(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0167773
(43) 공개일자 2022년12월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/00 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/00 (2013.01)
C07K 16/2818 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0070880
(22) 출원일자 2022년06월10일
심사청구일자 2022년06월10일
(30) 우선권주장
1020210076561 2021년06월14일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
재단법인 오송첨단의료산업진흥재단
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명로 123
(72) 발명자
정상택
서울특별시 강남구 선릉로69길 20, 112동 6층 702호(역삼동, 역삼 e-편한세상)
고상환
서울특별시 성북구 솔샘로16길 11, 302호(정릉동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인충현

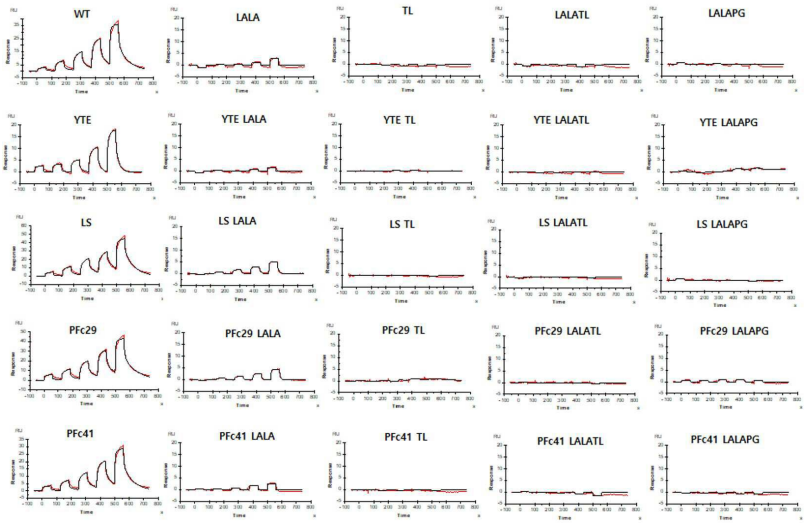
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 **제어된 면역 작용 기작과 증가된 혈중 반감기를 갖는 Fc변이체들**

(57) 요 약

본 발명은 항체 Fc 도메인의 아미노산 서열 중 일부가 다른 아미노산 서열로 치환된 Fc 변이체를 포함하는 폴리펩타이드 또는 이를 포함하는 항체에 관한 것이다. 본 발명의 Fc 변이체는 광범위한 항체 및 Fc 융합체 산물에 있어서의 용도를 가질 수 있다. 일면에 있어서, 본 발명의 항체 또는 Fc 융합체는 치료용, 진단용, 또는 연구용 시약(reagent), 바람직하게는 치료용 의약으로 사용될 수 있다. 본 발명의 Fc 변이체는 일부 아미노산 서열의 최적화를 통하여 체 내 반감기를 극대화하면서도, 감소되거나 침묵화된 효과기 기능을 나타낼 수 있다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
C07K 16/2887 (2013.01)
C07K 2317/72 (2013.01)
C07K 2317/732 (2013.01)
C07K 2317/734 (2013.01)
C07K 2317/94 (2013.01)

(72) 발명자
최소영
세종특별자치시 누리로 27, 614동 1001호(한솔동, 첫마을6단지)
손명호
세종특별자치시 보듬2로 42, 1412동 1402호(도담동, 도램마을14단지)
박소라
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명로 200, 예스오피스텔동 1106호
김은성
세종특별자치시 보듬2로 43, 1502동 702호(도담동, 도램마을15단지)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465029663
과제번호	HI19C0763010019
부처명	다부처
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	첨단의료복합단지미래의료산업원스톱지원(과기정통부,산업부,복지부)(R&D)
연구과제명	바이오BT기반 의료제품 공동연구개발지원
기 여 율	1/1
과제수행기관명	오송첨단의료산업진흥재단 및 고려대학교 산학협력단
연구기간	2019.04.01 ~ 2022.06.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

항체 Fc 변이체를 포함하는 폴리펩타이드로서, 상기 Fc 변이체는 야생형(wild type) 항체 Fc 도메인에서 카밧 EU 넘버링 시스템(Kabat EU numbering system)에 따른 S228, L234, L235, T299 및 P329로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 위치에서 아미노산 치환을 포함하며, 야생형 항체 Fc 도메인과 비교하여 FcɣRIIIa에 대한 결합력이 감소된 것을 특징으로 하는, 폴리펩타이드.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 Fc 변이체는 야생형 항체 Fc 도메인과 비교하여 ADCC (Antibody-Dependent Cellular Mediated Cytotoxicity)가 감소된 것을 특징으로 하는, 폴리펩타이드.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 Fc 변이체는 야생형 항체 Fc 도메인과 비교하여 CDC (Complement-Dependent Cytotoxicity)가 감소된 것을 특징으로 하는, 폴리펩타이드.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 Fc 변이체는 야생형 항체 Fc 도메인에서 카밧 EU 넘버링 시스템에 따른 S228P, L234A, L235A, L235E, T299L 및 P329G로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 아미노산 치환을 포함하는 것을 특징으로 하는, 폴리펩타이드.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 Fc 변이체는 야생형 항체 Fc 도메인에서 카밧 EU 넘버링 시스템에 따른 하기의 아미노산 치환을 포함하는 것을 특징으로 하는, 폴리펩타이드:

(i) L234A 및 L235A;

(ii) L234A, L235A 및 P329G;

(iii) T299L;

(iv) L234A, L235A 및 T299L;

(v) S228P 및 L235E;

(vi) S228P, L235E 및 T299L; 또는

(v) S228P 및 T299L.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 Fc 변이체는 야생형 항체 Fc 도메인에서 카밧 EU 넘버링 시스템에 따른 M252, S254, T256, L309, Q311, M428 및 N434로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 위치에서 아미노산 치환을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 폴리펩타이드.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 추가적인 아미노산 치환은 M252Y, S254T, T256E, L309G, Q311R, M428L 및 N434S로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 폴리펩타이드.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 추가적인 아미노산 치환은 하기의 아미노산 치환을 포함하는 것을 특징으로 하는, 폴리펩타이드:

(i) M252Y, S254T 및 T256E;

(ii) M428L 및 N434S;

(iii) Q311R 및 M428L; 또는

(iv) L309G 및 M428L.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 Fc 변이체는 야생형 항체 Fc 도메인과 비교하여 반감기(Half-life)가 증가된 것을 특징으로 하는, 폴리펩타이드.

청구항 10

제 1 항에 있어서, 상기 항체는 IgG 항체인 것을 특징으로 하는 폴리펩타이드.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 IgG 항체는 IgG1 또는 IgG4 항체인 것을 특징으로 하는 폴리펩타이드.

청구항 12

제 1 항의 폴리펩타이드를 포함하는 항체.

청구항 13

제 12 항에 있어서 상기 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 미니바디(minibody), 도메인 항체, 이중특이적 항체, 항체 모방체, 키메라 항체, 항체 접합체(conjugate), 인간항체 또는 인간화 항체이거나 이의 단편인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 14

제 1 항의 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산분자.

청구항 15

제 14 항의 핵산분자를 포함하는 벡터.

청구항 16

제 15 항의 벡터를 포함하는 숙주세포.

청구항 17

제 1 항의 폴리펩타이드, 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자를 포함하는 벡터를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 18

제 17 항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 약물을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는, 약제학적 조성물.

청구항 19

제 18 항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 Fc 도메인의 이펙터 기능(effector function) 감소용인 것을 특징으로 하는, 약제학적 조성물.

청구항 20

제 19 항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 반감기 증가용인 것을 특징으로 하는, 약제학적 조성물.

청구항 21

하기의 단계를 포함하는 야생형 Fc 도메인과 비교하여 이펙터 기능(effector function)이 감소된 Fc 변이체를 포함하는 폴리펩타이드의 제조방법:

a) 제 1 항의 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 단계; 및

b) 상기 숙주세포에 의해 발현된 폴리펩타이드를 회수하는 단계.

청구항 22

하기의 단계를 포함하는 야생형과 비교하여 이펙터 기능(effector function)이 감소된 항체의 제조방법:

a) 제 1 항의 폴리펩타이드를 포함하는 항체를 발현하는 숙주세포를 배양하는 단계; 및

b) 상기 숙주세포로부터 발현된 항체를 정제하는 단계.

청구항 23

제 1 항의 폴리펩타이드, 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자를 포함하는 벡터를 포함하는 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상(subject)에게 투여하는 단계를 포함하는, 이펙터 기능(effector function)이 감소된 Fc 변이체의 전달방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 이펙터 기능이 감소 또는 침묵화 및/또는 혈중 반감기가 연장된 Fc 변이체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 다양한 질환의 치료를 위해 치료적 항체가 개발되고 있으며, 이들 중 일부 치료적 항체의 효능은 부분적으로 하나 이상의 이펙터 기능을 매개하는 항체의 Fc 영역으로부터 비롯된다. 이들 이펙터 기능은 항체-의존적 세포-매개 세포독성(ADCC) 및 보체 의존적 세포독성(CDC)을 포함하는 다양한 반응을 자극하기 위한 면역계 세포와 항체 및 항체-항원 복합체의 상호작용으로부터 비롯된다(Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234(1997)).

[0004] 그러나 특정 질환의 치료에 있어서, 상기 Fc 영역에 의해 매개된 이펙터 기능은 바람직하지 않은 역효과를 유발할 수 있고, 따라서 감소되거나 침묵화된 이펙터 기능을 갖는 항체의 개발이 요구된다.

[0006]

[0007] 상기한 배경기술로서 설명된 사항들은 본 발명의 배경에 대한 이해 증진을 위한 것일 뿐, 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 이미 알려진 종래기술에 해당함을 인정하는 것으로 받아들여져서는 안 될 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 항체-의존적 세포-매개 세포독성(ADCC) 및/또는 보체 의존적 세포독성(CDC)과 같은 Fc 영역의 이펙터 기능이 감소되거나 침묵화되면서도, 반감기 연장의 효과를 갖는 신규한 Fc 변이체를 발굴하고자 예의 노력을 하였다. 그 결과, 야생형 Fc 도메인의 일부 아미노산 서열을 다른 아미노산 서열로 치환하여 최적화함으로써, 단백질 또는 항체 치료제의 활성에는 거의 영향을 주지 않으면서 이펙터 기능을 감소시키거나 침묵화 시킬 수 있는 방법을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0011] 따라서, 본 발명의 목적은 항체 Fc 변이체를 포함하는 폴리펩타이드로서, 상기 Fc 변이체는 야생형(wild type) 항체 Fc 도메인과 비교하여 FcγRIIIa에 대한 결합력이 감소된 것을 특징으로 하는, 폴리펩타이드를 제공하는데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 폴리펩타이드를 포함하는 항체를 제공하는데 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산분자를 제공하는데 있다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 핵산분자를 포함하는 벡터를 제공하는데 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 벡터를 포함하는 숙주세포를 제공하는데 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 야생형 Fc 도메인과 비교하여 이펙터 기능(effector function)이 감소된 Fc 변이체를 포함하는 폴리펩타이드의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 야생형과 비교하여 이펙터 기능(effector function)이 감소된 항체의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0018] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자를 포함하는 벡터를 포함하는 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상(subject)에게 투여하는 단계를 포함하는, 이펙터 기능(effector function)이 감소된 Fc 변이체의 전달방법을 제공하는데 있다.

[0020] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0022] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 항체 Fc 변이체를 포함하는 폴리펩타이드로서, 상기 Fc 변이체는 야생형(wild type) 항체 Fc 도메인과 비교하여 FcɣRIIIa에 대한 결합력이 감소된 것을 특징으로 하는, 폴리펩타이드를 제공한다.

[0024] 본 발명자들은 기존의 항체 또는 Fc 영역이 갖고 있는 항체-의존적 세포-매개 세포독성(ADCC) 및/또는 보체 의존적 세포독성(CDC)과 같은 이펙터 기능을 감소시키거나 침묵화하면서도, 반감기 연장의 효과를 갖는 신규한 Fc 변이체를 발굴하였다.

[0026] 항체는 특정 항원에 특이적으로 결합을 나타내는 단백질로, 천연 항체는 통상 2개의 동일한 경쇄(L) 및 2개의 동일한 중쇄(H)로 구성된, 약 150,000 달톤의 헤테로다이머 당단백질이다.

[0027] 본 발명에서 사용되는 인간 항체는 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM의 5개의 주요 클래스가 있으며, 바람직하게는 IgG이다. 항체의 파파인 분해는 2개의 Fab 단편과 1개의 Fc 단편을 형성하며, 인간 IgG 분자에서, Fc 영역은 Cys 226의 N-말단을 파파인 분해함으로써 생성된다(Deisenhofer, *Biochemistry* 20: 2361-2370, 1981).

[0028] 본 명세서에서 용어 "Fc 영역"은 항체의 C-말단 영역을 정의하기 위해 사용된다. Fc 영역은 항체의 두 중쇄: 사슬 A 및 사슬 B의 제2 및 제3 불변 도메인에서 유도된 두 동일한 단백질 단편으로 이루어진다. 제2 및 제3 불변 도메인은 각각 CH2 도메인 및 CH3 도메인으로 공지되어 있다. CH2 도메인은 사슬 A의 CH2 도메인 서열 및 사슬 B의 CH2 도메인 서열을 포함한다. CH3 도메인은 사슬 A의 CH3 도메인 서열 및 사슬 B의 CH3 도메인 서열을 포함한다. 본원에서 사용된 Fc 영역에는 아래에서 정의된 힌지 영역이 포함된다.

[0029] 용어 "Fc 영역" 또는 "Fc 도메인"은 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하기 위해 사용된다. "Fc 영역 서열"은 천연 Fc 영역 서열 또는 변이체 Fc 영역 서열일 수 있다. 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역 서열의 경계는 변할 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역 서열은 보통 위치 Cys226 또는 Pro230의 아미노산 잔기로부터 이들의 카복실 말단까지 연장되는 것으로 정의된다.

[0030] 인간 IgG Fc 영역 서열의 "CH2 도메인 서열"(또한 일명 "Cy2" 도메인 서열)은 보통 대략 아미노산 231 내지 대략 아미노산 340까지 연장된다.

[0031] "CH3 도메인 서열"은 Fc 영역 서열에서 CH2 도메인 서열까지 C-말단 잔기의 연장부(즉 IgG의 대략 아미노산 잔기 341 내지 대략 아미노산 잔기 447)를 포함한다.

[0032] "기능적 Fc 영역"은 야생형 Fc 영역의 "효과기 기능" 또는 "이펙터 기능"을 보유한다. 예시적인 "이펙터 기능"에는 C1q 결합; 보체 의존적 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존적 세포-매개 세포독성(ADCC); 식균작용; 세포 표면 수용체(예를 들면 B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절 등이 포함된다. 그와 같은 효과기 기능은 일반적으로 Fc 영역이 결합 도메인(예를 들면 항체 가변 도메인)과 조합되는 것을 필요로 하며, 예를 들면 본원에 개시된 다양한 분석을 이용해서 평가될 수 있다.

[0033] "야생형 Fc 영역 서열"은 자연에서 발견되는 Fc 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 야생형 Fc 영역에는 야생형 인간 IgG1 Fc 영역(비-A 및 A 동종이형); 야생형 인간 IgG2 Fc 영역; 야생형 인간 IgG3 Fc 영역; 및 야생형 인간 IgG4 Fc 영역 뿐만 아니라 이들의 천연 발생 변이체가 포함된다.

