



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년04월08일

(11) 등록번호 10-1379568

(24) 등록일자 2014년03월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/28 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7007364

(22) 출원일자(국제) 2006년08월25일

심사청구일자 2011년08월25일

(85) 번역문제출일자 2008년03월26일

(65) 공개번호 10-2008-0040036

(43) 공개일자 2008년05월07일

(86) 국제출원번호 PCT/IB2006/003294

(87) 국제공개번호 WO 2007/031875

국제공개일자 2007년03월22일

(30) 우선권주장

60/711,454 2005년08월26일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

W02005044859 A2\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

로슈 글리카트 아게

스위스 솔리렌-취리히 체하-8952 바기슈트라쎄 18

(72) 발명자

우마나 파블로

스위스 체하-8032 취리히 프라이슈트라쎄 159

모쓰너 에케하르트

스위스 체하-8280 크로이츨링엔 펠젠후르크베크 5

(74) 대리인

특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 28 항

심사관 : 이미옥

(54) 발명의 명칭 변형된 세포 신호 활성을 가진 개질된 항원 결합 분자

### (57) 요 약

본 발명은 개질된 항원 결합 분자 (ABM)에 관한 것이다. 특별한 구현예에서, 본 발명은 표적 항원에 의한 세포 신호 활성을 매개하는 능력이 변형되고/거나 또는 하나 이상의 표적 항원의 가교를 매개하는 능력이 변형된 키메라, 영장류화된 또는 인간화된 항체 또는 절편을 포함하는 재조합 모노클로날 항체 또는 절편에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 그러한 개질된 ABM을 암호화하는 핵산 분자, 및 상기 핵산 분자를 포함하는 벡터 및 숙주 세포에 관한 것이다. 본 발명은 추가로, 본 발명의 개질된 ABM의 제조 방법, 및 질환의 치료에 상기 개질된 ABM을 사용하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 증가된 Fc 수용체 결합 및 증가된 효과기 기능을 가진 항체를 포함하여, 향상된 치료 특성을 가진 개질된 글리코실화가 있는 개질된 ABM에 관한 것이다.

### 대 표 도

1F5-VH	1 QVOLRQPGAEVVKPGASVMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQFKKGATL
B9E9-VH	1 .....
C2B8-VH	1 .....
2H7-VH	1 .....
B-1y1-VH	1 .....
2F2-VH	1 .....
7D8-VH	1 .....
11B8-VH	1 .....
1F5-VH	71 TADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARS-HYGS-NYVDYF---DYWGQGTIVTVST
B9E9-VH	71 .....
C2B8-VH	71 .....
2H7-VH	71 .....
B-1y1-VH	71 .....
2F2-VH	71 .....
7D8-VH	71 .....
11B8-VH	71 .....

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

젖과 B-Ly1 항체의 중쇄 가변 영역과 비교해 중쇄 가변 영역의 프레임워크 영역 1 (framework region 1, FR1)에서 하나 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함하는 상기 중쇄 가변 영역을 포함하는 개질된 항-CD20 항체 또는 항원 결합 프래그먼트로서, 상기 FR1 이 SEQ ID NO:63 의 Kabat 위치 8 내지 13에서 아미노산 서열을 포함하고, 상기 개질된 항체 또는 항원 결합 프래그먼트가 CD20 과 복합체를 이루는 경우, 젖과 B-Ly1 항원 결합 분자가 CD20 과 복합체를 이루는 경우에 비해 높은 수준의 세포자멸사를 유도하며, 하기로 포함하는 개질된 항체 또는 항원 결합 프래그먼트:

SEQ ID NO: 12 의 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는 제 1 단리된 폴리펩티드 및 SEQ ID NO: 134 의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 제 2 단리된 폴리펩티드.

### 청구항 2

삭제

### 청구항 3

삭제

### 청구항 4

삭제

### 청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 프래그먼트가 양분된 올리고사카라이드 복합체의 양이 증가하도록 글리코엔지니어링된 Fc 영역을 포함하는 항체 또는 항원 결합 프래그먼트.

### 청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 프래그먼트가 푸코스 잔기의 양이 감소하도록 글리코엔지니어링된 Fc 영역을 포함하는 항체 또는 항원 결합 프래그먼트.

### 청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 프래그먼트가 증가된 하나 이상의 효과기 기능, 증가된 Fc 수용체 결합 친화성 또는 이를 모두를 나타내도록 개질된 N-연결 올리고사카라이드를 갖는 Fc 영역을 포함하는 항체 또는 항원 결합 프래그먼트.

### 청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 항체의 Fc 영역 내 올리고사카라이드 중 20 % 이상이 양분되고, 비푸코실화된 항체 또는 항원 결합 프래그먼트.

### 청구항 9

제 7 항에 있어서, Fc 영역 내 올리고사카라이드 중 50 % 이상이 비푸코실화된 항체 또는 항원 결합 프래그먼트.

### 청구항 10

제 5 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항원 결합 프래그먼트를 발현하는 숙주 세포로서, 상기 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드와 Fc 영역을 당 개질시키기에 충분한 양으로 발현시키는  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 핵산을 포함하는 숙주 세포.

**청구항 11**

제 10 항에 있어서, 상기 숙주 세포가 추가로 만노시다제 II 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 발현하는 숙주 세포.

**청구항 12**

제 10 항에 있어서, 상기 숙주 세포에 의해 생산된 항체가 글리코엔지니어링의 결과, 증가된 Fc 수용체 결합 친화성을 나타내는 숙주 세포.

**청구항 13**

제 12 항에 있어서, 상기 Fc 수용체가 FcγRIIA 수용체인 숙주 세포.

**청구항 14**

제 10 항에 있어서, 상기 숙주 세포에 의해 생산된 항체가 글리코엔지니어링의 결과, 증가된 효과기 기능을 나타내는 숙주 세포.

**청구항 15**

제 14 항에 있어서, 상기 증가된 효과기 기능이 Fc-매개 세포의 세포독성의 증가인 숙주 세포.

**청구항 16**

제 14 항에 있어서, 상기 증가된 효과기 기능이 항체-의존성 세포독성의 증가인 숙주 세포.

**청구항 17**

제 10 항에 있어서, 하기에 따른 제 1 및 제 2 폴리펩티드를 암호화 하는 하나 이상의 형질전환된 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 상기 핵산은 인간 면역글로불린의 Fc 영역에 상응하는 영역을 암호화하는 서열을 포함하는 숙주 세포:

SEQ ID NO: 12 의 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는 제 1 단리된 폴리펩티드 및 SEQ ID NO: 134 의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 제 2 단리된 폴리펩티드.

**청구항 18**

혈액 악성종양 또는 자가면역성 질환의 치료용 약제의 제조를 위한 약학 조성물로서, 제 1 항 및 제 5 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항원 결합 프래그먼트의 유효량 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물.

**청구항 19**

혈액 악성종양 또는 자가면역성 질환의 치료용 약제의 제조를 위한 제 1 항 및 제 5 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항원 결합 프래그먼트를 포함하는 약학 조성물.

**청구항 20**

삭제

**청구항 21**

제 19 항에 있어서, 상기 혈액 악성종양이 B-세포 림프종, 비-호즈킨 암종 또는 B-세포 만성 림프구성 백혈병인 항체 또는 항원 결합 프래그먼트를 포함하는 약학 조성물.

**청구항 22**

제 19 항에 있어서, 상기 자가면역성 질환이 류마티스성 관절염 또는 루푸스인 항체 또는 항원 결합 프래그먼트를 포함하는 약학 조성물.

**청구항 23**

제 21 항에 있어서, 상기 혈액 악성종양이 B-세포 램프종인 항체 또는 항원 결합 프래그먼트를 포함하는 약학 조성물.

**청구항 24**

B-세포 램프종의 치료용 약제의 제조를 위한 제 1 항 및 제 5 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항원 결합 프래그먼트를 포함하는 약학 조성물.

**청구항 25**

약제

**청구항 26**

약제

**청구항 27**

약제

**청구항 28**

약제

**청구항 29**

SEQ ID NO: 134 의 경쇄 가변 영역을 암호화하는 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

**청구항 30**

제 29 항에 있어서, 추가로 SEQ ID NO: 12 의 중쇄 가변 영역을 암호화하는 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

**청구항 31**

제 29 항 또는 제 30 항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

**청구항 32**

제 31 항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

**청구항 33**

울리고사카라이드로 개질되고 증가된 효과기 기능을 갖도록 엔지니어링된 Fc 영역을 포함하는 항체 또는 항원 결합 프래그먼트를 숙주 세포 내에서 제조하는 방법으로서, 하기를 포함하는 방법:

a. 상기 항체 또는 항원 결합 프래그먼트를 암호화하는 하나 이상의 핵산 및  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 핵산을 발현하도록 엔지니어링된 숙주 세포를 배양함;

b. 상기 항체를 단리함;

여기서 상기 항체는 제 5 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 따른 개질된 항체 또는 항원 결합 프래그먼트임.

**청구항 34**

제 33 항에 있어서, 상기 숙주 세포는 추가로 만노시다제 II 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 발현하는 방법.

**청구항 35**

제 33 항에 있어서, 상기 개질된 올리고사카라이드는 비-개질된 올리고사카라이드에 비해 감소된 푸코실화를 갖는 방법.

**청구항 36**

제 33 항에 있어서, 상기 숙주 세포에 의해 생산된 항체 또는 항원 결합 프래그먼트가 상기 폴리펩티드의 Fc 영역 내 양분된, 비-푸코실화 올리고사카라이드의 증가된 일부는 갖는 방법.

**청구항 37**

삭제

**청구항 38**

삭제

**청구항 39**

삭제

**청구항 40**

삭제

**청구항 41**

삭제

**청구항 42**

삭제

**청구항 43**

삭제

**청구항 44**

삭제

**청구항 45**

삭제

**청구항 46**

삭제

**청구항 47**

삭제

**청구항 48**

삭제

**청구항 49**

삭제

**청구항 50**

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

## 명세서

### 기술분야

[0001]

본 발명은 항원 결합 분자 (ABM)에 관한 것이다. 특별한 구현예에서, 본 발명은 또한, 표적 항원에 의한 세포 신호 활성을 매개하는 변형된 능력, 및/또는 하나 이상의 표적 항원의 가교를 매개하는 변형된 능력을 갖는, 키메라, 영장류화된 또는 인간화된 항체 또는 절편을 포함하여, 재조합 모노클로날 항체 또는 절편에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 ABM을 암호화하는 핵산 분자, 및 상기 핵산-분자를 포함하는 벡터 및 숙주 세포에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 본 발명의 ABM의 제조 방법, 및 질환 치료에 있어서 상기 ABM의 사용 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 증가된 Fc 수용체 결합 및 증가된 효과기 기능을 가진 항체를 포함하여, 향상된 치료성을 가진, 개질된 글리코실화가 있는 ABM에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002]

면역글로불린이라고도 하는 항체는 4개의 폴리펩티드 사슬 : 2개의 동일한 경쇄 (L)와 짹을 이룬 2개의 동일한 중쇄 (H)를 포함하는 기본 구조를 갖는다. 각각의 중쇄 및 경쇄는 가변 영역 (각각 VH 및 VL) 및 불변 영역 (각각 CH 및 CL)을 포함한다. CH 영역은 3개의 도메인 (CH1, CH2, 및 CH3)을 갖는 한편, 더 작은 CL 영역은 단지 1개의 도메인 (이를 간단히 CL이라고 함)만을 갖는다. 각각의 VH 및 VL 영역은 하기 순서대로 4개의 골격 영역 옆에 있는 3개의 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함한다 : FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. CDR은 V 영역 중 가장 가변성인 부분이고, 항체의 항원 특이성을 결정한다. 다시 말해, 짹을 이룬 VH 및 VL은 항원 결합 부위를 형성하고, 2가 항체는 2개의 그러한 항원 결합 부위를 갖는다. 이

러한 기본적인 항체 구조는 목적하는 기능 및/또는 항원 결합 활성을 여전히 유지하거나 또는 심지어 향상시키면서, 다양한 방식으로 (예를 들어, 구조의 절편을 생성함으로써) 개질될 수 있음을 이해해야 할 것이다.

[0003] VH 및 CH1 도메인 사이의 경계면은 보존된 아미노산을 포함한다. 이러한 접촉면을 "분자 볼-앤드 소켓 조인트 (molecular ball-and-socket joint)" 라고 말할 수 있다. 상기 조인트는 CH1 및 CL 영역에 대해 VH 및 VL 영역의 "팔꿈치 운동 (elbow motion)" 과 또한 소위 "팔꿈치 각 (elbow angle)" 을 결정하고, V 및 C 영역 사이에 강체 접촉이 형성되는 것을 방지한다 (Lesk and Chothia, *Nature* (1988) 335(8): 188-190). 볼-앤드-소켓 조인트의 소켓은 VH 골격 영역 내 아미노산 잔기, 특히 위치 11, 110, 및 112에 있는 아미노산 잔기에 의해 형성된다 (Kabat 등의 번호화 시스템에 따라, (1987) *Sequences of Prtoeins of Immunological Interest*, 4th ed. (Public Health Services, NIH, Washington, DC)). ([Lesk and Chothia, *Nature* (1988) 335(8): 188-190] 참조). 이러한 볼-앤드-소켓 조인트의 "볼 (ball)" 은 CH1 도메인에서 발견되고, 주로 위치 148 및 149에서 2개의 아미노산에 의해 형성된다 ([Landolfi 등, *J. Immunol.* (2001) 166:1748-1754; Lesk and Chothia, *Nature* (1988) 335(8):188-190 참조) (여기서, "볼" 을 형성하는 CH1 잔기를 149 및 150으로 숫자를 매김). 이들 위치에 있는 아미노산의 차이는 V 및 C 영역 사이에 형성된 팔꿈치 각을 가리킬 수 있고, 따라서 VH-VL 이랑체의 오리엔테이션 (orientation) 이다 ([Lesk and Chothia, *Nature* (1988) 335(8): 188-190] 참조). 이들 VH 위치를 차지하는 아미노산 잔기는 면역글로불린 서열에 걸쳐서 고도로 보존되어 있다 (예를 들어, [Lesk and Chothia, *Nature* (1988) 335(8):188-190] 참조). 상기 조인트 (예를 들어, 위치 11, 110, 112, 148, 및 149)에 포함되는 모든 잔기는 골격 영역 (예를 들어, 잔기 11, 110, 및 112) 또는 불변 도메인 (예를 들어, 148 및 149 (Landolfi 등에 따라; Lesk 및 Chothia에 따른 위치 149 및 150)에 위치해 있고, 항원 결합에는 직접 관여하지 않는 것으로 보인다 (Landolfi 등, *J. Immunol.* (2001) 166:1748-1754).

[0004] 항체 의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC) 및 보체 의존성 세포독성 (CDC)과 같은 효과기 기능을 매개하는 것 외에도, 모노클로날 항체는 세포 신호 경로를 유도하거나 또는 억제시킴으로써 세포 기능을 조정할 수 있다. 예를 들어, 모노클로날 항체는 항원 가교를 매개하고, 사멸 수용체를 활성화시키고 (예를 들어, 수용체의 올리고머화를 용이하게 하거나 또는 리간드 결합을 흥내냅으로써), 세포 성장 분화 및/또는 증식 경로에서 리간드-매개 세포 신호화를 차단하는 것으로 보인다 (예를 들어, [Ludwig 등, *Oncogene* (2003) 22: 9097-9106] 참조).

[0005] 세포자멸사, 또는 예정된 (programmed) 세포 사멸은 여러 상이한 기작에 의해 유도될 수 있다. 예를 들어, 종양 괴사 인자 수용체 (TNFR) 슈퍼페밀리의 원소인 세포 막-결합 "사멸 수용체" 를 통한 신호 경로의 활성화는 세포자멸사의 유도를 초래할 수 있다. 마찬가지로, CD20과 같은 표면 항원의 이랑체화 또는 가교 또한 세포자멸사를 유도할 수 있다 (예를 들어, [Ludwig 등, *Oncogene* (2003) 22: 9097-9106] 참조).

[0006] 인간을 포함하나 이에 제한되지 않는 영장류에 있어서 질환의 치료를 위해, 세포자멸사 유도를 포함하나 이에 제한되지 않는, 세포 신호와 연관된 항원을 표적으로 하는 향상된 치료 접근법이 필요하다.

## 발명의 상세한 설명

### 발명의 간략한 개요

[0008] 표적 항원에 의한 세포 신호 활성을 매개하는 변형된 능력, 및/또는 하나 이상의 표적 항원의 가교를 매개하는 변형된 능력을 갖는 개질된 항원 결합 분자 (ABM)의 대단한 치료력을 인지하는 것은 상기 ABM 뿐만 아니라, 그러한 ABM의 제조 방법을 개발하였다. 즉, 상기 방법은 그의 재조합, 키메라 항체 또는 키메라 절편의 제조를 포함한다. 이러한 개질된 ABM의 효능은 항체 Fc 영역의 글리코실화 프로파일을 엔지니어링함으로써 추가로 향상된다.

[0009] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 모 (parent) 항원 결합 분자의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역과 비교해 상기 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 중 하나 이상의 골격 영역에서 하나 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함하는 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 포함하는 개질된 항원 결합 분자에 관한 것으로서, 여기서 상기 치환은 상기 개질된 항원 결합 분자가 상기 표적 항원과 복합체를 이루는 경우 표적 항원의 세포 신호 활성을 변형시킨다. 특별한 구현예에서, 변형된 세포 신호 활성은 세포자멸사이다. 한 구현예에서, 개질된 항원 결합 분자는 세포자멸사를 유도하는 능력이 증가되어 있다. 또 다른 구현예에서, 개질된 항원 결합 분자는 세포자멸사를 유도하는 능력이 감소되어 있다.

[0010] 또 다른 측면에서, 본 발명은 모 항원 결합 분자의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역과 비교해 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 중 하나 이상의 골격 영역에서 하나 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함하는 상기 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 포함하는 개질된 항원 결합 분자에 관한 것으로서, 여기서 상기 개질된 항원 결합 분자는 상기 치환의 결과,

하나 이상의 표적 항원의 가교를 매개하는 능력이 변형되었다.

[0011] 한 구현예에서, 본 발명의 개질된 항원 결합 분자는 중쇄 가변 영역의 FR1에서의 치환을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 상기 치환은 2개 이상, 3개 이상, 또는 4개 이상의 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 대체를 포함한다.

[0012] 한 구현예에서, 치환은 중쇄 가변 영역의 전체 FR1의 대체를 포함한다. 추가의 구현예에서, 전체 FR1은 생식 계열 VH FR1에 의해 대체된다. 특별한 구현예에서, 생식 계열 VH FR1은 Kabat 위치 8 내지 13에서 SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:104, 및 SEQ ID NO:105로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0013] 한 구현예에서, 개질된 ABM은 하나 이상의 Kabat 위치 8, 9, 10, 11, 12, 또는 13에서 아미노산 잔기가 대체되는 것을 포함하는, 중쇄 가변 영역 중 FR1에서의 치환을 포함한다.

[0014] 특별한 구현예에서, 중쇄 가변 영역 중 FR1에서의 치환은 Kabat 위치 8에서 아미노산 잔기가 대체되는 것을 포함한다. 더욱 구체적인 구현예에서, 중쇄 가변 영역 중 FR1에서의 치환은 Kabat 위치 8에서 아미노산 잔기가 아르기닌 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기로 대체되는 것을 포함한다.

[0015] 또 다른 특별한 구현예에서, 중쇄 가변 영역 중 FR1에서의 치환은 Kabat 위치 9에서 아미노산 잔기가 대체되는 것을 포함한다. 더욱 구체적인 구현예에서, 중쇄 가변 영역 중 FR1에서의 치환은 Kabat 위치 9에서 아미노산 잔기가 알라닌, 프롤린, 글리신, 세린 및 히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기로 대체되는 것을 포함한다.

[0016] 한 특별한 구현예에서, 중쇄 가변 영역 중 FR1에서의 치환은 Kabat 위치 10에서 아미노산 잔기가 대체되는 것을 포함한다. 더욱 구체적인 구현예에서, 치환은 Kabat 위치 10에서 아미노산 잔기가 글루타메이트, 트레오닌, 글리신, 알라닌 및 발린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기로 대체되는 것을 포함한다.

[0017] 또 다른 특별한 구현예에서, 중쇄 가변 영역 중 FR1에서의 치환은 Kabat 위치 11에서 아미노산 잔기가 대체되는 것을 포함한다. 더욱 구체적인 구현예에서, 치환은 Kabat 위치 11에서 아미노산 잔기가 루신을 제외한 아미노산으로 대체되는 것을 포함한다. 또 다른 구체적인 구현예에서, 치환은 Kabat 위치 11에서 아미노산 잔기가 비극성 아미노산으로 대체되는 것을 포함한다. 또 다른 구체적인 구현예에서, 치환은 Kabat 위치 11에서 아미노산 잔기가 발린, 루신, 이소루신, 세린 및 페닐알라닌으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기로 대체되는 것을 포함한다. 특별한 구현예에서, 치환은 Kabat 위치 11에서 아미노산 잔기가 루신으로 대체되는 것을 포함한다.

[0018] 또 다른 특별한 구현예에서, 중쇄 가변 영역 중 FR1에서의 치환은 Kabat 위치 12에서 아미노산 잔기가 대체되는 것을 포함한다. 더욱 구체적인 구현예에서, 치환은 Kabat 위치 12에서 아미노산 잔기가 리신, 발린, 루신 및 이소루신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기로 대체되는 것을 포함한다.

[0019] 또 다른 특별한 구현예에서, 중쇄 가변 영역 중 FR1에서의 치환은 Kabat 위치 11 및 12에서 아미노산 잔기가 대체되는 것을 포함한다. 구체적인 구현예에서, 치환은 Kabat 위치 11에서 아미노산 잔기가 발린으로, 그리고 Kabat 위치 12에서 아미노산 잔기가 리신으로 대체되거나; Kabat 위치 11에서 아미노산 잔기가 루신으로, 그리고 Kabat 위치 12에서 아미노산 잔기가 발린으로 대체되거나; Kabat 위치 11에서 아미노산 잔기가 발린으로, 그리고 Kabat 위치 12에서 아미노산 잔기가 이소루신으로 대체되거나; 또는 Kabat 위치 11에서 아미노산 잔기가 발린으로, 그리고 Kabat 위치 12에서 아미노산 잔기가 발린으로 대체되는 것을 포함한다.

[0020] 또 다른 특별한 구현예에서, 중쇄 가변 영역 중 FR1에서의 치환은 Kabat 위치 13에서 아미노산 잔기가 대체되는 것을 포함한다. 구체적인 구현예에서, 치환은 Kabat 위치 13에서 아미노산 잔기가 리신, 아르기닌, 글루타민 및 글루타메이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기로 대체되는 것을 포함한다.

[0021] 본 발명의 또 다른 측면에서, ABM에서의 치환은 중쇄 가변 영역 중 FR4에서 하나 이상의 아미노산 잔기가 대체되는 것을 포함한다. 특별한 구현예에서, 중쇄 가변 영역 중 FR4에서의 치환은 Kabat 위치 110 또는 112 중 하나 이상에서 아미노산 잔기가 대체되는 것을 포함한다.

[0022] 특별한 구현예에서, 치환은 Kabat 위치 110에서 아미노산 잔기가 루신, 이소루신, 트레오닌 또는 세린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산으로 대체되는 것을 포함한다. 더욱 구체적인 구현예에서, 치환은

Kabat 위치 110에서 아미노산 잔기가 이소루신으로 대체되는 것을 포함한다.

[0023] 또 다른 구현예에서, 치환은 Kabat 위치 112에서 아미노산 잔기가 발린, 루신, 이소루신, 또는 트레오닌으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산으로 대체되는 것을 포함한다. 더욱 구체적인 구현예에서, 치환은 Kabat 위치 112에서 아미노산 잔기가 이소루신으로 대체되는 것을 포함한다.

[0024] 한 측면에서, 본 발명은 추가로, 모 폴리펩티드의 CH1 도메인과 비교해 하나 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함하는 CH1 도메인을 포함하는 개질된 항원 결합 분자에 관한 것으로서, 여기서 상기 치환은 개질된 항원 결합 분자가 표적 항원과 복합체를 이루는 경우 표적 항원의 세포 신호 활성을 변형시킨다.

[0025] 또 다른 측면에서, 본 발명은 추가로, 모 폴리펩티드의 CH1 도메인과 비교해 하나 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함하는 CH1 도메인을 포함하는 개질된 항원 결합 분자에 관한 것으로서, 여기서 항원 결합 분자는 치환 결과, 하나 이상의 표적 항원의 가교를 매개하는 능력이 변형되었다.

[0026] 특별한 구현예에서, CH1에서의 치환은 위치 148, 149 또는 150 중 하나 이상에서 아미노산 잔기가 대체되는 것을 포함한다. 더욱 구체적인 구현예에서, 치환은 위치 149에서 아미노산 잔기가 루신으로 대체되는 것을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 치환은 전체 CH1 도메인이 대체되는 것을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 치환은 IgG CH1 도메인이 IgM CH1 도메인으로 대체되는 것을 포함한다.

[0027] 또 다른 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 개질된 항원 결합 분자에 관한 것으로서, 여기서 상기 치환은 가변 영역과 불변 영역 사이의 경계면의 영역에서 경쇄 내 아미노산 잔기가 대체되는 것을 포함하며, 여기서, 상기 치환은 상기 개질된 항원 결합 분자가 상기 표적 항원과 복합체를 이루는 경우 표적 항원 결합 분자의 세포 신호 활성을 변형시킨다.

[0028] 또 다른 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 개질된 항원 결합 분자에 관한 것으로서, 여기서 상기 치환은 가변 영역과 불변 영역 사이의 경계면의 영역에서 경쇄 내 아미노산 잔기가 치환되는 것을 포함하며, 여기서, 상기 개질된 항원 결합 분자는 상기 치환 결과, 하나 이상의 표적 항원의 가교를 매개하는 능력이 변형되었다.

[0029] 특별한 구현예에서, ABM의 경쇄 가변 영역에서의 치환은 Kabat 위치 10, 12, 39, 40, 41, 80, 81, 83, 84, 103, 105, 106, 및 108 중 하나 이상에서 아미노산이 대체되는 것을 포함한다. 특별한 구현예에서, ABM의 경쇄 가변 영역에서의 치환은 Kabat 위치 40, 80, 83, 105, 또는 106 중 하나 이상에서 아미노산이 대체되는 것을 포함한다.

[0030] 또 다른 특별한 구현예에서, ABM의 경쇄에서의 치환은 Kabat 위치 40, 80, 83, 105, 또는 106 중 하나 이상에서 아미노산 잔기가 비극성 아미노산으로 대체되는 것을 포함한다.

[0031] 또 다른 특별한 구현예에서, ABM의 경쇄에서의 치환은 Kabat 위치 40에서 아미노산 잔기가 알라닌으로 대체되는 것을 포함한다.

[0032] 또 다른 특별한 구현예에서, ABM의 경쇄에서의 치환은 Kabat 위치 80에서 아미노산 잔기가 프롤린으로 대체되는 것을 포함한다.

[0033] 또 다른 특별한 구현예에서, ABM의 경쇄에서의 치환은 Kabat 위치 83에서 아미노산 잔기가 페닐알라닌으로 대체되는 것을 포함한다.

[0034] 또 다른 특별한 구현예에서, ABM의 경쇄에서의 치환은 Kabat 위치 105에서 아미노산 잔기가 알라닌으로 대체되는 것을 포함한다.

[0035] 또 다른 특별한 구현예에서, ABM의 경쇄에서의 치환은 Kabat 위치 106에서 아미노산 잔기가 알라닌으로 대체되는 것을 포함한다. 더욱 특별한 구현예에서, ABM의 경쇄에서의 치환은 Kabat 위치 106에서 아미노산 잔기가 대체되는 것을 포함하며, 여기서, 상기 항원 결합 분자는 세포자멸사를 유도하는 능력이 감소되었다.

[0036] 일부 구현예에서, 본 발명의 치환은 본원에 기술된 바와 같이 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역 및/또는 불변 영역에서의 아미노산 잔기의 대체의 조합을 포함한다.

[0037] 한 측면에서, 본 발명의 개질된 ABM에서의 아미노산 치환(들)은 개질된 ABM이 표적 항원과 복합체를 이루는 경우 표적 항원의 세포 신호 활성을 변형시킨다.

[0038] 본 발명의 한 측면에서, 변형된 세포 신호 활성은 증가된 아고니스트 활성이다. 한 구현예에서, 증가된 아

고니스트 활성은 세포자멸사 유도 및 세포 분화 유도로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0039] 본 발명의 또 다른 측면에서, 변형된 세포 신호 활성은 증가된 안타고니스트 활성이다. 한 구현예에서, 안타고니스트 활성은 세포 생존, 세포 성장, 세포 증식, 및 혈관신생으로 이루어진 군으로부터 선택되는 세포 신호 경로의 차단이다.

[0040] 추가의 구현예에서, 본 발명의 개질된 항원 결합 분자는 인간 CD20에 특이적으로 결합한다. 또 다른 측면에서, 개질된 항원 결합 분자는 인간 TNF 수용체 슈퍼페밀리의 구성원에 특이적으로 결합한다. 특별한 구현예에서, TNF 수용체 슈퍼페밀리는 TNFR1, CD95, TRAILR1, TRAILR2, EDAR, 및 p75NGFR로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0041] 본 발명의 또 다른 측면에서, 개질된 항원 결합 분자는 수용체 타이로신 키나아제에 특이적으로 결합한다. 특별한 구현예에서, 수용체 타이로신 키나아제는 HER1 (EGFR1), HER2/neu, HER3, HER4, IGF-1R, FGFR, PDGFR, VEGFR1, VEGFR2, 및 VEGFR3으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 더욱 구체적인 구현예에서, 수용체 타이로신 키나아제는 HER1 (EGFR1)이다.

[0042] 또 다른 측면에서, 본 발명은 추가로, 전체 항체, Fab 절편 또는 그의 융합 단백질, F(ab')2 절편 또는 그의 융합 단백질, 미니바디 (minibody), 다이아바디 (diabody), 트리아바디 (triabody), 및 테트라바디 (tetraabody)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는 개질된 ABM에 관한 것이다. 특별한 구현예에서, 개질된 ABM은 키메라성 또는 전체적으로 인간성이다. 더욱 특별한 구현예에서, 키메라성 개질된 ABM은 인간화되어 있다. 또 다른 특별한 구현예에서, 개질된 ABM은 다중특이성이다. 더욱 특별한 구현예에서, 개질된 ABM은 이중특이성이다.

[0043] 또 다른 측면에서, 본 발명에 따른 모 항원 결합 분자는 SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, 및 SEQ ID NO:62로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0044] 또 다른 측면에서, 본 발명에 따른 모 항원 결합 분자는 SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:131, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:133, 및 SEQ ID NO:134로 이루어진 군으로부터 선택되는 경쇄를 포함한다.

[0045] 추가의 측면에서, 본 발명은 또한, 인간 Fc 영역을 추가로 포함하는 개질된 ABM에 관한 것이다. 한 구현예에 따르면, 개질된 ABM의 Fc 영역은 변형된 올리고사카라이드를 갖도록 개질된다. 더욱 구체적인 구현예에서, Fc 영역은 비-개질된 Fc 영역과 비교해 푸코스 잔기의 일부가 감소되도록 개질되었다. 또 다른 구체적인 구현예에서, Fc 영역은 비-개질된 Fc 영역과 비교해 양분된 올리고사카라이드의 증가된 일부를 가진다. 또 다른 구체적인 구현예에서, 개질된 올리고사카라이드는 양분된 복합체이다. 또 다른 구체적인 구현예에서, 개질된 올리고사카라이드는 비-개질된 Fc 영역과 비교해 Fc 영역에서 양분된, 비푸코실화된 올리고사카라이드의 증가된 일부를 갖는다. 또 다른 구체적인 구현예에서, Fc 영역은 비-개질된 Fc 영역과 비교해 개질된 Fc 영역에서 증가된 비율의 GlcNAc 잔기 대 푸코스 잔기를 갖는다. 또 다른 구체적인 구현예에서, 양분된, 비푸코실화된 올리고사카라이드는 하이브리드이다. 또 다른 구체적인 구현예에서, 양분된, 비푸코실화된 올리고사카라이드는 복합체이다.

[0046] 또 다른 측면에 따르면, 본 발명에 따른 표적 항원은 막 수송 수용체, G-단백질-연결 수용체, 효소-연결 수용체로 이루어진 군으로부터 선택되는 세포 표면 수용체이다. 특별한 구현예에서, 막 수송 수용체는 채널-연결 수용체이다. 또 다른 구현예에서, 효소-연결 수용체는 수용체 구아닐릴 시클라아제, 수용체 타이로신 키나아제, 타이로신-키나아제 연관 수용체, 수용체 타이로신 포스파타제, 및 수용체 세린/트레오닌 키나아제로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0047] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 개질된 ABM을 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다. 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 보조제 또는 그의 조합을 추가로 포함할 수 있는 것으로 생각된다.

[0048] 본 발명은 또한 환자에서 변형된 세포 신호 활성에 의해 치료가능한 질환을 치료하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 본 발명에 따른 개질된 ABM 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 치료적 유효량의 약학적 조성물을 환자에 투여하는 것을 포함한다.

[0049] 또 다른 측면에서, 본 발명은 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 관한 것으로서, 여기서 상기 중쇄 또는 경쇄 가변 영역은 모 중쇄 또는 경쇄 가변 영역과 비교해 하나 이상의 골격 영역에서의 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환을 포함하며, 여기서, 상기 치환은 폴리펩티드가 표

적 항원과 복합체를 이룬 경우, 표적 항원의 세포 신호 활성을 변형시킨다.

[0050] 추가의 측면에서, 본 발명은 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 관한 것으로서, 여기서 상기 중쇄 또는 경쇄 가변 영역은 모 중쇄 또는 경쇄 가변 영역과 비교해 하나 이상의 골격 영역에서 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환되는 것을 포함하고, 여기서 상기 폴리펩티드는 치환 결과, 하나 이상의 표적 항원의 가교를 매개하는 능력이 변형되었다.

[0051] 한 구현예에서, 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드는 폴리펩티드를 암호화하는데, 여기서 상기 폴리펩티드는 항체 중쇄 또는 경쇄를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드는 폴리펩티드를 암호화하는데, 여기서 상기 폴리펩티드는 융합 단백질을 포함한다. 본 발명은 또한 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 폴리펩티드에 관한 것이다.

[0052] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 백터, 및 상기 백터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.

[0053] 본 발명은 추가로, 모 항원 결합 분자의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역과 비교해 중쇄 또는 경쇄 가변 영역의 하나 이상의 골격 영역에서 하나 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함하는 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것으로서, 여기서 상기 폴리펩티드는 본 발명에 따른 개질된 ABM이다.

[0054] 본 발명은 또한, 숙주 세포에 의해 생성된 폴리펩티드의 Fc 영역 내 올리고사카라이드를 개질시키기에 충분한 양으로  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 핵산을 발현하도록 엔지니어링된 숙주 세포에 관한 것으로서, 여기서 상기 폴리펩티드는 본 발명에 따른 개질된 ABM이다. 한 구현예에서,  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III 활성을 갖는 폴리펩티드는 융합 폴리펩티드이다. 특별한 구현예에서, 융합 폴리펩티드는  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III의 촉매 도메인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 융합 폴리펩티드는 추가로, 이종 골지 거주 폴리펩티드의 골지 위치화 도메인을 포함한다. 골지 위치화 도메인은 만노시다제 II의 위치화 도메인,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 I의 위치화 도메인,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 II의 위치화 도메인, 만노시다제 I의 위치화 도메인, 및  $\alpha 1-6$  코어 푸코실트랜스퍼라제의 위치화 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0055] 또 다른 구현예에서, 개질된 ABM은 인간 IgG의 Fc 영역에 상응하는 영역을 포함한다.

[0056] 추가의 구현예에서, 본 발명의 숙주 세포에 의해 생성된 개질된 ABM은 올리고사카라이드 개질 결과, 증가된 Fc 수용체 결합 친화성 및/또는 증가된 효과기 기능을 나타낸다. 본 발명에 따르면, 증가된 효과기 기능은 Fc-매개 세포의 세포독성의 증가, NK 세포에의 결합 증가, 대식세포에의 결합 증가, 단핵성 세포에의 결합 증가, 단핵구에의 결합 증가, 세포자멸사를 유도하는 직접적인 신호의 증가, 수지상 세포 성숙화 증가, 및 T 세포 프라이밍 증가로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 구현예에서, Fc 수용체는 Fc $\gamma$  활성화 수용체이다. 또 다른 구현예에서, Fc 수용체는 Fc $\gamma$ RIIIA 수용체이다.

[0057] 본 발명의 숙주 세포는 CHO 세포, HEK293-EBNA 세포, BHK 세포, NSO 세포, SP2/0 세포, YO 골수종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포 또는 하이브리도마 세포를 포함하나 이에 제한되지 않는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0058] 또 다른 측면에서, 본 발명은 모 ABM의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역과 비교해 중쇄 또는 경쇄 가변 영역의 하나 이상의 골격 영역에서 하나 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함하는 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 포함하는 개질된 ABM의 제조 방법에 관한 것으로서, 상기 치환은 개질된 ABM이 표적 항원과 복합체를 이룬 경우, 표적 항원의 세포 신호 활성을 변형시키며, 상기 방법은 하기를 포함한다 :

[0059] (i) 폴리뉴클레오티드의 발현을 허용하는 조건 하에 본 발명의 숙주 세포를 배양함, 및

[0060] (ii) 개질된 ABM을 배양 배지에서 회수함.

[0061] 추가의 측면에서, 본 발명은 모 ABM의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역과 비교해 중쇄 또는 경쇄 가변 영역의 하나 이상의 골격 영역에서 하나 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함하는 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 포함하는 개질된 ABM의 제조 방법에 관한 것으로서, 여기서 개질된 항원 결합 분자는 치환 결과 가교를 매개하는 능력이 변형되었으며, 상기 방법은 하기를 포함한다 :

- [0062] (i) 폴리뉴클레오티드의 발현을 허용하는 조건 하에 본 발명의 숙주 세포를 배양함, 및
- [0063] (ii) 개질된 ABM 을 배양 배지에서 희수함.
- [0064] 추가의 측면에서, 본 발명은 ABM 의 표적 항원을 포함하는 복합체의 형성을 용이하게 하는 ABM 의 능력을 변경시키는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 모 ABM 의 하나 이상의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 골격 영역 내 하나 이상의 아미노산 잔기를 대체하는 것을 포함한다. 한 구현예에서, ABM 은 표적 항원을 발현하는 세포에서 세포자멸사를 유도를 증가시킨다. 또 다른 구현예에서, ABM 은 표적 항원을 발현하는 세포에서 세포 분화의 유도를 증가시킨다.
- [0065] 본 발명은 또한, 세포에서 세포자멸사를 유도하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 모 ABM 의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역과 비교해 중쇄 또는 경쇄 가변 영역의 하나 이상의 골격 영역에서 하나 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함하는 상기 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 포함하는 개질된 ABM 과 세포를 접촉시키는 것을 포함하며, 여기서 개질된 ABM 은 모 폴리펩티드와 비교해 세포자멸사를 유도하는 능력이 증가되었다. 특별한 구현예에서, 세포는 중양 세포이다. 한 구현예에서, 접촉은 생체 내에서 발생한다.
- [0066] 또 다른 측면에서, 본 발명은 또한, 표적 항원의 변형된 세포 신호 활성에 의해 치료가능한 질환 또는 장애를 치료하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 치료적 유효량의 개질된 ABM 을 이를 필요로 하는 대상에 투여하는 것을 포함하고, 여기서, 개질된 ABM 은 모 ABM 의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역과 비교해 중쇄 또는 경쇄 가변 영역의 하나 이상의 골격 영역에서 하나 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함하는 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서, 상기 치환은 개질된 ABM 이 표적 항원과 복합체를 이룬 경우 표적 항원의 세포 신호 활성을 변형시킨다.
- [0067] 추가의 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 표적 항원의 가교를 매개하는 변형된 능력에 의해 치료가능한 질환 또는 장애의 치료 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 치료적 유효량의 개질된 ABM 을 이를 필요로 하는 대상에 투여하는 것을 포함하고, 여기서, 상기 개질된 ABM 은 모 ABM 의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역과 비교해 중쇄 또는 경쇄 가변 영역의 하나 이상의 골격 영역에서 하나 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함하는 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서 상기 개질된 ABM 은 치환 결과, 하나 이상의 표적 항원의 가교를 매개하는 능력이 변형되었다.
- [0068] 특별한 구현예에서, 본 발명에 따라 투여되는 개질된 ABM 은 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:36, 및 SEQ ID NO:38 로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0069] 한 측면에서, 본 발명의 개질된 ABM 으로 치료되는 질환 또는 장애는 세포 증식 장애이다. 한 구현예에서, 세포 증식 장애는 암이다. 또 다른 측면에서, 본 발명의 개질된 ABM 으로 치료되는 질환 또는 장애는 B 세포 장애이다. 구체적인 구현예에서, B 세포 장애는 B 세포 림프종이다.
- [0070] 본 발명은 또한, 암 치료 또는 예방용 약제의 제조를 위한, 본 발명에 따른 개질된 ABM 의 용도에 관한 것이다.
- [0071] 특별한 구현예에서, 본 발명은 또한, 암 치료 또는 예방용 약제의 제조를 위한, 본 발명에 따른 개질된 ABM 의 용도에 관한 것으로서, 여기서 상기 암은 B-세포 림프종, 유방암, 방광암, 두경부암, 피부암, 췌장암, 폐암, 난소암, 결장암, 전립선암, 신장암, 및 뇌암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0072] 또 다른 특별한 구현예에서, 본 발명은 또한, 암 치료 또는 예방용 약제의 제조를 위한, 본 발명에 따른 개질된 ABM 의 용도에 관한 것으로서, 여기서 상기 항원 결합 분자는 약 1.0 mg/kg 내지 약 15 mg/kg 의 치료적 유효량으로 사용된다. 추가의 구현예에서, 치료적 유효량은 약 1.5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg 이다. 추가의 구현예에서, 치료적 유효량은 약 1.5 mg/kg 내지 약 4.5 mg/kg 이다. 추가의 구현예에서, 치료적 유효량은 약 4.5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg 이다. 추가의 구현예에서, 치료적 유효량은 약 1.5 mg/kg 이다. 추가의 구현예에서, 치료적 유효량은 약 4.5 mg/kg 이다. 추가의 구현예에서, 치료적 유효량은 약 12 mg/kg 이다.
- [0073] 본 발명은 또한, 치료적 유효량의 본 발명의 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 환자에 투여하는 것을 포함하는 암 치료 또는 예방 방법에 관한 것이다. 특별한 구현예에서, 상기 암은 B-세포 림프종, 유방암, 방광암, 두경부암, 피부암, 췌장암, 폐암, 난소암, 결장암, 전립선암, 신장암, 및 뇌암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0074] 본 발명은 또한, 청구항 제 85 항 내지 제 158 항의 치료적 유효량의 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 환자에 투여하는 것을 포함하는 전암성 상태 또는 병변의 치료 또는 예방 방법에 관한 것이다. 특별한 구현예에서, 전암성 상태 또는 병변은 구강 백반증, 광선 각화증 (일광 각화증), 결장 또는 직장의 전암성 용종, 위 상피성

이형성증, 선종성 이형성증, 유전성 비용종증 결장암 증후군 (HNPPCC), 바렛 식도, 방광 이형성증, 및 전암성 자궁경부 상태로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0075] 본 발명은 또한, 암 치료 또는 예방에 사용될 본 발명의 개질된 항원 결합 분자에 관한 것이다. 특별한 구현예에서, 상기 암은 B-세포 림프종, 유방암, 방광암, 두경부암, 피부암, 췌장암, 폐암, 난소암, 결장암, 전립선암, 신장암, 및 뇌암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0076] 본 발명은 또한, 전암성 상태 또는 증상의 치료 또는 예방에 사용될 본 발명의 개질된 항원 결합 분자에 관한 것이다. 특별한 구현예에서, 전암성 상태 또는 증상은 구강 백반증, 광선 각화증 (일광 각화증), 결장 또는 직장의 전암성 용종, 위 상피성 이형성증, 선종성 이형성증, 유전성 비용종증 결장암 증후군 (HNPPCC), 바렛 식도, 방광 이형성증, 및 전암성 자궁경부 상태로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0077] 본 발명은 또한, 변형된 세포 신호 활성 및/또는 하나 이상의 표적 항원의 변형된 가교와 연관된 장애의 치료에 사용될 본 발명에 따른 개질된 항원 결합 분자에 관한 것이다.

## 실시예

[0370] 구체적으로 달리 언급되지 않는 한, 하기 실시예에서의 특정 아미노산 잔기 위치의 번호화(numbering)은 Kabat 번호화 시스템에 부합한다.

[0371] 실시예 1

[0372] 재료 및 방법

[0373] 재조합 항체 B-Ly1 의 클로닝 및 발현

[0374] 하이브리도마 세포 (see, 예를 들어, Poppema, S., 등, 1987, Proceedings of the 9th Biostest Symposium, Institute of Education, London, (Sonneborn, H.H. and Tills, D, Eds.); Ling, N.R, 등, 1987, In Leucocyte Typing Conference III: White Cell differentiation antigens, 302-355, Oxford University Press, Oxford. (AJ. McMichael, Ed.); Knapp, W. 1990. Leukocyte Typing Conference TV Proceedings, Oxford University Press, Oxford 참조) 를 발현하는 B-Ly1를 10% FBS 및 4 mM L-글루타민을 함유하는 RPMI 에서 육성시켰다. 생존능력 > 90% 인  $6 \times 10^6$  개의 세포를 수확하고 총 RNA 를 Qiagen RNAeasy 미니 키트 (midi kit)를 사용해 단리했다. B-Ly1 의 가변 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 cDNA를 RT-PCR로써 증폭시켰다.

RT-PCR 반응을 하기 조건을 사용해 실시했다: 제 1 가닥 cDNA 합성용으로는 30 분 50 °C; 15 분 95 °C 초기 변성; 30 주기의 1 분 94 °C, 1 분 45 °C, 1.5 분 72 °C; 및 10분, 72 °C 에서 최종 연장(elongation) 단계.

PCR 생성물의 기대되는 크기를 젤 전기영동으로써 확인했다. PCR 생성물을 적합한 대장균 벡터내로 클론하고, 유전자를 암호화하는 가변 경쇄 및 중쇄가 단리되는 것을 DNA 서열로 확인했다.

[0375] 키메라 B-Ly1 발현 벡터의 구축을 위해, 합성 신호 서열 및 적절한 제한 부위를 추가의 PCR 반응으로써 가변쇄로 응합했다. 가변쇄의 올바른 DNA 서열의 최종 확인 후에, 그것을 상응하는 인간 IgG1 불변 영역과 조합했다. 일단 유전자를 구축하면, 그것을 2 개의 분리 벡터인, 플라스미드 pETR1808(중쇄 발현 벡터) 및 pETR1813(경쇄 발현 벡터)를 초래하는 각각의 쇄용의 것을 사용해 MPSV 프로모터 및 상류의 합성 폴리A 부위의 통제하에서 클론시켰다. 각 벡터는 EBV Or iP 서열을 운반했다.

[0376] 키메라 B-Ly1 을 칼슘 포스페이트-트랜스펙션 접근법을 사용해 벡터 pETR1808 및 pETR1813을 가진 HEK293-EBNA 세포를 공동-트랜스펙션하여 생산했다. 기하급수적으로 자라는 HEK293-EBNA 세포를 칼슘 포스페이트 방법으로써 트랜스펙션했다. 세포를 10% FCS 로 보완된 DMEM 배양 배지를 사용한 T 플라스스크 내에서 접착성 단일 층 배양으로서 키우고 그것이 50 내지 80% 정도로 풍부해 때 트랜스펙션했다. T75 플라스스크의 트랜스펙션을 위해, 8백만 개의 세포를 트랜스펙션하기 24 시간 전에 FCS(10% V/V 최종), 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  네오마이신으로 보충된 DMEM 배양 배지 14  $\text{ml}$  에서 심고, 세포를 5%  $\text{CO}_2$  분위기를 가진 인큐베이터에서 밤새 37°C로 놓았다. 동등하게 경쇄 및 중쇄 발현 벡터로 나눈 47  $\mu\text{g}$  총 플라스미드 벡터 DNA, 235  $\mu\text{l}$  의 1M  $\text{CaCl}_2$  용액을 혼합하고 물을 최종 부피 469  $\mu\text{l}$ 로 첨가함으로써 트랜스펙션될 각각의 T75 플라스스크를 위해, DNA,  $\text{CaCl}_2$  및 물의 용액을 제조했다. 상기 용액에, 469  $\mu\text{l}$  의 50mM HEPES, 280 mM NaCl, pH 7.05 의 1.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  용액을 첨가하고 10 초 동안 즉시 혼합하고 20 초 동안 실온에 방치했다. 혼탁물을 12  $\text{ml}$  의 2% FCS 로 보충된 DMEM으로 희석하고, 기존 배지 대신하여 T75에 첨가했다. 세포를 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  에서 약 17 내지 20 시간동안 인큐베이

션시키고, 이어서 배지를 12 ml DMEM, 10% FCS로 대체했다. 비개질된 항체, "chB-Ly1"의 생산을 위해, 세포를 오직 항체 발현 벡터 pETR1808 및 pETR1813을 비율 1:1로하여 트랜스펙션하였다. 글리코엔지니어링된 항체인 "chB-Ly1-ge"의 생산을 위해, 각각 비율 4:4:1:1로 항체 발현(pETR1808 및 pETR1813)용 2개, 융합 GnTIII폴리펩티드 발현용(pETR1519) 1개, 및 만노시다아제II 발현용(pCLF9) 1개인 4개의 플라스미드로 세포를 공동트랜스펙션시켰다. 5일 트랜스펙션후, 상청액을 수확해 5분 동안 1200 rpm에서 원심분리한 후 10분 동안 4000 rpm에서 두 번째 원심분리하고 4°C에서 유지했다.

[0377] 3개의 순차 크로마토그래프 단계인, 단백질 A 크로마토그래프, 양이온 교환 크로마토그래프 및 크기 배제 크로마토그래프를 Superdex 200 컬럼(Amersham Pharmacia사) 상에서 사용하고, 완충액을 포스페이트 완충 염수로 교환하고 단량체성 항체 퍼크를 상기 마지막 단계에서 수집하여 chB-Ly1 및 chB-Ly1-ge를 배양 상청액에서 정제했다. 항체 농축물을 분광광도계를 사용해 280 nm에서 흡수도로부터 평가했다.

#### 울리고사카라이드 분석

[0379] 울리고사카라이드를 효소작용적으로 PNGaseF 분해로써 항체로부터 방출시키고, 이 때 상기 항체는 PVDF 막 또는 용액 내에서 고정된다.

[0380] 방출된 울리고사카라이드를 함유한 생성 분해 용액을 MALDI/TOF-MS 분석용으로 직접 제조하거나 MALDI/TOF-MS 분석용 시료 제조 전의 EndoH 글리코시다아제로 추가로 분해시켰다.

#### PVDF 막-고정 항체용 울리고사카라이드 방출 방법

[0382] PVDF (Immobilon P, Millipore, Bedford Massachusetts) 막으로 만들어진 96 웰 플레이트의 웰을 100  $\mu$ l의 메탄올으로 적시고 액체를 다중스크린 진공 매니폴드(Multiscreen vacuum manifold: Millipore, Bedford, Massachusetts)에 적용된 진공을 사용하여 PVDF 막을 통해 가져왔다. PVDF 막을 3회 300  $\mu$ l 물로 세척했다. 웰을 이어서 50  $\mu$ l RCM 완충액(8M 우레아, 360mM Tris, 3.2mM EDTA, pH 8.6)으로 세척했다. 30 내지 40  $\mu$ g 항체를 10  $\mu$ l RCM 완충액을 함유하는 웰에 적재했다. 웰 내 액체를 진공을 적용시켜 막을 통해 끌어내고, 상기 막을 후속적으로 2회 50  $\mu$ l RCM 완충액으로 세척했다. 디슬파이드 교량의 환원을 RCM 내 50  $\mu$ l의 0.1 M 디티오트레이를 첨가하고 1시간 동안 37 °C에서 인큐베이션시켜 실시했다.

[0383] 환원 후에, 진공을 웰로부터 디티오트레이를 용액을 제거하기 위해 적용시켰다. 웰을 RCM 완충물 내 50  $\mu$ l 0.1 M 요오도아세트산의 첨가 및 실온 어두운 곳에서 30분간 인큐베이션시켜 시스테인 잔기를 카르복시메틸화하기 전에 3회 300  $\mu$ l 물로 세척했다.

