Pro Lys Gln Ala Asn Gly Gly Ala Tyr Gln Lys Pro Thr Lys

290 295 300

Gln Glu Glu Phe Tyr Ala Lys Pro Thr Lys Gln Glu Glu Phe Tyr Ala

305 310 315 320

<210> 151

<211> 420

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Target sequence

<400> 151

Met Pro Gly Gly Cys Ser Arg Gly Pro Ala Ala Gly Asp Gly Arg Leu

1 5 10 15

Arg Leu Ala Arg Leu Ala Leu Val Leu Leu Gly Trp Val Ser Ser Ser

20 25 30

Ser Pro Thr Ser Ser Ala Ser Ser Phe Ser Ser Ser Ala Pro Phe Leu

35 40 45

Ala Ser Ala Val Ser Ala Gln Pro Pro Leu Pro Asp Gln Cys Pro Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Asn Leu Thr Glu Val Pro Thr Asp Leu Pro Ala Tyr Val Arg Asn Leu

85 90 95

Phe Leu Thr Gly Asn Gln Leu Ala Val Leu Pro Ala Gly Ala Phe Ala

100 105 110

Arg Arg Pro Pro Leu Ala Glu Leu Ala Ala Leu Asn Leu Ser Gly Ser

115 120 125

Arg Leu Asp Glu Val Arg Ala Gly Ala Phe Glu His Leu Pro Ser Leu

130 135 140

Arg Gln Leu Asp Leu Ser His Asn Pro Leu Ala Asp Leu Ser Pro Phe

145 150 155 160

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

165 170 175

Glu Leu Ile Leu Asn His Ile Val Pro Pro Glu Asp Glu Arg Gln Asn

180 185 190

Arg Ser Phe Glu Gly Met Val Val Ala Ala Leu Leu Ala Gly Arg Ala

195 200 205

Leu Gln Gly Leu Arg Arg Leu Glu Leu Ala Ser Asn His Phe Leu Tyr

210 215 220

Leu Pro Arg Asp Val Leu Ala Gln Leu Pro Ser Leu Arg His Leu Asp

225 230 235 240

Leu Ser Asn Asn Ser Leu Val Ser Leu Thr Tyr Val Ser Phe Arg Asn

245 250 255

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

260 265 270

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

325 330 335
Leu Asn Ser Ala Asp Leu Asp Cys Asp Pro Ile Leu Pro Pro Ser Leu
340 345 350
Gln Thr Ser Tyr Val Phe Leu Gly Ile Val Leu Ala Leu Ile Gly Ala
355 360 365
Ile Phe Leu Leu Val Leu Tyr Leu Asn Arg Lys Gly Ile Lys Lys Trp
370 375 380
Met His Asn Ile Arg Asp Ala Cys Arg Asp His Met Glu Gly Tyr His

385 390 395 400
Tyr Arg Tyr Glu Ile Asn Ala Asp Pro Arg Leu Thr Asn Leu Ser Ser
405 410 415
Asn Ser Asp Val
420

<210> 152
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Signal peptide
<400> 152
Asp Ala Ala Gln Pro Ala
1 5