[0034] "변이체 Fc 영역 서열"은 본원에서 정의된 "하나 이상의 아미노산 변형"에 의해 야생형 Fc 영역 서열과 상이한 아미노산 서열을 포함한다. 변이체 Fc 영역 서열은 야생형 Fc 영역 서열 또는 모 폴리펩타이드의 Fc 영역 서열에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환, 예를 들면 야생형 Fc 영역 서열 또는 모 폴리펩타이드의 Fc 영역 서열에 약 1 내지 약 10개 아미노산 치환, 바람직하게는 약 1 내지 약 5개 아미노산 치환을 갖는다. 특정 구현예에서, 본원의 변이체 Fc 영역 서열은 야생형 Fc 영역 서열 또는 모 폴리펩타이드의 Fc 영역 서열과 적어도 약 80% 동일성을, 가장 바람직하게는 그와 적어도 약 90% 동일성을, 더 바람직하게는 그와 적어도 약 95% 동일성을

보유한다.

[0035] 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 설명하기 위해 사용된다. 바람직한 FcR은 천연 인간 FcR이다. 게다가, 특정 구현예에서, FcR은 IgG 항체에 결합하는 것(감마 수용체, FcγR)이며, 이들 수용체의 대립유전자 변이체 및 대안적으로 스플라이스된 형태를 포함하는 FcγRI(CD64), FcγRII(CD32), 및 FcγRIII(CD16) 서브클래스의 수용체가 포함된다. 용어 "FcR"에는 또한 신생아 수용체, FcRn이 포함되며, 이는 모계 IgGs의 태아로의 전달에 관여한다(Guyer et al, *J. Immunol.* 1 17:587(1976)). 용어 "FcγR"에는 FcRn이 포함되지 않는다.

[0036] "항체-의존적 세포-매개 세포독성" 및 "ADCC"는 표적 세포 상에 결합된 항체를 인식하고 차후에 표적 세포의 용해를 유도하는 FcRs을 발현하는 비특이적 세포독성 세포(예를 들면 자연 살해(NK) 세포, 중성구, 및 대식구)에서 세포-매개된 반응을 나타낸다. ADCC를 매개하는 주요 세포인, NK 세포는 FcγRIII 및 낮은 수준의 FcγRIIc를 발현하는 반면, 단핵구는 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII을 발현한다.

[0037] "인간 이펙터 세포"는 하나 이상의 FcRs을 발현하고 효과기 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게는, 세포는 적어도 FcγRIII을 발현하며 ADCC 효과기 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예에는 말초 혈액 단핵구(PBMC), 자연 살해(NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 중성구가 포함되며; PBMCs 및 NK 세포가 바람직하다. 이펙터 세포는 이들의 천연 공급원, 예를 들면 혈액 또는 PBMCs로부터 단리될 수 있다.

[0038] "감소된", "침묵화된", "무시해도 좋은" 또는 "제거된" FcγR 결합 친화도 및 C1q 결합 친화도를 갖는 Fc 변이체는 모 폴리펩타이드 또는 야생형 Fc 영역 서열을 포함하는 폴리펩타이드에 비해 줄어든 FcγR 결합 활성 및 C1q 결합 활성을 갖는 것이다. 일부 구현예에서, "감소된", "침묵화된", "무시해도 좋은" 또는 "제거된" FcγR 결합 친화도 및 C1q 결합 친화도를 갖는 Fc 변이체는 또한 모 폴리펩타이드 또는 야생형 Fc 영역 서열을 포함하는 폴리펩타이드에 비해 "감소된", "침묵화된", "무시해도 좋은" 또는 "제거된" ADCC, ADCP 및 CDC 활성을 갖는 Fc 변이체이다.

[0039] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 Fc 변이체는 야생형 항체 Fc 도메인과 비교하여 ADCC가 감소된 것이다.

[0040] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 Fc 변이체는 야생형 항체 Fc 도메인과 비교하여 CDC가 감소된 것이다.

[0041] FcγR에 대해 "감소된 또는 검출불가능한 결합을 나타내는" Fc 변이체는 모 폴리펩타이드보다 낮은 친화도로 모든 FcγRs에 결합한다. FcγR에 대해 감소된 결합을 나타내는 그와 같은 변이체는 FcγR에 대해 인식할 만한 결합을 거의 또는 전혀 보유하지 않을 수 있다. 일 구현예에서, 변이체는, 예를 들어 본원에서 실시예에서 결정된 또는 평형 상수의 변화로 측정된 바와 같이, 천연 IgG Fc 영역에 비해 FcγR에 대해 0-10% 결합을 나타낸다. 일 구현예에서, 변이체는 천연 IgG Fc 영역에 비해 FcγR에 대해 0-5% 결합을 나타낸다. 일 구현예에서, 변이체는 천연 IgG Fc 영역에 비해 FcγR에 대해 0-3% 결합을 나타낸다. 일 구현예에서, 변이체는 천연 IgG Fc 영역에 비해 FcγR에 대해 0-1% 결합을 나타낸다.

[0042] "모 항체", "모 폴리펩타이드" 또는 "야생형 Fc 영역을 포함하는 폴리펩타이드"는 힌지 영역에 대해 아미노산 변형을 포함하지 않는 작제물을 나타낸다. 일 구현예에서, 모 항체는 힌지 영역에 대한 아미노산 변형을 포함하지 않고 이종이량체 Fc 영역의 형성을 촉진하는 CH3 도메인에 대한 변형을 포함하는 것이다.

[0043] "아미노산 변형"은 예정된 아미노산 서열의 아미노산 서열 내 변화를 나타낸다. 예시적인 변형에는 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실이 포함된다. 특정 구현예에서, 본원의 아미노산 변형은 치환이다. 예를 들면 Fc 영역의 명시된 위치"에서의 아미노산 변형"은 명시된 잔기의 치환 또는 결실, 또는 명시된 잔기에 인접한 적어도 하나의 아미노산 잔기의 삽입을 나타낸다. 명시된 잔기에 "인접한" 삽입이란 이들의 하나 또는 두 잔기 내의 삽입을 의미한다. 특정 구현예에서, 삽입은 명시된 잔기에 대해 N-말단 또는 C-말단이다.

[0044] "아미노산 치환"은 예정된 아미노산 서열에서 적어도 하나의 기존 아미노산 잔기의 또 하나의 상이한 "대체" 아미노산 잔기를 이용한 대체를 나타낸다. 대체 잔기 또는 잔기들은 "천연 발생 아미노산 잔기"(즉 유전자 암호에 의해 인코딩된 것)일 수 있고, 하기로 구성된 그룹으로부터 선택될 수 있다: 알라닌(Ala); 아르기닌(Arg); 아스파라긴(Asn); 아스파르트산(Asp); 시스테인(Cys); 글루타민(Gln); 글루탐산(Glu); 글리신(Gly); 히스티딘(His); 이소류신(Ile): 류신(Leu); 라이신(Lys); 메티오닌(Met); 페닐알라닌(Phe); 프롤린(Pro): 세린(Ser); 트레오닌(Thr); 트립토판(Trp); 티로신(Tyr); 및 발린(Val). 바람직하게는, 대체 잔기는 시스테인이 아니다. 하나 이상의 비-천연 발생 아미노산 잔기를 이용한 치환이 또한 본원에서 아미노산 치환의 정의에 포괄된다. "

비-천연 발생 아미노산 잔기"는 상기 열거된 천연 발생 아미노산 잔기와 다른 잔기를 나타내며, 이는 폴리펩타이드 사슬에서 인접한 아미노산 잔기(들)에 공유 결합할 수 있다. 비-천연 발생 아미노산 잔기의 예에는 노르류신, 오르니틴, 노르발린, 호모세린 및 다른 아미노산 잔기 유사체, 예컨대 [Ellman 등 Meth. Enzym. 202:301-336(1991)]에 기재된 것들이 포함된다.

[0045] 항체 Fc 도메인은 IgA, IgM, IgE, IgD, 또는 IgG 항체의 Fc 도메인, 혹은 이들의 변형일 수 있다. 일 실시양태에 있어서는 상기 도메인은 IgG 항체의 Fc 도메인(예를 들면 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, 또는 IgG4 항체의 Fc 도메인)이다. 일 실시 양태에 있어서는 상기 Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인(예를 들면, 트라스트주맙 또는 리툭시맙의 Fc 도메인) 또는 IgG4 Fc 도메인(예를 들면, 니볼루맙의 Fc 도메인)일 수 있다. 본 발명의 Fc 도메인을 포함하는 폴리펩타이드는 폴리펩타이드 일부 또는 전체가 당화되어 있지 않거나 당화되어 있을 수 있다. 또한, 폴리펩타이드에 Fc 도메인에 더해 항체에서 유래하는 하나 이상의 영역이 포함될 수도 있다. 추가적으로, 상기 폴리펩타이드에는 항체 유래의 항원 결합 도메인(antigen binding domain)이 포함될 수도 있으며, 복수의 폴리펩타이드가 항체 또는 항체형 단백질을 형성할 수도 있다.

[0046] 본 명세서에서 항체 Fc 도메인의 아미노산 잔기 번호는 당업계에서 통상적으로 사용되는 카밧 EU 넘버링 시스템(Kabat EU numbering system)에 따른다(Kabat et al., in Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 1991에서와 같은 EU 지수번호).

[0047] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 본 발명의 치환된 Fc 변이체는 카밧 EU 넘버링 시스템에 따른 S228, L234, L235, T299 및 P329로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 위치에서 아미노산 치환을 포함한다.

[0048] 본 발명의 Fc 변이체는 야생형 항체 Fc 도메인과 비교하여 FcɣRIIIa에 대한 결합력이 감소된 것이다.

[0049] 본 명세서에서 용어 "결합력" 또는 "결합 친화도" 일반적으로 분자(예를 들면, 항체)의 단일 결합 부위 및 그것의 결합 파트너(예를 들면, FcɣR) 간의 비공유 상호작용의 총합의 강도를 나타낸다. 분자 X의 그 파트너 Y에 대한 친화도는 일반적으로 해리 상수(Kd 또는 KD)로 나타낼 수 있다. 친화도는 본원에 기재된 것을 포함하는 당해기술에 공지된 일반적 방법에 의해 측정될 수 있다.

[0050] 본 발명의 Fc 변이체는 FcɣRIIIa에 대하여 바람직하게는 10 nM 이하의 KD, 보다 바람직하게는 5 nM 이하의 KD, 보다 더 바람직하게는 3 nM 이하의 KD, 보다 더욱 더 바람직하게는 1 nM 이하의 KD, 가장 바람직하게는 측정 불가 수준의 감소된 결합력을 나타낸다.

[0051] 본 명세서에서 사용된 "Fc-융합"은 하나 이상의 폴리펩타이드가 Fc 영역 또는 이들의 유도체에 작동가능하게 연결되는 단백질을 의미한다. Fc 융합은 면역글로불린의 Fc 영역과 일반적으로 임의의 단백질 또는 소분자일 수 있는 융합 파트너를 조합한다. Fc 융합의 비-Fc 부분, 즉 융합 파트너의 역할은 표적 결합을 매개하는 것이며, 따라서 항체의 가변 영역과 기능적으로 유사하다. 사실상 임의의 단백질 또는 소분자가 Fc에 연결되어 Fc 융합을 생성할 수 있다. 단백질 융합 파트너에는 비제한적으로 수용체의 표적-결합 영역, 접합 부착, 리간드, 효소, 사이토카인, 케모카인, 또는 일부 다른 단백질 또는 단백질 도메인이 포함될 수 있다. 소분자 융합 파트너에는 치료 표적에 대한 Fc 융합을 유도하는 임의의 치료제가 포함될 수 있다. 그와 같은 표적은 임의의 분자, 바람직하게는 질환에 관여되는 세포외 수용체일 수 있다. 수많은 승인된 소분자 약물의 표적인 표면 수용체의 두 패밀리는 G-단백질 커플링된 수용체(GPCRs), 및 K+, Na+, Ca+ 채널을 포함하는 이온 채널이다. 현재 전세계적으로 시판되는 모든 약물의 거의 70%가 GPCRs을 표적으로 한다. 따라서 본원에 기재된 Fc 단백질은, 예를 들면 하나 이상의 GABA 수용체, 퓨린성 수용체, 아드레날린성 수용체, 히스타민성 수용체, 오피오이드 수용체, 케모카인 수용체, 글루타메이트 수용체, 니코틴 수용체, 5HT(세로토닌) 수용체, 및 에스트로겐 수용체를 표적으로 하는 소분자에 융합될 수 있다. 융합 파트너는 치료적으로 유용한 표적을 표적으로 하는 단백질의 소분자 모방체일 수 있다. Fc 융합 파트너로 작용할 수 있는 특정 약물의 구체적인 예는 [L. S. Goodman et al, Eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics(McGraw-Hill, New York, ed. 9, 1996)]에서 찾아볼 수 있다. 또한, 다양한 링커가 Fc 융합을 생성하기 위해 융합 파트너에 Fc를 공유 연결하기 위해 사용될 수 있다.

[0052] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 Fc 변이체는 야생형 항체 Fc 도메인에서 카밧 EU 넘버링 시스템에 따른 S228P, L234A, L235A, L235E, T299L 및 P329G로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 아미노산 치환을 포함하는 것이다.

[0053] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 Fc 변이체는 야생형 항체 Fc 도메인에서 카밧 EU 넘버링 시스템에

따른 하기의 아미노산 치환을 포함하는 것이다:

[0054] (i) L234A 및 L235A;

[0055] (ii) L234A, L235A 및 P329G;

[0056] (iii) T299L;

[0057] (iv) L234A, L235A 및 T299L;

[0058] (v) S228P 및 L235E;

[0059] (vi) S228P, L235E 및 T299L; 또는

[0060] (v) S228P 및 T299L.

[0061] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 Fc 변이체는 야생형 항체 Fc 도메인과 비교하여 반감기(Half-life) 연장을 위한 추가의 아미노산 변이를 포함한다.

[0062] 예를 들어, 상기 Fc 변이체는 야생형 항체 Fc 도메인에서 카밧 EU 넘버링 시스템에 따른 M252, S254, T256, L309, Q311, M428 및 N434로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 위치에서 아미노산 치환을 추가로 포함할 수 있다.

[0063] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 추가적인 아미노산 치환은 M252Y, S254T, T256E, L309G, Q311R, M428L 및 N434S로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[0064] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 추가적인 아미노산 치환은 하기의 아미노산 치환을 포함할 수 있다:

[0065] (i) M252Y, S254T 및 T256E;

[0066] (ii) M428L 및 N434S;

[0067] (iii) Q311R 및 M428L; 또는

[0068] (iv) L309G 및 M428L.

[0069] 상기 추가적인 아미노산 치환은 FcRn(neonatal Fc receptor)에 대한 결합 및 해리를 조정한다. 특히, 낮은 pH에서 FcRn에 대한 증가된 결합 친화도(binding affinity)를 나타내고, 높은 pH에서 실질적으로 변화된 결합을 나타내지 않은 Fc 변이체, 또는 그의 기능적 변이체를 포함한다.

[0070] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 Fc 변이체는 pH 5.6 내지 6.2(바람직하게는 pH 5.8 내지 6.0)에서 FcRn에 대한 결합 친화도(binding affinity)가 야생형 Fc 도메인과 비교하여 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 100% 이상 증가되거나, 야생형 Fc 도메인보다 2배 이상, 3배 이상, 4배 이상, 5배 이상, 6배 이상, 7배 이상, 8배 이상, 9배 이상, 10배 이상, 20배 이상, 30배 이상, 40배 이상, 50배 이상, 60배 이상, 70배 이상, 80배 이상, 90배 이상 또는 100배 이상 증가될 수 있다.