[0384] 카르복시메틸화 후, 웰을 진공으로 가져오고 후속적으로 3회 300  $\mu$ l 물로 세척했다. 이어서 엔도글리코시다아제의 흡수를 막기위해, 실온에서 1시간 동안 1% 폴리비닐피롤리돈 360 수용액 100 $\mu$ l를 인큐베이션시킴으로써 PVDF 막을 차단시켰다. 차단 시약을 이어서 일반 진공(gentle vacuum)으로써 제거한 후 3회 300  $\mu$ l 물로 세척했다.

[0385] 임의의 잠재 충전된 단당류 잔기를 제거하기 위해, 2.5 mU 펩티드-N-글리코시다아제 F (제조항체 N-글리카나아제, GLYKO, Novato, CA) 및 0.1 mU 시알리다아제(GLYKO, Novato, CA)를 첨가함으로써 20mM NaHCO<sub>3</sub>, pH7.0, 최종 부피 25  $\mu$ l으로 N-결합된 울리고사카라이드를 방출시켰다. 분해작용을 3시간 동안 37°C에서 실시했다.

#### 용액 내 항체를 위한 울리고사카라이드 방출 방법

[0387] 40 내지 50  $\mu$ g의 항체를 2mM Tris, pH7.0 최종부피 25 마이크로리터로 2.5 mU PNGaseF(Glyko, U. S. A.)과 혼합하고, 혼합물을 3시간 동안 37°C에서 인큐베이션시켰다.

[0388] 하이브리드 양분된 울리고사카라이드 구조의 MALDI/TOF-MS 중성 울리고사카라이드 퍼크로 할당되기 위한 PNGaseF-방출 울리고사카라이드의 엔도글리코시다아제 H 분해 사용

[0389] PNGaseF 방출 울리고사카라이드를 후속적으로 엔도글리코시다아제 H로 분해시켰다 (EC 3.2.1.96). EndoH 분해를 위해, 15 mU의 EndoH (Roche, 스위스)를 PNGaseF 분해물(상기 용액 방법 내 항체)로 첨가해 최종 부피 30  $\mu$ l을 제공하고 혼합물을 3시간 동안 37°C에서 인큐베이션시켰다. EndoH는 N-결합된 울리고사카라이드의 키토바이오스(chitobiose) 중심의 N-아세틸글리코사민 잔기 사이를 절단한다. 효소는 오직 울리고만노오스 및 하이브리드 유형 글리칸을 분해할 수 있는 반면에 복합 유형 울리고사카라이드는 가수분해되지 않는다.

## [0390] MALDI/TOF-MS 용 시료 제조

실온에서 추가 3시간 동안 최종 농도 150 mM 로 아세트산 첨가 후에 방출된 올리고사카라이드를 함유하는 효소 작용 분해물을 인큐베이션시키고, 후속적으로 마이크로-바이오-스핀 크로마토그래프 컬럼(BioRad, 스위스)로 가득채워진 0.6 mL 의 양이온 교환 수지(AG50W-X8 수지, 수소 형태, 100-200 메시, BioRad, 스위스)를 통해 통과시켜 양이온 및 단백질을 제거했다. 1  $\mu$ L 의 생성 시료를 스테인레스 스틸 목적 플레이트로 적용하고 플레이트 상에서 1  $\mu$ L 의 sDHB 매트릭스로 혼합했다. sDHB 매트릭스를 1 mL 의 에탄올/10 mM 수성 나트륨 클로라이드 1:1(v/v) 내 2 mg 의 2,5-디히드록시벤조산 + 0.1 mg 의 5-메톡시살리실산을 용해함으로써 제조했다. 시료를 공기중 건조시키고 0.2  $\mu$ L 에탄올을 적용하고 시료를 최종적으로 공기 하에서 재결정화시켰다.

## [0392] MALDI/TOF-MS

질량 스펙트럼을 수득하기 위해 사용한 MALDI-TOF 질량 분석기는 Voyager Elite(Perspective Biosystems)이었다. 이 기계는, 20 kV 의 가속 및 80 ns 의 지체(delay)와 함께 선형 배열로 조작되었다. 올리고사카라이드 표준을 사용한 외부 측정은 이온의 질량 할당(mass assignment)에 사용되었다. 200 레이저 발사로부터의 스펙트럼들을 종합하여 최종 스펙트럼을 수득하였다.

## [0394] 전혈 B 세포 삭제

건강한 공여자로부터의 495  $\mu$ L 혈액을 5 mL 폴리스티렌 투브에 분취하고, 5  $\mu$ L 100-배 농축시킨 항체 샘플을(1-1000 ng/mL 최종 농도) 또는 PBS 를 단독으로 첨가하고, 투브를 37°C 에서 인큐베이션시켰다. 24시간 후 50  $\mu$ L 혈액을 새 투브로 옮기고, 15 분 동안 어두운 실온에서 항-CD3-FITC, 항-CD19-PE 및 항-CD45-CyChrome (Becton-Dickinson)으로 염색하였다. 분석 전, 500  $\mu$ L FACS 완충액 (2% FCS 및 5 mM EDTA 함유 PBS)를 투브에 첨가하였다. 혈액 샘플의 CD3-FITC 및 CD19-PE 형광을, CD45-CyChrome을 역치로 하여 유세포분석으로 분석하였다. B 세포-삭제는 CD19<sup>+</sup> B 세포 대 CD3<sup>+</sup> T 세포 비율을 플롯하여 결정하였다.

## [0396] Raji 세포에 항-CD20 항체의 결합

180  $\mu$ L FACS 완충액 (2% FCS 및 5 mM EDTA 함유 PBS) 중의 200,000 개의 세포를 5 mL 폴리스티렌 투브에 옮겼다. 다음, 20  $\mu$ L 10 배 농축 항-CD20 항체 샘플(1-5000 ng/mL 최종 농도) 또는 PBS를 단독으로 첨가하고 투브를 4°C 에서 30 분 동안 인큐베이션시켰다. 이어서 샘플을 FACS 완충액으로 2회 세척하고, 300  $\times$  g 에서 3 분 동안 펠릿화하였다. 상청액을 흡인 제거하고, 세포를 100  $\mu$ L FACS 완충액 중에 넣었다. 다음, 1  $\mu$ L 항-Fc-특이적 F(ab')2-FITC 절편(Jackson Immuno Research Laboratories, USA)을 첨가하고 투브를 4°C 에서 30 분 동안 인큐베이션시켰다. 유세포분석에 의한 분석을 위해, 샘플을 FACS 완충액으로 2 회 세척하고, 0.5  $\mu$ g/mL PI 함유 FACS 완충액에 500  $\mu$ L 를 넣었다. 결합은 항체 농도에 대한 기하 평균 형광에 대해 플롯하여 결정하였다.

## [0398] 실시예 2

## [0399] 고 상동성 수용체 접근

고 상동성 항체 수용체 프레임워크 조사는, 마우스 B-Ly1 단백질 서열을 인간 생식선 서열의 수합에 정렬시켜 가장 높은 서열 동일성을 보이는 인간 서열을 골라냄으로써 수행되었다. 여기서, VBase 데이터베이스로부터의 서열 VH1\_10 (로커스 1-e, Acc No. DP-88) 이 중쇄 프레임워크 수용체 서열로서 선택되었고, IGKV2\_40 (Acc No. X59314) 서열이 경쇄에 대한 프레임워크 수용체로 선택되었다. 이러한 2 개의 수용체 프레임워크에, 마우스 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 상보성 결정영역 (CDR) 3 개를 이식시켰다. 프레임워크 4 영역이 생식선 V 유전자의 가변 영역의 일부가 아니기 때문에, 위치 정렬이 개별적으로 수행되었다. 중쇄로는 JH4 영역이, 경쇄로는 JK4 영역이 선택되었다. 디자인된 면역글로불린 도메인의 문자 모델링은, CDR 의 밖에 인간의 아미노산 잔기 대신에 쥐과의 아미노산 잔기를 잠재적으로 필요로 하는 부분을 밝혀 내었다. 인간 프레임워크에 쥐과동물 아미노산 잔기를 재도입하는 것은 소위 역돌연변이를 일으킬 것이다. 예를 들어, Kabat 위치 27 에 있는 인간 수용체 아미노산 잔기는 타이로신 잔기로 역돌연변이가 되었다. 인간화 항체 변이체는 역돌연변이를 포함하거나 또는 생략하도록 디자인되었다. 인간화 항체 경쇄는 임의의 역돌연변이를 필요로 하지 않았다. 단백질 서열을 디자인 한 후, 이러한 단백질을 암호화하는 DNA 서열을 하기와 같이 합성하였다.

## [0401] 혼합 프레임워크 접근

인간 수용체 프레임워크의 결정적인 아미노산 잔기 위치(양호한 항원 결합 친화성 또는 항체 기능을 유지하는

데 결정적인)에 역돌연변이를 도입하는 것을 피하기 위해, 전체 프레임워크 영역 1(FR1), 또는 프레임워크 영역 1(FR1) 및 2(FR2)가 함께, 천연 인간 생식선 서열의 중요한 위치에서 이미 공여자 잔기를 갖는 인간 항체 서열로 교체되거나 또는 기능적으로 동등한 것으로 교체될 수 있는지 알아보았다. 이러한 목적을 위해, 마우스 B-1y1 서열의 VH 프레임워크 1 및 2를 인간 생식선 서열에 개별적으로 정렬시켰다. 여기서, 가장 높은 서열 동일성은 중요하지 않고, 수용체 프레임워크를 선택하는데 사용되지 않았으나 대신 다수의 주요한 잔기의 매칭이 더 중요하게 고려되었다. 이러한 주요한 잔기는 잔기 24, 71 및 94 (Kabat 번호화) 및 또한 Kabat에 의한 CDR1 정의의 외부에 위치하는 위치 27, 28, 및 30 (Kabat 번호화)에 있는 잔기를 포함하나, 종종 항원 결합에 관여한다. IMGT 서열 IGHV3\_15 (Acc No. X92216) 가 적합한 것으로 선택되었다. 단백질 서열을 디자인한 후, 이러한 단백질을 암호화하는 DNA 서열을 하기와 같이 합성하였다. 양호한 수준의 항원 결합을 유지하기 위해, 이러한 접근을 사용하여 경쇄 또는 중쇄에 역돌연변이가 필요하지 않았다.

#### [0403] 항체 유전자의 합성

인간화 항체 V 영역의 아미노산 서열을 디자인 한 후, DNA 서열을 발생시켜야 했다. 개별적 프레임워크 영역의 DNA 서열 데이터를 인간 생식선 서열의 데이터베이스에서 찾았다. CDR 영역의 DNA 서열은 상응하는 쥐 과동물 cDNA 데이터로부터 취했다. 이러한 서열로, 전체 DNA 서열을 실질적으로 어셈블리하였다. 이러한 DNA 서열 데이터를 가지고, 침묵 돌연변이 (silent mutation)의 도입, 내부제한효소에 대한 제한 부위 생성에 의해 진단 제한 부위를 실질적인 서열에 도입하였다. 물리적 DNA 사슬을 수득하기 위해, 유전자 합성을 수행하였다(예, Wheeler 등 1995). 이 방법에서, 올리고뉴클레오티드를 관심유전자로부터 디자인하였는데, 일련의 올리고뉴클레오티드는 코딩 가닥으로부터 유도되고, 다른 하나의 일련의 올리고뉴클레오티드는 비(non)-코딩 가닥으로부터 유도된다. 각 올리고뉴클레오티드의 3' 및 5' 말단(열에서 가장 처음 및 마지막을 제외)은 항상 반대 가닥으로부터 유래된 2 개의 프라이머에 상보적인 서열을 보인다. 이러한 올리고뉴클레오티드를 임의의 열 안정성 중합효소에 적합한 반응 완충액에 넣고,  $Mg^{2+}$ , dNTP 및 DNA 중합효소를 첨가하면, 각 올리고뉴클레오티드가 그의 3' 말단에서부터 연장된다. 다음, 하나의 프라이머의 새로 형성된 3' 말단은 반대 가닥의 다음 프라이머에 어닐링되어, 템플레이트 의존성 DNA 사슬 신장에 적합한 조건 하에 추가로 그의 서열을 연장시킨다. 최종 생성물은 *E. coli*에서의 증식을 위한 통상적인 백터에 클로닝되었다.

#### [0405] 항체 생성

표준 분자생물학 기술을 사용하여, 인간 중쇄 및 경쇄 선도 서열 (분비를 위한) 을 상기 가변 영역 서열의 상류에 첨가한 다음, 이것을 인간 IgG1 카파 불변 중쇄 및 경쇄 서열의 상류에 각각 연결시켰다. 상기 실시예 1에 기술된 바와 같이, 생성 전체 항체 중쇄 및 경쇄 DNA 서열을, MPSV 프로모터 및 합성 폴리A 부위의 상류의 조절 하에 각각 EBV OrIIP 서열을 지니는 백터인 포유류 발현 백터 (하나는 경쇄용, 하나는 중쇄용임)에 서브클로닝 (subclone) 하였다. 항체를 상기 실시예 1에 기술된 바와 같이 생성하였는데, 즉, HEK293-EBNA 를 포유류 항체 중쇄 및 경쇄 발현 백터로 공-트랜스펙션시키고, 트랜스펙션한 지 5 내지 7 일 후 조건화된 배양 배지를 수합하고, 단백질 A 친화성 크로마토그래피 및 이어서 양이온 교환 크로마토그래피 및 최종적으로 크기 분리 압출 크로마토그래피 단계에 의해 분비된 항체를 정제하여, 순수한 단량체성 IgG1 항체를 단리하였다. 항체를 25 mM 인산칼륨, 125 mM 염화나트륨, pH 6.7의 100 mM 글리신 용액 중에 제형하였다. 인간화 항체 변이체의 글리코엔지니어링된 변이체를, 상기 실시예 1에서 키메라 항체에 대해 기술된 바와 같이, GnT-III 글리코실트랜스퍼라제 발현 백터와 함께, 또는 GnT-III 발현 백터 + 골지 만노시다제 II 발현백터와 함께, 항체 발현 백터를 공-트랜스펙션시켜 생성하였다. 글리코엔지니어링된 항체를 상기 비-글리코엔지니어링된 항체에 대해 상기에 기술된 바와 같이 정제 및 제형화하였다. 항체의 Fc 영역에 부착된 올리고사카라이드를 하기와 같이 MALDI/TLF-MS로 분석하였다.

#### [0407] 올리고사카라이드 분석

#### [0408] 용액 중의 항체에 대한 올리고사카라이드 방출 방법

40 내지 50  $\mu$ g 의 항체를, 최종 부피 25  $\mu$ l 중의 pH 7.0, 2mM Tris 중의 2.5 mU 인 PNGaseF(Glyko, USA) 와 혼합시키고, 상기 혼합물을 37°C에서 3 시간 동안 인큐베이션시켰다.

#### [0410] MALDI/TLF-MS용 샘플 제조

방출된 올리고사카라이드를 함유하는 효소 분해물을 최종 농도 150 mM 이 되도록 아세트산을 첨가한 후, 실온에서 추가로 3 시간 동안 인큐베이션시키고, 이어서, 이것을 마이크로-바이오-스핀 크로마토그래피 칼럼 (BioRad, 스위스)에 패킹된 0.6 ml 양이온 교환 수지 (AG50W-X8 수지, 수소 형태, 100-200 메쉬, BioRad, 스위스)를

통해 통과시켜 양이온 및 단백질을 제거하였다. 생성 샘플 1  $\mu\text{l}$  를 스테인레스 강철 표적 플레이트에 적용하고, 플레이트 상에서 1  $\mu\text{l}$ 의 sDHB 매트릭스와 함께 혼합하였다. sDHB 매트릭스를, 2,5-디히드로벤조산 2 mg + 5-메톡시살리실산 0.1 mg 을 에탄올/10 mM 수성 염화나트륨 1:1(v/v) 1  $\text{m}\text{l}$  에 용해시켜 제조하였다. 샘플을 공기 중에서 건조시키고, 0.2  $\mu\text{l}$  에탄올을 적용하고, 최종적으로 공기 중에서 재결정화되도록 샘플을 방치하였다.

#### [0412] MALDI/TOF-MS

[0413] 질량 스펙트럼을 수득하는데 사용된 MALDI-TOF 질량 분석기는 Voyager Elite(Perspective Biosystem s)이었다. 상기 기계는, 20 kV 의 가속 및 80 ns 의 지체로 선형 배열로 조작되었다. 올리고사카라이드 표준을 사용한 외부 측정을 이온의 질량 할당에 사용하였다. 200 레이저 발사로부터의 스펙트럼들을 종합하여 최종 스펙트럼을 수득하였다.

#### [0414] 항원 결합 어세이

[0415] 상기 실시예 1 의 키메라 B-Ly1 항체에 대해 기술된 바와 같이 유세포분석-기재 어세이를 사용하여, 정제된 단량체성 인간화 항체 변이체를 B-세포 림프종 표적 세포 상의 인간 CD20 과의 결합에 대해 시험하였다.

#### [0416] NK세포 및 Fc $\gamma$ RIIIA-발현 CHO 세포주에 단량체성 IgG1 글리코변이체의 결합

[0417] 것 단리된 말초혈액 단핵구 세포 (PBMC)로부터 CD16- 및 CD56-양성 세포 (MACS 시스템, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach/Germany) 가 풍부한 네거티브 선별을 하여 인간 NK 세포를 단리하였다. CD56 발현에 의해 결정된 순도는 88-95% 사이였다. 것 단리된 NK 세포를 칼슘 및 마그네슘 이온( $3 \times 10^5$  세포/ $\text{m}\text{l}$ ) 이 없는 PBS 에서 37°C 에서 20 분 동안 인큐베이션시켜, NK 세포-결합 IgG를 제거하였다. 세포를 PBS, 0.1% BSA 중 상이한 농도 (0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10  $\mu\text{g}/\text{m}\text{l}$ ) 의 항-CD20 항체 농도에서  $10^6$  세포/ $\text{m}\text{l}$  로 인큐베이션 시켰다. 수 차례의 세척 후, 1:200 FITC-컨쥬게이션된 F(ab')<sub>2</sub> 염소 항-인간, F(ab')<sub>2</sub> 특이적 IgG (Jackson Immune Research, West Grove PA/USA) 및 항-인간 CD-56 PE (BD Biosciences, Allschwil/Switzerland) 와 인큐베이션시켜 항체 결합을 검출하였다. 항-Fc  $\gamma$ RIIIA 3G8 F(ab')<sub>2</sub> 절편 (Ancell, Bayport, MN/USA) 을 10  $\mu\text{g}/\text{m}\text{l}$ 의 농도로 첨가하여, 항체 글리코변이체(3  $\mu\text{g}/\text{m}\text{l}$ )의 결합을 경합시켰다. 결합된 항체 변이체를 나타내는 형광 강도를 FACSCalibur (BD Biosciences, Allschwil/Switzerland) 상에서 CD56-양성 세포에 대해 결정하였다. CHO 세포를, Fc  $\gamma$ RIIIA-Val158  $\alpha$ -사슬 및  $\gamma$ -사슬을 암호화하는 발현 벡터로 전기천공법 (280 V, 950  $\mu\text{F}$ , 0.4 cm) 에 의해 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션된 것을 6  $\mu\text{g}/\text{m}\text{l}$  푸로마이신을 첨가하여 선별하였고, 안정한 클론을  $10^6$  세포에 대해 10  $\mu\text{l}$  FITC-컨쥬게이션된 항-Fc  $\gamma$ RIII 3G8 단일클론 항체(BD Biosciences, Allschwil/Switzerland)를 사용하여 FACS 에 의해 분석하였다. IgG1의 Fc  $\gamma$ RIIIA-Val158-발현 CHO 세포에의 결합을 상기 기술된 NK 세포 결합과 유사하게 수행하였다.

#### [0418] ADCC 어세이

[0419] 인간 말초혈액 단핵구 세포 (PBMC) 를 효과기 세포로 사용하였고, Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, M063178 USA) 를 사용하여, 본질적으로 제조업자의 설명에 따라 제조하였다. 간단히, 정맥혈을 지원자들로부터 혈관화시킨 주사기로 취하였다. 혈액을 PBS(Ca<sup>++</sup> 또는 Mg<sup>++</sup> 미함유) 와 1 : 0.75 - 1.3 이 되도록 희석시키고, Histopaque-1077에 층으로 놓았다. 구배를 실온 (RT) 에서  $400 \times g$  에서 30 분 동안 쉬지 않고 원심분리하였다. PBMC 를 함유하는 중간상을 수합하고, PBS (두 구배로부터 세포 당 50  $\text{m}\text{l}$ ) 로 세척하고, 실온에서  $300 \times g$  에서 10 분 동안 원심분리하여 수확하였다. 펠렛을 PBS 로 재현탁시킨 후, PBMC 를 계수하고, 실온에서  $200 \times g$  에서 10 분 동안 원심분리하여, 두 번째로 세척하였다. 다음, 후속한 과정을 위해 세포를 적절한 배지에 재현탁시켰다.

[0420] ADCC 어세이에 사용되는 효과기 대 표적의 비율은 PBMC 및 NK 세포에 대해 각각 25 : 1 및 10 : 1 이었다. 효과기 세포를 AIM-V 배지에서 적절한 농도로 제조하여, 둑근 바닥 96 웰 플레이트에 웰 당 50  $\mu\text{l}$  로 첨가하였다. 표적 세포는 10% FCS 함유 DMEM 에서 배양된 인간 B 림프종 세포 (예, Raji 세포) 였다. 표적 세포를 PBS 중에서 세척, 계수하고,  $\text{m}\text{l}$  당 30 만 개로 AIM-V 에 재현탁시켜, 마이크로 웰 당 100  $\mu\text{l}$  중에 30,000 개를 첨가하였다. 항체를 AIM-V 에 희석시키고, 미리-플레이트시킨 표적 세포에 50  $\mu\text{l}$  로 첨가하고, 실온에서 10 분 동안 방치하여 표적에 결합하도록 하였다. 다음, 효과기 세포를 첨가하고, 플레이트를 5% CO<sub>2</sub> 함유 습한 대기 중 37°C에서 4 시간 동안 인큐베이션시켰다. 손상된 세포로부터 방출된 락테이트 디히드로게나제

(LDH) 를 세포독성 검출 키트 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) 를 사용하여 측정함으로써, 표적 세포 사멸을 평가하였다. 인큐베이션 4 시간 후, 플레이트를  $800 \times g$  에서 원심분리하였다. 각 웰의  $100 \mu\text{l}$  상청액을 새로운 투명한 평바닥 96 웰 플레이트에 옮겼다. 키트의 색상 기질 완충액을 웰 당  $100 \mu\text{l}$  첨가하였다. 색 반응의  $V_{\text{max}}$  수치를, SOFTmax PRO 소프트웨어 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA94089, USA) 를 사용하는 ELISA 리더기 내  $490 \text{ nm}$  에서 10 분 이상 측정하였다. 계속적인 LDH 방출을 표적 및 효과기 세포만 함유하고, 항체는 없는 웰에서 측정하였다. 최대 방출을 오직 표적 세포 및 1% Triton X-100 만을 함유하는 웰에서 측정하였다. 특정 항체-매개 살해 백분율을 하기와 같이 계산하였다 :  $((x-\text{SR})/(\text{MR}-\text{SR})*100$  (여기서,  $x$  는 특정 항체 농도에서의  $V_{\text{max}}$  평균이고, SR은 계속적인 방출의  $V_{\text{max}}$  의 평균이고, MR은 최대 방출의  $V_{\text{max}}$  의 평균임).

#### [0421] 보체 의존성 세포독성 어세이

표적 세포를 계수, PBS 로 세척하고, AIM-V (Invitrogen) 에  $\text{mL}$  당 1 백만 개의 세포로 재현탁시켰다. 평바닥 96 웰 플레이트에 웰 당 세포  $50 \mu\text{l}$  를 플레이팅하였다. 항체 희석을 AIM-V 중에서 제조하고, 세포에  $50 \mu\text{l}$  로 첨가하였다. 항체가 세포에 결합하도록 10 분 동안 실온에 놔두었다. 인간 혈청 보체 (Quidel) 를 새로 해동시키고, AIM-V로 3-배 희석시키고, 웰 당  $50 \mu\text{l}$  로 첨가하였다. 래빗 보체 (Cedarlane Laboratories) 를 제조업자 설명문에 따라 제조하고, AIM-V로 3 배 희석시키고, 웰 당  $50 \mu\text{l}$  로 첨가하였다. 대조군으로서, 어세이 첨가 전에 보체원을 30 분 동안  $56^\circ\text{C}$  에서 가열하였다.

[0423] 어세이 플레이트를  $37^\circ\text{C}$  에서 2 시간 동안 인큐베이션시켰다. 세포의 살해를 LDH 방출을 측정함으로써 결정하였다. 간단히, 플레이트를  $300 \times g$  에서 3 분 동안 원심분리하였다. 웰 당  $50 \mu\text{l}$  상청액을 새로운 96 웰 플레이트에 옮기고, 세포독성 키트 (Roche) 의 어세이 시약  $50 \mu\text{l}$  를 첨가하였다. ELISA 리더기로 속도 (kinetic) 측정은 상청액 중의 LDH 농도에 부합하는  $V_{\text{max}}$  를 결정하였다. 최대 방출을 1% Triton X-100 의 존재 하에서 세포를 인큐베이션시킴으로써 결정하였다.

#### [0424] 전혈 B-세포 삭제 어세이

항-CD20 항체에 의한 전혈에서의 정상 B-세포 삭제는 상기 실시예 1 에서 기술된 바와 같이 수행하였다.

#### [0426] 세포자멸사 어세이

[0427] 항체의 세포자멸 효력은  $10 \mu\text{g/mL}$  의 항체 (항원 결합에 대한 포화 조건) 를 표적 세포 (표적 세포 농도  $5 \times 10^5 \text{ 세포/mL}$ ) 와 밤새 (16 - 24 시간) 인큐베이션시켜 어세이하였다. 샘플을 AnnV-FITC로 염색하고, FACS로 분석하였다. 어세이를 3 중으로 수행하였다.

[0428] 검출을, 아넥신 V 및 포스파티디 세린 (phosphatidy serine) 과 같은 세포자멸사 마커를 출현시켜 유세포분석에 의해 수행하였다. 음성 대조군 (세포자멸 유도되지 않음) 은 임의의 항체를 함유하지 않고, 오직 포스페이트 완충 식염수만 함유한다. 양성 대조군 (최대 세포자멸사) 은 강한 세포자멸사 유도체인 캄포테신 (Camptothecin, CPT)  $5 \mu\text{M}$  을 함유한다.

#### [0429] 결과 및 토의

[0430] 모, 키메라 B-Ly1 경쇄 (상기 실시예 1 에 기술된 바와 같은 mVL) 및 인간화 B-Ly1 경쇄 B(KV1)와 복합된 항체 변이체 B-HH1, B-HH2, B-HH3 의 인간 CD20 항원과의 결합을 비교하면, 모든 항체가 유사한 EC50 값을 가지나, B-HH1 구축물은 변이체 B-HH2 및 B-HH3에 비해 더 낮은 세기/화학양론으로 결합한다는 것을 나타낸다 (도 11).

B-HH1 은 그의 부분적 인간 CDR1 및 CDR2 영역 (Kabat 정의) 뿐만 아니라, 위치 28 (Kabat 번호화)에서의 Ala/Thr 다형성 (polymorphism) 에 의해, B-HH2 및 B-HH3 와 구별될 수 있다. 이는, 위치 28, 완전 CDR1 및 /또는 완전 CDR2가 항체/항원 상호작용에 중요함을 가리킨다.

[0431] B-HL1, B-HH1, 및 키메라 chB-Ly1 모 항체의 비교는, B-HL1 구축물에는 임의의 결합 활성이 없음을 보여주고, B-Ly1 와 비교해 B-HH1 의 결합 강도/화학양론의 약 절반임을 보여준다 (도 12). B-HH1 뿐만 아니라 B-HL1 도 인간 VH1 부류로부터 유도된 수용체 프레임워크를 기재로 디자인된다. 다른 차이점 중, B-HL1 구축물의 위치 71 (Kabat 번호화) 이 가장 차이가 나는데, 이는 항체 결합에 대한 그의 잠재적인 중요성을 나타낸다. 위치 71 의 아미노산은 중쇄의 CDR2 카노니칼 루프 구조를 결정하는 잔기 중 하나이다. 본원에서, 알라닌 또는 그의 기능성 대응물 (예를 들어, 루신, 발린 또는 트레오닌 (예를 들어, Morea 등, Methods 20:267-279(2000) 참조) 은 항원 결합에 중요한 것으로 보이는 한편, 아르기닌은 항원 결합에 불리한 것으로 보인다.

[0432]

도 2, 및 9 내지 13 의 항원 결합 데이터를 비교할 때, 테스트된 상이한 인간화 항체 변이체 중에서, BHH2-BKV1, BHL8-BKV1, 및 BHL11-표V1 변이체는, 인간 세포의 표면 상에 있는 인간 CD20에 양호한 결합 친화성을 보여준다. 항원 결합에 대한 EC50값이 유사하더라도, 이를 변이체는 CD20 양성 표적 세포에서 세포자멸사를 유도하는 그의 거동이 상당히 상이하다 (도 4 ~ 6, 14, 15 참조). 원래의 B-ly1 항체가 세포자멸사를 낮게 유도하는 것으로 보이기 때문에, 본 발명자들은 모 B-ly1 항체 구축물 및 B-HL8 과 BHH2 구축물 사이에 차이점을 측정하였다. B-HL8 또는 모 B-ly1 중에는 존재하지 않은 7 개의 잔기를 BHH2 중쇄에서 규명하였다 : Gln1, Ala9, Val11, Lys12, Ser16, Val20 및 Met48. 이들 모든 잔기는 VH 도메인의 골격 영역에 위치한다.

Gln1 을 제외하고는 직접 항원 접촉의 경향이 일어나지 않을 것 같았다. 이들 잔기 중 단일한 것만이 새로 형성된 세포자멸사-유도 특성에 책임있다는 것을 측정하기 위해, 잠재적으로 BHH2 구축물의 세포자멸사 거동을 저장할 수 있는 B-HL8 중쇄의 7 개의 변이체를 생성하였다 : B-HL11 (돌연변이 E1Q 가짐), B-HL12 (G9A, V48M), B-HL13 (L11V, V48M), B-HL14 (V12K, V48M), B-HL15 (G16S, V48M), B-HL16 (L20V, V48M), B-HL17 (V48M). SEQ ID NO:3 2, 34, 36, 38, 40, 42, 44 (서열 목록에 나타난 것은 Kabat에 따라 번호화되지 않았으나, 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있음) 를 참조한다. 이들 변이체의 항원 결합 특성은 EC50 값 및 화학양론에 대해서는 크게 상이하지 않다 (도 2 참조). 그러나, 지배적인 차이는 세포자멸사를 유도하는 그의 능력에서 발견될 수 있다 (도 4 ~ 6, 14, 15, 및 24 참조). L11V, V48M 개질, B-HL3 이 있는 구축물은 세포자멸사를 유도하는 능력이 유의하게 증가되었다 (도 24 참조). 그러나, V48M 개질은 단독적으로 가지적인 효과를 가지지 못하였다 (도 5 참조). 따라서, Kabat 위치 11 및 12에 있는 잔기는 세포자멸사 거동에 크게 영향을 미쳤다. 이들 잔기는 항원 결합에 직접 영향을 미치지 않으나, VH 및 CH1 도메인 사이의 경계면에 영향을 미치고, 따라서 팔꿈치 각의 변형을 통해 작용한다.

[0433]

B-HL4 구축물은, B-HH2의 FR1을 인간 생식선 서열 IGHV1-45 (Acc No. X92209)의 것으로 대체함으로써 B-HH2 항체로부터 유도된다. 상기 구축물은, FR1 중의 오직 4 개의 위치에서 상이한 아미노산을 가짐에도 불구하고, 현저하게 감소된 항원 결합력을 나타낸다. 이러한 잔기는 위치 2, 14, 28 및 30에 위치한다 (Kabat 번호화). 이 중에서, 위치 28 및 30은, 그것이 CDR1의 Chothia 정의의 일부이기 때문에, 영향력있는 위치이다. 변이체 B-HH8 및 9 (둘 다 BKV1 경쇄 가짐)에서 위치 28 및 30은 모 B-Ly1 서열과 비교해 개질된다.

도 22에서 나타낸 것처럼, 항원성은 트레오닌 28 또는 트레오닌 30이 존재한다면 유의하게 해를 입지 않는다 (도 22). 전체 Kabat CDR1, CDR2 및 CDR3가 이식된 인간화 경쇄에 역돌연변이가 도입되지 않았다. 세포자멸사의 유도에서 (도 14, 15 및 21), 가장 강력한 변이체는 인간화 B-Ly1 변이체 BHH2-BKV1(오리지널 chB-Ly1에 비해 훨씬 더 강력하고, 리투시마브에 동일한 서열이 있는 항체 C2B8 보다 더 강력함) 이었다. 증가된 세포자멸사를 회복할 수 있는 기타 인간화 변이체 (BHL8의 유도체)는 : B-HL1 및 B-HL14 (표 참고) 및 BHH8 ("혼합 프레임워크") 및 BHH9 (하나의 역돌연변이가 있는 "혼합된 프레임워크", S30T) 및 BHH6 (BHH2의 M34I 유도체) 이다. 변이체 BHH4는 추가의 비-인간 서열을 도입하지 않은 기타 인간화 B-Ly1 변이체이다.

변이체 BHH5, BHH6 및 BHH7은 부분 인간화된 Kabat CDR1 영역이 있는 B-HH2 구축물의 유도체이다.

[0434]

인간화 B-Ly1 항체의 중요한 특성은, 그것이 [Cragg, M.S 및 Glennie, M.J., *Blood* 103(7) : 2738 ~ 2743 (2004년 4월)]에 정의된 유형 II 항-CD20 항체라는 것이다. 따라서, 이는 CD20에 결합하여도, CD20+ 인간 세포의 표면으로부터 CD20의 비-이온성 세제 추출 (이를 위해, [Polyak, M. J. 및 Deans, J. P., *Blood* 99(9) : 3256-3262 (2002)]에 기술된 어세이를 사용함)에 대한 임의의 분명한 내성을 유도하지 않았다. 이는 확실히 C2B8 항체 (리투시마브에 동일한 서열을 가지는 또 다른 항-CD20 항체, Reff에게 허여된 미국 특허 출판 번호 제 2003 0003097 호 참조) 보다 현저히 낮은, CD20의 비-이온성 세제 추출에 대한 내성을 유도하였다. 유형 II 항-CD20 항체에서 기대되는 바와 같이, 인간화 B-Ly1은 임의의 분명한 보체 매개 과쇄 활성을 가지지 않았고, 항-CD20 항체 C2B8 (리투시마브에 동일한 서열을 가진 키메라 IgG1) 보다는 확실히 더 낮은 보체 매개 과쇄 활성을 나타내었다. 인간화 B-Ly1 항체 (변이체 BHH2 BKV1)의 또 다른 중요한 특성은, 그것이 동형 응집 어세이 (homotypic aggregation assay)에서 매우 강력하다는 것이었다. 상기 어세이에서 CD20-양성 인간 세포인 Daudi 세포를, Deans 참조 문헌에 자세히 설명된 바와 같이, 포유류 세포 인큐베이터 내 5% CO<sub>2</sub> 대기 중, 37°C에서 24시간 동안 세포 배양 배지에서 1 μg/ml 농도의 항체와 5 μg/ml의 농도에서 평행하게 인큐베이션시켰다. 비교로, 대조군, 세포의 평행 인큐베이션을, 항-CD20 항체 C2B8을 사용한 것을 제외하고 동일한 조건 하에 수행하였다. 인큐베이션 8시간 및 24시간을 포함하여 상이한 시점에서, 현미경을 사용하여 세포를 시각적으로 검사하였다. 인간화 B-Ly1 항체는 강한 동형 응집을 야기한다는 것을 발견하였는데, 여기서 상기 응집물은 C2B8 대조군 항체를 첨가하여 유도된 것보다 확실히 더 컸다. 또한, 항체가 항-CD20 유형 II인 것과 일치하게, 이는 CD20-양성 인간 세포를 인간화 B-Ly1 항체와 인큐베이션시킬 때, 리투시마브와 동일한 서열을 가진 C2B8 키메라 IgG1 항체를 사용하여 동일한 조건 하에서 대조군과 비교하여, 더 높은

수준의 세포자멸사를 유도하였다.

[0435]

인간화 항체의 글리코엔지니어링된 변이체를, 포유류 세포에서 항체 유전자와 함께 GnTIII 글리코실트랜스페라제를 공발현시켜서 생성하였다. 이는, WO 2004/065540에 기술된 바와 같이, 이분된 비-푸코실화 올리고사카라이드를 포함하여 항체의 Fc 영역에 부착된 비-푸코실화 올리고사카라이드의 분획을 증가시켰다 (도 17~19).

글리코엔지니어링된 항체는, 비-글리코엔지니어링된 항체 및 C2B8 항체에 비해, 인간 Fc $\gamma$ RIII 수용체(도 20)로의 확실히 더 높은 수준의 결합, 및 더 높은 ADCC 활성을 가졌다 (도 16). 인간화 B-Ly1 항체는 또한 대조군 C2B8 항체보다 전혈 어세이에서 인간 B-세포 삭제의 유도에 있어서 더욱 강력하다 (도 16). 이는, 비-글리코엔지니어링된 B-Ly1 항체 및 글리코엔지니어링된 버전의 것 모두에 대해 사실이었다. 글리코엔지니어링된 항체는 전혈에서의 B-세포 삭제에 있어서, C2B8 대조군 항-CD20 항체보다 약 1000-배 더 강력했다. 이러한 비교는 비-글리코엔지니어링된 및 글리코엔지니어링된 인간화 형태의 B-Ly1 항체에 모두에 있어서 중요한데, 이는 ADCC, 플러스 보체 매개 파쇄, 플러스 세포자멸사 유도와 같은 Fc 수용체-의존성 활성을 조합한 어세이에서, B-Ly1의 두 형태 모두 극적으로 더 낮은 보체 매개 파쇄 활성을 가짐에도 불구하고, B-Ly1의 두 형태 모두 현저하게 C2B8 보다 더 강력했기 때문이었다. ADCC, Fc 수용체-의존성 세포 살해 활성 및 세포자멸사 유도는 이러한 인간화 B-Ly1 항체 변이체의 우수한 활성에 존재하였다. 또한, 세포자멸사 어세이에서 비-글리코엔지니어링된 및 글리코엔지니어링된 형태의 상기 유형 II 항-CD20 항체는 모두 강력하였는데, 이는 비-Fc-엔지니어링된 변이체보다 Fc-엔지니어링된 변이체의 Fc $\gamma$  수용체에 대한 증가된 결합 친화성이, 세포자멸사 유도에 있어서 훨씬 더 강력하고, 모든 변이체가 대조군 항체 C2B8 보다 확실히 더 강력했기 때문이다. 증강된 동형 응집 및 유형 II 항-CD20 항체에 의해 매개된 세포자멸사 유도의 정확한 기작은 공지되지 않지만, Fc 감마 수용체와 같은 CD20-양성 세포의 표면 상의 다른 분자에의 동시적인 결합은 이러한 중요한 특성에 영향을 줄 수 있다. 따라서, Fc $\gamma$ RIII를 포함하는 Fc $\gamma$  수용체에 대한 증가된 결합 친화성 및 ADCC 활성에서의 관련된 증가를 위해 Fc 영역에서 엔지니어링된 유형 II의 항-CD20 항체가 비-Fc-엔지니어링된 것보다 더욱 더 강력한 세포자멸사 및 동형 응집을 유도할 수 있었음을 나타내는 것은 중요하다. 세포자멸사 유도는 생체 내에서 중요한데, 이는 표적 CD20-양성 세포가 발견될 수 있는 위치가 몸 속에 있으나, Fc $\gamma$ RIII-양성 세포에의 접근이 혈액에서보다 어려운 위치에 있어서이고, 예를 들어 그러한 위치는 림프절이다. 이러한 위치에서, 항-CD20 항체 그 자체에 의한 세포자멸사의 유도는 B-세포 삭제 접근을 통해 비-호즈킨 암종 및 B-세포 만성 림프 구성 백혈병과 같은 혈액 악성종양의 치료, 및 류마티스성 관절염 및 루푸스와 같은 자가면역성 질환 모두에 있어서, 인간에서의 항-CD20 항체 치료의 양호한 효과를 위해 중요할 수 있다. Fc $\gamma$ RIII에 대한 증가된 결합 친화성 및 인간화, Fc-엔지니어링된 유형 II 항-CD20 항체의 더 높은 ADCC 또한 이러한 치료에 매우 중요한 특성일 수 있다. 최종적으로, 인간화 및 Fc-엔지니어링된 변이체를 포함하여, 상기 유형 II 항-CD20 항체의 감소된 또는 사소한 보체 매개 파쇄 활성 또한 중요한데, 이는 항-CD20 항체에 의한 더 높은 보체 활성이 증가된 바람직하지 않은 부작용과 관련되어있기 때문이다.

[0436]

### 실시예 3

[0437]

세포자멸사 활성에 영향을 주는 잔기를 추가로 알아보기 위해, BHH2 종쇄의 6 개의 변이체를 제조하였다 : BHH2-A (V11L) (SEQ ID NO: 124), BHH2-B (K12V) (SEQ ID NO: 125), BHH2-C (A9G) (SEQ ID NO: 126), BHH2-D (E10G) (SEQ ID NO: 127), BHH2-E (T1 101) (SEQ ID NO: 128), 및 BHH2-F (S1 121) (SEQ ID NO: 129). . 이들 변이체 구축물은 본원 상기에 기술된 방법에 의해 표적 항원 (CD20)에의 결합에 대해 시험하였다. 모든 6 개의 변이체가 결합 활성을 가지고 있었다.

[0438]

이들 종쇄 변이체 구축물을 또한 본원 상기에 기술된 방법에 의해 세포자멸사 효과에 대해 시험하였다. 구축물 중 5 개, BHH2-B, BHH2-C, BHH2-D, BHH2-E, 및 BHH2-F 가 BHH2 모 구축물과 동일한 세포자멸사 능력을 가지고 있었다. 그러나, BHH2-A (V11L) 의 세포자멸사 유도 능력은 BHH2 와 비교해 유의하게 감소되었다 (도 23 참조).

[0439]

인간화된 B-1y1 경쇄 (BKV1)에서 단일 아미노산 치환의 세포자멸사 효과를 또한 5 개의 변이체를 제조하여 시험하였다 : BKV-10 (P40A) (SEQ ID NO:130), BKV-11 (A80P) (SEQ ED NO:131), BKV-12 (V83F) (SEQ ID NO:132), BKV-13 (E105A) (SEQ ID NO:133), andBKV-14 (I1 06A) (SEQ ID NO: 134). 구축물 BKV-11, BKV-12, BKV-13 및 BKV-14 를 표적 항원 (CD20)에의 결합에 대해 본원 상기에 기술된 방법에 의해 시험하고, 모든 4 개가 결합 활성을 가지고 있는 것으로 결정하였다. 이들 4 개의 경쇄 변이체 구축물을 또한 본원 상기에 기술된 방법에 의해 세포자멸사 효과에 대해 시험하였다. BKV-11, BKV-12 및 BKV-13 의 세포자멸사 능력은 각각의 치환에 의해 변하지 않았다. 그러나, BKV-14 의 세포자멸사 능력은 BKV-1 과 비교해 감소되었다 (도

25 참조).

[0440] 본 명세서에서 언급된 교과서, 저널, GenBank 내용물, 및 공개 출원과 같은 모든 공개 문헌은 각각의 개별 공개 물 또는 특허 출원이 참조로써 삽입된 대로 구체적으로 개별적으로 지시되는 바와 동일한 범위로 참조로써 본원에 삽입된다.

### 도면의 간단한 설명

[0078] 도 1 은 다양한 항-CD20 항체 중쇄 가변 영역 구축물의 아미노산 서열 정렬이다. 모노클로날 항체 1F5 의 가변 중쇄 영역의 아미노산 서열이 대조군 서열로서 사용된다. 1F5 와의 아미노산 차이가 음영처리되어 있다.

[0079] 도 2 는 Raji B-세포에 대한 상이한 인간화된 항-CD20 항체의 결합이다. 모 (키메라) B-Ly1 은 강한 세포자멸사를 유도하는 것으로 규명된 2 개의 인간화된 중쇄 변이체 (BHH2 및 BHH6) 뿐만 아니라, 이러한 효과를 복구하는 것으로 가정된 (인간화된, 비세포자멸사성) B-HL8 변이체의 유도체 (B-HL11 내지 17) 와 비교된다. 모든 인간화된 중쇄 변이체는 동일한 BKV1 인간화된 경쇄 변이체와 짹을 이루었다.

[0080] 도 3 은 Raji B-림프종 세포 상의 CD20 에 대한 리툭시마브 (○) 및 chB-Ly1 (△) 의 결합이다.

[0081] 도 4 는 3 개의 항-CD20 항체에 의한 항체-의존성 세포자멸사의 비교이다. chB-Ly1 야생형은 짹과 가변 영역 및 인간 불변 영역을 갖는 키메라 B-ly1 항체 구축물을 나타낸다. BHH2-BKV1 은 중쇄에 대한 VH1 부류 인간 생식 계열 V 유전자로부터 유래되고 BKV1 인간화된 B-ly1 경쇄와 짹을 이루는 인간 골격 영역 및 짹과 B-ly1 CDR 을 포함하는 인간화된 변이체를 나타낸다. BHL8-BKV1 야생형은 2 개의 상이한 인간 생식 계열 V 유전자로부터 유래되고 BKV1 인간화된 B-ly1 경쇄와 짹을 이루는 인간 골격 영역 및 짹과 B-ly1 CDR 을 포함하는 인간화된 변이체를 나타낸다.

[0082] 도 5 는 B-ly1 항-CD20 항체의 5 개의 인간화된 변이체에 의한 항체-의존성 세포자멸사의 비교이다. BHH2-BKV1 은 중쇄에 대한 VH1 부류 (BHH2) 로부터 유래되고 BKV1 인간화된 B-ly1 경쇄와 짹을 이룬 인간 골격 영역 및 짹과 B-ly1 CDR 을 포함하는 인간화된 변이체를 나타낸다. BHL8-BKV1 야생형은 2 개의 상이한 인간 생식 계열 V 유전자로부터 유래되고 BKV1 인간화된 B-ly1 경쇄와 짹을 이룬 인간 골격 영역 및 짹과 B-ly1 CDR 을 포함하는 인간화된 변이체를 나타낸다. BHL14-BKV1 은 중쇄 가변 영역의 Kabat 위치 12 에서 발린이 리신으로 치환되고 Kabat 위치 48 에서 발린이 메티오닌으로 치환된 BHL8 의 유도체를 나타내고, BKV1 경쇄 구축물과 짹을 이룬다. BHL15-BKV1 W1 은 또한, 중쇄 가변 영역의 Kabat 위치 16 에서 글리신이 세린으로 치환되고 Kabat 위치 48 에서 발린이 메티오닌으로 치환된 BHL8 로부터 유래되고, BKV1 경쇄 구축물과 짹을 이룬다. BHL16-BKV1 W1 은 중쇄 가변 영역의 Kabat 위치 20 에서 루신이 발린으로 치환되고 Kabat 위치 48 에서 발린이 메티오닌으로 치환된 BHL8 로부터 유래되고, BKV1 경쇄 구축물과 짹을 이룬다. BHL17-BKV1 W1 은 중쇄 가변 영역의 Kabat 위치 48 에서 발린이 메티오닌으로 치환된 BHL8 로부터 유래되고, BKV1 경쇄 구축물과 짹을 이룬다.

[0083] 도 6 은 C2B8 항-CD20 모노클로날 항체, 및 B-ly1 항체의 2 개의 인간화된 변이체인 BHH2-BKV1 및 BHL13-BKV1 에 의한 Z-138 세포에서의 항체-의존성 세포자멸사의 비교이다. BHH2-BKV1 은 중쇄에 대한 VH1 부류 인간 생식 계열 V 유전자로부터 유래되고 BKV1 인간화된 B-ly1 경쇄와 짹을 이룬 인간 골격 영역 및 짹과 B-ly1 CDR 을 포함하는 인간화된 변이체를 나타낸다. BHL13-BKV1 은 중쇄 가변 영역의 Kabat 위치 11 에서 루신이 발린으로 치환되고 Kabat 위치 48 에서 발린이 메티오닌으로 치환된 BHL8 로부터 유래되고 (상기 도 5 참조), BKV1 경쇄 구축물과 짹을 이룬다.

[0084] 도 7 은 Fc γRIIIa-158V/F 유전형의 3 개의 상이한 부류의 전혈에서 리툭시마브 (◇) 및 chB-ly1 (■) 에 의한 B-세포 제거이다 : (A) 더 낮은 친화성 수용체에 대해 동형인 F/F 공여자의 전혈 ; (B) 친화성 수용체에 대해 이형인 F/V 공여자의 전혈 ; 및 (C) 더 높은 친화성 수용체에 대해 동형인 V/V 공여자의 전혈.

[0085] 도 8 은 글리코엔지니어링된, 키메라 B-ly1 항체의 MALDI-TOF 프로파일이다. (A) 표는 특정 피크의 % 를 나타내고 ; (B) 는 글리코엔지니어링된 키메라 B-ly1 에 대한 스펙트럼이고 ; (C) Endo-H 로 처리된 글리코엔지니어링된 키메라 B-Ly1 의 스펙트럼이다.

[0086] 도 9 는 Raji B-세포에 대한 상이한 인간화된 항-CD20 항체의 결합이다. B-HH2 구축물 및 B-HL8 과 B-HL11 구축물 사이의 차이는, 모든 CDR 은 동일하면서, 골격 1 및 2 영역에 위치해 있다. B-HL8 및 B-HL11 은 인간 VH3 부류로부터 유래된 그의 FR1 및 FR2 서열을 갖는 반면, 완전한 B-HH2 골격은 인간 VH1 유래이다. B-

HL11 은 단일 돌연변이 Glu1Gln 이 있는 B-HL8 의 유도체로서, Gln 은 B-HH2 구축물 내 아미노산 잔기이다. 이는, Glu1Gln 교환이 결합 친화성 또는 세기를 변경시키지 않는다는 것을 의미한다. B-HH2 과 B-HL8 사이의 다른 차이는 14 개의 FR 잔기로서, 이 중 하나 이상은 본 항체의 항원 결합 거동에 영향을 미칠 것이다.

[0087] 도 10 은 Raji 표적 세포 상의 인간화된 항-CD20 항체 BHL4-BKV1 의 결합이다. B-HL4 구축물은 B-HH2 의 FR1 을 인간 생식 계열 서열IGHV1-45 (Acc No X92209) 의 것으로 대체함으로써 B-HH2 항체로부터 유래된다.

이러한 구축물은 FR1 내 단지 4 개의 위치에서 상이한 아미노산을 갖고 있음에도 불구하고, 항원 결합 성능이 크게 감소된 것을 보여준다. 이러한 잔기는 Kabat 번호화에 따라 위치 2, 14, 28 및 30 에 위치한다.

이 중에서, 위치 28 및 30 은 CDR1 의 Chothia 정의의 일부이기 때문에, 영향력있는 위치에 있는 것으로 보인다.

[0088] 도 11 은 B-HH1, B-HH2, B-HH3 (모두 BKV1 인간화된 B-ly1 경쇄와 짹을 이룸), 및 모 항체 B-ly1 사이의 결합 거동의 비교이다. 상기 데이터는, 모든 Ab 가 유사한 EC50 값을 보여주나, B-HH1 구축물은 변이체 B-HH2 및 B-HH3 보다 더 낮은 세기/화학양론으로 결합한다. B-HH1 은 그의 부분적 인간 CDR1 및 CDR2 영역 (Kabat 정의) 뿐만 아니라, 위치 28 (Kabat 번호화) 에서 Ala/Thr 다형 현상에 인해 B-HH2 및 B-HH3 과 구별될 수 있다. 이는 위치 28 의, 완전 CDR1 및/또는 완전 CDR2 가 항체/항원 상호작용에 중요하다는 것을 가리킨다.

[0089] 도 12 는 B-HL1, B-HH1, 및 B-ly1 모 항체 사이의 결합 거동의 비교이다. 데이터는 B-HL1 구축물 내에서의 결합 활성의 부재, 및 B-ly1 과 비교해 약 절반인 B-HH1 의 결합 세기/화학양론을 보여준다. B-HL1 뿐만 아니라 B-HH1 둘 다 인간 VH1 부류로부터 유래된 수용체 골격을 바탕으로 디자인된다. 다른 차이 중에서도, B-HL1 구축물의 위치 71 (Kabat 번호화) 은 중요한 차이이고, 이는 항원 결합에 대한 그의 추정상의 중요성을 가리킨다.

[0090] 도 13 은 그의 항원에 대한 항-CD20 항체 중쇄 구축물 B-HL2 및 B-HL3 사이의 결합 거동의 비교이다. 두 경우에서, 젖과 VL 서열은 인간화된 중쇄와 조합된다. 데이터는 B-HL2 및 B-HL3 구축물이 CD-20 결합 활성을 나타내지 않는다는 것을 보여주었다.

[0091] 도 14 는 Z-138 MCL 세포 상에서의 항-CD20 항체의 세포자멸사 효과이다.

[0092] 도 15 는 항-CD20 항체에 의한 세포자멸사이다. 어세이 세부사항 :  $5 \times 10^5$  세포/웰을 배양 배지 내에서 24-웰 플레이트 ( $5 \times 10^5$  세포/ml) 에 심었다.  $10 \mu\text{g/ml}$  최종 농도의 각 항체, 음성 대조군을 위한 PBS 또는  $5 \text{ mM}$  캄포테신 (CPT) 양성 대조군을 웰에 첨가하였다. 샘플을 밤새 (16 시간) 인큐베이션시키고, AnnV-FITC 로 염색하고, FACS 로 분석하였다. 어세이를 3 별 수행하였다. (\*): PBS 단독의 신호를 제하였다 (PBS 단독은 PR-1 및 Z-138 세포 각각에 대해 8% 및 2% AnnV+ 가 나왔음). 항체는 : C2B8 (키메라, 비-글리코엔지니어링된) ; BHH2-BKV1 (인간화된, 비-글리코엔지니어링된) 이 사용되었다. 주의 : 본 어세이는 추가의 효과기 세포를 포함하지 않고, 단지 표적 + 항체 또는 대조군을 포함한다.

[0093] 도 16 은 면역 효과기 세포와 함께 항-CD20 항체에 의한 표적-세포 살해이다. 어세이 세부사항 : 밤새 인큐베이션시켜서 정상 전혈 내에서의 B-세포 제거, 및 FACS 에 의해 CD19+/CD3+ 에 대한 분석을 측정하였다. ADCC 를 4 시간 인큐베이션시켜서 효과기로서 PBMC 를 사용하고 25:1 의 효과기:표적 비를 이용해 측정하였다. 세제-분해 (100%) 및 항체가 없을 때의 분해 (0%) 에 대한 칼세인-체류에 의해 표적-살해를 측정하였다. 사용된 항체는 : C2B8 (키메라, 비-글리코엔지니어링된 형태) ; BHH2-BKV1-야생형 (BHH2-BKV1 의 인간화된, 비-글리코엔지니어링된 형태) ; BHH2-BKV1-GE (BHH2-BKV1 의 인간화된, 글리코엔지니어링된 형태) 이었다.

[0094] 도 17 은 비개질, 비글리코엔지니어링된 BHH2-BKV1 인간화된 IgG1 B-ly1 항-인간 CD20 항체의 PNGaseF-방출 Fc-올리고사카라이드의 MALDI/TOF-MS 프로파일이다.

[0095] 도 18 은 글리코엔지니어링된 BHH2-BKV1g1 인간화된 IgG1 B-ly1 항-인간 CD20 항체의 PNGaseF-방출 Fc-올리고사카라이드의 MALDI/TOF-MS 프로파일이다.  $\beta$ -1,4-N-아세틸글루코스아미닐트랜스페라제 III (GnT-III) 촉매 활성이 있는 효소를 암호화하는 유전자 및 항체 유전자를 숙주 세포 내에서 공동-발현시켜 글리코엔지니어링을 수행하였다.

[0096] 도 19 는 글리코엔지니어링된 BHH2-BKV1g2 인간화된 IgG1 B-ly1 항-인간 CD20 항체의 PNGaseF-방출 Fc-올리고사카라이드의 MALDI/TOF-MS 프로파일이다.  $\beta$ -1,4-N-아세틸글루코스아미닐트랜스페라제 III (GnT-III) 촉매 활성을 가진 효소를 암호화하고 골지  $\alpha$ -만노시다제 II 촉매 활성을 가진 효소를 암호화하는 유전자와 항체 유전자를 숙주 세포 내에서 공동-발현시켜 글리코엔지니어링을 수행하였다.

- [0097] 도 20 은 비-글리코엔지니어링된 및 글리코엔지니어링된 (g2 버전 ; 글리코실화 프로파일에 대해서는 도 17 ~ 19 를 참조) 항체의, 재조합 CD16 을 발현하는 CHO 세포 표면상에 제시된 인간 Fc감마RIIIa 수용체에의 결합이다.
- [0098] 도 21 은 Z-138 MCL 세포 상에서 비-Fc 엔지니어링된 및 Fc-엔지니어링된 항-CD20 항체의 세포자멸사 효과이다. 어세이 세부사항 :  $5 \times 10^5$  세포/웰을 배양 배지 내에서 24-웰 플레이트 ( $5 \times 10^5$  세포/ml) 에 심었다.  $10 \mu\text{g/ml}$  최종 농도의 각 항체, 또는 음성 대조군을 위한 PBS 를 웰에 첨가하였다. 샘플을 밤새 (16 시간) 인큐베이션시키고, AnnV-FITC 로 염색하고, FACS 로 분석하였다. 어세이를 3 별 수행하였다. 사용된 항체는 : C2B8 = 리툭시마브 (키메라, 비-글리코엔지니어링된 형태); BHH2-BKV1 (인간화된, 비-글리코엔지니어링된-글리코실화 프로파일에 대해서는 도 17 ~ 19 참조); BHH2-BKV1g1 (인간화된, 글리코엔지니어링된); BHH2-BKV1g2 (인간화된, 글리코엔지니어링된) 이었다. 주의 : 본 어세이는 추가의 효과기 세포를 포함하지 않고, 단지 표적 + 항체 또는 대조군을 포함한다. (\*): PBS 단독에 대한 신호를 감하였다.
- [0099] 도 22 는 Raji B-세포에 대한 상이한 인간화된 항-CD20 항체의 결합이다. 인간화된 종체 구축물 BHH2 는 그의 유도체 BHH4 및 BHH7 과 비교된다. 또한, Kabat 위치 28 및 30 의 영향을 미치는 변이체가 나타나 있다 (BHH8 및 BHH9).
- [0100] 도 23 은 Z-138 MCL 세포 상에서 항-CD20 항체에 의한 세포자멸사에 있어서, 단일 아미노산 변화의 효과이다. 어세이 세부사항 :  $5 \times 10^5$  세포/웰을 배양 배지 내에서 24-웰 플레이트 ( $5 \times 10^5$  세포/ml) 에 심었다.  $10 \mu\text{g/ml}$  최종 농도의 각 항체, 또는 음성 대조군을 위한 PBS 를 웰에 첨가하였다. 샘플을 밤새 (16 시간) 인큐베이션시키고, AnnV-FITC 로 염색하고, FACS 로 분석하였다. 어세이를 3 별 수행하였다. 사용된 항체는 : C2B8 (키메라, 비-글리코엔지니어링된), BHH2 (인간화된, 비-글리코엔지니어링된), BHH2-A (Kabat 위치 11 에서 발린이 루신으로 치환된 BHH2 의 유도체), 및 BHH2-B (Kabat 위치 12 에서 리신이 발린으로 치환된 BHH2 의 유도체) 이었고, 뒤의 3 개는 BKV1 경쇄와 짹을 이루었다. 항원 결합의  $K_D$  는 치환에 의해 변하지 않고 그대로 있다. 주의 : 본 어세이는 추가의 효과기 세포를 포함하지 않고, 단지 표적 + 항체 또는 대조군을 포함한다.
- [0101] 도 24 는 Z-138 MCL 세포 상에서 이미 불활성인 항-CD20 항체에 의한 세포자멸사에 있어서, 단일 아미노산 교환의 효과이다. 어세이 세부사항 :  $5 \times 10^5$  세포/웰을 배양 배지 내에서 24-웰 플레이트 ( $5 \times 10^5$  세포/ml) 에 심었다.  $10 \mu\text{g/ml}$  최종 농도의 각 항체, 또는 음성 대조군을 위한 PBS 를 웰에 첨가하였다. 샘플을 밤새 (16 시간) 인큐베이션시키고, AnnV-FITC 로 염색하고, FACS 로 분석하였다. 어세이를 3 별 수행하였다. 사용된 항체는 : C2B8 (키메라, 비-글리코엔지니어링된), BHL8 (인간화된, 비-글리코엔지니어링된), BHL13 (Kabat 위치 11 에서 루신이 발린으로 치환되고 Kabat 위치 48 에서 발린이 메티오닌으로 치환된 BHL8 의 유도체), 및 BHL14 (Kabat 위치 12 에서 발린이 리신으로 치환되고 Kabat 위치 48 에서 발린이 메티오닌으로 치환된 BHL8 의 유도체) 이었고, 뒤의 3 개는 BKV1 경쇄와 짹을 이루었다. 주의 : 본 어세이는 추가의 효과기 세포를 포함하지 않고, 단지 표적 + 항체 또는 대조군을 포함한다.
- [0102] 도 25 는 Z-138 MCL 세포 상에서 항-CD20 항체에 의한 세포자멸사에 있어서, 경쇄 내 단일 아미노산 교환의 효과이다. 어세이 세부사항 :  $5 \times 10^5$  세포/웰을 배양 배지 내에서 24-웰 플레이트 ( $5 \times 10^5$  세포/ml) 에 심었다.  $10 \mu\text{g/ml}$  최종 농도의 각 항체, 음성 대조군을 위한 PBS 또는 양성 대조군을 위한 5 mM 캄포테신 (CPT) 을 웰에 첨가하였다. 샘플을 밤새 (16 시간) 인큐베이션시키고, AnnV-FITC 로 염색하고, FACS 로 분석하였다. 어세이를 3 별 수행하였다. 사용된 항체는 : BKV1 경쇄와 짹을 이룬 BHH2-A (Kabat 위치 11 에서 발린이 루신으로 치환된 BHH2 의 유도체), BKV1 경쇄와 짹을 이룬 BHH6 (Kabat 위치 34 에서 메티오닌이 이소루신으로 치환된 BHH2 의 유도체), 및 BKV14 경쇄와 짹을 이룬 BHH6 (Kabat 위치 106 에서 이소루신이 알라닌으로 치환된 BKV1 의 유도체) 이었다.
- [0103] 도 26 은 VH 및 CH1 도메인 사이의 경계면에 있는 문자 "볼 앤드 소켓 조인트" 의 3-차원 도식이다.
- [0104] **발명의 상세한 설명**
- [0105] 용어는 하기 및 본원에서 달리 정의되지 않는 한, 당업계에서 일반적으로 사용된 바대로 본원에서 사용된다.
- [0106] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 항원 결합 문자 (ABM) 는 넓은 의미에서, 항원 결정소에 특이적으로 결합하는 문자를 말한다. "특이적으로 결합한다" 는 결합이 항원에 대해 선택적이고 원하지 않거나 또는 비특이적인

상호작용과 구별될 수 있음을 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 개질된 항원 결합 분자 (또는 개질된 ABM)는 중쇄 가변 영역 및/또는 CH1 영역에서의 하나 이상의 아미노산 잔기 치환 및/또는 경쇄 가변 영역 및/또는 CL 영역에서의 하나 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함하는 ABM을 말한다.

[0107] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 항체는 모노클로날, 폴리클로날 및 다중특이성 (예를 들어, 이중특이성) 항체를 포함하여 전체 항체 분자뿐만 아니라, Fc 영역을 갖고 결합 특이성을 유지하는 항체 절편, 및 면역글로불린의 Fc 영역에 상응하는 영역을 포함하고 결합 특이성을 유지하는 융합 단백질을 포함한다. 또한, VH 절편, VL 절편, Fab 절편, F(ab')2 절편, scFv 절편, Fv 절편, 미니바디, 다이아바디, 트리아바디 및 테트라바디를 포함하나 이에 제한되지 않는, 결합 특이성을 유지하는 항체 절편이 포함된다 (예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로써 삽입된 [Hudson and Souriau, *Nature Med.* 9: 129-134 (2003)]를 참조). 또한, 인간화된 항체, 영장류화된 항체 및 키메라 항체도 포함된다. 본원에 사용된 바와 같이, 전체 항체는 각각이 가변 영역 및 불변 영역을 포함하는 2 개의 중쇄 및 2 개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 분자를 말한다.

[0108] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 가변 영역은 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄의 N-말단 도메인을 말한다. 본 발명의 한 구현예에 따르면, 개질된 ABM은 가변 영역의 기능성 절편을 포함할 수 있다.

[0109] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 중쇄 가변 영역은 면역글로불린 중쇄의 N-말단 도메인을 말한다. 한 예에서, 중쇄 가변 영역은 Kabat 위치 1 내지 113에 의해 한정된다 ([Kabat 등, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983)]에 의해 지정된 특정 잔기에서의 삽입이 가능함). 본 발명의 한 구현예에 따르면, 개질된 ABM은 중쇄 가변 영역의 기능성 절편을 포함할 수 있다.

[0110] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 중쇄 불변 영역은 면역글로불린 중쇄의 C 말단 도메인을 말한다. 중쇄 불변 영역의 5 가지 자연-발생 부류가 있다 : IgA, IgG, IgE, IgD, 및 IgM. 한 예에서, 중쇄 불변 영역은 CH1 도메인, CH2 도메인, 및 CH3 도메인을 포함한다.

[0111] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 CH1 영역은 가변 영역의 C-말단과 헌지 영역의 N-말단인 면역글로불린의 중쇄 도메인을 말한다. IgG 유형의 면역글로불린에서, 예를 들어, CH1은 통상 Kabat 위치 114에서 228로 정의된다.

[0112] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 세포자멸사는 핵 절편화 및/또는 세포질, 원형질막 및/또는 세포기관의 응축에 의한 세포자멸사체의 형성과 같은 특정 세포 사건을 특징으로 하는 예정된 세포 사멸을 말한다.

[0113] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 아고니스트 활성은 세포 표면과 연관된 분자와 상호작용하고 (예를 들어, 결합하고) 반응을 개시하거나 또는 유도할 때의 제제 (예를 들어, 항원 결합 분자)의 활성을 말한다.

[0114] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 안타고니스트 활성은 세포 상의 분자와 상호작용하고 (예를 들어, 결합하고) 반응의 개시나 유도를 방지하거나 또는 진행 반응을 중지시킬 때의 제제 (예를 들어, 항원 결합 분자)의 활성을 말한다.

[0115] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 융합 및 키메라는 ABM과 같은 폴리펩티드에 관해 사용될 때, 상이한 종의 항체 일부와 같은 2 개 이상의 이중 폴리펩티드로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 말한다. 키메라 ABM에 대해, 예를 들어, 비-항원 결합 성분은 침팬지 및 인간과 같은 영장류를 포함하여 다양한 종으로부터 유래될 수 있다. 키메라 ABM의 불변 영역은 가장 바람직하게는 본래의 인간 항체의 불변 영역과 실질적으로 동일하고 ; 키메라 항체의 가변 영역은 가장 바람직하게는 흥미있는 항원에 특이적으로 결합하는 비-인간 (즉, 공여자) 항원 결합 분자로부터 유래된다. 키메라 ABM은 전체 공여자 가변 영역을 포함할 수 있고 ; 대안적으로는, 키메라 항체는 인간화된 또는 영장류화된 항체를 포함할 수 있다. 인간화된 항체는 특히 바람직한 융합 또는 키메라 항체 형태이다.

[0116] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 인간화된 항체는 모 분자의 항원-결합 특성을 유지하거나 또는 실질적으로 유지하나 인간에서 거의 면역원성이지 않은 비-인간 항원-결합 분자, 예를 들어, 쥐과 항체로부터 유래된 항원 결합 분자를 말한다. 이는 (a) 전체 비-인간 가변 도메인을 인간 불변 영역에 이식하여 키메라 항체를 생성하는 것, (b) 단지 비-인간 CDR을 중요한 골격 잔기 (예를 들어, 양호한 항원 결합 친화성 또는 항체 기능을 유지하는데 중요한 골격 잔기)가 있거나 또는 없는 인간 골격 및 불변 영역에 이식하는 것, 또는 (c) 전체 비-인간 가변 도메인을 이식하나, 표면 잔기를 대체하여 인간-형 부분으로 그것들을 "가리는 것"을 포함하여 다양한 방법에 의해 수행될 수 있다. 상기 방법은 그 전체가 본원에 참조로써 삽입된 [Jones 등, Morrison 등, Proc. Natl. Acad. Sci., 81:6851-6855 (1984); Morrison and Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988); Verhoeyen 등,

Science, 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun., 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun., 31(3):169-217 (1994)]에 개시되어 있다.

[0117] 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 각각에 일반적으로 3 개의 상보성 결정 영역 또는 CDR (CDR1, CDR2 및 CDR3) 이 있으며, 이는 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 각각에 있는 4 개의 골격 하위 영역 (즉, FR1, FR2, FR3, 및 FR4)에 인접하여 위치한다 : FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. 인간화된 항체에 관한 토의는 즉, 미국 특허 제 6,632,927 호에서 찾을 수 있고, 미국 출원 2003/0175269에 개시되어 있으며, 이 둘 다 그 전체가 본원에 참조로써 삽입되어 있다.

[0118] 유사하게는, 본원에 사용된 바와 같이, 용어 영장류화된 항체는 모 분자의 항원-결합 특성을 유지하거나 또는 실질적으로 유지하나 영장류에서 거의 면역원성이지 않은 비-영장류 항원-결합 분자, 예를 들어 젖과 항체로부터 유래된 항원-결합 분자를 말할 때 사용된다.

[0119] 당 기술분야에 사용되고/거나 또는 허용되는 2 가지 이상의 정의가 있는 경우, 본원에 사용된 바와 같이 용어의 정의는 명백히 달리 언급되지 않는 한, 모든 그러한 의미를 포함하는 것으로 여긴다. 구체적인 예는 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드 둘 다의 가변 영역 내에서 발견된 비-연속적인 항원 조합 부위를 말하기 위한 용어 "상보성 결정 영역" ("CDR")의 사용이다. 이러한 특별한 영역은 본원에 참조로써 삽입된 [Kabat 등, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983)] 및 [Chothia 등, J Mol Biol. 196:901-917 (1987)]에 의해 기술되었고, 상기 정의는 서로 비교될 때 아미노산 잔기를 오버랩하거나 또는 부분집합을 포함한다. 그럼에도 불구하고, 항체 또는 그의 변이체의 CDR을 말하기 위한 정의의 적용은 본원에 정의되고 사용된 용어의 범주 내에 있다. 상기 언급된 참조의 각각에 의해 정의된 CDR을 포함하는 적절한 아미노산 잔기는 비교로서 하기 표 1에 나타나 있다. 특별한 CDR을 포함하는 정확한 잔기 수는 CDR의 크기 및 서열에 따라 다양할 것이다. 당업자는 잔기가 주어진 항체의 가변 영역 아미노산 서열에 특별한 CDR을 포함한다는 것을 통상적으로 측정할 수 있다.

### 표 1

CDR 정의 <sup>1</sup>	Kabat	Chothia	OxAbM <sup>2</sup>
V <sub>H</sub> CDR1	31-35	26-35	26-35
V <sub>H</sub> CDR2	50-65	52-58	50-58
V <sub>H</sub> CDR3	95-102	95-102	95-102
V <sub>L</sub> CDR1	24-34	26-32	24-34
V <sub>L</sub> CDR2	50-56	50-52	50-56
V <sub>L</sub> CDR3	89-97	91-96	89-97

<sup>1</sup> 표 1의 모든 CDR 정의의 번호화는 Kabat 등 (하기 참조)에 나와 있는 번호화 규정에 따른 것이다.

<sup>2</sup> "OxAbM"은 Oxford 분자 "AbM" 항체 모델링 소프트웨어에 의해 정의된 CDR을 말한다.

[0121] Kabat 등은 또한 임의의 항체에 적용가능한 가변 도메인 서열에 대한 번호화 시스템을 정의하였다. 당업자는 서열 자체의 범위를 넘어서는 실험 데이터에 의존하지 않고 명백히 이러한 "Kabat 번호화" 시스템을 가변 도메인 서열에 지정하였다. 본원에 사용된 바와 같이, "Kabat 번호화"는 [Kabat 등, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983)]에 나타낸 번호화 시스템을 말한다. 달리 언급되지 않는 한, ABM 내 특정 아미노산 잔기 위치의 번호화에 대한 참조는 Kabat 번호화 시스템에 따른 것이다. 서열 목록의 서열은 Kabat 번호화 시스템에 따라 번호화되지 않는다.

[0122] 본원에 사용된 바와 같이, "GnTIII 활성"을 갖는 폴리펩티드는 N-연결 올리고사카라이드의 트리만노실 코어의  $\beta$ -연결 만노사이드에의  $\beta$ -1-4 연결에서 N-아세틸글루코스아민 (GlcNAc) 잔기의 첨가를 촉매시킬 수 있는 폴리펩티드를 말한다. 이는 투여량 의존성이 있거나 또는 없이, 특별한 생물학적 어세이에서 측정된 바와 같이, [Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)]에 따라,  $\beta$ -1,4-만노실-당단백질 4-베타-N-아세틸글루코스아미닐-트랜스페라제 (EC 2.4.1.144)라고도 알려진  $\beta$ (1,4)-N-아세틸글루코스아미닐트랜스페라제 III의 활성과 유사하나 본질적으로 동일하지는 않은 효소 활성을 나타내는 융합 폴리펩티드를 포함한다. 투여량 의존성이 있는 경우, GnTIII의 것과 동일할 필요는 없으나,

GnTIII 와 비교해 주어진 활성이 투여량-의존성과 실질적으로 유사하다 (즉, 후보 폴리펩티드는 GnTIII 와 비교해 약 25-배 미만 이하의 더 큰 활성, 및 바람직하게는 약 10 배 미만 이하의 더 큰 활성, 및 가장 바람직하게는 약 3-배 미만 이하의 더 큰 활성을 나타낼 것임).

[0123] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 변이체 (또는 유사체) 는 예를 들어, 재조합 DNA 기술을 사용하여 형성된 아미노산 삽입, 삭제, 및 치환에 의해 본 발명의 구체적으로 언급된 폴리펩티드와 상이한 폴리펩티드를 말한다. 본 발명의 ABM 의 변이체는 키메라, 영장류화된 또는 인간화된 항원 결합 분자를 말하고, 여기서, 하나 또는 여러 개의 아미노산 잔기는 실질적으로 항원 결합 친화성에 영향을 미치지 않는 방식으로 대체, 첨가 및/또는 삭제에 의해 개질된다. 아미노산 잔기가 흥미있는 활성을 없애지 않으면서 대체, 첨가 또는 삭제될 수 있는지를 결정하는데 대한 지침은 특정 폴리펩티드의 서열을 상동성 웨이트의 것과 비교하고 고도의 상동성 영역 (보존된 영역) 에서 형성되는 아미노산 서열 변화의 수를 최소화함으로써, 또는 아미노산을 보존 서열로 대체함으로써 발견될 수 있다.

[0124] 대안적으로, 이러한 동일 또는 유사한 폴리펩티드를 암호화하는 재조합 변이체는 유전적 코드 내 "잉여부분 (redundancy)" 을 사용함으로써 합성 또는 선택될 수 있다. 다양한 제한 부위를 생성하는 침묵 변화와 같은 다양한 코돈 치환은 플라스미드 또는 바이러스 벡터 내로의 클로닝 또는 원핵 또는 진핵 시스템 내에서의 발현을 최적화시키기 위해 도입될 수 있다. 폴리뉴클레오티드 서열 내 돌연변이는 폴리펩티드의 부분의 특성을 개질시키고, 리간드-결합 친화성, 내부사슬 친화성, 또는 분해/던오버 비율과 같은 특징을 변화시키기 위해, 폴리펩티드에 첨가되는 다른 웨이트의 폴리펩티드 또는 도메인에서 반영될 수 있다.

[0125] 본원에 사용된 바와 같이, 아미노산 잔기 치환은 대조군 서열 (예를 들어, 항원 결합 분자와 같은 모 분자) 내 하나 이상의 아미노산을 대체하는 것을 말한다. 한 구현예에서, 아미노산 잔기 치환은 예를 들어, 모 서열과 비교해 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 서열 내에서의 점 돌연변이에 의해 이루어질 수 있다. 또 다른 구현예에서, 아미노산 잔기의 치환은 아마도, 모 폴리펩티드의 전체 골격 영역을, 예를 들어, 모 폴리펩티드와 비교해 치환될 위치에 목적하는 아미노산을 포함하는 생식 계열 VH 서열의 골격 영역으로 대체함으로써 이루어질 수 있다.

[0126] "보존성" 아미노산 치환은 하나의 아미노산을, 유사한 구조 및/또는 화학 특성을 가진 또 다른 아미노산으로 대체함으로써, 즉 보존성 아미노산 대체에 이루어지고, 관련 잔기의 극성, 전하, 용해성, 소수성, 친수성, 및/또는 양친매성 성질의 유사성을 바탕으로 이루어질 수 있는 치환이다. 예를 들어, 비극성 (소수성) 아미노산에는 글리신, 알라닌, 루신, 이소루신, 발린, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토фан 및 메티오닌이 포함되고 ; 극성 중성 아미노산에는 세린, 트레오닌, 시스테인, 타이로신, 아스파라гин 및 글루타민이 포함되고 ; 양전하성 (염기성) 아미노산에는 아르기닌, 리신 및 히스티딘이 포함되고 ; 음전하성 (산성) 아미노산에는 아스파르트산 및 글루탐산이 포함된다. "삽입" 또는 "삭제" 는 바람직하게는 약 1 내지 20 개의 아미노산, 더욱 바람직하게는 1 내지 10 개의 아미노산 범위에서 이루어진다. 변이는 재조합 DNA 기술을 사용하여 폴리펩티드 분자 내 아미노산의 삽입, 삭제, 또는 치환을 시스템적으로 생성하고 생성된 재조합 변이체를 활성에 대해 어세이함으로써 실험적으로 측정될 수 있다.

[0127] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 모 항원 결합 분자, 또는 모 분자는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 특별한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 말한다. 모 분자의 서열 (즉, 모 서열) 은 세포 신호 활성 및/또는 항원의 가교를 유도하거나 또는 방지하는 생성 분자 (예를 들어, 개질된 항원 결합 분자) 의 능력을 변경시키는 아미노산 잔기 치환을 생성하는데 있어서 대조군 서열로서 작용한다. 마찬가지로, 모 분자의 활성은 치환이 세포 신호 활성 및/또는 항원의 가교에 효과를 갖는지, 그리고 그 효과의 상대적인 범위를 결정할 때 대조군으로서 작용한다. 그의 모 서열과 비교해 하나 이상의 아미노산 치환을 함유하는 서열 (예를 들어, 개질된 ABM) 은 추가의 치환을 위해 다시 모 서열로서 작용할 수 있다.

[0128] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 변형된 세포 신호 활성은 표적 항원의 세포 신호 활성을 유도하거나 또는 억제시키는 ABM 의 능력의 증가 또는 감소를 말한다.

[0129] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 하나 이상의 표적 항원의 변형된 가교는, 세포 신호 경로를 개시하는, 서로에 대한 더 가까운 근접성, 및/또는 다른 막-연관 분자와의 더 가까운 근접성, 및/또는 복합체를 형성할 수 있는 (예를 들어, 단백질의 가교, 또는 막-연관 수용체의 올리고머화를 통해) 표적 항원과의 상호작용을 위한 더욱 선호할만한 구조를 야기하는 ABM 의 능력의 증가 또는 감소를 말한다.

[0130] 본원에 사용된 바와 같이, 세포 신호 기작 또는 세포 신호 활성은 특별한 세포 사건 또는 생물학적 기능 뿐만

아니라 경로에 따른 신호 단계를 초래하는 전체 신호 (즉, 신호 전달) 경로를 말한다.

[0131] 예를 들어, 본 발명의 대조군 뉴클레오티드 서열과 95% 이상 "동일한" 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산 또는 폴리뉴클레오티드는, 상기 폴리뉴클레오티드 서열이 대조군 뉴클레오티드 서열의 각 100 개의 뉴클레오티드 당 5 개 이하의 점 돌연변이를 포함할 수 있다는 점을 제외하고는, 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열이 대조군 서열과 동일함을 말한다. 즉, 대조군 뉴클레오티드 서열과 95% 이상 동일한 뉴클레오티드 서열을 가진 폴리뉴클레오티드를 수득하기 위해서는, 대조군 서열 내 5% 이하의 뉴클레오티드가 삭제되거나 또 다른 뉴클레오티드로 치환될 수 있거나, 또는 대조군 서열 내 총 뉴클레오티드의 5% 이하의 수의 뉴클레오티드가 대조군 서열에 삽입될 수 있다.

[0132] 실질적인 문제로서, 특별한 핵산 분자 또는 폴리펩티드가 본 발명의 뉴클레오티드 서열 또는 폴리펩티드 서열과 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한지는 공지된 컴퓨터 프로그램을 사용해 통상적으로 측정될 수 있다. 글로벌 서열 정렬이라고도 하는 쿼리 서열 (본 발명의 서열) 및 대상 서열 사이의 최상의 전체적인 매치를 측정하는 바람직한 방법은 [Brutlag 등, Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990)] 의 알고리즘을 바탕으로 한 FASTDB 컴퓨터 프로그램을 사용하여 측정될 수 있다. 서열 정렬에서, 쿼리 및 대상 서열은 둘 다 DNA 서열이다. RNA 서열은 U 를 T 로 변환시킴으로써 비교될 수 있다. 상기 글로벌 서열 정렬의 결과는 % 동일성으로 나타낸다. % 동일성을 계산하는 DNA 서열의 FASTDB 정렬에 사용되는 바람직한 파라미터는 : 매트릭스 (Matrix) = 일원 (Unitary), k-(터플) = 4, 미스매치 폐널티 (Mismatch Penalty) = 1, 조이닝 폐널티 (Joining Penalty) = 30, 랜덤화 그룹 길이 (Randomization Group Length) = 0, 컷오프 스코어 (Cutoff Score) = 1, 갭 폐널티 (Gap Penalty) = 5, 갭 사이즈 폐널티 (Gap Size Penalty) = 0.05, 윈도우 사이즈 (Window Size) = 500, 또는 어느 것이 더 짧든 간에 대상 뉴클레오티드 서열 길이이다.

[0133] 대상 서열이 내부 삭제가 아니라 5' 또는 3' 삭제 때문에 쿼리 서열보다 더 짧다면, 결과에 수동 보정이 이루어져야만 한다. 이는, FASTDB 프로그램이 % 동일성을 계산할 때, 대상 서열의 5' 및 3' 절단을 이해하지 못하기 때문이다. 5' 또는 3' 말단에서 절단된 대상 서열에 대해, 쿼리 서열과 비교해, 쿼리 서열의 총 염기의 %로서, 매치/정렬되지 않은 대상 서열의 5' 및 3' 인 쿼리 서열의 염기수를 계산함으로써 % 동일성을 보정한다. 뉴클레오티드가 매치/정렬되었는지는 FASTDB 서열 정렬 결과에 의해 결정된다. 다음, 구체적인 파라미터를 사용하는 상기 FASTDB 프로그램에 의해 계산된 동일성 %에서 이 %를 감하여, 최종 % 동일성을 수득한다. 이렇게 보정된 스코어는 본 발명의 목적에 사용되는 스코어이다. FASTDB 정렬에 의해 나타낸 바와 같이, 쿼리 서열에 매치/정렬되지 않은 대상 서열의 5' 및 3' 염기 외부의 염기만이 % 동일성 스코어를 수동 조정하기 위해 계산된다.

[0134] 예를 들어, % 동일성을 측정하기 위해 90 개 염기 대상 서열이 100 개의 염기 쿼리 서열에 정렬된다. 삭제는 대상 서열의 5' 말단에 일어나고, 따라서, FASTDB 정렬은 5' 말단에 있는 처음 10 개의 염기의 매치/정렬을 보여주지는 않는다. 10 개의 짹을 이루지 않는 염기는 서열의 10% (매치되지 않은 5' 및 3' 말단에 있는 염기수/쿼리 서열 내 총 염기수) 를 나타내고, 따라서 10% 는 FASTDB 프로그램에 의해 계산된 % 동일성 스코어에서 감해진다. 만일 남아 있는 90 개의 염기가 완전히 매치된다면, 최종 % 동일성은 90% 일 것이다. 또 다른 예에서, 90 개의 대상 서열은 100 개의 염기 쿼리 서열과 비교된다. 이 때, 삭제는 내부 삭제여서, 쿼리와 매치/정렬되지 않은 대상 서열의 5' 또는 3' 말단에 어떤 염기도 없다. 이 경우, FASTDB 에 의해 계산된 % 동일성이 수동 보정되지 않는다. 일단 다시, 쿼리 서열과 매치/정렬되지 않은 대상 서열의 5' 및 3' 말단에 있는 염기만이 수동 보정된다. 다른 어떤 수동 보정도 본 발명의 목적을 위해 이루어지지 않는다.

[0135] 본 발명의 쿼리 아미노산 서열과 예를 들어 95% 이상 "동일한" 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드는, 대상 폴리펩티드 서열이 쿼리 아미노산 서열의 각각의 100 개의 아미노산 당 5 개 이하의 아미노산 변경을 포함할 수 있다는 점을 제외하고는, 대상 폴리펩티드의 아미노산 서열이 쿼리 서열과 동일하다는 것을 말한다. 즉, 쿼리 아미노산 서열과 95% 이상 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 수득하기 위해서는, 대상 서열 중 5% 이하의 아미노산 잔기가 삽입, 삭제 또는 또 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 이러한 대조군 서열의 변경은 대조군 아미노산 서열의 아미노 또는 카복시 말단 위치에서, 또는 대조군 서열 또는 대조군 서열 내의 하나 이상의 연속 기에 있는 잔기 중에서 개별적으로 산재된 그러한 말단 위치 사이의 어디에서나 일어날 수 있다.

[0136] 실용적인 문제로서, 특별한 폴리펩티드가 대조군 폴리펩티드와 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한지는 공지된 컴퓨터 프로그램을 사용하여 통상 측정될 수 있다. 글로벌 서열 정렬이라고도 하는, 쿼리 서열 (본 발명의 서열) 및 대상 서열 사이의 최상의 전체적인 매치를 측정하는 바람직한 방법은 [Brutlag 등, Comp. App. Biosci. (5:237-245 (1990))] 의 알고리즘을 바탕으로 한 FASTDB 컴퓨터 프로그램을 사용하여

측정될 수 있다. 서열 정렬에서, 쿼리 및 대상 서열은 둘 다 뉴클레오티드 서열이거나 또는 둘 다 아미노산 서열이다. 상기 글로벌 서열 정렬의 결과는 % 동일성으로 나타난다. FASTDB 아미노산 정렬에 사용되는 바람직한 파라미터는 : 매트릭스 = PAM 0, k-터플 = 2, 미스매치 페널티 = 1, 조이닝 페널티 = 20, 랜덤화 그룹 길이 = 0, 컷오프 스코어 = 1, 윈도우 사이즈 = 서열 길이, 캡 페널티 = 5, 캡 사이즈 페널티 = 0.05, 윈도우 사이즈 = 500 또는 어느 것이 더 짧든지간에 대상 아미노산 서열의 길이이다.

[0137] 내부 삭제 때문이 아니라 N- 또는 C-말단 삭제로 인해 대상 서열이 쿼리 서열보다 짧다면, 결과에 수동 보정이 이루어져야만 한다. 이는, FASTDB 프로그램이 글로벌 % 동일성을 계산할 때, 대상 서열의 N- 및 C-말단 절단을 이해하지 못하기 때문이다. 쿼리 서열에 대해 N- 및 C-말단에서 절단된 대상 서열에 대해, % 동일성을 대상 서열의 N- 및 C-말단인 쿼리 서열의 잔기의 수를 계산함으로써 보정하고, 이는 쿼리 서열의 총 염기의 %로서, 상응하는 대상 잔기와 매치/정렬되지 않는다. 잔기가 매치/정렬되는지는 FASTDB 서열 정렬 결과 측정된다. 다음, 구체적인 파라미터를 사용하는 상기 FASTDB 프로그램에 의해 계산된 동일성 %에서 이러한 %를 감하여, 최종 % 동일성 스코어를 수득한다. 이러한 최종 % 동일성 스코어는 본 발명의 목적에 사용되는 스코어이다. 쿼리 서열에 매치/정렬되지 않는 대상 서열의 N- 및 C-말단의 잔기만이 % 동일성 스코어를 수동 조정하는데 고려된다. 즉, 단지 쿼리 잔기는 단지 대상 서열의 가장 먼 N- 및 C-말단에 위치한다.

[0138] 예를 들어, 90 개의 아미노산 잔기 대상 서열이 100 개의 잔기 쿼리 서열과 정렬되어, % 동일성을 결정한다. 삭제는 대상 서열의 N-말단에서 일어나고, 따라서, FASTDB 정렬은 N-말단에서 처음 10 개의 잔기의 매칭/정렬을 보여주지 않는다. 10 개의 짹을 이루지 않은 잔기는 서열의 10%를 나타내고 (매치되지 않은 N- 및 C-말단의 잔기의 수/쿼리 서열 내 잔기의 총 수), 따라서 FASTDB 프로그램에 의해 계산된 % 동일성 스코어에서 10%를 제한다. 만약 남아있는 90 개의 잔기가 완전히 매칭된다면, 최종 % 동일성은 90% 일 것이다. 또 다른 예에서, 90 개의 잔기 대상 서열은 100 개의 잔기 쿼리 서열과 비교된다. 이 때, 삭제는 내부 삭제여서, 쿼리와 매칭/정렬되지 않은 대상 서열의 N- 또는 C-말단에는 잔기가 없다. 이 경우, FASTDB에 의해 계산된 % 동일성은 수동 보정되지 않는다. 다시 한번, FASTDB 정렬에서 나타낸 바와 같이, 쿼리 서열과 매칭/정렬되지 않은 단지 대상 서열의 N- 및 C-말단 외부에 있는 잔기 위치는 수동 보정된다. 다른 어떤 수동 보정도 본 발명의 목적을 위해 행해지지는 않는다.

[0139] 본원에 사용된 바와 같이, 본 발명의 혁신 서열에 "엄격한 조건 하에서 혼성화하는" 혁신은 50% 포름아마이드, 5 x SSC (750 mM NaCl, 75 mM 소듐 시트레이트), 50 mM 소듐 포스페이트 (pH 7.6), 5 x Denhardt's 용액, 10% 엑스트란 술페이트, 및 20  $\mu$ g/ml 변성, 쉬어드 연어 정자 (sheared salmon sperm) DNA 를 포함하는 용액 내에서 42°C에서 밤새 인큐베이션하고, 약 65°C에서 0.1 x SSC에서 필터를 세정함으로써 혼성화하는 폴리뉴클레오티드를 말한다.

[0140] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 Fc 영역은 IgG 중쇄의 C-말단 영역을 말한다. IgG 중쇄의 Fc 영역의 경계가 약간 다양하더라도, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 보통 위치 Cys226에 있는 아미노산 잔기에서 카복실-말단으로 뻗어있는 것으로 정의된다.

[0141] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 면역글로불린의 Fc 영역에 상응하는 영역은, 면역글로불린의 Fc 영역의 자연 발생 대립 변이체, 뿐만 아니라, 치환, 첨가 또는 삭제를 생성하나 효과기 기능 (예컨대 항체 의존성 세포의 세포독성) 을 매개하는 면역글로불린의 능력을 실질적으로 감소시키지는 않는 변형을 가진 변이체를 포함한다. 예를 들어, 하나 이상의 아미노산은 생물학적 기능의 실질적인 소실 없이, 면역글로불린의 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단으로부터 삭제될 수 있다. 그러한 변이체는 활성에 대해 최소의 효과를 가지도록 당업계에 공지된 일반 규칙에 따라 선택될 수 있다 (예를 들어, [Bowie, J. U. 등, Science 247:1306-10 (1990)] 참조). 한 구현예에서, Fc 영역에 상응하는 영역은 이종 융합 단백질의 일부를 형성할 수 있다. 일부 구현예에서, Fc 영역에 상응하는 영역은 또한 면역글로불린 중쇄 (예를 들어, IgA, IgE, IgD, 및 IgM) 의 또 다른 부류의 상응하는 영역을 포함한다.

[0142] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 골지 위치화 도메인은 폴리펩티드가 골지 복합체 내에 위치하는데에 책임 있는 골지 거주 폴리펩티드의 아미노산 서열을 말한다. 일반적으로, 위치화 도메인은 효소의 아미노 말단 "꼬리"를 포함한다.

[0143] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 효과기 기능은 항체의 Fc 영역 (본래의 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역) 으로 인한 생물학적 활성을 말한다. 항체 효과기 기능의 예에는, Fc 수용체 결합 친화성, 항체-의존성 세포의 세포독성 (ADCC), 항체-의존성 세포의 식균작용 (ADCP), 사이토카인 분비, 항원-제시 세포에 의한 면역-복합체-매개 항원 습득, 세포 표면 수용체의 하향-조절 등이 포함되나, 이에 제한되지 않는다.

- [0144] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 엔지니어, 엔지니어링된, 엔지니어링, 글리코엔지니어, 글리코엔지니어링된, 글리코엔지니어링, 및 글리코실화 엔지니어링은 항원 결합 분자 (ABM), 또는 그의 절편과 같은 자연 발생 또는 재조합 폴리펩티드의 글리코실화 패턴의 조작을 포함하는 것으로 생각된다. 글리코실화 엔지니어링은 세포 내에서 발현되는 당단백질의 글리코실화를 변형시키기 위한 올리고사카라이드 합성 경로의 유전적 조작을 포함하여, 세포의 글리코실화 머시너리의 대사 엔지니어링을 포함한다. 한 구현예에서, 글리코실화 엔지니어링은 글리코실트랜스퍼라제 활성의 변형이다. 특별한 구현예에서, 엔지니어링은 글루코스아미닐트랜스퍼라제 활성 및/또는 푸코실트랜스퍼라제 활성을 변형시킨다.
- [0145] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 숙주 세포는 본 발명의 폴리펩티드 및 항원-결합 분자를 생성하도록 엔지니어링 될 수 있는 임의의 종류의 세포 시스템을 포함한다. 숙주 세포는 배양된 세포, 예를 들어, 몇 개만 언급하자면, CHO 세포, BHK 세포, HEK293-EBNA 세포, NSO 세포, SP2/0 세포, YO 골수종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포 또는 하이브리도마 세포와 같은 포유류 배양 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 및 식물 세포를 포함하고, 또한 형질전환 동물, 형질전환 식물 또는 배양된 식물 또는 동물 조직 내에 포함된 세포를 포함한다. 한 구현예에서, 숙주 세포는 개질된 당형을 가진 항원 결합 분자를 제조할 수 있도록 엔지니어링 된다. 바람직한 구현예에서, 항원 결합 분자는 항체, 항체 절편, 또는 융합 단백질이다. 특정 구현예에서, 숙주 세포는 GnTIII 활성을 가진 하나 이상의 폴리펩티드를 증가된 수준으로 발현하도록 추가로 조작된다. 다른 구현예에서, 숙주 세포는 코어  $\alpha$ 1,6-푸코실트랜스퍼라제 활성을 제거, 감소 또는 억제시키도록 엔지니어링된다. 용어  $\alpha$ 1,6-푸코실트랜스퍼라제 활성은 코어  $\alpha$ 1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자의 발현뿐만 아니라 코어  $\alpha$ 1,6-푸코실트랜스퍼라제 효소와 그의 기질과의 상호작용을 포함한다.
- [0146] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 Fc-매개 세포의 세포독성은 항체-의존성 세포의 세포독성, 및 인간 Fc-영역을 함유하는 용해성 Fc-융합 단백질에 의해 매개되는 세포의 세포독성을 포함한다. 이는 "인간 면역 효과기 세포"에 의한 "항체-표적화된 세포"의 파쇄를 초래하는 면역 기작으로서, 여기서 :
- [0147] 인간 면역 효과기 세포는 항체 또는 Fc-융합 단백질의 Fc-영역에의 결합을 통해 세포 표면에서 Fc 수용체를 제시하고 효과기 기능을 수행하는 백혈구 군이다. 그러한 세포군에는 말초혈액 단핵구 세포 (PBMC) 및/또는 자연 살해 (NK) 세포가 포함될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0148] 항체-표적화된 세포는 항체 또는 Fc-융합 단백질에 의해 결합된 세포이다. 항체 또는 Fc 융합-단백질은 Fc 영역에 대한 단백질 부분 N-말단을 통해 표적 세포에 결합한다.
- [0149] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 증가된 Fc-매개 세포의 세포독성은, 상기 정의된 Fc-매개 세포의 세포독성의 기작에 의해, 표적 세포를 둘러싼 배지 내에서 주어진 시간, 주어진 항체 또는 Fc-융합 단백질 농도에서 파쇄되는 "항체-표적화된 세포" 수의 증가, 또는 Fc-매개 세포의 세포독성의 기작에 의해, 주어진 시간 내에 주어진 수의 "항체-표적화된 세포"의 파쇄에 필요한, 표적 세포를 둘러싼 배지 내의 항체 또는 Fc-융합 단백질의 농도의 감소로서 정의된다. Fc-매개 세포의 세포독성의 증가는 당업자에게 알려진 동일한 표준 제조, 정제, 제형 및 저장 방법을 사용해 동일한 유형의 숙주 세포에 의해 생성되나, 본원에 기술된 방법에 의해 글리코실트랜스퍼라제 GnTIII 를 발현하도록 엔지니어링된 숙주 세포에 의해서는 생성되지 않는 동일한 항체 또는 Fc-융합 단백질에 의해 매개되는 세포의 세포독성과 비례한다.
- [0150] 증가된 항체 의존성 세포의 세포독성 (ADCC) 을 가진 항체는 본원에 정의된 용어처럼, 당업자에게 알려진 적합한 방법에 의해 측정되는 ADCC 가 증가된 항체를 의미한다. 하나의 허용된 ADCC 어세이는 본원 하기의 실시예에 기술된다. 또 다른 허용된 시험관 내 ADCC 어세이는 하기와 같다 :
- [0151] 1) 항체의 항원-결합 영역에 의해 인지되는 표적 항원을 발현하는 것으로 알려진 표적 세포를 사용하는 어세이 ;
- [0152] 2) 무작위로 선별된 건강한 공여자의 혈액에서 단리한 인간 말초혈액 단핵구 세포 (PBMC) 를 효과기 세포로서 사용하는 어세이 ;
- [0153] 3) 하기 프로토콜에 따라 수행하는 어세이 ;
- [0154] i) PBMC 를 표준 밀도 원심분리 과정을 사용해 단리하고, RPMI 세포 배양 배지 내에서  $5 \times 10^6$  세포/ml 로 혼탁 시킴 ;
- [0155] ii) 표적 세포를 표준 조직 배양 방법에 의해 배양하고, 90% 초과의 생존성을 가진 지수생장기 (exponential

growth phase)에서 수합하고, RPMI 세포 배양 배지에서 세정하고, 100 마이크로-큐리 (micro-Curies)의  $^{51}\text{Cr}$ 으로 표지하고, 세포 배양 배지로 2회 세정하고, 세포 배양 배지 내에  $10^5$  세포/ml의 밀도로 재현탁시킴;

[0156] iii) 상기 최종 표적 세포 혼탁액 중  $100 \mu\text{l}$  를 96-웰 마이크로타이터 플레이트의 각 웰에 옮김;

[0157] iv) 항체를 세포 배양 배지 내에서  $4000 \text{ ng/ml}$ 에서  $0.04 \text{ ng/ml}$ 로 단계회석시키고, 생성 항체 용액 중  $50 \mu\text{l}$  를 96-웰 마이크로타이터 플레이트에 있는 표적 세포에 첨가하고, 상기 전체 농도 범위를 포함하는 다양한 항체 농도에서 3별 중복 테스트함;

[0158] v) 최대 방출 (MR) 대조군을 위해, 표지된 표적 세포를 함유하는 플레이트에 있는 3개의 추가의 웰에 항체 용액 (상기 iv 참조) 대신에 2% (V/V) 비-이온성 세제 (Nonidet, Sigma, St. Louis) 수용액  $50 \mu\text{l}$  를 첨가함;

[0159] vi) 지속 방출 (SR) 대조군을 위해, 표지된 표적 세포를 함유하는 플레이트에 있는 3개의 추가의 웰에 항체 용액 (상기 iv 참조) 대신에 RPMI 세포 배양 배지  $50 \mu\text{l}$  를 첨가함;

[0160] vii) 다음, 96-웰 마이크로타이터 플레이트를  $50 \times \text{g}$ 에서 1분 동안 원심분리하고,  $40^\circ\text{C}$ 에서 1시간 동안 인큐베이션시킴;

[0161] viii) PBMC 혼탁액 (상기 i 참조)  $50 \mu\text{l}$  를 효과기 : 표적 세포의 비가 25 : 1 이 되도록 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 5%  $\text{CO}_2$  분위기 하  $37^\circ\text{C}$ 에서 4시간 동안 인큐베이터 내에 놔둠;

[0162] ix) 각 웰에서 세포-없는 상청액을 수합하고, 실험적 방출 방사능 (ER) 을 감마 계수기를 사용해 정량함;

[0163] x) 식  $(\text{ER-MR})/(\text{MR-SR}) \times 100$ 에 따라, 특정 분해의 % 를 각 항체 농도에 대해 계산함 (여기서, ER 은 항체 농도 (상기 ix 참조)에 대해 정량화된 평균 방사능이고, MR 은 MR 대조군 (상기 v 참조)에 대해 정량화된 평균 방사능이고, SR 은 SR 대조군 (상기 ix 참조)에 대해 정량화된 평균 방사능임);

[0164] 4) "증가된 ADCC" 는 상기 테스트된 항체 농도 내에서 관찰된 특정 분해의 최대 % 의 증가, 및/또는 상기 테스트된 항체 농도 내에서 관찰된 특정 분해의 최대 % 의 절반을 달성하는데 필요한 항체 농도의 감소로서 정의된다. ADCC의 증가는 당업자에게 알려진 동일한 표준 제조, 정제, 제형 및 저장 방법을 사용해 동일한 숙주 세포에 의해 생성되나, GnTIII 을 과발현하도록 엔지니어링된 숙주 세포에 의해서는 생성되지 않은 동일한 항체에 의해 매개되는, 상기 어세이에서 측정된 ADCC에 비례한다.

#### 중쇄 및/또는 경쇄 아미노산 치환이 있는 항원 결합 분자

[0166] 한 측면에서, 본 발명은 개질된 중쇄 및/또는 경쇄 V 영역 및/또는 C 영역을 포함하는 ABM, 및 이들 ABM의, 표적 항원의 세포 신호 활성을 유도하고/거나 또는 표적 항원의 가교를 매개하는 능력이 상기 개질에 의해 향상 (즉, 유도 또는 증가) 또는 감소 (즉, 억제 또는 감소) 될 수 있다는 발견에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 개질된 중쇄 및/또는 경쇄 V 영역 및/또는 C 영역을 가진, ABM을 포함한 폴리펩티드, 상기 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열 (예를 들어 벡터), 개질된 중쇄 및/또는 경쇄 V 영역 및/또는 C 영역을 가진 폴리펩티드의 제조 방법, 및 다양한 질환 및 장애의 치료에 이를 사용하는 방법을 제공한다.

[0167] 다수의 기작이 항체 의존성 세포의 세포독성 (ADCC), 보체-의존성 세포독성 (CDC), 및 성장 억제 또는 세포자멸사의 유도, 및 세포 성장, 세포 증식, 세포 생존 및/또는 기타 세포 사건의 차단 또는 억제를 포함하여, 항체의 치료 효능과 관련있다고 알려져 있다. 예를 들어, 아고니스트성 모노클로날 항체에 의한 세포 사멸 및 기타 세포 신호 사건의 유도의 예가 보고되었다. Cerisano 등은 세포자멸사-형 특징 (포스파티딜-세린 (PS) 노출, 형태 변화 및/또는 프로페디-요오다이드 (PI) 습득 포함) 뿐만 아니라 Ewing's 육종 세포의 동형 응집을 특징으로 하는, 트랜스멤브레인 당단백질인 CD99에 대한 아고니스트성 항체 (예를 들어, 항-CD99 013 MAb 및 0662 MAb)로의 자극에 의한 캐스페이즈-비의존성 세포 사멸의 유도를 보여주었다 (Cerisano 등, Oncogene 23: 5664-5674 (2003)). 마찬가지로, Hahn 등은 세포의 동형 응집을 초래한 (Hahn 등, FEBS Letters 470: 350-354 (2000)), CD99 와 항-CD99 모노클로날 항체 (예를 들어, DN16 및 YG32) 와의 상호작용 (engagement)에 의한 MAPK 신호 경로의 활성화를 보고하였다. Pettersen 등은 항-CD99 모노클로날 항체인 Ad20에 의해 활성화될 수 있었던 CD99의 새로운 기능성 도메인을 규명하였고, 상기 활성화는 형질전환된 T 세포에서 세포자멸사를 유도하였다 (Pettersen 등, J. Immunol. 166:4931-4942 (2001)). CD47에 대한 모노클로날 항체 (예를 들어, B6H12)는 또한 세포골격의 재구성 신호 경로와 연관있는 캐스페이즈-비의존성 세포 사멸을 유도할 수 있다 (Mateo 등, Blood 100:2882- 2890 (2002)). 상기-언급된 참조문헌 각각은 그 전체가 참조로써 본원에

삽입된다.