[0071] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 Fc 변이체는 pH 7.0 내지 7.8(바람직하게는 pH 7.2 내지 7.6)에서 FcRn(neonatal Fc receptor)으로부터 해리(dissociation)되는 정도가 야생형 Fc 도메인과 비교하여 동일하거나 실질적으로 변화되지 않을 수 있다.

[0072] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 치환된 Fc 변이체는 야생형 Fc 또는 기 개발된 타 Fc 변이체와 비교하여 약산성 조건(예를 들어, pH 5.8 내지 6.0)에서는 매우 향상된 결합 친화도를 나타내었으며, 중성 조건(예를 들어, pH 7.0)에서는 동일하거나 실질적으로 동등 또는 그 이상의 수준의 해리 정도를 나타내었다.

[0073] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 치환된 Fc 변이체는 야생형 항체 Fc 도메인과 비교하여 반감기(Half-life)가 증가된 것이다.

[0074] 본 발명의 치환된 Fc 변이체의 반감기는 야생형 Fc 도메인과 비교하여 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 100% 이상 증가되거나, 야생형 Fc 도메인 보다 2배 이상, 3배 이상, 4배 이상, 5배 이상, 6배 이상, 7배 이상, 8배 이상, 9배 이상 또는 10배 이상 증가될 수 있다.

[0075] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 치환된 Fc 변이체는 야생형과 비교하여 월등히 향상된 체 내 반감기

를 나타내었다.

[0077] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 폴리펩타이드를 포함하는 항체를 제공한다.

[0078] 본 명세서에서 용어 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 미니바디(minibody), 도메인 항체, 이중특이적 항체, 항체 모방체, 키메라 항체, 항체 접합체(conjugate), 인간항체 또는 인간화 항체이거나 이의 단편을 의미한다.

[0079] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명은 항체 Fc 영역의 최적화를 통해 Fc 도메인 또는 이를 포함하는 폴리펩타이드의 반감기를 극대화하면서도, 이펙터 기능은 감소시키거나 침묵화할 수 있다.

[0081] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자를 포함하는 벡터 또는 상기 벡터를 포함하는 숙주세포를 제공한다.

[0083] 본 발명의 핵산분자는 단리된 것이거나 재조합된 것일 수 있으며, 단일쇄 및 이중쇄 형태의 DNA 및 RNA뿐만 아니라 대응하는 상보성 서열이 포함된다. 단리된 핵산은 천연 생성 원천에서 단리된 핵산의 경우, 핵산이 단리된 개체의 게놈에 존재하는 주변 유전 서열로부터 분리된 핵산이다. 주형으로부터 효소적으로 또는 화학적으로 합성된 핵산, 예컨대 PCR 산물, cDNA 분자, 또는 올리고뉴클레오타이드의 경우, 이러한 절차로부터 생성된 핵산이 단리된 핵산분자로 이해될 수 있다. 단리된 핵산분자는 별도 단편의 형태 또는 더 큰 핵산 구축물의 성분으로서의 핵산 분자를 나타낸다. 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 작동가능하게 연결된다. 예를 들면, 전서열 또는 분비 리더(leader)의 DNA는 폴리펩타이드가 분비되기 전의 형태인 전단백질(preprotein)로서 발현되는 경우 폴리펩타이드의 DNA에 작동가능하게 연결되고, 프로모터 또는 인핸서는 폴리펩타이드 서열의 전사에 영향을 주는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되며, 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 촉진하도록 배치될 때 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로 작동가능하게 연결된은 연결될 DNA 서열들이 인접하여 위치함을 의미하며, 분비 리더의 경우 인접하여 동일한 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나 인핸서는 인접하여 위치할 필요는 없다. 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션에 의해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커를 통상적인 방법에 따라 사용한다.

[0084] 본 명세서에서 용어 벡터는 핵산 서열을 복제할 수 있는 세포로의 도입을 위해서 핵산 서열을 삽입할 수 있는 전달체를 의미한다. 핵산 서열은 외생 (exogenous) 또는 이종 (heterologous)일 수 있다. 벡터로서는 플라스미드, 코스미드 및 바이러스(예를 들면, AAV, 박테리오파지)를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 당업자는 표준적인 재조합 기술에 의해 벡터를 구축할 수 있다(Maniatis, et al., *Molecular Cloning*, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988; 및 Ausubel et al., In: *Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc, NY, 1994 등).

[0085] 본 명세서에서 용어 발현 벡터는 전사되는 유전자 산물 중 적어도 일부분을 코딩하는 핵산 서열을 포함한 벡터를 의미한다. 일부의 경우에는 그 후 RNA 분자가 단백질, 폴리펩타이드, 또는 펩타이드로 번역된다. 발현 벡터에는 다양한 조절서열을 포함할 수 있다. 전사 및 번역을 조절하는 조절서열과 함께 벡터 및 발현 벡터에는 또 다른 기능도 제공하는 핵산 서열도 포함될 수 있다.

[0086] 본 명세서에서 용어 숙주세포는 진핵생물 및 원핵생물을 포함하며, 상기 벡터를 복제할 수 있거나 벡터에 의해 코딩되는 유전자를 발현할 수 있는 임의의 형질 전환 가능한 생물을 의미한다. 숙주세포는 상기 벡터에 의해 형질감염(transfected) 또는 형질전환(transformed) 될 수 있으며, 이는 외생의 핵산분자가 숙주세포 내에 전달되거나 도입되는 과정을 의미한다.

[0087] 본 명세서에서 용어 "형질전환"은 상기 형질감염(Transfected) 및 형질도입(Transduced)을 포함하는 의미로 사용된다.

[0088] 본 발명의(숙주)세포는 제한되지 않으나, 바람직하게는 곤충세포 또는 포유동물 세포, 보다 바람직하게는 곤충세포의 경우 Sf9, 포유동물 세포의 경우 HEK293 세포, HeLa 세포, ARPE-19 세포, RPE-1 세포, HepG2 세포, Hep3B 세포, Huh-7 세포, C8D1a 세포, Neuro2A 세포, CHO 세포, MES13 세포, BHK-21 세포, COS7 세포, COP5 세

포, A549 세포, MCF-7 세포, HC70 세포, HCC1428 세포, BT-549 세포,PC3 세포, LNCaP 세포, Capan-1 세포, Panc-1 세포, MIA PaCa-2 세포, SW480 세포, HCT166 세포, LoVo 세포, A172 세포, MKN-45 세포, MKN-74 세포, Kato-III 세포, NCI-N87 세포, HT-144 세포, SK-MEL-2 세포, SH-SY5Y 세포, C6 세포, HT-22 세포, PC-12 세포, NIH3T3 세포 등을 이용할 수 있다.

[0089] 본 발명의 숙주세포는 바람직하게는 단리된 숙주세포이다.

[0091] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 야생형 Fc 도메인과 비교하여 이펙터 기능(effector function)이 감소된 Fc 변이체를 포함하는 폴리펩타이드의 제조방법을 제공한다:

[0092] a) 상기 Fc 변이체를 포함하는 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 단계; 및

[0093] b) 상기 숙주세포에 의해 발현된 폴리펩타이드를 회수하는 단계.

[0095] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 야생형과 비교하여 이펙터 기능(effector function)이 감소된 항체의 제조방법을 제공한다:

[0096] a) 상기 Fc 변이체를 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 항체를 발현하는 숙주세포를 배양하는 단계; 및

[0097] b) 상기 숙주세포로부터 발현된 항체를 정제하는 단계.

[0099] 본 발명의 제조방법에 있어서, 항체의 정제는 여과, HPLC, 음이온 교환 또는 양이온 교환, 고속 액체 크로마토그래피(HPLC), 친화도 크로마토그래피, 또는 이들의 조합을 하는 것이 포함될 수 있으며, 바람직하게는 Protein A를 사용하는 친화 크로마토그래피를 이용할 수 있다.

[0101] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 아미노산 치환을 포함하는 Fc 변이체를 포함하는 폴리펩타이드, 상기 항체, 상기 핵산분자 또는 상기 벡터를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0103] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물이다.

[0105] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 Fc 변이체를 포함하는 폴리펩타이드, 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자를 포함하는 벡터를 포함하는 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상(subject)에게 투여하는 단계를 포함하는, 이펙터 기능(effector function)이 감소된 Fc 변이체의 전달방법을 제공한다.

[0107] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 Fc 변이체는 대조군(예를 들어, 리툭시맙 또는 니볼루맙) 대비 검출 불가능 정도의 낮은 FcγRIIIa 결합력 및/또는 전혀 없는 정도의 ADCC(antibody dependent cellular cytotoxicity) 및/또는 CDC (Complement-Dependent Cytotoxicity) 활성을 나타내면서, 동시에 현저한 반감기 증가능을 갖는다.

[0108] 본 발명의 약제학적 조성물은 (a) 상기 폴리펩타이드, 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자를 포함하는 벡터; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다.

[0109] 본 발명의 약제학적 조성물은 특정 질환(예를 들어, 종양, 바이러스 또는 세균 감염 등)의 예방 또는 치료 용도로 사용될 수 있다.

[0110] 본 명세서에서 용어 "예방"은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸릴 가능성이 있는 대상체에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다.

[0111] 본 명세서에서 용어 "치료"는 (a) 질환, 질병 또는 증상의 발전의 억제; (b) 질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c) 질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물은 그 자체로 바이러스 감염 치료용 조성물이 될 수도 있고, 혹은 다른 약리성분과 함께 투여되어 이의 치료 반응성을 향상시키는 치료 보조제로 적용될 수도 있다. 이에, 본 명세서에서 용어 "치료" 또는 "치료제"는 "치료 보조" 또는 "치료 보조제"의 의미를 포함한다.

[0112] 본 명세서에서 용어 "투여" 또는 "투여하다"는 본 발명의 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다.

[0113] 본 발명에서 용어 "약제학적 유효량" 또는 "치료적 유효량"은 본 발명의 약제학적 조성물을 투여하고자 하는 개체에게 조성물 내의 약리성분이 치료적 또는 예방적 효과를 제공하기에 충분한 정도로 함유된 조성물의 함량을 의미하며, 이에 "예방적 유효량"을 포함하는 의미이다.

[0114] 본 명세서에서 용어 "대상체"는 제한없이 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함한다. 구체적으로는, 본 발명의 대상체는 인간이다.

[0115] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함한다.

[0116] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.

[0117] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 통상의 방법에 따라 다양한 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 예컨대, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽 등의 경구형 제형으로 제형화할 수 있고, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0118] 본 발명의 조성물은 항암 활성, 항 바이러스 또는 항 박테리아 활성을 가진 공지의 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

[0119] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 바람직하게는 비경구 투여이며, 예컨대, 정맥 내 주입, 경피 투여, 피하 주입, 근육 내 주입, 유리체 내 주입(intravitreal injection), 망막 하 주입(subretinal injection), 맥락막위공간 주입(suprachoroidal injection), 점안 투여(eye drop administration), 뇌실 내 주입(intracerebroventricular injection), 척추강 내 주입(intrathecal injection), 양막 내 주입 (intraamniotic injection), 동맥 내 주입 (intraarterial injection), 관절강 내 주입 (intraarticular injection), 심장 내 주입 (intracardiac injection), 음경해면체 내 주입 (intracavernous injection), 뇌 내 주입 (intracerebral injection), 뇌수조 주입 (intracisternal injection), 관상 내 주입 (intracoronary injection), 두개 내 주입 (intracranial injection), 경막 내 주입 (intradural injection), 경막 외 주입 (epidural injection), 해마 내 주입 (intrahippocampal injection), 비강 내 주입 (intranasal injection), 골강 내 주입 (intraosseous injection), 복강 내 주입 (intraperitoneal injection), 흉강 내 주입 (intrapleural injection), 척수 내 주입 (intraspinal injection), 흉곽 내 주입 (intrathoracic injection), 흉선 내 주입 (intrathymic injection), 자궁 내 주입 (intrauterine injection), 질 내 주입 (intravaginal injection), 심실 내 주입 (intraventricular injection), 방광 내 주입 (intravesical injection), 결막 하 주입 (subconjunctival injection) , 종양 내 주입 (intratumoral injection), 국소 주입 및 복강 주입(intraperitoneal injection) 등으로 투여할 수 있다.

[0120] 상기 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0121] 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 상기 약제학적 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 상기 약제학적 조성물의 투여로 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 투여 대상이 되는 개체의 종류, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 질병의 증세나 정도, 성별, 식이, 배설, 해당 개체에 동시 또는 이시에 함께 사용되는 약물 기타 조성물의 성분 등을 비롯한 여러 인자 및 의약 분야에서 잘

알려진 유사 인자에 따라 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다.

[0122] 본 발명의 약제학적 조성물의 투여 경로 및 투여 방식은 각각 독립적일 수 있으며, 그 방식에 있어 특별히 제한되지 아니하며, 목적하는 해당 부위에 상기 약학적 조성물이 도달할 수 있는 한 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다.

발명의 효과

[0124] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0125] (ⅰ) 본 발명은 인간 항체 Fc 도메인의 아미노산 서열 중 일부가 다른 아미노산 서열로 치환된 Fc 변이체를 포함하는 폴리펩타이드 또는 이를 포함하는 항체를 제공한다.

[0126] (ii) 또한, 본 발명은 상기 폴리펩타이드 또는 항체의 제조방법을 제공한다.

[0127] (iii) 본 발명의 Fc 변이체는 일부 아미노산 서열의 최적화를 통하여 이펙터 기능의 감소 또는 침묵화와 동시에 체 내 반감기를 극대화 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0129] 도 1은 Rituximab (IgG1) Fc 이중 변이체의 SDS-PAGE결과를 나타낸다.

도 2는 Rituximab (IgG1) Fc 이중 변이체의 SEC-HPLC 분석결과를 나타낸다.

도 3은 Nivolumab (IgG4) Fc 이중 변이체의 SDS-PAGE결과를 나타낸다.

도 4는 Nivolumab (IgG4) Fc 이중 변이체의 SEC-HPLC분석결과를 나타낸다.

도 5는 Rituximab (IgG1) Fc 이중 변이체의 FcγRIIIa와의 결합력 측정 조건을 나타낸다.

도 6은 Rituximab (IgG1) Fc 이중 변이체의 FcγRIIIa와의 결합패턴을 나타낸다.

도 7은 pH 6.0 조건에서 인간 FcRn과 Fc 이중 변이체간의 결합력 측정 결과를 나타낸다 (도 7a: Rituximab 대비 변이체 4종 (YTE, LS, PFc29, PFc41)의 결합력 측정 결과; 도 7b: effector function을 줄이는 TL mutatant를 추가 도입한 결과).

도 8은 Nivolumab (IgG4) Fc 이중 변이체의 FcγRIIIa와의 결합력 측정 조건을 나타낸다.

도 9는 Nivolumab (IgG4) Fc Double Variants의 FcγRIIIa와의 결합패턴 분석 결과를 나타낸다(도 9a: SPTL, SPLETL이 추가로 도입된 변이체들은 KD 값; 도 9b: WT, LS, PFc29, PFc41의 KD 값).

도 10은 Rituximab (IgG1) Fc 이중 변이체간의 ADCC Assay 결과를 나타낸다(도 10a: original form과 LALAPG 돌연변이 form의 비교; 도 10b: original form과 TL 돌연변이 form의 비교).

도 11은 Rituximab (IgG1) Fc 이중 변이체간의 CDC Assay 결과를 나타낸다(도 11a: original form과 LALAPG 돌연변이 form의 비교; 도 11b: original form과 TL 돌연변이 form의 비교).