[0168] 다른 예에서, CD20에 대한 특정 항체 (예를 들어, 리툭시마브 및 토시투모마브) 및 CD52에 대한 특정 항체 (CAMPATH-1H)는 종양 세포에서 세포자멸사를 직접 유도하는 것으로 보인다 (Ludwig 등, *Oncogene* 22: 9097-9106 (2003) 참조). 신호 활성이 거의 없거나 또는 아예 없는 리툭시마브 및 다수의 기타 모노클로날 항체 (항-CD19, CD21, CD22 및 Her2)에 대해, 세포자멸사 또는 성장 억제를 유도하는 능력은 항체를 IgG-IgG 동종이량체로 화학 전환시킴으로써 향상되었다 (Ghetie 등, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:7509-14 (1997). 상기 향상은 증가된 음성 신호 및/또는 4가 항체 동종이량체에 의한 초가교 (hypercrosslinking)로 인한 것으로 추측되었다 (Ghetie 등, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:7509-14 (1997). 가교 및 증가된 세포자멸사는 또한 2차 항체 또는 Fc-수용체-있는 악세사리 세포의 사용을 통해 달성된다 ([Jazhirehi and Bonavida, *Oncogene* 24:2121-43 (2005)] 참조). 상기-언급된 참조문헌 각각은 그 전체가 참조로써 본원에 삽입된다.

[0169] 이론에 구애되지 않으면서, 본 발명자들은 항원 결합 분자의 팔꿈치 헌지 영역 내 아미노산 잔기에의 개질은 신호 활성 및/또는 표적 항원의 가교를 유도하거나 또는 억제시키는 ABM의 능력에 영향을 줄 수 있다고 결정하였다. 팔꿈치 헌지 영역의 각은 면역글로불린의 C 영역에 대한 V 영역의 배향을 조절하고, 그 자체로 항체와 항원 및 효과기 단백질과의 상호작용을 용이하게 한다 ([Lesk and Chothia, *Nature* 335: 188-90 (1988)] 참조). Lesk 및 Chothia는 항체 내 팔꿈치 헌지 영역의 분자 볼-앤드-소켓 조인트, 즉 VH 영역 내 Kabat 위치 11, 110과 112 및 CH1 영역 내 위치 149와 150을 구성하는 잔기를 규명하였고, 이러한 조인트를 구성하는 잔기의 항체에 걸친 고도의 보존을 주시하였다 (Lesk and Chothia, *Nature* 335: 188-90 (1988) (그 전체가 본원에 참조로써 삽입됨)). 그러나, 그들은 볼-앤드-소켓 잔기 또는 그 주변의 잔기는 개질시키지 않았다.

Landolfi 등은 인간 IFN $\gamma$ 에 대한 중성화 항체인 AF2에 있는 Kabat 위치 10-13에의 개질이 항체의 중성화 활성을 유의하게 소실시켰으나, 항체의 그의 표적 항원에의 결합에는 영향을 미치지 않았음을 보여주었다 (Landolfi 등, *J. Immunol.* 166: 1748-54 (2001) (그 전체가 본원에 참조로써 삽입됨)). 그러나, Landolfi 등은 세포 신호를 유도하거나 또는 가교를 매개하는 항체의 능력에 대한 효과를 보여주지 못했다.

[0170] 다가 ABM을 이용해, 항원 결합 부위의 배향을 변화시키는 능력은 결합된 항원 단위체가 다중 항원 결합 부위와 복합체를 이루는 경우, 결합된 항원 단위체의 근접성의 조정을 허용한다. 서로에 대한 항원 단위체의 근접성은 항원 단위 사이의 다소의 상호작용 (예를 들어, 가교, 이량체화 등)을 용이하게 한다. 예를 들어, ABM에 있는 각각의 VH/VL-CH1/CL의 팔꿈치 각이, 항원 결합 부위가 서로 더 가깝게 근접하도록 배향된다면, 결합된 항원 단위체 (예를 들어, 세포 표면 수용체 분자)는 또한 서로 더 가깝게 근접되거나 또는 상호작용하기에 더 좋은 구조로 될 것이다. 이러한 근접성 또는 구조 변화는 결합된 항원 사이의 가교 및 올리고머화 같은 상호작용을 조정할 수 있다. 반면, 항원 결합 부위가 더 멀리 떨어져 있도록 하거나 또는 덜 선호할만한 구조를 갖도록 하는 항원 결합 부위의 배향은 항원 결합 부위가 상호작용하지 못하게 할 수 있다.

[0171] VL-CL 경계면에 있는 아미노산 잔기 또한 개질되어서, 항원 결합 부위 배향에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 경쇄 가변 영역 골격에 있는 Kabat 잔기 40, 80, 83, 105 및 106은 VL/CL 경계면에 위치한다.

[0172] 세포 신호 기작의 활성은 본 발명의 ABM에 의해 영향을 받을 수 있다 (즉, 유도 또는 억제될 수 있음). 본 발명의 한 측면에서, 관계된 세포 신호 기작은 이온-채널 연결, G-단백질-연결 및 효소-연결 세포-표면 수용체 단백질을 포함한 세포 표면 수용체 단백질을 통해 개시되는 기작이다. 일반적으로, [Chapter 15: Cell Signaling in MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, Alberts 등, eds., (3d ed. 1994) (본원에 참조로써 삽입됨)]를 참조한다. 따라서, 예를 들어, 본 발명의 세포 신호 활성은 세포자멸사, 세포 분화, 세포 성장, 세포 증식 및 세포 생존, 뿐만 아니라 경로에 따른 신호 단계를 초래하는 것을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 한 구현예에서, 세포 신호 활성은 효소-연결 수용체를 통해 발생하고; 특별한 구현예에서, 효소-연결 수용체는 수용체 타이로신 키나아제이다. 또 다른 구현예에서, 세포 신호 활성은 이온 채널-연결 수용체를 통해서이다.

[0173] 본 발명의 ABM의 개질된 중쇄 또는 경쇄 V 영역 및/또는 C 영역은 하나 이상의 아미노산 치환에 의해, 상응하는 비개질된 모 폴리펩티드 (예를 들어, 모 항원 결합 분자) 영역과 상이하다. "모," "출발" 또는 "비개질된" 폴리펩티드는 바람직하게는 항체 중쇄 또는 경쇄의 일부 이상을 포함하고, 중쇄 V 영역 또는 CH1 영역 또는 그의 일부 및/또는 경쇄 V 또는 C 영역 또는 그의 일부를 포함하는 폴리펩티드를 생성하는 당업계에서 이용 가능한 기술을 사용해 제조될 수 있다. 구체적인 예에서, 모 폴리펩티드는 항원 결합 분자이고, VH 또는 VL 영역의 일부 이상을 포함한다. 특정 구현예에서, 개질된 중쇄 및/또는 경쇄 V 영역이 생성될 수 있고 (예를 들어, 본원에 개시된 방법에 따라), 항체 Fc와 같은 선택된 이종 폴리펩티드에 융합될 수 있다. 본 발명의 한 구현예에서, 개질된 ABM 또는 그의 절편은 융합 단백질을 포함하며, 여기서 개질된 중쇄 V 영역 또는 그의

절편은 IgA, IgG, IgE, IgD, 및 IgM 또는 그의 절편 또는 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄 불변 영역에 융합된다. 특별한 구현예에서, 중쇄 불변 영역은 IgG이다. 본 발명의 또 다른 구현예에서, 개질된 ABM 또는 그의 절편은 융합 단백질을 포함하며, 여기서 개질된 경쇄 V 영역 또는 그의 절편은 IgA, IgG, IgE, IgD, 및 IgM, 또는 그의 절편 또는 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 경쇄 불변 영역에 융합된다. 특별한 구현예에서, 경쇄 불변 영역은 IgG이다. 구체적인 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 개질된 중쇄 및/또는 경쇄 V 영역을 갖는 경쇄 및 중쇄를 포함하는 전체 항체 (예를 들어, IgG)를 포함한다.

[0174] 개질된 중쇄 V 영역 또는 CH1 영역 또는 경쇄 V 영역 또는 CL 영역을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 특별한 서열에 대한 본 명세서의 지침을 이용해 당업계에 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다.

이들 방법에는, 폴리펩티드를 암호화하는 사전에 제조된 핵산의 위치-특이적 (또는 올리고뉴클레오티드-매개) 돌연변이, PCR 돌연변이, 및 카세트 돌연변이에 의한 제조가 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 위치-특이적 돌연변이는 치환 변이체를 제조하는 바람직한 방법이다. 이 기술은 당업계에 잘 알려져 있다 (예를 들어, 본원에 참조로써 삽입된 [Carter 등, Nucleic Acids Res. 13: 4431-4443 (1985)] 및 [Kunkel 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488 (1987)] 참조). 간략하게는, DNA의 위치 특이적 돌연변이를 수행하는데 있어서, 우선, 목적하는 돌연변이를 암호화하는 올리고뉴클레오티드를 상기 출발 DNA의 단일 가닥에 혼성화함으로써 출발 DNA를 변형시킨다. 혼성화 후에, 혼성화된 올리고뉴클레오티드를 프라이머로서 사용하고, 출발 DNA의 단일 가닥을 주형으로서 사용하여, DNA 중합효소를 사용해 전체 제 2 가닥을 합성한다. 따라서, 목적하는 돌연변이를 암호화하는 올리고뉴클레오티드는 생성 이중-가닥 DNA에 삽입된다.

[0175] PCR 돌연변이 또한 비개질된 출발 폴리펩티드의 아미노산 서열 변이체를 생성하는데 적합하다 (예를 들어, 본원에 참조로써 삽입된 [Vallette 등, Nuc. Acids Res. 17: 723-733 (1989)] 참조). 간략하게는, 소량의 주형 DNA를 PCR에서 출발 물질로서 사용할 때, 주형 DNA 내 상응하는 영역과 서열이 약간 상이한 프라이머를 사용하여, 프라이머가 주형과 상이한 위치에서만 주형 서열과 상이한 특정 DNA 절편을 상대적으로 대량 생성할 수 있다.

[0176] ABM 변이체를 제조하는 또 다른 방법인 카세트 돌연변이는 본원에 참조로써 삽입된 [Wells 등, Gene 34: 315-323 (1985)]에 의해 기재된 기술을 바탕으로 한다. 출발 물질은 개질될 출발 폴리펩티드 DNA를 포함하는 플라스미드 (또는 기타 벡터)이다. 돌연변이될 출발 DNA 내 코돈(들)을 규명한다. 규명된 돌연변이 부위(들)의 각 면에 독특한 제한 엔도뉴클레아제 부위가 있어야 한다. 그러한 제한 부위가 없다면, 출발 폴리펩티드 DNA 내 적절한 위치에 제한 부위를 도입하는 상기-기술된 올리고뉴클레오티드-매개 돌연변이 방법을 사용해 제한 부위를 생성할 수 있다. 플라스미드 DNA는 이러한 부위에서 절단되어, DNA를 선형으로 만든다.

제한 부위 사이의 DNA 서열을 암호화하나 목적하는 돌연변이(들)를 함유하는 이중-가닥 올리고뉴클레오티드를 표준 과정을 사용해 합성하는데, 여기서 올리고뉴클레오티드의 2 가닥은 따로 합성된 다음, 표준 기술을 사용해 혼성화된다. 상기 이중-가닥 올리고뉴클레오티드를 카세트라고 한다. 이러한 카세트는 선형화된 플라스미드의 말단과 융화가능한 5' 및 3' 말단을 갖도록 디자인되어서, 플라스미드에 직접 연결될 수 있다. 이러한 플라스미드는 현재 돌연변이된 DNA 서열을 함유한다.

[0177] 대안적으로, 또는 추가로, 폴리펩티드 변이체를 암호화하는 목적하는 아미노산 서열을 측정할 수 있고, 그러한 아미노산 서열 변이체를 암호화하는 핵산 서열을 합성 생성할 수 있다.

[0178] 모 폴리펩티드의 아미노산 서열을 개질시켜, 개질된 ABM이 표적 항원과 복합체를 이를 때 (예를 들어, 결합할 때), 표적 항원의 세포 신호 활성을 유도하는 능력이 변형된, 개질된 중쇄 V 영역 및/또는 개질된 CH1 영역, 및/또는 개질된 경쇄 V 영역 및/또는 개질된 CL 영역을 갖는 ABM을 생성할 수 있다. 세포 신호 활성은 아고니스트 활성 또는 안타고니스트 활성일 수 있다. 본 발명의 한 측면에 따르면, 아고니스트 활성은 세포막-관련 수용체에 결합하고 세포 신호 경로를 개시할 때, 개질된 항원 결합 분자에 의해 유도된다. 특정 구현예에서, 세포 신호 경로는 세포자멸사 경로이다. 다른 구현예에서, 세포 신호 경로는 세포 분화 경로이다. 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 개질된 항원 결합 분자에 의한 안타고니스트 활성은 예를 들어, ABM이 세포막-관련 수용체에 결합하고 세포 신호 경로의 유도를 방지하고 진행 신호를 중단시킬 때 발생할 수 있다. 안타고니스트 활성은 예를 들어, 결합을 차단하고 이어서 내인성 리간드의 신호 전달을 차단함으로써, 및/또는 세포 신호 경로의 유도에 필요할 수용체 또는 기타 분자의 가교 또는 올리고머화를 방지함으로써 이루어질 수 있다. 한 구현예에서, 억제 또는 중단되는 세포 신호 경로는 세포 성장 경로이다. 다른 구현예에서, 억제 또는 중단되는 세포 신호 경로는 세포 분화 경로이다. 다른 구현예에서, 억제 또는 중단되는 세포 신호 경로는 세포 생존 경로이다.

[0179] 마찬가지로, 모 폴리펩티드의 아미노산 서열 또한 개질되어서, 개질된 ABM 이 표적 항원(들)과 복합체를 이룰 때 (예를 들어, 결합할 때), 하나 이상의 표적 항원의 가교를 매개하는 능력이 변형된, 개질된 중쇄 V 영역 또는 개질된 C 영역 (예를 들어, 개질된 CH1 영역), 및/또는 개질된 경쇄 V 영역 및/또는 개질된 CL 영역을 갖는 ABM 을 생성할 수 있다. 한 구현예에서, 결합된 표적 항원 (예를 들어, 세포 표면 수용체 분자) 은 상응하는 비-개질된 모 ABM 보다 서로 더 가깝게 근접되거나 또는 상호작용하기에 더 좋은 구조로 되어서, 결합된 항원 사이의 가교 및 올리고머화를 증가시킨다. 또 다른 구현예에서, 결합된 표적 항원 (예를 들어, 세포 표면 수용체 분자) 은 상응하는 비-개질된 모 ABM 보다 서로 더 멀리 떨어져 있도록 하고/거나 또는 덜 선호할만한 구조로 있게 하여, 결합된 항원 사이의 가교 및 올리고머화를 감소 또는 방지한다. 특별한 구현예에서, 증가된 가교 또는 올리고머화는 세포자멸사를 증가시킨다. 또 다른 구현예에서, 증가된 가교 또는 올리고머화는 세포 분화를 증가시킨다. 또 다른 구현예에서, 가교 또는 올리고머화의 감소는 세포 성장 감소, 세포 분할 감소, 또는 세포 생존 감소를 초래한다.

[0180] 중쇄 V 영역 또는 CH1 영역, 또는 경쇄 V 영역 또는 CL 영역의 생물학적 특성에 있어서의 실질적인 개질은, (a) 병풍 또는 나선 구조와 같은 치환 영역 내 폴리펩티드 골격의 구조, (b) 표적 부위에 있는 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 벌크 (bulk) 를 유지하는데 있어서 그의 효과가 유의하게 상이한 치환을 선택함으로써 달성될 수 있다. 자연 발생 잔기는 공통적인 측쇄 특성을 바탕으로 한 부류로 구분된다 :

[0181] (1) 소수성 : met, ala, val, leu, ile ;

[0182] (2) 천연 친수성 : cys, ser, thr ;

[0183] (3) 산성 : asp, glu ;

[0184] (4) 염기성 : asn, gln, his, lys, arg ;

[0185] (5) 사슬 배향에 영향을 미치는 잔기 : gly, pro ; 및

[0186] (6) 방향족 : trp, tyr, phe.

[0187] 비-보존성 치환은 상기 부류 중 한 부류의 원소를 다른 부류의 원소로 교환하는 것을 수반할 것이다. 보존성 치환은 상기 부류 중 한 부류의 원소를 동일한 부류의 다른 원소로 교환하는 것을 수반할 것이다.

#### 개질된 ABM 을 포함하는 실례의 폴리펩티드

[0189] 한 측면에서, 본 발명은 세포 신호 활성을 유도하고/거나 또는 항원의 가교를 매개하는 ABM 의 능력을 변경시키는 아미노산 개질이 있는 항원 결합 분자에 관한 것이다. 한 구현예에서, ABM 에의 개질은 모 분자와 비교해 중쇄 또는 경쇄 가변 영역의 하나 이상의 골격 영역에서 하나 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함한다. 특별한 구현예에서, 치환은 중쇄 FR1 에서 아미노산 잔기를 대체한다. 바람직한 구현예에서, ABM 에의 개질은 중쇄 가변 영역 내 Kabat 위치 8, 9, 10, 11, 12 또는 13 의 하나 이상에서의 아미노산 잔기의 치환을 포함한다. 또 다른 구현예에서, ABM 에의 개질은 중쇄 FR4 에서 아미노산 잔기의 치환을 포함한다. 특별한 구현예에서, ABM 에의 개질은 중쇄 가변 영역 내 Kabat 위치 110 또는 112 중 하나 이상에서 아미노산 잔기의 치환을 포함한다. 또 다른 구현예에서, ABM 에의 개질은 V 및 C 영역 사이의 경계면에서 경쇄 내 하나 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함한다. 더욱 특별한 구현예에서, ABM 에의 개질은 Kabat 위치 40, 80, 83, 105 또는 106 중 하나 이상에서 아미노산 잔기 치환을 포함한다.

[0190] 한 구현예에서, 아미노산은 모 서열 내에 점 돌연변이를 생성함으로써 치환되어, 아미노산 잔기(들)에 목적하는 변화를 줄 수 있다. 대안적으로, ABM 에의 개질은 모 분자의 전체 골격 영역을, 특정 위치에서 목적하는 아미노산 잔기를 포함하는 골격 영역으로 대체하는 것을 포함할 수 있다. 특별한 구현예에서, ABM 에의 개질은 모 분자의 FR1 을 생식 계열 가변 유전자 서열에 의해 암호화되는 FR1 로 대체하는 것을 포함한다.

[0191] 본 발명의 또 다른 구현예에서, ABM 은 하나 이상의 CH1 영역을 포함하고, ABM 의 개질은 모 폴리펩티드와 비교해 하나 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함한다. 특별한 구현예에서, ABM 에의 개질은 중쇄 불변 영역 내 위치 148, 149 및/또는 150 에서 아미노산 잔기의 하나 이상의 치환을 포함한다.

[0192] 또 다른 측면에서, 본 발명은 모 항원 결합 분자의 절단된 CDR 중 하나 이상을 포함하는 개질된 항원 결합 분자에 관한 것이다. 그러한 절단된 CDR 은 최소한, 주어진 CDR 에 대한 특이성-결정 아미노산 잔기를 함유할 것이다. "특이성-결정 잔기" 는 항원과의 상호작용에 직접 관여하는 잔기를 의미한다. 일반적으로, 주어진 CDR 의 잔기 중 단지 약 1/5 내지 1/3 만이 항원과의 결합에 참여한다. 특정 CDR 내 특이성-결정 잔기

는 예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로써 삽입된 [Padlan 등, FASEB J. P(7J:133-139 (1995)]에서 기술된 방법에 따라 3-차원 모델링으로부터 원자간 접촉의 컴퓨터화 및 주어진 잔기 위치에서의 서열 변이성의 측정에 의해 규명될 수 있다.

[0193] 따라서, 본 발명은 또한, 모 분자의 하나 이상의 상보성 결정 영역을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 상보성 결정 영역에 대한 하나 이상의 특이성-결정 잔기를 함유하는 그의 변이체 또는 절단된 형태에 관한 것으로서, 여기서 상기 단리된 폴리뉴클레오티드는 융합 폴리펩티드를 암호화한다. 바람직하게는, 그러한 단리된 폴리뉴클레오티드는 개질된 항원 결합 분자인 융합 폴리펩티드를 암호화한다. 한 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 모 분자의 3 개의 상보성 결정 영역, 또는 상기 3 개의 상보성 결정 영역의 각각에 대한 하나 이상의 특이성-결정 잔기를 함유하는 그의 변이체 또는 절단된 형태를 포함한다. 또다른 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 키메라 (예를 들어, 인간화된) 항체의 경쇄 또는 중쇄의 전체 가변 영역을 암호화한다. 본 발명은 추가로, 상기 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 폴리펩티드에 관한 것이다.

[0194] 또다른 구현예에서, 본 발명은 모 분자의 하나 이상의 상보성 결정 영역, 또는 상기 상보성 결정 영역에 대한 하나 이상의 특이성-결정 잔기를 함유하는 그의 변이체 또는 절단된 형태를 포함하고, 이종 폴리펩티드로부터 유래된 서열을 포함하는 개질된 항원 결합 분자에 관한 것이다. 한 구현예에서, 개질된 항원 결합 분자는 모 분자의 3 개의 상보성 결정 영역, 또는 상기 3 개의 상보성 결정 영역의 각각에 대한 하나 이상의 특이성-결정 잔기를 함유하는 그의 변이체 또는 절단된 형태에 관한 것이다. 또다른 측면에서, 개질된 항원 결합 분자는 항체 경쇄 또는 중쇄의 가변 영역을 포함한다. 한 특별히 유용한 구현예에서, 항원 결합 분자는 키메라, 예를 들어, 인간화된, 항체이다. 본 발명은 또한, 그러한 개질된 항원 결합 분자의 제조 방법, 및 세포 증식 장애를 포함한 질환의 치료에 있어서의 그의 용도에 관한 것이다.

[0195] 항체 의존성 세포의 세포독성 (ADCC), 보체-의존성 세포독성 (CDC), 및 성장 억제, 세포 분화, 또는 세포자멸사의 유도를 포함하여, 항체의 치료 효능에 여러 기작이 관여한다고 알려져 있다.

[0196] 본 발명은 상응하는 비-개질된 모 ABM 과 비교해 세포자멸사를 유도하는 능력이 증가된 개질된 ABM에 관한 것이다. 예를 들어, 세포자멸사를 유도하는 능력이 거의 없거나 아예 없는 모 ABM은 본 발명에 따라 개질되어서, 세포자멸사를 유도하는 능력을 가지거나 또는 세포자멸사를 유도하는 능력이 증가된 개질된 ABM을 생성할 수 있다. 본 발명은 또한, 상응하는 비-개질된 모 ABM과 비교해 성장 억제 또는 세포 분화를 유도하는 능력이 증가된 개질된 ABM에 관한 것이다. 예를 들어, 성장 억제 또는 세포 분화를 유도하는 능력이 거의 없거나 또는 아예 없는 모 ABM은 본 발명에 따라 개질되어서, 성장 억제 또는 분화를 유도하는 능력을 가지거나 또는 성장 억제 또는 분화를 유도하는 능력이 증가된 개질된 ABM을 생성할 수 있다.

[0197] 항-CD20 항체에 관해, 특히, 예를 들어, 대부분의 실험 증거는, 리툭시마브가 CDC 및 ADCC 어세이에 의해 측정된 통상의 효과기 기작을 통해 작동한다는 것을 가리킨다. 유사하게는, 싱이한 림프종 세포의 리툭시마브에 대한 생체 내 저항은 시험관 내에서 그의 CDC에 대한 민감성의 함수인 것으로 나타났다. 반대로, 치료용으로 승인된 또다른 항-CD20 항체인 B1의 생체 내 작용 형태는 보체 또는 자연 살해 (NK) 세포 활성 중 어느 것도 요구하지 않는다. 더욱이, B1의 생체 내 효능은 강력한 세포자멸사를 유도하는 능력으로 인한 것이다.

일반적으로, 항-CD20 모노클로날 항체는 림프종 세포를 근절하는 그의 작용 기작을 바탕으로 2 개의 구분되는 범주에 속한다. 유형 I 항-CD20 항체는 본래 표적 세포를 살해하기 위해 보체를 이용하는 한편, 유형 II 항체는 다른 기작에 의해 본래 세포자멸사를 조작한다. 리툭시마브 및 1F5는 유형 I 항-CD20 항체의 예이고, 반면 B1은 유형 II 항체의 예이다. 예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로써 삽입된 [Cragg, M.S. and Glennie, M.J., Blood 103(7):2738-2743 (April 2004); Teeling, J.L. 등, Blood 104(6): 1793- 1800 (September 2004)]를 참조한다.

[0198] Umana 등의 미국 특허 출원 공개 번호 2005/0123546 (그 전체가 본원에 참조로써 삽입됨)은 유형 I 항-CD20 항체가 ADCC와 같이 증가된 효과기 기능을 가지고 강력한 세포자멸사 능력을 생성하도록 엔지니어링되어서, 유형 I 항-CD20 항체를 유형 II 항-CD20 항체로 효과적으로 바꾸는 것에 대한 첫번째 공지된 예를 개시하였다. 한 구현예에서, 본 발명은 유형 I 모 항-CD20 항체와 비교해 중쇄 또는 경쇄 가변 영역에 치환을 포함하는 개질된 항-CD20 항체에 관한 것으로서, 여기서, 치환(들)은 개질된 항-CD20 항체에 의한 세포자멸사의 유도를 증가시킨다. 또다른 구현예에서, 본 발명은 세포자멸사를 유도하는 실질적인 능력이 소실되지 않은 채, 효과기 기능 증가를 위한 엔지니어링의 결과 증가된 ADCC를 갖는, 엔지니어링된 유형 II 항-CD20 항체에 관한 것이다.

한 구현예에서, 유형 II 항-CD20 항체는 모 분자에 비해 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 내 하나 이상의 아미노산에서 치환을 포함한다. 또다른 구현예에서, 유형 I 및/또는 유형 II 항-CD20 항체는 Fc 영역에서의 글리코

실화의 변형된 패턴을 갖도록 엔지니어링되었다. 특별한 구현예에서, 개질된 ABM 의 변형된 글리코실화는 Fc 영역에서 증가된 수준의 양분된 복합체 잔기를 포함한다. 또 다른 특별한 구현예에서, 개질된 ABM 의 변형된 글리코실화는 Fc 영역에서 감소된 수준의 푸코스 잔기를 포함한다. 그 전체가 본원에 참조로써 삽입된 Shitara 등의 미국 특허 출원 공개 번호 20040093621 를 참조한다. 또 다른 구현예에서, 유형 I 또는 유형 II 항-CD20 항체는 그 전체가 본원에 참조로써 삽입된 Presta 의 미국 특허 제 6,737,056 호 또는 미국 특허 출원 공개 번호 2004 0185045 (Macrogenics) 또는 미국 특허 출원 공개 번호 2004 0132101 (Xencor) 에서 교시된 바와 같이 폴리펩티드 엔지니어링을 받는다. 본 발명은 추가로, 그러한 엔지니어링된 유형 I 또는 유형 II 항체의 제조 방법, 및 B 세포 램프종을 포함하여 다양한 B 세포 장애의 치료에 상기 항체를 사용하는 방법에 관한 것이다.

#### [0199] 키메라 및 인간화된 개질된 ABM

키메라 마우스/인간 항체가 기술되어 있다. 예를 들어, [Morrison, S. L. 등, PNAS 11:6851-6854 (November 1984); 유럽 특허 공개 번호 173494; Boulianna, G. L. 등, Nature 312:642 (December 1984); Neubeiger, M. S. 등, Nature 314:268 (March 1985); 유럽 특허 공개 번호 125023; Tan 등, J Immunol. 135:8564 (November 1985); Sun, L. K 등, Hybridoma 5(1):517 (1986); Sahagan 등, J. Immunol. 137:1066-1074 (1986)] 를 참조한다. 일반적으로, [Muron, Nature 312:597 (December 1984); Dickson, Genetic Engineering News 5(3) (March 1985); Marx, Science 229:455 (August 1985); 및 Morrison, Science 229:1202-1207 (September 1985)] 를 참조한다. PCR 공개 번호 WO/88104936 에서, Robinson 등은 CD20 의 에피토프에 대한 특이성을 가진 인간 불변 영역 및 젖과 가변 영역이 있는 키메라 항체를 기술하고 ; Robinson 참조문헌의 키메라 항체의 젖과 부분은 2H7 마우스 모노클로날 항체 (감마 2b, 카파)로부터 유래된 것이다.

참조문헌에서 기술된 키메라 항체가 B 세포 장애의 치료를 위한 "주요 후보자 (prime candidate)" 라는 것을 언급하면서도, 상기 언급은 이러한 제안이 상기 특별한 항체에 대해서 정확한지 아닌지를 결정하는 것이 당업자에게 그러한 제안 이상은 아닌 것으로 보여질 수 있는데, 그 이유는 특히 치료 효능의 주장을 뒷받침할 데이터가 없고, 중요하게는 영장류 또는 인간과 같은 고등 동물을 사용한 데이터가 없기 때문이다.

키메라 항체의 제조 방법은 당업자가 이용가능하다. 예를 들어, 경쇄 및 중쇄는 예를 들어, 개별 플라스미드 내에서 또는 단일 (예를 들어, 폴리시스트론) 백터 상에서 면역글로불린 경쇄 및 면역글로불린 중쇄를 사용해 따로 발현될 수 있다. 다음, 이를 시험관 내에서 정제 및 조립하여 완전한 항체가 되게 할 수 있고 ; 그러한 조립 수행 방법이 기술되어 있다. 예를 들어, [Scharff, M., Harvey Lectures 69:125 (1974)] 를 참조한다. 감소된 단리된 경쇄 및 중쇄로부터 IgG 항체를 형성하기 위한 시험관 내 반응 파라미터 또한 기술되어 있다. 예를 들어, [Sears 등, Biochem. 16(9):2016-25 (1977)] 를 참조한다.

특히 바람직한 구현예에서, 본 발명의 키메라 ABM 은 인간화된 항체이다. 비-인간 항체를 인간화시키는 방법은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 본 발명의 인간화된 ABM 은 그 전체가 본원에 참조로써 삽입된 Winter 의 미국 특허 제 5,225,539 호, Queen 등의 미국 특허 제 6,180,370 호, 또는 Adair 등의 미국 특허 제 6,632,927 호, Foote의 미국 특허 출원공개 번호 2003/0039649 ; Sato 등의 미국 특허 출원 공개 번호 2004/0044187 ; 또는 Leung 등의 미국 특허 출원 공개 번호 2005/0033028 의 방법에 따라 제조될 수 있다. 바람직하게는, 인간화된 항체는 비-인간인 공급원으로부터 도입되는 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이러한 비-인간 아미노산 잔기를 종종 통상 "수입 (import)" 가변 도메인으로부터 수득되는 "수입" 잔기라고 한다. 인간화는 본질적으로 인간 항체의 초가변 영역 서열을 상응하는 서열로 치환시킴으로써 Winter 및 공동 연구자 (Jones 등, Nature, 321 :522-525 (1986); Riechmann 등, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen 등, Science, 239: 1534-1536 (1988)) 의 방법에 따라 수행될 수 있다. 따라서, 그러한 "인간화된" 항체는 키메라 항체 (미국 특허 제 4,816,567 호) 로서, 여기서 실질적으로 본래의 인간 가변 도메인 미만의 도메인은 비-인간 종의 상응하는 서열로 치환되었다. 실제로, 인간화된 항체는 전형적으로, 일부 초가변 영역 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체 내 유사 부위의 잔기에 의해 치환된 인간 항체이다. 목적의 인간화된 항-CD20 항체는 인간 면역글로불린의 불변 영역을 포함할 것이다.

인간화된 항체의 제조에 사용되는 경쇄 및 중쇄 둘 다인 인간 가변 도메인의 선택은 항원성을 감소시키기 위해서는 매우 중요하다. 소위 "베스트-핏 (best-fit)" 방법에 따르면, 설치류 항체의 가변 도메인의 서열은 공지된 인간 가변-도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝된다. 다음, 설치류 서열에 가장 밀접한 인간 서열은 인간화된 항체를 위한 인간 골격 영역 (FR) 으로서 수용된다 (Sims 등, J. Immunol., 151 :2296 (1993); Chothia 등, J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). 인간 골격 서열을 선택하는 또 다른 방법은, 전체 설치류 골격의 각각의 개별 하위영역 (즉, FR1, FR2, FR3 및 FR4) 또는 개별 하위영역의 일부 조합 (예를 들어,

FR1 및 FR2) 의 서열을, 골격 하위영역에 상응하는 공지된 (예를 들어, Kabat 번호화에 의해 결정됨) 인간 가변 영역 서열의 라이브러리와 비교하고, 설치류의 것에 가장 밀접한 각각의 하위영역 또는 조합에 대한 인간 서열을 선택하는 것이다 (2003년 2월 27일에 공개된 Leung 미국 특허 출원 공개 번호 2003/0040606A1). 또 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 하위군의 모든 인간 항체의 보존성 서열로부터 유래된 특정 골격 영역을 사용한다. 동일한 골격은 여러 상이한 인간화된 항체에 사용될 수 있다 (각각의 전체 내용이 참조로써 본원에 삽입된 Carter 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta 등, J Immunol., 151 :2623 (1993)).

[0204]

추가로 항체는 항원에 대한 높은 친화성 및 기타 선호할만한 생물학적 특성을 가진 체류로 인간화될 수 있다는 것이 중요하다. 이를 이루기 위해, 바람직한 방법에 따르면, 인간화된 항체는 모 서열 및 인간화된 서열의 3-차원 모델을 사용해 모 서열 및 다양한 개념상 인간화된 생성물의 분석에 의해 제조된다. 3-차원 면역글로불린 모델은 당업자에게 친숙한 컴퓨터 프로그램을 사용해 생성될 수 있다 (예를 들어 InsightII, accelrys inc (이전의 MSI), 또는 [Schwede 등, Nucleic Res. 2003 (13):3381-3385]에서 기술된 <http://swissmodel.expasy.org/>에서). 이러한 모델의 조사는 후보 면역글로불린 서열의 기능에서 잔기의 유사한 역할의 분석, 즉, 후보 면역글로불린의 그의 항원에의 결합능력에 영향을 미치는 잔기의 분석을 허용한다. 이러한 방식으로, 표적 항원(들)에 대한 유지된 친화성과 같은 목적하는 항체 특성을 달성하도록 FR 잔기는 수여자 및 수입 서열로부터 선택되고 조합될 수 있다. 일반적으로, 초가변 영역 잔기는 항원 결합에 영향을 미치는데 직접 및 가장 실질적으로 관여한다.

[0205]

또 다른 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 그 전체가 참조로써 본원에 삽입된 예를 들어, Balint 등의 미국 특허 출원 공개 번호 2004/0132066에 개시된 방법에 따라 향상된 결합 친화성을 갖도록 엔지니어링된다.

[0206]

바람직한 구현예에서, 본 발명은 하기 표 3 및/또는 5에 나타낸 바와 같이 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 하기 표 2 및/또는 4에서 개시된 뉴클레오티드 서열과 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 서열을 포함하는 단리된 핵산에 관한 것이다. 또 다른 구현예에서, 본 발명은 하기 표 3 및/또는 5의 아미노산 서열과 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 서열을 포함하는 단리된 핵산에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 보존성 아미노산 치환이 있는, 표 3 및/또는 5의 구축물 중 임의의 구축물의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 서열을 포함하는 단리된 핵산을 포함한다. 특정 구현예에서, 표 2 ~ 5의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 제외될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 특정 구현예에서, 개질된 ABM, 및/또는 개질된 ABM을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37 또는 SEQ ID NO:38의 임의의 것 또는 모두를 포함하지 않는다. 또 다른 예에서, 특정 구현예에서, 본 발명의 개질된 ABM은 SEQ ID NO: 55 ~ 62 중 임의의 것 또는 모두를 포함하지 않는다.

[0207]

또 다른 구현예에서, 본 발명은 하기 표 3 및/또는 5에서 나타낸 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩티드에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 하기 표 2 및/또는 4에 나타낸 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 서열을 포함하는 단리된 폴리펩티드에 관한 것이다. 또 다른 구현예에서, 본 발명은 하기 표 3 및/또는 5의 아미노산 서열과 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩티드에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 보존성 아미노산 치환이 있는, 표 3 및/또는 5의 구축물 중 임의의 구축물의 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩티드를 포함한다. 특정 구현예에서, 표 2 ~ 5의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 제외될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 특정 구현예에서, 폴리펩티드는 SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37 또는 SEQ ID NO:38 중 임의의 것 또는 모두에 상응하거나 또는 암호화되는 아미노산 서열을 포함하지 않는다. 또 다른 예에서, 특정 구현예에서, 본 발명의 개질된 ABM은 SEQ ID NO: 55 ~ 62 중 임의의 것 또는 모두를 포함하지 않는다.

## 표 2

CONSTRUCT	NUCLEOTIDE SEQUENCE	SEQ ID NO
B-HH1	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAAGAAC CTGGGAGTTCAAGTGAAGGTCTCTGCAGGGCTCCGGATA CACCTTCAGCTATTCTGGATGAGCTGGGTGCGGCAGGCC CCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCG GCGATGGGGATACTGACTACGCACAGAAATTCAAGGAAG AGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTAT ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGTGT ATTACTGTGCAAGAAATGCTTGTATGGTTACTGGCTTGT TACTGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCTCA	1
B-HH2	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAAGAAC CTGGGAGTTCAAGTGAAGGTCTCTGCAGGGCTCCGGATA CGCCCTCAGCTATTCTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCC CCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCG GCGATGGGGATACTGACTACAATGGAAATTCAAGGGCAG AGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTAT ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGTGT ATTACTGTGCAAGAAATGCTTGTATGGTTACTGGCTTGT TACTGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCTCA	3
B-HH3	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAAGAAC CTGGGAGTTCAAGTGAAGGTCTCTGCAGGGCTCCGGATA CGCCCTCAGCTATTCTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCC CCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCG GCGATGGGGATACTGACTACAATGGAAATTCAAGGGCAG AGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTAT ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGTGT ATTACTGTGCAAGAAATGCTTGTATGGTTACTGGCTTGT TACTGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCTCA GCACC	5
B-HH4	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAAGAAC CTGGGAGTTCAAGTGAAGGTCTCTGCAGGGCTCCGGATA CGCCTTCAGCTATTCTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCC CCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCG GCGATGGGGATACTGACTACAATGGAAATTCAAGGGCAG AGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTAT ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGTGT ATTACTGTGCAAGAAATGCTTGTATGGTTACTGGCTTGT TACTGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCTCA	7
B-HH5	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAAGAAC CTGGGAGTTCAAGTGAAGGTCTCTGCAGGGCTCCGGATA CGCCCTCAGCTATTCTGGATGAGCTGGGTGCGGCAGGCC CCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCG GCGATGGGGATACTGACTACAATGGAAATTCAAGGGCAG AGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTAT ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGTGT ATTACTGTGCAAGAAATGCTTGTATGGTTACTGGCTTGT TACTGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCTCA	9
B-HH6	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAAGAAC CTGGGAGTTCAAGTGAAGGTCTCTGCAGGGCTCCGGATA CGCCCTCAGCTATTCTGGATCAATTGGGTGCGGCAGGCC CTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCG GAGATGGGGATACTGACTACAATGGAAATTCAAGGGCAGA GTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATA TGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGTGT TTACTGTGCAAGAAATGCTTGTATGGTTACTGGCTTGT TACTGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCTCA	11

CONSTRUCT	NUCLEOTIDE SEQUENCE	SEQ ID NO
B-HH7	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAAGAAGC CTGGGAGTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCCGGATA CGCCTCAGCTATTCTGGATCTCGTGGGTGCGGGCAGGCC CTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCG CGATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGA GTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATA TGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGA TTACTGTGCAAGAAATGTCTTGATGGTTACTGGCTTGT ACTGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCTCA	13
B-HH8	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAAGAAGC CTGGCGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCCGGATA CACCTTCACATACAGCTGGATGAACCTGGGTGCGGCAGGCC CCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCG CGATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGCAG AGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATA ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGA TTACTGTGCAAGAAATGTCTTGATGGTTACTGGCTTGT TACTGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCTCA	15
B-HH9	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAAGAAGC CTGGCGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCCGGATA CACCTTCAGCTATTCTGGATGAACCTGGGTGCGGCAGGCC CCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCG CGATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGCAG AGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATA ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGA TTACTGTGCAAGAAATGTCTTGATGGTTACTGGCTTGT TACTGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCTCA	17
B-HL1	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAAGAAGC CTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCCGGATA CACCTTCACCTATTCTGGATGCACTGGGTGCGGCAGGCC CTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCG CGATGGGGATACTGACTACGCACAGAAATTCCAAGGAAGA GTCACAATGACACGGGACACGTCCACTCCACCGTCTATA TGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGA TTACTGTGCAAGAAATGTCTTGATGGTTACTGGCTTGT ACTGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCTCA	19
B-HL2	GAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAAGAAGC CTGGGGCCACCGTGAAGATCTCCTGCAAGGTGTCGGATA CACCTTCACCTATTCTGGATGCACTGGGTGCGAGCAGGCC CTGGAAAGGGGCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCG CGATGGGGATACTGACTACGCAGAGAAATTCCAAGGAAG AGTCACAATCACAGCCGACACGTCCACTGACACCGCCTATA ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGA TTACTGTGCAACCAATGTCTTGATGGTTACTGGCTTGT TACTGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCTCA	21
B-HL3	GAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAAGAAGC CTGGGGCCACCGTGAAGATCTCCTGCAAGGTGTCGGATA CACCTTCACCTATTCTGGATGCACTGGGTGCGAGCAGGCC CTGGAAAGGGGCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCG CGATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGAAAG AGTCACAATCACAGCCGACACGTCCACTGACACCGCCTATA ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGA TTACTGTGCAACCAATGTCTTGATGGTTACTGGCTTGT TACTGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCTCA	23

CONSTRUCT	NUCLEOTIDE SEQUENCE	SEQ ID NO
B-HL4	CAGATGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAAGAAGA CCGGGAGITTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCCGGATA CACCTCACCTATTCTGGATGAGCTGGGTGCGGCAGGGCCC CTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCGG CGATGGGGATACTGACTACGCACAGAAATTCCAAGGAAGA GTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATA TGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGTGT TTACTGTGCAAGAAATGTCTTGTGTTACTGGCTTGT ACTGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCT CACC	25
B-HL8	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGGAGGCTTGGTCAAGC CTGGCGGGTCCCTCGCGCTCTCTGTGCAAGCCTCTGGATT ACATTTAGCTATTCTGGATGAACCTGGGTGCGGCAGGCTCC TGGAAAGGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTCCCGC GATGGGGATACTGACTACAATGGAAATTCAAGGGCAGA GTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATA TGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGTGT TTACTGTGCAAGAAATGTCTTGTGTTACTGGCTTGT ACTGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCT AGCGAACATTCTCGA	27
B-HL10	CGGAATTGGCCCCACCGGTGGGCCACCATGGACTGGACCTG GAGGATCCTCTTCTGGTGGCAGCAGCCACAGGAGGCCAC TCCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGGCTTGGTCA AGCCTGGCGGGTCCCTCGCGCTCTCTGTGCAAGCCTCTGG TTCGCATTCACTATTCTGGATGAACCTGGGTGCGGCAGGC TCTGGAAAGGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTCCC GGCGATGGGGATACTGACTACAATGGAAATTCAAGGGCAGA GAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTA TATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGTGT TATTACTGTGCAAGAAATGTCTTGTGTTACTGGCTTGT TTACTGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCT AGCGAACATTCTCGA	29
B-HL11	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGGAGGCTTGGTCAAGC CTGGCGGGTCCCTCGCGCTCTCTGTGCAAGCCTCTGGATT ACATTTAGCTATTCTGGATGAACCTGGGTGCGGCAGGCTCC TGGAAAGGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTCCCGC GATGGGGATACTGACTACAATGGAAATTCAAGGGCAGA GTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATA TGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGTGT TTACTGTGCAAGAAATGTCTTGTGTTACTGGCTTGT ACTGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCT AGCGAACATTCTCGA	31
B-HL12	CGGAATTGGCCCCACCGGTGGGCCACCATGGACTGGACCTG GAGGATCCTCTTCTGGTGGCAGCAGCCACAGGAGCTCAC TCCGAAGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGAGCAGGCTTGGTCA AGCCTGGCGGGTCCCTCGCGCTCTCTGTGCAAGCCTCTGG ATTACACATTAGCTATTCTGGATGAACCTGGGTGCGGCAGG CTCTGGAAAGGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTCCC GGCGATGGGGATACTGACTACAATGGAAATTCAAGGGC AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCT ATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGT GTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTGTGTTACTGGCTTGT TTTACTGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCT AGCGAACATTCTCGA	33

CONSTRUCT	NUCLEOTIDE SEQUENCE	SEQ ID NO
B-HL13	CGGAATTGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGGACCTG GAGGATCCTTCTTGGTGGCAGCAGCCACAGGAGCTCAC TCCGAAGTGCAGCTCGTCGAGTCTGGAGGAGGCGTGGCA AGCCTGGCGGGTCCCTGCGGCTCTCTGCGCAGCCTCTGG ATTACACATTAGCTATTCTGGATGAACCTGGGTGCGGCAGG CTCCTGAAAGGGCCTCGAGTGGGTGGACGGATCTTCC CGCGATGGGAACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCT ATATGGAGCTGAGCAGCTGAGATCTGAGGACACGGCGT GTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTGATGGTTACTGGCTTG TTACTGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCT AGCGAATTCTCGA	35
B-HL14	CGGAATTGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGGACCTG GAGGATCCTTCTTGGTGGCAGCAGCCACAGGAGCTCAC TCCGAAGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGAGGAGGCGTGAAGA AGCCTGGCGGGTCCCTGCGGCTCTCTGCGCAGCCTCTGG ATTACACATTAGCTATTCTGGATGAACCTGGGTGCGGCAGG CTCCTGAAAGGGCCTCGAGTGGGTGGACGGATCTTCC CGCGATGGGAACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCT ATATGGAGCTGAGCAGCTGAGATCTGAGGACACGGCGT GTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTGATGGTTACTGGCTTG TTACTGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCT AGCGAATTCTCGA	37
B-HL15	CGGAATTGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGGACCTG GAGGATCCTTCTTGGTGGCAGCAGCCACAGGAGCCAC TCCGAAGTGCAGCTGGGGAGTCTGGAGGAGGCGTGGCA AGCCTGGCTCTCCCTGCGGCTCTCTGCGCAGCCTCTGG TTACACATTAGCTATTCTGGATGAACCTGGGTGCGGCAGG TCCTGAAAGGGCCTCGAGTGGGTGGACGGATCTTCC GGCGATGGGAACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC GAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTA TATGGAGCTGAGCAGCTGAGATCTGAGGACACGGCGT TATTACTGTGCAAGAAATGTCTTGATGGTTACTGGCTTG TTACTGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCT AGCGAATTCTCGA	39
B-HL16	CGGAATTGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGGACCTG GAGGATCCTTCTTGGTGGCAGCAGCCACAGGAGCCAC TCCGAAGTGCAGCTGGGGAGTCTGGAGGAGGCGTGGCA AGCCTGGCGGGTCCCTGCGGCTAGCTGCGCAGCCTCTGG ATTACACATTAGCTATTCTGGATGAACCTGGGTGCGGCAGG CTCCTGAAAGGGCCTCGAGTGGGTGGACGGATCTTCC CGCGATGGGAACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCT ATATGGAGCTGAGCAGCTGAGATCTGAGGACACGGCGT GTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTGATGGTTACTGGCTTG TTACTGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCT AGCGAATTCTCGA	41

[0211]

CONSTRUCT	NUCLEOTIDE SEQUENCE	SEQ ID NO
B-HL17	CGGAATTGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGGACCTG GAGGATCCTTCTTGGTGGCAGCAGCCACAGGAGCCAC TCCGAAGTGCAGCTGGGGAGTCTGGAGGAGGCGTGGCA AGCCTGGGGTCCCTGCGGCTCTCTGCGCAGCCTCTGG ATTACACATTAGCTATTCTGGATGAACCTGGGTGCGGCAGG CTCCTGAAAGGGCCTCGAGTGGGTGGACGGATCTTCC GGCGATGGGAACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCT ATATGGAGCTGAGCAGCTGAGATCTGAGGACACGGCGT GTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTGATGGTTACTGGCTTG TTACTGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCT AGCGAATTCTCGA	43
VH Signal Sequence	ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTGGTGGCAGCAG CCACAGGAGCCACACTCC	45
B-KV1	GATATCGTGAATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCGGTCAC CCCTGGAGAGCCGGCAGCATTAAGCTGAGGTCTAGCAAG AGCTCTTGCACAGCAATGGCATCACTTATTGTATTGGTA CCTGAAAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCTGATTAT CAAATGTCACCTTGTCTGGCGTCCCTGACGGGTCTC CGGATCGGGTCAAGGCACTGATTCACTGAAATCAGC AGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAGTTATTACTGCGCTC AGAATCTAGAACCTCCCTACACCTTGGCGGAGGGACCAA GGTGGAGTCAAACGTAACGGT	47
VL Signal Sequence	ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGCTCCTGCT GCTCTGGTCCCAGGTGCCAGGTGT	49

[0212]

## 표 3

CONSTRUCT	AMINO ACID SEQUENCE	SEQ ID NO
B-HH1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSYSWMSWVRQAP GQGLEWMGRIFPGDGDTDYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVSS	2
B-HH2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWMNWVRQAP PGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVSS	4
B-HH2A	QVQLVQSGAEELKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWMNWVRQAP GQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVSS	124
B-HH2B	QVQLVQSGAEVVKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWMNWVRQAP PGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVSS	125
B-HH2C	QVQLVQSGGEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWMNWVRQAP PGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVSS	126
B-HH2D	QVQLVQSGAGVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWMNWVRQAP PGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVSS	127
B-HH2E	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWMNWVRQAP PGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLVIVSS	128

[0213]

CONSTRUCT	AMINO ACID SEQUENCE	SEQ ID NO
B-HH2F	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWMNWVRQA PGQGLEWMGRIFPGDGD'TDYNFKFKRVTITADKSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVIS	129
B-HH3	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWMNWVRQA PGQGLEWMGRIFPGDGD'TDYNFKFKRVTITADKSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVSS	6
B-HH4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYAFSYSWMNWVRQA PGQGLEWMGRIFPGDGD'TDYNFKFKRVTITADKSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVSS	8
B-HH5	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWMNWVRQAP GQGLEWMGRIFPGDGD'TDYNFKFKRVTITADKSTSTAYMEL SSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVSS	10
B-HH6	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWINWVRQAP GQGLEWMGRIFPGDGD'TDYNFKFKRVTITADKSTSTAYMEL SSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVSS	12
B-HH7	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWISWVRQAP GQGLEWMGRIFPGDGD'TDYNFKFKRVTITADKSTSTAYMEL SSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVSS	14
B-HH8	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTYSWMNWVRQA PGQGLEWMGRIFPGDGD'TDYNFKFKRVTITADKSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVSS	16
B-HH9	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTFSYSWMNWVRQA PGQGLEWMGRIFPGDGD'TDYNFKFKRVTITADKSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVSS	18
B-HL1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTYSWMHWVRQA PGQGLEWMGRIFPGDGD'TDYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYM ESSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVSS	20
B-HL2	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTYSWMHWVQQAP GKGLEWMGRIFPGDGD'TDYAEKFQGRVTITADTSTDAYMEL SSSLRSEDTAVYYCATNVDGYWLVYWGQGTLVTVSS	22
B-HL3	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTYSWMNWVQQAP GKGLEWMGRIFPGDGD'TDYNFKFKRVTITADTSTDAYME LSSLRSEDTAVYYCATNVDGYWLVYWGQGTLVTVSS	24
B-HL4	QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYTFTYSWMMSWVRQA PGQGLEWMGRIFPGDGD'TDYAQKFQGRVTITADKSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVSS	26
B-HL8	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVRQAP GKGLEWVGRIFPGDGD'TDYNFKFKRVTITADKSTSTAYMEL SSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVSS	28
B-HL10	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSYSWMNWVRQAP GKGLEWVGRIFPGDGD'TDYNFKFKRVTITADKSTSTAYMEL SSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVSS	30

CONSTRUCT	AMINO ACID SEQUENCE	SEQ ID NO
B-HL11	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVRQAP GKGLEWVGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLTVSS	32
B-HL12	EVQLVESGGAGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVRQAP GKGLEWVGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLTVSS	34
B-HL13	EVQLVESGGGVVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVRQAP GKGLEWVGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLTVSS	36
B-HL14	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVRQAP GKGLEWVGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLTVSS	38
B-HL15	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVRQAP GKGLEWVGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLTVSS	40
B-HL16	EVQLVESGGGLVKPGGSLRVSCAASGFTFSYSWMNWVRQAP GKGLEWVGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLTVSS	42
B-HL17	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVRQAP GKGLEWVGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLTVSS	44
VH Signal Sequence	MDWTWRILFLVAAATGAHS	46
B-KV1	DIVMTQTPLSLPVTPGEPAISCRSSKSLHSNGITYLYWYLQK PGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYCAQNLELPYTFGGGTKEIKRTV	48
B-KV10	DIVMTQTPLSLPVTPGEPAISCRSSKSLHSNGITYLYWYLQK AGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYCAQNLELPYTFGGGTKEIKRTV	130
B-KV11	DIVMTQTPLSLPVTPGEPAISCRSSKSLHSNGITYLYWYLQK PGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPEDV GVYYCAQNLELPYTFGGGTKEIKRTV	131
B-KV12	DIVMTQTPLSLPVTPGEPAISCRSSKSLHSNGITYLYWYLQK PGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDF GVYYCAQNLELPYTFGGGTKEIKRTV	132
B-KV13	DIVMTQTPLSLPVTPGEPAISCRSSKSLHSNGITYLYWYLQK PGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYCAQNLELPYTFGGGTKEIKRTV	133
B-KV14	DIVMTQTPLSLPVTPGEPAISCRSSKSLHSNGITYLYWYLQK PGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYCAQNLELPYTFGGGTKEAKRTV	134

[0215]

CONSTRUCT	AMINO ACID SEQUENCE	SEQ ID NO
VL Signal Sequence	MDMRVPAQLLGLLLWFPGARC	50

[0216]

표 4

CONSTRUCT	NUCLEOTIDE SEQUENCE	SEQ ID NO.
I-HHD	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCTGGGCTGAGGTGAAGA AGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCTGCAAGGCCCTCT GGTTTACATTCACTGACTACAAGATAACACTGGGTGCG ACAGGCCCTGGACAAGGGCTGAGGTGGATGGGATATT TCAACCCCTAACAGCGGTATAGTACCTACGCACAGAAG TTCCAGGGCAGGGTCACCATACCGGGACAAATCCAC GAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCTGAGATCTG AGGACACGGCGTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAG GCGGTACTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCA CCGTGACCGTCTCCTCA	51
M-HHA	GAAGTGCAAGCTGGTGGAGCTGGAGGGAGCTGGTCAAGC CTGGCGGGTCCCTCGCGCTCTCTGTGCAAGCTCCGGATTC ACATTAGCAACTATTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCTCC TGAAAGGGCTCGAGTGGTGGGAGAGATCAGATTGAAA TCCAATAACTTCGGAAGATATTACGCTGCAAGCGTGAAGGG CCGGTTCAACCATCAGCAGAGATGATCCAAGAACACGCTGT ACTCGAGATGAACAGCTGAAGACCGAGGATACGGCCGT GTATTACTGTACACATACGGCAACTACGTGTTGGCACTACT TCGACCACTGGGCCAAGGGACCACCGTACCGTCTCCAGT	53

[0217]

표 5

CONSTRUCT	AMINO ACID SEQUENCE	SEQ ID NO.
I-HHD	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYNMHWV RQAPGQGLEWMGYFPNPNSGYSTYAQKFQGRVTITADK STSTAYMELSSLRSEDATAVYYCARLSPGGYYVMDAWG QGTTVTVSS	52
M-HHA	EVQLVESGGLVKPGSSLRSLCAASGFTFSNYWMNVRQAP GKGLEWVGEIRLKSNNSNFGRYYAAASVKGRFTISRDDSKNLYL QMNSLKTEDTAVYYCTYGNYVGHYFDHWGQGTTVTVSS	54

[0218]

또다른 특별한 구현예에서, 본 발명은 도 1 및 표 6에 나타낸 모 서열로부터 유래된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 서열을 포함하고, 하나 이상의 중쇄 FR 영역 내에 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 또다른 구현예에서, 본 발명은 도 1 및 표 6에 나타낸 모 서열로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하고, 하나 이상의 중쇄 FR 영역 내에 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 단리된 폴리펩티드에 관한 것이다.