도 12는 Nivolumab (IgG4) Fc 이중 변이체간의 pH6.0에서의 hFcRn 결합력을 측정한 결과를 나타낸다.

도 13은 Nivolumab (IgG4) Fc 이중 변이체간의 pH7.4에서의 hFcRn 결합력을 측정한 결과를 나타낸다.

도 14는 Nivolumab (IgG4) Fc 이중 변이체들의 Effector Silencing Effect 확인 (ADCC Assay) 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0130] 이하, 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0132] **실시예**

[0133] **실시예 1: Rituximab (IgG1) 과 Nivolumab (IgG4) 면역작용기작 제거 Fc 변이체 Construct 제작 및 생산**

[0134] **가. Rituximab (IgG1) Fc 이중 변이체 Constructs 제작**

[0135] Rituximab wild type, YTE, LS, pFc29, pFc41 변이체에 각각 LALA (L234A,L235A) LALAPG (L234A, L235A, P329G), TL (T299L), LALATL (L234A, L235A, T299L) 돌연변이가 도입된 Rituximab Fc 변이체들을 pcDNA3.4 vector(Thermo Fisher Scientific, 14697)를 이용하여 Heavy chain과 Light chain construct를 도입하여 총 25종의 변이체를 제작하였다 (표 1).

표 1

[0136] 반감기 증가 변이체 기반 면역작용기작 제거 변이체 추가 도입

SEQ ID NO	변이체 이름	반감기 증가 변이	Effector-silent 변이
1	Rituximab	WT	-
2	Rituximab-YTE	YTE	
3	Rituximab-LS	LS	
4	Rituximab-PFc29	PFc29	
5	Rituximab-PFc41	PFc41	
6	Rituximab-LALA	WT	LALA
7	Rituximab-YTE_LALA	YTE	
8	Rituximab-LS_LALA	LS	
9	Rituximab-PFc29_LALA	PFc29	
10	Rituximab-PFc41_LALA	PFc41	
11	Rituximab-LALPG	WT	LALPG
12	Rituximab-YTE_LALPG	YTE	
13	Rituximab-LS_LALPG	LS	
14	Rituximab-PFc29_LALPG	PFc29	
15	Rituximab-PFc41_LALPG	PFc41	
16	Rituximab-TL	WT	TL
17	Rituximab-YTE_TL	YTE	
18	Rituximab-LS_TL	LS	
19	Rituximab-PFc29_TL	PFc29	
20	Rituximab-PFc41_TL	PFc41	
21	Rituximab-LALATL	WT	LALATL
22	Rituximab-YTE_LALATL	YTE	
23	Rituximab-LS_LALATL	LS	
24	Rituximab-PFc29_LALATL	PFc29	
25	Rituximab-PFc41_LALATL	PFc41	

[0138] **나. Rituximab (IgG1) Fc 이중 변이체 발현 정제**

[0139] Rituximab wild type을 비롯한 Fc 변이체 25종에 대해 Expi293F expression system (Thermo Fisher Scientific, A14527)을 활용하여 동물세포에서 일시 발현하였다.

[0140] Transfection 하루 전날 Expi293F 세포를 $2x10^6$ cells/mL이 되도록 계대배양하였고 다음날 세포밀도가 $2.9x10^6$ cells/mL이 되면 270 mL의 양으로 맞추어 세포를 준비하였다. Opti-MEM1 배지(Thermo Fisher Scientific, 31985070) 15 mL에 heavy chain과 light chain의 transfection ratio를 1:1로 하여 총 300 ug의 plasmid DNA를 섞고, 다른 Opti-MEM1 배지 15 mL에 ExpiFectamine293 transfection reagent (Thermo Fisher Scientific, A14524) 0.81 mL을 각각 섞어 5분 동안 둔 후, DNA를 섞은 Opti-MEM1 배지를 ExpiFectamine293 transfection reagent를 섞은 Opti-MEM1 배지에 잘 섞어 20 분간 상온에 두었다가 미리 준비한 270 ml의 Expi293F에 넣어주고, shaking CO_2 incubator (INFORS HT, multitron standard)에서 37℃, 125 rpm, 8% CO_2조건으로 배양하였다.

20시간 후 Enhancer1 2.5 mL, Enhancer2 25 mL을 추가로 넣어주어 총 300 mL의 양으로 shaking CO_2 incubator에서 37℃, 125 rpm, 8% CO_2조건으로 5일간 더 배양한 후 원심분리하여 상등액만 취하였다.

[0141] 발현 상등액은 HiTrap MabSelect SuRe column (GE healthcare, #11003495)을 장착한 AKTA prime plus (GE healthcare, 11001313)를 이용하여 affinity chromatography를 수행하고, 상등액 300 mL을 분당 3 mL의 속도로 흘려주었다. Elution buffer (100 mM citrate buffer, 5 % Sucrose, pH3.0)를 분당 3 mL의 속도로 5 mL씩 6개의 fraction으로 Elution하고 2~4 fraction을 회수하였다. 30K Amicon ultra centrifugal filter (Millipore, UFC903024)를 이용하여 최종적으로 pH 7.4의 1xPBS buffer (ThermoFisher, 10010031)로 buffer로 바꿔주면서 농축하는 방법으로 단백질을 정제하였다. 생산된 단백질을 SDS-PAGE와 SEC-HPLC분석을 수행하여 92 %이상 순도의 항체를 확보하였다 (도 1 및 2).

[0143] **다. Nivolumab (IgG4) Fc 이중 변이체 Constructs 제작**

[0144] Nivolumab wild type, YTE, LS, pFc29, pFc41 변이체에 각각 SPLE (S228P, L235E), SPLETL (S228P, L235E, T299L), SPTL (S228P, T299L) 돌연변이가 도입된 Nivolumab Fc 변이체들을 pcDNA3.4 vector를 이용하여 Heavy chain과 Light chain construct를 도입하여 총 20종의 변이체를 제작하였다 (표 2).

표 2

[0145] 반감기 증가 변이체 기반 면역작용기작 제거 변이체 추가 도입

SEQ ID NO	변이체 이름	반감기 증가 변이	Effector-silent 변이
26	Nivolumab	WT	-
27	Nivolumab-YTE	YTE	
28	Nivolumab-LS	LS	
29	Nivolumab-PFc29	PFc29	
30	Nivolumab-PFc41	PFc41	
31	Nivolumab-LALA	WT	SPLE
32	Nivolumab-YTE_SPLE	YTE	
33	Nivolumab-LS_SPLE	LS	
34	Nivolumab-PFc29_SPLE	PFc29	
35	Nivolumab-PFc41_SPLE	PFc41	
36	Nivolumab-SPLETL	WT	SPLETL
37	Nivolumab-YTE_SPLETL	YTE	
38	Nivolumab-LS_SPLETL	LS	
39	Nivolumab-PFc29_SPLETL	PFc29	
40	Nivolumab-PFc41_SPLETL	PFc41	
41	Nivolumab-SPTL	WT	SPTL
42	Nivolumab-YTE_SPTL	YTE	
43	Nivolumab-LS_SPTL	LS	
44	Nivolumab-PFc29_SPTL	PFc29	
45	Nivolumab-PFc41_SPTL	PFc41	

[0147] **라. Nivolumab (IgG4) Fc 이중 변이체 발현 정제**

[0148] Nivolumab Wild type을 비롯한 Fc 변이체 20종에 대해 ExpiCHO expression system (Thermo Fisher Scientific, A29127)을 활용하여 동물세포에서 일시 발현하였다.

[0149] Transfection 하루 전날 ExpiCHO 세포를 $3x10^6$ cells/mL이 되도록 계대 배양하였고 다음날 세포밀도가 $6x10^6$ cells/mL이 되면 200 mL의 양으로 맞추어 세포를 준비하였다. OptiPRO SFM 배지 (Thermo Fisher Scientific, 12309050) 8 mL에 heavy chain과 light chain의 transfection ratio를 1:1로 하여 총 300 ug의 plasmid DNA를 섞고, 다른 OptiPRO SFM배지 7.4 mL에 ExpiFectamineCHO transfection reagent (ThermoFisher, A29129) 0.64 mL을 각각 섞은후 두 배지를 잘 섞어 미리 준비한 200 ml의 ExpiCHO에 넣어주고, shaking CO_2 incubator에서 37

℃, 125 rpm, 8% CO_2조건으로 배양하였다. 20시간 후 ExpiCHO Enhaner 1.2 mL, ExpiCHO Feed 32 mL을 추가로 넣어준 후 32℃, 125 rpm, 5% CO_2조건으로 배양하고, 5일후 추가적으로 ExpiCHO Feed 32 ml을 더 넣어 14 일간 배양한 후 원심 분리하여 상등 액만 취하였다.

[0150] 발현 상등액은 HiTrap MabSelect SuRe column (GE healthcare, 11003495)을 장착한 AKTA prime plus를 이용하여 affinity chromatography를 수행하였다. 상등액 300 mL을 분당 3 mL의 속도로 흘려주었다. Elution buffer (100 mM citrate buffer, 50 mM NaCl, 5% Sucrose, pH3.0)를 분당 3 mL의 속도로 5 mL씩 6개의 fraction으로 Elution하고 2-4 fraction을 회수하였다. 30K Amicon ultra centrifugal filter (Millipore, UFC903024)를 이용하여 최종적으로 pH 7.4의 1xPBS buffer (ThermoFisher, 10010031)로 buffer를 바꿔주면서 농축하는 방법으로 단백질을 정제하였다. 생산된 단백질을 SDS-PAGE와 SEC-HPLC분석을 수행하여 95%이상 순도의 항체를 확보하였다 (도 3 및 4).

[0152] **실시예 2: Rituximab (IgG1)과 Nivolumab (IgG4) 면역작용기작 제거 Fc 변이체의 FcγRIIIa와 FcRn 결합력 측정**

[0153] **가. Rituximab (IgG1) Fc 이중 변이체의 FcγRIIIa 결합력 측정**

[0154] FcγRIIIa과 Rituximab variant의 결합력을 측정하기 위하여, Biacore T200 장비(GE healthcare, 28975001)를 이용하여 FcγRIIIa를 ligand로 capture하여 결합력 측정을 진행하였다 (도 5).

[0155] FcγRIIIa와의 결합력 측정 결과, LALA, TL, LALATL, LALAPG 변이체들은 KD 값이 계산되지 않을 정도로 결합력이 현저히 감소되었음을 확인하였다. 하지만 LALA의 경우에는 결합하는 양상은 보였으며, PG 변이가 추가로 도입된 LALAPG 변이체에서는 결합패턴이 나타나지 않았다. TL 변이체의 경우 결합 패턴이 나타나지 않았으므로, LALA변이가 추가로 도입된 LALATL 변이체에서는 추가적인 결합력 감소패턴은 관찰할 수 없었다 (도 6).

[0157] **나. Rituximab (IgG1) Fc 이중 변이체의 FcRn 결합력 측정**

[0158] FcRn과 Rituximab-Fc variant의 결합력을 측정하기 위하여, Biacore T200 장비(GE Healthcare, 28975001)를 이용하여 Rituximab-Fc variant를 ligand로 CM5 chip (GE Healthcare, BR100012)에 capture하여 결합력 측정을 진행하였다. Endosome pH인 pH 6.0 조건에서 결합력을 측정한 결과, Rituximab 대비 변이체 4종 (YTE, LS, PFc29, PFc41)의 결합력이 향상되었다. 또한, 과도한 면역반응을 나타낼 수 있는 치료용 작용기작 (effector function)을 줄이는 TL mutatant를 도입하였음에도 도입 전과 비교하여 결합력이 유지되었다 (도 7).

[0160] **다. Nivolumab (IgG4) Fc 이중 변이체의 FcγRIIIa 결합력 측정**

[0161] FcγRIIIa와 Nivolumab (IgG4) Fc 이중 변이체의 결합력 측정하기 위하여, Biacore T200 장비를 이용하여 FcγRIIIa를 ligand로 capture하여 결합력 측정을 진행하였다 (도 8).

[0162] FcγRIIIa와의 결합력 측정 결과, 기존 Nivolumab 변이체들은 YTE를 제외하고서 FcγRIIIa에 대한 결합력이 어느정도 남아있는 양상을 보였으며 SPTL, SPLETL이 추가로 도입된 변이체들은 KD 값이 계산되지 않을 정도로 결합력이 현저히 감소되었다. LE변이가 추가로 도입된 SPLETL 변이체에서는 추가적인 결합력 감소패턴은 관찰할 수 없었다(도 9a). FcγRIIIa와의 결합은 YTE를 제외하고 WT, LS, PFc29, PFc41에서 나타났으며, 결합력이 낮아서 KD 값을 측정할 수 없었다 (도 9b).

[0164] **실시예 3: Rituximab (IgG1) Fc 이중 변이체간의 항체의존적 세포독성 (ADCC) 및 보체의존적 세포독성 (CDC)의 반응성 차이 확인**

[0165] **가. ADCC (Antibody-Dependent Cellular Mediated Cytotoxicity) Assay 분석**

[0166] Rituximab (IgG1) Fc 변이체의 original form과 LALAPG, TL 돌연변이가 추가된 이중 변이체간의 ADCC 반응성을 비교하기 위하여 CD20이 안정적으로 발현되는 Raji cell(ATCC, CCL-86)을 target cell로 선정하여 실험을 진행하였다.

[0167] ADCC assay 시험수행 당일에 Raji cell을 96 well white plate에 각각의 well에 $1.25x10^4$의 세포수가 들어가도록 assay buffer에 cell number를 계수하여 cells을 seeding하고, 시험물질 (original, LALAPG, TL)을 assay buffer에 최고농도 1 ug/mL, 1/3 dilution, 10 point가 되도록, cells이 seeding된 96 well white plate에 처리하였다. Effector cell을 액체질소 용기에서 꺼내어 재빠르게 녹여서, Effector cell과 target cell의 비율이 25:1이 되도록 96 well white plate에 처리한 후 CO_2 incubator (37℃, 5 % CO_2 조건)에서 6시간동안 반응시켰다. 시간이 경과되면 plate를 꺼내어 EnSpire (Perkin Elmer) 장비를 활용하여 Luminescence fold를 측정함으로써 결과 값을 수집하였다. 측정결과 Rituximab (IgG1) original form은 ADCC 반응성이 약 50 fold 이하로 확인되는 반면, LALAPG 돌연변이 form(도 10a)과 TL 돌연변이 form은 ADCC 반응성이 전혀 없는 것으로 확인되었다 (도 10b).

[0169] **나. CDC (Complement-Dependent Cytotoxicity) Assay 분석**

[0170] Rituximab (IgG1) Fc 이중 변이체의 original form과 LALAPG, TL mutant의 CDC 반응성을 비교하기 위하여, CD20이 안정적으로 발현되는 Raji cell을 target cell로 선정하여 실험을 진행하였다.

[0171] CDC assay 시험 수행 당일에 Raji cell (ATCC, CCL-86)을 96 well V-bottom plate (Corning, 3894)에 각각의 well에 $1.2x10^4$의 세포수가 들어가도록 assay buffer에 cell number를 계수하여 cells을 seeding하고, 시험물질 (original, LALAPG, TL)을 assay buffer에 최고농도 1 ug/mL, 1/3 dilution, 10 points가 되도록, cells이 seeding된 96 well V-bottom plate (Corning, 3894)에 처리하여 상온에서 15분 동안 반응시켰다. Complement (Quidel, A112)를 deepfreezer에서 꺼내어 재빠르게 녹여서, 2.5%의 비율이 되도록 96 well V-bottom plate에 처리하여 CO_2 incubator (37℃, 5% CO_2조건, Eppendorf, GALAXY 170S)에서 1시간동안 반응시킨 다음 시간이 경과되면 plate를 꺼내어 300 g 5분동안 centrifugation을 수행하여 상등액 50 uL을 취하여 새로운 96 well flat-bottom plate (Corning, 3635)에 옮겼다. Cytotox96 reagent (Promega, G1780) 50 uL를 각 well에 넣어주고, 30분동안 반응시킨 후 시간이 경과되면 stop reagent 50 uL를 넣어서 반응을 중지시키고, ELISA plate reader (Molecular Device, VersaMAX)장비를 활용하여 optical density값을 측정하였다.