표 6

SEQUENCE NAME	AMINO ACID SEQUENCE	SEQ ID NO.
1F5-VH	QVQLRQPGAEVLVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWV KQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKS STSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSHYGSNYVDYFDYWG QGTLVTVST	55
B9E9-VH	QVQLVQSGAEVLVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWV KQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKS STSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARAQLRPNWYFDVVG AGTTVTVS	56
C2B8-VH	QVQLQQPGAEVLVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWV KQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKS STSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWG AGTTVTVSA	57
2H7-VH	QAYLQQSGAEVRPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWV KQTPRQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTVDKS STSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARVVVYNSYWYFDVVG TGTTVTVS	58
B-ly1-VH	EVKLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSYSWMNWV KLRPGQGLEWIGRIFPGDGDTDYNGKFKGKATLTADKS SNTAYMQLTSLTSVDSAVYLCARNVFDGYWLVYWG QGTLVTVSA	59

[0220]

SEQUENCE NAME	AMINO ACID SEQUENCE	SEQ ID NO.
2F2-VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWV RQAPGKGLEWVSTISWNSGSIIGYADSVKGRFTISRDNAK KSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVVG QGTTVTVSS	60
7D8-VH	EVQLVESGGGLVQPDRSLRLSCAASGFTFHHDYAMHWV RQAPGKGLEWVSTISWNSGTIGYADSVKGRFTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVVG QGTTVTVSS	61
11B8-VH	EVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCTGSGFTFSYHAMHWV RQAPGKGLEWVSIIGTGGVITYYADSVKGRFTISRDNVK NSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARDYYGAGSFYDGLYGM MDVWGQGTTVTVSS	62

[0221]

[0222]

한 측면에서, 본 발명의 개질된 ABM은 모 ABM과 비교해 전체 골격 영역을 포함할 수 있다. 따라서, 예를 들어, 본 발명은 추가로, 인간 생식 계열 VH 서열로부터 유래된 하나 이상의 중쇄 FR을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 바람직한 구현예에서, FR1 영역 내 또는 Kabat 위치 8 - 13 내의 인간 VH 생식 계열 서열은 하기 표 7에서 규명된 서열 중 하나에서 유래된다. 이들 서열은 IMGT 데이터베이스 (<http://imgt.cines.fr:8104/textes/IMGTrertoire>)에서 이용가능하고, 그의 수탁 번호에 의해 규명된 각각의 서열은 그 전체가 참조로써 본원에 삽입된다.

표 7

IMGT DATABASE NAME	ACCESSION NUMBER	SEQ ID NO (NUCLEOTIDE SEQUENCE)
IMGT_hVH_1_2	X07448	82
IMGT_hVH_2_5	X62111	83
IMGT_hVH_2_26	M99648	84
IMGT_hVH_2_70	L21969	85
IMGT_hVH_3_7	M99649	86
IMGT_hVH_3_11	M99652	87
IMGT_hVH_3_19	M99656	88

[0223]

IMGT DATABASE NAME	ACCESSION NUMBER	SEQ ID NO (NUCLEOTIDE SEQUENCE)
IMGT_hVH_3_20	M99657	89
IMGT_hVH_3_33	L06618	90
IMGT_hVH_3_43	M99672	91
IMGT_hVH_3_53	M99679	92
IMGT_hVH_3_d	Z18898	93
IMGT_hVH_4_4	X05713	94
IMGT_hVH_4_30_2	L10089	95
IMGT_hVH_4_34	X92278	96
IMGT_hVH_5_51	M99686	97
IMGT_hVH_6_1	X92224	98
IMGT_hVH_7_4_1	L10057	99
IMGT_hVH_7_81	Z27509	100

[0224]

[0225]

또다른 구현예에서, 본 발명은 하기 표 8에서 나타낸 서열에 따라, 중쇄 가변 영역의 Kabat 위치 8 내지 13 또는 그의 하위셋 (예를 들어, 위치 9 내지 12, 위치 10 내지 12 등)에서 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 또다른 구현예에서, 본 발명은 하기 표 8에서 나타낸 서열에 따라, Kabat 위치 8 내지 13 또는 그의 하위셋 (예를 들어, 위치 9 내지 12, 위치 10 내지 12 등)에서 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩티드에 관한 것이다.

#### 표 8

AMINO ACID SEQUENCE	SEQ ID NO
GAEVKK	63
GPTLVK	64
GPVLVK	65
GPALVK	66
GGGLVQ	67
GGGLVK	68

[0226]

AMINO ACID SEQUENCE	SEQ ID NO
GGGLVE	69
GGGVVR	70
GGGVVQ	71
GGVVVQ	72
GGGLIQ	73
RGVLVQ	74
GPGLVK	75
GSGLVK	76
GAGLLK	77
GSELKK	78
GHEVKQ	79
GAELKK	101
GAEVVK	102
GGEVKK	103
GAGVKK	104
GGGVVK	105

[0227]

[0228] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 중쇄 가변 영역의 Kabat 위치 108 내지 113 또는 그의 하위셋 (예를 들어, 위치 110 내지 112, 위치 110 및 112 등)에서 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 특별한 구현예에서, 위치 108 내지 113의 서열은 하기 표 9에 나타나 있다. 또 다른 구현예에서, 본 발명은 하기 표 9에 나타낸 서열에 따라, Kabat 위치 108 내지 113 또는 그의 하위셋 (예를 들어, 위치 110 내지 112, 위치 110 및 112 등)에서 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩티드에 관한 것이다.

#### 표 9

AMINO ACID SEQUENCE	SEQ ID NO
LTVVSS	106
LVIVSS	107
LTVVIS	108
LVIVIS	109
LVGVSS	110
LTVVGS	111
LVGVGS	112
LVAVSS	113
LTVVAS	114
LVAVAS	115
LVVVSS	116

[0229]

AMINO ACID SEQUENCE	SEQ ID NO
LTVVVS	117
LVVVVS	118
LVLVSS	119
LTVVLS	120
LVLVLS	121
LVSVSS	122
LTVVTS	123

[0230]

[0231] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및/또는 숙주 세포에 관한 것이다.

[0232]

일반적으로, 임의의 유형의 배양 세포주가 본 발명의 ABM 을 발현하는데 사용될 수 있다. 바람직한 구현예에서, CHO 세포, HEK293-EBNA 세포, BHK 세포, NSO 세포, SP2/0 세포, YO 골수종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포 또는 하이브리도마 세포, 기타 포유류 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 또는 식물 세포는 본 발명의 엔지니어링된 숙주 세포를 생성하는데 있어서 배경 세포주로서 사용된다.

[0233]

Fc 영역 및 Fc 영역 변이체를 추가로 포함하는 개질된 ABM

[0234]

한 구현예에서, 중쇄 V 및/또는 CH1 영역 및/또는 경쇄 V 및/또는 C 영역에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 본 발명의 ABM 은 추가로 인간 Fc 영역을 포함할 수 있다. 구체적인 구현예에서, 인간 불변 영역은 SEQ ID NO 80 및 81에서 나타내고 하기에 나타낸 IgG1 이다 :

[0235]

IgG1 뉴클레오티드 서열 (SEQ ID NO:80)

ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTC  
TGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAC  
CGGTGACGGTGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACC  
TTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG  
ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAA  
TCACAAGCCCAGCAACACCAAGGGTGGACAAGAAAGCAGAGGCCAAATCT  
TGTGACAAAACCTCACACATGCCAACCGTGGCCAGCACCTGAACCTGGG  
GGGACCGTCAGTCTTCCCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCCTCATGA  
TCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAA  
GACCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGGTGCATAA  
TGCCAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG  
GTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA  
CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA  
TCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCTGCC

[0236]

CCATCCGGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTCAGCCTGACCTGCCGGT  
CAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGG  
CAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCGTGCTGGACTCCGACG  
GCTCCTCTCCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG  
CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA  
CTACACGAGAACAGGCTCTCCCTGTCCTCCGGTAAATGA

[0237]

IgG1 아미노산 서열 (SEQ ID NO:81)

TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKAEPKSCDKTHT  
CPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY  
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL  
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE  
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALH  
NHYTQKSLSLSPGK

[0239]

[0240] 그러나, 인간 Fc 영역의 변이체 및 아이소폼 (isoform) 또한 본 발명에 포함된다. 예를 들어, 본 발명에 사용되기에 적합한 변이체 Fc 영역은 그 전체가 본원에 참조로써 삽입된 Presta 의 미국 특허 제 6,737,056 호

(하나 이상의 아미노산 개질로 인해 효과기 기능이 변형된 Fc 영역 변이체) ; 또는 미국 특허 출원 제 60/439,498 호 ; 제 60/456,041 호 ; 제 60/514,549 호 ; 또는 WO 2004/063351 (아미노산 개질로 인해 결합 친화성이 증가된 변이체 Fc 영역) ; 또는 미국 특허 출원 제 10/672,280 호 또는 WO 2004/099249 (아미노산 개질로 인해 Fc감마R 에의 결합이 변형된 Fc 변이체) 에서 교시된 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0241] 본 발명의 또다른 측면에서, 중쇄 V 및/또는 CH1 영역 및/또는 경쇄 V 및/또는 C 영역에 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 ABM 은 추가로 Fc 영역 변이체를 포함할 수 있다. 당업자는 하나 이상의 FcR 에 대한 결합 친화성이 변형된 변이체를 제조하기 위해 Fc 영역을 엔지니어링할 수 있다. 당업자는 본원에 참조로써 삽입된 미국 Provisional Pat. Appl. No. 60/678,776 에서 기술된 바와 같이, 예를 들어, FcR 에의 결합을 변경 (예를 들어 증가 또는 감소) 시키기 위해 Fc 영역의 하나 이상의 아미노산 잔기를 개질시킬 수 있다. 일반적으로, 당업자는 FcR 결합에 영향을 미치는 것으로 규명된 Fc 영역 잔기 중 하나 이상에서 아미노산 치환을 하여, 그러한 Fc 영역 변이체를 생성할 것이다. 바람직한 구현예에서, 1 내지 약 10 개 이하의 Fc 영역 잔기가 삭제 또는 치환될 것이다. 본원에서 하나 이상의 아미노산 개질 (예를 들어 치환) 을 포함하는 Fc 영역은 바람직하게는 모 Fc 영역 서열 또는 본래의 서열 인간 Fc 영역의 약 80% 이상, 바람직하게는 약 90% 이상, 및 가장 바람직하게는 약 95% 이상 유지할 것이다.

[0242] 당업자는 또한 개질된 Fc 영역에 아미노산 삽입을 할 수 있고, 이러한 변이체는 변형된 효과기 기능을 갖는다. 예를 들어, 당업자는 FcR 결합에 영향을 주는 본원에 규명된 Fc 영역 위치 중 하나 이상에 인접한 하나 이상의 아미노산 잔기 (예를 들어 1 내지 2 개의 아미노산 잔기 및 일반적으로 10 개 이하의 잔기) 를 도입할 수 있다. 인접이란 것은 본원에 규명된 Fc 영역 잔기의 1 내지 2 개의 아미노산 잔기 내에 있다는 것을 의미한다. 그러한 Fc 영역 변이체는 향상된 또는 감소된 FcR 결합 및/또는 효과기 기능을 나타낼 수 있다.

그러한 삽입 변이체를 생성하기 위해서는, 당업자는 FcR (예를 들어 흥미있는 FcR 의 세포의 도메인) 의 결합 영역 및 아미노산 잔기(들) 가 삽입된 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드의 공-결정 구조를 평가하여 (예를 들어, 본원에 참조로써 삽입된 [Sondermann 등 Nature 406:267 (2000)]; [Deisenhofer, Biochemistry 20 (9): 2361-2370 (1981)]; 및 [Burmeister 등, Nature 344: 379-383, (1994)] 를 참조) 예를 들어, 향상된 FcR 결합 능력을 나타내는 개질된 Fc 영역을 이상적으로 디자인한다.

[0243] 모 Fc 영역에 적절한 아미노산 서열 개질을 도입함으로써, 당업자는 (a) 인간 효과기 세포의 존재 하에 하나 이상의 효과기 기능을 다소 효과적으로 매개하고/거나 또는 (b) 모 폴리펩티드보다 더 양호한 친화성으로 Fcγ 수용체 (FcγR) 또는 Fc 신생 수용체 (FcRn) 에 결합하는 변이체 Fc 영역을 제조할 수 있다. 그러한 개질된 Fc 영역은 일반적으로 Fc 영역에 하나 이상의 아미노산 개질을 포함할 것이다.

[0244] 바람직한 구현예에서, 모 폴리펩티드 Fc 영역은 인간 Fc 영역, 예를 들어 본래의 인간 Fc 영역 인간 IgG1 (A 및 비-A 알로타입), IgG2, IgG3, IgG4, 및 임의의 종으로부터 알려지거나 또는 발견된 모든 알로타입이다. 그러한 영역은 그 전체가 본원에 참조로써 삽입된 미국 Provisional Patent Application No. 60/678,776 에 개시된 바와 같은 서열을 갖는다.

[0245] 특정 구현예에서, 중쇄 V 및/또는 CH1 영역 및/또는 경쇄 V 및/또는 C 영역 내에 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하고 향상된 효과기 기능 (예를 들어, ADCC) 을 갖는 개질된 Fc 영역을 추가로 포함하는 ABM 을 제조하기 위해서, 모 폴리펩티드는 바람직하게는 기존의 ADCC 활성 (예를 들어, 모 폴리펩티드는 인간 IgG1 또는 인간 IgG3 Fc 영역을 포함함) 을 갖는다. 일부 구현예에서, 향상된 ADCC 를 갖는 개질된 Fc 영역은 본래의 서열 IgG1 또는 IgG3 Fc 영역이 있는 항체보다 실질적으로 더욱 효과적으로 ADCC 를 매개한다.

[0246] 특별한 구현예에서, 아미노산 개질(들) 은 모 Fc 영역의 CH2 도메인에 도입된다.

[0247] 개질된 Fc 영역을 갖는 본 발명의 폴리펩티드는 폴리펩티드의 목적하는 또는 원하는 용도에 따라 하나 이상의 추가의 개질을 받을 수 있다. 그러한 개질은 예를 들어, 아미노산 서열의 추가의 변경 (아미노산 잔기의 치환, 삽입 및/또는 제거), 이종 폴리펩티드(들) 에의 융합 및/또는 공유 개질을 포함할 수 있다. Fc 수용체 결합 및/또는 효과기 기능의 변경을 초래하는 상기 개시된 아미노산 개질(들) 전, 동시에 또는 후에 상기 추가의 개질이 이루어질 수 있다.

[0248] 대안적으로 또는 추가로, 아미노산 개질을, Fc 영역의 C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성 기능을 변형시키는 하나 이상의 추가의 아미노산 개질과 조합시키는 것이 유용할 수 있다. 본원의 이러한 측면에서 특히 흥미있는 출발 폴리펩티드는 C1q 에 결합하고 보체 의존성 세포독성 (CDC) 을 나타내는 것이다. 본원에 기술된 아미노산 치환은 출발 폴리펩티드가 C1q 에 결합하는 능력을 변경시키고/거나 또는 그의 보체 의존성 세포독

성 기능을 변경시키도록 (예를 들어 이들 효과기 기능을 감소시키고 바람직하게는 없애도록) 작용할 수 있다.

그러나, 향상된 Clq 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC) 기능을 가진 기술된 위치 중 하나 이상에서 치환을 포함하는 폴리펩티드가 본원에 포함된다. 예를 들어, Clq에 결합하고/거나 또는 CDC를 매개할 수 없는 출발 폴리펩티드는 이러한 추가의 효과기 기능을 얻도록 본원 교시에 따라 개질될 수 있다. 더욱이, CDC를 매개하는 능력을 임의로 추가로 갖는, 기존의 Clq 결합 활성이 있는 폴리펩티드는 상기 활성 중 하나 또는 2 가지 활성이 향상되도록 개질될 수 있다. Clq를 변경시키고/거나 또는 그의 보체 의존성 세포독성 기능을 변경시키는 아미노산 개질이 예를 들어, 본원에 참조로써 삽입된 WO00/42072에 기술된다.

[0249]

상기 개시된 바와 같이, 당업자는 예를 들어, Clq 결합 및/또는 FcR 결합을 개질하여 CDC 활성 및/또는 ADCC 활성을 바꿈으로써 변형된 효과기 기능을 갖는 Fc 영역 또는 그의 부분을 디자인할 수 있다. 예를 들어, 당업자는 향상된 Clq 결합 및 향상된 FcγRIII 결합 (예를 들어 향상된 ADCC 활성 및 향상된 CDC 활성 둘 다를 가짐)을 가진 개질된 Fc 영역을 제조할 수 있다. 대안적으로, 당업자가 효과기 기능이 감소 또는 제거되는 것을 바라는 경우, 당업자는 감소된 CDC 활성 및/또는 감소된 ADCC 활성을 가진 개질된 Fc 영역을 엔지니어링할 수 있다. 다른 구현예에서, 당업자는 이러한 활성 중 단지 하나만을 증가시키고 임의로 또한 다른 활성을 감소시킬 수 있는데, 예를 들어 ADCC 활성은 향상되었으나 CDC 활성은 감소된, 또는 그 반대인 개질된 Fc 영역을 제조할 수 있다.

[0250]

또다른 유형의 아미노산 치환은 폴리펩티드의 글리코실화 패턴을 변경하도록 작용한다. 이는 예를 들어, 폴리펩티드에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 부분을 삭제하고/거나 또는 폴리펩티드에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위를 첨가함으로써 수행될 수 있다. 폴리펩티드의 글리코실화는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결이다. N-연결은 아스파라긴 잔기의 측쇄에 탄수화물 부분을 부착하는 것을 말한다. 웨프티드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서, X는 프롤린을 제외한 아미노산임)은 탄수화물 부분의 아스파라긴 측쇄에의 효소적 부착을 위한 인지 서열이다. 따라서, 폴리펩티드 내에 이러한 웨프티드 서열이 존재하는 것은 잠재적인 글리코실화 부위를 만든다. O-연결 글리코실화는 당 N-아세일갈락토스아민, 갈락토스, 또는 크실로스 중 어느 하나가 히드록시아미노산, 가장 흔하게는 세린 또는 트레오닌에 부착하는 것을 말하며, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시리신 또한 사용될 수 있다.

[0251]

일부 구현예에서, 본 발명은 Fc 영역을 갖는 모 폴리펩티드의 개질을 포함하는 조성물을 제공하는데, 여기서 개질된 Fc 영역은 하나 이상의 표면 잔기 아미노산 개질을 포함한다 (예를 들어, [Deisenhofer, Biochemistry, 28;20(9):2361-70, April 1981] 및 WO00/42072을 참조하며, 둘 다 본원에 참조로써 삽입되어 있음). 다른 구현예에서, 본 발명은 Fc 영역을 갖는 모 폴리펩티드의 개질을 포함하는 조성물을 제공하는데, 여기서 개질된 Fc 영역은 하나 이상의 비-표면 잔기 아미노산 개질을 포함한다. 추가의 구현예에서, 본 발명은 Fc 영역을 갖는 모 폴리펩티드의 변이체를 포함하는데, 여기서 변이체는 하나 이상의 표면 아미노산 개질 및 하나 이상의 비-표면 아미노산 개질을 포함한다.

[0252]

본 발명의 개질된 ABM의 치료 효능은 하나 이상의 당단백질-개질화 글리코실트랜스퍼라제의 발현을 변형시키도록 글리코엔지니어링된 숙주 세포에서 개질된 ABM을 제조함으로써 추가로 향상될 수 있다. 한 구현예에서, 글리코엔지니어링된 숙주 세포는 추가로 하기 중 하나 이상을 발현한다 :

[0253]

GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드,

[0254]

ManII 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 또는

[0255]

GaIT 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드. 바람직한 구현예에서, 숙주 세포는 GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 발현한다. 다른 바람직한 구현예에서, 숙주 세포는 GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드뿐만 아니라 ManII 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 발현한다. 더욱 다른 바람직한 구현예에서, GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드는 골지 거주 폴리펩티드의 골지 위치화 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드이다. 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명의 개질된 ABM의, GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 발현하는 숙주 세포에서의 발현은 증가된 Fc 수용체 결합 친화성 및 증가된 효과기 기능을 갖는 개질된 ABM을 제공한다. 따라서, 한 구현예에서, 본 발명은 (a) GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 서열을 포함하는 단리된 핵산; 및 (b) 인간 CD20에 결합하는 키메라, 영장류화된 또는 인간화된 항체와 같은 본 발명의 ABM을 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다. 바람직한 구현예에서, GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드는 GnTIII의 촉매 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드이고, 골지 위치화 도메인은 만노시다제 II의 위치화 도메인이다. 그러한 융합 폴리펩티드의 제조 방법 및 증가된 효

과기 기능을 갖는 항체의 제조에 이를 사용하는 방법은 그 전체가 본원에 참조로써 삽입된 미국 Provisional Pat. Appl. No. 60/495,142 및 미국 특허 출원 공개 번호 2004/0241817에 개시되어 있다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 키메라 ABM은 젖과 B-Ly1 항체의 결합 특이성을 갖는 키메라 항체 또는 그의 절편이다. 특히 바람직한 구현예에서, 키메라 항체는 인간 Fc를 포함한다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 항체는 영장류화된 또는 인간화된 것이다.

[0256]

한 구현예에서, 본 발명의 ABM을 암호화하는 하나 또는 다수의 폴리뉴클레오티드는 지속적 프로모터 또는 대안적으로는 조절된 발현 시스템의 조절 하에 발현될 수 있다. 적합한 조절된 발현 시스템에는 테트라사이클린-조절된 발현 시스템, 엑디손-유도성 발현 시스템, 락(lac)-스위치 발현 시스템, 글로코코르티코이드-유도성 발현 시스템, 온도-유도성 프로모터 시스템, 및 메탈로티오네인 금속-유도성 발현 시스템이 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 ABM을 암호화하는 여러 상이한 핵산이 숙주 세포 시스템 내에 포함된다면, 이들 중 일부는 지속적 프로모터의 조절 하에 발현될 수 있고, 한편 다른 것들은 조절된 프로모터의 조절 하에 발현된다. 최대 발현 수준은 세포 성장률에 유의한 역효과를 갖지 않는 안정한 폴리펩티드 발현의 최고 가능한 수준으로 간주되고, 일반 실험을 사용하여 측정될 것이다. 발현 수준은 ABM에 특이적인 항체 또는 ABM에 융합된 펩티드 태그에 특이적인 항체를 사용한 웨스턴 블로트 분석; 및 노던 블로트 분석을 포함하여 당업계에 일반적으로 알려진 방법에 의해 측정된다. 추가의 대안에서, 폴리뉴클레오티드는 리포터 유전자에 조작적으로 연결될 수 있고; 모 항체의 동일한 결합 특이성을 실질적으로 갖는 개질된 ABM의 발현 수준을 리포터 유전자의 발현 수준과 관련된 신호를 측정하여 측정한다. 리포터 유전자는 단일 mRNA 분자로서 상기 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산(들)과 함께 전사될 수 있고; 그의 각각의 코딩 서열은 내부 리보솜 도입 부위 (IRES) 또는 캡-비의존성 번역 인핸서 (CITE)에 의해 연결될 수 있다. 리포터 유전자는 모 항체의 동일한 결합 특이성을 실질적으로 갖는 개질된 ABM을 암호화하는 하나 이상의 핵산과 함께 번역될 수 있어서, 단일 폴리펩티드 사슬이 형성된다. 본 발명의 ABM을 암호화하는 핵산은 단일 프로모터의 조절 하에 리포터 유전자에 조작적으로 연결될 수 있어서, 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 및 리포터 유전자는 2개의 개별 전령 RNA (mRNA) 분자로 대안적으로 나뉘어지는 RNA 분자로 전사되고; 생성 mRNA 중 하나는 상기 리포터 단백질로 번역되고, 나머지 다른 하나는 상기 융합 폴리펩티드로 번역된다.

[0257]

### 개질된 ABM의 발현

[0258]

당업자에게 잘 알려진 방법은 적절한 전사/번역 조절 신호와 함께 모 항체의 동일한 결합 특이성을 실질적으로 갖는 개질된 ABM의 코딩 서열을 함유하는 발현 벡터를 구축하는데 사용될 수 있다. 이러한 방법은 시험관내 재조합 DNA 기술, 합성 기술 및 생체 내 재조합/유전 재조합을 포함한다. 예를 들어, [Maniatis 등, MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. (1989)] 및 [Ausubel 등, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y (1989)]에 기재된 기술을 참조한다.

[0259]

다양한 숙주-발현 벡터 시스템은 본 발명의 ABM의 코딩 서열을 발현하도록 사용될 수 있다. 바람직하게는, 포유류 세포는 흥미있는 단백질의 코딩 서열 및 융합 폴리펩티드의 코딩 서열을 함유하는 재조합 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 트랜스펙션되는 숙주 세포 시스템이다. 가장 바람직하게는, CHO 세포, HEK293-EBNA 세포, BHK 세포, NSO 세포, SP2/0 세포, YO 골수종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포 또는 하이브리도마 세포, 기타 포유류 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 또는 식물 세포가 숙주 세포 시스템으로서 사용된다. 발현 시스템 및 선별 방법의 일부 예는 하기 참조문헌에 기술되어 있다: [Borth 등, Biotechnol. Bioen. 71(4):266-73 (2000-2001)], [Werner 등, Arzneimittelforschung/Drug Res. 48(8):870-80 (1998)], [Andersen and Krummen, Curr. Op. Biotechnol. 13:117-123 (2002)], [Chadd and Chamow, Curr. Op. Biotechnol. 12:188-194 (2001)], 및 [Giddings, Curr. Op. Biotechnol. 12: 450-454 (2001)]. 대안적인 구현예에서, 다른 진핵숙주 세포 시스템이 고려될 수 있는데, 미국 특허 출원 제 60/344,169 호 및 WO 03/056914에서 교시된 발현 시스템과 같은 (비-인간 진핵 숙주 세포에서 인간-형 당단백질을 제조하는 방법) (그 전체가 참조로써 본원에 삽입됨) 본 발명의 ABM의 코딩 서열을 함유하는 재조합 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모 세포; 모 항체의 동일한 결합 특이성을 실질적으로 갖는 개질된 ABM의 코딩 서열을 함유하는, 재조합 바이러스 발현 벡터 (예를 들어, 바큘로바이러스)로 감염된 곤충 세포 시스템; 재조합 바이러스 발현 벡터 (예를 들어, 꽃양배추 모자이크병 바이러스, CaMV; 담배 모자이크병 바이러스, TMV)로 감염되거나, 또는 미국 특허 제 6,815,184 호 (유전적으로 엔지니어링된 개구리밥으로부터 생물학적 활성 폴리펩티드를 발현 및 분비하는 방법), WO 2004/057002 (선태류 식물 세포에서 글리코실 트랜스퍼라제 유전자의 도입에 의해 글리코실화된 단백질을 제조하는 방법) 및 WO 2004/024927 (이끼 원형질체에서의 세포외 이종 비-식물

단백질의 제조 방법) 및 미국 특허 출원 제 60/365,769 호, 제 60/368,047 호, 및 WO 2003/078614 (기능성 포유류 GnTIII 효소를 포함하는 유전자도입 식물에서의 당단백질 처리) (각 내용이 그 전체가 본원에 참조로써 삽입됨)에 교시된 발현 시스템을 포함하나 이에 제한되지 않는 본 발명의 ABM 의 코딩 서열을 함유하는 재조합 플라스미드 발현 벡터 (예를 들어, Ti 플라스미드)로 형질전환된 식물 세포 시스템 ; 또는 이중-미세 염색체 (예를 들어, 젖과 세포주)에서 안정적으로 증폭되거나 (CHO/dhfr) 또는 불안정하게 증폭되는 모 항체의 동일한 결합 특이성을 실질적으로 갖는 개질된 ABM 을 암호화하는 DNA 의 복사본을 여러 개 함유하도록 엔지니어링된 세포주를 포함하여 재조합 바이러스 발현 벡터 (예를 들어, 아데노바이러스, 백시니아바이러스)로 감염된 동물 세포 시스템이 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 한 구현예에서, 본 발명의 ABM 을 암호화하는 폴리뉴클레오티드(들)를 포함하는 벡터는 폴리시스트론성이다. 또한, 한 구현예에서, 상기 논의된 ABM 은 항체 또는 그의 절편이다. 바람직한 구현예에서, ABM 은 인간화된 항체이다.

[0260]

본 발명의 방법을 위해, 안정한 발현은 일반적으로 일시적인 발현에 바람직한데, 그 이유는 그것이 더욱 재현 가능한 결과를 달성하게 하고 또한 대규모 생산에 더욱 용이하기 때문이다. 복제 바이러스 기원을 함유하는 발현 벡터를 사용하는 것보다는, 숙주 세포는 적절한 발현 조절 원소 (예를 들어, 프로모터, 인핸서, 서열, 전사 종료자, 폴리아데닐화 부위 등)에 의해 조절되는 각각의 코딩 핵산, 및 선택성 마커로 형질전환될 수 있다.

외부 DNA 의 도입 후, 엔지니어링된 세포는 풍부한 배지 내에서 1 ~ 2 일 동안 성장하도록 방치될 수 있고, 그런 다음 선별 배지로 옮겨진다. 재조합 플라스미드 내 선택성 마커는 선별에 대한 저항성을 부여하고, 플라스미드를 그의 염색체에 안정하게 혼입한 세포의 선별을 가능하게 하고, 성장해서 클로닝되고 세포주로 확장될 수 있는 포키 (foci) 를 형성하게 한다.

[0261]

각각 tk-, hgprt- 또는 aprt- 세포에서 적용될 수 있는 헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제 (Wigler 등, 세포 11:223 (1977)), 하이폭산틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제 (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sd. USA 48:2026 (1962)), 및 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제 (Lowy 등, Cell 22:817 (1980)) 유전자를 포함하나 이에 제한되지 않은 많은 선별 시스템이 사용될 수 있다. 또한, 항대사물질 저항성은 메토트렉세이트에 대한 저항성을 부여하는 dhfr (Wigler 등, Natl Acad. Sci. USA 77:3567 (1989) ; O'Hare 등, Proc. Natl. Acad. Sci USA 78: 1527 (1981)); 마이코페놀산에 대한 저항성을 부여하는 gpt (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci USA 78:2072 (1981)) ; 아미노글리코시드 G-418 에 대한 저항성을 부여하는 neo (Colberre-Garapin 등, J. Mol. Biol. 150:1 (1981)) ; 및 하이그로마이신에 대한 저항성을 부여하는 hygro 유전자 (Santerre 등, Gene 30:147 (1984) 에 대한 선별의 기준으로서 사용될 수 있다. 최근, 세포가 트립토판 대신에 인돌을 사용하게 하는 trpB ; 세포가 히스티딘 대신에 히스티놀을 사용하게 하는 hisD (Hartman & Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:8047 (1988)) ; 글루타민 합성효소 시스템 ; 및 오르니틴 탈탄소효소 억제제인 2-(디플루오로메틸)-DL-오르니틴, DEMO 에 대한 저항성을 부여하는 ODC (오르니틴 탈탄소효소) (McConlogue, in: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed. (1987)) 로서 추가의 선별 유전자가 기술되었다.

[0262]

#### 변형된 글리코실화가 있는 Fc 영역을 포함하는 개질된 ABM 의 발현

[0263]

또다른 측면에서, 본 발명은 추가로, 본 발명의 개질된 ABM 을 암호화하는 핵산 및 GnTIII 활성을 가진 폴리펩티드를 암호화하는 핵산, 또는 그러한 핵산을 포함하는 벡터를 상기 숙주 세포에서 발현시키는 것을 포함하는, 숙주 세포에 의해 생성된 V 또는 CH1 영역에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 개질된 ABM 의 글리코실화 프로파일을 개질시키는 방법에 관한 것이다. 바람직하게는, 개질된 폴리펩티드는 IgG 또는 Fc 영역을 포함하는 그의 절편이다. 특히 바람직한 구현예에서, ABM 은 인간화된 항체 또는 그의 절편이다. 또다른 구현예에서, 숙주 세포는 본 발명의 ABM, GnTIII 및 만노시다제 II (ManII) 를 공동발현하도록 엔지니어링된다.

[0264]

본 발명의 숙주 세포에 의해 생성된 개질된 ABM 은 개질 결과, 증가된 Fc 수용체 결합 친화성 및/또는 증가된 효과기 기능을 나타낸다. 특히 바람직한 구현예에서, 개질된 ABM 은 인간화된 항체 또는 Fc 영역을 함유하는 그의 절편이다. 바람직하게는, 증가된 Fc 수용체 결합 친화성은 Fc $\gamma$ RIIIa 수용체와 같은 Fc $\gamma$  활성화 수용체에의 증가된 결합이다. 증가된 효과기 기능은 바람직하게는 하기 중 하나 이상의 증가이다 : 항체-의존성 세포의 세포독성 증가, 항체-의존성 세포의 식균작용 (ADCP) 증가, 사이토카인 분비 증가, 항원-제시 세포에 의한 면역-복합체-매개 항원 습득 증가, Fc-매개 세포의 세포독성 증가, NK 세포에의 결합 증가, 대식세포에의 결합 증가, 다핵성 세포 (PMN) 에의 결합 증가, 단핵구에의 결합 증가, 표적-결합된 항체의 가교 증가, 직접 신호 유도성 세포자멸사 증가, 수지상 세포 성숙화 증가, 및 T 세포 프라이밍 증가.

[0265]

효과기 기능은 당업자에게 알려진 다양한 어세이에 의해 측정 및/또는 결정될 수 있다. Fc 수용체 결합 친

화성 및 보체 의존성 세포독성과 같은 효과기 기능을 측정하는 다양한 어세이는 그 전체가 본원에 참조로써 삽입된 미국 특허 출원 공개 번호 2004/0241817A1 에 기술되어 있다. 사이토카인 분비는 예를 들어, 샌드위치 ELISA 를 사용하여 측정될 수 있으며, 예를 들어, [McRae 등, *J. Immunol.* 164: 23-28 (2000)] 및 [www.bdbiosciences.com/pharmingen/protocols](http://www.bdbiosciences.com/pharmingen/protocols) 에서 이용가능한 사이토카인 샌드위치 ELISA 프로토콜을 참조하거나, 또는 [Takahashi 등, *British J. Pharmacol.* 137: 315-322 (2002)] 에서 기술된 방법에 의해 측정될 수 있으며, 이를 각각은 그 전체가 본원에 참조로써 삽입되어 있다. 수지상 세포 성숙화는 예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로써 삽입된 [Kalergis and Ravetch, *J. Exp. Med.* 195: 1653-59 (2002)] 에 의해 나타내어진 어세이를 사용해 결정될 수 있다. 식균작용 및 항원 습득/제시 어세이의 예는 그 전체가 본원에 참조로써 삽입된 [Gresham 등, *J. Exp. Med.* 191: 515-28 (2000)] ; [Krauss 등, *J. Immunol.* 153: 1769-77 (1994); wX Rafiq 등, *J. Clin. Invest.* 110: 71-79 (2002)] 및 [Hamano 등, *J. Immunol.* 164: 6113-19 (2000)] 에 의해 제공된다. 세포-표면 수용체의 하향조절은 예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로써 삽입된 [Liao 등, *Blood* 83: 2294-2304 (1994)] 에서 나타낸 방법에 의해 결정될 수 있다. 일반적인 방법, 프로토콜 및 어세이는 그 전체가 본원에 참조로써 삽입된 [CELL BIOLOGY : A LABORATORY HANDBOOK, Celis, J.E., ed., (2d ed., 1998)] 에서 찾을 수 있다. 당업자는 상기-참조된 방법, 프로토콜 및 어세이를 본 발명에 사용되도록 채택할 것이다.

[0266] 본 발명은 또한, 하기를 포함하는, 숙주 세포에 본 발명의 개질된 올리고사카라이드를 갖는 본 발명의 ABM 의 제조 방법에 관한 것이다 :

[0267] (a) 본 발명에 따른 ABM 의 제조를 허용하는 조건 하에, GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 핵산을 발현하도록 엔지니어링된 숙주 세포를 배양하고, 여기서 상기 GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드는 상기 숙주 세포에 의해 생성되는 상기 ABM 의 Fc 영역 내에서 올리고사카라이드를 개질시키기에 충분한 양으로 발현됨 ; 및

[0268] (b) 상기 ABM 을 단리함. 바람직한 구현예에서, GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드는 GnTIII 의 촉매 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드이다. 특히 바람직한 구현예에서, 융합 폴리펩티드는 추가로 골지 거주 폴리펩티드의 골지 위치화 도메인을 포함한다.

[0269] 바람직하게는, 골지 위치화 도메인은 만노시다제 II 또는 GnTI 의 위치화 도메인이다. 대안적으로, 골지 위치화 도메인은 : 만노시다제 I 의 위치화 도메인, GnTII 의 위치화 도메인, 및  $\alpha$ 1-6 코어 푸코실트랜스퍼제의 위치화 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본 발명의 방법에 의해 제조되는 ABM 은 증가된 Fc 수용체 결합 친화성 및/또는 증가된 효과기 기능을 갖는다. 바람직하게는, 증가된 효과기 기능은 하기 중 하나 이상이다 : Fc-매개 세포의 세포독성 (항체-의존성 세포의 세포독성 증가 포함) 증가, 항체-의존성 세포의 식균작용 (ADCP) 증가, 사이토카인 분비 증가, 항원-제시 세포에 의한 면역-복합체-매개 항원 습득 증가, NK 세포에의 결합 증가, 대식세포에의 결합 증가, 다핵성 세포 (PMN) 에의 결합 증가, 단핵구에의 결합 증가, 직접 신호 유도성 세포자멸사 증가, 표적-결합된 항체의 가교 증가, 수지상 세포 성숙화 증가, 및 T 세포 프라이밍 증가. 증가된 Fc 수용체 결합 친화성은 바람직하게는 Fc  $\gamma$ RIIIa 와 같은 Fc 활성화 수용체에의 증가된 결합이다. 특히 바람직한 구현예에서, ABM 은 인간화된 항체 또는 그의 절편이다.

[0270] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 상기 폴리펩티드의 Fc 영역 내에 증가된 비율의 양분된 올리고사카라이드를 갖는, 본 발명의 방법에 의해 제조되는 모 항체의 동일한 결합 특이성을 실질적으로 갖는 개질된 ABM 에 관한 것이다. 그러한 ABM 이 항체 및 Fc 영역을 포함하는 그의 절편을 포함하는 것으로 생각된다. 바람직한 구현예에서, ABM 은 인간화된 항체이다. 한 구현예에서, ABM 의 Fc 영역 내 양분된 올리고사카라이드의 % 는 총 올리고사카라이드의 50% 이상, 더욱 바람직하게는 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상 또는 90% 이상, 및 가장 바람직하게는 90 ~ 95% 이상이다. 더욱 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법에 의해 제조되는 ABM 은 본 발명의 방법에 의한 그의 올리고사카라이드의 개질 결과, Fc 영역 내에 증가된 비율의 비푸코실화된 올리고사카라이드를 갖는다. 한 구현예에서, 비푸코실화된 올리고사카라이드의 % 는 50% 이상, 바람직하게는 60% 내지 70% 이상, 가장 바람직하게는 75% 이상이다. 비푸코실화된 올리고사카라이드는 하이브리드 또는 복합체 유형일 수 있다. 특히 바람직한 구현예에서, 숙주 세포 및 본 발명의 방법에 의해 제조되는 ABM 은 증가된 비율의, 양분된, 비푸코실화된 올리고사카라이드를 Fc 영역에 갖는다. 양분된, 비푸코실화된 올리고사카라이드는 하이브리드 또는 복합체일 수 있다. 구체적으로는, 본 발명의 방법은 ABM 의 Fc 영역 내 올리고사카라이드 중 15% 이상, 더욱 바람직하게는 20% 이상, 더욱 바람직하게는 25% 이상, 더욱 바람직하게는 30% 이상, 더욱 바람직하게는 35% 이상이 양분된, 비푸코실화된 ABM 을 제조하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 방법은 또한, 폴리펩티드의 Fc 영역 내 올리고사카라이드 중 15% 이상, 더욱 바람직하게는 20% 이상, 더욱 바람직하게

는 25% 이상, 더욱 바람직하게는 30% 이상, 더욱 바람직하게는 35% 이상이 양분된 하이브리드 비푸코실화된 폴리펩티드를 제조하는데 사용될 수 있다.

[0271] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 방법에 의해 제조된, 증가된 효과기 기능 및/또는 증가된 Fc 수용체 결합 친화성을 갖도록 엔지니어링된 모 항체의 동일한 결합 특이성을 실질적으로 갖는 개질된 ABM에 관한 것이다. 바람직하게는, 증가된 효과기 기능은 하기 중 하나 이상이다 : Fc-매개 세포의 세포독성 (항체-의존성 세포의 세포독성 증가) 증가, 항체-의존성 세포의 식균작용 (ADCP) 증가, 사이토카인 분비 증가, 항원-제시 세포에 의한 면역-복합체-매개 항원 습득 증가, NK 세포에의 결합 증가, 대식세포에의 결합 증가, 단핵구에의 결합 증가, 다핵성 세포 (PMN)에의 결합 증가, 직접 신호 유도성 세포자멸사 증가, 표적-결합된 항체의 가교 증가, 수지상 세포 성숙화 증가, 및 T 세포 프라이밍 증가. 바람직한 구현예에서, 증가된 Fc 수용체 결합 친화성은 Fc 활성화 수용체, 가장 바람직하게는 Fc $\gamma$ RIIIa에의 증가된 결합이다. 한 구현예에서, 개질된 ABM은 항체, Fc 영역을 함유하는 항체 절편, 또는 면역글로불린의 Fc 영역에 상응하는 영역을 포함하는 융합 단백질이다. 특히 바람직한 구현예에서, ABM은 인간화된 항체이다.

#### 개질된 ABM을 포함하는 약학적 조성물

[0273] 본 발명은 추가로, 본 발명의 개질된 ABM 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0274] 임의의 통상의 담체 물질이 사용될 수 있다. 담체 물질은 에테랄 (eternal), 경피 또는 비경구 투여용에 적합한 유기 또는 무기일 수 있다. 적합한 담체는 물, 젤라틴, 겹 아라빅, 락토스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 탈크, 식물유, 폴리알킬렌-글리콜, 석유 젤리 등을 포함한다. 더욱이, 약학적 제제는 기타 약학적 활성화제를 함유할 수 있다. 풍미제, 안정화제, 에멀젼화제, 완충제 등과 같은 추가의 첨가제가 약학적 화합물화의 허용된 실행에 따라 첨가될 수 있다.

[0275] 구 "약학적으로 허용가능한"은 타당한 이익/위험비가 균형잡힌, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 기타 문제 또는 합병증 없이 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용되기에 적합한, 사운드 의료 판단의 범주 내에 있는 화합물, 물질, 조성물, 및/또는 투여 형태를 말할 때 본원에 적용된다.

[0276] 본 발명은 추가로, 암 치료 또는 예방용의 그러한 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 추가로, 치료적 유효량의 본 발명의 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 암 치료 또는 예방 방법에 관한 것이다.

[0277] 바람직하게는, 암은 유방암, 방광암, 두경부암, 피부암, 췌장암, 폐암, 난소암, 결장암, 전립선암, 신장암, 및 뇌암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0278] 본 발명은 추가로, 전암성 상태 또는 종상의 치료 또는 예방에 사용되는 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 추가로, 치료적 유효량의 본 발명의 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 전암성 상태 또는 종상의 치료 또는 예방 방법에 관한 것이다.

[0279] 바람직하게는, 전암성 상태 또는 종상은 구강 백반증, 광선 각화증 (일광 각화증), 결장 또는 직장의 전암성 용종, 위 상피성 이형성증, 선종성 이형성증, 유전성 비용종증 결장암 증후군 (HNPPC), 바렛 식도, 방광 이형성증, 및 전암성 자궁경부 상태로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0280] 본 발명은 추가로, 증가된 Fc 수용체 결합 친화성, 바람직하게는 증가된 Fc 활성화 수용체에의 결합, 및/또는 항체-의존성 세포의 세포독성을 포함하여 증가된 효과기 기능을 가진, 본 발명의 개질된 ABM이 당형의 제조를 위한 숙주 세포 시스템의 제조 및 사용 방법을 제공한다. 본 발명의 개질된 ABM으로 사용될 수 있는 글리코엔지니어링 방법은 그 전체가 본원에 참조로써 삽입된 미국 특허 제 6,602,684 호 및 Provisional U.S. Patent Application No. 60/441,307 및 WO 2004/065540에 더욱 상세히 나타나 있다. 본 발명의 개질된 ABM은 대안적으로는, 그 전체가 본원에 참조로써 삽입된 EP 1 176 195 A1에서 개시된 기술에 따라 Fc 영역 내에 감소된 푸코스 잔기를 갖도록 엔지니어링될 수 있다.

#### 변형된 글리코실화 패턴을 가진 개질된 ABM의 생성을 위한 세포주 생성

[0282] 본 발명은 개질된 글리코실화 패턴을 갖는 본 발명의 개질된 ABM의 생성을 위한 숙주 세포 발현 시스템을 제공한다. 특히, 본 발명은 향상된 치료가치를 가진 본 발명의 개질된 ABM의 당형의 생성을 위한 숙주 세포 시스템을 제공한다. 따라서, 본 발명은 GnTIII 활성을 가진 폴리펩티드를 발현하도록 선별 또는 엔지니어링된 숙주 세포 발현 시스템을 제공한다. 한 구현예에서, GnTIII 활성을 가진 폴리펩티드는 이종 골지 거주 폴리펩티드의 골지 위치화 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드이다. 구체적으로는, 그러한 숙주 세포 발현 시스

템은 구조성 또는 조절된 프로모터 시스템에 조작적으로 연결된, GnTIII 을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 재조합 핵산 분자를 포함하도록 엔지니어링될 수 있다.

[0283] 한 구체적인 구현예에서, 본 발명은 GnTIII 활성을 가지고 이종 골지 거주 폴리펩티드의 골지 위치화 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 핵산을 발현하도록 엔지니어링된 숙주 세포를 제공한다.

한 측면에서, 숙주 세포는 GnTIII 활성을 가지고 이종 골지 거주 폴리펩티드의 골지 위치화 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 유전자를 포함하는 핵산 분자로 엔지니어링된다.

[0284] 일반적으로, 상기 논의된 세포주를 포함하여 임의의 배양 세포주는 본 발명의 숙주 세포주를 엔지니어링하기 위한 배경으로서 사용될 수 있다. 바람직한 구현예에서, CHO 세포, BHK 세포, NSO 세포, SP2/0 세포, YO 골수 종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포 또는 하이브리도마 세포, 기타 포유류 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 또는 식물 세포는 본 발명의 엔지니어링된 숙주 세포를 생성하는데 있어서 배경 세포주로서 사용된다.

[0285] 본 발명은 본원에 정의된 이종 골지 거주 폴리펩티드의 골지 위치화 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드를 포함하여, GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 발현하는 엔지니어링된 숙주 세포를 포함하는 것으로 생각된다.

[0286] GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 하나 또는 다수의 핵산은 지속적 프로모터 또는 대안적으로 발현 시스템의 조절 하에 발현될 수 있다. 상기 시스템은 당업계에 잘 알려져 있고, 상기 기술된 시스템을 포함한다. GnTIII 활성을 갖고 이종 골지 거주 폴리펩티드의 골지 위치화 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드를 암호화하는 여러 상이한 핵산이 숙주 세포 시스템에 포함된다면, 이들 중 일부는 지속적 프로모터의 조절 하에 발현될 수 있는 한편, 나머지 다른 것들은 조절된 프로모터의 조절 하에 발현된다. GnTIII 활성을 가진 융합 폴리펩티드의 발현 수준은 웨스턴 블롯 분석, 노던 블롯 분석, 리포터 유전자 발현 분석 또는 GnTIII 활성의 측정을 포함하여, 당업계에 일반적으로 알려진 방법에 의해 측정된다. 대안적으로, 텍틴은 GnTIII, 예를 들어, E4-PHA 텍틴의 생합성 생성물에 결합하도록 적용될 수 있다. 대안적으로, GnTIII 활성을 가진 폴리펩티드를 암호화하는 핵산으로 엔지니어링된 세포에 의해 생성되는 항체에 의해 매개되는 증가된 Fc 수용체 결합 또는 증가된 효과기 기능을 측정하는 기능성 어세이가 사용될 수 있다.