[0172] 측정결과 Rituximab (IgG1)의 Original form은 CDC 반응성이 약 50% 이하의 cytotoxicity로 확인되는 반면, LALAPG 돌연변이 form(도 11a)과 TL 돌연변이 form(도 11b)은 CDC 반응성이 전혀 없는 것으로 확인되었다.

[0173]

[0174] **실시예 4: Nivolumab (IgG4) Fc 이중 변이체의 pH -dependent 의존 hFcRn 결합력 측정**

[0175] hFcRn과 Nivolumab-Fc double variants의 결합력을 측정하기 위하여, Biacore T200 장비를 이용하였다. Anti-idiotype Ab capture method를 사용하여 anti Nivolumab antibody (BIORAD, HCA299)를 고정 후 Nivolumab- Fc duble variants를 ligand로 CM5 chip에 약 160 RU level로 capture하여 결합력 측정을 진행하였다.

[0176] 결합력 측정은 hFcRn를 analyte로 1000 nM 농도에서 1/2씩 희석하여 총 6 points로서 31.25 내지 1000 nM 구간에서 진행하였다. Endosome pH인 pH 6.0 조건에서 결합력을 측정한 결과, Nivolumab 대비 변이체 3종 (LS, PFc29, PFc41)에 과도한 면역반응을 나타낼 수 있는 치료용 작용기작 (effector function)을 줄이는 TL mutatant를 도입한 Fc 이중 변이체에서의 결합력이 대조군에 비해 크게 향상되었다 (도 12). 현재 market에 출시된 Xencor의 LS 이중 변이체의 경우, 대조군에 대비 pH6.0에서 FcRn과의 결합친화력이 가장 좋았으나 physical pH인 7.4에서의 상대적 해리값이 가장 높아 효율적 해리가 되지 않았다 (도 13). 많은 문헌에서 보고된 바에 따르면 이런 경향성은 실제 체내 약동학에서의 반감기 감소가 예측되며, 두 변이체 pFc29와 pFc41에 비해 길지 않을 수도 있음이 예측되었다. 대조군의 경우 pH7.4에서의 효율적 해리는 가장 좋으나 실제 endosome의 pH 6.0에서의 결합력이 너무 약해 이 또한 체내 반감기가 길지 않음을 예측 할 수 있다.

[0178] **실시예 5: Nivolumab (IgG4) Fc 이중 변이체간의 항체의존적 세포독성 (ADCC)에서의 Effector Silencing 효과 확인**

[0179] Nivolumab (IgG4) Fc 변이체들에 TL 돌연변이가 추가된 이중 변이체간의 ADCC(Antibody-Dependent Cellular

Mediated Cytotoxicity) 반응성을 비교하기 위하여 hPD-1을 과발현시킨 Raji cell (Raji-hPD-1 cell, Invivogen, raji-hpd1)을 target cell로 선정하여 실험을 진행하였다.

[0180] ADCC assay 시험수행 당일에 Raji-hPD-1 cell을 96 well white plate (Thermo Fisher Scientific, 136101)에 각각의 well에 $1.25x10^4$의 세포수가 들어가도록 assay buffer에 cell number를 계수하여 cells을 seeding하고, 시험물질 (이중 변이체들)을 assay buffer에 최고농도 1 ug/mL, 1/3 dilution, 10 point가 되도록, cells이 seeding된 96 well white plate 에 처리하였다. Effector cell을 액체질소 용기에서 꺼내어 재빠르게 녹여서, Effector cell과 target cell의 비율이 25:1이 되도록 96 well white plate에 처리한 후 CO_2 incubator (37℃, 5% CO_2 조건)에서 6시간동안 반응 시켰다. 시간이 경과되면 plate를 꺼내어 EnSpire (Perkin Elmer) 장비를 활용하여 Luminescence fold를 측정함으로써 결과 값을 수집하였다. 측정결과 Nivolumab (IgG4)에 도입된 각 original form 변이체들의 ADCC 반응성은 예상대로 거의 효과 없음으로 확인되었고, original form IgG4 (변이체 포함)들에 미미하게 보이던 ADCC 효과도 TL 돌연변이 도입된 이중 변이체 형태에선 ADCC 반응성이 완전히 없어지는 것으로 확인되었다(도 14).

[0182] **실시예 6: 반감기 증가와 면역작용기작 제거된 Nivolumab (IgG4) TL 변이체에 대한 hFcRn Tg 마우스 약동학**

[0183] 반감기 증가 돌연변이인 LS, PFc29, PFc41과 면역작용기작이 저해되는 것으로 보고되어 있는 TL (T299L) 돌연변이를 도입하여 제작된 IgG4 기반 Nivolumab에 대하여 인간 FcRn Tg 마우스 (Jackson Lab., JAX#004919)를 이용하여 혈중반감기 향상효과를 비교검증하였다.

[0184] Fc 변이체를 포함한 4종의 Nivolumab에 대해 인간 FcRn Tg 마우스 24마리(각 군당 6마리씩 6mg/kg을 I.V (미정맥)로 주사후 facial vein에서 개체별 교차채혈 (총 12회 → 0.5, 2, 8, 24, 72hr (0, 1, 4, 12, 72hr), 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 day)에서 얻어진 혈액을 이용하여 ELISA로 농도분석한 후 Phoenix WinNonlin™ (Certara, ver.8.1.0)으로 non-compartmental analysis (NCA) 실시하였다. ELISA 분석결과를 통해 산출된 4종의 약동학 변수를 조사하였다 (표 3).

[0185] 그 결과, IgG4 항체인 Nivolumab에 도입된 혈중 반감기 변이체 (LS, pFc29와 pFc41)에 TL (T299L) 추가 돌연변이를 도입한 변이체 중 XenCore의 LS mutants의 경우엔 TL 추가 변이체 도입후 반감기가 대조군보다 더 감소됨이 확인 되었다. 이는 pH 7.4 (그림 11)에서의 해리가 다른 두 변이체보다 상대적으로 되지 않고 추가 돌연변이 도입에 따른 상대적 불안정성에 기인한 것으로 추측된다. 반면에, pFc29와 pFc41 두 변이체는 IgG4 backbone 도입시 TL 추가 변이체 도입하에서 immune effector silencing 효과를 극대화 시키고 반감기도 안정적으로 유지시킴을 확인 (표 3)하였다.

표 3

[0187] hFcRn Tg 마우스를 이용한 Nivolumab Fc 돌연변이체의 PK 분석

Antibody[a]	Antigen	Animals per Group	Half-Life[b] (days)			AUC[b] (d*ug/mL)		Clearance[b] (mL/d/kg)	
			Mean	SD	Fold[c]	Mean	SD	Mean	SD
WT-TL	PD-1	6	7.4	1.8	1.0	506.7	132.1	12.24	3.36
LS-TL	PD-1	6	6.53	2.8	0.88	418.2	94.7	14.64	3.6
pF29-TL	PD-1	6	10.6	7.5	1.4	552.3	212.2	11.52	2.88
pF41-TL	PD-1	6	8.7	1.8	1.2	513.5	141.8	12.24	3.36

[0188] [a]The Fc region of anti-PD1 Ab (Nivolumab) for the Fc engineered version. Dose level and route : single i.v.infusion at 6 mg/kg.

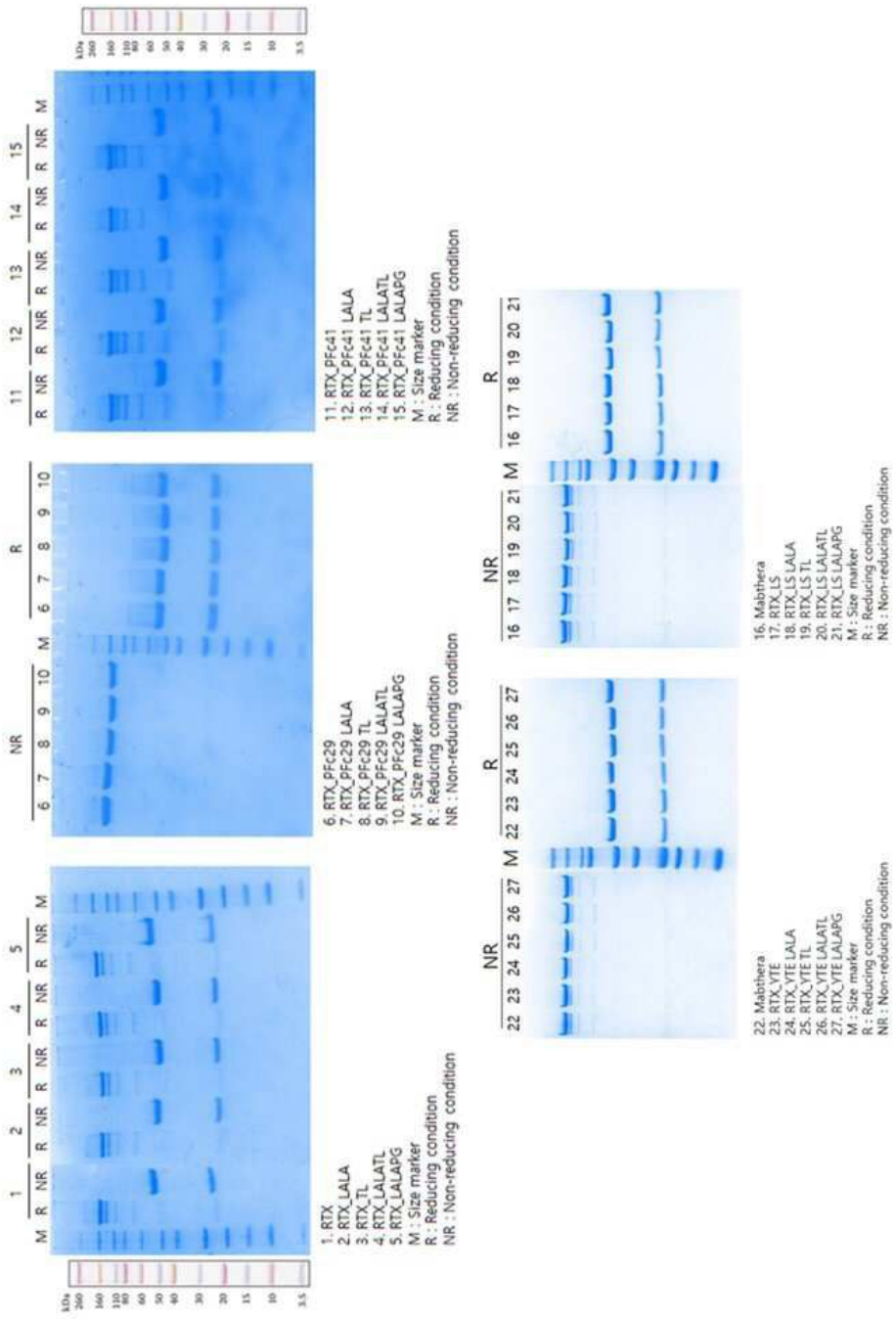
[0189] [b]Half-life, area under the curve (AUC), and clearance were computed for individual animals using noncompartment methods and are reported as the mean and standard deviation (SD).

[0190] [c]Fold half-life=half-life (double variant in Nivo) / half-life (Nivo-single variant (IgG4+TL))

[0192] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

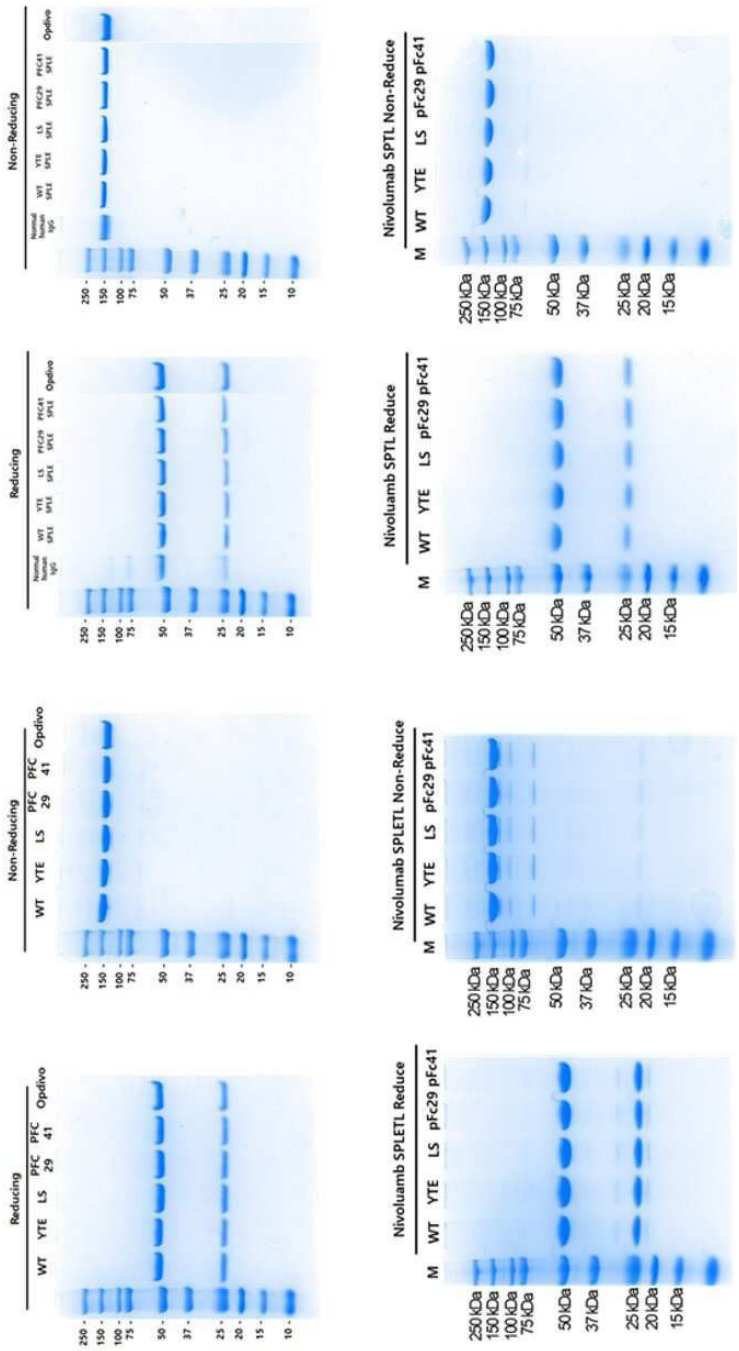
도면1



도면2

Peak	Retention time	Peak area	% Area
RTX	7.315	791153	99.56
RTX_LALA	7.280	762505	99.86
RTX_TL	7.309	769301	99.16
RTX_LALATL	7.289	792683	99.24
RTX_LALAPG	7.308	839065	99.78
RTX_PFc29	7.924	792193	100
RTX_PFc29 LALA	7.886	983786	100
RTX_PFc29 TL	7.889	790134	100
RTX_PFc29 LALATL	7.888	784362	96.15
RTX_PFc29 LALAPG	7.895	864123	100
RTX_PFc41	7.901	829144	100
RTX_PFc41 LALA	7.876	837860	100
RTX_PFc41 TL	7.877	776684	91.31
RTX_PFc41 LALATL	7.870	731618	92.17
RTX_PFc41 LALAPG	7.886	839709	100
RTX_LS	7.948	787789	98.08
RTX_LS LALA	7.925	776743	98.00
RTX_LS TL	7.920	778050	96.89
RTX_LS LALATL	7.914	748567	96.94
RTX_LS LALAPG	7.922	790430	97.79
RTX_YTE	7.947	582341	97.55
RTX_YTE LALA	7.913	748235	97.92
RTX_YTE TL	7.929	784094	98.34
RTX_YTE LALATL	7.921	794007	98.39
RTX_YTE LALAPG	7.913	843038	98.88

도면3


Non-Reducing
Normal human IgG
WT SPLE
YTE SPLE
LS SPLE
PFC29 SPLE
PFC41 SPLE
Opdivo
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
Nivolumab SPTL Non-Reduce
M WT YTE LS pFc29 pFc41
250kDa
150kDa
100kDa
75kDa
50kDa
37kDa
25kDa
20kDa
15kDa
Reducing
Nivoluamb SPTL Reduce
Non-Reducing
WT YTE LS PFC 29 PFC 41 Opdivo
Nivolumab SPLETL Non-Reduce
Reducing
Nivoluamb SPLETL Reduce

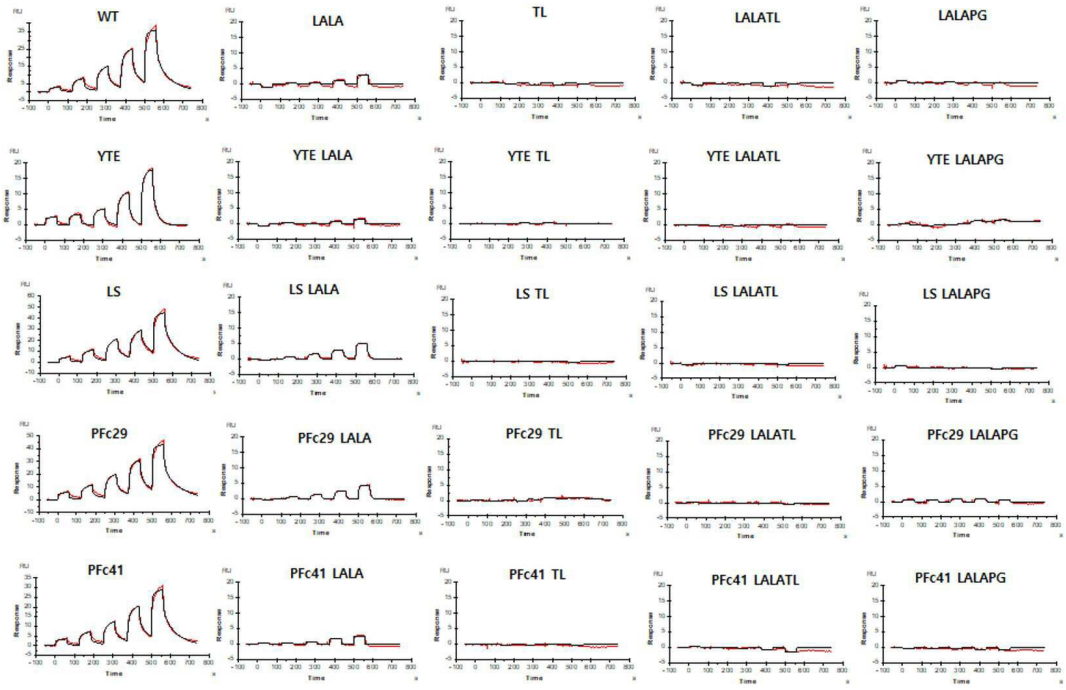
도면4

Peak	Retention time	Peak area	% Area
Nivolumab	7.27	742733	98.38
Nivolumab_YTE	7.243	743401	98.22
Nivolumab_LS	7.291	738858	98.81
Nivolumab_pFc29	7.353	837847	99.13
Nivolumab_pFc41	7.287	681476	99.18
Nivolumab_SPLE	7.188	1298899	98.90
Nivolumab_YTE_SPLE	7.160	352103	98.93
Nivolumab_LS_SPLE	7.187	1263869	97.60
Nivolumab_pFc29_SPLE	7.251	1012856	98.58
Nivolumab_pFc41_SPLE	7.180	467757	99.50
Nivolumab_SPLETL	7.241	624076	100
Nivolumab_YTE_SPLETL	7.238	767377	99.01
Nivolumab_LS_SPLETL	7.249	744737	96.35
Nivolumab_pFc29_SPLETL	7.316	755728	100
Nivolumab_pFc41_SPLETL	7.245	749902	100
Nivolumab_SPTL	7.286	607433	98.60
Nivolumab_YTE_SPTL	7.261	574523	98.64
Nvoluma_LS_SPTL	7.271	547938	98.16
Nivolumab_pFc29_SPTL	7.353	664421	99.18
Nivolumab_pFc41_SPTL	7.283	645775	99.21

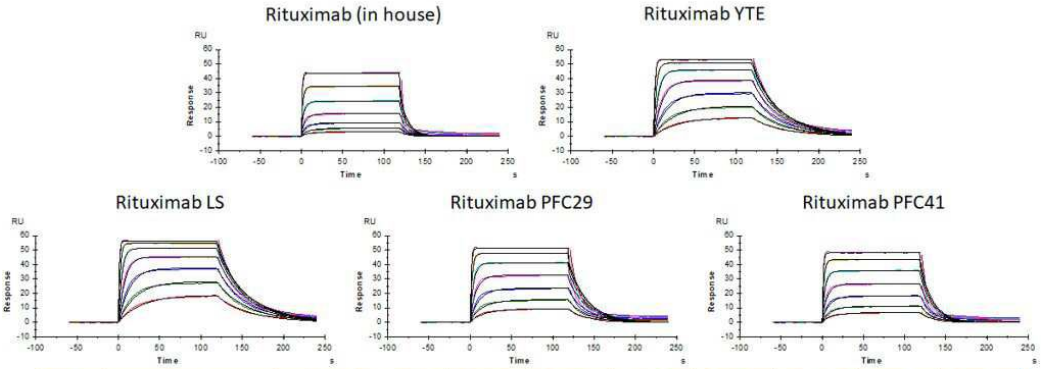
도면5

Sensor chip		CM5 chip
Analysis temperature		25 °C
Running buffer		PBS-P+
Capture (his capture)	**Sample**	CD16a Protein, Human, Recombinant (ECD, F176V, His Tag) (Sino biological, 10389-H08H1)
	Capture level (RU)	~ 80 RU
	Injection conc. (㎍/ml)	1 ㎍/ml (stabilization 120s)
	Flow rate (㎕/min)	5 ㎕/min
	Contact time (sec)	30 sec
Analyte	**Sample**	RTX variants
	Dose (nM)	0.31 ~ 10 nM
	Flow rate (㎕/min)	30 ㎕/min
	Association time (min)	1 min
	Dissociation time (min)	3 min
Regeneration	**Buffer**	10 mM glycine pH 1.5
	Flow rate (㎕/min)	30 ㎕/min
	Regeneration time (sec)	30 sec
	Stabilization period (sec)	-
Evaluation		Two state reaction model

도면6

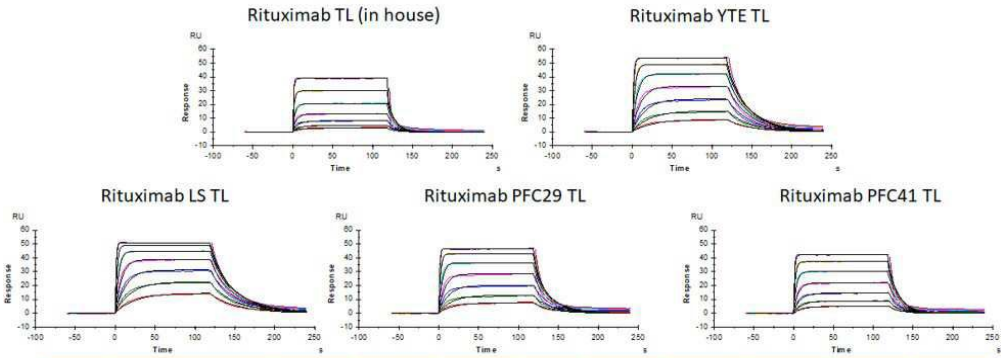


도면7a



pH	Ligand	Analyte	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	Kd(M)	Rmax(RU)	Chi²(RU²)	U-value	SE(ka)	SE(kd)
pH 6.0	Rituximab (in house)	FcRn	6.370E+05	1.025E-01	1.609E-07	31.1	1.2	6.9	1.5E+04	2.6E-03
	Rituximab YTE		7.474E+05	3.790E-02	5.071E-08	53.5	0.6	1.1	3.5E+03	1.9E-04
	Rituximab LS		1.115E+06	3.590E-02	3.220E-08	56.0	0.6	1.1	4.6E+03	1.6E-04
	Rituximab PFC29		7.194E+05	4.378E-02	6.085E-08	42.3	2.6	3.1	5.8E+03	1.7E-04
	Rituximab PFC41		7.402E+05	6.555E-02	8.856E-08	41.2	1.9	4.1	6.8E+03	3.0E-04

도면7b

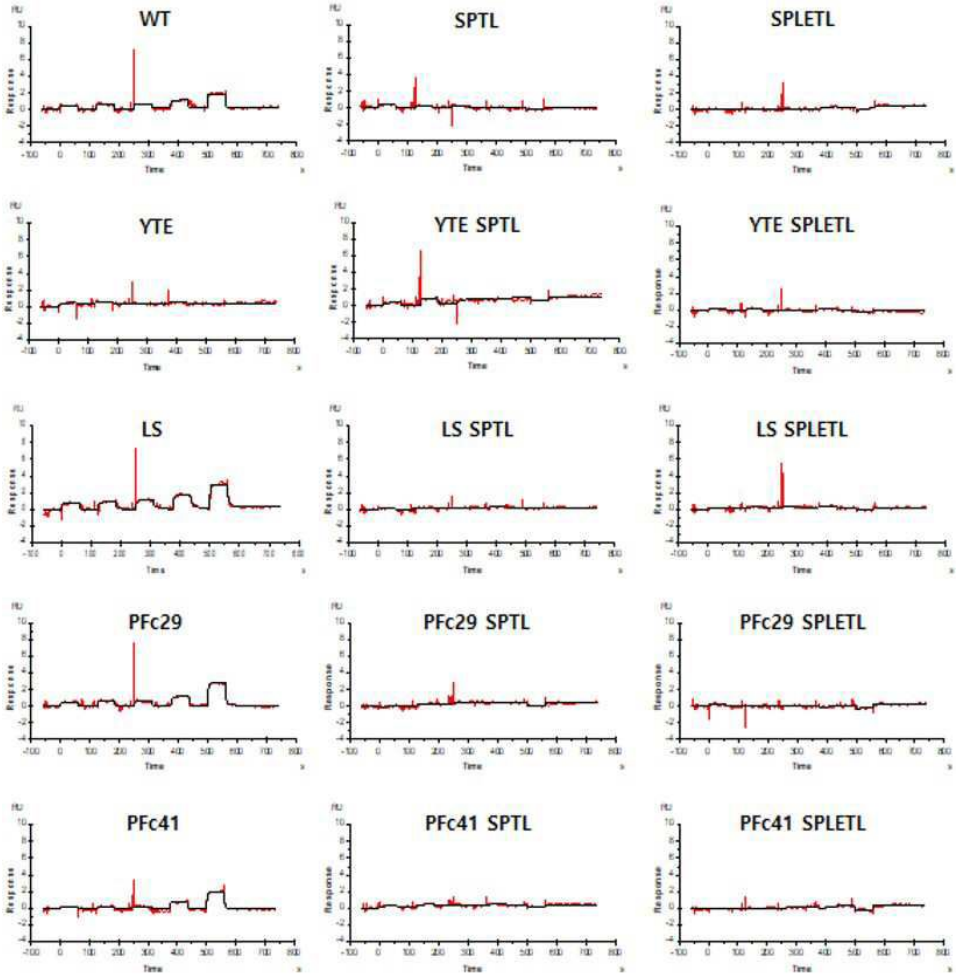


pH	Ligand	Analyte	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	Kd(M)	Rmax(RU)	Chi²(RU²)	U-value	SE(ka)	SE(kd)
pH 6.0	Rituximab (in house) TL	FcRn	6.968E+05	1.032E-01	1.481E-07	23.9	0.6	5.3	8.7E+03	6.7E-04
	Rituximab YTE TL		6.051E+05	4.587E-02	7.581E-08	51.3	1.1	2.4	4.9E+03	4.0E-04
	Rituximab LS TL		1.135E+06	4.661E-02	4.106E-08	50.1	0.7	1.9	7.2E+03	3.2E-04
	Rituximab PFC29 TL		1.371E+06	1.066E-01	7.776E-08	42.2	1.7	6.9	3.1E+04	2.7E-03
	Rituximab PFC41 TL		7.471E+05	7.367E-02	9.861E-08	35.8	1.3	4.1	7.2E+03	3.6E-04

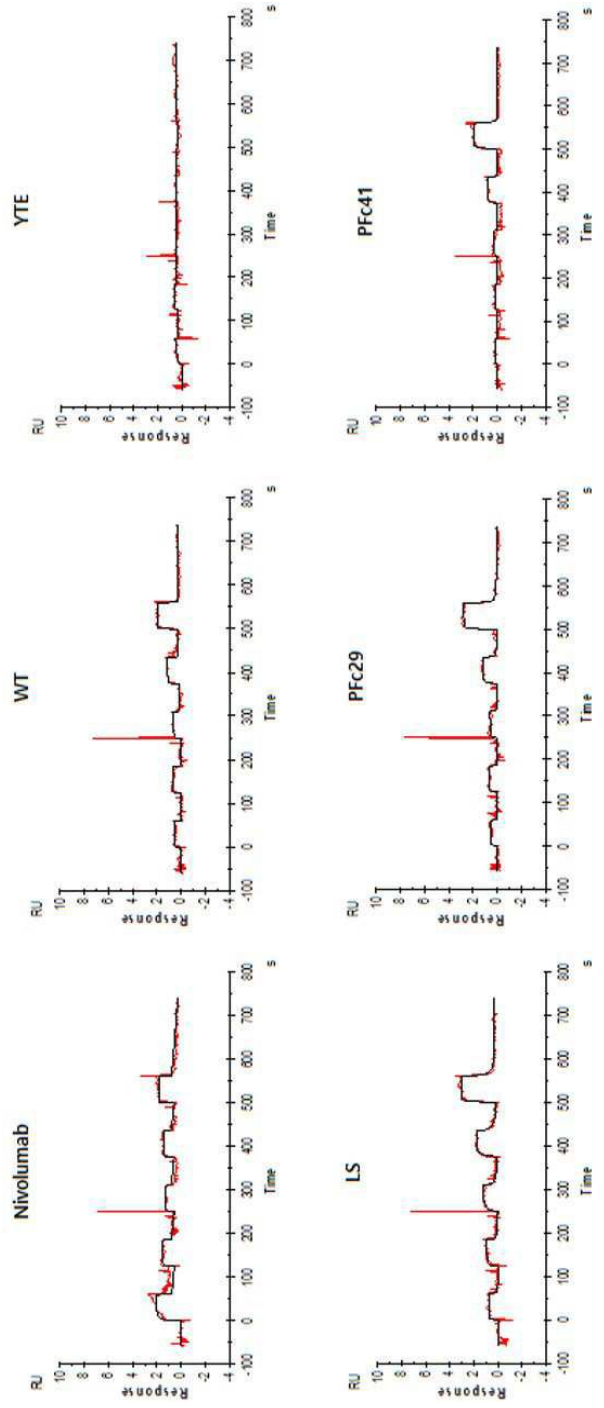
도면8

Sensor chip		CM5 chip
Analysis temperature		25 °C
Running buffer		PBS-P+
Capture (his capture)	**Sample**	CD16a Protein, Human, Recombinant (ECD, F176V, His Tag) (Sino biological, 10389-H08H1)
	Capture level (RU)	~ 95 RU
	Injection conc. (㎍/ml)	1 ㎍/ml (stabilization 120s)
	Flow rate (㎕/min)	5 ㎕/min
	Contact time (sec)	30 sec
Analyte	**Sample**	Nivolumab variants
	Dose (nM)	3.7 ~ 300 nM
	Flow rate (㎕/min)	30 ㎕/min
	Association time (min)	1 min
	Dissociation time (min)	3 min
Regeneration	**Buffer**	10 mM glycine pH 1.5
	Flow rate (㎕/min)	30 ㎕/min
	Regeneration time (sec)	30 sec
	Stabilization period (sec)	-
Evaluation		Two state reaction model

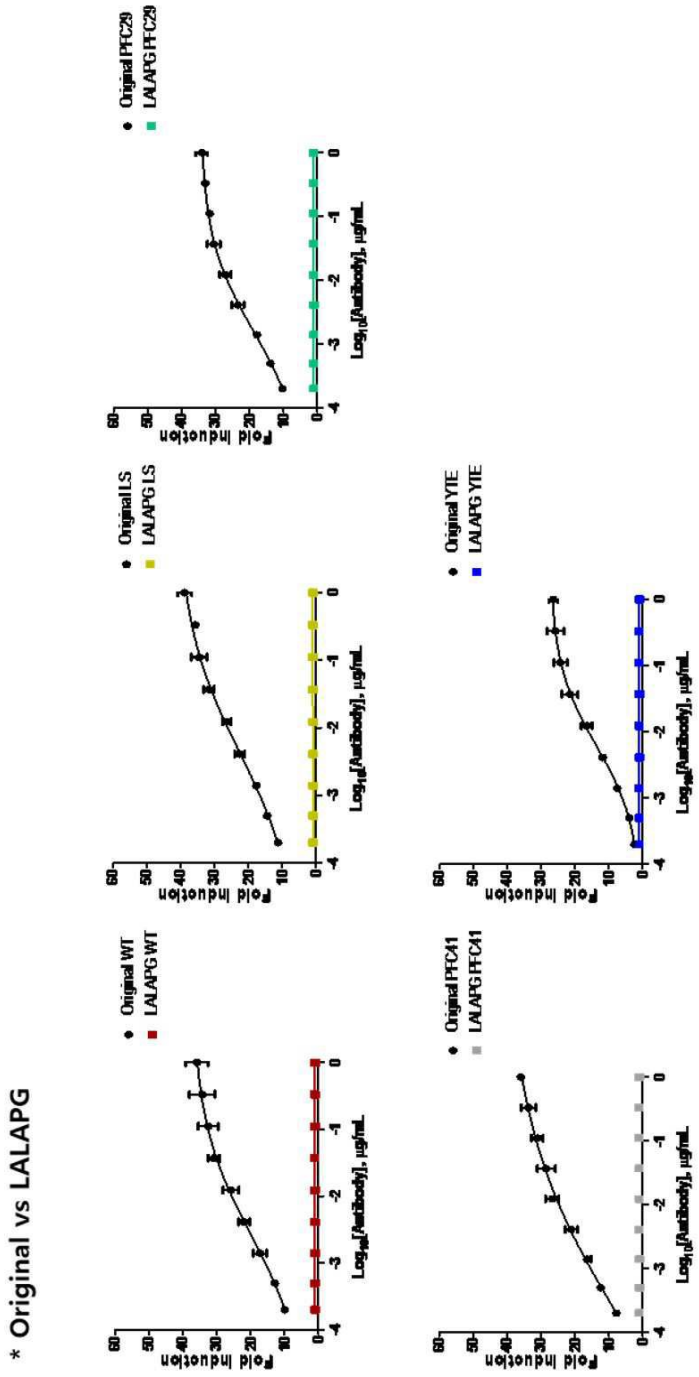
도면9a


WT
SPTL
SPLETL
YTE
YTE SPTL
YTE SPLETL
LS
LS SPTL
LS SPLETL
PFc29
PFc29 SPTL
PFc29 SPLETL
PFc41
PFc41 SPTL
PFc41 SPLETL

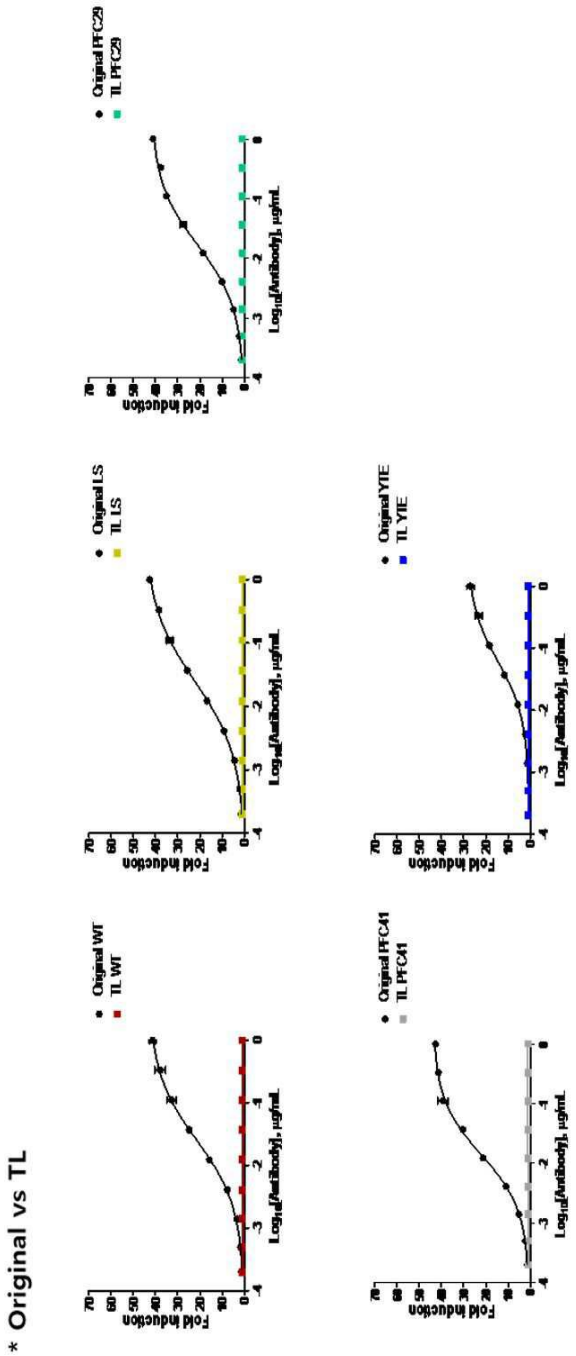
도면9b



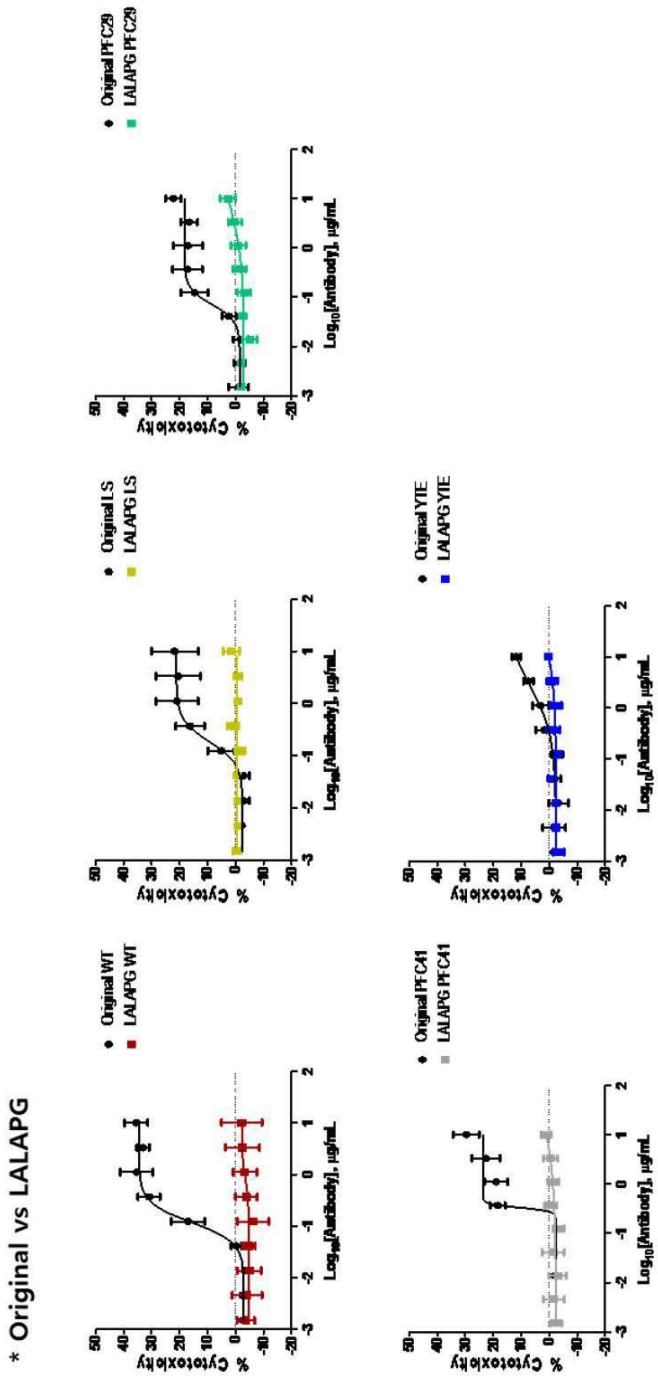
도면10a


* Original vs LALAPG
Original WT
LALAPG WT
Original LS
LALAPG LS
Original YTE
LALAPG YTE
Original PFC29
LALAPG PFC29
Original PFC41
LALAPG PFC41
Fold Induction
Log10[Antibody], μg/mL

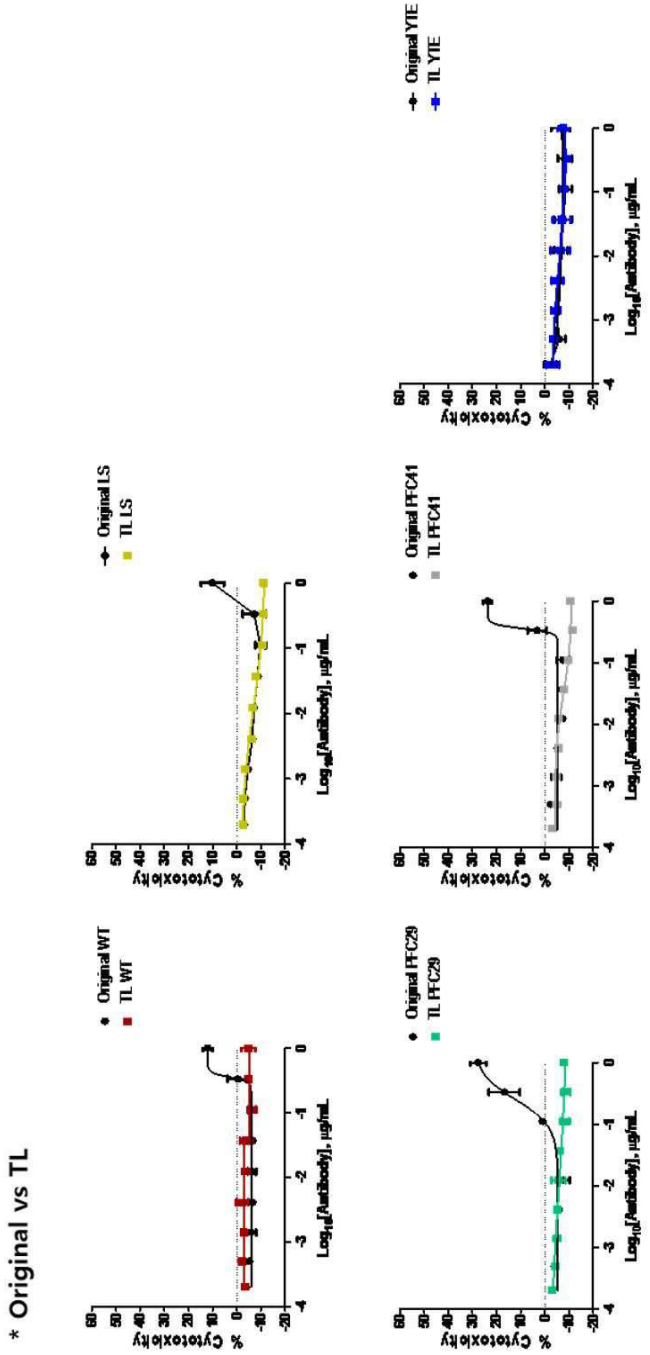
도면10b


* Original vs TL
Original WT
TL WT
Original LS
TL LS
Original YIE
TL YIE
Original PFC29
TL PFC29
Original PFC41
TL PFC41
Fold induction
Log10[Antibody], μg/mL

도면11a


* Original vs LALAPG
Original WT
LALAPG WT
Original LS
LALAPG LS
Original YTE
LALAPG YTE
Original PFC41
LALAPG PFC41
Original PFC29
LALAPG PFC29
% Cytotoxicity
Log10[Antibody], μg/mL

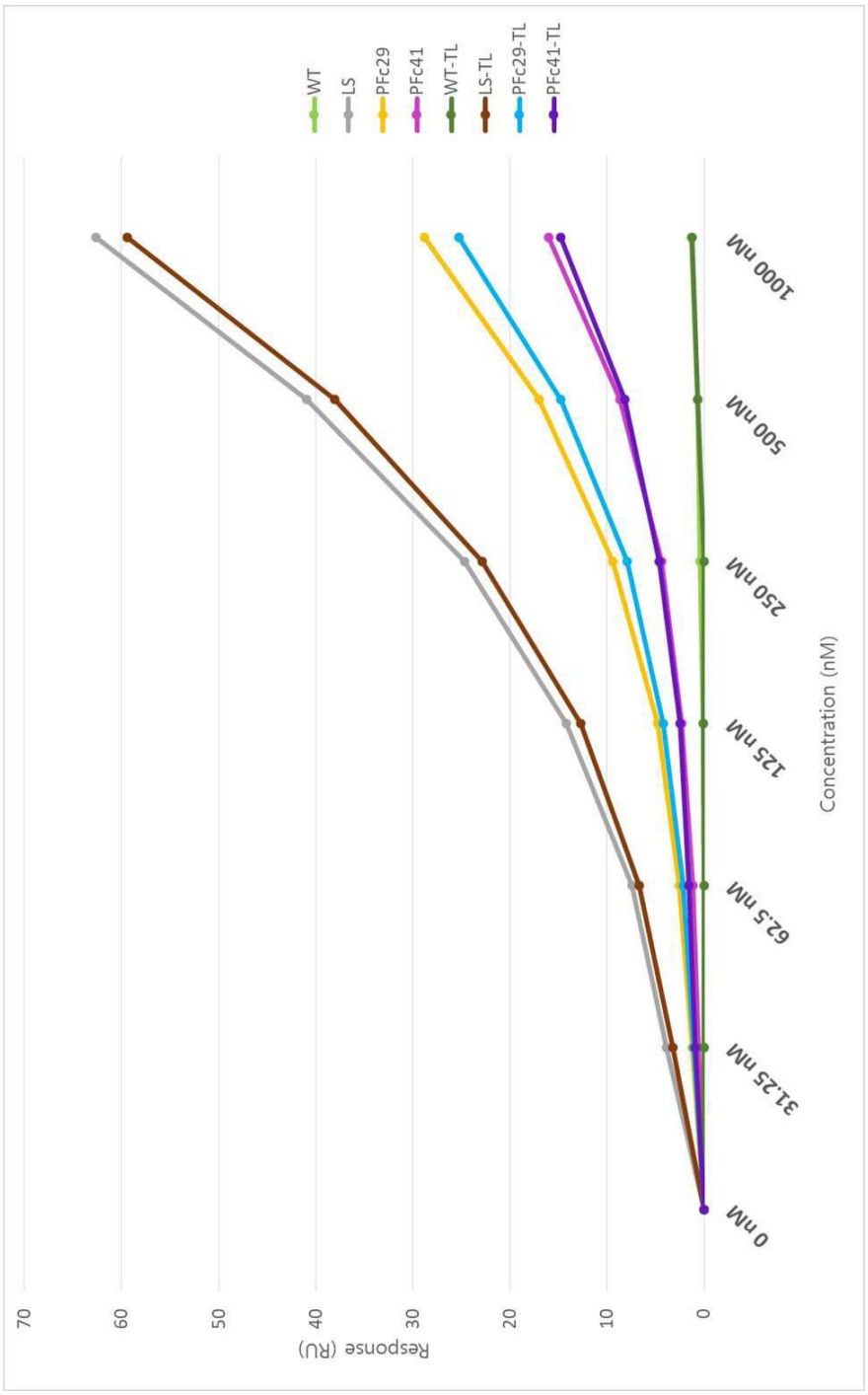
도면11b



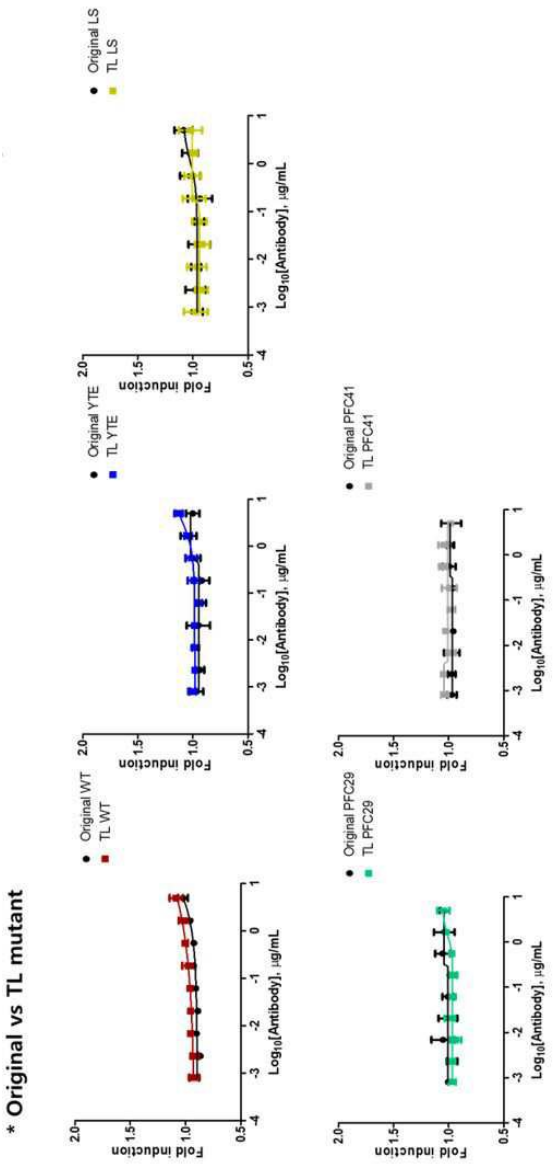
도면12

Variant Name	K_{on} (1/nM*s)	K_{off} (1/s)	K_D (nM)	Fold K_D
Nivo (WT)-TL	0.0000024	0.011	4,583	1.0
Nivo-LS-TL	0.000728	0.150	206	22
Nivo-pFc29-TL	0.000759	0.399	525	8.7
Nivo-pFc41-TL	0.000694	0.446	642	7.1

도면13


WT
LS
PFc29
PFc41
WT-TL
LS-TL
PFc29-TL
PFc41-TL
Response (RU)
70
60
50
40
30
20
10
0
Concentration (nM)
1000 nM
500 nM
250 nM
125 nM
62.5 nM
31.25 nM
0 nM

도면14



서 열 목 록

<110> Osong Hi-Tech Medical Industry Promotion Foundation

Korea University Research and Business Foundation

<120> Fc Variants with Modulated Effector Functions and Prolonged Serum Half-Lives

<130> HPC-10740

<150> KR 10-2021-0076561

<151> 2021-06-14

<160> 45

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rituximab

<400> 1

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 Ala 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> 2

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rituximab-YTE

<400> 2

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 Ala 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 Tyr
245 250 255

Ile Thr Arg Glu 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> 3

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rituximab-LS

<400> 3

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 Ala 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 Leu
420 425 430

His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

435 440 445

Pro Gly Lys

450

<210> 4

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rituximab-PFc29

<400> 4

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 Ala 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 Arg 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 Leu

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> 5

<211> 451

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Rituximab-PFc41

<400> 5

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 Ala 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 Gly 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 Leu

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> 6

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rituximab-LALA

<400> 6

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 Ala Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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> 7

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rituximab-YTE-LALA

<400> 7

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 Ala Glu Pro Lys Ser Cys

210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly

225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr

245 250 255

Ile Thr Arg Glu 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> 8

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rituximab-LS-LALA

<400> 8

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 Ala Glu Pro Lys Ser Cys

210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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 Leu

420 425 430

His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

435 440 445

Pro Gly Lys

450

<210> 9

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rituximab-PFc29-LALA

<400> 9

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 Ala Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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 Arg 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 Leu
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> 10

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rituximab-PFc41-LALA

<400> 10

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 Ala Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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 Gly 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 Leu
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> 11

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rituximab- LALAPG

<400> 11

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 Ala Glu Pro Lys Ser Cys

210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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 Gly 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> 12

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rituximab-YTE-LALAPG

<

400> 12

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 Ala Glu Pro Lys Ser Cys

210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly

225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr

245 250 255

Ile Thr Arg Glu 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 Gly 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> 13

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rituximab-LS-LALAPG

<400> 13

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 Ala Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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 Gly 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 Leu
420 425 430
His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445
Pro Gly Lys
450

<210> 14
<211> 451
<212> PRT
<213
> Artificial Sequence
<220><223> Rituximab-PFc29-LALAPG
<400> 14

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 Ala Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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 Arg Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly 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 Leu
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> 15
<211> 451
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Rituximab-PFc41-LALAPG
<400> 15

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 Ala Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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 Gly His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly 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 Leu
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> 16
<211> 451
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Rituximab-TL
<400> 16
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 Ala 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 Leu 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> 17

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rituximab-YTE-TL

<400> 17

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 Pro Lys Ser

210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu

225 230 235 240

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

245 250 255

Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Leu

290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro

325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val

355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr

405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

435 440 445

Ser Pro Gly Lys

450

<210> 18

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rituximab-LS-TL

<400> 18

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 Pro Lys Ser

210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu

225 230 235 240

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

245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Leu

290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro

325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val

355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

385 390 395 400

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

<210> 19
<211> 451
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Rituximab-PFc29-TL

<400> 19
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 Ala 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 Leu Tyr
290 295 300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Arg 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 Leu
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> 20
<211> 451
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Rituximab-PFc41-TL
<400> 20
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 Ala 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 Leu Tyr
290 295 300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Gly 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 Leu

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> 21

<211> 451

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Rituximab-LALATL

<400> 21

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 Ala Glu Pro Lys Ser Cys

210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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 Leu 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 Gly 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> 22

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rituximab-YTE-LALATL

<400> 22

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 Ala Glu Pro Lys Ser Cys

210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly

225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr

245 250 255

Ile Thr Arg Glu 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 Leu 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 Gly 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> 23
<211> 451
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Rituximab-LS-LALATL
<400> 23
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 Ala Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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 Leu 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 Gly 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 Leu
420 425 430

His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 24
<211> 451
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Rituximab-PFc29-LALATL
<400> 24

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 Ala Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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 Leu Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Arg Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly 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 Leu

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> 25

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rituximab-PFc41-LALATL

<400> 25

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 Ala Glu Pro Lys Ser Cys

210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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 Leu Tyr

290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Gly His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly 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 Leu

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> 26

<211> 440

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nivolumab

<400> 26

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser

20 25 30

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

35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp

130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr

145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr

165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys

180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp

195 200 205

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

210 215 220

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

225 230 235 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

245 250 255

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val

260 265 270

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

275 280 285

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly

305 310 315 320

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

325 330 335

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr

340 345 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

355 360 365

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

435 440

<210> 27
<211> 440
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nivolumab-YTE
<400> 27
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp

130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr

145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr

165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys

180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp

195 200 205

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

210 215 220

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

225 230 235 240

Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val

245 250 255

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val

260 265 270

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

275 280 285

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly

305 310 315 320

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

325 330 335

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr

340 345 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

355 360 365

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

370 375 380

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

385 390 395 400

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe

405 410 415

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

435 440

<210> 28

<211> 440

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nivolumab-LS

<400> 28

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser

20 25 30

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

35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp

130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr

145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr

165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys

180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp

195 200 205

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

210 215 220

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

225 230 235 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

245 250 255

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val

260 265 270

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

275 280 285

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly

305 310 315 320

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

325 330 335

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr

340 345 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

355 360 365

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

370 375 380

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
385 390 395 400
Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
405 410 415
Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430
Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 29
<211> 440
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Nivolumab-PFc29
<400> 29
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp

130 135 140

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

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

275 280 285

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

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
355 360 365
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

370 375 380

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

385 390 395 400

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe

405 410 415

Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

435 440

<210> 30

<211> 440

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nivolumab-PFc41

<400> 30

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser

20 25 30

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

35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp

130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr

145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr

165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys

180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp

195 200 205

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

210 215 220

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

225 230 235 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

245 250 255

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val

260 265 270

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

275 280 285

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Gly His Gln

290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly

305 310 315 320

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

325 330 335

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr

340 345 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

355 360 365

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

370 375 380

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

385 390 395 400

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

<210> 31
<211> 440
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nivolumab-SPLE
<400> 31
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

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

145 150 155 160

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

225 230 235 240
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
245 250 255
Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
260 265 270
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
275 280 285
Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
290 295 300

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

370 375 380
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
385 390 395 400

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
405 410 415
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430
Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 32

<211> 440
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nivolumab-YTE-SPLE
<400> 32
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
115 120 125

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

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

195 200 205
Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
210 215 220
Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
225 230 235 240
Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val
245 250 255
Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
260 265 270

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

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

405 410 415

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 33

<211> 440

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nivolumab-LS-SPLE

<400> 33

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

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr

165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
180 185 190
Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205
Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
210 215 220
Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
225 230 235 240
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

245 250 255
Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
260 265 270
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
275 280 285
Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
290 295 300
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
305 310 315 320

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
325 330 335
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
340 345 350
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
355 360 365
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
370 375 380
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

385 390 395 400
Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
405 410 415

Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 34

<211> 440

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nivolumab-PFc29-SPLE

<400> 34

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

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
180 185 190
Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205
Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
210 215 220

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

290 295 300
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
305 310 315 320
Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
325 330 335
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
340 345 350
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
355 360 365

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

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

435 440

<210> 35

<211> 440

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nivolumab-PFc41-SPLE

<400> 35

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

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

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

115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys

180 185 190

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

260 265 270
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
275 280 285
Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Gly His Gln
290 295 300
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
305 310 315 320
Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
325 330 335

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

405 410 415
Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

435 440

<210> 36

<211> 440

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nivolumab-SPLETL

<400> 36

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser

20 25 30

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

35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp

130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr

145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr

165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys

180 185 190

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

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

305 310 315 320
Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
325 330 335
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
340 345 350
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
355 360 365
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
370 375 380

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
385 390 395 400
Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
405 410 415
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430
Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 37

<211> 440

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nivolumab-YTE-SPLETL

<400> 37

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

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp

130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp

195 200 205

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

275 280 285
Phe Asn Ser Leu Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
290 295 300
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
305 310 315 320
Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
325 330 335
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
340 345 350

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

420 425 430
Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 38

<211> 440

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nivolumab-LS-SPLETL

<400> 38

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

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30

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

35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys

180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205

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

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
260 265 270
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
275 280 285
Phe Asn Ser Leu Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
290 295 300
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
305 310 315 320
Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

325 330 335
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
340 345 350
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
355 360 365
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
370 375 380
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
385 390 395 400

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
405 410 415
Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430
Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440
<210> 39
<211> 440

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nivolumab-PFc29-SPLETL

<400> 39

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser

20 25 30

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

35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp

130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr

145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr

165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys

180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp

195 200 205

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

210 215 220

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

290 295 300
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
305 310 315 320
Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
325 330 335
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
340 345 350
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
355 360 365

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

435 440

<210> 40
<211> 440

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nivolumab-PFc41-SPLETL

<400> 40

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

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

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

115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
210 215 220

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

260 265 270
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
275 280 285
Phe Asn Ser Leu Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Gly His Gln
290 295 300
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
305 310 315 320
Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
325 330 335

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

405 410 415
Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430
Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 41
<211> 440
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Nivolumab-SPTL

<400> 41

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

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
210 215 220

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

225 230 235 240

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

305 310 315 320
Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
325 330 335
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
340 345 350
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
355 360 365
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
370 375 380

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
385 390 395 400
Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
405 410 415
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430
Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 42
<211> 440
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Nivolumab-YTE-SPTL

<400> 42

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

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp

130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
210 215 220

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
225 230 235 240

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

275 280 285
Phe Asn Ser Leu Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
290 295 300
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
305 310 315 320
Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
325 330 335
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
340 345 350

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

420 425 430
Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 43
<211> 440
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nivolumab-LS-SPTL
<400> 43

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

35 40 45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
115 120 125
Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys

180 185 190
Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205
Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
210 215 220
Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
225 230 235 240
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

245 250 255

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
260 265 270
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
275 280 285
Phe Asn Ser Leu Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
290 295 300
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
305 310 315 320
Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

325 330 335
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
340 345 350
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
355 360 365
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
370 375 380
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
385 390 395 400

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

<210> 44
<211> 440
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nivolumab-PFc29-SPTL
<400> 44
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

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

85 90 95
Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
115 120 125
Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

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

225 230 235 240
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
245 250 255

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
260 265 270
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
275 280 285
Phe Asn Ser Leu Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Arg
290 295 300

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

370 375 380
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
385 390 395 400
Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
405 410 415
Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430
Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 45

<211> 440
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nivolumab-PFc41-SPTL
<400> 45
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
115 120 125

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

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

260 265 270

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

340 345 350
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
355 360 365
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
370 375 380
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
385 390 395 400
Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
405 410 415

Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430
Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440