[0287] **개질된 글리코실화 패턴을 가진 단백질을 발현하는 세포감염물 (Transfектант) 또는 형질전환체의 규명**

[0288] 본 발명의 개질된 ABM 의 코딩 서열을 함유하고 생물학적 활성 유전자 생성물을 발현하는 숙주 세포를 4 가지 일반적인 접근법에 의해 규명할 수 있다 :

[0289] (a) DNA-DNA 또는 DNA-RNA 혼성화 ;

[0290] (b) "마커" 유전자 기능의 존재 또는 부재 ;

[0291] (c) 숙주 세포 내 각각의 mRNA 전사체의 발현에 의해 측정되는 전사 수준의 평가 ; 및

[0292] (d) 면역어세이 또는 그의 생물학적 활성에 의해 측정된 유전자 생성물의 검출.

[0293] 제 1 접근법에서, 본 발명의 개질된 ABM 의 코딩 서열 및 GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드의 코딩 서열의 존재는 각각의 코딩 서열, 개별적으로 또는 그의 부분 또는 유도체에 상동성인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 프로브를 사용하여, DNA-DNA 또는 DNA-RNA 혼성화에 의해 측정될 수 있다.

[0294] 제 2 접근법에서, 재조합 발현 벡터/숙주 시스템은 특정 "마커" 유전자 기능 (예를 들어, 티미딘 키나아제 활성, 항생제에 대한 저항성, 메토트렉세이트에 대한 저항성, 형질전환 표현형, 바콜로바이러스 내 폐색체 형성 등)의 존재 또는 부재를 바탕으로 규명 및 선별될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 개질된 ABM 또는 그의 절편의 코딩 서열, 및 GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드의 코딩 서열이 벡터의 마커 유전자 서열 내에 삽입된다면, 각각의 코딩 서열을 함유하는 재조합은 마커 유전자 기능의 부재에 의해 규명될 수 있다. 대안적으로, 마커 유전자는 코딩 서열의 발현을 조절하는데 사용되는 동일 또는 상이한 프로모터의 조절 하에 코딩 서열과 함께 위치될 수 있다. 유도 또는 선별에 반응하는 마커의 발현은 본 발명의 개질된 ABM 의 코딩 서열 및 GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드의 코딩 서열의 발현을 지시한다.

[0295] 제 3 접근법에서, 본 발명의 개질된 ABM, 또는 그의 절편의 코딩 서열, 및 GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드의 코딩 서열을 위한 전사 활성을 혼성화 어세이에 의해 평가할 수 있다. 예를 들어, RNA 는 본 발명의 개질된 ABM, 또는 그의 절편의 코딩 서열, 및 GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드 또는 그의 특정 부분의 코딩 서열에 상동성인 프로브를 사용하여 노던 블롯에 의해 단리 및 분석될 수 있다. 대안적으로, 숙주 세포의 총 핵산은 상

기 프로브에의 혼성화를 위해 추출 및 어세이될 수 있다.

[0296] 제 4 접근법에서, 단백질 생성물의 발현은 예를 들어 웨스턴 블로트, 면역방사선-침전과 같은 면역어세이, 효소-연결 면역어세이 등에 의해 면역학적으로 평가될 수 있다. 그러나, 발현 시스템의 성공에 대한 궁극적인 테스트는 생물학적 활성 유전자 생성물의 검출을 포함한다.

[0297] **항체-의존성 세포의 세포독성을 포함하여 증가된 효과기 기능을 가진 개질된 ABM 의 생성 및 용도**

[0298] 바람직한 구현예에서, 본 발명은 젖과 B-Ly1 항체의 동일한 결합 특이성을 실질적으로 가지고 항체-의존성 세포의 세포독성을 포함하여 증가된 효과기 기능을 가진 키메라 개질된 ABM 의 당형을 제공한다. 항체의 글리코실화 엔지니어링은 이미 기술되었다. 예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로써 삽입된 미국 특허 제 6,602,684 호를 참조한다.

[0299] 일부 유형의 암의 치료를 위한 비컨쥬케이션 모노클로날 항체 (mAb) 의 임상적 시도는 최근 유망한 결과를 제공하였다 (Dillman, Cancer Biother. & Radiopharm. 12:223-25 (1997); Deo 등, Immunology Today 18:127 (1997)). 키메라, 비컨쥬케이션 IgG1 은 저등급 또는 여포성 B-세포 비-호지킨스 림프종에 승인되었고 (Dillman, Cancer Biother. & Radiopharm. 12:223-25 (1997)), 한편 고형 유방 종양을 표적화하는 인간화된 IgG1 인 또다른 비컨쥬케이션 mAb 또한 임상 III 기 시도에서 유망한 결과를 보여주고 있다 (Deo 등, Immunology Today 18:127 (1997)). 이러한 2 가지 mAb 의 항원은 그의 개별 종양 세포에서 고도로 발현되고, 항체는 시험관 내 및 생체 내에서 효과기 세포에 의한 강력한 종양 파괴를 매개한다. 반대로, 양호한 종양 특이성을 가진 많은 다른 비컨쥬케이션 mAb 는 임상적으로 유용한 충분한 잠재력의 효과기 기능을 유도할 수 없다 (Frost 등, Cancer 80:317-33 (1997); Surfus 등, J. Immunother. 19:184-91 (1996)). 이러한 더 약한 mAb 중 일부를 위해서, 부가의 사이토카인 치료법이 현재 테스트되고 있다. 사이토카인의 첨가는 순환 림프구의 활성 및 수를 증가시킴으로써 항체-의존성 세포의 세포독성 (ADCC) 을 자극시킬 수 있다 (Frost 등, Cancer 80:317-33 (1997); Surfus 등, J. Immunother. 19:184-91 (1996)). 항체-표적화된 세포에 대한 용해성 공격인 ADCC 는 항체의 불변 영역 (Fc) 에 림프구 수용체가 결합했을 때 유도된다 (Deo 등, Immunology Today 18: 127 (1997)).

[0300] 비컨쥬케이션 IgG1 의 ADCC 활성을 증가시키는 상이한, 그러나 상보적인 접근법은 항체의 Fc 영역을 엔지니어링 하는 것이다. 단백질 엔지니어링 연구는 Fc γ R 가 IgG CH2 도메인의 하위 힌지 영역과 상호작용하는 것을 보여준다 (Lund 등, J. Immunol. 157:4963-69 (1996)). 그러나, Fc γ R 결합은 또한 CH2 영역의 보존된 Asn 297 에 공유 부착된 올리고사카라이드의 존재를 필요로 하며 (Lund 등, J. Immunol. 157:4963-69 (1996); Wright and Morrison, Trends Biotech. 15:26-31 (1997)), 이는 올리고사카라이드 및 폴리펩티드 둘 다가 상호작용 부위에 직접 기여하거나 또는 올리고사카라이드가 활성 CH2 폴리펩티드 형성을 유지하는데 필요하다는 것을 제안한다. 따라서, 올리고사카라이드 구조의 개질은 상호작용의 친화성을 증가시키는 수단으로서 사용될 수 있다.

[0301] IgG 분자는 그의 Fc 영역에서, 각각의 중쇄 상에서 하나씩, 2 개의 N-연결 올리고사카라이드를 운반한다. 임의의 당단백질로서, 항체는 동일한 폴리펩티드 골격을 공유하나, 글리코실화 부위에 부착된 상이한 올리고사카라이드를 가진 당형의 군으로서 생성된다. 정상적으로는 혈청 IgG 의 Fc 영역에서 발견되는 올리고사카라이드는 복합체 바이-안테나리 (bi-antennary) 유형 (Wormald 등, Biochemistry 5(5):130-38 (1997) 으로서, 말단 시알산 및 양분화 N-아세틸글루코스아민 (GlcNAc) 의 수준이 낮고, 다양한 정도의 말단 갈락토실화 및 코어 푸코실화가 있다. 일부 연구는, Fc γ R 결합에 필요한 최소한의 탄수화물 구조가 올리고사카라이드 코어 내에 놓여 있다고 한다 (Lund 등, J. Immunol. 75:4963-69 (1996)).

[0302] 비컨쥬케이션 치료성 mAb 의 제조를 위해 산업 및 학계에서 사용되는 마우스- 또는 햄스터-유래 세포주는 정상적으로는 필요한 올리고사카라이드 결정소를 Fc 부위에 부착한다. 그러나, 이러한 세포주에서 발현되는 IgG 은 혈청 IgG 에서 소량으로 발견되는 양분화 GlcNAc 가 없다 (Lifely 등, Glycobiology 375:813-22 (1995)). 반대로, 최근, 래트 골수종-생성, 인간화된 IgG1 (CAMPATH-1H) 이 그의 당형의 일부에서 양분화 GlcNAc 를 운반한다는 것이 관찰되었다 (Lifely 등, Glycobiology 375:813-22 (1995)). 래트 세포-유래 항체는 표준 세포주에서 생성되는 CAMPATH-1H 항체와 시험관 내 ADCC 활성이 유사한 최대값에 도달하였으나, 유의하게 더 낮은 항체 농도에서 상기 값에 도달하였다.

[0303] CAMPATH 항원은 정상적으로는 림프종 세포 상에 높은 수준으로 존재하고, 이러한 키메라 mAb 는 양분화 GlcNAc 의 부재 하에 높은 ADCC 활성을 가진다 (Lifely 등, Glycobiology 375:813-22 (1995)). N-연결 글리코실화

경로에서, 양분화 G1cNAc 는 GnTIII 에 의해 첨가된다 (Schachter, Biochem. 세포 Biol. 54:163-81 (1986)).

[0304] 이전의 연구는 상이한 수준의, 클로닝된 GnIII 유전자 효소를 외부-조절된 방식으로 발현하도록 이미 엔지니어링된 단일 항체-생성 CHO 세포주를 사용하였다 (Umana, P., 등, Nature Biotechnol. 77:176-180 (1999)). 상기 접근법은, 처음에 GnTIII 의 발현 및 개질된 항체의 ADCC 활성 사이의 염격한 연관을 구축하였다. 따라서, 본 발명은 증가된 GnTIII 활성으로 인한 변형된 글리코실화를 가진, 젖파 B-Ly1 항체의 결합 특이성을 가진 재조합, 키메라 항체 또는 그의 절편을 고려한다. 증가된 GnTIII 활성은 개질된 ABM 의 Fc 영역에서 양분된 올리고사카라이드의 % 의 증가뿐만 아니라, 푸코스 잔기의 % 의 감소를 초래한다. 이러한 항체 또는 그의 절편은 증가된 Fc 수용체 결합 친화성 및 증가된 효과기 기능을 가진다. 또한, 본 발명은 면역글로불린의 Fc 영역에 상응하는 영역을 포함하는 항체 절편 및 융합 단백질에 관한 것이다.

#### [0305] 본 발명의 방법에 따른 개질된 ABM 의 치료 적용

[0306] 광범위하게는, 본 발명의 개질된 ABM 은 생체 내 또는 시험관 내에서 표적 항원을 발현하는 표적 세포에 사용될 수 있으며, 특히, 여기서 상기 표적 항원은 세포 표면상에 발현된다. 표적 항원을 발현하는 세포는 진단 또는 치료 목적을 표적으로 할 수 있다. 한 측면에서, 본 발명의 개질된 ABM 은 표적 항원을 발현하는 세포에서 세포 신호 활성을 변경하는데 사용될 수 있다. 또 다른 측면에서, 본 발명의 개질된 ABM 은 하나 이상의 표적 항원의 가교 및/또는 올리고머화를 변경하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 개질된 ABM 의 표적 항원은 CD20, CD21, CD22, CD19, CD47, CD99, CD2, CD45, HER1 (EGFR), Her2/neu, Her3, Her4, TRAIL 수용체 (예를 들어, TRAILR1, TRAILR2), TNFR, FGF 수용체 (예를 들어, FGFR1), IGF 수용체, PDGF 수용체, VEGF 수용체, 및 기타 세포-표면 관련 수용체를 포함하나 이에 제한되지 않는 세포 표면 수용체일 수 있다. 특별한 구현예에서, 표적 항원은 CD20 이다. 본 발명의 개질된 ABM 은 또한, 세포 주기를 억제시키고, 표적 세포 (예를 들어, 종양 세포) 의 세포자멸사를 야기하고, 혈관신생을 억제시키고/거나 또는 표적 세포의 분화를 야기하도록 작용한다.

[0307] 또 다른 측면에서, 본 발명은 치료적 유효량의 본 발명의 개질된 ABM 을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 포함하는, 표적 항원의 변형된 세포 신호 활성 및/또는 하나 이상의 표적-항원의 가교를 매개하는 변형된 능력에 의해 치료 가능한 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다. 구체적인 구현예에서, 개질된 ABM 은 항체이다. 더욱 구체적인 구현예에서, 항체는 인간화된 것이다. 개질된 ABM 이 투여될 수 있는 질환의 예에는 세포 증식 질환 또는 장애, 자가면역 질환 또는 장애, 및 박테리아 또는 바이러스 감염 관련 질환 또는 장애가 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0308] 한 구현예에서, 질환 또는 장애는 세포 증식 장애이다. 본 발명의 ABM 에 의해 치료될 수 있는 세포 증식 장애의 예에는, 복부, 뼈, 유방, 소화계, 간, 췌장, 복막, 내분비샘 (부신, 부갑상선, 뇌하수체, 고환, 난소, 흉선, 갑상선), 눈, 두경부, 신경계 (중추 및 말초), 림프계, 콜반, 피부, 연조직, 비장, 흉부 영역, 및 비뇨 생식기계에 위치한 신생물, 암, 악성종양 및/또는 종양이 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 ABM 으로 치료될 수 있는 특별한 신생물, 암, 악성종양 및/또는 종양에는, 외피 및 편평 세포암종, 신경교종, 췌장암, 난소암, 전립선암, 유방암, 방광암, 두경부암, 신세포암종, 결장암, 직장암, 폐암, 뇌종양, 악성 흑색종, 백혈병, 림프종, T 세포 림프종, 다발성 골수종, 위암, 자궁경부암, 자궁내막암, 식도암, 간암, 피부암, 요로암종, 용모막암종, 인두암, 후두암, 테코마토시스 (thecomatosis), 남성모세포종, 자궁내막 증식증, 자궁내막증, 배아종, 섬유육종, 카포시 육종, 혈관종, 해면상 혈관종, 혈관모세포종, 망막모세포종, 성상세포종, 신경섬유종, 희소돌기아교세포종, 수모세포종, 신경절신경모세포종, 신경교종, 횡문근육종, 골육종, 평활근육종, 갑상선 육종, 에빙 (Ewing's) 육종, 및 월름 종양 (Wilms tumor) 이 포함되나, 이에 제한되지 않는다.

[0309] 유사하게는, 기타 세포 증식 장애 또한 본 발명의 개질된 ABM 으로 치료될 수 있다. 그러한 세포 증식 장애의 예에는, 상기 열거된 기관계에 위치한 신조직형성 외에도, 고감마글로불린혈증, 림프구증식 장애, 이상단백 혈증, 자반증, 사코이드증, 세자리 (Sezary) 증후군, 왈덴스트롬 거대글로불린혈증 (Waldenstron's Macroglobulinemia), 고체 (Gaucher's) 질환, 조직구증식증, 및 기타 세포 증식 질환이 포함되나 이에 제한되지 않는다.

[0310] 자가면역 질환 또는 장애의 예에는, 면역-매개 저혈소판증, 예컨대 급성 특발성 자혈소판성 자반증 및 만성 특발성 저혈소판성 자반증, 피부근육염, 시든햄 무도증, 루프스 신장염, 류마티스염, 다분비선 증후군, 해노호센 라인자반증, 연쇄구균감염후 신장염, 결절홍반, 타카야수 동맥염, 에디슨병, 다형홍반, 결절다발동맥염, 강지척 추염, 굿파스처증후군, 폐쇄성 혈전혈관염, 원발쓸개관간경화증, 하시모토 갑상선염, 갑상샘증독증, 만성활동간

염, 다발근육염/피부근육염, 다발연골염, 보통천포창(*pamphigus vulgaris*), 베게너육아종증, 막성콩팥병증, 근육위축가족경화증, 척수매독, 다발근육통증, 악성빈혈, 급성진행사구체신염 및 섬유성 폐포염, 염증성 반응, 예컨대 건선 및 피부염 (예를 들면, 아토피 피부염)을 포함하는 염증성 피부 질환; 전신피부경화증 및 경화증; 염증성창자병과 연관된 반응 (예컨대, 크론병 및 궤양대장염); 호흡곤란증후군 (성인성 호흡곤란증후군; ARDS 포함); 피부염; 수막염; 뇌염; 포도막염; 대장염; 사구체신염; 알레르기성 상태, 예컨대 습진 및 천식 및 T 세포의 침윤 및 만성 염증 반응을 포함하는 기타 상태; 죽상동맥경화증; 백혈구부착결핍증; 류마티스관절염; 전신홍반루푸스 (SLE); 당뇨병 (예를 들면, 유형 1 당뇨병 또는 인슐린 의존성 당뇨병); 다발 경화증; 레이나우드 증후군(Reynaud's syndrome); 자기면역성 갑상샘염; 알레르기성 뇌척수염; 쇼그렌 증후군; 연소자형 당뇨병; 및 전형적으로 결핵, 사코이드증, 다발근육염, 육아종증 및 혈관염에서 발견되는 사이토카인 및 T-림프구에 의해 매개되는 급성 및 지연형 과민형 연관 면역 반응; 악성빈혈 (에디슨병); 백혈구누출(leukocyte diapedesis)을 포함하는 질환; 중추신경계 (CNS) 염증 장애; 다발성 장기 손상 증후군; 용혈빈혈 (이에 한정되지는 않지만, 크라이오글로빈혈증(cryoglobulinemia) 또는 쿰스 양성 빈혈(Coombs positive anemia) 포함); 중증근육무력증; 항원-항체 복합 매개 질환; 항-사구체 기저막 질환; 항인지질증후군; 알레르기성 신경염; 그레이브스병; 람버트-이튼 근무력증증후군; 유천포창; 천포창; 자기면역 다발성 내분비장애증(autoimmune polyendocrinopathies); 라이터병; 근육강직 증후군; 베체트병; 거세포동맥염; 면역 복합 신장염; 면역글로불린에이 신장병증; IgM 다발신경병증; 면역혈소판감소자색판(ITP) 또는 자가면역 저혈소판증 등이 포함되나, 이에 제한되지 않는다.

[0311]

본 발명의 개질된 ABM은 단독으로, 또는 세포 신호 활성 및/또는 하나 이상의 표적 항원의 가교를 증가 또는 감소시킴으로써 치료가능한 장애를 치료하는 기타 치료법 또는 치료제와 병용해서 사용될 수 있다. 한 구현 예에서, 본 발명의 개질된 ABM은 생체 내에서 종양 세포를 표적화하고 살해하는데 단독으로 사용될 수 있다.

개질된 ABM은 또한, 인간 암종을 치료하는 적절한 치료제와 함께 사용될 수 있다. 예를 들어, 개질된 ABM은 치료제를 암종 부위로 전달하기 위해, 화학치료법, 방사선치료법과 같은 표준 또는 통상적인 치료 방법과 함께 사용되거나, 치료 약물, 또는 독소, 및 램포카인 또는 종양-억제 성장 인자에 콘쥬게이션되거나 결합될 수 있다. 본 발명의 개질된 ABM의 콘쥬게이트 중에는 (1) 면역독소 (개질된 ABM 및 세포독성 부분의 콘쥬게이트) 및 (2) 표지된 (예를 들어, 동위원소표지, 효소-표지 또는 형광염색-표지) 개질된 ABM이 포함되며, 여기서 표지은 표지된 ABM을 포함하는 면역 복합체를 확인하기 위한 방법을 제공한다. 개질된 ABM은 또한 천연 보체 과정을 통해 파쇄를 유도하고, 일반적으로 존재하는 항체 의존성 세포독성 세포와 상호작용하기 위해 사용될 수 있다.

[0312]

면역독소의 세포독성 부분은 세포독성 약물 또는 박테리아 또는 식물 원천의 효소 활성 독소, 또는 그러한 독소의 효소 활성 단편 ("A 쇄")일 수 있다. 사용되는 효소 활성 독소 및 그의 단편은 디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 쇄 (수도모나스 아루지노사 (*Pseudomonas aeruginosa*)로부터의), 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 알루라이츠 포르디 (*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 파이토라카 아메리카나 (*Phytolacca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 차란티아 억제제, 커르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 (*sapaonaria officinalis*) 억제제, 젤로닌, 미토젤린, 레스토릭토신, 페노마이신, 및 에노마이신이다. 또다른 구현 예에서는, 개질된 ABM이 소분자 항암 약물에 콘쥬게이션된다. 개질된 ABM 및 그러한 세포독성 부분의 콘쥬게이트는 다양한 2기능의 단백질 결합제를 사용하여 제조된다. 이러한 시약의 예는 SPDP, IT, 디메틸 아디피미레이트 HCl과 같은 이미도에스테르의 2기능 유도체, 디설���니미딜 수베레이트와 같은 활성 에스테르, 글루타르알데하이드와 같은 알데하이드, 비스(p-아지도벤조일)헥산디아민과 같은 비스-아지도 화합물, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민과 같은 비스-디아조늄 유도체, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트와 같은 디이소시아네이트, 및 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠과 같은 비스-활성 플루오린 화합물이다. 독소의 용해 부분은 개질된 ABM의 Fab 단편에 결합시킬 수 있다. 부가적인 적합한 독소는, 예를 들어 여기에 그대로 참조로서 포함된, 미국 특허 출원 제 2002/0128448 호에 공개된 바와 같이, 당업계에 잘 알려져 있다.

[0313]

한 구현 예에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 방사선표지 또는 독소와 같은 추가의 부분에 콘쥬게이션된다. 상기 콘쥬게이션된 개질된 ABM은 당업계에 잘 공지된 다수의 방법에 의해 생성될 수 있다.

[0314]

다양한 방사선핵종이 본 발명에 적용되며, 당업자는 다수의 상황 하에 어떤 방사선핵종이 가장 적당한지 용이하게 결정하는 능력을 갖는다. 예를 들어, <sup>131</sup>요오드가 표적 면역치료법에 대해 사용되는 잘 공지된 방사선핵종이다. 그러나, <sup>131</sup>요오드의 임상적인 유용성은 하기를 포함하는 다수의 인자에 의해 제한될 수 있다: 8 일 간의 물리적 반감기; 혈액 및 종양 부위 모두에서의 요오드화 항체의 탈활로겐화; 및 종양에 적용된 국소적용

투여량에 대한 차선이 될 수 있는 발광 특징 (예를 들어, 대형 감마 성분). 월등한 킬레이트화제의 출현으로, 단백질에 금속 킬레이트기를 부착하는 기회가, <sup>111</sup>인듐 및 <sup>90</sup>이트륨과 같은 기타 방사선핵종을 사용하는 기회를 증가시켰다. <sup>90</sup>이트륨은 방사 면역치료 적용에서의 용도에 대한 다수의 장점을 제공한다: <sup>90</sup>이트륨의 64시간 반감기는 종양에 의한 항체 축적을 허용하기 위해 충분히 길고, <sup>131</sup>요오드는 달리 <sup>90</sup>이트륨은 100 내지 1,000 세포 적경의 조직의 범위에서 그의 불괴시 감마 방사를 동반하지 않는 고에너지의 순수한 베타 방출자이다. 더욱이, 최소 방사선 침투량은 <sup>90</sup>이트륨-표지 항체의 외래환자에 대한 투여를 가능하게 한다. 추가로, 표지된 항체의 내재화 (internalization)는 세포 살해에 필요하지 않으며, 이온화된 방사선의 국소적인 방출은 표적 항원이 결핍된 근접한 종양 세포에 대해 치명적이 될 것이다.

[0315] 본 발명의 <sup>90</sup>이트륨 표지 개질된 ABM의 유효한 단독 치료 투여량 (즉, 치료적 유효량)은 약 5 내지 약 75 mCi, 더욱 바람직하게는 약 10 내지 약 40 mCi의 범위이다. <sup>131</sup>요오드 표지 개질된 ABM의 유효한 단독 치료 비-골수 제거 (ablative) 투여량은 약 5 내지 약 70 mCi, 더욱 바람직하게는 약 5 내지 약 40 mCi의 범위이다.

<sup>131</sup>요오드 표지 개질된 ABM 항체의 유효한 단독 치료 제거 투여량 (즉, 동종 골수 이식을 필요로 할 수 있음)은 약 30 내지 약 600 mCi, 더욱 바람직하게는 약 50 내지 약 500 mCi 미만의 범위이다. 본 발명에 따른 키메라성 항체와 함께, 마주한 (vis-a-vis) 쥐과동물 항체의 더 긴 순환 반감기로 인해, <sup>131</sup>요오드 표지 키메라 항체의 유효한 단독 치료 비-골수 제거 투여량은 약 5 내지 약 40 mCi, 더욱 바람직하게는 약 30 mCi 미만이다.

예를 들어, <sup>111</sup>인듐 표지에 대한 조영 기준은 일반적으로 약 5 mCi 미만이다.

[0316] 본 발명의 방사선표지 항체에 대하여, 본원에서의 치료법은 또한 단독 요법 치료 또는 다중 치료를 사용하여 수행될 수 있다. 방사선험종 성분 때문에, 치료에 앞서 말초 출기 세포 ("PSC") 또는 골수 ("BM")가 방사선 조사로 인한 잠재적으로 치명적인 골수 독성을 겪는 환자를 위해 "수합" 되는 것이 바람직하다. BM 및/또는 PSC는 표준 기술을 사용하여 수합된 후, 일소되고, 재주입 가능하도록 동결된다. 추가로, 치료 전에 환자에 대한 진단 표지 항체 (예를 들어, <sup>111</sup>인듐)를 사용한 진단 약량 측정 연구가 수행되는 것이 가장 바람직한데, 그의 목적은 치료 표지 항체 (예를 들어, <sup>90</sup>이트륨)가 임의의 정상적인 장기 또는 조직에 불필요하게 "농축" 되지 않음을 확인하기 위한 것이다.

[0317] 하나의 구현예에서는, 본 발명의 키메라 글리코엔지니어링된 개질된 ABM이 리신 A 쇄에 컨쥬케이션된다. 가장 유리하게는, 리신 A 쇄는 재조합 방법을 통해 탈글리코실화되고 제조된다. 리신 면역독소를 제조하는 유리한 방법은 여기에 참조로서 포함된, [Vitetta *et al.*, *Science* 238, 1098 (1987)]에 기술되어 있다.

[0318] 진단 목적을 위해 인간 암 세포를 죽이기 위해 사용되는 경우, 컨쥬케이트는 전형적으로 약 10 nM의 농도로 세포 배양 배지에 첨가될 것이다. 시험관내 용도를 위한 제형 및 투여 방법은 결정적이지 않다. 일반적으로 배양물 또는 관류 배지와 친화성인 수성 제형이 사용될 것이다. 세포독성은 통상적인 기법으로 읽어 암의 존재 또는 정도를 측정한다.

[0319] 상기에 기술된 바와 같이, 암을 치료하기 위한 세포독성 방사성약제는 방사성 동위원소 (예를 들어, I, Y, Pr)를 본 발명의 키메라 글리코엔지니어링되고/거나 또는 개질된 ABM에 컨쥬케이션시켜 제조할 수 있다. 여기에 사용된 용어 "세포독성 부분"은 상기 동위원소를 포함하는 것을 의미한다.

[0320] 또 다른 구현예에서는, 리포좀은 세포독성 약물로 충전되어 있고, 그 리포좀은 본 발명의 ABM으로 코팅되어 있다. 본 발명의 개질된 ABM에 대한 많은 표적 분자가 세포 표면 상에 발현되기 (예를 들어, 악성 B-세포의 표면 상에 다수의 CD20 분자가 있음) 때문에, 이러한 방법은 정확한 세포 유형에, 다양한 약물 전달을 허용한다.

[0321] 상기 치료제를 항체에 컨쥬케이션시키기 위한 기법은 잘 알려져 있다 (예를 들어, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp.623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); and Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates",

*Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982) 참조).

[0322]

본 발명의 ABM 을 위한 또 다른 치료 적용은, 예를 들어, 재조합 DNA 기법에 의한, 약물전구체를 세포독성 약물로 전환시킬 수 있는 효소로의 컨쥬게이션 또는 결합, 및 그러한 항체-효소 컨쥬게이트를 약물전구체와 함께 사용하여, 그 약물전구체를 종양 부위에서 세포독성 제제로 전환시키는 것을 포함한다 (예를 들어, Senter et al., "Anti-Tumor Effects of Antibody-alkaline Phosphatase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4842-46 (1988); "Enhancement of the in vitro and in vivo Antitumor Activities of Phosphorylated Mitocycin C and Etoposide Derivatives by Monoclonal Antibody-Alkaline Phosphatase Conjugates", *Cancer Research* 49:5789-5792 (1989); and Senter, "Activation of Prodrugs by Antibody-Enzyme Conjugates: A New Approach to Cancer Therapy," *FASEB J.* 4:188-193 (1990) 참조).

[0323]

본 발명의 ABM 의 또다른 치료 용도는 암 환자의 골수로부터 종양 세포를 제거하기 위해, 보체의 존재 하에서 비컨쥬게이션되어, 또는 항체-약물 또는 항체-독소 컨쥬게이트의 일부로서 사용하는 것을 포함한다. 이러한 방법에 따라, 자가 골수가 항체로의 처리에 의해 생체외로 제거되고, 골수가 환자에 다시 주입될 수 있다 [예를 들어, Ramsay et al., "Bone Marrow Purgung Using Monoclonal Antibodies", *J. Clin. Immunol.*, 8(2):81-88 (1988) 참조].

[0324]

추가로, 본 발명은 모 항체 (예를 들어, 설치류 B-Ly1 항체의 CDR 을 함유하는 폴리펩티드) 와 실질적으로 동일한 결합 특이성을 허용하는 항체 결합 도메인을 포함하고, 추가로 독소 폴리펩티드를 포함하는 단쇄 면역독소를 포함한다. 본 발명의 단쇄 면역독소는 인간 암종을 생체내에서 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0325]

마찬가지로, 항-종양 활성, 예컨대 럼포카인 또는 온코스타틴을 가진 제 2 의 단백질 중 하나 이상의 관능활성 부분에 연결된 본 발명의 ABM 의 항체-결합 영역을 하나 이상 포함하는 융합 단백질이 사용되어 생체내 인간 암종을 치료할 수 있다.

[0326]

본 발명은 CD20, Her1 (EGFR), Her2/neu, Her3, Her4, TRAIL 수용체 (예를 들어, TRAILR1, TRAILR2), TNFR, FGF 수용체 (예를 들어, FGFR1), IGF 수용체, PDGF 수용체, VEGF 수용체, 및 기타 세포-표면 관련 수용체를 포함하나 이에 제한되지 않는 세포 표면 수용체를 발현하는 종양 세포를 선택적으로 살해하는 방법을 제공한다.

본 방법은 본 발명의 개질된 ABM (컨쥬게이션된, 예를 들어, 면역독소와 같은, 또는 비컨쥬게이션) 을 상기 종양 세포와 반응시키는 것을 포함한다. 상기 종양 세포는 인간 암종의 것일 수 있다.

[0327]

추가로, 본 발명은 생체 내에서 암종 (예를 들어, 인간 암종) 을 치료하는 방법을 제공한다. 본 방법은 본 발명의 개질된 ABM (컨쥬게이션된, 예를 들어, 면역독소와 같은, 또는 비컨쥬게이션된) 중 하나 이상을 함유하는, 약학적 유효량의 조성물을 개체에 투여하는 것을 포함한다.

[0328]

추가의 측면에서, 본 발명은 치료적 유효량의 본 발명의 ABM 을 이를 필요로 하는 인간 개체에 투여하는 것을 포함하는 B-세포 제거를 바탕으로 한, B-세포 럼프종을 포함하여 B-세포 증식 장애, 뿐만 아니라 병원성 자가항체에 의해 전체 또는 부분적으로 발생된 자가면역질환의 향상된 치료 방법에 관한 것이다. 바람직한 구현예에서, ABM 은 젖과 B-Ly1 항체의 것과 실질적으로 동일한 결합 특이성을 가진 글리코엔지니어링된 항-CD20 항체이다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 항체는 인간화된 것이다. 본 발명의 상기 국면에서, 본 발명의 ABM 은 연장 기간 동안 정상 B-세포의 혈류를 제거하는데 사용된다.

[0329]

본 발명의 실시에 의하면, 대상체는 인간, 말, 돼지, 소, 설치류, 갯과 동물, 고양잇과 동물, 및 조류 대상체일 수 있다. 기타 온혈 동물이 또한 본 발명에 포함된다.

[0330]

본 발명은 추가로 인간 종양 세포의 성장 저해, 대상체 내 종양 치료, 및 대상체 내 증식 유형의 질환 치료 방법을 제공한다. 상기 방법은 대상체에 유효량의 본 발명의 조성물을 투여하는 것을 포함한다.

[0331]

한 구현예에서, 본 발명은 암, 전암성 상태 또는 증상, 또는 자가면역 장애 치료 또는 예방에 사용될 본 발명에 따른 ABM 에 관한 것이다. 더욱 또다른 구현예에서, 본 발명은 암, 전암성 상태 또는 증상, 또는 자가면역 장애 치료 또는 예방용 약제로서 사용될 본 발명에 따른 ABM 에 관한 것이다. 암에는 예를 들어, B-세포 럼프종, 폐암, 비소세포폐(NSCL)암, 기관지폐포세포 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안와내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 항문 부위암, 위암, 소화기암, 결장암, 유방암, 자궁암, 난관암종, 자궁내막암 종, 경부암종, 질암종, 호지킨스 질환, 식도암, 소장암, 내분비계암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 방광암, 신장 또는 요로암, 신세포암, 신우암종, 중피종, 간세포암, 담즙암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구성 림프종, 중추신경계 (CNS) 신생물종, 척수종양 (spinal axis tumor), 뇌간 신경 교종, 다형성 교모세포종, 성상세포종, 슈반세포종, 뇌실막세포종, 수막종, 편평세포암종, 뇌하수

체 선종, 상기 암 중의 난치성 암, 또는 상기 암 중 하나 이상의 조합이 포함된다. 전암성 상태 또는 증상에는, 예를 들어, 구강 백반증, 광선 각화증 (일광 각화증), 결장 또는 직장의 전암성 용종, 위 상피성 이형성증, 선종성 이형성증, 유전성 비용종증 결장암 증후군 (HNPCC), 바렛 식도, 방광 이형성증, 및 전암성 자궁경부 상태로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 포함된다.

[0332] 바람직하게는, 암은 B-세포 림프종, 유방암, 방광암, 두경부암, 피부암, 췌장암, 폐암, 난소암, 결장암, 전립선암, 신장암, 및 뇌암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 자가면역 장애의 예는 상기 제공된다.

[0333] 더욱 또다른 구현예는 암 치료 또는 예방, 또는 전암성 상태 또는 증상의 치료 또는 예방용 약제의 제조를 위한 본 발명에 따른 ABM의 사용이다. 암 및 전암성 상태 또는 증상은 상기 기술된다.

[0334] 따라서, 본 발명에는 약학 조성물, 조합물 및 인간 암종의 치료 방법이 포함되는 것이 자명하다. 예를 들면, 본 발명에는 약제학적 유효량의 본 발명의 항체 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 인간 암종 치료 용도의 약학 조성물이 포함된다.

[0335] 본 발명의 ABM 조성물은 이에 한정되지는 않지만, 정맥내 투여, 복막내 투여, 경구투여, 림프액내 (intralymphatic) 투여 또는 종양으로의 직접 투여를 포함하는 종래의 투여 방식을 사용해 투여될 수 있다. 정맥내 투여가 바람직하다.

[0336] 본 발명의 한 측면에서, 본 발명의 ABM을 함유하는 치료학적 제형물은 감압하에 동결건조된 제형물 또는 수용액의 형태로, 임의적으로는 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정제와 원하는 정도의 순도를 가진 항체를 혼합함으로써 저장하기 위해 제조된다 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A.Ed. (1980)). 활용된 투여량 및 농도로의 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정제는 수혈자에게 비독성이고, 하기를 포함한다: 완충용액, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 기타 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보호제 (예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤잘코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 폐놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥사놀; 3-펜타놀; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10 미만 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐파리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신; 단당류, 이당류, 및, 글루코오스, 만노오스, 또는 텍스트린을 포함하는 기타 탄수화물; 킬레이트제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로오스, 만니톨, 트레할로오스 또는 소르비톨; 염형성 반대 이온, 예컨대 나트륨; 금속 착물(예를 들면, Zn-단백질 착물); 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONIC<sup>TM</sup> 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG).

[0337] 실례의 항-CD20 ABM 제형물은 WO98/56418에 기재되어 있고, 이는 본원에서 참고로써 포함되어 있다. 상기 문헌은 2-8°C에서 2년 저장의 최소 저장수명을 가진 pH 5.0의 0.02% 폴리소르베이트 20, 40 mg/ml 리툭시마브, 25 mM 아세테이트, 150 mM 트레할로오스, 0.9% 벤질 알코올을 포함하는 액형 다중투여(multidose) 제형물을 기재했다. 또다른 관심있는 항-CD20 제형물에는 pH 6.5의 주사용 멸균수, 9.0 mg/ml 염화나트륨 내 10 mg/ml 리툭시마브, 7.35 mg/ml 나트륨 시트레이트 디하이드레이트 및 0.7 mg/ml 폴리소르베이트 80이 포함된다. 본 발명에서, 리툭시마브는 발명의 개질된 ABM으로 대체될 것이다.

[0338] 피하 투여용으로 적당한 감압하에서 동결건조된 제형물은 WO97/04801에 기재되어 있다. 상기 감압하에서 동결건조된 제형물은 적합한 화석제로 고 단백질 농도로 재구성될 수 있고, 재구성된 제형물은 본원에서 치료될 포유동물에 피하 투여될 수 있다.

[0339] 또한 본원에서 제형물은 치료될 특정 지시에 필수적인 하나 이상의 활성 화합물, 바람직하게는 서로 부작용을 일으키지 않는 보완적인 활성을 가진 것을 함유할 수 있다. 예를 들면, 추가로 세포독성제, 화학요법제, 사이토카인 또는 면역억제제(예를 들면, T 세포상에 작용하는 것, 예컨대 시클로스포린 또는 T 세포에 결합하는 항체, 예컨대 LFA-1를 결합하는 것)를 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 유효량의 상기 기타 작용제는 제형물 내에 존재하는 안타고니스트의 양, 질환 또는 장애 또는 치료 유형 및 상기에서 논의되는 기타 인자에 좌우된다. 상기는 일반적으로 동일 투여량 및 이하에 사용된 바와 같은 투여 경로로 사용되거나 또는 약 1내지 99%의 이전까지 활용된 투여량으로 사용된다.

[0340] 활성 성분은 또한 예컨대 코르아세르베이션 기술 또는 계면 중합으로써, 제조된 마이크로캡슐, 예컨대 각각 콜로이드성 약물전달계(예컨대, 리포좀, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀젼, 나노 입자 및 나노캡슐) 또는 매크로에멀젼내의 히드록시메틸셀룰로오스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐로 들어갈 수 있다. 상기 기술은 Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed.

(1980)에 개시된다.

[0341] 서방성 제제는 제조될 수 있다. 적합한 서방성 제제의 예에는 안타고니스트를 함유하는 고형 소수성 중합체의 반투성 기질이 포함되며, 여기서 기질은 모양지어진 성형품, 예컨대, 필름 또는 마이크로캡슐 형태이다.

서방성 기질의 예에는 하기가 포함된다: 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들면, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트), 또는 폴리(비닐알코올)), 폴리락티드 (U.S. 특허 제 3,773,919 호), L-글루타민산 및 γ-에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비분해가능성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해가능성 락트산-글리콜산 공중합체, 예컨대 LUPRON DEPOT™ (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 이루어진 주사가능한 마이크로스피어), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산.

[0342] 생체내 투여에 사용될 제형물은 멸균되어야 한다. 이것은 멸균 여과막을 통해 여과함으로써 용이하게 성취된다.

[0343] 본 발명의 조성물은 이에 제한되지는 않지만 하기를 포함하는 각종 투약 형태일 수 있다: 액형 용액 또는 혼탁물, 정제, 환약, 분말, 좌제 중합체성 마이크로캡슐 또는 마이크로소낭, 리포좀 및 주사가능한 또는 불용해성 용액. 바람직한 형태는 투여 양태 및 치료학적 적용에 좌우된다.

[0344] 본 발명의 조성물은 또한 바람직하게 종래의 약학적으로 허용가능한 담체 및 당기술에 공지된 보조물, 예컨대 인간 혈청 알부민, 이온 교환제, 알루미나, 레시틴, 완충 물질, 예컨대 포스페이트, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트 및 염 또는 전해물, 예컨대 프로타민 술페이트를 포함한다.

[0345] 가장 효과적인 본 발명의 약학 조성물 용의 투여 양태 및 투약 양생법은 질환의 격렬성 및 진행과정, 치료에 대한 환자의 건강 및 반응 및 치료 의사의 판단에 좌우된다. 따라서, 조성물의 투여량은 개인 환자에 맞게 적정되어야 한다. 그럼에도 불구하고 본 발명의 조성물의 유효 투여량은 일반적으로 약 0.01 내지 약 2000 mg/kg 일 것이다.

[0346] 본원에서 기재된 분자는 이에 제한되지 않으나 하기를 포함하는 각종 투약 형태일 수 있다: 액형 용액, 또는 혼탁물, 정제, 환약, 분말, 좌제, 중합체성 마이크로캡슐 또는 마이크로소낭, 리포좀, 및 주사가능한 또는 불용해성 용액. 바람직한 형태는 투여 양태 및 치료학적 적용에 좌우된다.

[0347] 본 발명의 투여량은 일부 경우, 예고성 생물마커의 사용에 의해 결정될 수 있다. 예고성 생물마커는 종양 관련 유전자 또는 단백질, 또는 종양-관련 신호 경로의 세포 성분의 발현 및/또는 활성화 패턴을 결정 (즉, 관찰 및/또는 정량화) 하는데 사용되는 문자 마커이다. 종양 조직 내 표적화된 치료의 생물학적 효과 및 이러한 효과와 임상 반응과의 상호작용을 해명하는 것은 종양에서 지배적인 성장 및 생존 경로를 규명하는데 도움을 주어서, 잘 반응하는 물질의 프로파일을 구축하고, 반대로 말하면 치료에 대한 내성을 극복하게 하는 전략을 디자인하는 근본원리를 제공한다. 예를 들어, 개질된 ABM 이 EGFR에 특이적인 항체라면, 항-EGFR 치료에 대한 생물마커는 Akt, RAS, RAF, MAPK, ERK1, ERK2, PKC, STAT3, STAT5를 포함하나 이에 제한되지 않는 세포 종식 장애를 초래하는 EGFR 하위 신호 경로에 있는 하나 이상의 분자를 포함할 수 있다 (Mitchell, Nature Biotech. 22: 363-364 (2004); Becker, Nature Biotech 22: 15-18 (2004); Tsao and Herbst, Signal 4: 4-9 (2003)). 항-EGFR 치료에 대한 생물마커는 또한 EGFR, ErbB-2 (HER2/neu), 및 ErbB-3 (HER3) 와 같은 성장 인자 수용체를 포함할 수 있고, 항-EGFR 치료에 대한 환자의 반응의 양성 또는 음성 예고자일 수 있다. 예를 들어, 성장 인자 수용체 ErbB-3 (HER3) 을 항-EGFR 항체 ABX-EGF에 대한 음성 예고성 생물마커로 결정하였다 (미국 특허 출원 공개 번호 2004/0132097 A1).

[0348] 예고성 생물마커는 면역조직화학법, 유세포분석법, 면역형광법, 캡쳐 및 검출 어세이, 및 역상 어세이, 및/또는 그 전체가 본원에 참조로써 삽입된 미국 특허 출원 공개 번호 2004/0132097 A1에서 나타낸 어세이를 포함하나 이에 제한되지 않는 당업계에 잘 알려진 세포성 어세이에 의해 측정될 수 있다. 항-EGFR 치료의 예고성 생물마커는 그 전체가 본원에 참조로써 삽입된 미국 특허 출원 공개 번호 2003/0190689 A1에 나타낸 기술에 따라 규명될 수 있다.

[0349] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은, 표적 항원 (예를 들어, 암)에 의한 변형 또는 이상조절된 세포 신호, 및/또는 하나 이상의 표적 항원의 가교 및/또는 올리고머화를 매개하는 변형된 능력과 관련된 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 이는: 변형 또는 이상조절된 세포 신호, 및/또는 하나 이상의 표적 항원의 가교 및/또는 올리고머화를 매개하는 변형된 능력과 관련된 장애에 대한 예고성 생물마커의 발현 및/또는 활성화를 검출하는, 하나 또는 다수의 시약으로 치료하기 전에, 인간 개체의 샘플을 어세이하여 치료가 필요한 인간 대상에서 개질된 ABM을 사용한 치료 시의 반응을 예상하고; 예고성 생물마커의 하나 이상의 발현 및/또는 활성화 패턴을 결정하고

(여기서, 패턴은 개질된 ABM 치료에 대한 인간 개체의 반응을 예상함) ; 본 발명의 개질된 ABM 을 포함하는 치료적 유효량의 조성물을 개질된 ABM 치료에 대해 양성 반응하는 것으로 예상된 인간 개체에 투여하는 것을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 개질된 ABM 치료에 대해 양성 반응하는 것으로 예상된 인간 개체는 개질된 ABM 이 표적 항원 (예를 들어, 종양 억제/수축) 에 의한 변형 또는 이상조절된 세포 신호, 및/또는 하나 이상의 표적 항원의 가교 및/또는 올리고머화를 매개하는 변형된 능력과 관련된 질환 또는 장애에 상당한 효과를 가질 것이고, 개질된 ABM 치료의 이점이 부작용 (예를 들어, 독성) 에 의해 초과되지 않는 개체이다. 본원에 사용된 바와 같이, 샘플은 단일 기원 세포, 조직 또는 생검을 포함하여, 하나 이상의 세포를 포함하는, 개체, 특히 인간의 생물학적 샘플을 의미하며, 유방, 폐, 위장관로, 피부, 경부, 난소, 전립선, 신장, 뇌, 두경부, 또는 임의의 다른 생체 기관 또는 조직에서 제거한 것으로서, 스미어 (smear), 객혈, 분비물, 뇌척수액, 담즙, 혈액, 림프액, 소변 및 배설물을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0350] 본 발명의 개질된 ABM 을 포함하는 조성물은 양호한 의약 관행에 따른 방식으로 제형화, 조제 및 투여될 것이다. 본 문맥에서 고려해야 할 요소는 특히 치료될 질환 또는 장애, 특히 치료할 포유동물, 각 환자의 임상 상태, 질환 또는 장애의 원인, 작용제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄 및 의학 수행자에게 공지된 기타 인자가 포함된다. 투여될 치료학적 유효량의 안타고니스트는 상기 고려사항에 의해 통제받을 것이다.

[0351] 일반적인 제안으로서, 투여량 당 비경구적으로 투여된 항체의 치료학적 유효량의 범위는 1일당 약 0.1 내지 20 mg/kg 의 환자 체중이고, 사용된 안타고니스트의 전형적인 초기 범위는 약 2 내지 10 mg/kg 이다.

[0352] 또한 바람직하게는, 개질된 ABM 은 약 1.0 mg/kg 내지 약 15 mg/kg 의 치료적 유효량으로 사용된다.

[0353] 또한 바람직하게는, 개질된 ABM 은 약 1.5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg 의 치료적 유효량으로 사용된다.

[0354] 또한 바람직하게는, 개질된 ABM 은 약 1.5 mg/kg 내지 약 4.5 mg/kg 의 치료적 유효량으로 사용된다.

[0355] 또한 바람직하게는, 개질된 ABM 은 약 4.5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg 의 치료적 유효량으로 사용된다.

[0356] 또한 바람직하게는, 개질된 ABM 은 약 1.5 mg/kg 의 치료적 유효량으로 사용된다.

[0357] 또한 가장 바람직하게는, 개질된 ABM 은 약 4.5 mg/kg 의 치료적 유효량으로 사용된다.

[0358] 또한 가장 바람직하게는, 개질된 ABM 은 약 12 mg/kg 의 치료적 유효량으로 사용된다.

[0359] 바람직한 구현예에서, ABM 은 항체, 바람직하게는 인간화된 항체이다. 적합한 상기 비콘쥬게이션된 항체용 투여량의 범위는 예를 들면 약  $20 \text{ mg/m}^2$  내지 약  $1000 \text{ mg/m}^2$  이다. 한 구현예에서, 항체 투여량은 리툭시 마브용으로 현재 제안된 것과 상이하다. 예를 들면, 이는 환자에게 실질적으로  $375 \text{ mg/m}^2$  미만의 항체 하나 이상의 투여량으로 환자에게 투여할 수 있고, 여기서 예를 들면, 상기 투여량의 범위는 약  $20 \text{ mg/m}^2$  내지 약  $250 \text{ mg/m}^2$ , 예를 들면 약  $59 \text{ mg/m}^2$  내지 약  $200 \text{ mg/m}^2$  이다.

[0360] 더욱이, 이는 항체 하나 이상의 초기 투여량 후에 하나 이상의 후속적인 투여량으로 투여할 수 있고, 여기서 후속적인 투여량 내 항체의  $\text{mg/m}^2$  투여량은 초기 투여량내 항체  $\text{mg/m}^2$  투여량을 초과한다. 예를 들면, 초기 투여량의 범위는 약  $20 \text{ mg/m}^2$  내지 약  $250 \text{ mg/m}^2$  (예컨대 약  $50 \text{ mg/m}^2$  내지 약  $200 \text{ mg/m}^2$  )이고, 후속적인 투여량의 범위는 약  $250 \text{ mg/m}^2$  내지 약  $1000 \text{ mg/m}^2$  일 수 있다.

[0361] 그러나, 상기에 언급된 바와 같이, 상기 제안된 양의 개질된 ABM 은 치료학적 측면으로 매우 신중해야 한다. 적절한 투여량을 선별하고 계획하는데 있어서 주요 요소는 상기에서 언급된 바와 같이 수득된 결과이다. 예를 들면, 비교적으로 고 투여량은 진행중이고 급별성인 질환 치료용으로 처음에 요구될 수 있다. 가장 효능있는 결과를 수득하기 위해, 질환 또는 장애에 따라 안타고니스트는 첫번째 증상, 진단, 외형 또는 질환 또는 장애의 발생에 가능한 근처 또는 질환 또는 장애의 완화 동안에 투여된다.

[0362] 본 발명의 개질된 ABM 은 비경구, 피하, 복막내, 폐내 및 비강내, 국소 면역억제성 치료용으로 원하는 경우에는, 병변내 투여를 포함하는 임의의 적합한 수단으로써 투여된다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복막내 또는 피하 투여를 포함한다. 게다가, 안타고니스트는 맥박 주입, 예를 들면 안타고니스트의 투여량을 하락시키면서 적합하게 투여될 수 있다. 바람직하게는 투여는 주사, 가장 바람직하게는 부분

적으로 투여가 단기성 또는 만성인지에 대해 따라 정맥내 주사 또는 피하 주사로써 제공된다.

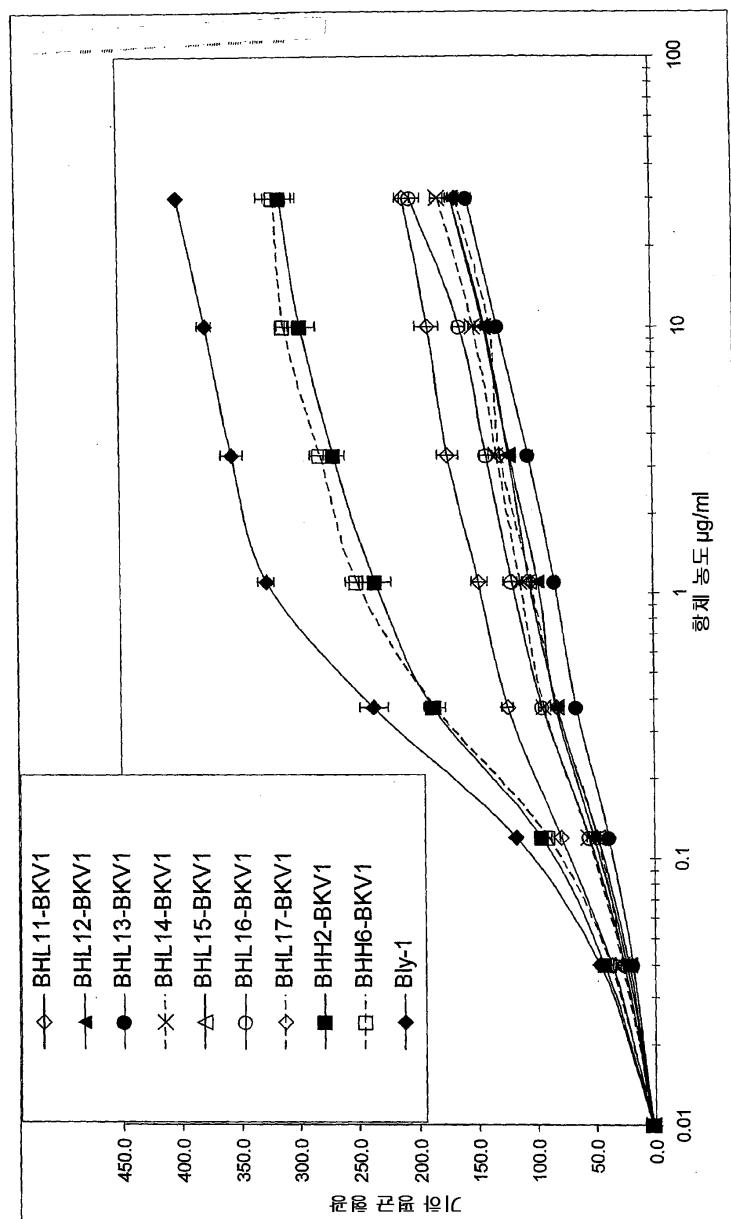
- [0363] 기타 화합물, 예컨대 본원에서 안타고니스트와 함께 사이토카인, 세포내 독성제, 화학요법제 및/또는 면역억제제와 같은 기타 화합물을 투여할 수 있다. 조합된 투여에는 분리된 제형물 또는 단일 약제학적 제형물 및 양쪽 각각의 순서로의 연속 투여를 사용한 공동투여가 포함되며, 여기서 바람직하게는 양자(또는 모두) 활성제가 동시에 그것의 생활성을 발휘하는 시간 기간이 있다.
- [0364] 치유를 달성하기 위해 요구되는 본 발명의 조성물의 투여량은 추가로 스케줄 최적화로 감소될 수 있음이 분명하다.
- [0365] 본 발명의 실시에 따라, 약제학적 담체는 지질 담체일 수 있다. 지질 담체는 인지질 일 수 있다. 추가로, 지질 담체는 지방산일 수 있다. 또한 지질 담체는 세제일 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 세제는 지질의 표면 장력을 변경, 일반적으로는 그것을 낮추는 임의의 물질이다.
- [0366] 본 발명의 한 실시예에서, 세제는 비이온성 세제일 수 있다. 비이온성 세제의 예에는 이에 한정되지는 않지만, 폴리소르베이트 80 (또한 Tween 80 또는 (폴리옥시에틸렌소르비탄 모노올레이트), Brij, 및 Triton (예를 들면 Triton WR-1339 및 Triton A-20)이 포함된다.
- [0367] 대안적으로, 세제는 이온성 세제일 수 있다. 이온성 세제의 예에는 이에 한정되지는 않지만 알킬트리메틸암모늄 브로마이드를 포함한다.
- [0368] 추가로, 본 발명에 따라, 지질 담체는 리포좀일 수 있다. 본 적용에서 사용된 바와 같이, "리포좀"은 본 발명의 임의 문자 또는 그의 조합물을 함유하는 소낭 결합의 임의의 막이다.
- [0369] 하기의 실시예는 본 발명을 더욱 자세히 설명한다. 하기의 제제 및 실시예는 당업자가 더 분명히 이해하고 본 발명을 실시할 수 있도록 제공된다. 본 발명은 그러나 실례가 되는 구현예에 의해 그 범위가 한정되지 않으며, 이는 본 발명의 단지 단일 국면의 설명으로써 의도된 것이며, 기능적으로 동등한 방법은 본 발명의 범위 내에 있다. 실제로, 본원에 기재된 것에 더하여 본 발명의 다양한 개정은 당업자에게는 상기의 설명 및 수반되는 도면으로부터 분명해질 것이다. 상기 개정은 첨가된 청구항의 범위 내에서 이르도록 의도된다.

도면

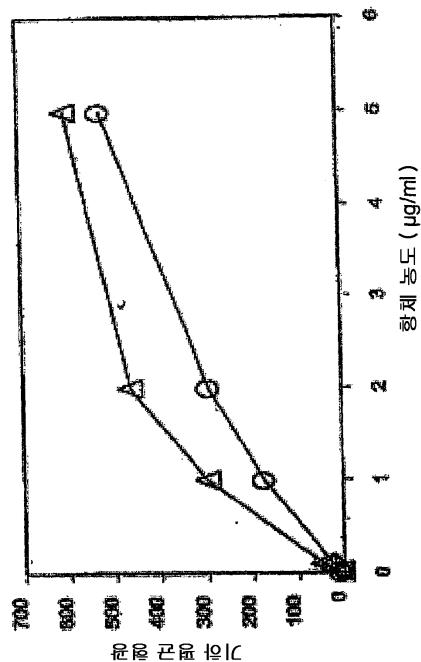
도면1

1F5-VH	1	QVOLRPGAEELVKPGASVSKMSCKASGYFTSYNMHWVQTPGQGLEWIGAIYPPNGDTSYNQKPKGKATL
B9E9-VH	1	Y S
C2B8-VH	1	Q S
2H7-VH	1	A S
B-1Y1-VH	1	E K
2F2-VH	1	E Q S
7D8-VH	1	E Q S
11B8-VH	1	E Q S
1F5-VH	71	TADKSSSTAYMOLSSITSEDAVYCCARS-HYGS-NYDVF-DYWGQGTLVTVST
B9E9-VH	71	A-QRD
C2B8-VH	71	DN
2H7-VH	71	Y
B-1Y1-VH	71	N
2F2-VH	71	YDQ
7D8-VH	71	YCN
11B8-VH	71	YCN

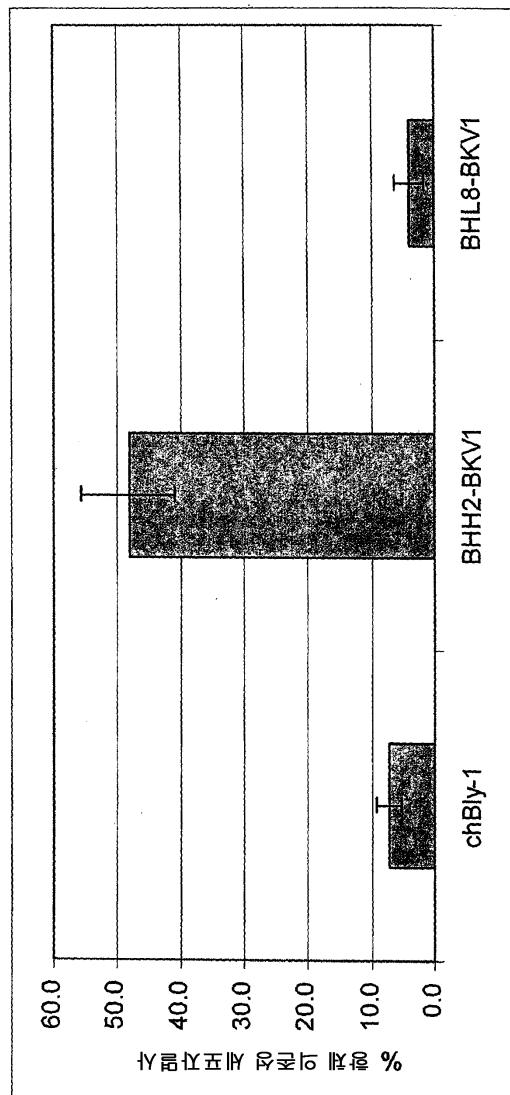
도면2



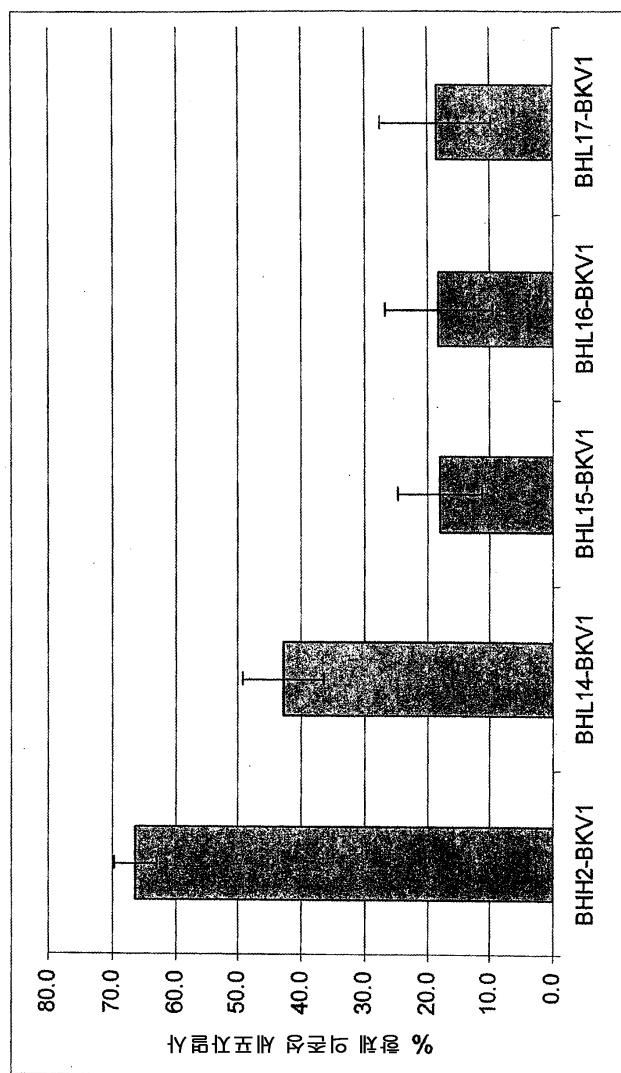
도면3



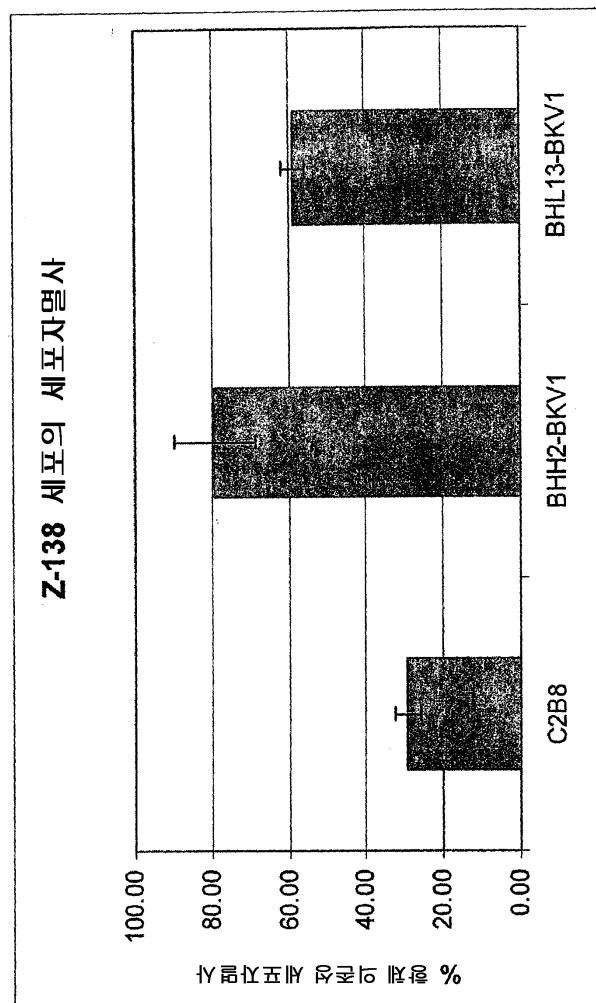
도면4



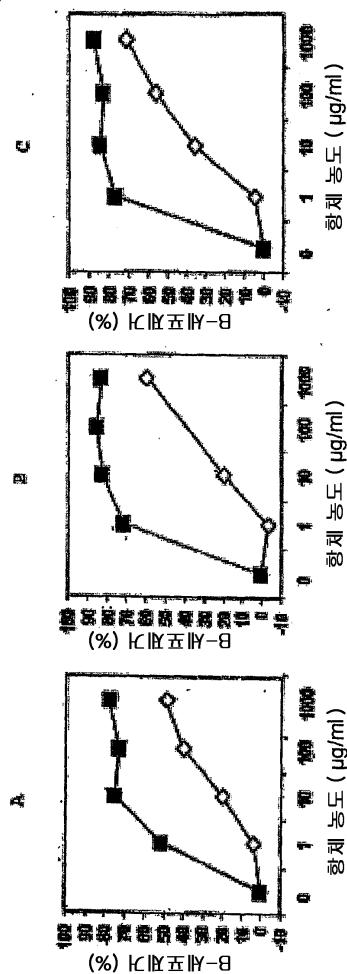
도면5



도면6



## 도면7

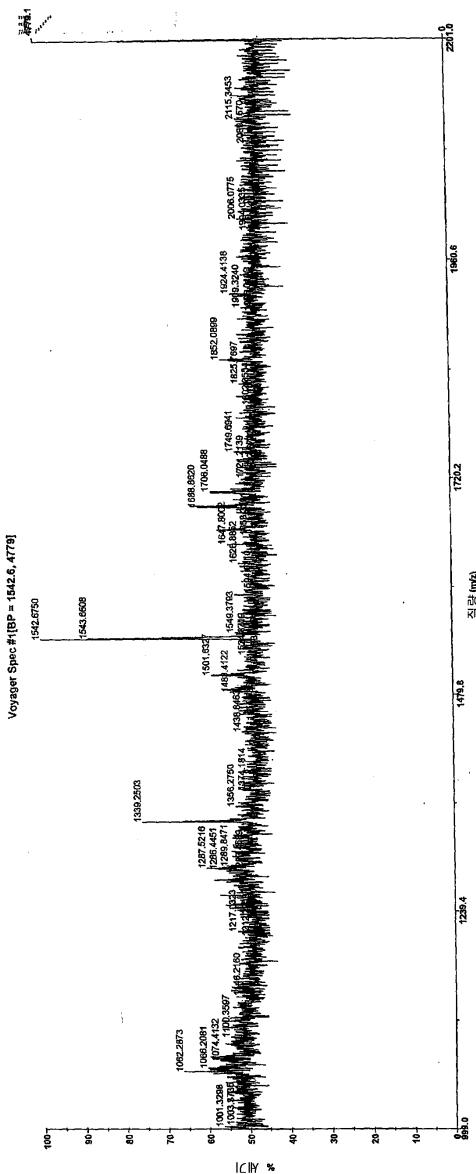


## 도면8A

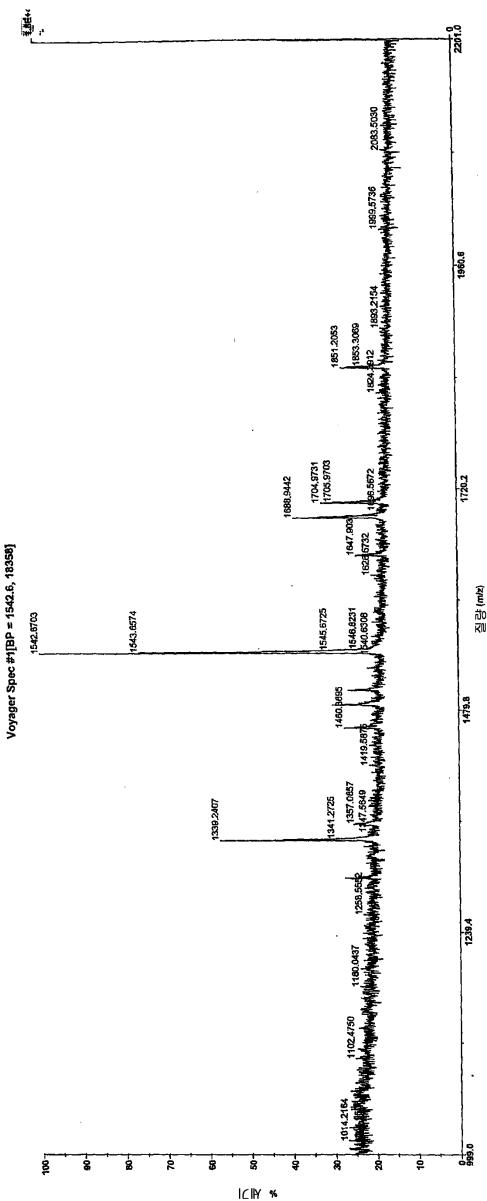
## 1. 상대 백분율

	+ EndoH	
	Bly-1 m1 031024 016	Bly-1 m1 031024 017
1053		
1256		
1282		
1298		3.70%
1339	18.60%	17.90%
1460		4.30%
1486	5.90%	5.50%
1502	5.10%	3.70%
1543	35.00%	39.20%
1622		
1647	4.60%	3.00%
1664	7%	
1680		
1688	11.00%	10.30%
1705	7.20%	7.30%
1810		
1826		
1850	5.90%	5.20%
1972		
2012		
	100%	100%

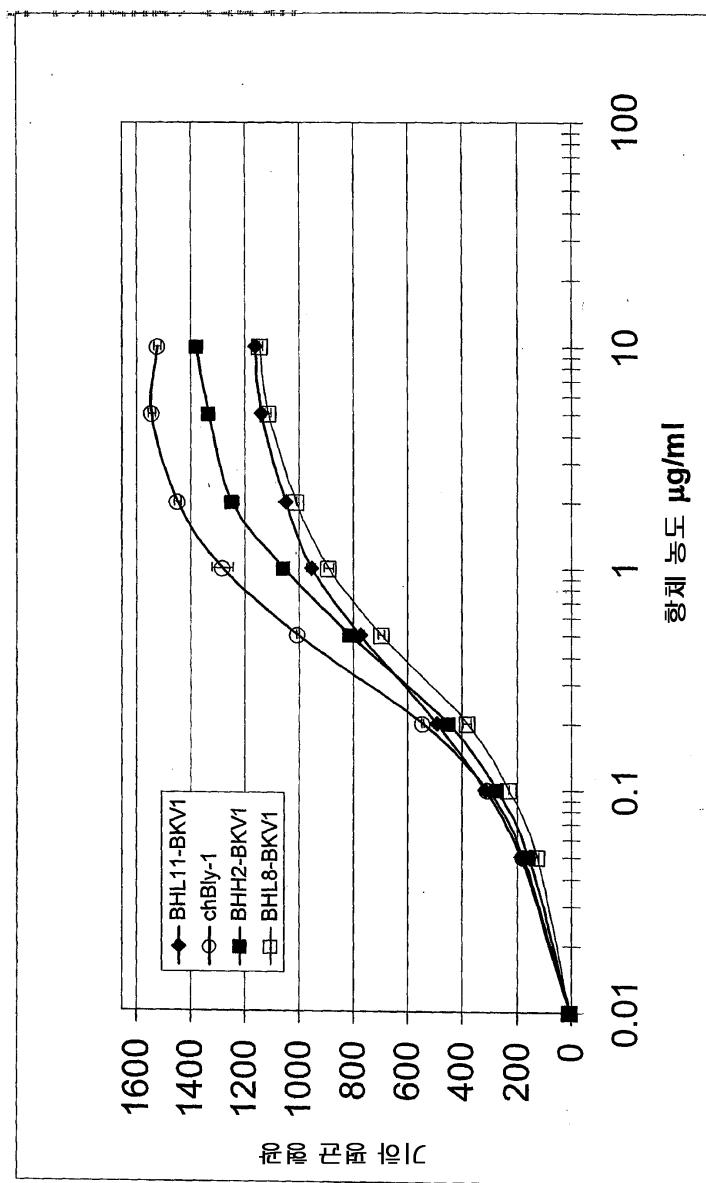
## 도면8B



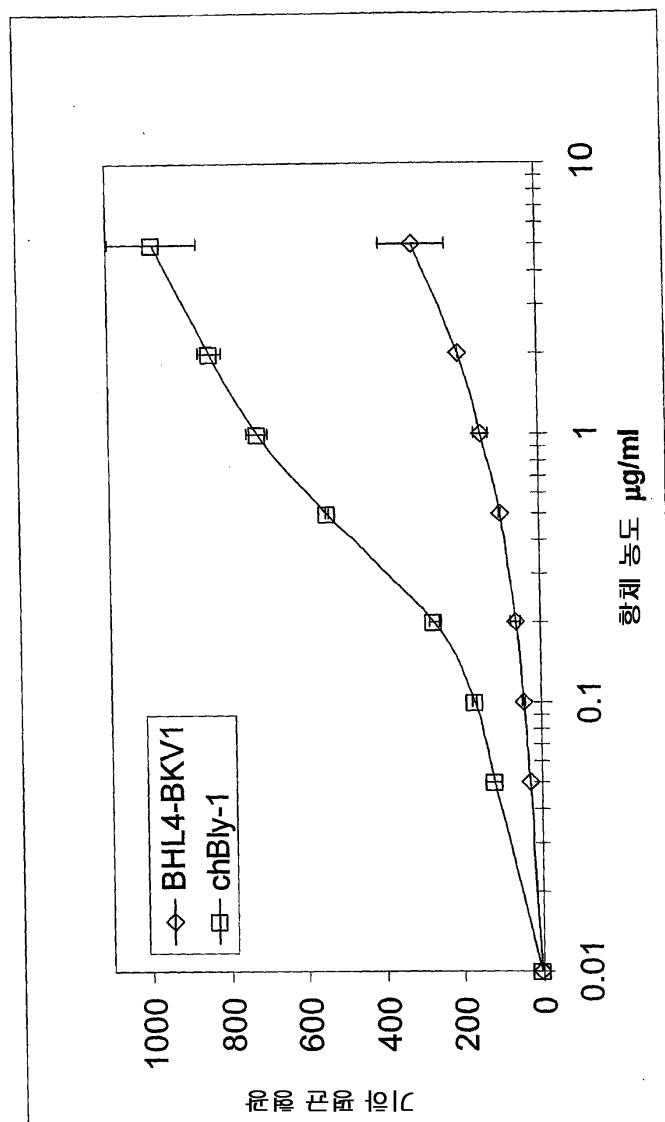
## 도면8C



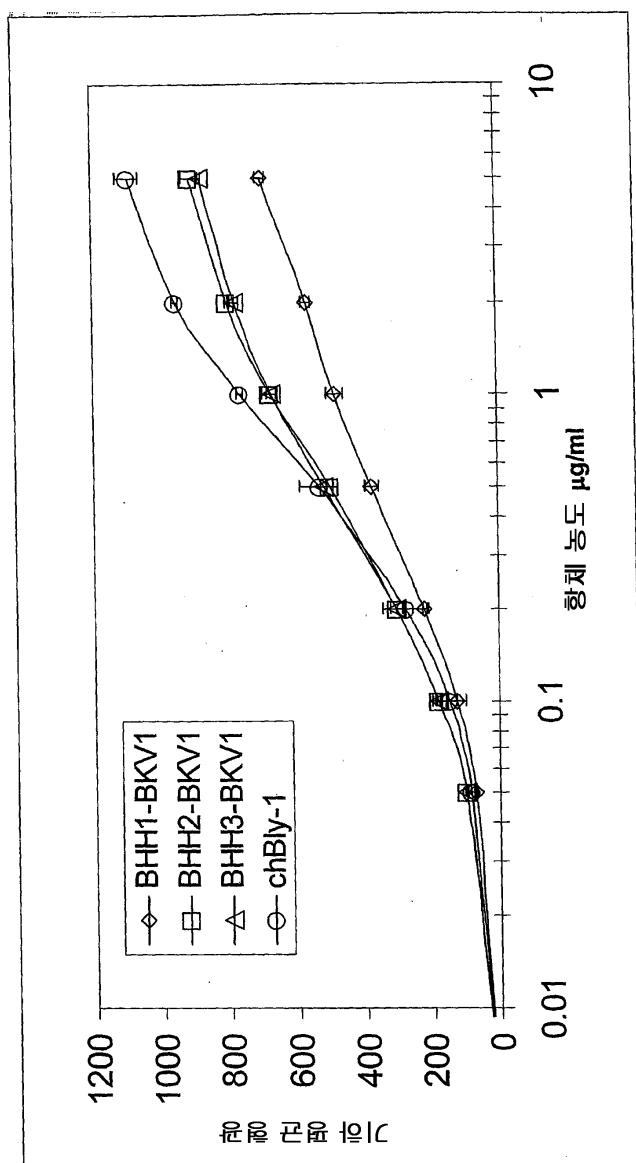
도면9



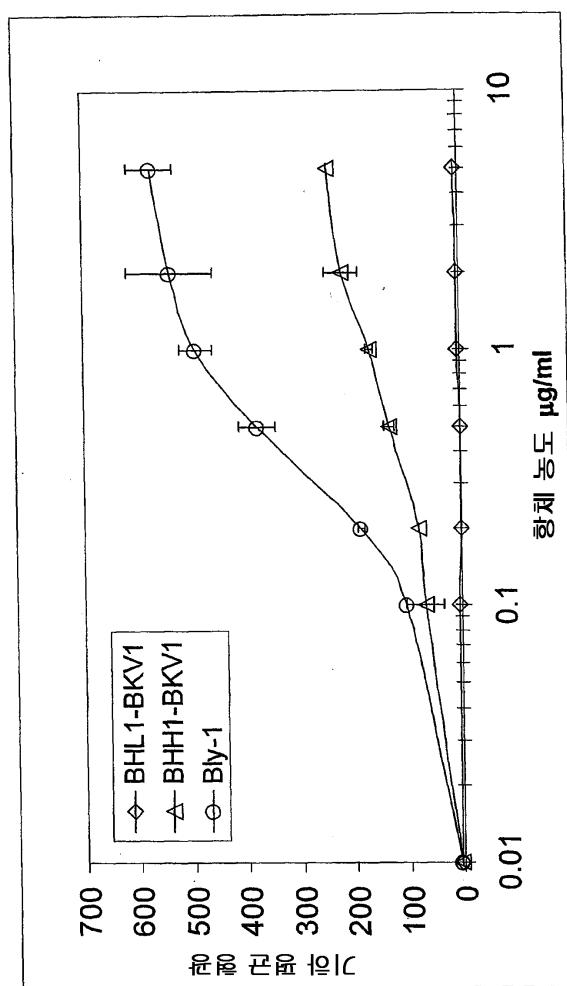
도면10



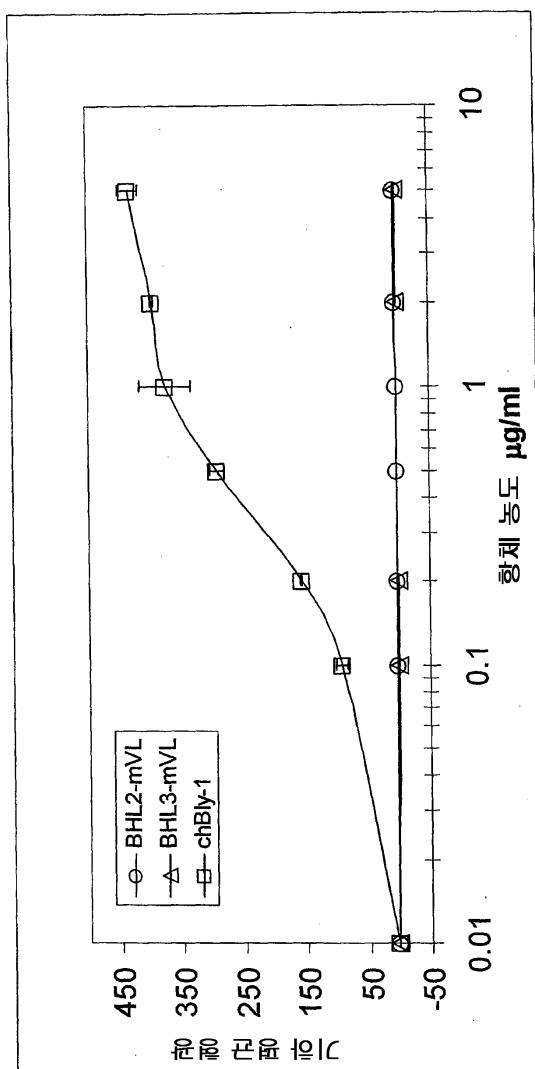
도면11



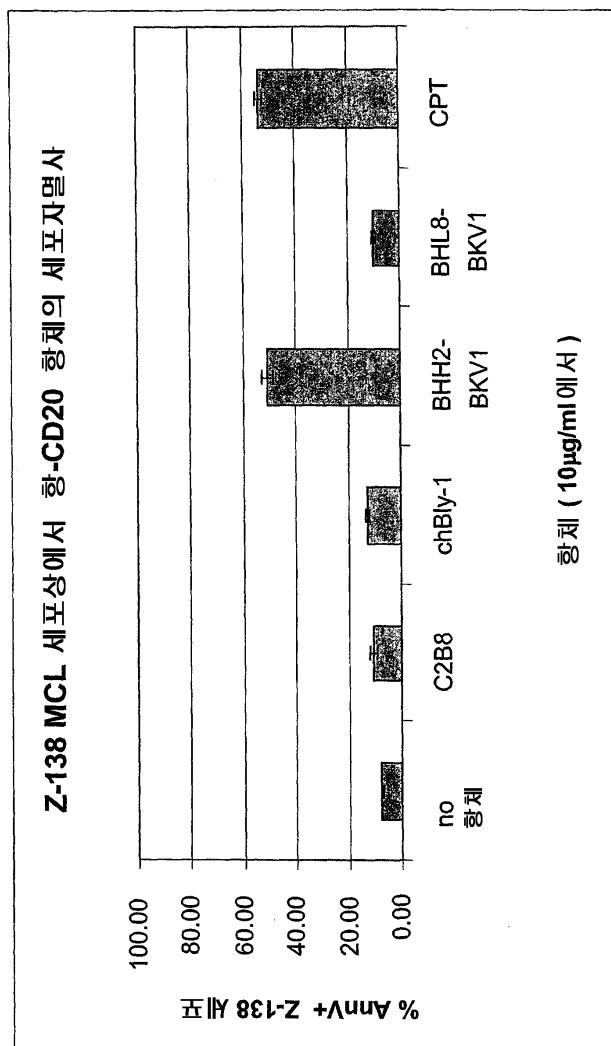
도면12



도면13

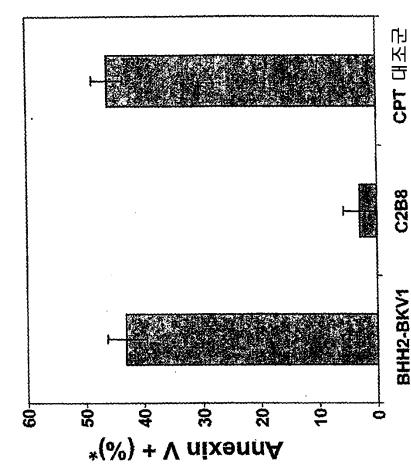


도면14

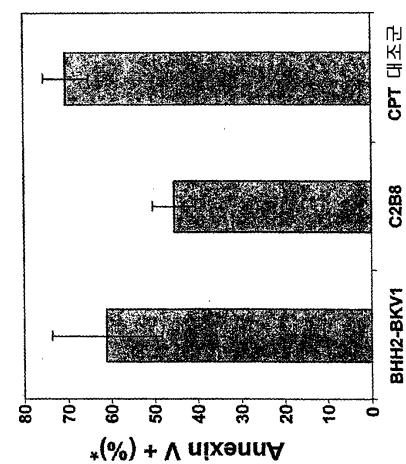


도면15

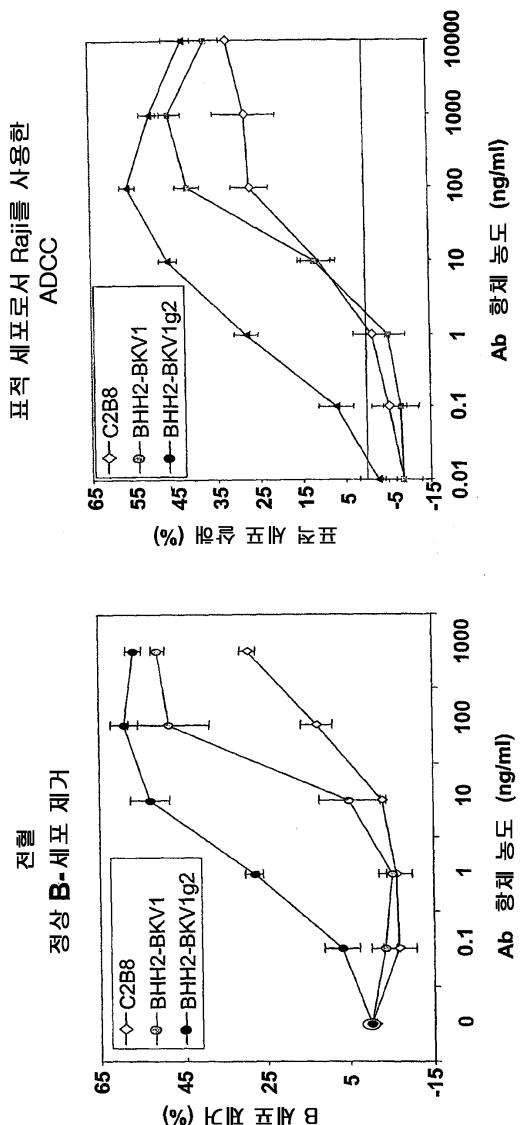
Z-138 (MCL 세포주 )



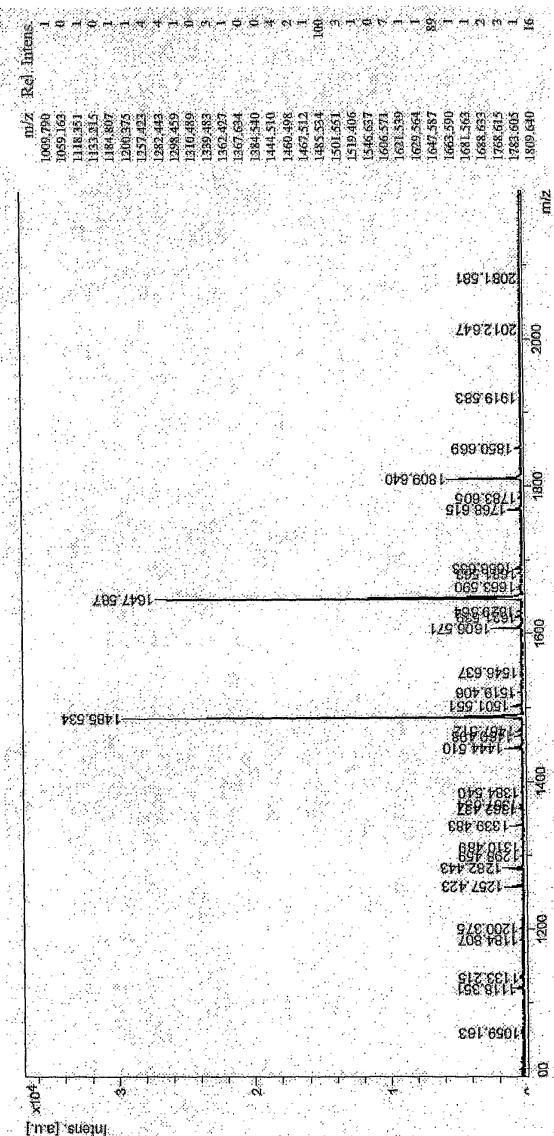
PR-1 (DLBCL 세포주 )



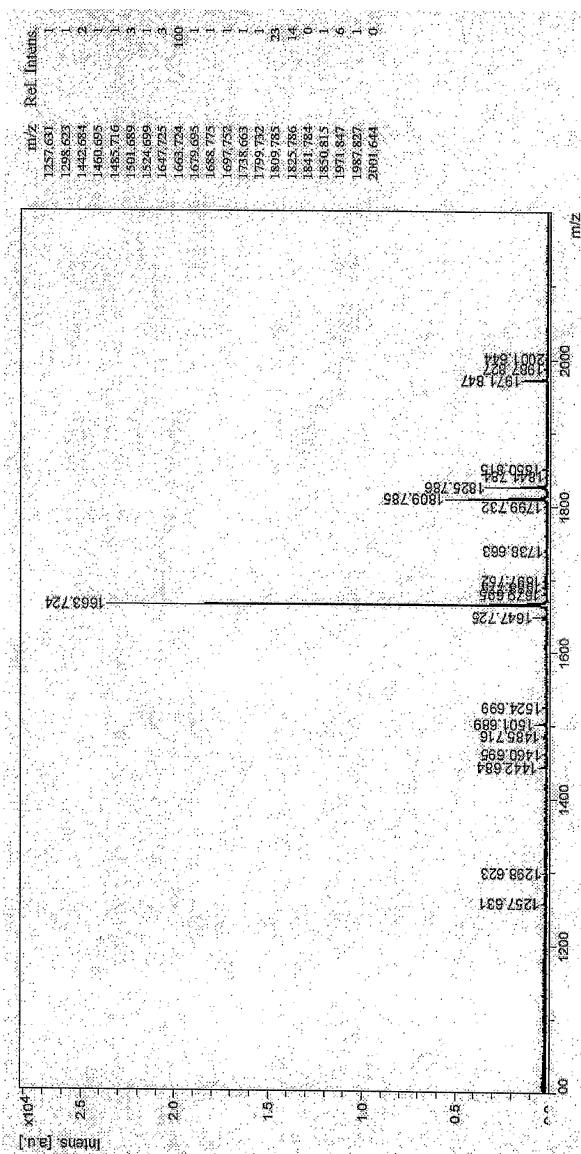
## 도면16



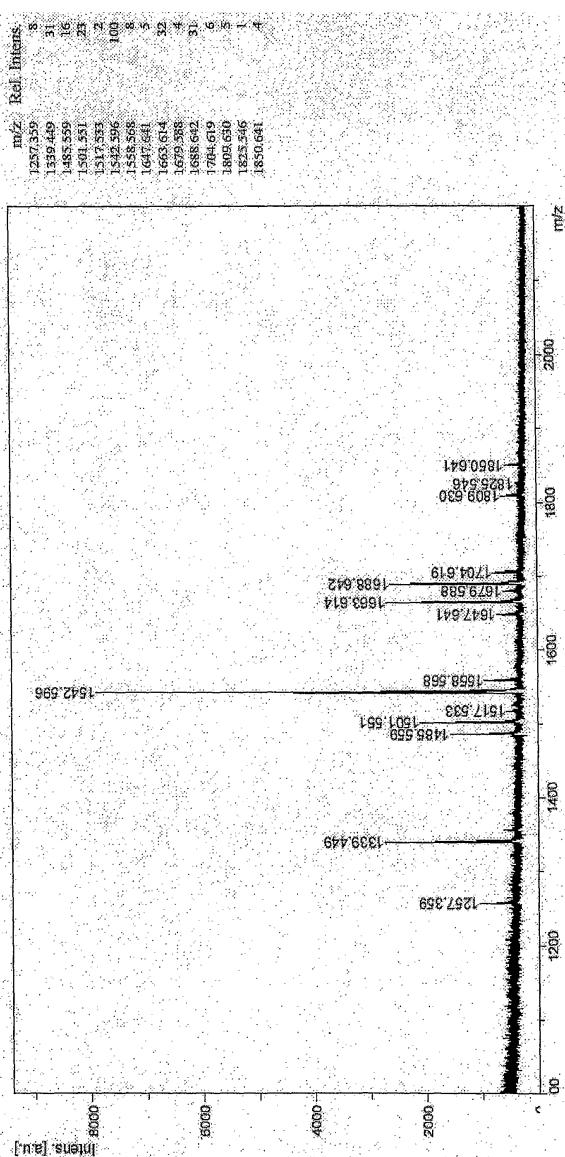
## 도면17



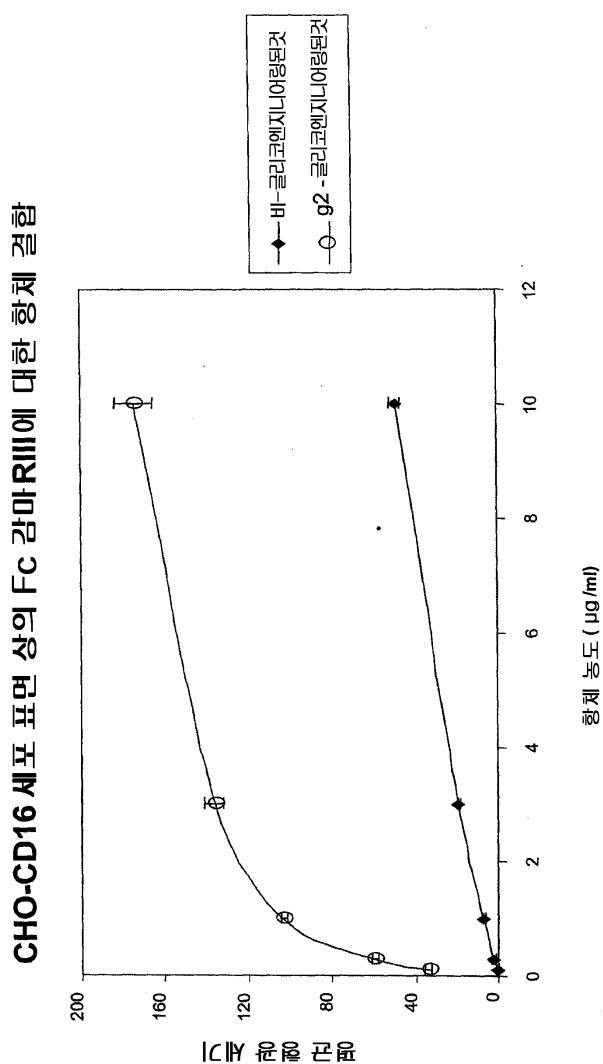
## 도면18



## 도면19



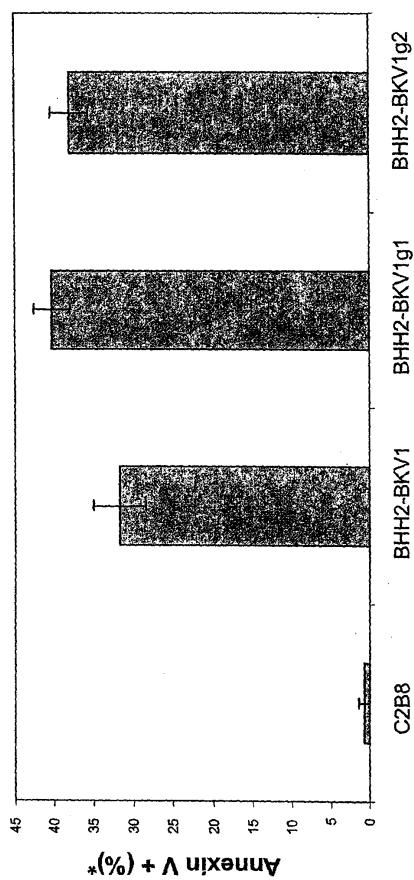
도면20



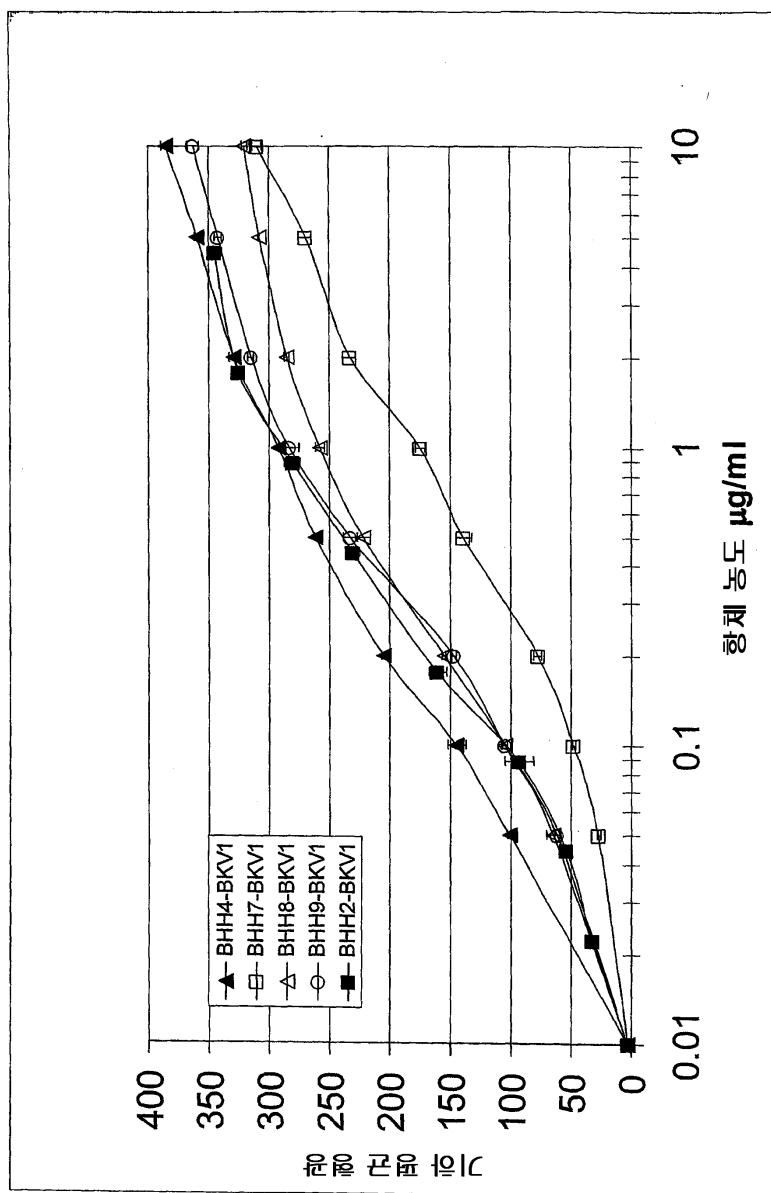
도면21

### $\bar{\gamma}$ -CD20 항체에 의한 세포자멸사

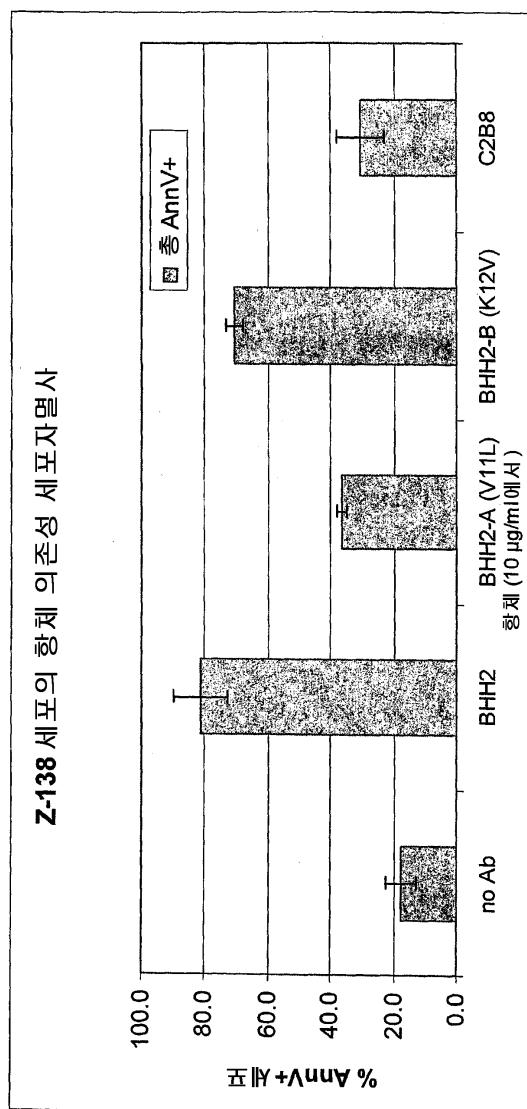
#### Z-138 맨틀 세포 림프종 세포주



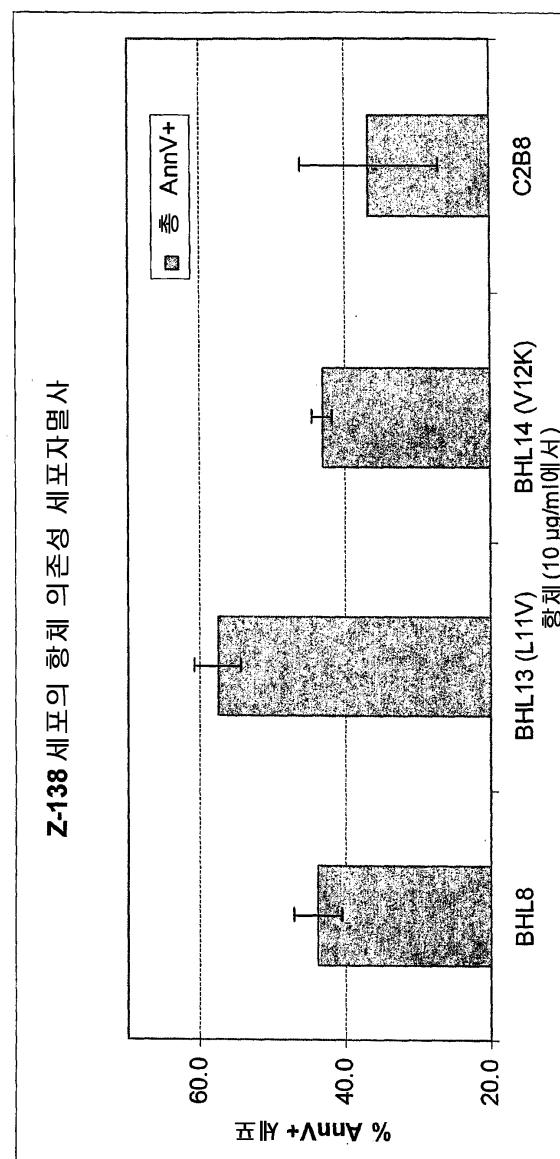
도면22



## 도면23

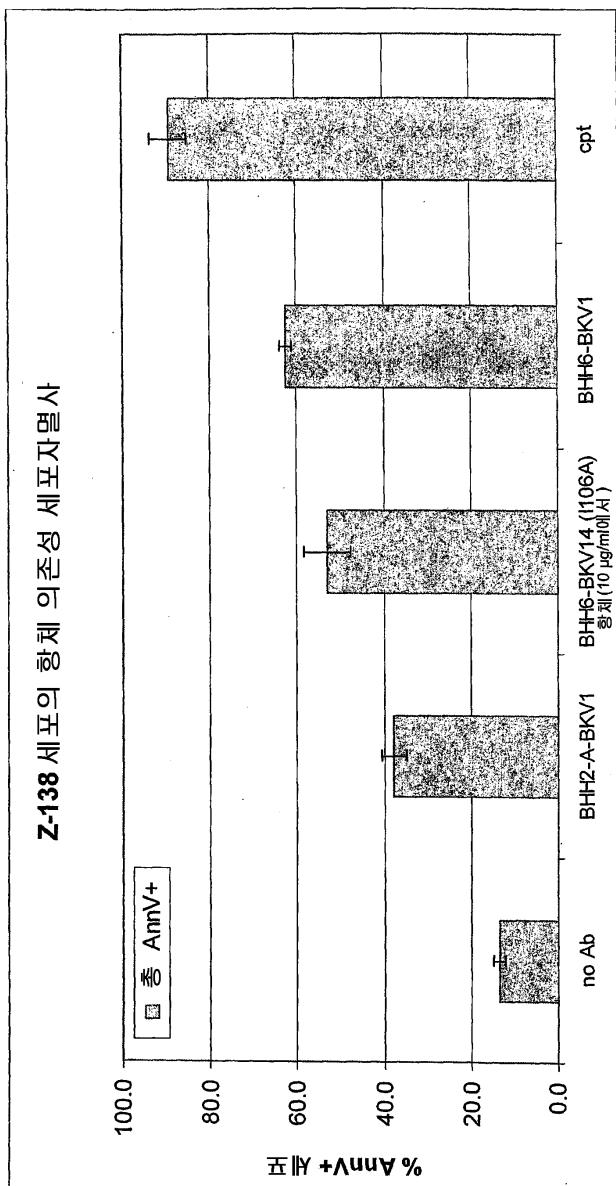


## 도면24

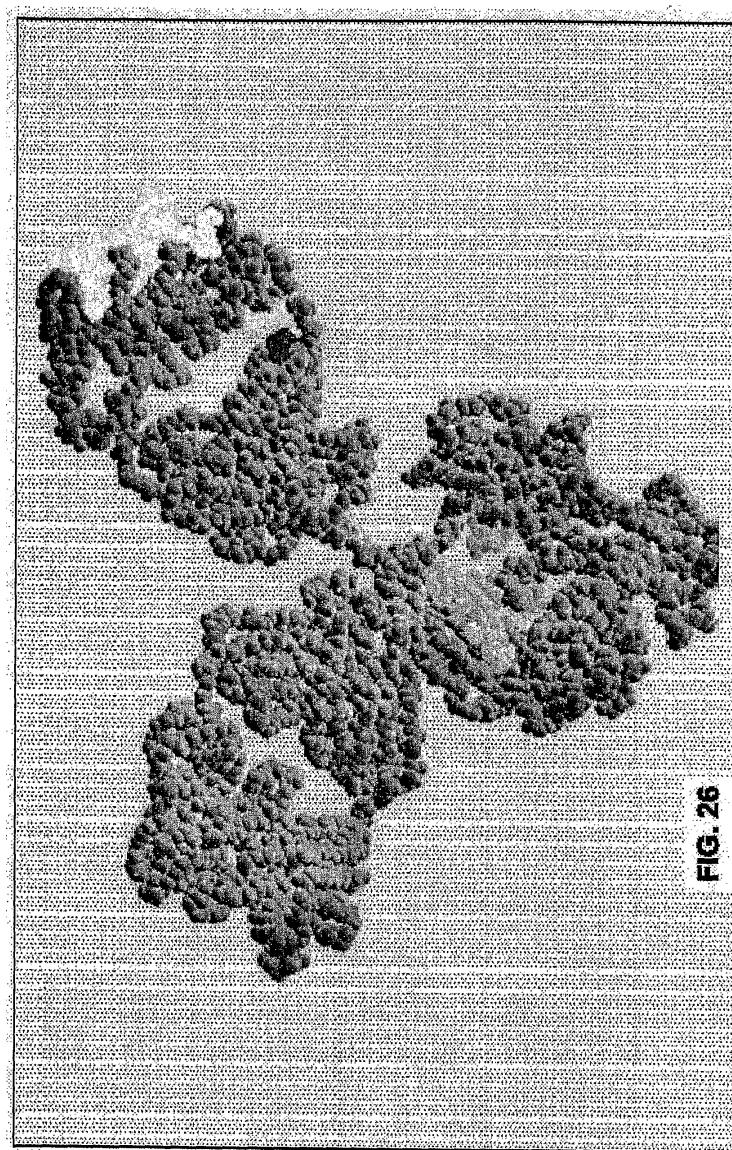


도면25

Z-138 세포의 항체 의존성 세포자멸사



도면26



서 열 목록

<110> GlycArt Biotechnology AG

<120> Modified Antigen Binding Molecules with Altered Cell Signaling Activity

<130> 1975.056PC01

<150> US 60/711,454  
<151> 2005-08-26

&lt;160&gt; 134

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

<210> 1  
 <211> 357  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> B-HH1 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 1  
 caggtgcaat tggtgagtc tggcgctgaa gtttagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60  
 tcctgcaagg ctccggata cacttcagc tatttttggta tgagctgggt gggcaggcc 120  
 cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atcttcccg gcgtatggga tactgactac 180  
 gcacagaaat tccaaggaag agtcacaatt accggccgaca aatccactag cacagcctat 240  
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300  
 tttgatggtt actggcttgt ttactggggc caggaaaccc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 2  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> B-HH1 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 2  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 3  
<211> 357  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> B-HH2 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 3  
caggtaat tggcagtc tggcgctgaa gtttggaaac ctggggatcc agtggaaatc 60

tcctgcaagg ctccggata cgccttcagc tattttggaa tggactgggt gggcaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atcttcccg gcatgggaa tactgactac 180

aatggaaat tcaagggcag agtcacaatt accggcaca aatccactag cacagcctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300

tttcatggtt actggcttgt ttactggggc caggaaaccc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 4  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> B-HH2 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 4  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 5  
 <211> 366  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> B-HH3 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 5  
 caggtgcaat tggtgcaagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60  
 tcctgcaagg ctccggata cgccttcagc tattcttggaa tgaactgggt gcggcaggcc 120  
 cctggacaag ggctcgagtg gatggacgg atcttcccg gcgatggga tactgactac 180  
 aatggaaat tcaaggcag agtcacaatt accgcccaca aatccactag cacagcctat 240  
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt atctgtgtgc aagaaatgtc 300  
 tttgatggtt actggcttgt ttactgggc cagggAACCC tggtcaccgt ctcctcagct 360  
 agcacc 366

<210> 6  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> B-HH3 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 6  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 7  
<211> 357  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> B-HH4 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 7  
caggtgaaat tggcgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctggagcttc agtgaaggc 60

tcctgcaagg tctccggata cgcgttcagc tatttttggaa tgaactgggt gggcaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcatgggaa tactgactac 180

aatggaaat tcaagggcag agtcacaatt accggcaca aatccactag cacagctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtt attactgtgc aagaaatgtc 300

tttgcgtttt actggcttgt ttactggggc caggaaacc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 8  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> B-HH4 construct of a mouse/human modified antigen binding

molecule

<400> 8  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 9  
 <211> 357  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> B-HH5 construct of a mouse/human modified antigen binding  
 molecule

<400> 9  
 cagggtcaat tgggtcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60  
 tcctgcaagg ctccggata cgcgttcagc tattcttggta tgagctgggt gcggcaggcg

120

cctggacaag ggctcgagtg gatggacgg atcttcccg gcgatggga tactgactac 180

aatggaaat tcaagggcag agtcacaatt accggcaca aatccactag cacagcstat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300

tttcatggtt actggcttgt ttactgggc cagggAACCC tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 10

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> B-HH5 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 11  
 <211> 357  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> B-HH6 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 11  
 caggtgcaat tggcgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggc 60

tcctgcaagg ctccggata cgccttcagc tatttttggaa tcaattgggt gcggcaggcg 120

cctggacaag ggctcgagtg gatggacgg atcttcccg gcgatgggg tactgactac 180

aatggaaat tcaagggcag agtcacaatt accggccaca aatccactag cacagcctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300

tttgatggtt actggcttgt ttactggggc cagggAACCC tggtcaccgt ctccctca 357

<210> 12  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> B-HH6 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 12  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15

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

Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 13  
 <211> 357  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> B-HH7 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 13  
 caggtgcaat tggcgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg ctccggata cgccttcagc tattcttggc tctcgtgggt gcggcaggcg 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atcttcccg gcgtgggaa tactgactac 180

aatggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgcccaca aatccactag cacagcctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300

tttgcgtt acggcttgt ttactggggc cagggaccc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 14  
 <211> 357

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; B-HH7 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

&lt;400&gt; 14

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

Ala	Gly	Thr	Cys	Thr	Gly	Gly	Cys	Gly	Cys	Thr	Gly	Ala	Ala	Gly	Thr
20				25						30					

Thr	Ala	Ala	Gly	Ala	Ala	Gly	Cys	Cys	Thr	Gly	Gly	Ala	Gly	Thr
35				40					45					

Thr	Cys	Ala	Gly	Thr	Gly	Ala	Ala	Gly	Gly	Thr	Cys	Thr	Cys	Cys	Thr
50				55				60							

Gly	Cys	Ala	Ala	Gly	Gly	Cys	Thr	Thr	Cys	Cys	Gly	Gly	Ala	Thr	Ala
65				70			75		80						

Cys	Gly	Cys	Cys	Thr	Thr	Cys	Ala	Gly	Cys	Thr	Ala	Thr	Thr	Cys	Thr
85				90				95							

Thr	Gly	Gly	Ala	Thr	Cys	Thr	Cys	Gly	Thr	Gly	Gly	Thr	Gly	Cys
100				105			110							

Gly	Gly	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys	Gly	Cys	Thr	Gly	Gly	Ala	Cys	Ala
115				120			125							

Ala	Gly	Gly	Gly	Cys	Thr	Cys	Gly	Ala	Gly	Thr	Gly	Gly	Ala	Thr	Gly
130				135			140								

Gly	Gly	Ala	Cys	Gly	Gly	Ala	Thr	Cys	Thr	Thr	Cys	Cys	Cys	Gly
145				150			155		160					

Gly	Cys	Gly	Ala	Thr	Gly	Gly	Gly	Ala	Thr	Ala	Cys	Thr	Gly	Ala
165				170			175							

Cys	Thr	Ala	Cys	Ala	Ala	Thr	Gly	Gly	Ala	Ala	Ala	Thr	Thr	Cys
180				185			190							

Ala Ala Gly Gly Gly Cys Ala Gly Ala Gly Thr Cys Ala Cys Ala Ala  
 195 200 205

Thr Thr Ala Cys Cys Gly Cys Cys Gly Ala Cys Ala Ala Ala Thr Cys  
 210 215 220

Cys Ala Cys Thr Ala Gly Cys Ala Cys Ala Gly Cys Cys Thr Ala Thr  
 225 230 235 240

Ala Thr Gly Gly Ala Gly Cys Thr Gly Ala Gly Cys Ala Gly Cys Cys  
 245 250 255

Thr Gly Ala Gly Ala Thr Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Cys Ala Cys  
 260 265 270

Gly Gly Cys Cys Gly Thr Gly Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr  
 275 280 285

Gly Cys Ala Ala Gly Ala Ala Ala Thr Gly Thr Cys Thr Thr Thr Gly  
 290 295 300

Ala Thr Gly Gly Thr Thr Ala Cys Thr Gly Gly Cys Thr Thr Gly Thr  
 305 310 315 320

Thr Thr Ala Cys Thr Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Ala  
 325 330 335

Ala Cys Cys Cys Thr Gly Gly Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Cys Thr  
 340 345 350

Cys Cys Thr Cys Ala  
 355

<210> 15  
 <211> 357  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> B-HH8 construct of a mouse/human modified antigen binding  
 molecule

<400> 15			
caggtgcaat tggcgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctggcgcc tc agtgaagg tc		60	
tcctgcaagg ctccggata cacttcaca tacagctgga tgaactgggt gcggcagg cc		120	
cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atcttcccg gcgatggga tactgact ac		180	
aatggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgcccaca aatccactag cacagcctat		240	
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc		300	
tttcatggtt actggcttgt ttactggggc caggaaaccc tggtcaccgt ctcctca		357	

<210> 16			
<211> 119			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			

<220>			
<223> B-HH8 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule			

<400> 16			
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15

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

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

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

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

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

85 90 95

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 17  
 <211> 357  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> B-HH9 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 17  
 caggtgaat tggcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctggcgcc tc agtgaagg tc 60

tcctgcaagg ctccggata caccttcagc tattcttgg a tgaactgggt gcggcaggcc 120

cctggacaag ggctcgagt gatggacgg atcttcccg gcgatggga tactgactac 180

aatggaaat tcaagggcag agt cacaatt accggcaca aatccactag cacagctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300

tttcatgtt actggcttgt ttactgggc caggaaacc tggcaccc tccctca 357

<210> 18  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> B-HH9 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 19  
 <211> 357  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> B-HL1 construct of a mouse/human modified antigen binding  
 molecule

<400> 19  
 cagggtcaat tggtgccagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctggggcctc agtgaaggc 60

tcctgcaagg ctccggata caccttcacc tatttttggaa tgcactgggt gggcaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcatgggaa tactgactac 180

gcacagaaat tccaaggaaag agtcacaatg acacgggaca cgtccacttc caccgttat 240

atggagctga gcagccttag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300

tttcatgtt actggcttgt ttactggggc cagggAACCC tggtcacccgt ctccctca 357

<210> 20  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> B-HL1 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 20  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 21  
 <211> 357  
 <212> DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; B-HL2 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

&lt;400&gt; 21

gagggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctggggccac cgtgaagatc 60

tcctgcaagg tgtccggata caccttcacc tattcttggta tgcaactgggt gcagcaggcc 120

cctggaaagg ggctcgagtg gatgggacgg atcttcccg gcgatggga tactgactac 180

gcagagaaat tccaaggaag agtcacaatc acagccgaca cgtccactga caccgcctat 240

atggagctga gcagccttagt atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaccaatgtc 300

tttgatggtt actggcttgt ttactgggc cagggAACCC tggtcaccgt ctcctca 357

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; B-HL2 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

&lt;400&gt; 22

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 23  
 <211> 357  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> B-HL3 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 23  
 gaggtgcaat tggcgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctggggccac cgtgaagatc 60

tcctgcaagg tgtccggata caccttcacc tattcttggaa tgaactgggt gcagcaggcc 120

cctggaaagg ggctcgagtg gatgggacgg atcttcccg gcgatggga tactgactac 180

aatggaaat tcaaggaaag agtcacaatc acagccgaca cgtccactga caccgcctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaccaatgtc 300

tttcatgtttt actggcttgt ttactggggc caggaaaccc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 24  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; B-HL3 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

&lt;400&gt; 24

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Ser  
20 25 30Trp Met Asn Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
50 55 60Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr  
65 70 75 80Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95Ala Thr Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 366

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; B-HL4 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

&lt;400&gt; 25

cagatgcaat tggtgcatc tggcgctgaa gttaagaaga ccgggagttc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg ctccggata cacttcacc tattcttgg a tgagctgggt gcggcaggcc	120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atcttcccg gcgatggga tactgactac	180
gcacagaaat tccaaggaag agtcacaatt accggccaca aatccactag cacagcctat	240
atggagctga gcagccttag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc	300
tttgatggtt actggcttgt ttactgggc cagggAACCC tggtcaccgt ctcctcagct	360
agcacc	366

<210> 26  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> B-HL4 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 26  
 Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser  
 1 5 10 15

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

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

100	105	110
-----	-----	-----

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 27  
<211> 357  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> B-HL8 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 27  
gaagtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ttggtaaagc ctggcgggtc cctgcggctc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacattagc tatttttggta tgaactgggt gggcaggct 120

cctgaaagg gcctcgagtg ggtgggacgg atcttcccg gcgtatggga tactgactac 180

aatggaaat tcaagggcag agtcacaatt accggccaca aatccactag cacagcctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300

tttcatgggtt actggcttgt ttactggggc caggaaaccc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 28  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> B-HL8 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 28  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 29  
 <211> 456  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> B-HL10 construct of a mouse/human modified antigen binding  
 molecule

<400> 29  
 cggaaatccgg cccaccgggtg gccaccaatgg actggaccctg gaggatcctc ttcttggtgg 60

cagcagccac aggagccac tcggaaagtgc agctggtgga gtctggagga ggcttggtca 120

agcctggcgg gtcctgcgg ctctcctgtg cagcctctgg attcgcattc agctattttt 180

ggatgaactg ggtgcggcag gtcctggaa agggcctcga gtgggtggga cggatcttc 240

ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtacaa attaccggcg 300

acaatccac tagcacagcc tataatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360

tgtattactg tcaagaat gtcttgatg gttactggct tgtttactgg ggccaggaa 420

ccctggcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 30

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> B-HL10 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 30

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 31

<211> 357

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> B-HL11 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 31	
caggtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ttggtaaagc ctggcgggtc cctgcggctc	60
tcctgtgcag cctctggatt cacat tagc tatttttggaa tgaactgggt gggcaggct	120
cctggaaagg gcctcgagtg ggtggacgg atcttcccg gcatgggaa tactgactac	180
aatggaaat tcaagggcag agt cacaatt accggcaca aatccactag cacagcctat	240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc	300
tttgatggtt actggcttgt ttactggggc cagggAACCC tggcacccgt ctcctca	357

<210> 32  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> B-HL11 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 32			
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly			
1	5	10	15

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 33  
 <211> 456  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> B-HL12 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 33  
 cggaaattcgg cccaccgggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60

cagcagccac aggagctcac tccgaagtgc agctcgtgga gtctggagca ggcttggtca 120

agcctggcgg gtccctgcgg ctctcctgctc cagcctctgg attcacattt agctattttt 180

ggatgaactg ggtgcggcag gtcctggaa agggcctcga gtgggtggaa cggatcttc 240

ccggcgtatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccggcg 300

acaatccac tagcacagcc tataatggac tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360

tgtttaactg tcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccaggaa 420

ccctggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcg 456

<210> 34  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> B-HL12 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 34  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 35  
 <211> 456  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> B-HL13 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400>	35					
cggaattcgg	cccaccggtg	gccaccatgg	actggacctg	gaggatcctc	ttcttggtgg	60
cagcagccac	aggagctcac	tccgaagtgc	agctcgctcg	gtctggagga	ggcgtggta	120
agcctggcgg	gtccctgcgg	cttcctgcg	cagcctctgg	attcacattt	agctattctt	180
ggatgaactg	ggtgcggcag	gctcctggaa	agggcctcg	gtgggtggga	cggatcttc	240
ccggcgatgg	ggatacigac	tacaatggga	aattcaaggg	cagagtacac	attaccgcgc	300
acaatccac	tagcacagcc	tataatgggc	tgagcagcct	gagatctgag	gacacggccg	360
tgtattactg	tgcaagaat	gtcttgatg	gttactggct	tgtttactgg	ggccaggaa	420
ccctggtcac	cgtctccctca	gctagcgaat	tctcg			456

<210> 36  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> B-HL13 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 36  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 37  
<211> 456  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> B-HL14 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 37  
cggaattcgg cccaccgggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60

cagcagccac aggagctcac tccgaagtgc agctggtcga gtccggagga ggcttgaaga 120

agcctggcgg gtcctgcgg ctctcctgcg cagcctctgg attcacattt agctatttt 180

ggatgaactg ggtgcggcag gtcctggaa agggcctcga gtgggtggga cggatcttc 240

ccggcgtatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtacaa attaccggcg 300

acaaatccac tagcacagcc tataatggcgc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360

tgtattactg tgcagaataat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccaggaa 420

ccctggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 38  
<211> 119  
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> B-HL14 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 38

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210>	39
<211>	456
<212>	DNA
<213>	Artificial Sequence

<220>

<223> B-HL15 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 39

cggaattcgg cccaccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg	60
cagcagccac aggagccac tccgaagtgc agctggtgga gtctggagga ggcttggtca	120
agcctggctc ttccctgcgg ctctcctgctg cagcctctgg attcacattt agctattctt	180
ggatgaactg ggtgcggcag gtcctggaa agggcctcga gtgggtggaa cggatcttc	240
ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtaca attaccgccc	300
acaatccac tagcacagcc tataatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg	360
tgtattactg tgcagaataat gtcttgatg gttactggct tgttactgg ggccaggaa	420
ccctggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga	456

<210> 40  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> B-HL15 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 40  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 41  
 <211> 456  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> B-HL16 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 41  
 cggaaattcgg cccaccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60

cagcagccac aggagccac tccgaagtgc agctggtgga gtctggagga ggcttggta 120

agcctggcgg gtccctgcgg gtcagctgctg cagcctctgg attcacattt agctatttt 180

ggatgaactg ggtgcggcag gtcctggaa agggcctcga gtgggtggga cggatcttc 240

ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtacaca attaccggcg 300

acaatccac tagcacagcc tataatggc tgagcgcct gagatctgag gacacggccg 360

tgtattactg tcaagaaat gtcttgatg gttactggct tgttactgg ggccaggaa 420

ccctggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 42  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; B-HL16 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

&lt;400&gt; 42

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

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

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

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

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

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

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

Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
115						

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 456

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; B-HL17 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

&lt;400&gt; 43

cggaattcgg cccaccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60

cagcagccac aggagccac tccgaagtgc agctggtgga gtctggagga ggcttggtca	120
agcctggcgg gtccctgcgg ctctcctgcg cagcctctgg attcacatgg atttctt	180
ggatgaactg ggtgcggcag gtcctggaa agggcctcga gtgggtggaa cggatcttc	240
ccggcgtatgg ggatactgac tacaatggaa aattcaaggg cagagtaca attaccggcg	300
acaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg	360
tgtattactg tgcagaatgt gtcttgatgttactggct tgttactgg ggccaggaa	420
ccctggtcac cgttcctca gctagcgaat tctcga	456

<210> 44  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> B-HL17 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 44  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 45  
 <211> 57  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 45  
 atggactgga cctggaggat cctttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcc 57

<210> 46  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 46  
 Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly  
 1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 47  
 <211> 345  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> B-KV1 of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 47  
 gatatcgtga tgacccagac tccactctcc ctgccccgtca cccctggaga gccccccagc 60

attagctgca ggtctagcaa gagcctcttg cacagcaatg gcatcactta tttgtattgg 120

tacctgcaaa agccaggca gtctccacag ctcctgattt atcaaatgtc caaccttgc 180

tctggcggtcc ctgaccgggtt ctccggatcc gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240

agcagggtgg aggctgagga tttggagtt tattactgct ctcagaatct agaacttcct 300

tacacccctcg gcgaggac caaggtggag atcaaacgta cggtg 345

<210> 48

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> B-KV1 of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 48

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn  
85 90 95

Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

Arg Thr

<210> 49  
 <211> 66  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 49  
 atggacatga gggccccgc tcagtcctg ggcctcctgc tgctctgggtt cccaggtgcc 60

aggtgt 66

<210> 50  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 50  
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp  
 1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys  
 20

<210> 51  
 <211> 360  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> I-HHD construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 51  
 cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggc 60

tcctgcaagg cctctggttt cacattcaact gactacaaga tacactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcggta tagtacctac 180

gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgtt attactgtgc gagactatcc 300

ccagcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgttcctca 360

360

<210> 52  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> I-HHD construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 52  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 53  
 <211> 366  
 <212> DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; M-HHA construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

&lt;400&gt; 53

gaagtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ttggtaaagc ctggcgggtc cctgcggctc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacat tagc aactattgga tgaactgggt gcggcaggct 120

cctggaaagg gcctcgagtg ggtgggagag atcagattga aatccaataa cttcggaaaga 180

tattacgctg caagcgtgaa gggccgggtc accatcagca gagatgattc caagaacacg 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgaagacc gaggatacgg ccgtgtatta ctgtaccaca 300

tacggcaact acgtggca ctacttcgac cactggggcc aagggaccac cgtcaccgtc 360

tccagt 366

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 122

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; M-HHA construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

&lt;400&gt; 54

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

Gly Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Phe Gly Arg Tyr Tyr Ala Ala  
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Thr Tyr Gly Asn Tyr Val Gly His Tyr Phe Asp His Trp  
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 55  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> IF5-VH - mouse/human chimeric polypeptide

<400> 55  
 Gln Val Gln Leu Arg 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 Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr 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 His Tyr Gly Ser Asn Tyr Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Thr  
115 120

<210> 56  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> B9E9-VH - mouse/human chimeric polypeptide

<400> 56  
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser 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 Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

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

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

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser  
115 120

<210> 57  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; C2B8-VH - mouse/human chimeric polypeptide

&lt;400&gt; 57

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly  
100 105 110Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala  
115 120

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 2H7-VH - mouse/human chimeric polypeptide

&lt;400&gt; 58

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp  
 100 105 110

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser  
 115 120

<210> 59  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> B-ly1-VH - mouse/human chimeric polypeptide

<400> 59  
 Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser  
 20 25 30

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

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

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

65	70	75	80
----	----	----	----

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala	115
-----------------------------	-----

<210> 60
<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>	
<223> 2F2-VH - mouse/human chimeric polypeptide	

<400> 60				
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg	1	5	10	15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr	20	25	30
---	----	----	----

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

Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val	50	55	60
---	----	----	----

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

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

Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp	100	105	110
---	-----	-----	-----

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
---

115

120

<210> 61  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 7D8-VH - mouse/human chimeric polypeptide

<400> 61  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Asp Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe His Asp Tyr  
 20 25 30

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

Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Thr Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp  
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 62  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> 11B8-VH - mouse/human chimeric polypeptide

<400> 62

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr His  
20 25 30

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

Ser Ile Ile Gly Thr Gly Gly Val Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
50 55 60

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

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

Arg Asp Tyr Tyr Gly Ala Gly Ser Phe Tyr Asp Gly Leu Tyr Gly Met  
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 63

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Vh Sequence at Kabat positions 8-13 of mouse/human modified  
antigen binding molecule

<400> 63

Gly Ala Glu Val Lys Lys  
1 5

<210> 64

<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Vh Sequence at Kabat positions 8-13 of mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 64  
Gly Pro Thr Leu Val Lys  
1 5

<210> 65  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Sequence at the Kabat positions of mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 65  
Gly Pro Val Leu Val Lys  
1 5

<210> 66  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Vh Sequence at Kabat positions 8-13 of mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 66  
Gly Pro Ala Leu Val Lys  
1 5

<210> 67  
<211> 6  
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Vh Sequence at Kabat positions 8-13 of mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 67

Gly Gly Gly Leu Val Gln  
1 5

<210> 68

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Vh Sequence at Kabat positions 8-13 of mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 68

Gly Gly Gly Leu Val Lys  
1 5

<210> 69

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Vh Sequence at Kabat positions 8-13 of mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 69

Gly Gly Gly Leu Val Glu  
1 5

<210> 70

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Vh Sequence at Kabat positions 8-13 of mouse/human modified antigen binding molecule

&lt;400&gt; 70

Gly Gly Gly Val Val Arg  
1 5

&lt;210&gt; 71

<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Vh Sequence at Kabat positions 8-13 of mouse/human modified antigen binding molecule

&lt;400&gt; 71

Gly Gly Gly Val Val Gln  
1 5

&lt;210&gt; 72

<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Vh Sequence at Kabat positions 8-13 of mouse/human modified antigen binding molecule

&lt;400&gt; 72

Gly Gly Val Val Val Gln  
1 5

&lt;210&gt; 73

<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Vh Sequence at Kabat positions 8-13 of mouse/human modified antigen binding molecule

&lt;400&gt; 73

Gly Gly Gly Leu Ile Gln  
1 5

&lt;210&gt; 74

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Vh Sequence at Kabat positions 8-13 of mouse/human modified antigen binding molecule

&lt;400&gt; 74

Arg Gly Val Leu Val Gln  
1 5

&lt;210&gt; 75

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Vh Sequence at Kabat positions 8-13 of mouse/human modified antigen binding molecule

&lt;400&gt; 75

Gly Pro Gly Leu Val Lys  
1 5

&lt;210&gt; 76

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Vh Sequence at Kabat positions 8-13 of mouse/human modified

antigen binding molecule

<400> 76  
Gly Ser Gly Leu Val Lys  
1 5

<210> 77  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Vh Sequence at Kabat positions 8-13 of mouse/human modified  
antigen binding molecule

<400> 77  
Gly Ala Gly Leu Leu Lys  
1 5

<210> 78  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Vh Sequence at Kabat positions 8-13 of mouse/human modified  
antigen binding molecule

<400> 78  
Gly Ser Glu Leu Lys Lys  
1 5

<210> 79  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Vh Sequence at Kabat positions 8-13 of mouse/human modified  
antigen binding molecule

<400> 79  
 Gly His Glu Val Lys Gln  
 1 5

<210> 80  
 <211> 987  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 80  
 accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctctcca agagcacctc tgggggcaca 60  
 gcggccctgg gctgcctggc caaggactac ttcccccgaac cggtgacggc gtcggtggac 120  
 tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtc tcctacagtc ctcaggactc 180  
 tactccctca gcagcgtgg gaccgtgcc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 240  
 tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agaaagcaga gcccaaatct 300  
 tgtgacaaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactccctggg gggaccgtca 360  
 gtctccctc tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctccggac ccctgaggtc 420  
 acatgcgtgg tggtgacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtaacgt 480  
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 540  
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtag 600  
 aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 660  
 aaaggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catccggga tgagctgacc 720  
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catgcccgt 780  
 gagttggaga gcaatggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgtggac 840

tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 900

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 960

agcctctccc tgtctccggg taaatga 987

<210> 81  
 <211> 328  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 81  
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr  
 1 5 10 15

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val  
 35 40 45

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser  
 50 55 60

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile  
 65 70 75 80

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala  
 85 90 95

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
 100 105 110

Pro Glu Leu Leu Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
 115 120 125

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
 130 135 140

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val  
 145 150 155 160

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

165

170

175

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
 180 185 190

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
 195 200 205

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
 210 215 220

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr  
 225 230 235 240

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 245 250 255

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
 260 265 270

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
 275 280 285

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
 290 295 300

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325

<210> 82  
 <211> 618  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 82  
 ctcatgaata tgcataataac ctgagat tta ctgaagtaaa tacagatctg tcctgtgccc 60

tgagagcatc acccagcaac cacatctg tgc ctctagagaa tcccctgaga gctccgttcc 120

tcaccatgga ctggacctgg aggatcctct tcttggtggc	180
agcagccaca ggtaagaggc	
tccctagtc cagtgtatgaa aagaggatt gagtccagtc	240
cagggagatc tcatccactt	
ctgtgttctc tccacaggag cccactccca ggtgcagctg	300
gtgcagctg gggctgaggt	
gaagaaggct gggccttag tgaaggcttc ctgcaaggct	360
tctggataca ctttacccgg	
ctactatacg cactgggtgc gacaggcccc tggacaagggtt	420
cttgagtgga tggacggat	
caaccctaac agtggtgca caaactatgc acagaagttt	480
cagggcaggg tcaccatgtac cagcctacat ggagctgagc	540
aggctgagat ctgacgacac	
ggtcgat tactgtgcga gagacacagt gtgaaaaccc	600
acatccttag ggtgtcagaa	
accccaggga ggaggcag	618

<210>	83
<211>	613
<212>	DNA
<213>	Homo sapiens

<400>	83
ccagctccac cctccctgg gttaaaaag ccgagcacag gtaccagctc	60
agtgactct	
gtgcaccacc atggacacac tttgctccac gtcctgctg ctgaccatcc	120
cttcatgtga	
gtgctgttgt cagggactcc ttacgggttg aaacatcagt tttttttt	180
gtggcttca	
tcttcttatg ctttctccac aggggtcttg tccagatca cttgaagga	240
gtctggctt	
acgctggta aacccacaca gaccctcaag ctgaccctgca	300
cttctctgg gttctcactc	
acgactatgt gatgggtgt gggctggatc cgtcagcccc cagggaaaggc	360
cctggatgg	
cttgcactca ttatggaa tcatgtataag cgctacagcc catctgtaa	420
gagcaggctc	
accatcacca aggacacctc caaaaaccag gtggcctta caatgaccaa	480
catggaccct	

gtggacacag ccacatatta ctgtgcacac agaccacaaa gacacagccc agggcacctc 540

ctgtacaaa acccaggctg cttctcatig gtgctccctc cccacctctg cagaacagga 600

aagtctgtct gct 613

<210> 84

<211> 546

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 84

agtgactcct gtgccccacc atggacacac tttgctacac actcctgctg ctgaccaccc 60

cttcctgtga gtgctgtggt cagggacttc ctcagaagtg aaacatcagt tgtccctt 120

gtggcctca tcttcttatg tcttctccac aggggtcttg tcccaggtca ctttgaagga 180

gtctggtcct gtgctggta aacccacaga gaccctcacg ctgacctgca ccgtctctgg 240

gttctcaactc agcaatgcta gaatgggtgt gagctggatc cgtcagcccc caggaaggc 300

cctggagtgg ctgcacaca tttttcgaa tgacgaaaaa tcctacagca catctctgaa 360

gaggcaggctc accatctcca aggacacctc caaaagccag gtggcctta ccatgaccaa 420

catggaccct gtggacacag ccacatatta ctgtgcacgg ataccacaga gacacagccc 480

aggatgcctc ctgtacaaga acctagctgc atctcagttg tgctccctcc ctacctctgc 540

agaaca 546

<210> 85

<211> 460

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 85

atggacatac tttgttccac gtcctgcta ctgactgtcc cgtcctgtga gtgcgtgggt	60
caggttagtac ttcaagaagca aaaaatctat tctctctttt gtgggcttca tcttctttag	120
tcttctccac aggggtctta tcccaggta ccttggggta gtctggctt ggcgtggta	180
aaccacaca gaccctcaca ctgacactgca cttctctgg gttctcactc agcactagtg	240
gaatgtgtt gagctggatc cgtcagcccc caggaaaggc cttggagtgg ctgcactca	300
ttgatggta tgatgataaa tactacagca catctctgaa gaccaggctc accatctcca	360
aggacacccca caaaaaccag gtggtctta caatgaccaa catggacccgtggacacag	420
ccacgttata ctgtgcacgg ataccacaga gacacaccca	460

<210>	86
<211>	877
<212>	DNA
<213>	Homo sapiens

<400>	86
acagcctatt cctccagcat cccactagag cttcttatat agttaggagac atgcaaata	60
ggccctccct ctactgatga aaaccaaccc aaccctgacc ctgcaggctc cagagaggag	120
ccttagccct ggactccaag gccttccac ttgggtatca gcactgagca cagaggactc	180
accatggaaat tggggctgag ctgggttttc cttgttgcta ttttagaagg tgattcatgg	240
aaaacttagga agattgagtg tgtgtggata tgagtgtgag aaacagtggaa ttgtgtggc	300
agtttctgac ctgggtgtct cttgtttgc aggtgtccag tgtgaggtgc agctgggtgg	360
gtctggggga ggcttggtcc agcctggggg gtccctgaga ctctcctgtc cagcctctgg	420
attcacctt agtagctatt ggatgagctg ggtccggccag gctccaggaa aggggctgg	480
gtgggtggcc aacataaagc aagatggaag tgagaaatac tatgtggact ctgtgaaggg	540

ccgattcacc atctccagag acaacgcca aactcactg tatctgcaa tgaacagcct	600
gagagccgag gacacggctg tgtattactg tgcgagagac acagtggagg gaagtcatgt	660
tgagcccaga cacaaacctc cctgcagggg tccctggga ccaccagggg ggcacaggc	720
attgagca ctggctgtc cagggcaggt gcaggtgctg ctgaggcgt gcttcctgtc	780
gcggctgccc gctgcctcgt cgtcaaattt ccccaagaaac ttctccagat ttacaattct	840
gtactgacat ttcatgtctc taaatgcaat actttt	877

<210> 87
<211> 557
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 87	
ccagagatccatcggtg atcagcaactg aacacagagg actcaccatg gagttggc	60
tgagctgggt ttccctgtt gctataataa aaggtgattt atggagaact agagacattt	120
agtggacgtg agtgagataa gcagtgaata tatgtggcag ttctgacta gggtgtctc	180
gtgtttgcag gtgtccagtg tcaggtgcag ctgggtggagt ctgggggagg cttggtaag	240
cctggagggt ccctgagact ctccgtgca gcctctggat tcacccatcg tgactactac	300
atgagctgga tccggccaggc tccagggaag gggctggagt gggtttcata cattagtagt	360
agtggtagta ccatatacta cgcaactct gtgaaggcc gattcaccat ctccaggac	420
aacgccaaga actcaactgtatctgcaaaatg aacagcctga gagccgagga cacggcgtg	480
tattactgtc cgagagacac agtgaggga agtcagtgtg agcccagaca caaacctccc	540
tgcagggggt cccttgg	557

<210> 88  
 <211> 727  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 88  
 agatttaaga accttgcacc tggtaccgt tgctttctt gtaaccattt gtcttttaag 60  
 ttgttatca ctctgttaact attttgatta ttttgattct tgcatgttt tacttctgtat 120  
 aaatttattac atttgagtcc ctctccctt cctaaaccta ggtataaaat ttactcgagc 180  
 cccttctcg tggccgagag aatttgagc atgagctgtc tcttggcag ccggcttaat 240  
 aaaggactct taattcgtct caaagtgtgg cgtttctta actcacctgg gtacaacagt 300  
 gcagctggtg gagtctgggg gaggcttggt agagcctggg gggccctga gactctctg 360  
 tgccgcctct ggattcacct ttagtaacag tgacatgaac tgggtccgccc aggctccagg 420  
 aaaggggctg gagtgggtat cgggtgttag ttggaatggc agtaggacgc actatgcaga 480  
 ctctgtgaag gcccattca tcatctccag agacaattcc aggaacttcc tgtatcagca 540  
 aatgaacagc ctgaggcccg aggacatggc tgtgtattac tgtgtgagaa acactgtgag 600  
 aggacggaag tgtgagccca gacacaaacc tcctgcagga acgttggggg aaatcagctg 660  
 cagggggcgc tcaagaccca ctcattcagag tcaacccag agcaggtgca catggaggct 720  
 gggtttt 727

<210> 89  
 <211> 514  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 89  
 ggactcgcca tggagtttg gctgagctgg gtttccttg ttgctatttt aaaaggtgat 60

tcatggatca atagagatgt tgagtgtgag tgaacacgag tgagagaaac agtggatttg	120
tgtggcagtt tctgaccagg gtgtctctgt gtttgcaggt gtccagtgagtg aggtgcagct	180
ggtgaggatct gggggagggtg tggtaacggcc tggggggtcc ctgagactct cctgtgcagc	240
ctctggattc acctttgatg attatggat gagctggtc cgccaagctc cagggaaagg	300
gctggagtgg gtctctggta ttaattggaa tggtggttagc acaggttatg cagactctgt	360
gaagggccga ttacccatct ccagagacaa cgccaagaac tccctgtatc tgcaaatgaa	420
cagtcgtgaga gccgaggaca cggccttgc tcaactgtgcg agagacacag tgagggaaag	480
ccagtggagag cccagacaca aacgtccctg cagg	514

<210> 90
<211> 412
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 90	
tgattcatgg agaaatagag agactgagtg tgagtgaaca tgagtgagaa aaactggatt	60
tgtgtggcat tttctgataa cggtgtcctt ctgtttgcag gtgtccagtg tcaggtgcag	120
ctgggtggagt ctgggggagg cgtggtccag cctgggaggt ccctgagact ctcctgtgca	180
gcgtctggat tcacccatcg tagctatggc atgcactggg tccgccaggc tccaggcaag	240
gggctggagt gggctggcagt tatatggat gatggaagta ataaatacta tgcagactcc	300
gtgaagggcc gattcaccat ctccagagac aattccaaga acacgctgtt tctgcaaatg	360
aacagcctga gagccgagga cacggctgtg tattactgtg cgagagacac ag	412

<210> 91
<211> 870

<212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (43)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (824)  
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 91	
catctgttac agaactcatt atatagtagg agacatccaa atngggtccc tccctctgct	60
gatgaaaacc agcccagccc tgaccctgca gctctggag aggagcccc gccctgagat	120
tcccaggtgt ttccattcgg tcatcagcac tgaacacaga gaacgcacca tggagttgg	180
actgagctgg gtttccttg ttgctatattt aaaagggtat tcatggataa atagagatgt	240
tgagtgtgag tgaacatgag ttagagaaac agtggatatg tgtggcagtg tctgaccagg	300
gtgtctctgt gttgcaggt gtccagtgtg aagtgcagct ggtggagtct gggggagtgc	360
tggtagcc tgggggtcc ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc acctttatg	420
attataccat gcactgggtc cgtcaagctc cgggaaggg tctggagtgg gtctcttta	480
ttagtggga tggtggtagc acatactatg cagactctgt gaagggccga ttcaccatct	540
ccagagacaa cagcaaaaac tccctgtatc tgcaaatgaa cagtctgaga actgaggaca	600
ccgccttgta ttactgtgca aaagatacac agtgaggggaa agtcagcgag agcccgacaa	660
aaaacctcgc tgcaggaaga caggagggc ctgggtgca gaggccactc aagacacact	720
gaggcataggg ttaactctgg gacaagttgc tcaggaaggt taagagctgg tttcccttca	780

gagtttcac aaatttctcc atctaacagt ttccccagga accngtctag atctgtgatc 840

ttggatctgc taaaactgcc tgtgtcacct 870

<210> 92  
 <211> 724  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (560)  
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 92  
 ccattcggtg atcagcactg aacacagagg actcaccatg gagtttgcc tgagctgggt 60

tttccttgtt gctatttaa aaggtgattc atggagaact agagatattg agtgtgagtg 120

aacacgagtg agagaaacag tggatatgtg tggcagttc taaccaatgt ctctgtgttt 180

gcaggtgtcc agtgtgaggt gcagctggtg gagtctggag gaggctgtat ccagcctggg 240

gggtccctga gactctcctg tgcagcctct gggttcaccg tcagtagcaa ctacatgagc 300

tgggtccgcc aggctccagg gaaggggctg gagtgggtct cagttatata tagcggtggt 360

agcacatact acgcagactc cgtgaaggc cgattcacca tctccagaga caattccaag 420

aacacgtgt atcttcaat gaacagcctg agagccgagg acacggccgt gtattactgt 480

gcgagagaca cagtggggg aagtcatgt gcccagac acaaacctcc ctgcaggaac 540

gctgggggaa aatcagcgn agggggcgct caggagccac tgcatcaggt cagccccgga 600

ggcaggtgca gatggaggct gatttccttg tcaggatgtg gggacttttg tcttctctg 660

acgggttccc cagggaaacc tctctaagtt tagcattctg tgcctatgaa cgtttctct 720

aagt	724
------	-----

<210>	93
<211>	288
<212>	DNA
<213>	Homo sapiens

<400>	93
gaggtgcagc tggggagtc ttggtagc ctgggggtc cctgagactc	60
tcctgtcag cctctggatt caccgtcagt agcaatgaga tgagctgggt ccgcaggct	120
ccagggagg gctggagtg ggtctcatcc attagtggtg gtagcacata ctacgcagac	180
tccagggagg gcagattcac catctccaga gacaattcca agaacacgct gcatttcaa	240
atgaacagcc tgagagctga ggacacggct gtgtattact gtaagaaa	288

<210>	94
<211>	626
<212>	DNA
<213>	Homo sapiens

<400>	94
catcccttt caccttttataaaaggca ccacccat gcaaattctc acttaggcac	60
ccacaggaaa ccaccacaca tttccctaaa ttccgggtcc agtcacatg gaaaatactt	120
tctgagagct catgggcctc ctgcacaaga acatgaaaca cctgtggttc ttccctcc	180
tggggcagc tcccatgtt gagggtctca agggtcaga catggggta tgggggtgc	240
ctctgatccc agggctcact gtgggtctct ctgttacag ggtccgtc tcaggtgcag	300
ctgcaggagt cggcccccagg actggtaag cctccggga ccctgtccct cacgtgcgt	360
gtctctgggt gctccatcag cagtagtaac tggggagggtt gggccggca gccccccagg	420
aaggggctgg agtggattgg gaaatctat catagtggga gcaccaacta caacccgtcc	480

ctcaagagtc gagtcaccat atcagtagac aagtccaaga accagttctc cctgaagctg 540

agctctgtga ccggccgga cacggccgtg tattgctgtg cgagagacac agtgagggga 600

ggtgagtgtg agcccagaca caaacc 626

<210> 95

<211> 299

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 95

cagctgcagc tgcaggagtc cggctcagga ctggtaagc cttcacagac cctgtccctc 60

acctgcgctg tctctggtgg ctccatcagc agtggtggtt actcctggag ctggatccgg 120

cagccaccag ggaaggccct ggagtggatt gggtacatct atcatagtgg gagcacctac 180

tacaaccgt ccctcaagag tcgagtcacc atatcagtag acaggtccaa gaaccagttc 240

tccctgaagc ttagctctgt gaccggcg gacacggccg tgtattactg tgccagaga 299

<210> 96

<211> 410

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 96

gggtcctgtc ccaggtgcag ctacagcagt ggggcgcagg actgttgaag ctttcggaga 60

ccctgtccct cacctgcgct gtctatggtg ggtccttcag tggttactac tggagctgga 120

tccggccagcc cccagggaaag gggctggagt ggattgggaa aatcaatcat agtggaaagca 180

ccaactacaa cccgtccctc aagagtcgag tcaccatatc agtagacacg tccaagaacc 240

agtttctccct gaagctgagc tctgtgaccg ccggacac ggctgtgtat tactgtgcga 300

gaggcacagt gaggggaggt gagtgtagc ccagacaaaa acctccctgc aggtaggcag 360

aggggcgccc cgccaggact gctcaagacc agcagggtggc ggcggcgcc 410

<210> 97  
<211> 700  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (19)  
<223> n is a, c, g, or t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (46)  
<223> n is a, c, g, or t

<400> 97  
agggtctggg ttataaacnc tgttagactcc tccctcagg gcaggntgac caactatgca 60

aatgcaagt gggcctccc cacttaaacc cagggtccc ctccacagt agtctccctc 120

actgcccagc tgggatctca gggcttcatt ttctgtccctc caccatcatg gggtaaccg 180

ccatcctcgc cctcctcctg gctgttctcc aaggtcagtc ctgccgaggg cttgaggtca 240

cagaggagaa cgggtggaaa ggagccctg attcaaattt tgtgtctccc ccacaggagt 300

ctgttccgag gtgcagctgg tgcagttctgg agcagaggtg aaaaagcccg gggagtctct 360

gaagatctcc tgaagggtt ctggatacag ctttaccagc tactggatcg gctgggtgcg 420

ccagatgccc gggaaaggcc tggagtggat gggatcatc tattctggtg actctgatac 480

cagatacagc ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca gccgacaagt ccatcagcac 540

cgcctacctg cagtggagca gcctgaaggc ctcggacacc gcatgtatt actgtgcgag 600

acacacagtg agagaaacca gccccgagcc cgtctaaaac cctccacacc gcaggtgcag 660

aatgagctgc tagagactca ctccccaggg gcctctctat 700

<210> 98  
<211> 650  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (621)  
<223> n is a, c, g, or t

<400> 98  
aggcagtc agtggctgg aaggacatac tacaggtcca agtggataa tgattatgca 60

gggcctcca tgggtcagt gtcaggaga tgccgtattc acagcagcat tcacagactg 120

agggtgttt cacttgctg tttcccttg tctccaggtg tcctgtcaca ggtacagctg 180

cagcagttagt gtcaggact ggtgaagccc tcgcagaccc tctcaactac ctgtgccatc 240

tccgggaca gtgtctctag caacagtgtc gcttggact ggatcaggca gtccccatcg 300

agaggcattt agtggctgg aaggacatac tacaggtcca agtggataa tgattatgca 360

gtatctgtga aaagtcaat aaccatcaac ccagacacat ccaagaacca gttccctg 420

cagctgaact ctgtgactcc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcaag agacacagtg 480

agggaagtc agtgtgagcc cagacacaaa cctccctgca gggatgctca ggaccccaga 540

aggcaccac cactaccaggc gcagggccca gaccaggagc aggtgtggag ttaagcaaaa 600

atgaaacttc ttgtgtgtc nttaactgtt gttgttttt tttttttt 650

<210> 99  
<211> 388  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 99	
taaggggctc cccagtcact gggctgaggg agaaaccagc acagtcaagt gagacttcat	60
gcactccat ctccctcca caggtgccca ctcccaggtg cagctggtgc aatctggtc	120
tgagttgaag aagcctgggg cctcagtgaa gtttcctgc aaggctctg gatacacctt	180
cactagctat gctatgaatt gggtgcgaca gcccctgga caaggcctg agtggatgg	240
atggatcaac accaacactg gaaacccaac gtatgccag ggcttcacag gacggttgt	300
cttcccttg gacacctctg tcagcacggc atatctgcag atctgcagcc taaaggctga	360
ggacactgcc gtgtattact gtgcgaga	388

<210> 100	
<211> 294	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	

<400> 100	
caggtgcagc tggcagtc tggccatgag gtgaagcagc ctggggctc agtgaaggc	60
tcctgcaagg ctctggta cagttcacc acctatggta tgaattgggt gccacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagtg gatggatgg ttcaacacct acactggaa cccacat	180
gcccaggcgt tcacaggacg gttgtctc tccatggaca cctctgccag cacagcatac	240
ctgcagatca gcagcataaa ggctgaggac atggccatgt attactgtgc gaga	294

<210> 101	
<211> 6	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	

<220>	
<223> Vh Sequence at Kabat positions 108-113 of mouse/human modified antigen binding molecule	

<400> 101  
Gly Ala Glu Leu Lys Lys  
1 5

<210> 102  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Vh Sequence at Kabat positions 108-113 of mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 102  
Gly Ala Glu Val Val Lys  
1 5

<210> 103  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Vh Sequence at Kabat positions 108-113 of mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 103  
Gly Gly Glu Val Lys Lys  
1 5

<210> 104  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Vh Sequence at Kabat positions 108-113 of mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 104  
 Gly Ala Gly Val Lys Lys  
 1 5

<210> 105  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Vh Sequence at Kabat positions 108-113 of mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 105  
 Gly Gly Gly Val Val Lys  
 1 5

<210> 106  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Vh Sequence at Kabat positions 108-113 of mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 106  
 Leu Val Thr Val Ser Ser  
 1 5

<210> 107  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Vh Sequence at Kabat positions 108-113 of mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 107  
 Leu Val Ile Val Ser Ser

1 5

<210> 108  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Vh Sequence at Kabat positions 108-113 of mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 108  
Leu Val Thr Val Ile Ser  
1 5

<210> 109  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Vh Sequence at Kabat positions 108-113 of mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 109  
Leu Val Ile Val Ile Ser  
1 5

<210> 110  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Vh Sequence at Kabat positions 108-113 of mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 110  
Leu Val Gly Val Ser Ser  
1 5

<210> 111  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Vh Sequence at Kabat positions 108-113 of mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 111  
Leu Val Thr Val Gly Ser  
1 5

<210> 112  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Vh Sequence at Kabat positions 108-113 of mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 112  
Leu Val Gly Val Gly Ser  
1 5

<210> 113  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Vh Sequence at Kabat positions 108-113 of mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 113  
Leu Val Ala Val Ser Ser  
1 5

<210> 114  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Vh Sequence at Kabat positions 108-113 of mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 114  
Leu Val Thr Val Ala Ser  
1 5

<210> 115  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Vh Sequence at Kabat positions 108-113 of mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 115  
Leu Val Ala Val Ala Ser  
1 5

<210> 116  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Vh Sequence at Kabat positions 108-113 of mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 116  
Leu Val Val Val Ser Ser  
1 5

<210> 117  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Vh Sequence at Kabat positions 108-113 of mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 117  
Leu Val Thr Val Val Ser  
1 5

<210> 118  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Vh Sequence at Kabat positions 108-113 of mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 118  
Leu Val Val Val Val Ser  
1 5

<210> 119  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Vh Sequence at Kabat positions 108-113 of mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 119  
Leu Val Leu Val Ser Ser  
1 5

<210> 120  
<211> 6

<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Vh Sequence at Kabat positions 108-113 of mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 120  
Leu Val Thr Val Leu Ser  
1 5

<210> 121  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Vh Sequence at Kabat positions 108-113 of mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 121  
Leu Val Leu Val Leu Ser  
1 5

<210> 122  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Vh Sequence at Kabat positions 108-113 of mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 122  
Leu Val Ser Val Ser Ser  
1 5

<210> 123  
<211> 6  
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VH Sequence at Kabat positions 108-113 of mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 123

Leu Val Thr Val Thr Ser  
1 5

<210> 124

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> B-HH2A construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 124

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 125  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> B-HH2B construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 125  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 126  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> B-HH2C construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 126

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 127

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> B-HH2D construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 127

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

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

20 25 30

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 128  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> B-HH2E construct of a mouse/human modified antigen binding  
 molecule

<400> 128  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15

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

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

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

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

65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Ile Val Ser Ser  
115

<210> 129  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> B-HH2F construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 129  
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ile Ser

115

<210> 130  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> B-KV10 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 130  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30

Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Ala Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn  
 85 90 95

Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

Arg Thr Val  
 115

<210> 131  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> B-KV11 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 131

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn  
85 90 95

Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

Arg Thr Val  
115

<210> 132

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> B-KV12 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400> 132

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

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

Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gln	Met	Ser	Asn	Leu	Val	Ser	Gly	Val	Pro
50				55											

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

Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Phe	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gln	Asn
85					90										95

Leu	Glu	Leu	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
100					105									

Arg	Thr	Val
		115

<210>	133
<211>	115
<212>	PRT
<213>	Artificial Sequence

<220>	
<223>	B-KV13 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule

<400>	133														
Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
1				5											15

Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	His	Ser
					20			25			30				

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

Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gln	Met	Ser	Asn	Leu	Val	Ser	Gly	Val	Pro
50				55											60

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

65	70	75	80
----	----	----	----

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn	85	90	95
---	----	----	----

Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Ala Ile Lys	100	105	110
---	-----	-----	-----

Arg Thr Val	115
-------------	-----

<210> 134
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> B-KV14 construct of a mouse/human modified antigen binding molecule
---

<400> 134				
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly	1	5	10	15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser	20	25	30
---	----	----	----

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro	50	55	60
---	----	----	----

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn	85	90	95
---	----	----	----

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

Arg Thr Val
-------------

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 제17항

【변경전】

숙주세포: c. SEQ ID NO:

【변경후】

숙주세포: SEQ ID NO:

【직권보정 2】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 제1항

【변경전】

프래그먼트: c. SEQ ID NO:

【변경후】

프래그먼트: SEQ ID NO: