(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0090525
(43) 공개일자 2017년08월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) *C07K 16/32* (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/395 (2013.01)
C07K 16/2803 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7021094(분할)
(22) 출원일자(국제) 2009년12월17일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2011-7016177
원출원일자(국제) 2009년12월17일
심사청구일자 2014년09월26일
(85) 번역문제출일자 2017년07월27일
(86) 국제출원번호 PCT/US2009/068577
(87) 국제공개번호 WO 2010/080538
국제공개일자 2010년07월15일
(30) 우선권주장
61/139,352 2008년12월19일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
마크로제닉스, 인크.
미국 메릴랜드주 20850 록빌 메디칼 센터 드라이브 9704
(72) 발명자
존슨 레슬리 에스
미국 매릴랜드 20874 단스타운 파플라 힐 로드 14411
후앙 링
미국 매릴랜드 20817 베데스다 모어랜드 로드 8210
(74) 대리인
송봉식, 정삼영

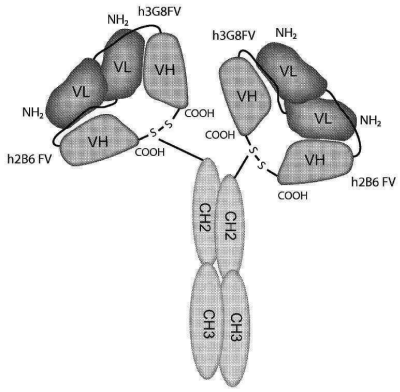
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 **공유결합형 디아바디 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 디아바디(Diabody) 분자와, 면역질환, 감염증, 중독, 암을 포함하는 다양한 질환 및 장애의 치료에 있어서 그 사용에 관한 것이다. 본 발명의 디아바디 분자는 동일 또는 다른 항원상의 동일 또는 다른 에피토프를 인식하는 적어도 2개의 에피토프 결합 부위를 형성하도록 결합되어 있는 2개의 폴리펩티드 사슬을 포함한다. 또한, 항원은 동일 또는 다른 분자에서 유래해도 좋다. 디아바디 분자의 각각의 폴리펩티드 사슬은, 비펩티드 결합형 공유결합을 통하여 공유결합되어 있고, 예를 들면, 각 폴리펩티드 사슬내에 존재하는 시스테인 잔기의 이황화 결합에 의해 공유결합되어 있을 수 있지만, 이것에 한정되는 것은 아니다. 특정의 구체예에서, 본 발명의 디아바디 분자는 해당 분자에 항체 유사 기능성을 허용하는 Fc 영역을 더 포함한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C07K 16/2809 (2013.01)
C07K 16/283 (2013.01)
C07K 16/32 (2013.01)
C07K 16/44 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/34 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/56 (2013.01)
C07K 2317/626 (2013.01)

(30) 우선권주장
61/156,035 2009년02월27일 미국(US)
61/256,779 2009년10월30일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

제 1 폴리펩티드 사슬과 제 2 폴리펩티드 사슬을 포함하는 디아바디 분자로서, 상기 폴리펩티드 사슬은 서로 공유결합으로 결합되고,

여기서,

I. 상기 제 1 폴리펩티드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로 (i) 에피토프(1)에 특이적인 제 1 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인의 결합 영역(VL1)을 포함하는 제 1 도메인, (ii) 에피토프(2)에 특이적인 제 2 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인의 결합 영역(VH2)을 포함하는 제 2 도메인, 및 (iii) 자발적으로 나선형 배좌(helical conformation)를 취하는 양성 또는 음성 전하를 띤 폴리펩티드 도메인을 포함하고;

제 1 도메인과 제 2 도메인은 공유결합으로 연결되어 있지만, 제 1 도메인과 제 2 도메인이 상기 에피토프(1) 결합 부위 또는 상기 에피토프(2) 결합 부위를 형성하도록 함께 회합(association)하는 것은 아니고;

II. 상기 제 2 폴리펩티드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로 (i) 상기 에피토프(2)에 특이적인 제 2 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인의 결합 영역(VL2)을 포함하는 제 4 도메인, (ii) 상기 에피토프(1)에 특이적인 제 1 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인의 결합 영역(VH1)을 포함하는 제 5 도메인, 및 (iii) 자발적으로 나선형 배좌를 취하는 음성 또는 양성 전하를 띤 폴리펩티드 도메인을 포함하고, 상기 제 1 및 제 2 폴리펩티드 사슬 중 하나는 상기 양성 전하를 띤 폴리펩티드 도메인을 함유하고 상기 제 1 및 제 2 폴리펩티드 사슬의 다른 하나는 상기 음성 전하를 띤 폴리펩티드 도메인을 함유하고;

제 4 도메인과 제 5 도메인은 공유결합으로 연결되어 있지만, 제 4 도메인과 제 5 도메인이 상기 에피토프(1) 결합 부위 또는 상기 에피토프(2) 결합 부위를 형성하도록 함께 회합하는 것은 아니고;

제 1 도메인과 제 5 도메인은 상기 에피토프(1)를 결합하는 결합 부위(VL1)(VH1)를 형성하도록 함께 회합하고; 및

제 2 도메인과 제 4 도메인은 상기 에피토프(2)를 결합하는 결합 부위(VL2)(VH2)를 형성하도록 함께 회합하는 디아바디 분자.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 제 1 폴리펩티드 사슬은 상기 전하를 띤 폴리펩티드 도메인에 의해 상기 제 2 도메인으로부터 분리된 제 3 도메인을 추가로 포함하고, 상기 제 3 도메인은 Fc 도메인 또는 그 일부인 것을 특징으로 하는 디아바디 분자.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 제 2 폴리펩티드 사슬은 상기 전하를 띤 폴리펩티드 도메인에 의해 상기 제 5 도메인으로부터 분리된 제 6 도메인을 추가로 포함하고, 상기 제 6 도메인은 Fc 도메인 또는 그 일부인 것을 특징으로 하는 디아바디 분자.

청구항 4

제 2 항에 있어서, 상기 디아바디는 제 3 폴리펩티드 사슬과 제 4 폴리펩티드 사슬을 추가로 포함하는 디아바디 분자로서, 상기 제 3 및 제 4 폴리펩티드 사슬은 서로 공유결합으로 결합되고,

여기서,

III. 상기 제 3 폴리펩티드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로 (i) 에피토프(3)에 특이적인 제 3 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인의 결합 영역(VL3)을 포함하는 제 7 도메인, (ii) 에피토프(4)에 특이적인 제 4 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인의 결합 영역(VH2)을 포함하는 제 8 도메인, (iii) 자발적으로 나선형 배좌를 취하는 양성 또는 음성 전하를 띤 폴리펩티드 도메인, 및 (iv) Fc 도메인 또는 그 부분인 제 9 도메인을 포함하고;

제 7 도메인과 제 8 도메인은 공유결합으로 연결되어 있지만, 제 1 도메인과 제 2 도메인이 상기 에피토프(3) 결합 부위 또는 상기 에피토프(4) 결합 부위를 형성하도록 함께 회합하는 것은 아니고;

IV. 상기 제 4 폴리펩티드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로 (i) 상기 에피토프(4)에 특이적인 제 4 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인의 결합 영역(VL2)을 포함하는 제 10 도메인, (ii) 상기 에피토프(3)에 특이적인 제 3 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인의 결합 영역(VH3)을 포함하는 제 11 도메인, 및 (iii) 자발적으로 나선형 배좌를 취하는 음성 또는 양성 전하를 띤 폴리펩티드 도메인을 포함하고, 상기 제 3 및 제 4 폴리펩티드 사슬 중 하나는 상기 양성 전하를 띤 폴리펩티드 도메인을 함유하고 상기 제 3 및 제 4 폴리펩티드 사슬의 다른 하나는 상기 음성 전하를 띤 폴리펩티드 도메인을 함유하고;

제 10 도메인과 제 11 도메인은 공유결합으로 연결되어 있지만, 제 10 도메인과 제 11 도메인이 상기 에피토프(3) 결합 부위 또는 상기 에피토프(4) 결합 부위를 형성하도록 함께 회합하는 것은 아니고;

제 7 도메인과 제 11 도메인은 상기 에피토프(3)를 결합하는 결합 부위(VL3)(VH3)를 형성하도록 함께 회합하고; 및

제 8 도메인과 제 10 도메인은 상기 에피토프(4)를 결합하는 결합 부위(VL4)(VH4)를 형성하도록 함께 회합하는 디아바디 분자.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 자발적으로 나선형 배좌를 취하는 상기 음성 전하를 띤 폴리펩티드 도메인은 E-코일(서열번호 299)인 것을 특징으로 하는 디아바디 분자.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 자발적으로 나선형 배좌를 취하는 상기 양성 전하를 띤 폴리펩티드 도메인은 K-코일(서열번호 300)인 것을 특징으로 하는 디아바디 분자.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 제 1 폴리펩티드 사슬은 혈청 단백질에 결합하는 단백질의 폴리펩티드 부분을 추가로 포함하고, 상기 폴리펩티드 부분은 상기 혈청 단백질에 결합할 수 있는 것을 특징으로 하는 디아바디 분자.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 제 2 폴리펩티드 사슬은 혈청 단백질에 결합하는 단백질의 폴리펩티드 부분을 추가로 포함하고, 상기 폴리펩티드 부분은 상기 혈청 단백질에 결합할 수 있는 것을 특징으로 하는 디아바디 분자.

청구항 9

제 7 항 또는 제 8 항에 있어서, 혈청 단백질에 결합하는 상기 단백질은 알부민 결합 단백질인 것을 특징으로 하는 디아바디 분자.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 알부민 결합 단백질은 연쇄상구균 단백질 G이고, 상기 폴리펩티드 부분은 상기 연쇄상구균 단백질 G의 알부민-결합 도메인(ABD)인 것을 특징으로 하는 디아바디 분자.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 연쇄상구균 단백질 G의 알부민 결합 단백질(ABD)는 스트렙토코쿠스 균주 G148(Streptococcus strain G148)의 단백질 G의 알부민-결합 도메인(ABD)인 것을 특징으로 하는 디아바디 분자.

청구항 12

제 7 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 디아바디 분자는 2시간 초과의 생체 내 혈청 반감기를 나타내는 것을 특징으로 하는 디아바디 분자.

청구항 13

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서, CD32B의 에피토프에 결합하는 도메인 및 CD16의 에피토프에 결합하는 도메인을 갖는 것을 특징으로 하는 디아바디 분자.

청구항 14

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서, 자연 살해 그룹 2D(NKG2D) 수용체에 대한 결합 리간드인 도메인을 갖는 것을 특징으로 하는 디아바디 분자.

청구항 15

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서, T-세포 수용체(TCR) 결합 도메인에 대한 결합 리간드인 도메인을 갖는 디아바디 분자.

청구항 16

제 1 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분자는 종양-연관 항원에 결합하는 것을 특징으로 하는 디아바디 분자.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 상기 종양-연관 항원은 유방암 항원, 난소암 항원, 전립선암 항원, 자궁 경부암 항원, 췌장암 항원, 폐암 항원, 방광암 항원, 결장암 항원, 고환암 항원, 교모세포종 암 항원, B 세포 악성 종양과 관련된 항원, 다발성 골수종과 관련된 항원, 비-호지킨 림프종과 관련된 항원, 또는 만성 림프구성 백혈병과 관련된 항원인 것을 특징으로 하는 디아바디 분자.

청구항 18

제 16 항에 있어서, 상기 종양-연관 항원은 A33; ADAM-9; ALCAM; B1; BAGE; 베타-카테닌; CA125; 카르복시펩티다아제 M; CD5; CD19; CD20; CD22; CD23; CD25; CD27; CD28; CD32B; CD36; CD40; CD45; CD46; CD56; CD79a; CD79b; CD103; CD154; CDK4; CEA; CTLA4; 사이토케라틴 8; EGF-R; 에프린 수용체; ErbB1; ErbB3; ErbB4; GAGE-1; GAGE-2; GD2; GD3; GM2; gp100; HER-2/neu; 인간 파필로마바이러스-E6; 인간 파필로마바이러스-E7; 인테그린 알파-V-베타-6; JAM-3; KID3; KID31; KSA(17-1A); LUCA-2; MAGE-1; MAGE-3; MART; MUC-1; MUM-1; N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라아제; 온코스타틴 M(온코스타틴 수용체 베타); p15; PIPA; PSA; PSMA; RAAG10; ROR1; SART; sTn; TES7; TNF-α 수용체; TNF-β 수용체; TNF-γ 수용체; 트랜스페린 수용체 또는 VEGF 수용체인 것을 특징으로 하는 디아바디 분자.

청구항 19

제 18 항에 있어서, 상기 종양-연관 항원은 HER-2/neu인 것을 특징으로 하는 디아바디 분자.

청구항 20

제 1 폴리펩티드와 제 2 폴리펩티드를 포함하는 디아바디 분자로서, 상기 제 1 폴리펩티드 사슬 및 상기 제 2 폴리펩티드 사슬은 서로 공유결합으로 연결되지만, 공유결합은 펩티드 결합이 아니고,

여기서,

상기 제 1 폴리펩티드 사슬은, (i) CD32B에 특이적인 제 1 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인의 결합 영역(VL1)을 포함하는 제 1 도메인, (ii) CD79B에 특이적인 제 2 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인의 결합 영역(VH2)을 포함하는 제 2 도메인, 및 (iii) 적어도 하나의 시스테인 잔기, 및 E-코일 분리자(서열번호 299) 또는 K-코일 분리자(서열번호 300)를 포함하는 제 3 도메인을 포함하고, 제 1 도메인과 제 2 도메인은 공유결합으로 연결되어 있지만, 제 1 도메인과 제 2 도메인이 상기 제 1 에피토프 결합 부위 또는 상기 에피토프(2) 결합 부위를 형성하도록 회합하는 것은 아니고;

상기 제 2 폴리펩티드 사슬은, (i) CD79b에 특이적인 제 2 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인의 결합 영역(VL2)을 포함하는 제 4 도메인, (ii) CD32B에 특이적인 제 1 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인의 결합 영역(VH1)을 포함하는 제 5 도메인, 및 (iii) 적어도 하나의 시스테인 잔기, 및 E-코일 분리자(서열번호 299) 또는 K-코일

분리자(서열번호 300)를 포함하는 제 6 도메인을 포함하고, 제 4 도메인과 제 5 도메인은 공유결합으로 연결되어 있지만, 제 4 도메인과 제 5 도메인이 에피토프 결합 부위를 형성하도록 회합하는 것은 아니고;

상기 제 3 및 제 6 도메인의 상기 시스테인 잔기는 상기 제 1 및 제 2 폴리펩티드 사슬 사이에서 이황화 결합을 형성하고;

상기 제 1 폴리펩티드 사슬이 상기 E-코일 분리자를 포함할 때, 상기 제 2 폴리펩티드 사슬은 상기 K-코일 분리자를 포함하고; 상기 제 1 폴리펩티드 사슬이 K-코일 분리자를 포함할 때, 상기 제 2 폴리펩티드 사슬은 E-코일 분리자를 포함하고;

제 1 도메인과 제 5 도메인은 CD32B에 결합하는 제 1 결합 부위 (VL1)(VH1)를 형성하기 위하여 회합하고;

제 2 도메인과 제 4 도메인은 CD79b에 결합하는 제 2 결합 부위 (VL2)(VH2)를 형성하기 위하여 회합하는 디아바디 분자.

청구항 21

제 20 항에 있어서, 상기 제 1 폴리펩티드 사슬 또는 상기 제 2 폴리펩티드 사슬은 Fc 도메인 또는 그 부분을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 디아바디 분자.

청구항 22

제 21 항에 있어서, 상기 Fc 도메인 또는 그 부분은 상기 E-코일 분리자 또는 상기 K-코일 분리자에 연결되는 것을 특징으로 하는 디아바디 분자.

청구항 23

제 21 항에 있어서, 상기 Fc 도메인 또는 그 부분은 상기 제 1 도메인 또는 상기 제 4 도메인의 N-말단에 연결되는 것을 특징으로 하는 디아바디 분자.

청구항 24

제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항의 디아바디 분자 및 생리학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 25

암 또는 자가면역 장애 또는 증상의 치료를 위한 약제의 제조에서 제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 따른 디아바디 분자, 또는 제 24 항의 약학적 조성물의 사용.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 미국 특허 출원 제 60/671,657호(2005년 4월 15일 출원; 소멸); 11/409,339(2006년 4월 17일 출원; 계류 중); PCT/US06/014481(2006년 4월 17일 출원; 소멸); 60/945,523(2007년 6월 21일 출원; 소멸), 61/019,051(2008년 1월 4일 출원; 소멸); 12/138,867(2008년 6월 13일 출원, 계류 중), PCT/US08/066957(2008년 6월 13일 출원, 계류 중), 61/139,352(2008년 9월 19일 출원, 계류 중), 61/156,035(2009년 2월 27일 출원, 계류 중) 및 61/256,779(2009년 10월 30일 출원; 계류 중)의 이익을 주장하는 것으로, 이들 출원의 전체 내용은 참고 문헌으로서 본 명세서에 포함된다.

[0002] **1. 발명의 분야**

[0003] 본 발명은 달리 "이중 친화성 재표적화 시약"("DART")으로도 불리는 디아바디(diabody) 분자와 면역질환이나 암을 포함하는 다양한 질환 및 장애의 치료에 있어서 그 사용에 관한 것이다. 본 발명의 디아바디 분자는 동일 또는 다른 에피토프를 인식하는 적어도 2개의 에피토프 결합부위를 형성하도록 결합되어 있는 적어도 2개의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 것이다. 또한, 에피토프는 동일 또는 다른 분자에 유래해도, 동일 또는 다른 세포상에 위치해도 좋다. 디아바디 분자의 각각의 폴리펩티드 사슬은, 비펩티드 결합형 공유결합을 통하여 공유결합되어 있고, 예를 들면, 각 폴리펩티드 사슬내에 존재하는 시스테인 잔기의 이황화 결합에 의해 공유결합되어 있지만, 이것에 한정되는 것은 아니다. 특정의 구체예에서, 본 발명의 디아바디 분자는 해당 분자에 항체 유사 기능성을

허용하는 Fc 영역을 더 포함한다.

배 경 기 술

[0004] **2. 발명의 배경**

[0005] 공유결합형 디아바디(covalent diabody)의 설계는, 단일쇄 Fv 컨스트럭트(scFv)에 기초하고 있다(Holliger et al.(1993) ''Diabodies': Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments,' Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; 그 전체가 참고문헌으로서 본 발명에 포함됨). 완전한 비변형된 IgG에서는, VL 및 VH 도메인이 각각의 폴리펩티드 사슬, 즉, 각각 경쇄와 중쇄에 위치하고 있다. 항체 경쇄와 항체 중쇄의 상호작용, 특히 VL 도메인 및 VH 도메인의 상호작용에 의해, 이 항체의 에피토프 결합부위의 1개가 형성된다. 이에 대하여, scFv 컨스트럭트에는 항체의 VL 및 VH 도메인이 단일의 폴리펩티드 사슬로 포함되어 있지만, 이들의 도메인은 기능성의 에피토프 결합부위로 이들 2개의 도메인이 자기집합(self-assembly)하는 것을 가능하게 하는, 충분한 길이의 유연성 링커에 의해 분리되어 있다. 링커의 길이가 불충분하기 때문에(약 12 아미노산 잔기보다 짧기때문에), 이들의 도메인이 자기집합할 수 없는 경우에는, 2개의 scFv 컨스트럭트가 상호작용하여 2가의 분자를 형성한다(Marvin et al.(2005) "Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies", Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658). 또한, 이 컨스트럭트의 C 말단에 시스테인 잔기는 그 2가 분자의 결합특성의 방해없이 안정화하는 것을 알 수 있다(예를 들면, Olafsen et al.(2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CE디아바디 Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications," Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27 참조). 더욱이, 특이성이 다르게 되어 있는 VL 및 VH 도메인을 선택하는 경우에는, 2가 뿐만 아니라 이중 특이성을 나타내는 분자를 구성하는 것이 가능하다.

[0006] 2가의 디아바디는 치료나 면역진단을 포함하여 광범위한 용도를 갖는다. 2가로 하면 다양한 용도에서의 디아바디의 설계 및 공학적 조작이 상당히 유연하게 되고, 다량체 항원에 대한 결합활성의 향상, 다르게 되어 있는 항원의 가교, 양표적항원의 존재에 의존하는 특정의 세포형으로의 직접적인 디아바디가 가능하게 된다. 이들의 증대한 결합가, 낮은 해리속도 및 (약 50kDa 이하의 작은 사이즈의 디아바디의 경우는) 순환계로부터의 빠른 클리어런스(clearance) 때문에, 당해 기술분야에서 공지된 디아바디 분자는 종양 이미징의 분야에서도 특별히 사용하고 있다(Fitzgerald et al.(1997) "Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In Pichia pastoris," Protein Eng. 10: 1221). 다른 세포의 가교, 예를 들면 세포독성 T 세포의 종양세포에의 가교는 특히 중요하다(Staerz et al.(1985) "Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells," Nature 314:628-631; 및 Holliger et al.(1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody," Protein Eng. 9:299-305). 디아바디의 에피토프 결합 도메인은 또한, T 림프구, 내추럴킬러(NK)세포 또는 다른 단핵세포상에 발현되는 CD3, CD16, CD32 또는 CD64와 같은 면역이펙터(effector) 세포의 표면 결정기에도 관련할 수 있다. 많은 연구에 있어서, 이펙터 세포의 결정기, 예를 들면 Fcɣ 수용체(FcɣR)에의 디아바디 결합은 또한 이펙터 세포를 활성화하는 것을 발견하였다(Holliger et al.(1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody," Protein Eng. 9:299-305; Holliger et al.(1999) " Car cino embryonic Antigen(CEA)-Specific T-cell Activation In Colon Carcinoma Induced By Anti-CD 3x Anti-CEA Bispecific Diabodies And B7 x Anti-CEA Bispecific Fusion Proteins," Cancer Res. 59:2909-2916). 통상, 이펙터 세포의 활성화는, 항원과 결합한 항체가 Fc-FcɣR 상호작용을 통하여 이펙터 세포에 결합하는 것에 의해 개시된다. 그러나, 이것과 관련하여, 본 발명의 디아바디 분자는 이들이 Fc 도메인을 포함할지 여부에 관한 것이 아니라, (예를 들면, 당해 기술분야에서 알려진 또는 본 명세서에 예시된 이펙터 기능 분석(예, ADCC 분석)으로 분석할 경우) Ig 유사 기능을 나타내는 것이 가능하다. 종양세포와 이펙터 세포를 가교시키는 것에 의해, 디아바디는 종양세포의 가까이에 이펙터 세포를 끌어당길 뿐 아니라, 종양의 효과적인 사멸을 이끈다(Cao et al.(2003) "Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics," Adv. Drug. Deliv. Rev. 55:171-197, hereby incorporated by reference herein in its entirety).

[0007] **2.1 이펙터 세포 수용체 및 면역계에 있어서의 그 역할**

[0008] 전통적인 면역기능에서는 항체-항원 복합체와 면역계의 세포와의 상호작용은 광범위한 반응을 일으키고, 그 범위는 이펙터 기능(예, 항체 의존성 세포 독성 작용, 마스트 세포(mast cell) 탈과립 및 식작용)부터 면역 조절 시그널(예, 림프구 증식 및 항체 분비의 조절)에 이른다. 이들의 상호작용은 전부 항체 또는 면역 복합체의 Fc 도메인이 조혈세포상의 특수한 세포 표면 수용체와 결합하는 것에 의해 개시된다. 항체와 면역 복합체에 의해 개시되는 세포 반응의 다양성은, Fc 수용체의 구조상의 불균일성을 통해 개시된다. Fc 수용체는 세포내 시그널

전달을 매개한다고 생각되는 구조적으로 관련있는 항원 결합 도메인을 공유한다.

[0009] 단백질의 면역글로불린 유전자 슈퍼패밀리의 멤버인 Fcɣ 수용체는, 면역글로불린 분자의 Fcɣ 부분과 결합하는 것이 가능한 표면 당단백질이다. 이 패밀리의 각 멤버는 Fcɣ 수용체의 알파(α)쇄상의 인식 도메인을 통하여 1 이상의 이소타입(isotype)의 면역글로불린을 인식한다. Fcɣ 수용체는 면역글로불린 서브타입에 대한 그 특이성에 의해 정의된다. IgG에 대한 Fcɣ 수용체는 FcɣR로, IgE에 대한 것은 FcεR로, 그리고 IgA에 대한 것은 FcαR로 불린다. 여러가지 악세서리 세포가 다른 이소타입의 항체에 대한 Fcɣ 수용체를 갖고, 항체의 이소타입이 소정의 반응에 어느 악세서리 세포가 관련되는지를 결정한다(reviewed by Ravetch J.V. et al.(1991) "Fc Receptors," Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92; Gerber J.S. et al.(2001) "Stimulatory And Inhibitory Signals Originating From The Macrophage Fcgamma Receptors," Microbes and Infection, 3: 131-139; Billadeau D.D. et al.(2002),"ITAMs Versus ITIMs: Striking A Balance During Cell Regulation," The Journal of Clinical Investigation, 2(109): 161-1681; Ravetch J.V. et al.(2000) "Immune Inhibitory Receptors," Science, 290: 84-89; Ravetch J.V. et al., (2001) "IgG Fc Receptors," Anmi. Rev. Immunol. 19:275-90; Ravetch J.V.(1994) "Fc Receptors: Rubor Redux," Cell, 78(4): 553-60). The different Fcɣ receptors, the cells that express them, and their isotype specificity is summarized in Table 1(adapted from Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4th ed. 1999, Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, New York).

[0010] ***Fcɣ 수용체***

[0011] 이 패밀리의 각 멤버는, 면역글로불린 관련 도메인의 C2 세트에 관한 세포외 도메인, 1회 막관통 도메인 및 가변 길이의 세포질내 도메인을 갖는 내재성 막 당단백질이다. 3종의 공지의 FcɣR이 있고, 각각 FcɣRI(CD64), FcɣRII(CD32), and FcɣRIII(CD16)이라 한다. 이 3종의 수용체는 다른 유전자에 의해 코드되고; 그러나 이 3종의 패밀리 멤버간의 광범위한 상동성은, 이들이 공통의 선조로부터, 유전자 복제에 의해 발생한 것임을 시사한다

[0012] ***FcɣRII(CD32)***

[0013] FcɣRII 단백질은 40kDa의 내재성 막 당단백질이고, 모노머 Ig에 대하여 저친화성(10^6M^{-1})이기 때문에 복합체화한 IgG와만 결합한다. 이 수용체는 단구, 마크로파지, B세포, NK 세포, 호중구, 마스트 세포 및 혈소판을 포함하여, 모든 조혈세포상에 존재하는 가장 광범위하게 발현되는 FcɣR이다. FcɣRII는, 이 면역글로불린 결합쇄중에 면역글로불린 유사 영역을 2개만 갖고 있고, 따라서 IgG에 대하여 FcɣRI 보다 훨씬 더 낮은 친화성을 갖는다. 3종의 인간 FcɣRII 유전자(FcɣRII-A, FcɣRII-B, FcɣRII-C)가 존재하고, 이들은 전부 응집체 또는 면역복합체의 IgG과 결합한다.

[0014] FcɣRII-A와 FcɣRII-B의 세포질내 도메인내에는 명확한 차이가 있기 때문에, 수용체 라이게이션(ligation)에 대하여 2개의 기능적으로 이종의 반응을 창출한다. 기본적인 차이는, A 이소형(isoform)이 세포활성화(예, 식작용 및 호흡 버스트(burst)에 이르는 세포내 시그널 전달을 개시하는 반면, B 이소형은 억제적 시그널을 개시하고, 예를 들면 B 세포 활성화를 억제하는 것에 있다.

[0015] ***FcɣRIII(CD16)***

[0016] 이 클래스의 불균일성 때문에, FcɣRIII의 사이즈는 마우스 및 인간에서 40 내지 80kDa의 범위에 있다. 2개의 인간 유전자가 2종의 전사산물을 코드하고, 즉, 내재성 막 당단백질의 FcɣRIIIA와, 글리코실포스파티딜-이노시톨(GPI) 결합형의 FcɣRIIIB를 코드한다. 1개의 마우스 유전자는 막관통 인간 FcɣRIIIA에 상동성의 FcɣRIII를 코드하고 있다. FcɣRIII는 다른 2개의 FcɣR의 각각과 구조상의 특징을 공유한다. FcɣRII와 같이, FcɣRIII는 낮은 친화성으로 IgG와 결합하고, 대응하는 2개의 세포외 Ig 유사 도메인을 포함한다. FcɣRIIIA는 마크로파지, 마스트 세포로 발현되고, NK 세포에서는 유일한 FcɣR이다. GPI 결합형의 FcɣRIIIB는 현재 인간 호중구에서만 발현되는 것이 알려져 있다.

[0017] ***FcɣR을 통한 시그널 전달***

[0018] 활성화와 억제 양쪽의 시그널은, 라이게이션 후에 FcɣR을 통하여 전달된다. 이들의 정반대의 기능은, 다른 수용체 이소형 간의 구조상의 상위에 기인한다. 수용체의 세포질내 시그널 전달 도메인내의 2개의 다른 도메인, 즉 면역 수용체 티로신계 활성화 모티프(ITAM) 또는 면역 수용체 티로신계 억제 모티프(ITIMS)가, 이 다른 반응의 원인으로 된다. 이들의 구조체에의 다른 세포질 효소의 회수(recruitment)가 FcɣR 매개 세포 반응의 결과를

규정한다. ITAM 함유 FcγR 복합체에는 FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA가 포함되어 있지만, ITIM 함유 복합체에는 FcγRIIB만 함유되어 있다.

[0019] 인간 호중구는 FcγRIIA 유전자를 발현한다. 면역 복합체 또는 특이적 항체 가교를 매개하는 FcγRIIA 클래스터 형성은, ITAM을 ITAM 인산화를 용이하게 하는 수용체 관련 키나제와 함께 응집시키도록 작용한다. ITAM 인산화는 Syk 키나제에 대한 도킹 영역로서 작용하고, Syk 키나제의 활성화는 하류의 기질(예, PI_3K)의 활성화를 유도한다. 세포 활성화에 의해 전염증성 매개체가 방출된다.

[0020] FcγRIIB 유전자는 B 림프구상에 발현되고, 이 세포외 도메인은 FcγRIIA와 96% 동일하고, 식별가능하지 않은 형식으로 IgG 복합체와 결합한다. FcγRIIB의 세포외 도메인중의 ITIM의 존재가, FcγR의 억제 서브클래스를 규정한다. 최근, 이 억제의 분자적 기초가 확립되었다. 활성화 FcγR와 함께 결합하면, FcγRIIB 중의 ITIM은 인산화되고, 이노시톨 폴리인산 5'-포스파타제(SHIP)의 SH2 도메인을 끌어들이고, 이것이 포스포이노시톨 메신저(ITAM 함유 FcγR 개재의 티로신 키나제 활성화의 결과로서 방출된다)를 가수분해하고, 그 결과 세포내 Ca^{++}의 유입을 억제한다. 따라서, FcγRIIB의 가교는, FcγR 라이게이션에 대한 활성화 반응을 소실시켜, 세포 반응성을 억제한다. 따라서, B세포 활성화, B세포 증식 및 항체 분비가 정지된다.

표 1

[0021] 면역글로불린 이소형의 Fc 영역에 대한 수용체

수용체	결합	세포형	라이게이션의 효과
FcγRI (CD64)	IgG1 10^8 M^{-1}	마크로파지, 호중구, 호산구, 수상세포	흡수, 자극, 호흡기 버스트의 활성화, 사멸유도
FcγRII-A (CD32)	IgG1 $2x10^6$ M^{-1}	마크로파지, 호중구, 호산구, 수상세포, 혈소판, 랑게르한스 세포	흡수, 과립방출
FcγRII-B2 (CD32)	IgG1 $2x10^6$ M^{-1}	마크로파지, 호중구, 호산구	흡수, 자극억제
FcγRII-B1 (CD32)	IgG1 $2x10^6$ M^{-1}	B 세포, 마스트 세포	흡수없음, 자극억제
FcγRIII (CD16)	IgG1 $5x10^5$ M^{-1}	NK 세포, 호산구, 마크로 파지, 호중구, 마스트 세포	사멸유도
FcεRI	IgE 10^{10} M^{-1}	마스트 세포, 호산구, 호염기구	과립분비
FcαRI (CD89)	IgA1, IgA2 10^7 M^{-1}	마크로파지, 호중구, 호산구	흡수, 사멸유도

발명의 내용

해결하려는 과제

[0022] **3. 발명의 개요**

[0023] 본 발명은, 공유결합형 디아바디 및/또는 공유결합형 디아바디 분자, 및 암, 자가면역질환, 알러지 질환, 및 세균, 진균 또는 바이러스가 원인인 감염증을 포함하는 각종의 질환 및 장애의 치료에 있어서 그 사용에 관한 것이다. 바람직하게는, 본 발명의 디아바디는 2개의 다른 세포상의 2개의 다른 에피토프에 결합하는 것이 가능하고, 여기서, 제 1 에피토프는 제 2 에피토프와는 다른 세포형에 발현되는 것으로, 그 결과 디아바디는 이들 2개의 세포를 모이게 할 수 있다.

과제의 해결 수단

[0024] 하나의 구체예에 있어서, 본 발명은 공유결합형 이중 특이성 디아바디에 관한 것으로, 이 디아바디는 제 1 및 제 2의 폴리펩티드 사슬을 함유하고 있고, 여기서, 제 1 폴리펩티드 사슬은, (i) 제 1 에피토프에 특이적인 제

1 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인의 결합 영역(VL1)을 포함하는 제 1 도메인, (ii) 제 2 에피토프에 특이적인 제 2 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인의 결합 영역(VH2)을 포함하는 제 2 도메인, 및 선택적으로(iii) 적어도 1개의 시스테인 잔기를 포함하는 제 3 도메인을 포함하고, 제 1 및 제 2의 도메인이 공유결합으로 연결되어 있지만, 제 1 및 제 2의 도메인은 에피토프 결합부위를 형성하도록 회합하는 것은 아니고; 여기서, 제 2 폴리펩티드 사슬은(i) 제 2 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인의 결합 영역(VL2)을 포함하는 제 4 도메인, (ii) 제 1 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인의 결합 영역(VH1)을 포함하는 제 5 도메인, 및 선택적으로 (iii) 적어도 1개의 시스테인 잔기를 포함하는 제 6 도메인을 포함하고, 제 4 및 제 5의 도메인이 공유결합으로 연결되어 있지만, 제 4 및 제 5의 도메인은 에피토프 결합부위를 형성하도록 회합하는 것은 아니고; 제 1 폴리펩티드 사슬과 제 2 폴리펩티드 사슬은 공유결합으로 연결되어 있지만, 이 공유결합은 펩티드 결합이 아니고; 이 경우, 제 1 도메인과 제 5 도메인이 회합하여, 제 1 에피토프와 결합하는 제 1 결합 부위(VL1)(VH1)을 형성하고; 제 2 도메인과 제 4 도메인이 회합하여, 제 2 에피토프와 결합하는 제 2 결합 부위(VL2)(VH2)를 형성한다.

[0025] 다른 구체예에서, 본 발명은 공유결합형 이중 특이성 디아바디에 관한 것으로, 이 디아바디는 제 1 및 제 2의 폴리펩티드 사슬을 포함하고, 여기서, 제 1 폴리펩티드 사슬은, (i) 제 1 에피토프에 특이적인 제 1 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인의 결합 영역(VL1)을 포함하는 제 1 도메인, (ii) 제 2 에피토프에 특이적인 제 2 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인의 결합 영역(VH2)을 포함하는 제 2 도메인, 및 (iii) Fc 도메인 또는 그 일부를 포함하는 제 3 도메인을 포함하고, 제 1 및 제 2의 도메인이 공유결합으로 연결되어 있지만, 제 1 및 제 2의 도메인은 에피토프 결합부위를 형성하도록 회합하는 것은 아니고; 여기서, 제 2 폴리펩티드 사슬은(i) 제 2 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인의 결합 영역(VL2)을 포함하는 제 4 도메인, (ii) 제 1 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인의 결합 영역(VH1)을 포함하는 제 5 도메인을 포함하고, 제 4 및 제 5의 도메인이 공유결합으로 연결되어 있지만, 제 3 및 제 4의 도메인은 에피토프 결합부위를 형성하도록 회합하는 것은 아니고; 제 1 폴리펩티드 사슬과 제 2 폴리펩티드 사슬은 공유결합으로 연결되어 있지만, 이 공유결합은 펩티드 결합은 아니고; 이 경우, 제 1 도메인과 제 5 도메인이 회합하여, 제 1 에피토프와 결합하는 제 1 결합 부위(VL1)(VH1)을 형성하고; 제 2 도메인과 제 4 도메인이 회합하여, 제 2 에피토프와 결합하는 제 2 결합 부위(VL2)(VH2)를 형성한다.

[0026] 특정의 구체예에 있어서, 본 발명은 디아바디 분자에 관한 것으로, 이 분자는 제 1 및 제 2의 폴리펩티드 사슬을 함유하고 있고, 여기서, 제 1 폴리펩티드 사슬은, (i) 제 1 에피토프에 특이적인 제 1 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인의 결합 영역(VL1)을 포함하는 제 1 도메인, (ii) 제 2 에피토프에 특이적인 제 2 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인의 결합 영역(VH2)을 포함하는 제 2 도메인, 및 (iii) Fc 도메인 또는 그 일부를 포함하는 제 3 도메인을 포함하고, 제 1 및 제 2의 도메인이 공유결합으로 연결되어 있지만, 제 1 및 제 2의 도메인은 에피토프 결합부위를 형성하도록 회합하는 것은 아니고; 여기서, 제 2 폴리펩티드 사슬은(i) 제 2 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인의 결합 영역(VL2)을 포함하는 제 4 도메인, (ii) 제 1 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인의 결합 영역(VH1)을 포함하는 제 5 도메인, 및 (iii) 적어도 1개의 시스테인 잔기를 포함하는 제 6 도메인을 포함하고, 제 4 및 제 5의 도메인이 공유결합으로 연결되어 있지만, 제 4 및 제 5의 도메인은 에피토프 결합부위를 형성하도록 회합하는 것은 아니고; 제 1 폴리펩티드 사슬과 제 2 폴리펩티드 사슬은 공유결합으로 연결되어 있지만, 이 공유결합은 펩티드 결합은 아니고; 이 경우, 제 1 도메인과 제 5 도메인이 회합하여, 제 1 에피토프와 결합하는 제 1 결합 부위(VL1)(VH1)을 형성하고; 제 2 도메인과 제 4 도메인이 회합하여, 제 2 에피토프와 결합하는 제 2 결합 부위(VL2)(VH2)를 형성한다.

[0027] 특정의 구체예에 있어서, 본 발명은 공유결합형 이중특이성 디아바디에 관한 것으로, 이 디아바디는 디아바디 분자의 2량체이고, 각각의 디아바디 분자는 제 1 및 제 2의 폴리펩티드 사슬을 함유하고 있고, 여기서, 제 1 폴리펩티드 사슬은, (i) 제 1 에피토프에 특이적인 제 1 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인의 결합 영역(VL1)을 포함하는 제 1 도메인, (ii) 제 2 에피토프에 특이적인 제 2 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인의 결합 영역(VH2)을 포함하는 제 2 도메인, 및 (iii) Fc 도메인 또는 그 일부를 포함하는 제 3 도메인을 포함하고, 제 1 및 제 2의 도메인이 공유결합으로 연결되어 있지만, 제 1 및 제 2의 도메인은 에피토프 결합부위를 형성하도록 회합하는 것은 아니고; 여기서, 제 2 폴리펩티드 사슬은(i) 제 2 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인의 결합 영역(VL2)을 포함하는 제 4 도메인, (ii) 제 1 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인의 결합 영역(VH1)을 포함하는 제 5 도메인, 및 (iii) 적어도 1개의 시스테인 잔기를 포함하는 제 6 도메인을 포함하고, 제 4 및 제 5의 도메인이 공유결합으로 연결되어 있지만, 제 4 및 제 5의 도메인은 에피토프 결합부위를 형성하도록 회합하는 것은 아니고; 각 디아바디 분자의 제 1 폴리펩티드 사슬과 제 2 폴리펩티드 사슬은 공유결합으로 연결되어 있지만, 이 공유결합은 펩티드 결합은 아니고; 이 경우, 각 디아바디 분자의 제 1 도메인과 제 5 도메인이 회합하여, 제 1 에피토프와 결합하는 제 1 결합 부위(VL1)(VH1)을 형성하고; 각 디아바디 분자의 제 2 도메인과 제 4 도메인이 회합하

여, 제 2 에피토프와 결합하는 제 2 결합 부위(VL2)(VH2)를 형성한다.

[0028] 또한, 다른 구체예에 있어서, 본 발명은 공유결합형 4중 특이성 디아바디에 관한 것으로, 이 디아바디는 디아바디 분자의 2량체이고, 제 1 디아바디 분자는 제 1 및 제 2의 폴리펩티드 사슬을 함유하고 있고, 여기서, 제 1 폴리펩티드 사슬은, (i) 제 1 에피토프에 특이적인 제 1 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인의 결합 영역(VL1)을 포함하는 제 1 도메인, (ii) 제 2 에피토프에 특이적인 제 2 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인의 결합 영역(VH2)을 포함하는 제 2 도메인, 및 (iii) Fc 도메인 또는 그 일부를 포함하는 제 3 도메인을 포함하고, 제 1 및 제 2의 도메인이 공유결합으로 연결되어 있지만, 제 1 및 제 2의 도메인은 에피토프 결합 부위를 형성하도록 회합하는 것은 아니고; 여기서, 제 2 폴리펩티드 사슬은(i) 제 2 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인의 결합 영역(VL2)을 포함하는 제 4 도메인, (ii) 제 1 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인의 결합 영역(VH1)을 포함하는 제 5 도메인, 및 (iii) 적어도 1개의 시스테인 잔기를 포함하는 제 6 도메인을 포함하고, 제 4 및 제 5의 도메인이 공유결합으로 연결되어 있지만, 제 4 및 제 5의 도메인은 에피토프 결합 부위를 형성하도록 회합하는 것은 아니고; 제 1 폴리펩티드 사슬과 제 2 폴리펩티드 사슬은 공유결합으로 연결되어 있지만, 이 공유결합은 펩티드 결합은 아니고; 이 경우, 제 1 도메인과 제 5 도메인이 회합하여, 제 1 에피토프와 결합하는 제 1 결합 부위(VL1)(VH1)을 형성하고; 제 2 도메인과 제 4 도메인이 회합하여, 제 2 에피토프와 결합하는 제 2 결합 부위(VL2)(VH2)를 형성하고; 그리고 제 2 디아바디 분자는 제 1 및 제 2의 폴리펩티드 사슬을 함유하고 있고, 여기서, 제 1 폴리펩티드 사슬은, (i) 제 3 에피토프에 특이적인 제 3 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인의 결합 영역(VL3)을 포함하는 제 1 도메인, (ii) 제 4 에피토프에 특이적인 제 4 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인의 결합 영역(VH4)을 포함하는 제 2 도메인, 및 (iii) Fc 도메인 또는 그 일부를 포함하는 제 3 도메인을 포함하고, 제 1 및 제 2의 도메인이 공유결합으로 연결되어 있지만, 제 1 및 제 2의 도메인은 에피토프 결합 부위를 형성하도록 회합하는 것은 아니고; 여기서, 제 2 폴리펩티드 사슬은(i) 제 4 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인의 결합 영역(VL4)을 포함하는 제 4 도메인, (ii) 제 3 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인의 결합 영역(VH3)을 포함하는 제 5 도메인, 및 (iii) 적어도 1개의 시스테인 잔기를 포함하는 제 6 도메인을 포함하고, 제 4 및 제 5의 도메인이 공유결합으로 연결되어 있지만, 제 4 및 제 5의 도메인은 에피토프 결합 부위를 형성하도록 회합하는 것은 아니고; 제 1 폴리펩티드 사슬과 제 2 폴리펩티드 사슬은 공유결합으로 연결되어 있지만, 이 공유결합은 펩티드 결합은 아니고; 이 경우, 제 1 도메인과 제 5 도메인이 회합하여, 제 3 에피토프와 결합하는 제 1 결합 부위(VL3)(VH3)을 형성하고; 제 2 도메인과 제 4 도메인이 회합하여, 제 4 에피토프와 결합하는 제 2 결합 부위(VL4)(VH4)를 형성한다.

[0029] 본 발명의 특정의 구체예에 있어서, 제 1 에피토프, 제 2 에피토프, 적절히 제 3 에피토프, 및 제 4 에피토프는 동일할 수 있다. 다른 구체예에서는, 제 1 에피토프, 제 2 에피토프, 적절히 제 3 에피토프, 및 제 4 에피토프가 다른 것과 각각 다를 수 있다. 제 3 에피토프의 결합 도메인을 포함하는 본 발명의 특정 구체예에서는, 제 1 에피토프와 제 3 에피토프가 동일할 수 있다. 제 4 에피토프의 결합 도메인을 포함하는 본 발명의 특정 구체예에서는, 제 1 에피토프와 제 4 에피토프가 동일할 수 있다. 제 3 에피토프의 결합 도메인을 포함하는 본 발명의 특정 구체예에서는, 제 2 에피토프와 제 3 에피토프가 동일할 수 있다. 제 4 에피토프의 결합 도메인을 포함하는 본 발명의 특정 구체예에서는, 제 2 에피토프와 제 4 에피토프가 동일할 수 있다. 제 3 에피토프의 결합 도메인과 제 4 에피토프의 결합 도메인을 포함하는 본 발명의 또 다른 구체예에서는, 제 3 에피토프와 제 4 에피토프는 다를 수 있다. 상기의 임의의 조합은 본 발명에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

[0030] 본 발명의 특정의 구체예에 있어서, 디아바디 또는 디아바디 분자의 제 1 도메인과 제 5 도메인을 동일의 면역글로불린으로부터 유도하는 것이 가능하다. 다른 구체예에서는, 디아바디 또는 디아바디 분자의 제 2 도메인과 제 4 도메인을 동일의 면역글로불린으로부터 유도하는 것이 가능하다. 또 다른 구체예에서는, 디아바디 또는 디아바디 분자의 제 1 도메인과 제 5 도메인을 다른 면역글로불린으로부터 유도하는 것이 가능하다. 또 다른 구체예에서는, 디아바디 또는 디아바디 분자의 제 2 도메인과 제 4 도메인을 다른 면역글로불린으로부터 유도하는 것이 가능하다. 상기의 임의의 조합은 본 발명에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

[0031] 본 발명의 특정의 구체예에 있어서, 디아바디 또는 디아바디 분자의 제 1 폴리펩티드 사슬과 제 2 폴리펩티드 사슬 사이의 공유결합은, 제 1 폴리펩티드 사슬상의 적어도 1개의 시스테인 잔기와 제 2 폴리펩티드 사슬상의 적어도 1개의 시스테인 잔기 사이의 이황화 결합을 통한 것일 수 있다. 이황화 결합에 관여하는 제 1 또는 제 2 폴리펩티드 사슬상의 시스테인 잔기는, 제 1, 제 2, 제 3, 제 4, 제 5 또는 제 6의 도메인내를 포함하고, 폴리펩티드 사슬상의 어느곳에 존재해도 좋다. 특정의 구체예에서는, 제 1 폴리펩티드 사슬상의 시스테인 잔기는 제 1 도메인에, 그리고 제 2 폴리펩티드 사슬상의 시스테인 잔기는 제 5 도메인에 존재한다. 제 1, 제 2, 제 4 및 제 5의 도메인은 결합에 관여하는 가변영역에 상당한다. 바람직한 구체예에서는, 제 1 및 제 2 폴리펩티드 사슬

사이의 술피드 결합에 관여하는 시스테인 잔기는, 각각 제 3 및 제 6의 도메인내에 위치된다. 이 구체예의 특정의 측면에서는, 제 1 폴리펩티드 사슬의 제 3 도메인은 **서열번호 17**의 아미노산 서열에 의해 코드되는 κ 경쇄의 C 말단의 6 아미노산, FNRGEC(**서열번호 23**)을 포함한다. 이 구체예의 다른 측면에서는, 제 2 폴리펩티드 사슬의 제 6 도메인은 **서열번호 17**의 아미노산 서열에 의해 코드되는 κ 경쇄의 C 말단의 6 아미노산, FNRGEC(**서열번호 23**)을 포함한다. 이 구체예의 또 다른 측면에서는, 제 1 폴리펩티드 사슬의 제 3 도메인은 **서열번호 78**의 뉴클레오티드 서열에 의해 코드되는 인간 IgG의 힌지 도메인으로부터 유도되는 아미노산 서열 VEPKSC(**서열번호 77**)을 포함한다. 이 구체예의 또 다른 측면에서는, 제 2 폴리펩티드 사슬의 제 6 도메인은 **서열번호 78**의 뉴클레오티드 서열에 의해 코드되는 인간 IgG의 힌지 도메인으로부터 유도되는 아미노산 서열 VEPKSC(**서열번호 77**)을 포함한다. 이 구체예의 또 다른 측면에서는, 제 1 폴리펩티드 사슬의 제 3 도메인은 인간 κ 경쇄의 C 말단의 6 아미노산 FNRGEC(**서열번호 23**)을 포함하고, 그리고 제 2 폴리펩티드 사슬의 제 6 도메인은 아미노산 서열 VEPKSC(**서열번호 77**)을 포함한다. 이 구체예의 또 다른 측면에서는, 제 2 폴리펩티드 사슬의 제 6 도메인은 인간 κ 경쇄의 C 말단의 6 아미노산 FNRGEC(**서열번호 23**)을 포함하고, 그리고 제 1 폴리펩티드 사슬의 제 3 도메인은 아미노산 서열 VEPKSC(**서열번호 77**)을 포함한다. 이 구체예의 또 다른 측면에서는, 제 1 폴리펩티드 사슬의 제 3 도메인은 인간 κ 경쇄의 C 말단의 6 아미노산 FNRGEC(**서열번호 23**)을 포함하고, 그리고 제 2 폴리펩티드 사슬의 제 6 도메인은 힌지 도메인을 포함한다. 이 구체예의 또 다른 측면에서는, 제 2 폴리펩티드 사슬의 제 6 도메인은 인간 κ 경쇄의 C 말단의 6 아미노산 FNRGEC(**서열번호 23**)을 포함하고, 그리고 제 1 폴리펩티드 사슬의 제 3 도메인은 힌지 도메인을 포함한다. 이 구체예의 또 다른 측면에서는, 제 1 폴리펩티드 사슬의 제 3 도메인은 인간 κ 경쇄의 C 말단의 6 아미노산 FNRGEC(**서열번호 23**)을 포함하고, 그리고 제 2 폴리펩티드 사슬의 제 6 도메인은 Fc 도메인 또는 그 일부를 포함한다. 이 구체예의 또 다른 측면에서는, 제 2 폴리펩티드 사슬의 제 6 도메인은 인간 κ 경쇄의 C 말단의 6 아미노산 FNRGEC(**서열번호 23**)을 포함하고, 그리고 제 1 폴리펩티드 사슬의 제 3 도메인은 Fc 도메인 또는 그 일부를 포함한다.

[0032] 다른 구체예에 있어서, 이황화 결합에 관여하는 제 1 또는 제 2 폴리펩티드 사슬상의 시스테인 잔기는, 제 1 폴리펩티드 사슬의 제 1, 제 2 또는 제 3 도메인의 외측에, 그리고 제 2 폴리펩티드 사슬의 제 4, 제 5 또는 제 6 도메인의 외측에 위치하여도 좋다. 특히, 제 1 폴리펩티드 사슬상의 시스테인 잔기는 제 1 도메인의 N-말단, 또는 제 1 도메인의 C-말단에 존재할 수 있다. 제 1 폴리펩티드 사슬상의 시스테인 잔기는 제 2 도메인의 N-말단, 또는 제 2 도메인의 C-말단에 존재할 수 있다. 제 1 폴리펩티드 사슬상의 시스테인 잔기는 제 3 도메인의 N-말단, 또는 제 3 도메인의 C-말단에 존재해도 좋다. 또한, 제 2 폴리펩티드 사슬상의 시스테인 잔기는 제 4 도메인의 N-말단, 또는 제 4 도메인의 C-말단에 존재할 수 있다. 제 2 폴리펩티드 사슬상의 시스테인 잔기는 제 5 도메인의 N-말단, 또는 제 5 도메인의 C-말단에 존재할 수 있다. 이에 따라, 제 2 폴리펩티드 사슬상의 시스테인 잔기는 제 6 도메인의 C-말단, 또는 제 6 도메인의 N-말단에 존재할 수 있다. 특정의 구체예에서는, 이황화 결합은, 제 1 폴리펩티드 사슬상의 적어도 2개의 시스테인 잔기와 제 2 폴리펩티드 사슬상의 적어도 2개의 시스테인 잔기 사이에 있다. 제 3 도메인과 제 6 도메인이 Fc 도메인 또는 그 일부를 포함하지 않는 특정의 구체예에서는, 시스테인 잔기가 제 1 폴리펩티드 사슬의 C-말단에 있고, 또한 제 2 폴리펩티드 사슬의 C-말단에 있다. 상술한 임의의 조합은 본 발명에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

[0033] 상기한 본 발명의 특정의 구체예에 있어서, 본 발명의 공유결합형 디아바디는 디아바디 분자의 2량체(각 디아바디 분자가 제 1 및 제 2의 폴리펩티드 사슬을 포함한다)를 포함한다. 이 구체예의 어느 측면에서는, 디아바디 분자끼리가 공유결합으로 연결되어 2량체를 형성하고 있지만, 이 공유결합은 펩티드 결합은 아니다. 이 구체예의 바람직한 측면에서는, 공유결합이 2량체의 각 디아바디 분자의 제 1 폴리펩티드 사슬상의 적어도 1개의 시스테인 잔기 사이의 이황화 결합이다. 본 발명의 더욱 바람직한 구체예에서는, 공유결합이 2량체를 형성하고 있는 각 디아바디 분자의 제 1 폴리펩티드 사슬상의 적어도 1개의 시스테인 잔기 사이의 이황화 결합이지만, 상기 적어도 1개의 시스테인 잔기가 각 제 1 폴리펩티드 사슬의 제 3 도메인에 존재한다.

[0034] 본 발명의 어떠한 구체예에 있어서, 제 1 폴리펩티드 사슬상의 제 1 도메인이 제 2 도메인의 N-말단에 있어도, 제 2 도메인의 C-말단에 있어도 좋다. 제 1 폴리펩티드 사슬상의 제 1 도메인은 제 3 도메인의 N-말단에 있어도, 제 3 도메인의 C-말단에 있어도 좋다. 제 1 폴리펩티드 사슬상의 제 2 도메인은 제 1 도메인의 N-말단에 있어도, 제 1 도메인의 C-말단에 있어도 좋다. 또한, 제 1 폴리펩티드 사슬상의 제 2 도메인은 제 3 도메인의 N-말단에 있어도, 제 3 도메인의 C-말단에 있어도 좋다. 이에 따라, 제 1 폴리펩티드 사슬상의 제 3 도메인은 제 1 도메인의 N-말단에 있어도, 제 1 도메인의 C-말단에 있어도 좋다. 제 1 폴리펩티드 사슬상의 제 3 도메인은 제 2 도메인의 N-말단에 있어도, 제 2 도메인의 C-말단에 있어도 좋다. 제 2 폴리펩티드 사슬과 관련하여, 제 4 도메인이 제 5 도메인의 N-말단에 있어도, 제 5 도메인의 C-말단에 있어도 좋다. 제 4 도메인은 제 6 도메인의 N-말단에 있어도, 제 6 도메인의 C-말단에 있어도 좋다. 제 2 폴리펩티드 사슬상의 제 5 도메인은 제 4 도

메인의 N-말단에 있어도, 제 4 도메인의 C-말단에 있어도 좋다. 제 2 폴리펩티드 사슬상의 제 5 도메인은 제 6 도메인의 N-말단에 있어도, 제 6 도메인의 C-말단에 있어도 좋다. 이에 따라, 제 2 폴리펩티드 사슬상의 제 6 도메인은 제 4 도메인의 N-말단에 있어도, 제 4 도메인의 C-말단에 있어도 좋다. 제 2 폴리펩티드 사슬상의 제 6 도메인은 제 5 도메인의 N-말단에 있어도, 제 5 도메인의 C-말단에 있어도 좋다. 상술한 임의의 조합은 본 발명에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

[0035] 특정의 구체예에서, 제 1 도메인과 제 2 도메인은 제 1 폴리펩티드 사슬상의 제 3 도메인의 C-말단에 존재해도 좋고, 또는 제 1 도메인과 제 2 도메인은 제 1 폴리펩티드 사슬상의 제 3 도메인의 N-말단에 존재해도 좋다. 제 2 폴리펩티드 사슬과 관련하여, 제 4 도메인과 제 5 도메인은 제 6 도메인의 C-말단에 존재해도 좋고, 또는 제 4 도메인과 제 5 도메인은 제 6 도메인의 N-말단에 존재해도 좋다. 이 구체예의 특정의 측면에서는, 본 발명은 공유결합형 이중 특이성 디아바디와 관련있고, 이 디아바디는 디아바디 분자의 2량체이고, 각 디아바디 분자는 제 1 및 제 2 폴리펩티드 사슬을 포함하고, 여기서 제 1 폴리펩티드 사슬은, (i) 제 1 에피토프에 특이적인 제 1 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인의 결합영역(VL1)을 포함하는 제 1 도메인, (ii) 제 2 에피토프에 특이적인 제 2 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인의 결합영역(VH2)을 포함하는 제 2 도메인, 및 (iii) Fc 도메인 또는 그 일부를 포함하는 제 3 도메인을 포함하고, 제 1 및 제 2 도메인이 공유결합으로 연결되어 있지만, 제 1 및 제 2 도메인은 에피토프 결합 부위를 형성하도록 회합하는 것은 아니고, 제 3 도메인은 제 1 도메인과 제 2 도메인 양쪽의 N-말단측에 있고; 여기서, 제 2 폴리펩티드 사슬은, (i) 제 2 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인의 결합영역(VL2)을 포함하는 제 4 도메인, (ii) 제 1 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인의 결합영역(VH1)을 포함하는 제 5 도메인, 및 (iii) 적어도 1개의 시스테인 잔기를 포함하는 제 6 도메인을 포함하고, 제 4 및 제 5 도메인이 공유결합으로 연결되어 있지만, 제 4 및 제 5 도메인은 에피토프 결합 부위를 형성하도록 회합하는 것은 아니고; 각 디아바디 분자의 제 1 폴리펩티드 사슬과 제 2 폴리펩티드 사슬은 공유결합으로 연결되어 있지만, 각 공유결합은 펩티드 결합은 아니고; 이 경우, 각 디아바디 분자의 제 1 도메인과 제 5 도메인이 회합하여, 제 1 에피토프와 결합하는 제 1 결합 부위(VL1)(VH1)를 형성하고; 각 디아바디 분자의 제 2 도메인과 제 4 도메인이 회합하여, 제 2 에피토프와 결합하는 제 2 결합 부위(VL2)(VH2)를 형성하고 있다.

[0036] 또한, 다른 구체예에서, 본 발명은 공유결합형 4중 특이성 디아바디와 관련있고, 이 디아바디는 디아바디 분자의 2량체이고, 제 1 디아바디 분자는 제 1 및 제 2 폴리펩티드 사슬을 포함하고, 여기서 제 1 폴리펩티드 사슬은, (i) 제 1 에피토프에 특이적인 제 1 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인의 결합영역(VL1)을 포함하는 제 1 도메인, (ii) 제 2 에피토프에 특이적인 제 2 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인의 결합영역(VH2)을 포함하는 제 2 도메인, 및 (iii) Fc 도메인 또는 그 일부를 포함하는 제 3 도메인을 포함하고, 제 1 및 제 2 도메인이 공유결합으로 연결되어 있지만, 제 1 및 제 2 도메인은 에피토프 결합 부위를 형성하도록 회합하는 것은 아니고, 제 3 도메인은 제 1 도메인과 제 2 도메인 양쪽의 N-말단측에 있고; 여기서, 제 2 폴리펩티드 사슬은, (i) 제 2 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인의 결합영역(VL2)을 포함하는 제 4 도메인, (ii) 제 1 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인의 결합영역(VH1)을 포함하는 제 5 도메인, 및 (iii) 적어도 1개의 시스테인 잔기를 포함하는 제 6 도메인을 포함하고, 제 4 및 제 5 도메인이 공유결합으로 연결되어 있지만, 제 4 및 제 5 도메인은 에피토프 결합 부위를 형성하도록 회합하는 것은 아니고; 제 1 폴리펩티드 사슬과 제 2 폴리펩티드 사슬은 공유결합으로 연결되어 있지만, 각 공유결합은 펩티드 결합은 아니고; 이 경우, 제 1 도메인과 제 5 도메인이 회합하여, 제 1 에피토프와 결합하는 제 1 결합 부위(VL1)(VH1)를 형성하고; 제 2 도메인과 제 4 도메인이 회합하여, 제 2 에피토프와 결합하는 제 2 결합 부위(VL2)(VH2)를 형성하고; 그리고 제 2 디아바디 분자는 제 1 및 제 2 폴리펩티드 사슬을 포함하고, 여기서 제 1 폴리펩티드 사슬은, (i) 제 3 에피토프에 특이적인 제 3 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인의 결합영역(VL3)을 포함하는 제 1 도메인, (ii) 제 4 에피토프에 특이적인 제 4 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인의 결합영역(VH4)을 포함하는 제 2 도메인, 및 (iii) Fc 도메인 또는 그 일부를 포함하는 제 3 도메인을 포함하고, 제 1 및 제 2 도메인이 공유결합으로 연결되어 있지만, 제 1 및 제 2 도메인은 에피토프 결합 부위를 형성하도록 회합하는 것은 아니고, 제 3 도메인은 제 1 도메인과 제 2 도메인 양쪽의 N-말단측에 있고; 여기서, 제 2 폴리펩티드 사슬은, (i) 제 4 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인의 결합영역(VL4)을 포함하는 제 4 도메인, (ii) 제 3 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인의 결합영역(VH3)을 포함하는 제 5 도메인, 및 (iii) 적어도 1개의 시스테인 잔기를 포함하는 제 6 도메인을 포함하고, 제 4 및 제 5 도메인이 공유결합으로 연결되어 있지만, 제 4 및 제 5 도메인은 에피토프 결합 부위를 형성하도록 회합하는 것은 아니고; 제 1 폴리펩티드 사슬과 제 2 폴리펩티드 사슬은 공유결합으로 연결되어 있지만, 각 공유결합은 펩티드 결합은 아니고; 이 경우, 제 1 도메인과 제 5 도메인이 회합하여, 제 3 에피토프와 결합하는 제 1 결합 부위(VL3)(VH3)를 형성하고; 제 2 도메인과 제 4 도메인이 회합하여, 제 4 에피토프와 결합하는 제 2 결합 부위(VL4)(VH4)를 형성하고 있다.

[0037] 상기한 바와 같이, 각각의 폴리펩티드 사슬상의 도메인은 공유결합으로 연결되어 있다. 특정의 구체예에서는,

제 1 및 제 2 도메인 사이, 제 1 및 제 3 도메인 사이, 제 2 및 제 3 도메인 사이, 제 4 및 제 5 도메인 사이, 제 4 및 제 6 도메인 사이, 및/또는 제 5 및 제 6 도메인 사이의 공유결합은 펩티드 결합일 수 있다. 특히, 제 1 및 제 2 도메인, 및 제 4 및 제 5 도메인이 결합 부위를 형성하도록 결합하지 않는 한, 제 1 및 제 2 도메인, 및 제 4 및 제 5 도메인은 각각 제 3 도메인 및 제 6 도메인에 의해, 또는 추가의 아미노산 잔기에 의해 분리되어 있어도 좋다. 아미노산 잔기의 수는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9 개의 아미노산 잔기여도 좋다. 하나의 바람직한 면에서는, 도메인 사이의 아미노산 잔기의 수는 8개이다.

[0038] 본 발명의 특정의 구체예에서, Fc 도메인을 포함한느 제 1 및 제 2 폴리펩티드 사슬의 도메인(즉, 경우에 따라, 각각 제 3 및 제 6 도메인)은, 이 도메인이 힌지-Fc 영역을 포함하도록 힌지 도메인을 더 포함할 수 있다. 이와는 다른 구체예에서는, 제 1 폴리펩티드 사슬 또는 제 2 폴리펩티드 사슬이, Fc 도메인의 포함없이 힌지 도메인을 포함할 수 있다. 본 발명에서 이용하는 중쇄, 경쇄, 힌지 영역, Fc 도메인 및/또는 힌지-Fc 도메인은 IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM을 포함하여 어떠한 면역글로불린 형으로부터 유래하는 것이어도 좋다. 바람직한 구체예에서는, 면역글로불린은 IgG 또는 이것의 어떠한 서브타입, 즉 IgG_1, IgG_2, IgG_3 또는 IgG_4이다. 다른 구체예에서는, 경쇄 및 중쇄가 유래되는 면역글로불린은 인간화 또는 키메라화된 것이다.

[0039] 또한, 디아바디 또는 디아바디 분자가 결합하는 제 1 에피토프와 제 2 에피토프, 적절히, 제 3 에피토프와 제 4 에피토프는, 동일의 항원에 유래하는 다른 에피토프여도, 다른 항원에 유래하는 다른 에피토프여도 좋다. 항원은 항체를 생성하는 것이 가능한 어떠한 분자여도 좋고, 예를 들면, 단백질, 핵산, 세균독소, 세포표면 마커, 자가면역 마커, 바이러스 단백질, 약물 등이다. 특정의 구체예에서는, 디아바디의 적어도 1개의 에피토프 결합 부위는, B 세포, T 세포, 식세포, 네츄럴킬러(NK) 세포, 수상세포와 같은 특정의 세포상의 항원에 대하여 특이적이다.

[0040] 본 구체예의 특정의 측면에서, 디아바디 또는 디아바디 분자의 적어도 1개의 에피토프 결합 부위는 Fc 수용체에 특이적이고, 이 Fc 수용체는 활성화성 Fc 수용체 또는 억제성 Fc 수용체일 수 있다. 특정의 구체예에서는, Fc 수용체가 Fcγ 수용체이고, Fcγ 수용체는 FcγRI, FcγRII 또는 FcγRIII 수용체이다. 보다 바람직한 구체예에서는, FcγRIII 수용체가 FcγRIIIA(CD16A) 수용체 또는 FcγRIIIB(CD16B) 수용체이고, 더 바람직한 구체예에서는, FcγRIII 수용체가 FcγRIIIA(CD16A) 수용체이다. 다른 바람직한 구체예에서는, FcγRII 수용체가 FcγRIIA(CD32A) 수용체 또는 FcγRIIB(CD32B) 수용체이고, 더 바람직하게는, FcγRIIB(CD32B) 수용체이다. 특히 바람직한 구체예에서는, 디아바디의 1개의 결합 부위가 CD32B에 특이적이고, 다른 결합 부위가 CD16A에 특이적이다. 본 발명의 특정의 구체예에서는, 디아바디 또는 디아바디 분자의 적어도 1개의 에피토프 결합 부위가 활성화성 Fc 수용체에 특이적이고, 적어도 1개의 다른 부위가 억제성 Fc 수용체에 특이적이다. 이 구체예의 어느 측면에서는, 활성화성 Fc 수용체가 CD32A이고, 억제성 Fc 수용체가 CD32B이다. 이 구체예의 다른 측면에서는, 활성화성 Fc 수용체가 BCR이고, 억제성 Fc 수용체가 CD32B이다. 이 구체예의 또 다른 측면에서는, 활성화성 Fc 수용체가 IgERI이고, 억제성 Fc 수용체가 CD32B이다.

[0041] 1개의 에피토프 결합 부위가 CD16A에 특이적인 경우에는, VL 및 VH 도메인이 마우스 항체 3G8(이 서열은 클론되어 있고, 본 명세서에 나타낸다)의 VL 및 VH 도메인과 동일해도 좋고, 유사해도 좋다. 1개의 에피토프 결합 부위가 CD32A에 특이적인 다른 경우에는, VL 및 VH 도메인이 마우스 항체 IV.3의 VL 및 VH 도메인과 동일해도 좋고, 유사해도 좋다. 1개의 에피토프 결합 부위가 CD32B에 특이적인 또 다른 경우에는, VL 및 VH 도메인이 마우스 항체 2B6(이 서열은 클론되어 있고, 본 명세서에 나타낸다)의 VL 및 VH 도메인과 동일해도 좋고, 유사해도 좋다. 3G8, 2B6 및 IV.3 항체의 VL 또는 VH 도메인의 어느 것이나 임의의 조합으로 사용할 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명은 또한 제 1 에피토프가 CD32B에 특이적이고, 제 2 에피토프가 CD16A에 특이적인 이중 특이성 디아바디 또는 디아바디 분자에 관한 것이다.

[0042] 다른 구체예에서는, 에피토프 결합 부위가 병원성 항원에 특이적일 수 있다. 본 명세서에서 사용하는 병원성 항원이란, 암, 감염증, 자가면역질환을 포함하는 특정의 병원성 질환과 관련된 항원일 수 있다. 따라서, 병원성 항원은 종양 항원, 세균 항원, 바이러스 항원 또는 자가면역 항원일 수 있다. 병원성 항원의 예로서는, 한정하는 것은 아니지만, 리포다당, 인간 면역결핍 바이러스, 아데노바이러스, 호흡기 다핵체 바이러스, 웨스트나일 바이러스(예, E16 및/또는 E53 항원) 및 간염 바이러스에서 유래하는 바이러스 항원으로 이루어지는 군에서 선택되는 바이러스 항원, 핵산(DNA 및 RNA), 및 콜라겐을 들 수 있다. 바람직하게는, 병원성 항원은 중화 항원이다. 바람직한 구체예에 있어서, 한쪽의 에피토프 결합 부위가 CD16A 또는 CD32A에 특이적인 경우, 다른쪽의 에피토프 결합 부위는 자가면역 항원을 제외한 병원성 항원에 특이적이다. 또 다른 바람직한 구체예에 있어서, 한쪽의 에피토프 결합 부위가 CD32B에 특이적인 경우, 다른쪽의 에피토프 결합 부위는 어떠한 병원성 항원에도 특

이적이다. 특정의 구체예에서는, 본 발명의 디아바디 분자는 동일 세포상의 2개의 다른 항원에 결합하고, 예를 들면, 한쪽의 항원 결합 부위는 활성화성 Fc 수용체에 특이적이지만, 다른쪽은 억제성 Fc 수용체에 특이적이다. 다른 구체예에서는, 디아바디 분자는 2개의 다른 바이러스 중화성 에피토프(예, 웨스트나일 바이러스의 E16 및 E53이지만, 이에 한정되는 것은 아니다)에 결합한다.

[0043] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 본 발명의 디아바디를 이용하여 다양한 질환이나 장애를 치료할 수 있다. 따라서, 본 발명은 유효량의 본 발명의 공유결합형 디아바디 또는 디아바디 분자를, 이것을 필요로하는 환자에 투여하는 것을 포함하여 이루어지는 질환 또는 장애의 치료방법에 관한 것으로, 이 디아바디 또는 디아바디 분자는, 적어도 1개의 결합 부위가 암세포의 표면 또는 세균이나 바이러스 입자의 표면에 발현되는 항원과 같은 병원성 항원에 특이적이고, 적어도 1개의 다른 결합 부위가 Fc 수용체(예로서, CD16A)에 특이적이다.

[0044] 또 다른 구체예에 있어서, 본 발명은 유효량의 본 발명의 공유결합형 디아바디 또는 디아바디 분자를, 이것을 필요로하는 환자에 투여하는 것을 포함하여 이루어지는 질환 또는 장애의 치료방법에 관한 것으로, 이 디아바디 또는 디아바디 분자는, 적어도 1개의 결합 부위가 CD32B에 특이적이고, 적어도 1개의 다른 결합 부위가 CD16A에 특이적이다.

[0045] 또 다른 구체예에 있어서, 본 발명은 유효량의 본 발명의 공유결합형 디아바디 또는 디아바디 분자를, 이것을 필요로하는 환자에 투여하는 것을 포함하여 이루어지는, 병원성 항원에 대한 면역 내성의 유발방법에 관한 것으로, 이 디아바디 또는 디아바디 분자는, 적어도 1개의 결합 부위가 CD32B에 특이적이고, 적어도 1개의 다른 결합 부위가 이 병원성 항원에 특이적이다. 이 구체예의 어느 측면에서는, 병원성 항원은 알러겐(allergen) 또는 면역내성이 요망되는 다른 분자, 예로서 이식한 조직에 발현되는 단백질과 같은 것일 수 있다.

[0046] 또 다른 구체예에 있어서, 본 발명은 유효량의 본 발명의 공유결합형 디아바디 또는 디아바디 분자를, 이것을 필요로하는 환자에 투여하는 것을 포함하여 이루어지는 해독방법에 관한 것으로, 이 디아바디 또는 디아바디 분자는, 적어도 1개의 결합 부위가 세포 표면 마커에 특이적이고, 적어도 1개의 다른 결합 부위가 해독에 특이적이다. 특정의 구체예에서는, 투여되는 본 발명의 디아바디는, 1개의 결합 부위가 Fc와 같은 세포표면 마커에 특이적이고, 다른 결합 부위가 세포 독소 또는 약물에 특이적이다. 어는 구체예에서는, 세포표면 마커는 적혈구상에 존재하지 않는 것이다.

[0047] **3.1 정의**

[0048] 특별히 정의하지 않는 한, 본 명세서에서 사용하는 모든 기술용어, 표기법, 그 외 과학용어 또는 전문용어는, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자가 통상 이해하는 의미를 갖는 것으로 한다. 어떤 경우에는, 통상 이해되는 용어라도, 명확성및/또는 참고로 본 명세서중에 정의되지만, 이러한 정의를 본 명세서에 포함하여도, 당 기술분야에서 일반적으로 이해되고 있는 의미에 대해 반드시 큰 상이점을 나타낸다고 해석되어서는 안된다. 본 발명의 실시에는, 특히 따로 나타내지 않는 한, 당업자가 용이하게 예상할 수 있는 분자생물학(재조합 기술 포함), 미생물학, 세포생물학, 생화학, 핵산화학, 및 면역학의 분야의 관용기술을 이용하는 것으로 한다. 이와 같은 기술은 문헌에 상세히 설명되어 있고, 예를 들면 Current Protocols in Immunology(J. E. Coligan et al, eds., 1999, including supplements through 2001); Current Protocols in Molecular Biology(F. M. Ausubel et al., eds., 1987, including supplements through 2001); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, third edition(Sambrook and Russel, 2001); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); The Immunoassay Handbook(D. Wild, ed., Stockton Press NY, 1994); Bioconjugate Techniques(Greg T. Hermanson, ed., Academic Press, 1996); Methods of Immunological Analysis(R. Masseyeff, W. H. Albert, and N. A. Staines, eds., Weinheim: VCH Verlags gesellschaft mbH, 1993), Harlow and Lane Using Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999; and Beaucage et al. eds., Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry John Wiley & Sons, Inc., New York, 2000)을 참조할 수 있다.

[0049] 본 명세서중에 사용하는 용어 "항체"는, 단일클론, 다중특이성 항체, 인간항체, 인간화 항체, 합성 항체, 키메라 항체, 낙타화 항체, 단일쇄 Fvs(scFv), 단일쇄 항체, Fab 항체, F(ab') 단편, 이황화 결합 이중특이성 Fvs(sdFv), 세포내 발현 항체(intrabody), 및 항이디오타입(anti-Id) 항체(예를 들면, 본 발명의 항체에 대한 항Id 및 항-항Id 항체를 포함), 및 상기의 어떠한 것의 에피토프 결합 단편을 의미한다. 특히, 항체는, 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역 활성 단편, 즉 항원 결합 부위를 함유하는 분자를 포함한다. 면역글로불린 분자는 어떠한 타입(예를 들면, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 및 클래스(IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4,

IgA_1 및 IgA_2) 또는 서브클래스여도 좋다.

[0050] 본 명세서중에 사용하는 "면역 특이적 결합","면역 특이적 인식","특이적 결합","특이적 인식" 및 이들과 유사한 용어는, 항원(예를 들면, 에피토프 또는 면역 복합체)와 특이적으로 결합하지만, 다른 분자와는 특이적으로 결합하지 않는 분자를 의미한다. 항원과 특이적으로 결합하는 분자는, 예를 들면 면역분석(immunoassay), BIAcore 또는 당 기술분야에서 알려진 다른 분석으로 측정하여, 보다 낮은 친화성으로 다른 펩티드 또는 폴리펩티드와 결합하여도 좋다. 바람직하게는, 항원과 특이적으로 결합하는 분자는, 다른 단백질과 교차 반응하지 않는다. 항원과 특이적으로 결합하는 분자는, 예를 들면, 면역분석, BIAcore 또는 당업자에게 알려진 다른 기법에 의해 동정할 수 있다.

[0051] 본 명세서중에 사용하는 용어 "면역 복합체"란, 적어도 1개의 표적 분자와 적어도 1개의 이종 Fcɣ 영역 함유 폴리펩티드가 서로 결합하여, 보다 큰 분자량의 복합체를 형성할 때 생기는 구조체를 의미한다. 면역 복합체의 예는, 항원-항체 복합체이고, 이는 가용성이어도 입자상(예, 세포표면상의 항원/항체 복합체)이어도 좋다.

[0052] 본 명세서중에 사용하는 용어 "중쇄","경쇄","가변영역","프레임워크(framework) 영역","불변 도메인(constant domain)" 등이란, 면역학 분야에서 각기 통상의 의미를 가지고, 천연의 면역글로불린중의 도메인 및 합성(예, 재조합) 결합 단백질(예, 인간화 항체, 단일쇄 항체, 키메라 항체 등)의 대응하는 도메인을 의미한다. 천연의 면역글로불린(예, IgG)의 기본적인 구조단위는, 2개의 경쇄와 2개의 중쇄를 갖는 4량체이고, 통상은 약 150,000Da의 당단백질로서 발현된다. 각 쇄의 아미노말단("N")부분은, 주로 항원 인식에 관여하는 약 100 내지 110 또는 그 이상의 아미노산으로 이루어지는 가변영역을 포함한다. 각 쇄의 카복시말단("C")부분은 정상영역을 규정하고 있고, 경쇄가 1개의 불변 도메인을 함유하고, 중쇄가 통상 3개의 불변 도메인과 힌지 영역을 갖는다. 따라서, IgG 분자의 경쇄의 구조는 n-V_L-C_L-c이고, IgG 분자의 중쇄의 구조는 n-V_H-C_{H1}-H-C_{H2}-C_{H3}-c(여기서, H는 힌지 영역)이다. IgG 분자의 가변영역은, 항원과 접촉하는 잔기를 함유하는 상보성 결정영역(CDR)과, 프레임워크 세그먼트라 불리는 비-CDR 세그먼크로 이루어지고, 이 세그먼트는 일반적으로 구조를 유지하고, CDR 루프의 위치를 결정한다(그러나, 특정의 프레임워크 잔기가 항원과 접촉하여도 좋다). 따라서, V_L 및 V_H 도메인은 구조 n-FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4-c를 갖는다.

[0053] 결합 단백질 또는 항체(본 명세서에서는 광범위하게 정의된다)에 대하여 말할때, 각 도메인의 아미노산의 귀속은 Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991)의 정의에 따른다. 면역글로불린의 성숙 중쇄 및 경쇄의 가변영역 유래의 아미노산은, 그 쇄중의 아미노산의 위치에 의해 정의된다. Kabat은 다수의 항체의 아미노산 서열을 기재하고, 각 서브그룹에 대해 공통의 아미노산 서열을 동정하고, 각 아미노산에 잔기번호를 할당하였다. Kabat의 넘버링 방식은, 문제의 항체를, 보존 아미노산을 기준으로 한 Kabat의 공통 서열의 1개와 대조하는 것에 의해, 그의 일람표(compendium)에는 포함되지 않는 항체까지 확장할 수 있다. 잔기번호를 할당하는 이 방법은, 당업계에서 표준적으로 되어 있고, 다양한 항체(키메라 또는 인간화된 변이체를 포함)에 있어서, 동등의 위치의 아미노산을 용이하게 동정한다. 예를 들면, 인간 항체 경쇄의 50위치의 아미노산은, 마우스 항체 경쇄의 50위치의 아미노산과 동등한 위치에 있다.

[0054] 본 명세서중에서 사용되는 "중쇄"라는 용어는 IgG 항체의 중쇄를 특정하기 위해 사용된다. 완전한 천연의 IgG에서는, 중쇄는 면역글로불린 도메인 VH, CH1, 힌지, CH2 및 CH3을 포함한다. 본 명세서 전체를 통하여, IgG 중쇄중의 잔기의 번호부여는 Kabat 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, NH1, MD(1991)(참조로서 본 명세서에 포함)에서와 같은 EU 인덱스의 것이다. "Kabat에서와 같은 EU 인덱스"란, 인간 IgG1 EU 항체의 번호부여를 말한다. 인간 IgG1의 힌지, CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 아미노산 서열의 예를, 이하에 기재하는 **도 1a 및 1b**에 나타낸다. **도 1a 및 1b**에는, IgG2, IgG3 및 IgG4의 중쇄의 힌지, IgG2 및 IgG3 도메인의 아미노산 서열도 나타낸다. IgG2, IgG3 및 IgG4 이소타입의 아미노산 서열은 각각의 힌지 영역의 최초와 최후의 시스테인 잔기(중쇄간 S-S 결합을 형성한다)을 동일한 위치에 배치하는 것에 의해, IgG1 서열과 대조한다. IgG2 및 IgG3의 힌지 영역에 대하여는, 모든 잔기가 EU 인덱스에 의해 번호부여되는 것에 한정되지 않는다.

[0055] "힌지 영역" 또는 "힌지 도메인"은, 일반적으로, 인간 IgG1의 Glu216 내지 Pro230까지의 영역을 의미한다. 인간 IgG1의 힌지영역의 아미노산 서열의 예를 **도 1a**에 나타낸다(**도 1a**에서의 아미노산 잔기는 Kabat 시스템에 따라 번호부여된다). 다른 IgG 이소타입의 힌지 영역은, **도 1a**에 나타내도록 중쇄간 S-S 결합을 형성하는 최초와 최후의 시스테인 잔기를 동일한 위치에 배치하는 것에 의해, IgG1 서열과 서열될 수 있다.

[0056] 본 명세서중에서 사용되는 "Fc 영역","Fc 도메인" 또는 이와 유사한 용어는, IgG 중쇄의 C-말단 영역을 규정하기 위해 사용된다. 인간 IgG1을 포함하는 아미노산 서열의 예를 **도 1b**에 나타낸다. Kabat 시스템에 따라 번호부여한 경우, 경계는 매우 다양할 수 있지만 Fc 도메인은 아미노산 231에서 447까지 연장되어 있다(**도 1b**에서의 아미노산 잔기는 Kabat 시스템에 따라 번호부여된다). **도 1b**에는, IgG 이소타입 IgG2, IgG3 및 IgG4의 Fc 영역의 아미노산 서열의 예를 나타낸다.

[0057] IgG의 Fc 영역은, 2개의 불변 도메인, CH2 및 CH3를 포함한다. 인간 IgG Fc 영역의 CH2 도메인은, 통상, Kabat의 넘버링 시스템에 따라 아미노산 231에서 341까지 이른다(**도 1b**). 인간 IgG Fc 영역의 CH3 도메인은, 통상, Kabat의 넘버링 시스템에 따라 아미노산 342에서 447까지 이른다(**도 1b**). 인간 IgG Fc 영역의 CH2 도메인("Cγ2" 도메인이라고도 불린다)은, 이것이 또 다른 도메인과 밀접하게 쌍을 이루고 있지 않는다는 점에서 독특하다. 오히려, 완전한 천연의 IgG의 2개의 CH2 도메인 사이에는, 2개의 N-결합 분지 당쇄가 개재하고 있다.

[0058] 본 명세서중에서 사용되는 "FcγR 결합 단백질","FcγR 항체" 및 "항FcγR 항체" 라는 용어는 상호 호환적으로 이용되고, 다양한 면역글로불린-유사 단백질 또는 면역글로불린-유래 단백질을 말한다. "FcγR 결합 단백질"은 V_L 및/또는 V_H 도메인과 상호작용을 통하여 FcγR과 결합한다(FcγR 개재 결합과는 구별된다). FcγR 결합 단백질의 예로서는, 완전히 인간의 항체, 다중클론 항체, 키메라 항체, 또는 인간화 항체(예를 들면, 2개의 중쇄와 2개의 경쇄를 포함), 그 단편(예를 들면, Fab, Fab', $F(ab')_2$, 및 Fv 단편), 2관능성 또는 다관능성 항체(예를 들면, Lanzavecchia et al.(1987) "The Use Of Hybrid Hybridomas To Target Human Cytotoxic T Lymphocytes," Eur. J. Immunol. 17:105-111 참조), 단일쇄 항체(예를 들면, Bird et al.(1988) "Single-Chain Antigen-Binding Proteins," Science 242:423-26 참조), 융합 단백질(예를 들면, 파아지 디스플레이 융합 단백질),"미니바디(minibody)"(예를 들면, U.S. 특허 번호 5,837,821 참조) 및 V_L 및/또는 V_H 도메인 또는 그 단편을 포함하는 다른 항원 결합 단백질을 들 수 있다. 어떤 구체예에 있어서, FcγRIIIA 결합 단백질은,"4량체 항체"이고, 즉 일반적으로 천연의 IgG의 구조를 갖고, 또한 가변 도메인과 불변 도메인을 포함한다(즉, V_L 도메인과 경쇄 불변 도메인을 갖는 경쇄 2개 및 V_H 도메인과 중쇄 힌지 및 불변 도메인을 갖는 중쇄 2개를 포함한다).

[0059] 본 명세서중에서 사용하는 "FcγR 길항제(antagonist)" 및 이의 유사용어는, FcγR의 적어도 1개의 생물학적 활성을 길항하는(예, 시그널 전달을 차단) 단백질 및 비단백질성 물질(소분자 포함)을 말한다. 예를 들면, 본 발명의 분자는 IgG의 FcγR에의 결합을 블락킹하는 것에 의해 시그널 전달을 차단한다.

[0060] 본 명세서중에서 사용하는 폴리펩티드 또는 단백질에 관한 "유도체"라는 용어는, 아미노산 잔기의 치환, 결실 또는 부가하는 것에 의해 개변되어 있는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 또는 단백질을 의미한다. 본 명세서중에서 사용하는 "유도체"는 개변되어 있는, 즉 폴리펩티드 또는 단백질에의 임의의 타입의 분자의 공유결합에 의해 개변되어 있는 폴리펩티드 또는 단백질을 의미한다. 예를 들면, 한정하는 것은 아니지만, 항체는 예로서 글리코실화, 아세틸화, PEG화, 인산화, 아미드화, 공지의 보호/블락킹에 의한 유도체화, 단백질 분해절단, 세포 리간드 또는 다른 단백질과의 결합 등에 의해 개변하는 것이 가능하다. 유도체 폴리펩티드 도는 단백질은, 한정하는 것은 아니지만, 특정의 화학적 절단, 아세틸화, 포밀화, 튜니카마이신(tunicamycin)의 대사적 합성 등을 포함하여, 당업자에 공지의 기술을 이용하는 화학적 변형에 의해 제조할 수 있다. 또한, 유도체 폴리펩티드 또는 단백질 유도체는, 이것이 유도되는 원래의 폴리펩티드 또는 단백질과 유사 또는 동일한 기능을 보유한다.

[0061] 본 명세서중에서 사용하는 비단백질 유도체와 관련하여 "유도체"란, 제 1 유기 또는 무기 분자의 구조에 기초하여 형성된 제 2 유기 또는 무기 분자를 의미한다. 유기분자의 유도체는, 한정하는 것은 아니지만, 예를 들면, 히드록실, 메틸, 에틸, 카르복실 또는 아미노기의 부가 또는 결실에 의해, 개변된 분자를 포함한다. 유기분자는 또한 에스테르화, 알킬화 및/또는 인산화되어도 좋다.

[0062] 본 명세서중에서 사용하는 "디아바디 분자"란, 2개 또는 그 이상의 폴리펩티드 사슬 또는 단백질의 복합체로서, 각각 적어도 1개의 VL 및 VH 도메인 또는 그 단편을 포함하고, 양 도메인이 단일의 폴리펩티드 사슬내에 포함되어 있는 복합체를 말한다. 어떠한 구체예에서,"디아바디 분자"에는 Fc 또는 힌지-Fc 도메인을 포함하는 분자가 포함된다. 이러한 복합체의 폴리펩티드 사슬은 동일하여도 달라도 좋고, 즉 디아바디 분자는 모노 다량체 도는 헤테로 다량체일 수 있다. 특정의 구체예에서는,"디아바디 분자"에는 2량체 또는 4량체가 포함되고, 즉, 상기 폴리펩티드 사슬이 양쪽과도 VL 및 VH 도메인을 포함한다. 다량체 단백질을 구성하는 각각의 폴리펩티드 사슬은, 쇄간 이황화 결합에 의해 다량체의 적어도 1개의 다른 펩티드와 공유결합으로 연결되어 있어도 좋다.

[0063] 본 명세서중에서 사용하는 "장애(disorder)" 및 "질환"이란, 호환적으로 사용되고, 피험자의 증상을 의미한다. 특히, 용어 "자가면역질환"은 "자가면역장애"와 호환적으로 사용되고, 피험자 자신의 세포, 조직 및/또는 기관에 대한 피험자의 면역반응에 기인하는 세포, 조직 및/또는 기관의 손상에 의해 특징지워지는 피험자의 증상을 의미한다. 용어 "염증성 질환"은 용어 "염증성 장애"와 호환적으로 사용되고, 염증 바람직하게는 만성 염증에 의해 특징지워지는 피험자의 증상을 의미한다. 자가면역 장애는 염증을 수반하여도 수반하지 않아도 좋다. 또한, 염증은 자가면역 장애에 기인하여도 기인하지 않아도 좋다. 따라서, 어떠한 특정의 장애는 자가면역 장애와 염증성 장애의 양쪽에 의해 특징지워질 수 있다.

[0064] 본 명세서중에서 사용하는 "동일의 폴리펩티드 사슬"란, 거의 동일의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 사슬을 의미하고, 예를 들면, 1개 이상의 아미노산의 상위를 갖는 폴리펩티드 사슬, 바람직하게는, 2개의 폴리펩티드 사슬의 활성이 유의있게 다르지 않는 바와 같은 보존적 아미노산 치환을 갖는 폴리펩티드 사슬이 포함된다.

[0065] 본 명세서중에서 사용하는 "암"이란, 이상한 무억제의 세포증식에서 생기는 신생물 또는 종양을 의미한다. 본 명세서중에서 사용하는 "암"은, 명확히 백혈병 및 림프종을 포함한다. 어떠한 구체예에서, 암은 국소화한 채로 존재하는 양성 종양을 의미한다. 다른 구체예에서, 암은 근처의 신체구조에 침입하여 파괴하고, 먼 부위에까지 이르는 악성 종양을 의미한다. 어떠한 구체예에서, 암은 특정의 암항원을 수반한다.

[0066] 본 명세서중에서 사용하는 "면역조절제" 및 그 변형은, 숙주의 면역계를 조절하는 약제를 의미한다. 어떠한 특정의 구체예에서는, 면역조절제는 면역억제제이다. 어떠한 특정의 구체예에서는, 면역조절제는 면역자극제이다. 면역조절제로서는 한정되는 것은 아니지만 소분자, 펩티드, 폴리펩티드, 융합단백질, 항체, 무기분자, 미메틱제(mimetic agent) 및 유기분자를 포함한다.

[0067] 본 명세서중에서 사용하는 "에피토프"란, 동물 바람직하게는 포유류, 가장 바람직하게는 인간에 있어서 항원성 또는 면역원성을 갖는 폴리펩티드 또는 단백질 또는 비단백질 분자의 단편을 의미한다. 면역원성을 갖는 에피토프는, 동물에서 항체반응을 유발하는 폴리펩티드 또는 단백질의 단편이다. 항원성을 갖는 에피토프는 당업자에 주지의 방법, 예를 들면, 면역분석에 의해 확인될 수 있는 바와 같은, 항체가 면역특이적으로 결합하는 폴리펩티드 또는 단백질의 단편이다. 항원성 에피토프는 반드시 면역원성일 필요는 없다.

[0068] 본 명세서중에서 사용하는 "단편"이란, 다른 폴리펩티드의 아미노산 서열의 적어도 5개 연속한 아미노산 잔기, 적어도 10개 연속한 아미노산 잔기, 적어도 15개 연속한 아미노산 잔기, 적어도 20개 연속한 아미노산 잔기, 적어도 25개 연속한 아미노산 잔기, 적어도 40개 연속한 아미노산 잔기, 적어도 50개 연속한 아미노산 잔기, 적어도 60개 연속한 아미노산 잔기, 적어도 70개 연속한 아미노산 잔기, 적어도 80개 연속한 아미노산 잔기, 적어도 90개 연속한 아미노산 잔기, 적어도 100개 연속한 아미노산 잔기, 적어도 125개 연속한 아미노산 잔기, 적어도 150개 연속한 아미노산 잔기, 적어도 175개 연속한 아미노산 잔기, 적어도 200개 연속한 아미노산 잔기, 적어도 250개 연속한 아미노산 잔기의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 또는 폴리펩티드를 의미한다. 특정의 구체예에서는, 폴리펩티드의 단편은 그 폴리펩티드의 적어도 1개의 기능을 보유한다.

[0069] 본 명세서중에서 사용하는 "핵산" 및 "뉴클레오티드 서열"이란, DNA 분자(예, cDNA 또는 게놈 DNA), RNA 분자(예, mRNA), DNA 및 RNA 분자의 조합 또는 하이브리드 DNA/RNA 분자, 및 DNA 또는 RNA 분자의 유사체를 포함한다. 이와 같은 유사체는, 예를 들면, 한정하는 것은 아니지만, 이노신 또는 트리틸화 염기를 포함하는 뉴클레오티드 유사체를 이용하여 제작하는 것이 가능하다. 이와 같은 유사체는 또한 분자에 유익한 속성을 부여하는(예, 뉴클레아제 내성을 부여하거나, 세포막을 통과하는 능력을 높이는) 개변된 골격을 갖는 DNA 또는 RNA 분자를 포함하여도 좋다. 핵산 또는 뉴클레오티드 서열은 단일쇄 또는 2중쇄여도 좋고, 단일쇄 부분과 이중쇄 부분의 양쪽을 포함하여도 좋고, 또한 3중쇄 부분을 포함하여도 좋다. 그러나, 바람직하게는, 2중쇄 DNA이다.

[0070] 본 명세서중에서 사용하는 "치료적 유효량"이란, 질환 또는 장애를 치료 또는 관리하는데 충분한 치료제의 양을 의미한다. 치료적 유효량은, 질환의 발병을 지연시키거나 또는 최소화하는(예, 암의 전이를 지연시키거나 최소화) 충분한 치료제의 양을 나타낸다. 치료적 유효량은, 질환의 치료 또는 관리에 있어서 치료상의 이익을 부여하는 치료제의 양을 의미하여도 좋다. 또한, 본 발명의 치료제에 대한 치료적 유효량은, 질환의 치료 또는 관리에 있어서 치료학적으로 이익을 부여하는, 단독 또는 다른 치료제와 조합한 치료제의 양을 의미한다.

[0071] 본 명세서중에서 사용하는 "예방제"란, 장애의 예방 또는 장애의 재발 또는 확대의 예방에 사용되는 약제를 의미한다. 예방상 유효한 양은, 과증식성 질환 특히 암의 재발 또는 확대, 또는 환자(한정하는 것은 아니지만, 과증식성 질환의 소인이 있는 환자, 예를 들면 유전적으로 암의 소인이 있거나 또는 이전에 발암물질에 노출된 환자를 포함)에 있어서 이들의 발생을 예방하는 것에 충분한 예방제의 양을 의미하여도 좋다. 또한, 예방상 유효

한 양은, 질환의 예방에 있어서 예방상의 이익을 부여하는 예방제의 양을 의미하여도 좋다. 또한, 본 발명의 예방제에 대한 예방상 유효한 양은 질환의 예방에 있어서 예방상의 이익을 부여하는, 단독 또는 다른 약제와 혼합한 예방제의 양을 의미한다.

[0072] 본 명세서중에서 사용하는 "예방"이란, 예방제 또는 치료제의 투여로부터 얻어지는, 피험자에 있어서의 장애의 1 이상의 증상의 재발 또는 발병의 예방을 의미한다.

[0073] 본 명세서중에서 사용하는 "조합하여"란, 2 이상의 예방제 및/또는 치료제의 사용을 의미한다. 용어 "조합하여"란, 예방제 및/또는 치료제를, 장애가 있는 피험자에 투여하는 순서를 제한하는 것은 아니다. 제 1 예방제 또는 치료제는, 장애가 있는 피험자에 제 2 예방제 또는 치료제를 투여하기 전(예를 들면, 5분, 15분, 30분, 45분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 8주 또는 12주 전)에, 또는 제 2 예방제 또는 치료제를 투여함과 동시에, 또는 제 2 예방제 또는 치료제를 투여한 후(예를 들면, 5분, 15분, 30분, 45분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 8주 또는 12주 후)에 투여하는 것이 가능하다.

[0074] 본 명세서중에서 사용하는 "이펙터 기능(effector function)"이란, 항체의 Fc 영역과, Fc 수용체 또는 항원과의 상호작용에 기인하는 생화학적 사건을 의미한다. 이펙터 기능의 예로서는, 항체 의존성 세포매개 세포독성(ADCC), 항체 의존성 세포매개 식작용(ADCP), 및 보체 의존성 세포독성(CDC)이 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 이펙터 기능에는, 항원 결합 후에 작용하는 이펙터 기능과, 항원 결합과는 무관하게 작용하는 이펙터 기능의 양쪽을 포함한다.

[0075] 본 명세서중에서 사용하는 "이펙터 세포"란, 1개 이상의 Fc 수용체를 발현하고, 1개 이상의 이펙터 기능을 매개하는, 면역계의 세포를 의미한다. 이펙터 세포의 예로서는, 단구, 마크로파지, 호중구, 수상세포, 호산구, 마스트 세포, 혈소판, B 세포, 대형과립 림프구, 랑게르한스 세포, 네츄럴 킬러(NK) 세포가 있지만, 이들에 한정되는 것은 아니고, 또한, 이펙터 세포는 임의의 생물, 예를 들면, 인간, 마우스, 래트, 토끼 및 원숭이에서 유래할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0076] 본 명세서 중에서 사용하는 "면역 복합체와 특이적으로 결합하는" 및 이와 유사한 용어는, 어떠한 면역 복합체와 특이적으로 결합하지만, 다른 분자와는 특이적으로 결합하지 않는 분자를 의미한다. 면역 복합체와 특이적으로 결합하는 분자는, 예를 들면, 면역 분석, BIAcore, 또는 당 기술분야에서 공지의 다른 분석으로 측정하여, 보다 낮은 친화성으로 다른 펩티드 또는 폴리펩티드와 결합하여도 좋다. 바람직하게는, 면역 복합체와 특이적으로 결합하는 분자는, 다른 단백질과 교차반응하지 않는 것이다. 면역 복합체와 특이적으로 결합하는 분자는, 예를 들면, 면역 분석, BIAcore, 또는 당 기술분야에서 공지의 다른 기술에 의해 확인하는 것이 가능하다.

[0077] 본 명세서중에서 사용하는 "안정한 융합 단백질"이란, 당업자에게 알려진 통상의 생화학적 및 기능성 분석을 이용하여 평가한 경우, 제조 및/또는 보존중에 최소 내지 검출불능 레벨로 분해되는 융합 단백질을 의미하고, 생화학적 활성(예를 들면, FcγR과의 결합)의 저하 없이 장기간 보존하는 것이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0078] 도 1a-b 인간 IgG, CH1, 힌지 및 Fc 영역의 아미노산 서열

도 1a는 인간 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 힌지(a) 및 Fc(b) 도메인의 아미노산 서열을 나타낸다(IgG1 힌지 도메인(**서열 번호 1**); IgG2 힌지 도메인(**서열 번호 2**); IgG3 힌지 도메인(**서열 번호 3**); IgG4 힌지 도메인(**서열 번호 4**); IgG1 Fc 도메인(**서열번호 5**); IgG2 Fc 도메인(**서열번호 6**); IgG3 Fc 도메인(**서열번호 7**); IgG1 Fc 도메인(**서열번호 8**)). **도 1a 및 1b**에서 나타낸 아미노산 잔기는 Kabat EU의 넘버링 시스템에 따라 번호를 붙이고 있다. 아이소타입 서열에 대해서는 중쇄간의 S-S 결합을 형성하는 각 힌지 영역의 최초와 최후의 시스테인 잔기를 동일 위치에 배치함으로써 IgG1 서열과의 정렬을 행하고 있다. **도 1b**에서는 CH2 도메인중의 잔기를 +로 나타내고, CH3 도메인중의 잔기를 ~로 나타내고 있다.

도 2 공유결합형 이중기능성 디아바디의 폴리펩티드 사슬의 모식도

공유결합형 이중기능성 디아바디의 폴리펩티드는 짧은 펩티드 링커에서 분리된 항체 VL도메인 및 항체 VH도메인으로 이루어진다. 8아미노산 잔기의 링커는 1본쇄 폴리펩티드의 scFv컨스트럭트에 대한 자기집합을 방해하고 있고, 그 대신에 상이한 폴리펩티드 사슬의 VL도메인 및 VH도메인간의 상호 작용이 우선한다. 4개의 컨스트럭트를 제작했다(각 컨스트럭트는 컨스트럭트의 좌측의 아미노 말단 "n"으로부터 도면의 우측의 카르복시 말단 "c"까지 기재되어 있다): 컨스트럭트(1)(서열 번호 9)은 n-Hu2B6의 VL도메인-링커(GGGSGGGG(서열 번호 10))-Hu3G8의 VH

도메인-및 C말단 서열(LGGC)-c를 포함하고, 컨스트럭트(2)(서열 번호 11)는 n-Hu3G8의 VL도메인-링커(GGGSGGGG(서열 번호 10))-Hu2B6의 VH도메인-및 C말단 서열(LGGC)-c를 포함하고, 컨스트럭트(3)(서열 번호 12)은 n-Hu3G8의 VL도메인-링커(GGGSGGGG(서열 번호 10))-Hu3G8의 VH도메인-및 C말단 서열(LGGC)-c를 포함하고, 컨스트럭트(4)(서열 번호 13)는 n-Hu2B6의 VL도메인-링커(GGGSGGGG(서열 번호 10))-Hu2B6의 VH도메인-및 C말단 서열(LGGC)-c를 포함한다.

도 3 친화성 정제된 디아바디의 SDS-PAGE 분석

도 3은 친화성 정제된 디아바디의 SDS-PAGE 분석을 나타내는 도면이다. 친화성 정제된 디아바디를 환원(레인 1~3) 또는 비환원(레인 4~6) 조건하에서SDS-PAGE 분석에 제공했다. 표준의 대략의 분자량을(레인 3 및 4 사이에)나타내고 있다. 레인 1 및 4는 h3G8 CMD를, 레인 2 및 5는 h2B6 CMD를, 레인 3 및 6은 h2B6-h3G8 CBD를 나타낸다.

도 4a-b 친화성 정제된 디아바디의 SEC 분석

친화성 정제된 디아바디를 SEC 분석에 제공했다. (a) 이미 알려진 표준: 전장 IgG(~150kDa), IgG의 Fab 단편(~50kDa), 및 scFv(~30kDa)의 용출 프로파일; (b) 이미 알려진 표준: h2b6 CMD, h3G8 CMD 및 h2B6-h3G8 CBD의 용출 프로파일.

도 5 h2B6-h3G8 CBD의 sCD32B 및 sCD16A에 대한 결합

sCD32B 및 sCD16A에 대한 h2B6-h3G8 CBD의 결합은 샌드위치 ELISA에서 분석하였다. sCD32B는 표준 단백질로서 사용하였다. 이차 프로브는 HRP 접합 sCD16A였다. CD16A에 결합하는 h3G8 CMD를 대조군으로서 사용하였다.

도 6a-c BIACORE 분석 OF 디아바디 결합 TO sCD16A, SCD32B 및 sCD32B

2B6-h3G8 CBD , h2B6 CMD 및 h3G8 CMD와 sCD16A, sCD32B 및 sCD32A(음성 대조군)와의 결합을 SPR 해석에 의해 분석했다. h3G8 scFv도 대조군으로서 시험했다.(a) sCD16과의 결합, (b) sCD32B와의 결합, 및 (c) sCD32A와의 결합. 디아바디를 100nM의 농도로, scFv를 200nM의 농도로, 유속 50ml/분에서 60초간, 수용체 표면에 투입했다.

도 7a-e sCD16A 및 SCD32B에 대한 디아바디 결합의 BIACORE 분석

h2B6-h3G8 CBD, h2B6 CMD 및 h3G8 CMD와 sCD16A, 및 sCD32B와의 결합을 SPR 해석에 의해 분석했다. h3G8 scFv도 대조군으로서 시험했다.(a) h3G8 CMD sCD16A와의 결합; (b) h2B6-h3G8 CBD와 sCD16A와의 결합; (c) h3G8 scFv와 sCD16A와의 결합; (d) h2B6 CMD와 sCD32B와의 결합; 및 (e) h2B6-h3G8 CBD와 sCD32B와의 결합. 디아바디를 6.25~200nM의 농도로, 유속 70ml/분에서 180초간, 수용체 표면에 투입했다.

도 8 공유결합형 이중특이성 디아바디 분자를 형성하기 위한 VL 및 VH 도메인을 포함하는 폴리펩티드 사슬의 상호작용을 나타내는 모식도

NH_2 및 COOH는 각각 각 폴리펩티드 사슬의 아미노 말단 및 카르복시 말단을 나타낸다. S는 각 폴리펩티드 사슬의 C말단 시스테인 잔기를 나타낸다. VL 및 VH는 각각 L쇄 가변 도메인 및 H쇄 가변 도메인을 나타낸다. 점선 및 파선은 2개의 폴리펩티드 사슬끼리를 구별하기 위한 것이고, 특히 상기 쇄의 링커 부분을 나타내고 있다. h2B6 Fv 및 h3G8 Fv는 각각 CD32B 및 CD16에 특이적인 에피토프 결합 부위를 나타낸다.

도 9 공유결합형 이중특이성 디아바디의 Fc 도메인을 함유하는 폴리펩티드 사슬의 모식도

본 발명의 디아바디 분자의 폴리펩티드 컨스트럭트의 모식도(각 컨스트럭트는 컨스트럭트의 좌측의 아미노 말단 "n"으로부터 도면의 우측의 카르복시 말단 "c"까지 기재되어 있다). 컨스트럭트(5)(서열 번호 14)는 n-Hu2B6의 VL도메인-제1 링커(GGGSGGGG(서열 번호 10))-Hu3G8의 VH도메인-제2 링커(LGGC)-및 인간 IgG1의 C말단 Fc도메인-c를 포함하고, 컨스트럭트(6)(서열 번호 15)은 n-Hu3G8의 VL도메인-링커(GGGSGGGG(서열 번호 10))-Hu2B6의 VH도메인-및 제2 링커(LGGC)-및 인간 IgG1의 C말단 Fc도메인-c를 포함하고, 컨스트럭트(7)(서열 번호 16)은 n-Hu2B6의 VL도메인-제1 링커(GGGSGGGG(서열 번호10))-Hu3G8의 VH도메인-및 C말단 서열(LGGCFNRGEC)(서열 번호 17)-c를 포함하고, 컨스트럭트(8)(서열 번호 18)은 n-Hu3G8의 VL도메인-링커(GGGSGGGG(서열 번호 10))-Hu2B6의 VH도메인-및 제2 링커(LGGC)-및 인간 IgG1의 C말단 힌지/Fc도메인(A215V의 아미노산 치환을 갖는다)-c를 포함한다.

도 10 CD32B 및 sCD16A에 대한 Fc 도메인을 포함하는 디아바디 분자의 결합

Fc도메인을 포함하는 디아바디 분자와 sCD32B 및 sCD16A와의 결합을 샌드위치 ELISA에서 분석했다. 분석한 디아

바디는 다음 3개의 재조합 발현 시스템에 의해 생산되었다: 컨스트럭트 1 및 6을 각각 발현하는 pMGX669 및 pMGX674의 동시형질도입, 컨스트럭트 2 및 5를 각각 발현하는 pMGX667 및 pMGX676의 동시형질도입, 컨스트럭트 5 및 6을 각각 발현하는 pMGX676 및 pMGX674의 동시형질도입. sCD32B를 표적 단백질로서 사용했다. 제2 프로브는 HRP 접합 sCD16A로 했다.

도 11 2가의 공유결합형 디아바디를 형성하기 위해서, 각각 1개의 Fc 도메인을 포함하는 2개의 폴리펩티드 사슬의 상호작용을 나타내는 모식도

NH_2 및 COOH는 각 폴리펩티드 사슬의 아미노 말단 및 카르복시 말단을 각각 나타낸다. S는 각 폴리펩티드 사슬의 제2 링커 서열중의 시스테인 잔기간의 적어도 1개의 이황화 결합을 나타낸다. VL 및 VH는 각각 L쇄 가변 영역 및 H쇄 가변 영역을 나타낸다. 점선 및 파선은 2개의 폴리펩티드 사슬끼리를 구별하기 위한 것이고, 특히 상기 쇄의 제1 링커 부분을 나타낸다. CH2 및 CH3은 Fc도메인의 CH2 및 CH3 불변 도메인을 나타낸다. h2B6 Fv 및 h3G8 Fv는 각각 CD32B 및 CD16에 특이적인 에피토프 결합 부위를 나타낸다.

도 12 힌지/Fc 도메인을 포함하는 디아바디 분자의 sCD32B 및 sCD16A에 대한 결합

Fc도메인을 포함하는 디아바디 분자와 sCD32B 및 sCD16A와의 결합에 대해서는 샌드위치 ELISA에서 분석했다. 분석한 디아바디는 다음의 4개의 재조합 발현 시스템에 의해 생산되었다: 컨스트럭트 1 및 6을 각각 발현하는 pMGX669+pMGX674의 동시형질도입, 컨스트럭트 2 및 8을 각각 발현하는 pMGX669+pMGX678의 동시형질도입, 컨스트럭트 7 및 6을 각각 발현하는 pMGX677+pMGX674의 동시형질도입, 컨스트럭트 7 및 8을 각각 발현하는 pMGX677+pMGX678의 동시형질도입. sCD32B를 표적 단백질로서 사용했다. 제2 프로브는 HRP 접합 sCD16A로 했다.

도 13 4량체 디아바디 분자를 형성하기 위한 폴리펩티드 사슬의 상호작용을 나타내는 모식도

NH_2 및 COOH는 각 폴리펩티드 사슬의 각각 아미노 말단 및 카르복시 말단을 나타낸다. S는 Fc를 가지는 '무거운' 폴리펩티드 사슬의 제2 링커 서열중의 시스테인 잔기와, Fc를 가지지 않는 '가벼운' 폴리펩티드 사슬의 C말단 서열중의 시스테인 잔기간의 적어도 1개의 이황화 결합을 나타낸다. VL 및 VH는 각각 L쇄 가변 도메인 및 H쇄 가변 도메인을 나타낸다. 점선 및 파선은 2개의 폴리펩티드 사슬끼리를 구별하기 위한 것이고, 특히 상기 중쇄의 제1 링커 부분 또는 상기 경쇄의 링커를 나타낸다. CH2 및 CH3은 Fc도메인의 CH2 및 CH3 불변 도메인을 나타낸다. h2B6 Fv 및 h3G8 Fv는 각각 CD32B 및 CD16에 특이적인 에피토프 결합 부위를 나타낸다.

도 14 공유결합형 이중특이성 디아바디를 형성하는 Fc 도메인을 함유하는 폴리펩티드 사슬의 모식도

본 발명의 디아바디 분자를 형성하는 폴리펩티드 컨스트럭트의 모식도(각 컨스트럭트는 컨스트럭트의 좌측의 아미노 말단 "n"으로부터 도면의 우측의 카르복시 말단 "c"까지 기재되어 있다). 컨스트럭트(9)(서열 번호 19)는 n-인간 IgG1의 힌지/Fc도메인-Hu3G8의 VL도메인-링커(GGGSGGGG(서열 번호 10))-Hu2B6의 VH도메인-링커(GGGSGGGG(서열 번호 10))-및 C말단 LGGC 서열-c를 포함하고, 컨스트럭트(10)(서열 번호 20)은 n-인간 IgG1의 Fc도메인-Hu3G8의 VL도메인-링커(GGGSGGGG(서열 번호 10))-Hu2B6의 VH도메인-링커(GGGSGGGG(서열 번호 10))-및 C말단 LGGC 서열-c를 포함하고, 컨스트럭트(11)(서열 번호 21)은 n-Hu2B6의 VL도메인(G105C)-링커(GGGSGGGG(서열 번호 10))-Hu3G8의 VH도메인-및 A215V의 아미노산 치환을 갖는 인간 IgG1의 C말단 힌지/Fc도메인-c를 포함하고, 컨스트럭트(12)(서열 번호 22)는 n-Hu3G8의 VL도메인-링커(GGGSGGGG(서열 번호 10))-Hu2B6의 VH도메인(G44C)-및 C말단 FNRGEC(서열 번호 23) 서열-c를 포함한다.

도 15 a-b 친화성 4량체 디아바디의 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯 분석

컨스트럭트 10 및 1, 컨스트럭트 9 및 1, 컨스트럭트 11 및 12를 발현하는 벡터에서 동시형질도입된 재조합 발현 시스템에 의해 생산된 디아바디를, 비환원적 조건의 SDS-PAGE 분석(a), 및 염소 항인간 IgG1 H+L을 프로브로서 사용한 웨스턴블랏 분석(b)에 제공했다. SDS-PAGE 겔중의 단백질을 심플리 블루 세이프스테인(Simply Blue Safestain; Invitrogen사)으로 시각화했다. a 및 b의 양 패널에 있어서, 컨스트럭트 10 및 1, 컨스트럭트 9 및 1, 컨스트럭트 11 및 12A를 포함하는 디아바디 분자는 각각 레인 1, 2, 3에 상당한다.

도 16 Fc 도메인 및 유전자 조작에 의해 만들어진 사슬내 이황화 결합을 포함하는 디아바디 분자의 SCD32B 및 sCD16A에 대한 결합

Fc도메인, 및 '가벼운' 폴리펩티드 사슬과 '무거운' 폴리펩티드 사슬간의 유전자 조작에 의해 만들어진 이황화 결합을 포함하는 디아바디 분자와, sCD32B 및 sCD16A와의 결합을 샌드위치 ELISA에서 분석했다. 분석한 디아바디는 다음 3개의 재조합 발현 시스템에 의해 생산되었다: 각각 컨스트럭트 1 및 10을 발현하는 계, 컨스트럭트

1 및 9를 발현하는 계, 및 컨스트럭트 11 및 12를 발현하는 계. sCD32B를 표적 단백질로서 사용했다. 제2 프로브는 HRP 접합 sCD16A로 했다. h3G8의 결합을 대조군으로서 사용했다.

도 17 디아바디 **분자의 폴리단백질 전구체의 모식도 및 람다 경쇄 및/또는 힌지 도메인을 함유하는 폴리펩티드의 모식도**

본 발명의 디아바디 분자를 형성하는 폴리펩티드 컨스트럭트의 모식도(각 컨스트럭트는 컨스트럭트의 좌측의 아미노 말단 "n"으로부터 도면의 우측의 카르복시 말단 "c"까지 기재되어 있다). 컨스트럭트(13)(서열 번호 95)은 n-3G8의 VL도메인-제1 링커(GGGSGGGG(서열 번호 10))-2.4G2VH의 VH도메인-제2 링커(LGGC)-푸린 인식 부위(RAKR(서열 번호 93))-2.4G2의 VL도메인-제3 링커(GGGSGGG(**서열번호 10**)-3G8의 VH도메인-및 C말단 LGGC도메인을 포함하고(서열 번호 95을 코드하는 뉴클레오티드 서열은 서열 번호 96에 나타냄), 컨스트럭트(14)(서열 번호 97)는 n-3G8의 VL도메인-제1 링커(GGGSGGGG(서열 번호 10))-2.4G2VH의 VH도메인-제2 링커(LGGC)-푸린 인식 부위(RAKR(서열 번호 93))-FMD(구제역 바이러스 프로테아제 C3) 부위-2.4G2의 VL도메인-제3 링커(GGGSGGG(서열 번호 10)-3G8의 VH도메인-및 C말단 LGGC도메인을 포함한다(서열 번호 97를 코드하는 뉴클레오티드 서열은 서열 번호 98에 나타낸다). 컨스트럭트(15)(서열 번호 99)는 n-Hu2B6의 VL도메인-링커(GGGSGGGG(서열 번호 10))-Hu3G8의 VH도메인-및 C말단 FNRGEC(서열 번호 23)도메인을 포함한다(서열 번호 99을 코드하는 뉴클레오티드 서열은 서열 번호 100에 나타낸다). 컨스트럭트(16)(서열 번호 101)은 n-Hu3G8의 VL도메인-링커(GGGSGGGG(서열 번호10))-Hu2B6의 VH도메인-C말단 VEPKSC(서열 번호 77)도메인을 포함한다(서열 번호 101을 코드하는 뉴클레오티드 서열은 서열 번호 102에 나타낸다).

도 18 폴리단백질 전구체 분자로부터 유래하는 디아바디 분자의 mCD32B 및 SCD16A에 대한 결합

폴리단백질 전구체 분자 컨스트럭트 13(서열 번호 95)에 유래하는 디아바디 분자와 마우스 CD32B(mCD32B) 및 가용성 CD16A(sCD16A)와의 결합을 샌드위치 ELISA에서 해석했다. mCD32B를 표적 단백질로서 사용했다. 제2 프로브는 비오틴 접합 sCD16A로 했다.

도 19 람다 사슬 및/또는 힌지 도메인을 포함하는 디아바디 분자의 sCD32B 및 sCD16A에 대한 결합

인간 람다 경쇄의 C말단에 유래하는 도메인 및/또는 IgG의 힌지 도메인을 포함하는 디아바디와, sCD32B 및 sCD16A와의 결합을 샌드위치 ELISA에서 분석하고, 컨스트럭트 1 및 2(도 5)로 이루어지는 디아바디와 비교했다. 분석한 디아바디는 컨스트럭트 15 및 16(각각 서열 번호 99 및 서열 번호 101)을 발현하는 재조합 발현 시스템에 의해 생산되었다. sCD32B를 표적 단백질로서 사용했다. 제2 프로브는 HRP 접합 sCD16A로 했다. 작은점 형상 모양의 바는 컨스트럭트 15/16의 조합물을 나타내고, 또 체크 모양의 바는 컨스트럭트 1/2의 조합물을 나타낸다.

도 20 세포 표면에 위치한 CD32B와 플루오레세인-접합 분자에 결합된 2B6/4420 DART의 모식도

2B6 arm에 대한 다른 특이성을 대체할 수 있을 뿐 아니라,"보편적인 어댑터(universal adaptor)"인 DART의 항-플루오레세인 arm의 유연성을 나타낸다. V-영역은 박스로 나타냈고, GGGSGGGG(**서열번호 10**) 링커는 선으로 나타냈고, 이황화 결합은 2개의 쇄를 연결하는 것으로 나타냈다. 하나의 쇄의 구성성분은 블루로, 다른 쇄의 구성성분은 핑크로 나타냈다. N은 아미노말단, C는 카복시말단, FL은 플루오레세인, VL은 경쇄 가변영역, VH은 중쇄 가변영역이다.

도 21(패널 A 및 B) 2B6/4420 DART는 플루오레세인-접합 분자에 대하여 특이적으로 결합하고, CD32에 동시에 결합할 수 있다.

(A) 2B6/4420 또는 2B6/3G8은, FITC-S 단백질로 코팅된 ELISA 플레이트에 결합되었다. 2B6 arm의 바인딩 및 기능은 가용성 CD32B로 검출하였고, 이어서 CD32B에 특이적인 항체와 HRP가 결합된 2차 검출 항체로 검출하였다. (B) 2B6/4420 또는 2B6/3G8는, HuIgG 또는 FITC-HuIgG(플루오레세인-결합형)으로 코팅된 ELISA 플레이트에 결합되었다. 결합은 2B6 Fv에 특이적인 다중클론 혈청으로 검출하고, 이어서 HRP가 결합된 2차 항체로 검출하였다.

도 22 (패널 A 및 B) 항-인간 CD79B 항체를 사용하여 정제된 B 세포의 활성화.

FITC-연결된 항-인간 CD79B 항체(CB3.1-FITC(A) 또는 CB3.2-FITC(B))와 GAM IgG Fc 특이적인 F(ab')2 단편 50 μg/ml(x축)의 농도를 증가시켜, 정제된 B 세포를 활성화시켰다. B 세포는 PBS(백색 막대) 또는 5μg/ml의 αFITCαCD32BDART(흑색 막대) 또는 αCD16αCD32BDART(회색 막대)의 존재하에서 활성화되었다. 반응은 3회 실시

하고, 표준편차를 계산하였다.

도 23 (패널 A 및 B) 정제된 B 세포의 활성화

건강한 2차 공여자로부터 정제된 B 세포를 **도 22**에 나타낸 바와 같이 활성화시켰다. 항-CD79b 항체 FITC-결합 CB3.2-FITC(A)의 존재하에서 활성화된 세포에서 증식 인덱스를 측정하였고, 비표지의 CB3.2 항체(B)의 존재하에서 활성화된 세포의 증식 인덱스와 비교하였다.

도 24 (상위 및 하위 패널) MGD261을 사용한 HCD16A/B 트랜스제닉 마우스에서의 생체 내 마우스 B 세포 감소

MacroGenics 사육 콜로니 유래의 mCD32-/-hCD16A+C57B1/6, mCD32-/-hCD32B+C57B1/6 및 mCD32-/-hCD16A+hCD32B+C57B1/6 마우스를, MGD261(10, 3, 1 또는 0.3mg/kg) 또는 관계없는 항체(hE16 10mg/kg)로, 0, 3, 7, 10, 14 및 17일째에 IV 주사하였다. FACS 분석을 위해, -19(사육전), 4, 11, 18, 25 및 32일째에 혈액을 수집하였다. 1주일에 3번 동물의 건강과 활동을 기록하였다. 상위 패널: h2B6-3G8 및 WNV mAb; 하위 패널: h2B6-3G8 -hCD16A 또는 -hCD32B 마우스 및 WNV mAb -hCD16A 또는 -hCD32B 마우스.

도 25 2.4G2-3G8 DB을 이용한 HCD16A/B 트랜스제닉 마우스에서의 생체 내 마우스 B 세포 감소

MacroGenics 사육 콜로니 유래의 mCD16-/-, mCD16-/-hCD16A+ C57B1/6, mCD16-/-hCD16B+ 및 mCD16-/-hCD16A+hCD16B+ 마우스를, 2.4G2-3G8 DB(75ug/마우스) 또는 PBS로, 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 및 18일째에 IP 주사하였다. FACS 분석을 위해, -10(사육전), 4, 11 및 18일째에 혈액을 수집하였다. 1주일에 3번 동물의 건강과 활동을 기록하였다.

도 26 인간 종양 세포주 RAJI의 정맥(IV) 모델을 이용한 MGD261의 항-종양 활성의 증명.

MacroGenics 사육 콜로니 유래의 12-22주령 mCD16-/-, hCD16A+, RAG1-/-C57B1/6 마우스를, 5x106 Raji 세포로, 0일째에 IV 주사하였다. 또한, 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27 및 30일째에, 마우스를 250, 25 또는 2.5ug의 MGD261 또는 PBS(음성 대조군)으로, 복강내(IP) 주사하였다. 이후, 마우스를 매일 관찰하여, 체중을 1주일에 두번 기록하였다. 다리마비를 보이는 마우스를 희생시켰다.

도 27 비-포유류 숙주에서의 DART 발현

BL21DE3 세포(Novagen)를 pET25b(+) *T7-lac* + 3G8/3G8 플라스미드로 형질전환후, amp-내성 콜로니를 배지배양용 시드로 이용하였다. 배양물이 0.5 OD600 unit에 이를 때, 0.5mM IPTG를 첨가하여 발현을 유도하였다. 배양물을 30℃에서 2시간 키운후, 무세포 배지를 수집하였다.

도 28 DART ELISA

96-well Maxisorp 플레이트를 이용하여, h3G8-h3G8 DART 결합 ELISA를 수행하였다. 반응후, 플레이트를 PBS-T로 3회 세정한 후, 80 μl/well의 TMB 기질로 현상하였다. 5분간 인큐베이션한 후, 40μl/well의 1% H_2SO_4로 반응을 중단시켰다. 96-well 플레이트 리더 및 SOFTmax 소프트웨어를 이용하여 OD450nm를 얻었다. GraphPadPrism 3.03 소프트웨어를 이용하여 OD450nm를 플롯팅하였다.

도 29 DART-유도 인간 B-세포 사멸

인간 PBMC를 표시된 분자와 함께 밤새 배양하였다. FACS를 이용하여, 총 FSC/SSC ungated 풀상의 B 세포(CD20+ 세포)의 PI+Annexin-V+ 풀의 퍼센트로서, 어팝토시스(apoptosis)를 분석하였다.

도 30 8B5-CB3.1 DART 컨스트럭트

본 발명을 설명하기 위하여, 다중 8B5-CB3.1 DART 컨스트럭트를 제조하였다. 컨스트럭트 5 및 6, 또는 6 및 7, 또는 8 및 9, 또는 9 및 10, 암호화된 발현 플라스미드를, 항 플라그 테그가 있거나 없이, 리포펙타민 2000(Invitrogen)을 이용하여, HEK-293 세포에 동시형질도입시키므로써 8B5-CB3.1 DART를 발현시켰다. 3일마다 3번 조건배지를 수집하였다. CD32B 친화성 컬럼을 이용하여 조건배지를 정제하였다.

도 31 8B5-CB3.1 DART ELISA

96-웰 Maxisorp 플레이트를 이용하여, 8B5-CB3.1 DART/ch8B5 경쟁 ELISA를 수행하였다. 반응후, 플레이트를 PBS-T로 3회 세정한 후, 80 μl/웰의 TMB 기질로 현상하였다. 5분간 인큐베이션한 후, 40μl/웰의 1% H_2SO_4로 반응을 중단시켰다. 96-웰 플레이트 리더 및 SOFTmax 소프트웨어를 이용하여 OD450nm를 얻었다. GraphPadPrism

3.03 소프트웨어를 이용하여 OD450nm를 플롯팅하였다.

도 32 4가의 DART 구조의 모식도

4개의 폴리펩티드 사슬의 어셈블리을 통하여 얻어지는 DART 종의 일반적인 구조를 나타낸다. Ig-유사 DART의 4개의 항원-결합 도메인을 사선과 암회색의 타원으로 표시하였다.

도 33 Ig-유사 4가의 DART

Ig-유사 4가 DART의 에피토프 결합 부위의 구조를 나타낸다.

도 34 mCD32-hCD16A 결합 ELISA

실시예 6.10의 Ig-유사 4가 DART가, 대조군(ch-mCD32 mAb) 항체 또는 다른 DART 종 보다 더 큰 친화성으로 항원에 결합함을 나타내는 ELISA의 결과이다.

도 35 Ig DART 분자의 모식도

Ig DART 분자를 도시한다. 특이성은 음영, 패턴 또는 백색 영역으로, 불변영역은 흑색으로, 이황화 결합은 도트 흑색선으로 표시하였다. 모든 단백질쇄의 N-말단은 그림의 위쪽으로 향하여 배향되어 있고, 모든 단백질쇄의 C-말단은 그림의 아래쪽으로 향하여 배향되어 있다. **도 35a-e**는 이중특이적이고, **도 35f-j**는 삼중특이적이다. **도 35a 및 35e**는 4가이다. **도 35b, c, f, i 및 j**는 6가이다. **도 35 d, g 및 h**는 8가이다. 각각의 도메인의 상세한 설명에 대하여는, **도 1, 2, 9, 14 및 17** 및 명세서의 Section 3.1 참조.

도 36 HU2B6 4.5-HU3G8 5.1 생물특이적 디아바디의 결합 능력

도 36은 Hu2B6 4.5 또는 Hu3G8 5.1 디아바디(삼각형)와 비교하여 Hu2B6 4.5-Hu3G8 5.1 생물특이적 디아바디(사각형)의 CD32b 및 CD16a에 대한 결합 능력을 보여준다.

도 37 E-코일 및 K-코일 DART 유도체의 도식

도 37은 E-코일 및 K-코일 DART 유도체의 일반적 배열을 묘사한다.

도 38 바람직한 E-코일 및 K-코일 분리자의 헬릭스 배열

도 38은 바람직한 "E-코일" 서열$(EVAALEK)_4$(**서열번호 299**) 및 바람직한 "K-코일" 서열$(KVAALKE)_4$(**서열번호 300**)의 헬릭스 배열을 보여준다.

도 39 E-코일 및 K-코일 Fc-함유 DART 유도체

도 39는 사슬 교환에 의해 형성될 수 있는 E-코일 및 K-코일 Fc-함유 DART 유도체의 다른 종을 묘사한다.

도 40 h2B6YAhCB3 DART의 E-코일 및/또는 K-코일 유도체 및 E-코일 및/또는 K-코일 FC-함유 유도체에서의 크기 배재 크로마토그래피

도 40은 h2B6YAhCB3 DART의 E-코일 및/또는 K-코일 유도체 및 E-코일 및/또는 K-코일 Fc-함유 유도체에서의 크기 배재 크로마토그래피의 결과를 보여준다. 이런 분자의 네 종을 분석하였다; 모두 E-코일 및 K-코일을 가졌다: EK(Fc 영역 없음), 2.1 mg; EFc/K(E-코일에 연결된 Fc), 2.7 mg; E/KFc(K-코일에 연결된 Fc), 1.8 mg; EFc/KFc(동일한 DART의 K-코일 및 E-코일에 연결된 Fc), 2.0 mg.

도 41 생산된 이량체 분자의 구조

도 41은 **도 40**의 크기 배재 크로마토그래피에서 확인된, 생성된 이량체 분자의 가능한 구조를 보여준다.

도 42 h2B6YAhCB3 DART의 E-코일 및/또는 K-코일 유도체 및 E-코일 및/또는 K-코일 FC-함유 유도체의 SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동 분석

도 42는 h2B6YAhCB3 DART의 E-코일 및/또는 K-코일 유도체 및 E-코일 및/또는 K-코일 FC-함유 유도체의 크기 배재 크로마토그래피(**도 40**)로부터 얻은 분획의 SDS 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동 분석의 결과를 보여준다. 측면 레인: 분자 마커 대조군; 레인 1 : EK(Fc 영역 없음); 레인 2: EFc/K, 집합 분획; 레인 3: EFc/K, 단량체 분획; 레인 4: E/KFc, 집합 분획; 레인 5: E/KFc, 단량체 분획; 레인 6: EFc/KFc, 집합 분획; 레인 7: EFc/KFc, 이량체 분획; 레인 8: EFc/KFc, 단량체 분획.

도 43 이중특이성 결합 ELISA 분석

도 43은 E-코일/K-코일 Fc-함유 h2B6YAhCB3 DART 유도체(EFc/K 또는 E/KFc), h2B6YAhCB3 DART, 대조군 및 EFc/KFc h2B6YAhCB3 DART 유도체를 비교한 이중특이성 결합 ELISA의 결과를 보여준다.

도 44 T-세포 증식을 억제하는 h2B6YAhCB3 DART의 E-코일 및/또는 K-코일 유도체 및 E-코일 및/또는 K-코일 FC-함유 유도체의 능력

도 44는 T-세포 증식을 억제하기 위한 h2B6YAhCB3 DART의 E-코일 및/또는 K-코일 유도체 및 E-코일 및/또는 K-코일 Fc-함유 유도체의 능력을 보여준다.

도 45 hCD16-hCD32B ABD-DART

도 45는 hCD16 및 hCD32B 항원과 면역반응하는 재조합 이중특이성 DART와 융합된 연쇄상구균 단백질 G의 ABD3 도메인으로 구성된 재조합 항체 분자, hCD16-hCD32B ABD-DART의 모식도를 보여준다.

도 46a/46b 이중 특이성 ELISA를 사용한 hCD16-hCD32B ABD-DART의 결합 친화성

ELISA 플레이트에 2㎍/mL의 농도의 CD16 항원(**도 46a**) 또는 인간 혈청 알부민(**도 46a**) 중 어느 하나로 코팅하였다. 2㎍/mL에서 시작하는 hCD16-hCD32B ABD-DART(■) 및 대조군 hCD16-hCD32B DART(●)의 다양한 농도를 결합시켰다. 검출을 위하여 바이오틴화 sCD32B 항원에 이어 HRP 접합 스트렙타비딘을 플레이트에 첨가하였다.

도 47 DART 단백질의 PBMC 매개 세포 독성

PBMC는 DART 단백질의 세포 독성을 매개하였다. ADCC 분석은 표적 세포로서 인간 B-세포주, Daudi를 이펙터 세포로서 PBMC와 배양하여 수행하였다. 개별 분석은 20:1의 이펙터-대-표적 비율 및 항체의 적정에서 3회 반복하여 수행하였다: hCD16A-hCD32B DART(●) 및 hCD16A-hCD32B ABD DART(■). 세포 매개 세포 독성은 LDH 분비 분석에 의해 측정하였다. 10° 에서의 더 낮은 곡선은 hCD16A-hCD32B ABD DART(■)이다.

도 48 C57B1/6 마우스에서 hCD 16-hCD32B ABD-DART의 개선된 약동학적 성질

마우스(n=3)에 (A) hCD16-hCD32B ABD-DART(●) 및 (B) hCD16-hCD32B DART(▲)를 5 mg/kg으로 단일 정맥 주사로 주입하였다. 마우스 혈청을 다양한 시점에서 수집하였고, 혈청에서의 단백질의 농도를 ELISA에 의해 정량하였다. 약동학적 계산은 WinNonlin Professional 5.1을 사용하여 수행하였다.

도 49 a-e HER2 저발현 세포주의 패널에서의 HER2 x TCRb DART 활성

Her2 및 T-세포 수용체(TCR) 결합 도메인을 갖는 DART 분자를 낮은 수준의 HER2 발현을 나타내는 것으로 이전에 특징화된 다양한 유방암 세포주, 결장암 및 방광암 세포주에서 세포 독성을 매개하는 그들의 능력을 시험하였다(그리고 따라서 항-Her2/neu 항체, Herceptin과 함께 처리하기 위해 내화됨). 시험한 유방암 세포주는 ZR75-1(HER2 2+)(**도 49a**), MCF-7(HER2 1+)(**도 49b**) 및 MDA-MB468(HER2-ve)(**도 49c**)이다. 시험한 비-유방암 세포주는 HT-29(결장암 세포주)(**도 49d**) 및 SW780(방광암 세포주)(**도 49e**)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0079] **5. 바람직한 구체예**

[0080] 디아바디 분자의 각 폴리펩티드 사슬은, VL 도메인 및 VH 도메인을 포함한다. 이들은, 도메인의 자기집합이 일어나지 않도록 공유결합에 의해 연결되어 있다. 2개의 폴리펩티드 사슬의 상호작용에 의해 2개의 VL-VH 쌍이 생기고, 2개의 에피토프 결합 부위, 즉 2가의 분자를 형성한다. VH 또는 VL 도메인은, 폴리펩티드 사슬내의 어는 위치에도 구속되지 않고, 즉 아미노(N) 말단 또는 카르복시(C) 말단에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 도메인은, 서로 상대적인 위치에 제한되는 것은 아니고, 즉 VL 도메인이 VH 도메인에 대하여 N 말단측에 있어도 좋고, 그 역으로 있어도 좋다. 유일한 제한은, 기능적인 디아바디를 형성하기 위해, 상보적인 폴리펩티드 사슬이 이용가능하다고 하는 점이다. VL 및 VH 도메인이 동일 항체에 유래하는 경우, 2개의 상보적 폴리펩티드 사슬은 동일해도 좋다. 예를 들면, 결합 도메인이 에피토프 A에 특이적인 항체에 유래하는 경우(즉, 결합 도메인이 VL_A-VH_A 상호작용으로부터 형성되는 경우), 각 폴리펩티드는 VH_A 및 VL_A을 포함하는 것이 가능하다. 항체의 2개의 폴리펩티드 사슬의 호모 2량체화는, 2개의 VL_A-VH_A 결합 부위의 형성을 유도하고, 결과적으로 2가의 단일 특이성 항체가 생긴다. VL 및 VH 도메인이 다른 항원에 대하여 특이적인 항체에 유래하는 경우, 기능적인 이중특이성 디아바디의 형성에는, 다른 2개의 폴리펩티드 사슬의 상호작용, 즉 헤테로 2량체의 형성이 필요하게 된다. 예를 들면, 이중특이성 디아바디의 경우, 1개의 폴리펩티드 사슬은 VL_A 및 VH_B로 구성된다. 상기 쇄의 호모 2량

체화는 결과적으로 결합하지 않거나 또는 예측할 수 없는 결합의, 2개의 VL_A-VH_B 결합 부위의 형성을 일으킬 수 있다. 이에 대하여, 2개의 다른 폴리펩티드 사슬이 예를 들면 재조합 발현 시스템에 있어서 자유로이 상호작용할 수 있는 경우, 한쪽은 VL_A 및 VH_B로, 다른 쪽은 VL_B 및 VH_A 로 이루어지고, 2개의 다른 결합 부위, 즉 VL_A-VH_A 및 VL_B-VH_B를 형성하는 것이 가능하다. 모든 디아바디 폴리펩티드 사슬의 쌍에 대하여, 2개의 쇄의 대조미스 또는 결합미스, 즉 VL-VL 또는 VH-VH 도메인의 상호작용의 가능성이 있다. 그러나, 기능적인 디아바디의 정제는, 적절히 2량체화한 결합 부위의 면역 특이성에 기초하여, 당해 분야에서 공지 또는 본 명세서에서 예시한, 예를 들면, 친화성 크로마토그래피와 같은 친화성을 기초로 한 방법을 이용하는 것으로, 용이하게 행할 수 있다.

[0081] 다른 구체예에서는, 디아바디의 1 이상의 폴리펩티드 사슬이 Fc 도메인을 포함하고 있다. 디아바디 분자의 폴리펩티드 사슬에서의 Fc 도메인은, 우선적으로 2량체를 형성하고, 결과적으로 면역글로불린 유사의 성질(예를 들면, Fc-FcγR 상호작용)을 나타내는 디아바디 분자가 형성된다. Fc 함유 디아바디는, 예를 들면 2개의 폴리펩티드 사슬로 이루어지고, 각각이 VH 도메인, VL 도메인 및 Fc 도메인을 포함하는 2량체여도 좋다. 상기 폴리펩티드 사슬의 2량체화에 의해, 비개변형 2가 항체의 구조와는 명확히 구별되는 구조임에도 불구하고, Fc 도메인을 포함하는 2가의 디아바디가 생긴다(**도 11**). 이와 같은 디아바디 분자는 야생형 면역글로불린과 비교하면, 예를 들면 혈중 반감기나 결합특성 등과 같은 표현형의 변화를 나타낼 수 있다. 다른 구체예에서, Fc 도메인을 포함하는 디아바디 분자는 4량체이어도 좋다. 상기 4량체는, 2개의 '무거운' 폴리펩티드 사슬, 즉 VL, VH 및 Fc 도메인으로 이루어지는 폴리펩티드 사슬와, 2개의 '가벼운' 폴리펩티드 사슬, 즉 VL 및 VH으로 이루어지는 폴리펩티드 사슬을 포함한다. 상기 경쇄 및 중쇄는 상호작용에 의해 단량체를 형성하고, 이들 단량체는 비쌍화 상태의 Fc 도메인을 통하여 서로 작용하여 Ig 유사 분자를 형성한다. 이와 같은 Ig 유사 디아바디는 4가이고, 단일 특이성, 2중 특이성, 또는 4중 특이성일 수 있다.

[0082] 디아바디 분자의 적어도 2개의 결합 부위는 동일 또는 다른 에피토프를 인식할 수 있다. 다른 에피토프는, 동일 항원 유래, 또는 다른 항원 유래로 할 수 있다. 하나의 구체예에서, 에피토프는 다른 세포 유래이다. 다른 구체예에서, 에피토프는 동일 세포 또는 바이러스상의 세포표면항원이다. 에피토프 결합 부위는, 항체의 생성이 가능한 어떠한 항원도 인식할 수 있다. 예를 들면, 단백질, 핵산, 박테리아 독소, 세포표면마커, 자가면역마커, 바이러스 단백질, 약물 등이다. 구체적인 구체예에서는, 디아바디의 적어도 1개의 에피토프 결합 부위는, 특정의 세포, 예를 들면 B 세포, T 세포, 식세포, NK 세포 또는 수상세포상의 항원에 대하여 특이적이다.

[0083] 디아바디의 폴리펩티드 사슬의 각 도메인 즉 VL, VH 및 Fc 도메인은 펩티드 링커에 의해 분리할 수 있다. 이 펩티드 링커는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9개의 아미노산으로 할 수 있다. 어떠한 구체예에서는, 아미노산 링커 서열은 핵산서열 **서열번호 74**에 의해 암호화되는 GGGSGGGG(**서열번호 10**)이다.

[0084] 어떠한 구체예에서는, 디아바디 분자의 각 폴리펩티드 사슬은, 디아바디 분자의 각 폴리펩티드 사슬이, 적어도 1개의 시스테인 잔기를 포함하도록 제작된다. 이 시스테인 잔기는, 본 발명의 두번째 폴리펩티드 사슬상의 적어도 1개의 시스테인 잔기와 상호작용하여, 쇄간 이황화 결합을 형성할 수 있다. 쇄간 이황화 결합은, 디아바디 분자의 안정화에 기여하고, 재조합계에서 발현 및 회수를 개선하는 것으로, 결과적으로 안정하고 일관성이 있는 조제물을 얻을 수 있을 뿐 아니라, 분리 정제된 산물의 *in vivo*에서의 안정성을 개선한다. 상기 적어도 1개의 시스테인 잔기는, 단일의 아미노산으로서 또는 비교적 긴 아미노산 서열(예를 들면 힌지 도메인)의 일부로서, 폴리펩티드 사슬의 임의의 위치에 도입하는 것이 가능하다. 구체적인 구체예에서, 상기 적어도 1개의 시스테인 잔기를 유전자 제조합하는 것에 의해 폴리펩티드 사슬의 C-말단에 존재하도록 설계한다. 어떠한 구체예에서, 상기 적어도 1개의 시스테인 잔기는, 아미노산 서열 LGGC의 내부로 폴리펩티드 사슬에 도입된다. 구체적인 구체예에서, 본 발명의 디아바디 분자를 구성하는 폴리펩티드 사슬의 C-말단은, 아미노산 서열 LGGC를 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 적어도 1개의 시스테인 잔기는, 예를 들면 **서열번호 1** 또는 **서열번호 4**의, 힌지 도메인을 구성하는 아미노산 서열내부로 폴리펩티드 사슬내에 도입된다. 구체적인 구체예에서, 본 발명의 디아바디 분자를 구성하는 폴리펩티드 사슬의 C-말단은, 예를 들면 **서열번호 1**과 같은 IgG 힌지 도메인의 아미노산을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 디아바디 분자를 구성하는 폴리펩티드 사슬의 C-말단은, 뉴클레오티드 서열(**서열번호 78**)로 암호화되는 아미노산 서열 VEPKSC(**서열번호 77**)를 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 적어도 1개의 시스테인 잔기는, 뉴클레오티드 서열(**서열번호 76**)로 암호화되는 아미노산 서열 LGGCFNRGEC(**서열번호 17**)내부로 폴리펩티드 사슬내에 도입된다. 구체적인 구체예에서, 본 발명의 디아바디를 포함하는 폴리펩티드 사슬의 C-말단은 뉴클레오티드 서열(**서열번호 76**)에 의해 암호화되는 아미노산 서열 LGGCFNRGEC(**서열번호 17**)을 포함한다. 어떠한 구체예에서, 상기 적어도 1개의 시스테인 잔기는, 뉴클레오티드 서열(**서열번호 75**)로 암호화되는 아미노산 서열 FNRGEC(**서열번호 23**)의 내부로 폴리펩티드 사슬내에 도입된다. 구체적인 구체예에서, 본 발명의 디아바

디 분자를 구성하는 폴리펩티드 사슬의 C-말단은, 뉴클레오티드 서열(**서열번호 75**)에 의해 암호화되는 아미노산 서열 FNRGEC(**서열번호 23**)을 포함한다.

[0085] 어떠한 구체예에서, 디아바디 분자는 적어도 2개의 폴리펩티드 사슬을 포함하고, 이들 각 쇄는 아미노산 서열 LGGC을 포함하고, 상기 서열 내의 시스테인 잔기 사이의 이황화 결합에 의해 공유결합된다. 다른 구체적인 구체예에서, 디아바디 분자는 적어도 2개의 폴리펩티드 사슬을 포함하고, 이들중 하나의 쇄는 아미노산 서열 FNRGEC(**서열번호 23**)를 포함하는 반면, 다른 쇄는 적어도 1개의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 도메인을 포함하고, 상기 적어도 2개의 폴리펩티드 사슬은 FNRGEC(**서열번호 23**) 내의 시스테인 잔기와 힌지 도메인 내의 시스테인 잔기 사이의 이황화 결합에 의해 공유결한된다. 구체적인 구체예에서, 힌지 도메인에 위치한 이황화 결합에 대한 시스테인 잔기는 Cys-128(Kabat EU에 의한 번호부여; 개변되지 않는 완전한 IgG 중쇄의 힌지 도메인에 위치)이다. 또한, 그 상대방은, **서열번호 23** 중의 시스테인 잔기 Cys-214(Kabat EU에 의한 번호부여; 개변되지 않는 완전한 IgG 경쇄의 C-말단에 위치)이다(Elkabetz et al.(2005) "Cysteines In CH1 Underlie Retention Of Unassembled Ig Heavy Chains," J. Biol. Chem. 280:14402-14412; 참조로서 그 전체를 본 명세서에 포함). 또 다른 구체예에서, 적어도 1개의 시스테인 잔기를 유전자조작에 의해 아미노산쇄의 N-말단에 존재시킨다. 또 다른 구체예에서, 적어도 1개의 시스테인 잔기를 유전자조작에 의해 디아바디 분자의 폴리펩티드 사슬의 링커부분에 존재시킨다. 또 다른 구체예에서, VH 또는 VL 도메인은 조작전의 VH 또는 VL 도메인과 비교하여 적어도 1개의 아미노산의 개변을 포함하도록 유전자 조작한다. 이와 같은 아미노산 개변은, 조작전의 아미노산을 시스테인으로 치환하는 것을 포함한다.

[0086] 본 발명은 Fc 도메인 또는 그 일부(예, CH2 도메인 또는 CH3 도메인)을 포함하는 디아바디 분자를 포함한다. Fc 도메인 또는 그 일부는, IgA, IgD, IgG, IgE 및 IgM을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니고, 어떠한 면역글로불린의 이소타입 또는 얼로타입(allotype)에 유래해도 좋다. Fc 도메인 또는 그 일부는, IgG에서 유래하는 것이 바람직한 구체예이다. IgG 이소타입은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4, 또는 이들의 얼로타입(allotype)인 것이 특히 바람직한 구체예이다. 어떠한 구체예에서, 디아바디 분자는 Fc 도메인을 포함한다. 이 Fc 도메인은 어떠한 면역글로불린 이소타입으로부터 독립하여 선택된 CH2 도메인 또는 CH3 도메인을 포함한다(즉, Fc 도메인은 IgG에서 유래하는 CH2 도메인과 IgE에서 유래하는 CH3 도메인, 또는 IgG1에서 유래하는 CH2 도메인과 IgG2에서 유래하는 CH3 도메인 등을 포함하여 이루어진다). 상기 Fc 도메인을, 본 발명의 디아바디 분자를 구성하는 폴리펩티드 사슬중에, 상기 폴리펩티드 사슬의 다른 도메인 또는 부분에 대하여 어떠한 위치여도, 유전자 조작으로 도입할 수 있다. 예를 들면, Fc 도메인 또는 그 일부가, 폴리펩티드 사슬의 VL 및 VH 양쪽 도메인의 N-말단에 있어도 좋고, 또는 한쪽의 도메인의 N-말단과 다른쪽의 도메인의 C-말단에(즉, 폴리펩티드 사슬의 2개의 도메인 사이) 있어도 좋다.

[0087] 본 발명은 또한, 힌지 도메인을 포함하는 분자를 포함한다. 힌지 도메인은, IgA, IgD, IgG, IgE 및 IgM을 포함하는 어떠한 면역글로불린의 이소타입 또는 얼로타입에서 유래될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 이 힌지 도메인은 IgG에서 유래되고, 이 IgG 이소타입은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4, 또는 이것의 얼로타입이다. 이 힌지 도메인은 디아바디 분자가 힌지 Fc 도메인을 포함하도록, 디아바디 분자를 구성하는 폴리펩티드 사슬 중에 Fc 도메인과 함께, 유전자 조작으로 도입할 수 있다. 어떠한 구체예에서, 힌지 및 Fc 도메인은, 당해분야에서 공지 또는 본 명세서에서 예시한 어떤 면역글로불린 이소타입과도 무관하게 선택된다. 다른 구체예에서, 힌지 및 Fc 도메인은, 폴리펩티드 사슬의 적어도 1개의 다른 도메인, 예를 들면, VL 도메인에 의해 떨어져 있다. 힌지 도메인을 또는 임의로 힌지-Fc 도메인을, 본 발명의 폴리펩티드 중에, 상기 폴리펩티드 사슬의 다른 도메인 또는 일부에 대하여 어떠한 위치여도, 유전자 조작으로 도입할 수 있다. 어떠한 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드 사슬은 힌지 도메인을 포함하지만, 이 힌지 도메인은 Fc 도메인을 포함하지 않는 폴리펩티드 사슬의 C-말단에 존재한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드 사슬은, 폴리펩티드 사슬의 C-말단에 존재하는 힌지-Fc 도메인을 포함한다. 어떠한 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드 사슬은, 폴리펩티드 사슬의 N-말단에 존재하는 힌지-Fc 도메인을 포함한다.

[0088] 상술한 바와 같이, 본 발명은 각각의 폴리펩티드 사슬이 VH 및 VL 도메인을 포함하는 폴리펩티드 사슬의 다량체를 포함한다. 어떠한 구체예에서, 상기 다량체의 폴리펩티드 사슬은 또한 Fc 도메인을 포함한다. Fc 도메인의 2량체 형성은, 면역글로불린 유사의 기능성, 즉 Fc를 통한 기능(예, Fc-FcγR 상호작용, 보체결합 등)을 나타내는 디아바디 분자의 형성을 야기한다. 어떠한 구체예에서, 각 폴리펩티드 사슬을 구성하는 VH 및 VL 도메인은 동일한 특이성을 나타내고, 상기 디아바디 분자는 2가이고, 또한 단일 특이적이다. 다른 구체예에서, 각 폴리펩티드 사슬을 구성하는 VH 및 VL 도메인은 다른 특이성을 갖고, 디아바디는 2가이고 또한 이중 특이적이다.

[0089] 다른 구체예에서, 본 발명의 디아바디 분자는, 각 폴리펩티드 사슬이 VH 및 VL 도메인을 포함하는 폴리펩티드

사슬의 4량체를 포함한다. 어떠한 구체예에서, 4량체의 2개의 폴리펩티드 사슬은 또한 Fc 도메인을 포함한다. 따라서, 4량체는 각각이 VH, VL 및 Fc 도메인으로 이루어지는 2개의 '무거운' 폴리펩티드 사슬와, VH 및 VL 도메인으로 이루어지는 2개의 '가벼운' 폴리펩티드 사슬을 포함한다. 2가 단량체로의 중쇄와 경쇄의 상호작용과 결합한, 중쇄의 Fc 도메인을 통한 2가 단량체의 2량체 형성은 4가의 면역글로불린 유사 분자의 형성을 야기할 수 있다(실시예 6.2 및 6.3에 예시). 어떠한 구체예에서, 단량체는 동일하고, 4가의 디아바디 분자는 단일 특이성 또는 이중 특이성이다. 다른 구체예에서 단량체는 다르고, 4가의 분자는 이중 특이성 또는 4중 특이성이다.

[0090] 상기 4중 특이성 디아바디 분자의 형성은, 4개의 다른 폴리펩티드 사슬의 상호작용을 필요로 한다. 이와 같은 상호작용을 단세포 재조합체 생산 시스템에서 효율적으로 행하는 것은, 쇄의 잠재적인 미스페어링에 의한 다수의 변이체의 존재때문에 곤란한다. 미스페어링의 가능성이 증가하는 것에 대한 하나의 해결책은, 소망하는 폴리펩티드 사슬쌍의 중에 "knobs-into-holes"형 변이를 도입하는 것이다. 이러한 변이는, 호모 이량체 형성보다도 헤테로 이량체 형성이 바람직하다. 예를 들면, Fc-Fc 상호작용에 관하여, 아미노산 치환('knob'을 형성하는 벌키한 측쇄를 포함하는 아미노산, 예를 들면 트립토판과 치환하는 것이 바람직)을 CH2 또는 CH3 도메인에 도입하여, 입체방해가 유사하게 돌연변이된 도메인과의 상호작용을 막도록 하고, 또한 입체방해가 그 변이형 도메인을, 상보적인 또는 적합한 변이(즉,"the hole", 예를 들면 글리신으로 치환하는)를 유전자 조작으로 도입한 도메인과, 강제적으로 쌍을 이루도록 한다. 이러한 변이세트는, 디아바디 분자를 구성하는 어떠한 폴리펩티드 사슬쌍에도 유전자 조작으로 도입하는 것이 가능하고, 또한 이러한 쌍의 폴리펩티드 사슬의 어느 부분에도 유전자 조작으로 도입하는 것이 가능하다. 호모 이량체 형성보다도 헤테로 이량체 형성에 유리한 단백질 조작의 방법, 특히 면역글로불린 유사 분자의 조작에 대하여는, 당해 분야에서 잘 알려져 있고, 이들은 본 명세서중에 포함된다(Ridgway et al.(1996) "'Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CHS Domains For Heavy Chain Heterodimerization,"Protein Engr. 9:617-621, Atwell et al.(1997) "Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library,"J. Mol. Biol. 270: 26-35, 및 Xie et al.(2005) "A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis," J. Immunol. Methods 296:95-101; 이들 문헌은 참조로서 그 전체를 본 명세서중에 포함한다).

[0091] 또한, 본 발명은 변이형 Fc 또는 변이형 힌지-Fc 도메인(또는 그 일부)를 포함하는 디아바디 분자를 포함한다. 이 변이형 Fc 도메인은, 비교가능한 야생형 힌지-Fc 도메인(또는 그 일부)과 비교하여, 적어도 하나의 아미노산 개변(예, 치혼, 삽입 또는 결실)을 포함하고 있다. 변이형 Fc 도메인 또는 변이형 힌지-Fc 도메인(또는 그 일부)을 포함하는 분자(예, 항체)는, 야생형 Fc 도메인 또는 야생형 힌지-Fc 도메인(또는 그 일부)을 포함하는 분자와 비교하여, 통상은 표현형이 변화되어 있다. 변이형의 표현형은, NK 의존성 또는 마크로파지 의존성 분석으로 분석한 경우, 혈중 반감기의 변화, 안정성의 변화, 세포성 효소에 대한 감수성의 변화, 또는 이펙터 기능의 변화로서 표현되는 경우가 있다. 이펙터 기능이 변화된 것이 확인된 변이형 Fc 도메인은, 국제공개 WO 04/063351호, 미국특허출원공개 2005/0037000 및 2005/0064514호, 미국가출원 제60/626,510호(2004년 11월 10일 출원), 제60/636,663호(2004년 12월 15일 출원) 및 제60/781,564호(2006년 3월 10일 출원), 본 발명자의 동시 출원인 미국특허출원 제11/271,140(2005년 11월 10일 출원) 및 제11/305,787호(2005년 12월 15일)에 개시되어 있다. 각 특허문헌은 참조로서 그 전체가 본 명세서에 포함된다.

[0092] 본 발명의 이중 특이성 디아바디는, 2개의 분리한 다른 에피토프에 동시에 결합할 수 있다. 어떠한 구체예에서, 에피토프는 동일 항원 유래이다. 다른 구체예에서, 에피토프는 다른 항원 유래이다. 적어도 하나의 에피토프 결합 부위는, T 림프구, NK 세포, 또는 다른 단핵세포로 발현되고, 면역 이펙터 세포상에 제시되는 결정원인(예, CD3, CD16, CD32, CD64 등)에 특이적인 것이 구체예로서 바람직하다. 하나의 구체예에서, 디아바디 분자는 이펙터 세포의 결정원인에 결합하고, 또한 상기 이펙터 세포도 활성화한다. 이와 관련하여, 본 발명의 디아바디 분자는 이들이 더욱 Fc 도메인을 포함하는지 여부는 관계없이, Ig 유사의 기능성을 나타낼 수 있다(예, 당해분야에서 공지의 또는 본 명세서에서 예시한, 어떠한 이펙터 기능 분석(예, ADCC assay)로 분석). 어떠한 구체예에서, 본 발명의 이중 특이성 디아바디는, 종양세포상의 암항원과 이펙터 세포의 결정원인의 양쪽에 결합하는 것과 동시에 이펙터 세포를 활성화한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 이중 특이성 디아바디 또는 디아바디 분자는, 상기(배경기술 참조)와 같이, 동일 세포상의 활성화 수용체와 억제 수용체에 동시에 결합하고(예, CD32A와 CD32B, BCR과 CD32B, 또는 IgERI과 CD32B에 결합), 이들을 연결하는 것에 의해 표적(예, 이펙터) 세포의 활성화를 정해하는 것이 가능하다. 본 구체예의 다른 측면에서, 이중 특이성 디아바디는, 바이러스상의 2개의 중화 에피토프(예, RSV 에피토프; E16 및 E53과 같은 WNV 에피토프)에 동시에 결합하는 것에 의해, 항바이러스성을 나타낼 수 있다.

[0093] 어떠한 구체예에서, 본 발명의 이중 특이성 디아바디 분자는, 특정의 세포형을 표적으로 하기 위한 특유의 기회를 제공한다. 예를 들면, 이중 특이성 디아바디 또는 디아바디 분자를, 유전자 조작하여 표적 세포형 또는 표적 조직형에 특이한 항원의 세트를 인식하는 에피토프 결합 부위의 조합을 포함하도록 하는 것이 가능하다. 또한, 각각의 항원의 한쪽 또는 양쪽이, 다른 조직 및/또는 세포형에서 별개로 일반적인 것이라면, 저친화성 결합 도메인을 이용하여, 디아바디 또는 디아바디 분자를 구축하는 것이 가능하다. 이러한 저친화성 결합 도메인은, 치료목적을 위해 충분한 결합력으로 개개의 에피토프 또는 항원에 결합할 수 없을 것이다. 그러나, 에피토프 또는 항원의 양쪽이, 단일 표적 세포 또는 조직상에 존재하는 경우, 그 세포 또는 조직에 대한 디아바디 또는 디아바디 분자의 결합력은, 항원 하나만을 발현하고 있는 세포 또는 조직의 것과 비교하면 증가할 수 있을 것이다. 이와 같이, 상기 세포 또는 조직은, 본 발명에 의해 효율적으로 표적화될 수 있다. 상기 이중 특이성 분자는, 단지 하나의 항원에 대한 특이성을 갖는 단일 특이성 디아바디 또는 항원과 비교하면, 상기 양쪽의 항원을 발현하는 세포상의 한쪽 또는 양쪽의 표적 항원에 대하여 강화된 결합성을 나타낼 수 있다.

[0094] 본 발명의 디아바디 결합특성은, 결합활성 및/또는 1 이상의 FcγR을 통한 이펙터 세포기능(Fc-FcγR 상호작용을 통하여, 또는 F cγR에 대한 디아바디 분자의 면역 특이적 결합에 의해 중개된다)을 측정하기 위해 *in vitro* 기능 분석에 의해 특성분석되는 것이 바람직하다(5.4.2 및 5.4.3 참조). FcγR에 대한 본 발명의 분자(예, 디아바디)의 친화성 및 결합특성을 결합 도메인 항원 또는 Fc-FcγR 상호작용(즉, 각각, 결합 도메인에의 항원 특이적 결합, 또는 FcγR에의 Fc 영역의 특이적 결합)을 측정하기 위해 당해분야에서 공지된 *in vitro* 분석법(생화학적 또는 면역학을 베이스로 한 분석법)을 이용하여 측정할 수 있다. 상기 *in vitro* 분석법에는, ELISA 분석, 표면 플라즈몬 공명 분석, 면역침전 분석(5.4.2 참조)가 포함되나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 분자가(본 명세서에 기재, 개시된 바와 같이) *in vivo* 모델에서, *in vitro* 베이스의 분석에 있어서의 이것과 유사한 결합특성을 갖는 구체예가 가장 바람직하다. 그러나, 본 발명은 *in vitro* 베이스의 분석에서는 원하는 표현형을 나타내지 않지만, *in vivo* 에서는 원하는 표현형을 나타내는 본 발명의 분자를 배제하는 것은 아니다.

[0095] 어떠한 구체예에서는, 본 발명의 분자를 조작하여, 금형분자(template molecule)의 상응하는 부분과 비교하여, 변화한 글리코실화 패턴 또는 변화한 글리코폼을 포함하도록 할 수 있다. 조작된 글리코폼은, 이펙터 기능을 증강하는 것을 포함하지만 이에 한정되지 않고, 다양한 목적에 유용하다. 예를 들면, 유전자 조작된 또는 변이형의 발현주를 이용하는 방법, 1 이상의 효소, 예를 들면, DI N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III(GnT III)와의 공발현에 의한 방법, 각종 생물 또는 각종 생물 유래의 세포주에서 본 발명의 디아바디를 발현시키는 방법, 또는 디아바디를 발현시켜 정제한 후에 탄수화물을 변형시키는 방법을 들 수 있다. 유전자 조작된 글리코폼을 제작하는 방법은, 당해분야에서 공지되어 있다. 이러한 방법은, Umana et al.(1999) "Engineered Glycoforms Of An Antineuroblastoma IgG1 With Optimized Antibody-Dependent Cellular Cytotoxic Activity," Nat. Biotechnol 17:176-180; Davies et al.(2001) "Expression Of GnTIII In A Recombinant Anti-CD20 CHO Production Cell Line: Expression Of Antibodies With Altered Glycoforms Leads To An Increase In Adcc Through Higher Affinity For Fc Gamma RIII," Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al.(2002) "Lack Of Fucose On Human IgG1 N-Linked Oligosaccharide Improves Binding To Human Fc gamma RIII And Antibody-Dependent Cellular Toxicity," J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al.(2003) "The Absence Of Fucose But Not The Presence Of Galactose 또는 Bisecting N-Acetylglucosamine Of Human IgG1 Complex-Type Oligosaccharides Shows The Critical Role Of Enhancing Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity," J Biol Chem 278:3466-3473, US 6,602,684; USSN 10/277,370; USSN 10/113,929; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/292246A1; PCT WO 02/311140A1; PCT WO 02/30954A1; Potillegent™ technology(Biowa, Inc. Princeton, NJ); GlycoMAb™ glycosylation engineering technology(GLYCART biotechnology AG, Zurich, Switzerland)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기 방법들은 참조로서 그 전체가 본 명세서에 포함된다. 예를 들면, WO 00061739; EA01229125; US 20030115614; Okazaki et al.(2004) "Fucose Depletion From Human IgG1 Oligosaccharide Enhances Binding Enthalpy And Association Rate Between IgG1 And Fc GammaRIIIA," JMB, 336: 1239-49를 참조하고, 이들은 참조로서 그 전체가 본 명세서에 포함된다.

[0096] 또한, 본 발명은, 본 발명의 디아바디를 제작하기 위해 비천연 아미노산을 조립하는 것을 포함한다. 이와 같은 방법은 당업자에게 공지이다. 예를 들면, 천연의 생합성 기구를 이용하여 단백질내로의 비천연 아미노산 조립을 가능하게 하는 방법 등이 있다. 예를 들면, Wang et al.(2002) "Expanding The Genetic Code," Chem. Comm. 1 : 1-11; Wang et al.(2001) "Expanding The Genetic Code Of Escherichia coli," Science, 292: 498-500; van Hest et al.(2001) "Protein-Based Materials, Toward A New Level Of Structural Control," Chem. Comm. 19: 1897-1904를 참조할 수 있고, 이들은 참조로서 그 전체가 본 명세서에 포함된다. 또 다른 방법으로, 아미노아실

-tRNA의 생합성에 관여하는 효소에 중점을 두는 방법으로서, 예를 들면, Tang et al.(2001) "Biosynthesis Of A Highly Stable Coiled-Coil Protein Containing Hexafluoroleucine In An Engineered Bacterial Host," J. Am. Chem. Soc. 123(44): 11089-11090; Kiick et al.(2001) "Identification Of An Expanded Set Of Translationally Active Methionine Analogues In Escherichia coli," FEBS Lett. 502(1-2):25-30를 참조할 수 있고, 이들은 참조로서 그 전체가 본 명세서에 포함된다.

[0097] 어떠한 구체예에서, 본 발명은 글리코실화 부위를 부가 또는 결실하는 것에 의해, 본 발명의 분자의 VL, VH 또는 Fc 도메인을 개변하는 방법을 포함한다. 단백질의 탄수화물을 개변하는 방법은, 당해분야에서 공지이고, 본 발명중에 포함된다. 예를 들면, 미국특허 제6,218,149호; EP 0 359 096 B1; 미국공개 제2002/0028486호; WO 03/035835; 미국공개 제2003/0115614호; 미국특허 제6,218,149호; 미국특허 제6,472,511호를 참조할 수 있고, 이들은 참조로서 그 전체가 본 명세서에 포함된다.

[0098] 본 발명의 디아바디 분자는 자연 살해 그룹 2D(NKG2D) 수용체에 대한 결합 리간드인 도메인을 포함하도록 구축될 수 있다. 이런 결합 리간드, 및 특히 정상 세포에서 발현되지 않는 이들은 조직적합성 60(H60) 분자, 레티노산 초기 유도 유전자-1(RAE-1)의 산물, 및 설치류 UL16-결합 단백질 유사 전사체 1(MULT1)을 포함한다(Raulet D.H.(2003) "Roles Of The NKG2D Immunorecepter And Its Ligand" Nature Rev. Immunol. 3:781-790; Coudert, J.D. et al.(2005) "Altered NKG2D Function In NK Cells Induced By Chronic Exposure To Altered NKG2D Ligand-Expressing Tumor Cells," Blood 106:1711-1717). 인간 NKG2D와 반응하는 추가적인 리간드는 다형성 MHC 클래스 I 사슬-연관 분자 MICA 및 MICB를 포함한다(Diefenbach, A. et al.(1999) "Natural Killer Cells: Stress Out, Turn On, Tune In," Curr. Biol. 9(22):R851-R8533; Bauer, S. et al.(1999) "Activation Of NK Cells 및 T Cells By NKG2D, A Receptor For Stress-Inducible MICA," Science 285(5428):727-729; Stephens, H.A.(2001) "MICA and MICB genes: can Enigma of their polymorphism be resolved?," Trends Immunol. 22:378-385).

[0099] MICA의 서열은 **서열번호 311**이다:

[0100] MGLGPVFLLL AGIFPFAPPG AAAEPHSLRY NLTVLSWDGS VQSGFLTEVH LDGQPFLRCD

[0101] RQKCRAKPQG QWAEDVLGNK TWDRETRDLT GNGKDLRMTL AHIKDQKEGL HSLQEIRVCE

[0102] IHEDNSTRSS QHFYYDGELF LSQNLETKEW TMPQSSRAQT LAMNVRNFLK EDAMKTKTHY

[0103] HAMHADCLQE LRRYLKSGVV LRRTVPPMVN VTRSEASEGN ITVTCRASGF YPWNITLSWR

[0104] QDGVSLSHDT QQWGDVLPDG NGTYQTWVAT RICQGEEQRF TCYMEHSGNH STHPVPSGKV

[0105] LVLQSHWQTF HVSAVAAAAI FVIIIFYVRC CKKKTSAAEG PELVSLQVLD QHPVGTSDHR

[0106] DATQLGFQPL MSDLGSTGST EGA

[0107] MICB의 서열은 **서열번호 312**이다:

[0108] PHSLRYNLMV LSQDGSVQSG FLAEGHLDGQ PFLRYDRQKR RAKPQGQWAE DVLGAKTWDT

[0109] ETEDLTENGQ DLRRTLTHIK DQKGGLHSLQ EIRVCEIHED SSTRGSRHFY YDGELFLSQN

[0110] LETQESTVPQ SSRAQTLAMN VTNFWKEDAM KTKTHYRAMQ ADCLQKLQLP PMVNVICSEV

[0111] SEGNITVTCR ASSFYPRNIT LTWRQDGVSL SHNTQQWGDV LPDGNGTYQT WVATRIRQGE

[0112] EQRFTCYMEH SGNHGTHPVP SGKALVLQSQ RT DFPYVSAA MPCFVIIIIL CVPCCKKKT S AAEGP

[0113] T-세포 수용체에 특이적으로 결합하는 항체는 항TCR 항체 BMA 031을 포함한다(Kurrle, R. et al.(1989) "BMA 031-A TCR-Specific Monoclonal Antibody For Clinical Application," Transplant Proc. 21(1 Pt 1): 1017-1019; Nashan, B. et al.(1987) "Fine Specificity Of A Panel Of Antibodies Against The TCR/CD3 Complex," Transplant Proc. 19(5):4270-4272; Shearman, CW. et al.(1991) "Construction, Expression, And Biologic Activity Of Murine/Human Chimeric Antibodies With Specificity For The Human α/β T Cell," J. Immunol. 146(3):928-935; Shearman, CW. et al.(1991) "Construction, Expression, And Characterization of Humanized Antibodies Directed Against The Human a/β T Cell Receptor," J. Immunol. 147(12):4366-4373). NKG2D 수용체에 특이적으로 결합하는 항체는 KYK-2.0을 포함한다(Kwong, KY et al.(2008) "Generation, Affinity Maturation, And Characterization Of A Human Anti-Human NKG2D Monoclonal Antibody With Dual

Antagonistic And Agonistic Activity," J. MoI. Biol. 384:1143-1156; 및 PCT/US09/54911).

[0114] 이런 디아바디의 용도를 통하여, 이제 표적 세포는 (NKG2D) 수용체를 배열한 세포에 의해 결합할 수 있는 세포가 되도록 초점을 바꾼다. NKG2D 수용체는 모든 인간(및 다른 포유동물) 자연 살해 세포(Bauer, S. et al.(1999) "Activation Of NK Cells And T Cells By NKG2D, A Receptor For Stress-Inducible MICA" Science 285(5428):727-729; Jamieson, A.M. et al.(2002) "The Role Of The NKG2D Immunoreceptor In Immune Cell Activation And Natural Killing," Immunity 17(1): 19-29)뿐만 아니라 모든 CD8+ T 세포(Groh, V. et al.(2001) "Costimulation Of CD8aβ T Cells By NKG2D Via Engagement By MIC Induced On Virus-Infected Cells," Nat. Immunol. 2(3):255-260; Jamieson, A.M. et al.(2002) "The Role Of The NKG2D Immunoreceptor In Immune Cell Activation And Natural Killing " Immunity 17(1):19-29)에서 발현된다.

[0115] 대안적으로, 본 발명의 디아바디 분자는 T-세포 수용체("TCR")에 대한 결합 리간드인 도메인을 포함하도록 구축될 수 있다. TCR은 CD4+ 또는 CD8+ T-세포에 의해 천연적으로 발현되고, 이런 세포가 항원-제시 세포의 클래스 I 또는 클래스 II MHC 단백질에 의해 결합되고 제시되는 항원성 펩티드를 인지하는 것을 허용한다. TCR에 의한 pMHC(펩티드-MHC) 복합체의 인식은 사이토카인의 생산 및 항원-제시 세포의 용해를 유도하는 세포 면역 반응의 전파를 시작한다(예컨대, Armstrong, K.M. et al.(2008) "Conformational Changes And Flexibility In T-Cell Receptor Recognition Of Peptid-MHC Complexes," Biochem. J. 415(Pt 2): 183-196; Willemsen, R.(2008) "Selection Of Human Antibody Fragments Directed Against Tumor T-Cell Epitopes For Adoptive T-Cell Therapy," Cytometry A. 73(11):1093-1099; Beier, K.C. et al.(2007) "Master Switches Of T-Cell Activation And Differentiation," Eur. Respir. J. 29:804-812; Mallone, R. et al.(2005) "Targeting T Lymphocytes For Immune Monitoring And Intervention In Autoimmune Diabetes," Am. J. Ther. 12(6):534-550을 참조하라).

[0116] 예를 들어, 표적 세포의 표면에 존재하는 수용체에 결합할 수 있는 적어도 하나의 에피토프-결합 도메인을 추가로 포함하도록 이런 디아바디 분자를 구축함으로써, 이런 디아바디 분자는 DART 분자일 것이고, 따라서 표적 세포에 대한 결합이 가능하며, 그것으로 인해 표적세포가 자연 살해 그룹 2D(NKG2D) 수용체 또는 TCR에 대한 결합 리간드를 제시하는 것을 유발한다(표적 세포-결합 디아바디에 존재하는 것은 무엇이든)(예컨대, Germain, C. et al.(2008) "Redirecting NK Cells Mediated Tumor Cell Lysis By A New Recombinant Bifunctional Protein," Prot. Engineer. Design Selection 21(11):665-672를 참조하라).

[0117] 이런 디아바디는 NK 세포-매개 세포 용해 또는 T-세포 매개 세포 독성의 표적인 세포에 임의의 원하는 표적 세포로 초점을 바꾸기 위하여 사용될 수 있다. 한 구체예에서, 표적 세포의 표면에 존재하는 수용체에 결합할 수 있는 디아바디의 에피토프-결합 도메인은 이런 암세포가 NK 세포-매개 세포 용해 또는 T-세포 매개 세포 독성에 대한 기질로 초점을 바꾸도록 종양-연관 항원에 결합하는 에피토프이다. 특별한 관심은 유방암 항원, 난소암 항원, 전립선암 항원, 자궁 경부암 항원, 췌장암 항원, 폐암 항원, 방광암 항원, 결장암 항원, 고환암 항원, 교모세포종 암 항원, B 세포 악성 종양과 관련된 항원, 다발성 골수종과 관련된 항원, 비-호지킨 림프종과 관련된 항원, 또는 만성 림프구성 백혈병과 관련된 항원인 종양-연관 항원이다.

[0118] 이런 용도를 위한 적절한 종양-연관 항원은 A33(결장 암종 항원; Almqvist, Y. 2006, Nucl Med Biol. Nov;33(8):991-998); Bl(Egloff, A.M. et al. 2006, Cancer Res. 66(1):6-9); BAGE(Bodey, B. 2002 Expert Opin Biol Ther. 2(6):577-84); 베타-카테닌(Prange W. et al. 2003 J Pathol. 201(2):250-9); CA125(Bast, R.C. Jr. et al. 2005 Int J Gynecol Cancer 15 Suppl 3:274-81); CD5(Calin, G.A. et al. 2006 Semin Oncol. 33(2): 167-73; CD19(Troussard, X. et al. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4): 139-48); CD20(Thomas, D.A. et al. 2006 Hematol Oncol Clin North Am. 20(5): 1125-36); CD22(Kreitman, R.J. 2006 AAPS J. 18;8(3):E532-51); CD23(Rosati, S. et al. 2005 Curr Top Microbiol Immunol. 5;294:91-107); CD25(Troussard, X. et al. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4): 139-48); CD27(Bataille, R. 2006 Haematologica 91(9): 1234-40); CD28(Bataille, R. 2006 Haematologica 91(9): 1234-40); CD36(Ge, Y. 2005 Lab Hematol. 11(1):31-7); CD40/CD154(Messmer, D. et al. 2005 Ann N Y Acad Sci. 1062:51-60); CD45(Jurcic, J.G. 2005 Curr Oncol Rep. 7(5):339-46); CD56(Bataille, R. 2006 Haematologica 91(9): 1234-40); CD79a/CD79b(Troussard, X. et al. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4): 139-48; Chu, P.G. et al. 2001 Appl Immunohistochem MoI Morphol. 9(2):97-106); CD103(Troussard, X. et al. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4): 139-48); CDK4(Lee, Y.M. et al. 2006 Cell Cycle 5(18):2110-4); CEA(암배 항원; Mathelin, C. 2006 Gynecol Obstet Fertil. 34(7-8):638-46; Tellez-Avila, F.I. et al. 2005 Rev Invest Clin. 57(6):814-9); CTLA4(Peggs, K.S. et al. 2006 Curr Opin Immunol. 18(2):206-13); EGF-R(상피 성장 인자 수용체; Adenis, A. et al. 2003 Bull Cancer. 90 Spec

No:S228-32); Erb(ErbB1; ErbB3; ErbB4; Zhou, H. et al. 2002 Oncogene 21(57):8732-40; Rimon, E. et al. 2004 Int J Oncol. 24(5): 1325-38); GAGE(GAGE-1; GAGE-2; Akcakanat, A. et al. 2006 Int J Cancer. 118(1): 123-8); GD2/GD3/GM2(Livingston, P.O. et al. 2005 Cancer Immunol Immunother. 54(10):1018-25); gp100(Lotem, M. et al. 2006 J Immunother. 29(6):616-27); HER-2/neu(Kumar, Pal S et al. 2006 Semin Oncol. 33(4):386-91); 인간 파필로마바이러스-E6/인간 파필로마바이러스-E7(DiMaio, D. et al. 2006 Adv Virus Res. 66:125-59); KSA(17-1A)(Ragupathi, G. 2005 Cancer Treat Res. 123:157-80); MAGE(MAGE-1; MAGE-3; (Bodey, B. 2002 Expert Opin Biol Ther. 2(6):577-84); MART(Kounalakis, N. et al. 2005 Curr Oncol Rep. 7(5):377-82); MUC-1(Mathelin, C. 2006 Gynecol Obstet Fertil. 34(7-8):638-46); MUM-1(Castelli, C. et al. 2000 J Cell Physiol. 182(3):323-31); N-아세틸글루코사민전이효소(Dennis, J.W. 1999 Biochim Biophys Acta. 6;1473(1):21-34); p15(Gil, J. et al. 2006 Nat Rev MoI Cell Biol. 7(9):667-77); PSA(prostate specific 항원; Cracco, CM. et al. 2005 Minerva Urol Nefrol. 57(4):301-11); PSMA(Ragupathi, G. 2005 Cancer Treat Res. 123:157-80); sTn(Holmberg, L.A. 2001 Expert Opin Biol Ther. 1(5):881-91); TNF-수용체(TNF-α 수용체, TNF-β 수용체; 또는 TNF-γ 수용체; van Horssen, R. et al. 2006 Oncologist. 11(4):397-408; Gardnerova, M. et al. 2000 Curr Drug Target. 1(4):327-64); 또는 VEGF 수용체(O'Dwyer. PJ. 2006 Oncologist. 11(9):992-8)을 포함한다.

[0119] 이런 용도를 위한 추가적인 종양-연관 항원(그리고 이런 항원에 특이적으로 반응하는 항체를 개시하는 간행물)은 ADAM-9(미국 특허 공개 번호 2006/0172350; PCT 공개 번호WO 06/084075); ALCAM(PCT 공개 번호WO 03/093443); 카르복시펩티다아제 M(미국 특허 공개 번호 2006/0166291); CD46(미국 특허 번호 7,148,038; PCT 공개 번호WO 03/032814); 사이토케라틴 8(PCT 공개 번호WO 03/024191); 에프린 수용체(그리고 특히 EphA2(미국 특허 번호 7,569,672; PCT 공개 번호WO 06/084226); 인테그린 알파-V-베타-6(PCT 공개 번호WO 03/087340); JAM-3(PCT 공개 번호WO 06/084078); KID3(PCT 공개 번호WO 05/028498); KID31(PCT 공개 번호WO 06/076584); LUCA-2(미국 특허 공개 번호 2006/0172349; PCT 공개 번호WO 06/083852); 온코스타틴 M(온코스타틴 수용체 베타)(미국 특허 번호 7,572,896; PCT 공개 번호WO 06/084092); PIPA(미국 특허 번호 7,40s,061; PCT 공개 번호WO 04/043239); RAAG10(미국 특허 번호 7,527,969; PCT 공개 번호WO 04/001381); ROR1(미국 특허 번호 5,843,749); TES7(PCT 공개 번호 WO 08/066691); 및 트랜스페린 수용체(미국 특허 번호 7,572,895; PCT 공개 번호WO 05/121179)를 포함한다.

[0120] 또한 관심있는 것은 특정 전염성 제제, 예컨대, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), B형 간염 바이러스(HBV), 인플루엔자, 인간 유두종 바이러스(HPV), 구제역(콕사키바이러스), 광견병 바이러스, 단순 포진 바이러스(HSV)를 포함하지만 이에 제한되지 않는 바이러스 제제, 및 로타바이러스, 아데노바이러스, 칼리시 바이러스, 아스트로바이러스 및 노르워크 바이러스를 포함하는 위장염의 원인 인자; E. 콜리, 살모넬라 타이피뮤리움, 슈도모나스 에루지노사, 비브리오 콜레라, 네이세리아 고노로에, 헬리코박터 파일로리, 헤모필러스 인플루엔자, 시겔라 디센테리에, 스타필로코쿠스 아우레우스, 마이코박테리움 투베르쿨로시스 및 스트렙토코쿠스 뉴모니에를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 박테리아 제제, 곰팡이 제제 및 가르디(Giardi)와 같은 기생충에 특이적인 항원이다.

[0121] 대안적으로, 이런 에피토프는 예를 들어 급성 단핵구성 백혈병 세포가 NK 세포-매개 세포 용해에 대한 기질로 방향을 바꾸도록 Fc 수용체(예컨대, FcγRI 또는 FcγRII)에 결합할 수 있다.

[0122] **5.1 디아바디 결합 도메인**

[0123] 본 발명의 디아바디는, 일반적으로 면역글로불린 또는 항체에 유래하는 항원 결합 도메인을 포함한다. 본 발명의 방법에 사용하는 결합 도메인이 유래하는 항체는, 조류 및 포유동물(예, 인간, 비인간 영장류, 뮤린, 당나귀, 양, 토끼, 염소, 기니아피그, 낙타, 말 또는 닭)을 포함하는 어떠한 동물 기원의 것이어도 좋다. 항체는, 인간 또는 인간화 단일클론 항체인 것이 바람직하다. 본 명세서에서 이용하는 경우, '인간' 항체는, 인간 면역글로불린의 아미노산 서열을 갖는 항체를 포함하여, 인간 면역글로불린 라이브러리 또는 합성 인간 면역글로불린 암호화 서열의 라이브러리, 또는 암호화 유전자 유래의 항체를 발현하는 마우스로부터 단리한 항체를 포함한다.

[0124] 본 발명은, 암, 자가면역질환, 염증성 질환 또는 감염증의 치료 및/또는 예방용에 당해분야에서 알려진 어떠한 항체를, 본 발명의 디아바디의 결합 도메인의 소스로서 사용하는 것을 의도하고 있다. 알려진 암 항체의 비한정적인 예를 섹션 5.7.1에 나타낼 뿐 아니라, 열거한 표적 항원에 특이적인 다른 항체, 및 섹션 5.7.1에 열거한 암 항원에 대한 항체를 나타낸다. 자가면역질환 및 염증성 질환의 치료 및/또는 예방용의 알려진 항체의 비한정적인 예를 섹션 5.7.2에 나타낼 뿐 아니라, 열거한 표적 항원에 대한 항체 및 섹션 5.6.1에 열거한 항원에 대한

항체도 나타낸다. 다른 구체예에서, 섹션 5.6.3에 열거한 감염증에 관련한 에피토프에 대한 항체를 사용하는 것이 가능하다. 어떠한 구체예에서, 상기 항체는 1 이상이 아미노산 서열 개변을 갖는 변이형 Fc 영역을 포함한다. 당해 항체는, 본 발명의 방법에 의해 동정되고, 부여된 이펙터 기능, 및/또는 야생형 Fc 영역을 포함하는 대응하는 분자와 비교하여 FcγRIIB에 대한 친화성의 증강 및 FcγRIIIA에 대한 친화성의 저감을 갖는 것이 알려져 있다. 본 발명에 따라 제작될 수 있는 염증성 질환의 치료 또는 예방에 이용되는 항체의 비한정적 예를 **표 23**에 나타낸다. 또한, 자가면역질환의 치료 또는 예방에 이용되는 항체의 비한정적 예를 **표 24**에 나타낸다.

[0125] 인간에 있어서의 항체의 *in vivo*에서의 사용 및 *in vitro* 검출 분석을 포함하는 어떠한 사용에 관하여, 인간, 키메라 또는 인간화 항체 유래의 가변 도메인을 갖는 디아바디를 사용하는 것이 바람직하다. 완전한 인간 항체 유래의 가변영역은, 피험자의 치료를 위해 특히 바람직하다. 인간 항체는, 인간 면역글로불린 서열에 유래하는 항체 라이브러리를 이용한 상기 파아지 디스플레이법(phage display method)을 포함하는, 당해분야에서 알려진 다양한 방법에 의해 작성하는 것이 가능하다. 또한, 미국특허 제4,444,887호 및 제4,716,111; 및 국제공개 WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, 및 WO 91/10741도 참조되며, 이들 각각은 참조로서 그 전체가 본 명세서에 포함된다.

[0126] 인간 항체는 소정의 항원에 결합할 수 있고, 인간 면역글로불린의 아미노산 서열을 실질적으로 갖는 프레임워크 영역(framework region)과 인간 이외의 면역글로불린의 아미노산 서열을 실질적으로 갖는 CDR을 포함하는, 항체, 그 변이체 또는 단편을 말한다. 인간화 항체는, 적어도 하나의, 일반적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 전부 포함하는 것이 가능하다. 이 가변 도메인은 CDR 영역의 전부 또는 실질적으로 전부가 인간 이외의 면역글로불린(즉, 공여자 항체)의 CDR 영역과 일치하고, 전부 또는 실질적으로 전부인 프레임워크 영역이 인간 면역글로불린의 컨센서스 서열(consensus sequence)의 프레임워크 영역으로 되어 있다.

[0127] 인간화 항체의 프레임워크 영역 및 CDR 영역은, 모 서열과 정확히 일치할 필요는 없다. 예를 들면, 공여자 CDR 또는 컨센서스 프레임워크는, 적어도 1개의 잔기의 치환, 삽입 또는 결실에 의해 변이 유발되고, 변이유발된 부위의 CDR 또는 프레임워크 잔기가 컨센서스 또는 공여자 항체에 일치하지 않도록 하는 것이 가능하다. 그러나, 이와 같은 변이를 광범위하게 행하는 것은 바람직하지 않다. 일반적으로는, 인간화 항체 잔기의 적어도 75%, 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95%를 초과하는 잔기가, parent의 프레임워크 영역(FR) 및 CDR의 것과 일치한다. 인간화 항체는 당해분야에서 알려진 다양한 기술을 이용하여 제작될 수 있다. 한정하는 것은 아니지만, 그와 같은 기술에는, CDR-그라프트법(유럽 특허 번호 EP 239,400; 국제 공개 번호 WO 91/09967; 및 U.S. 특허 번호 5,225,539, 5,530,101, and 5,585,089), 베니어링(veneering) 또는 리서피싱(resurfacing)(유럽 특허 번호 EP 592,106 및 EP 519,596; Padlan(1991) "A Possible Procedure For Reducing The Immunogenicity Of Antibody Variable Domains While Preserving Their Ligand-Binding Properties," Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka et al.(1994) "Human-Engineered Monoclonal Antibodies Retain Full Specific Binding Activity By Preserving Non-CDR Complementarity-Modulating Residues," Protein Engineering 7(6):805-814; and Roguska et al.(1994) "Humanization Of Murine Monoclonal Antibodies Through Variable Domain Resurfacing," Proc Natl Acad Sci USA 91 :969-973), chain shuffling(U.S. 특허 번호 5,565,332), 및 예를 들면, U.S. 특허 번호 6,407,213, 5,766,886, 5,585,089, 국제공개 WO 9317105, Tan et al.(2002) "'Superhumanized' Antibodies: Reduction Of Immunogenic Potential By Complementarity-Determining Region Grafting With Human Germline Sequences: Application To An Anti-CD28," J. Immunol. 169:1119-25, Caldas et al.(2000) "Design And Synthesis Of Germline-Based Hemi-Humanized Single-Chain Fv Against The CD 18 Surface Antigen," Protein Eng. 13 :353-60, Morea et al.(2000) "Antibody Modeling: Implications For Engineering And Design," Methods 20:267-79, Baca et al.(1997) "Antibody Humanization Using Monovalent Phage Display," J. Biol. Chem. 272:10678-84, Roguska et al.(1996) "A Comparison Of Two Murine Monoclonal Antibodies Humanized By CDR-Grafting And Variable Domain Resurfacing," Protein Eng. 9:895-904, Couto et al.(1995) "Designing Human Consensus Antibodies With Minimal Positional Templates," Cancer Res. 55(23 Supp):5973s-5977s, Couto et al.(1995) "Anti-BA46 Monoclonal Antibody Mc3: Humanization Using A Novel Positional Consensus And In Vivo And In Vitro Characterization," Cancer Res. 55:1717-22, Sandhu(1994) "A Rapid Procedure For The Humanization Of Monoclonal Antibodies," Gene 150:409-10, Pedersen et al.(1994) "Comparison Of Surface Accessible Residues In Human And Murine Immunoglobulin Fv Domains. Implication For Humanization Of Murine Antibodies," J. MoL Biol. 235:959-973, Jones et al.(1986) "Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse," Nature 321 :522-525, Riechmann et al.(1988) "Reshaping Human Antibodies For

Therapy," Nature 332:323-327 및 Presta(1992) "Antibody Engineering," Cure. Op. Biotech. 3(4):394-398에 개시된 기술 등이 포함된다. 흔히, 프레임워크 영역중의 프레임워크 잔기를, CDR 공여자 항체 유래에 대응하는 잔기로 치환하여 항원결합성을 변화시키고, 바람직하게는 개선할 수 있다. 이러한 프레임워크 치환은, 당 기술분야에서 주지의 방법으로 동정될 수 있다. 예를 들면, CDR과 프레임워크 잔기의 상호작용을 모델링하여 항원결합성에 중요한 프레임워크 잔기를 동정하는 방법, 및 서열비교에 의해 특정의 위치의 특유의 프레임워크 잔기를 동정하는 방법을 들 수 있다(예를 들면, Queen et al, U.S. 특허 번호 5,585,089; U.S. 공개 번호 2004/0049014 and 2003/0229208; U.S. 특허 번호 6,350,861; 6,180,370; 5,693,762; 5,693,761; 5,585,089; 및 5,530,101 및 Riechmann et al.(1988) "Reshaping Human Antibodies For Therapy,"Nature 332:323-327이 있고, 이들 모두는 참조로서 그 전체가 본 명세서에 포함된다).

[0128] 가장 바람직한 구체예에서, 인간화 결합 도메인은, 공여자인 마우스 항체와 동일한 에피토프에 특이적으로 결합한다. 당업자에게는, 본 발명이 일반적으로 항체의 CDR 그라프트법을 포함하는 것으로 이해될 것이다. 따라서, 설령 동일 항체 클래스 또는 동일 항체 서브클래스여도, 공여자 항체와 수용자 항체를 동일 종의 동물 유래로 하는 것이 가능하다. 그러나, 보다 일반적으로는, 공여자측 및 수용자측의 항체는, 다른 종류의 동물에서 유래한다. 전형적으로는, 공여자 항체는 설치류 mAb이고, 수용자 항체는 인간의 항체이다.

[0129] 어떠한 구체예에서, 공여자 항체로부터 유래하는 적어도 하나의 CDR이 인간 항체에 그라프트화된다. 다른 구체예에서, 중쇄 및/또는 경쇄 가변영역의 각각의 적어도 2개, 바람직하게는 3개 전부의 CDR이 인간 항체에 그라프트화된다. CDR은, Kabat CDR, 루프 CDR, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 어떠한 구체예에서, 본 발명은, 적어도 하나의 CDR 그라프트화 중쇄와 적어도 하나의 CDR 그라프트화 경쇄를 함유하는 인간화 FcγRIIB 항체를 포함한다.

[0130] 본 발명의 방법에서 이용되는 디아바디에는, 변형된 유도체, 즉 디아바디에 어떠한 디아바디 분자가 공유결합하여 변형된 유도체가 포함된다. 예를 들면, 한정되는 것은 아니지만, 상기 디아바디 유도체는 예를 들면, 글리코실화, 아세틸화, PEG화, 인산화, 아미드화, 공지의 보호기/봉쇄기(protecting/blocking group)에 의한 유도체화, 단백질 분해절단, 세포성 리간드 또는 다른 단백질과의 결합 등에 의해 개변된 디아바디를 포함한다. 어떠한 다수의 화학적 변형도 공지의 기술에 의해 실행될 수 있고, 예를 들면, 이에 한정되는 것은 아니지만 특이적 화학절단, 아세틸화, 포밀화, 튜니카마이신(tunicamycin)의 대사 합성 등을 포함한다. 또한, 상기 유도체는 하나 이상의 비전형적인 아미노산을 포함할 수 있다.

[0131] 키메라 항체는, 예를 들면, 비인간 항체에서 유래하는 가변영역과 인간 면역글로불린의 불변 영역을 갖는 항체와 같이, 키메라 항체의 다른 부분이 다른 면역글로불린 분자에서 유래하는 분자의 것이다. 키메라 항체를 만드는 방법은 공지이다. 예를 들면, Morrison(1985) "Transfectomas Provide Novel Chimeric Antibodies," Science 229:1202-1207; Oi et al.(1986) "Chimeric Antibodies," BioTechniques 4:214-221; Gillies et al.(1989) "High-Level Expression Of Chimeric Antibodies Using Adapted cDNA Variable Region Cassettes," 1. Immunol. Methods 125:191-202; and U.S. 특허 번호 6,311,415, 5,807,715, 4,816,567 및 4,816,397를 참조할 수 있고, 이들 모두는 참조로서 그 전체가 본 명세서에 포함된다.

[0132] 흔히, 프레임워크 영역내의 프레임워크 잔기를, CDR 공여자 항체 유래에 대응하는 잔기로 치환하여, 항원결합성을 바꾸고 바람직하게는 개선하는 것이 가능하다. 이러한 프레임워크 치환은 당해기술분야에서 주지의 방법에 의해 동정하는 것이 가능하다. 예를 들면, CDR과 프레임워크 잔기의 상호작용을 모델링하여 항원 결합성에 중요한 프레임워크 잔기를 동정하는 방법이나, 서열을 비교하여 특정 위치에 있는 프레임워크의 특이한 잔기를 동정하는 방법을 들 수 있다(예를 들면, U.S. 특허 번호 5,585,089; 및 Riechmann et al.(1988) "Reshaping Human Antibodies For Therapy," Nature 332:323-327 참조, 이들 모두는 참조로서 그 전체가 본 명세서에 포함된다.)

[0133] 본 발명의 디아바디의 결합 도메인 유래의 단일클론 항체는, 당해기술분야에서 알려진 다양한 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 상기 기술에는, 하이브리도마, 재조합체 및 파아지 디스플레이 기술 또는 이들의 조합이 포함된다. 예를 들면, 단일클론 항체는, 하이브리도마 기술을 이용하여 제조할 수 있다. 상기 하이브리도마 기술에는, 당해분야에서는 공지인 기술 이외에 예를 들면 Harlow et al, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, et al, in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, pp. 563-681(Elsevier, N.Y., 1981)(both of which are incorporated by reference in their entireties)가 포함된다. 여기서 사용되는 용어 "단일클론 항체"는 하이브리도마 기술을 이용하여 제조된 항체에 한정되는 것은 아니다. "단일클론 항체"라는 용어는, 어떠한 진핵생물 클론, 원핵생물 클론 또는 파아지 클론을 포함하는 단일 클론에서 유래하는 항체를 의미하는 것으로서, 이것을 생산하는 방법을 의미하는 것은 아니

다.

[0134] 하이브리도마 기술을 이용하여 특정의 항체를 제조 및 스크리닝하는 방법은 루틴하고 공지인 기술이다. 비한정적인 예로는, 마우스를 대상 항원 또는 그와 같은 항원을 발현하는 세포에서 면역화하는 것이 가능하다. 예를 들면, 항원 특이적 항체가 마우스 혈청으로부터 검출되도록, 일단 면역반응이 검출되도록 마우스 비장이 적출되고, 이자세포가 단리된다. 그 후, 이 이자세포를 주지기술에 의해 임의의 적당한 미에로마(myeloma) 세포와 융합시킨다. 하이브리도마를 한계희석법에 의해 선택하고 클론화한다. 이 하이브리도마 클론을 그 후 당해분야에서 알려진 방법으로 상기 항원에 결합할 수 있는 항체를 분비하는 세포에 대해 분석한다. 통상, 고레벨의 항체를 포함하는 복수(ascites fluid)를, 마우스의 복강 내에 양성 하이브리도마 클론을 접종하는 것에 의해 얻을 수 있다. 대상 항원을, 섹션 5.8.1에 기재한 암에 관련한 항원, 섹션 5.8.2에 기재한 자가면역질환 및 염증성 질환에 관련한 항원, 섹션 5.8.3에 기재한 감염증에 관련한 항원, 및 섹션 5.8.4에 기재한 효소를 포함한다. 다만, 이것들에 한정되는 것은 아니다.

[0135] 또한, 항체는 당해분야에서 알려진 다양한 파아지 디스플레이법을 이용하여 제조할 수 있다. 파아지 디스플레이법에서는, 기능성 항체 도메인이 이것을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 담지하는 파아지 입자 표면상에 제시된다. 구체적인 구체예에서, 상기 파아지를 이용하여 레퍼토리(repertoire) 또는 조합의 항체 라이브러리(예, 인간 또는 마우스)로부터 발현된 항원 결합 도메인(예, Fab 및 Fv 또는 이황화 결합 안정화 Fv)을 제시할 수 있다. 대상의 항원에 결합하는 항원 결합 도메인을 발현하는 파아지는, 항원을 이용하여(예를 들면, 표지한 항원, 또는 고체표면 또는 비즈에 결합 또는 캡쳐된 항원을 이용) 선택 또는 동정할 수 있다. 이들 방법에서 이용되는 파아지는, 일반적으로는 fd 및 M13을 포함하는 수지상 파아지이다. 항원결합 도메인은, 파아지 유전자 III 또는 VIII 단백질의 어느 하나에 재조합 융합시킨 단백질로서 발현된다. 본 발명의 면역글로불린 또는 그 단편의 제조에 이용될 수 있는 파아지 디스플레이법의 예는, 이하의 문헌중에 개시되어 있는 방법을 포함한다. 즉, Brinkmann et al.(1995) "Phage Display Of Disulfide-Stabilized Fv Fragments," J. Immunol. Methods, 182:41-50; Ames et al.(1995) "Conversion Of Murine Fabs Isolated From A Combinatorial Phage Display Library To Full Length Immunoglobulins," J. Immunol. Methods, 184:177-186; Kettleborough et al.(1994) "Isolation Of Tumor Cell-Specific Single-Chain Fv From Immunized Mice Using Phage-Antibody Libraries And The Re-Construction Of Whole Antibodies From These Antibody Fragments," Eur. J. Immunol, 24:952-958; Persic et al.(1997) "An Integrated Vector System For The Eukaryotic Expression Of Antibodies or Their Fragments After Selection From Phage Display Libraries," Gene, 187:9-18; Burton et al.(1994) "Human Antibodies From Combinatorial Libraries," Advances in Immunology, 57:191-280; PCT 출원 번호 PCT/GB91/01134; PCT 공개 WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; 및 U.S. 특허 번호 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 및 5,969,108을 참조할 수 있고, 이들 모두는 참조로서 그 전체가 본 명세서에 포함된다.

[0136] 파아지 디스플레이 기술을 이용하여, 항원에 대한 항체의 친화성을 증대시킬 수 있다. 이 기술은 고친화성 항체를 얻는 데에 유용하다. 친화성 성숙이라 불리는 이 기술은, 천연 변이 유발 또는 동종 항원을 이용한 CDR 워킹 및 재선택을 사용하여, 초기 항체 또는 parental 항체와 비교한 경우에 항원에 대하여 보다 높은 친화력으로 결합하는 항체를 동정한다(Glaser et al.(1992) "Dissection Of The Combining Site In A Humanized Anti-Tac Antibody," J. Immunology 149:2607-2614 참조). 단일 뉴클레오티드보다 전체에 대한 천연 변이 유발은, 결과적으로 아미노산 변이의 반 랜덤화(semi-randomized) 레퍼토리를 일으킨다. 변이형 클론의 풀로 이루어지는 라이브러리를 구축할 수 있고, 상이 변이형 클론은 각각이 하나의 CDR 중의 단일 아미노산의 개변에 따라 다르고, 각 CDR 잔기에 관하여 가능한 아미노산 치환을 각각 제시하는 변이체를 포함하고 있다. 항원에 대한 결합 친화성이 증가한 변이체는, 고정한 변이체와 표지한 항원과의 접촉에 의해 스크리닝하는 것이 가능하다. 당해분야에서 알려진 어떠한 스크리닝 방법이라도, 항원에 대한 결합활성이 증가한 변이형 항체를 동정하는 데에 사용할 수 있다(예, ELISA)(Wu et al.(1998) "Stepwise In Vitro Affinity Maturation Of Vitaxin, An Alphav Beta3-Specific Humanized mAb," Proc Natl. Acad Sci. USA 95:6037-6042; Yelton et al.(1995) "Affinity Maturation Of The Br96 Anti-Carcinoma Antibody By Codon-Based Mutagenesis," J. Immunology 155:1994-2004 참조). 경쇄를 랜덤 변이시킨 CDR 워킹도 사용할 수 있다(Schier et al.(1996) "Isolation Of Picomolar Affinity Anti-C-ErbB-2 Single-Chain Fv By Molecular Evolution Of The Complementarity Determining Regions In The Center Of The Antibody Binding Site," J. MoI. Bio. 263:551-567 참조).

[0137] 또한, 본 발명은 프레임워크 또는 CDR 영역에 변이(예를 들면, 1 이상의 아미노산 치환)를 갖는, 본 명세서에

기재 또는 당업계에 알려진 어떠한 결합 도메인의 아미노산 서열로 이루어지는 결합 도메인의 사용을 포함한다. 이들 결합 도메인에 있어서의 변이는, 결합 도메인의 FcγRIIB(이것에 결합 도메인이 면역 특이적으로 결합한다)에 대한 결합력 및/또는 친화력을 유지 또는 증강하는 것이 바람직하다. 당업자에 알려진 표준적 기술(예, 면역 분석)을 사용하여 특정의 항원에 대한 항체의 친화성을 분석할 수 있다.

[0138] 당업자에게 알려진 표준기술을 사용하여, 항체 또는 그 단편을 코딩하는 뉴클레오티드 서열중에 변이를 도입하는 것이 가능하다. 이와 같은 기술에는, 예를 들면, 결과적으로 아미노산 치환을 일으키는 부위 특이적 돌연변이 유발 및 PCR을 통한 돌연변이 유발 등을 들 수 있다. 유도체는, 원래의 항체 또는 그 단편과 비교하여, 15 아미노산 미만의 치환, 10 아미노산 미만의 치환, 5 아미노산 미만의 치환, 4 아미노산 미만의 치환, 3 아미노산 미만의 치환 또는 2 아미노산 미만의 치환을 포함하는 것이 바람직하다. 바람직한 구체예에서, 유도체는 1 이상의 예측되는 비필수 아미노산 잔기에서의 보존적 아미노산 치환을 갖는다.

[0139] **5.1.1 FcγRIIB과 면역 특이적으로 결합하는 에피토프 결합 부위를 포함하는** 디아바디

[0140] 구체적인 구체예에 있어서, 본 발명의 디아바디의 적어도 하나의 결합 도메인은, FcγRIIB의 적어도 하나의 활성을 어고나이즈한다(agonize). 본 발명의 일구체예에서, 상기 활성은 B 세포 수용체를 통한 시그널 전달을 저해하는 것이다. 다른 구체예에 있어서, 결합 도메인은 B 세포의 활성화, B 세포의 증식, 항체생산, B 세포의 세포내 칼슘 유입, 세포주기의 진행, 또는 FcγRIIB 시그널 전달 경로에 있어서의 1 이상의 하류의 시그널 전달 분자의 활성을 저해한다. 또 다른 구체예에서, 결합 도메인은 FcγRIIB의 인산화 또는 SHIP의 동원(recruitment)을 증강한다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 결합 도메인은 B 세포 수용체를 통한 시그널 전달 경로에서의 MAP 키나제 활성 또는 Akt 동원을 저해한다. 다른 구체예에서 결합 도메인은 FcεRI 시그널 전달의 FcγRIIB를 통한 저해에 어고나이즈한다(agonize). 구체적인 구체예에서, 상기 결합 도메인은 FcεRI 유도된 마스트 세포(mast cell) 활성화, 칼슘 동원, 탈과립, 사이토카인 생산, 또는 세로토닌 방출을 저해한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 결합 도메인은 FcγRIIB의 인산화를 자극하고, SHIP의 동원을 자극하고, SHIP의 인산화 및 SHIP과 Shc의 결합을 자극하고, 또는 MAP 키나제 패밀리 멤버(예, Erk1, Erk2, JNK, p38 등)의 활성화를 저해한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 결합 도메인은 $p62^{dok}$의 티로신 인산화, 및 이것과 SHIP 및 rasGAP과의 결합을 증강한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 결합 도메인은 단구 또는 마크로파아지에서의 FcγR을 통한 식작용을 저해한다.

[0141] 다른 구체예에서, 결합 도메인은 FcγRIIB의 적어도 하나의 활성을 길항한다(antagonize). 일구체예에서, 상기 활성화는 B 세포 수용체를 통한 시그널 전달의 활성화이다. 구체적인 구체예에 있어서, 결합 도메인은 B 세포의 활성화, B 세포의 증식, 항체생산, B 세포의 세포내 칼슘 유입, 또는 FcγRIIB 시그널 전달 경로에 있어서의 1 이상의 하류의 시그널 전달 분자의 활성을 증강한다. 또 다른 구체예에서, 결합 도메인은 FcγRIIB의 인산화 또는 SHIP의 동원(recruitment)을 감소시킨다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 결합 도메인은 B 세포 수용체를 통한 시그널 전달 경로에서의 MAP 키나제 활성 또는 Akt 동원을 증강한다. 다른 구체예에서, 결합 도메인은 FcεRI 시그널 전달의 FcγRIIB를 통한 저해에 길항한다(antagonize). 구체적인 구체예에서, 상기 결합 도메인은 FcεRI 유도된 마스트 세포(mast cell) 활성화, 칼슘 동원, 탈과립, 사이토카인 생산, 또는 세로토닌 방출을 증강한다. 다른 구체예에서, 결합 도메인은 FcγRIIB의 인산화를 저해하고, SHIP의 동원을 저해하고, SHIP의 인산화 및 SHIP과 Shc의 결합을 저해하고, 또는 MAP 키나제 패밀리 멤버(예, Erk1, Erk2, JNK, p38 등)의 활성화를 증강한다. 또 다른 구체예에서 본 발명의 결합 도메인은 $p62^{dok}$의 티로신 인산화, 및 이것과 SHIP 및 rasGAP과의 결합을 저해한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 결합 도메인은 단구 또는 마크로파아지에서의 FcγR을 통한 식작용을 증강한다. 다른 구체예에서, 결합 도메인은 비장 마크로파아지에 의한 옵소닌화 입자(opsonized particle)의 식작용, 클리어런스(clearance)를 저해한다.

[0142] 다른 구체예에서, 적어도 하나의 결합 도메인을 이용하여, FcγRIIB를 발현하는 세포를 본 발명의 디아바디의 표적으로 하는 것이 가능하다.

[0143] 하나의 구체적인 구체예에서, 결합 도메인중 하나는, 클론 2B6 또는 3H7로부터 생산되는 마우스 단일클론 항체에서 유래한다. 상기 클론은 각각 ATCC 수탁번호 PTA-4591 및 PTA-4592를 갖는다. 2B6 및 3H7 항체를 생산하는 마이크로도마는, American Type Culture Collection(10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209)에 2002년 8월 13일에 특허수속상의 미생물의 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약의 규정에 기초하여 기탁되어, 각각 수탁번호 PTA-4591(2B6를 생산하는 하이브리도마용) 및 PTA-4592(3H7를 생산하는 하이브리도마용)가 부여되었다. 이들은, 참조로서 본 명세서에 포함된다. 결합 도메인은 인간 유래이거나 또는 인간화된 것이 구체예로서 바람직하다. 3H7 또는 2B6 클론으로부터 생산되는 항체의 인간화 버전에서 유래하는 결합 도메인이 바람

직하다.

[0144] 본 발명은 또한 다른 항체 유래의 결합 도메인을 갖는 디아바디를 포함한다. 다른 항체로는 특히 FcγRIIB 바람직하게는 인간 FcγRIIB, 보다 바람직하게는 천연의 인간 FcγRIIB에 결합하고, 또한 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 및 1F2(각각 ATCC 수탁번호 PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 및 PTA-5959를 갖는다)를 포함하지만 이에 한정되지 않는 클론에 유래한다. 상기의 클론을 생산하는 하이브리도마는, 부다페스트 조약의 규정하에, American Type Culture Collection(10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209)에 2004년 5월 7일에 기탁되어 있다. 이들 하이브리도마는, 참조로서 본 명세서에 포함된다. 상기 항체 유래의 결합 도메인은 인간화된 것이 구체예로서 바람직하다.

[0145] 구체적인 구체예에서, 본 발명의 디아바디에 사용되는 결합 도메인은, 항체 또는 그 항원 결합 단편(예를 들면, 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 또는 1F2 클론에서 생산되는 항체의 1 이상의 상보성 결정영역(CDR), 바람직하게는 6개의 CDR 전체를 포함) 유래이다. 다른 구체예에서, 결합 도메인은, 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 또는 1F2 클론의 각각에서 생산되는 마우스 단일클론 항체와 동일한 에피토프에 결합하고, 및/또는, 예로서 ELISA 분석 또는 다른 적당한 경쟁 면역분석(competitive immunoassay)로 측정한 때에, 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 또는 1F2 클론에서 생산된 마우스 단일클론 항체와 경쟁하고, 또한 그 결합 도메인이 FcγRIIA와 결합하는 것 보다 더 강한 친화성으로 FcγRIIB와 결합한다.

[0146] 본 발명은 또한 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 또는 1F2 클론에서 생산되는 마우스 단일클론 항체의 중쇄 가변부 및/또는 경쇄 가변부의 아미노산 서열과 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 중쇄 가변부 및/또는 경쇄 가변부의 아미노산 서열을 포함하는 결합 도메인을 갖는 디아바디를 포함한다. 본 발명은 또한 FcγRIIA에 결합하는 것 보다 더 높은 친화성으로 FcγRIIB에 특이적으로 결합하고, 또한 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 또는 1F2 클론에서 생산되는 마우스 단일클론 항체의 1 이상의 CDR의 아미노산 서열과 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 1 이상의 CDR의 아미노산 서열을 포함하는, 결합 도메인을 갖는 디아바디를 포함한다. 2개의 아미노산 서열의 동일성 퍼센트의 결정은, BLAST 단백질 검색을 포함하는 당업자에게 공지인 어떠한 방법에 의하여도 결정할 수 있다.

[0147] 본 발명은 또한 결합 도메인이 FcγRIIA와 결합하는 것보다 강한 친화성으로 FcγRIIB와 특이적으로 결합하는 결합 도메인을 포함하는 디아바디의 사용을 포함한다. 이 결합 도메인은, 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 또는 1F2 클론에서 생산되는 마우스 단일클론 항체의 뉴크레오티드 서열에 스트린전트 조건(stringent condition)하에서 혼성화하는 뉴크레오티드 서열에 의해 코딩되어 있다. 바람직한 구체예에서, 결합 도메인은, FcγRIIA보다 강한 친화성으로 FcγRIIB와 특이적으로 결합하고, 또한 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 또는 1F2 클론에서 생산되는 마우스 단일클론 항체의 경쇄 가변부 및/또는 중쇄 가변부의 뉴크레오티드 서열에 스트린전트 조건(stringent condition)하에서 혼성화하는 뉴크레오티드 서열에 의해 코딩되어 있는 경쇄 가변부 및/또는 중쇄 가변부를 포함한다. 다른 바람직한 구체예에서, 결합 도메인은, FcγRIIA보다 강한 친화성으로 FcγRIIB와 특이적으로 결합하고, 또한 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 또는 1F2 클론에서 생산되는 마우스 단일클론 항체의 1 이상의 CDR의 뉴크레오티드 서열에 스트린전트 조건(stringent condition)하에서 혼성화하는 뉴크레오티드 서열에 의해 코딩되어 있는 1 이상의 CDR을 포함한다. 스트린전트 혼성화 조건은 한정되는 것은 아니지만, 필터에 결합한 DNA를 약 45℃의 온도하에서 6×염화나트륨/시트르산나트륨(SSC) 용액중에서 처리한 후, 약 50~65℃하에서 0.2×SSC/0.1% SDS 용액으로 1회 이상 세정하는 혼성화를 포함한다. 보다 고도의 스트린전트 조건은, 예를 들면 필터에 결합한 DNA를 약 45℃의 온도하에서 6×SSC 용액중에서 처리한 후, 약 60℃하에서 0.1×SSC/0.2% SDS 용액으로 1회 이상 세정하는 혼성화를 포함한다. 또는, 당업자에게 공지된 다른 스트린전트 혼성화 조건(예를 들면, Ausubel, F. M. et al, eds. 1989 Current Protocols in Molecular Biology, vol.1, Green Publishing Associates, Inc. 및 John Wiley 및 Sons, Inc., NY 페이지 6.3.1 내지 6.3.6 및 2.10.3 참조)을 포함한다.

[0148] 본 발명은 또한 프레임워크 또는 CDR 영역에 변이(예를 들면, 1 이상의 아미노산 치환)을 갖는 상기 어떠한 결합 도메인의 아미노산 서열을 포함하는 결합 도메인의 사용을 포함한다. 이들 결합 도메인에 있어서의 변이는, 결합 도메인이 면역 특이성에 결합하는 FcγRIIB에 대한 결합 도메인의 결합력 및/또는 친화성을 유지 또는 강화하는 것이 바람직하다. 당업자에게 공지인 표준적인 기술(예를 들면, 면역 분석)을 이용하여, 특정의 항원에 대한 항체의 친화성을 분석하는 것이 가능하다.

[0149] 당업자에게 공지인 표준적인 기술을 이용하여, 항체 또는 그 단편을 코딩하는 뉴클레오티드 서열중에 변이를 도입하는 것이 가능하다. 이와 같은 기술에는, 예를 들면, 아미노산 치환을 유발하는 부위특이적 돌연변이 유발 및 PCR을 통한 돌연변이 유발이 포함된다. 유도체는, 원래의 항체 또는 그 단편에 대하여 15 아미노산 미만의 치환, 10 아미노산 미만의 치환, 5 아미노산 미만의 치환, 4 아미노산 미만의 치환, 3 아미노산 미만의 치환, 또는 2 아미노산 미만의 치환을 포함하는 것이 바람직하다. 유도체가 1 이상의 예측되는 비필수 아미노산 잔기에 보존적 아미노산 치환을 갖는 것이 구체예로서 바람직하다.

[0150] 바람직한 구체예에서, 결합 도메인은 인간화 항체에서 유래한다. 인간화 FcγRIIB 특이적 항체는, 적어도 1개, 통상은 2개의 가변 도메인의 실질적으로 전체를 포함하고 있어도 좋다. 이 가변 도메인은, CDR 영역의 전체 또는 실질적으로 전체가 비인간 면역글로불린(예, 공여자 항체)의 CDR 영역과 일치하고, 프레임워크 영역의 전체 또는 실질적으로 전체가 인간 면역글로불린의 프레임워크 영역의 컨센서스 서열(consensus sequence)로 되어 있다.

[0151] 본 발명의 디아바디는, FcγRIIB에 특이적인 인간화 가변 도메인을 포함한다. 이 가변 도메인에서는, 인간 항체(수용자 항체)의 중쇄 및/또는 경쇄 가변영역의 1 이상의 CDR의 1 이상의 영역이, FcγRIIA 보다 강한 친화성으로 FcγRIIB와 특이적으로 결합하는 공여자의 단일클론 항체의 1 이상의 CDR의 유사 부분에서 치환되어 있다. 이와 같은 단일클론 항체로서, 예를 들면 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 또는 1F2 클론에서 생산되는 단일클론 항체를 들 수 있다. 다른 구체예에서, 인간화 항체는 각각 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 또는 1F2과 동일한 에피토프에 결합한다.

[0152] 바람직한 구체예에서, 인간화 FcγRIIB 결합 도메인의 CDR 영역은, FcγRIIB에 특이적인 마우스 항체에서 유래한다. 어떠한 구체예에서, 본 명세서에 기재된 인간화 항체는, 한정되는 것은 아니지만, 수용자 항체의 아미노산 결실, 삽입, 변형을 포함하는 개변을 포함한다. 여기서 말하는 수용자 항체란, 즉 인간 항체이고, 더욱이 공여자 단일클론 항체의 결합 특이성을 보유하는 데에 필요한 중쇄 및/또는 경쇄의 가변 도메인의 프레임워크 영역을 의미한다. 어떠한 구체예에서, 본 명세서에 기재된 인간화 항체의 프레임워크 영역은 반드시 천연의 인간 항체 가변 영역의 프레임워크 영역의 아미노산 서열과 정확히 동일할 필요는 없고, 인간화 항체의 성질을 바꾸는 아미노산 결실, 삽입, 변형을 포함하는(다만, 이것들에 한정되는 것은 아니다) 다양한 개변을 포함한다. 여기서, 인간화 항체의 성질을 바꾸는 것이란, 예를 들면, 마우스의 FcγRIIB 특이적 항체와 동일한 표적에 대하여 특이적인 인간화 항체 영역의 결합특성을 개선하는 것 등이 해당한다. 가장 바람직한 구체예에서는, 비인간 프레임워크 잔기를 광범위하게 도입하는 것을 피하고, 인간에 있어서 인간화 항체의 최소한의 면역원성을 보유하기 위하여, 프레임워크 영역에 대하여 최소한의 개변을 행한다. 공여자의 단일클론 항체는, 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 또는 1F2에서 생산되는 단일클론 항체인 것이 바람직하다.

[0153] 구체적인 구체예에서, 결합 도메인은 FcγRIIA와 결합하는 것보다도 강한 친화력으로 FcγRIIB와 특이적으로 결합하는 CDR 그래프트화 항체의 가변 도메인을 포함한다. 여기에서, CDR 그래프트화 항체는 레시피언트 항체의 프레임워크 잔기와, 도너 단일 클론 항체 유래의 잔기로 이루어지는 중쇄 가변 영역 도메인을 포함한다. 도너 단일 클론 항체는, 예를 들면, 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 또는 1F2 클론으로부터 생산되는 단일 클론 항체와 같이, FcγRIIA와 결합하는 것보다도 강한 친화력으로 FcγRIIB와 특이적으로 결합하는 항체이다. 다른 구체적인 구체예에서, 본 발명의 디아바디는 CDR 그래프트화 항체가 FcγRIIA와 결합하는 것보다도 강한 친화력으로 FcγRIIB와 특이적으로 결합하는 이 CDR 그래프트화 항체 유래의 가변 도메인을 포함한다. 여기에서, CDR 그래프트화 항체는, 레시피언트 항체의 프레임워크 잔기와, 도너 단일 클론 항체 유래의 잔기로 이루어지는 경쇄 가변 영역 도메인을 포함한다. 도너 단일 클론 항체는, 예를 들면, 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 또는 1F2클론으로부터 생산되는 단일 클론 항체와 같이, FcγRIIA와 결합하는 것보다도 강한 친화력으로 FcγRIIB와 특이적으로 결합하는 항체이다.

[0154] 본 발명에서 사용되는 인간화 항 FcγRIIB의 가변 도메인은, CDR1(**서열번호** 24 또는 서열번호 25) 및/또는 CDR2(**서열번호 26 또는 서열번호 27**) 및/또는 CDR3(**서열번호 28 또는 서열번호 29**)의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 CDR1(**서열번호 30 또는 서열번호 31**) 및/또는 CDR2(**서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34 또는 서열번호 35**) 및/또는 CDR3(**서열번호 36 또는 서열번호 37**)의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 가지고 있어도 된다.

[0155] 구체적인 구체예에서, 디아바디는 인간화 2B6 항체에 유래하는 가변 도메인을 포함한다. 이 디아바디에서는, VH 영역이 인간 생식 계열의 VH 세그먼트인 VH1-18(Matsuda et al.(1998) "The Complete Nucleotide Sequence Of The Human Immunoglobulin 중쇄 가변 부위 Locus," J. Exp. Med. 188:2151-2162) 및 JH6(Ravetch et

al.(1981) "Structure Of The Human Immunoglobulin Mu Locus: Characterization Of Embryonic And Rearranged J And D Genes," Cell 27(3 Pt. 2): 583-91)에 유래하는 FR 세그먼트와, **서열번호 24, 서열번호 26 또는 서열번호 28**의 아미노산 서열을 갖는 2B6 VH의 1 이상의 CDR 영역으로 이루어진다. 1의 구체예에서, 2B6 VH는 **서열번호 38**의 아미노산 서열을 갖는다. 다른 구체예에서, 2B6 VH 도메인은 **서열번호 85**의 Hu2B6VH의 아미노산 서열을 갖고, **서열번호 86**의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩될 수 있다. 다른 구체적인 구체예에서, 디아바디는 VL 영역을 더 포함하고, 이 VL 영역은 인간 생식 계열 VL 세그먼트인 VK-A26(Lautner-Rieske et al.(1992) "The Human Immunoglobulin Kappa Locus. Characterization Of The Duplicated A Regions," Eur. J. Immunol. 22:1023-1029) 및 JK4(Hieter et al.(1982) "Evolution Of Human Immunoglobulin Kappa J Region Genes," J. Biol. Chem. 257:1516-22)의 FR 세그먼트와, **서열번호 30, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34 및 서열번호 36**의 아미노산 서열을 갖는 2B6 VL의 1 이상의 CDR 영역으로 이루어진다. 1의 구체예에서, 2B6 VL은 **서열번호 39, 서열번호 40, 또는 서열번호 41**의 아미노산 서열을 갖는다. 구체적인 구체예에서, 2B6 VL은 **서열번호 87**의 Hu2B6VL의 아미노산 서열을 갖고, **서열번호 88**의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩될 수 있다.

[0156] 다른 구체적인 구체예에서, 디아바디는 인간화 3H7 항체에 유래하는 가변 도메인을 갖는다. 이 디아바디에서는, VH 영역이 인간 생식 계열 VH 세그먼트에 유래하는 FR 세그먼트와, **서열번호 35**의 아미노산 서열을 갖는 3H7 VH의 CDR 영역으로 이루어진다. 다른 구체적인 구체예에서, 인간화 3H7 항체는 또한 VL 영역을 포함하고, 이 VL 영역은 인간 생식 계열 VL 세그먼트의 FR 세그먼트와, **서열번호 42**의 아미노산 서열을 갖는 3H7VL의 CDR 영역으로 이루어진다.

[0157] 구체적으로는, 결합 도메인은 천연의 인간 FcγRIIB의 세포외 도메인과 면역 특이적으로 결합하고, 또 이하의 조합 중 어느 하나에서 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 또는 1F2의 CDR 서열을 포함한다(또는, 이루어진다). 상기 조합이란 VH CDR1 및 VL CDR1; VH CDR1 및 VL CDR2; VH CDR1 및 VL CDR3; VH CDR2 및 VL CDR1; VH CDR2 및 VL CDR2; VH CDR2 및 VL CDR3; VH CDR3 및 VH CDR1; VH CDR3 및 VL CDR2; VH CDR3 및 VL CDR3; VH1 CDR1, VH CDR2 및 VL CDR1; VH CDR1 및 VH CDR2 및 VL CDR2; VH CDR1, VH CDR2 및 VL CDR3; VH CDR2, VH CDR3 및 VL CDR1, VH CDR2, VH CDR3 및 VL CDR2; VH CDR2, VH CDR2 및 VL CDR3; VH CDR1, VL CDR1 및 VL CDR2; VH CDR1, VL CDR1 및 VL CDR3; VH CDR2, VL CDR1 및 VL CDR2; VH CDR2, VL CDR1 및 VL CDR3; VH CDR3, VL CDR1 및 VL CDR2; VH CDR3, VL CDR1 및 VL CDR3; VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3 및 VL CDR1; VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3 및 VL CDR2; VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3 및 VL CDR3; VH CDR1, VH CDR2, VL CDR1 및 VL CDR2; VH CDR1, VH CDR2, VL CDR1 및 VL CDR3; VH CDR1, VH CDR3, VL CDR1 및 VL CDR2; VH CDR1, VH CDR3, VL CDR1 및 VL CDR3; VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1 및 VL CDR2; VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1 및 VL CDR3; VH CDR2, VH CDR3, VL CDR2 및 VL CDR3; VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1 및 VL CDR2; VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1 및 VL CDR3; VH CDR1, VH CDR2, VL CDR1, VL CDR2, VL CDR3; VH CDR1, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3; VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3; 또는 본 명세서에서 개시한 VH CDR 및 VL CDR 중 어느 하나의 조합을 말한다.

[0158] 본 발명의 디아바디에 포함되는 결합 도메인의 유래가 되는 항체는, FcγRIIA와 비교하여 FcγRIIB에 가장 강한 특이성을 가진 항체를 선택할 수 있도록, 에피토프 매핑에 의해 더욱 특징지을 수 있다. 항체의 에피토프 매핑법은 당해 분야에서는 주지이며, 본 발명의 방법에 포함된다. 몇개의 구체예에서는, FcγRIIB의 1 이상의 영역을 포함하는 융합 단백질을, 본 발명의 항체의 에피토프를 매핑하는데 사용할 수 있다. 구체적인 구체예에서, 융합 단백질은 인간 IgG2의 Fc 부분과 융합한 FcγRIIB의 영역의 아미노산 서열을 포함하고 있다. 각 융합 단백질은, 하기의 **표 2**에 나타내는 바와 같은 아미노산 치환 및/또는 상동 수용체(예를 들면, FcγRIIA)의 대응 영역에 의한 이 수용체의 특정 영역의 교환을 더욱 포함할 수 있다. pMGX125 및 pMGX132는 FcγRIIB 수용체의 IgG 결합 부위를 포함하고(전자는 FcγRIIB의 C 말단을 갖고, 그리고 후자는 FcγRIIA의 C 말단을 가짐), C 말단 결합성을 구별하기 위하여 사용할 수 있다. 그 밖은 IgG 결합 부위에서의 FcγRIIA 치환, 및 FcγRIIA 또는 FcγRIIB 중 어느 하나의 N 말단을 갖는다. 이들 분자는 항체가 결합하는 수용체 분자의 부분을 결정하는데 도움이 된다.

표 2

[0159] 단일클론 항 FcγRIIB 항체의 에피토프를 조사하는 데에 사용할 수 있는 융합 단백질의 리스트에 관한 것이다. 잔기 172~180은, FcγRIIA 및 FcγRIIB의 IgG 결합 부위에 속한다. FcγRIIA 서열 유래의 특정 아미노산을 볼드체(bold)로 나타내었다.

플라스미드	수용체	N-말단	172-180	서열번호	C-말단
pMGX125	RIIb	IIb	KKFSRSDPN	43	APS------SS (IIb)
pMGX126	RIIa/b	IIa	QKFSRLDPN	44	APS------SS (IIb)
pMGX127		IIa	QKFSRLDPT	45	APS------SS (IIb)
pMGX128		IIb	KKFSRLDPT	46	APS------SS (IIb)
pMGX129		IIa	QKFSHLDPT	47	APS------SS (IIb)
pMGX130		IIb	KKFSHLDPT	48	APS------SS (IIb)
pMGX131		IIa	QKFSRLDPN	49	VPSMGSSS(IIa)
pMGX132		IIb	KKFSRSDPN	50	VPSMGSSS(IIa)
pMGX133	RIIa-131R	IIa	QKFSRLDPT	51	VPSMGSSS(IIa)
pMGX134	RIIa-131H	IIa	QKFSHLDPT	52	VPSMGSSS(IIa)
pMGX135		IIb	KKFSRLDPT	53	VPSMGSSS(IIa)
pMGX136		IIb	KKFSHLDPT	54	VPSMGSSS(IIa)
주: APSSS는 서열번호 309이고; VPSMGSSS는 서열번호 310이다					

[0160] 융합 단백질은, 본 발명의 항 FcγRIIB 항체에의 결합을 측정하기 위한 어느 하나의 생화학적 분석법, 예를 들면, ELISA법에서 사용할 수 있다. 다른 구체예에서는, 특정 잔기를 FcγRIIA 서열 유래의 잔기와 치환한 펩티드를 사용하여, 에피토프 특이성의 새로운 확인을 행할 수 있다.

[0161] 항체는 본 발명의 항체의 기능, 특히 FcγRIIB 시그널 전달을 조절하는 활성을 동정하기 위한 분석법을 사용하여 특성 분석할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 특성 분석은 FcγRIIB의 ITIM 모티프(motif) 중의 티로신 잔기의 인산화를 측정하거나, 또는, B 세포 수용체에 의해 발생하는 칼슘 동원의 저해를 측정할 수도 있다. 본 발명의 특성 분석은 세포 베이스의 분석법 또는 무세포계 분석법으로 할 수 있다.

[0162] 마스트 세포(mast cell)에서는, 고친화성 IgE 수용체인 FcεRI와 FcγRIIB의 공응집이, 항원 유도성 탈과립, 칼슘 동원, 및 사이토카인 생산의 저해를 초래하는 것은 당해 분야에서는 충분히 입증되어 있다(Metcalfe D. D. et al.(1997) "Mast Cells," Physiol. Rev. 77:1033-1079; Long E.O.(1999) "Regulation Of Immune Responses Through Inhibitory Receptors," Annu. Rev. Immunol. 17: 875-904). 이 시그널 전달경로의 분자적 상세에 대해서는, 최근 밝혀졌다(Ott V. L.(2002) "Downstream Of Kinase, p62(dok), Is A Mediator Of FcgammaIIB Inhibition Of Fc Epsilon RI Signaling," J. Immunol. 162(9):4430-4439). 일단 FcεRI와 공응집하면, FcγRIIB는 그 ITIM 모티프 중의 티로신상에서 즉시 인산화되고, 그 후 Src 호몰로지2 함유 이노시톨-5-포스파타제(Src Homology-2 containing inositol-5-phosphatase: SHIP)를 동원한다. 이 효소는 SH2 도메인 함유 이노시톨 폴리포스페이트5-포스파타제이며, 순차 인산화되어, Shc 및 $p62^{dok}$와 회합한다. $p62^{dok}$는 어댑터 분자 패밀리의 프로토타입이며, 여기에서 말하는 어댑터 분자 패밀리는, 예를 들면, 아미노 말단의 플렉스트린 상동 도메인(PH 도메인)과 같은 시그널 전달 도메인, PTB 도메인, 및 PXXPmotif와 다수의 인산화 부위를 포함하는 카르복시 말단 영역을 포함한다(Carpino et al.(1997) "p62(dok): A Constitutively Tyrosine-Phosphorylated, GAP-Associated Protein In Chronic Myelogenous Leukemia Progenitor Cells," Cell, 88: 197-204; Yamanshi et al.(1997) "Identification Of The Abl-And ras GAP-Associated 62 kDa Protein As A Docking Protein, Dok," Cell, 88:205-211).

[0163] 본 발명에서 사용하는 항 FcγRIIB 항체는, 마찬가지로, 1 이상의 IgE 개재 응답을 조절하는 능력에 대하여 특성 분석할 수 있다. IgE에 대하여 고친화성의 수용체 및 FcγRIIB에 대하여 저친화성의 수용체를 공발현하는 세포주를, IgE 개재 응답의 조절에서의 항 FcγRIIB 항체의 특성 분석에 사용하는 것이 바람직하다. 구체적인 구체예에서, 전체 길이의 인간 FcγRIIB로 트랜스펙트한 래트 호염기구성 백혈병 세포주(RBL-H23; Barsumian E.L. et al.(1981) "IgE-Induced Histamine Release From Rat Basophilic Leukemia Cell Lines: Isolation Of Releasing And Nonreleasing Clones," Eur. J. Immunol.11 :317-323; 참조로서 본 명세서에 그 모두를 포함함) 유래의 세포를 사용할 수 있다. RBL-2H3은 충분히 특징지어진 래트 세포주이며, IgE를 통한 세포 활성화 후의 시그널 전달기구를 연구하는데도 널리 사용되고 있다. RBL-2H3 세포에서 발현되고, 그리고 FcεRI와 공응집하면, FcγRIIB는 FcεRI 유도 칼슘 동원, 탈과립 및 사이토카인 생산을 저해한다(Malbec et al.(1998) "Fc Epsilon Receptor I-Associated Lyn-Dependent Phosphorylation OfFc Gamma Receptor HB During Negative Regulation Of Mast Cell Activation," J. Immunol. 160:1647-1658; Daeron et al.(1995) "Regulation Of High-Affinity IgE Receptor-Mediated Mast Cell Activation By Murine Low-Affinity IgG Receptors," J. Clin. Invest. 95:577; Ott V. L.(2002) "Downstream Of Kinase, p62(dok), Is A Mediator Of FcgammaIIB

Inhibition OfFc Epsilon RI Signaling," J. Immunol. 162(9):4430-4439).

[0164] 본 발명에서 사용하는 항체는 FcεRI 유도형 마스트 세포 활성화의 저해에 대하여 특성 분석할 수도 있다. 예를 들면, FcγRIIB로 트랜스펙트된 래트 호염기구성 백혈병 세포주(RBL-H23; Barsumian E.L. et al.(1981) "IgE-Induced Histamine Release From Rat Basophilic Leukemia Cell Lines: Isolation Of Releasing And Nonreleasing Clones," Eur. J. Immunol.11 :317-323) 유래의 세포를, IgE에서 감작하고, 그리고 FcεRI만을 응집하는 토끼 항 마우스 IgG의 F(ab')2 단편로 자극하거나, 또는 FcγRIIB와 FcεRI를 공응집하는 완전한 토끼 항 마우스 IgG로 자극한다. 이 계에서는, 하류 시그널 전달 분자의 간접적인 조절을, 감작 및 자극한 세포에 본 발명의 항체를 첨가했을 때에 분석할 수 있다. 예를 들면, FcγRIIB의 티로신 인산화 및 SHIP의 동원과 인산화, Erk1, Erk2, JNK 또는 p38을 포함하지만 그것들에 한정되지 않는 MAP 키나제 패밀리 멤버의 활성화, 및 p62dok의 티로신 인산화 및 그것과 SHIP 및 RasGAP의 회합을 분석한다.

[0165] 본 발명의 항체에 의해 FcεRI 유도형 마스트 세포 활성화의 저해를 측정하는 1개의 전형적인 분석은 이하를 포함할 수 있다. 즉, 인간 FcγRIIB로 RBL-H23 세포를 트랜스펙트하는 것, IgE로 RBL-H23 세포를 감작하는 것, 그리고 토끼 항 마우스IgG의 F(ab')2(FcεRI만을 응집하고, FcεRI 개재 시그널 전달을 일으킨다; 대조군으로서 사용함)로 RBL-H23 세포를 자극하거나, 또는 완전한 토끼 항 마우스 IgG(FcγRIIB와 FcεRI를 공응집하고, 결과적으로 FcεRI 개재 시그널 전달을 저해함)로 RBL-H23 세포를 자극하는 것을 포함할 수 있다. 완전한 토끼 항 마우스 IgG 항체로 자극한 세포를, 또한, 본 발명의 항체와 프리 인큐베이트할 수 있다. 본 발명의 항체와 프리 인큐베이트한 세포, 및 본 발명의 항체와 프리 인큐베이트하지 않은 세포의 FcεRI 의존성 활성을 측정하고, 이들 세포에서의 FcεRI 의존성 활성의 레벨을 비교함으로써 본 발명의 항체에 의한 FcεRI 의존성 활성의 조절을 나타낼 수 있다.

[0166] 상기의 전형적인 분석을 사용하여, 예를 들면, FcγRIIB 수용체에의 리간드(IgG) 결합을 블록하고, 또한 및 FcεRI와 FcγRIIB의 공응집을 방해함으로써 FcεRI 시그널 전달의 FcγRIIB 개재 저해에 어고나이즈하는 항체를 동정할 수 있다. 마찬가지로 이 분석은, FcγRIIB와 FcεRI의 공응집을 증강하고, FcγRIIB와 FcεRI의 공응집을 촉진함으로써 FcεRI 시그널 전달의 FcγRIIB 개재 저해에 어고나이즈하는 항체를 동정한다.

[0167] 몇개의 구체예에서, 본 명세서에서 동정되어 기재된 또는 당해 분야에서 알려진, 본 발명의 항 FcγRIIB 항체의 에피토프 결합 도메인을 포함하는 항 FcγRIIB 디아바디는, 바람직하게는 세포 베이스의 분석법에 있어서, 마스트 세포 또는 호염기구(basophils)의 탈과립을 모니터링하고 및/또는 측정함으로써, IgE 개재 응답을 조절하는 그 능력에 대하여 특성 분석된다. 이러한 분석에서 사용하는 마스트 세포 또는 호염기구는, 당업자에게 공지의 표준적인 재조합법을 사용하여, 인간 FcγRIIB를 포함하도록 유전자 조작되어 있는 것이 바람직하다. 구체적인 구체예에서, 본 발명의 항 FcγRIIB 항체는, 세포 베이스의 β-헥소사미니다제(과립 중에 포함되는 효소) 방출 분석으로 IgE 개재 응답을 조절하는 그 능력에 대하여 특성 분석된다. 마스트 세포 및 호염기구으로부터의 β-헥소사미니다제 방출은 급성 알레르기 상태 및 급성 염증 상태의 최초의 특징이다(Aketani 등, 2001 Immunol. Lett.75: 185-9; Aketani 등, 2000 Anal. Chem. 72: 2653-8). 세로토닌이나 히스타민을 포함하지만 이것들에 한정되지 않는 다른 염증성 매개자의 방출을 본 발명 방법에 따라 분석하고, IgE 개재 응답을 측정해도 된다. 특정 작용 기작에 얽매이는 것은 아니지만, 마스트 세포 및 호염기구으로부터의 β-헥소사미니다제 함유 과립과 같은 과립의 방출은, FcγRI와 다가 항원과의 가교에 의해 개시되는 세포내 칼슘 농도 의존성의 프로세스이다.

[0168] 인간 마스트 세포의 연구의 가능성은 적당한 장기의 인간 마스트 세포 배양물이 없어 제한되어 있다. 최근들어, LAD1 및 LAD2라고 불리는 2종의 신규 줄기세포 인자 의존성의 인간 마스트 세포주가 마스트 세포 육종/백혈병 환자 유래의 골수액으로부터 수립되었다(Kirshenbaum et al.(2003) "Characterization Of Novel Stem Cell Factor Responsive Human Mast Cell Lines LAD 1 And 2 Established From A Patient With Mast Cell Sarcoma/Leukemia; Activation Following Aggregation Of FcRI or FcγRI," Leukemia research, 27:677-82; 참조로서 그 모두를 본 명세서에 포함함). 양 세포주는 FcεRI 및 몇개의 인간 마스트 세포 마커를 발현하는 것이 기재되어 있다. LAD1 세포 및 LAD2 세포는 IgE 개재 응답에 본 발명의 항체가 미치는 효과를 평가하는데 사용할 수 있다. 구체적인 구체예에서, 상기와 같은 세포 베이스의 β-헥소사미니다제 방출 분석을 LAD 세포에서 사용하여, 본 발명의 항 FcγRIIB 항체에 의한 IgE 개재 응답의 모든 조절을 측정할 수 있다. 전형적인 분석에서는, 예를 들면, LAD1 등의 인간 마스트 세포를, 인간 키메라 IgE 항 니트로페놀(NP)로 자극하고, 다가 항원인 BSA-NP로 챌린지한다. 그리고 세포의 탈과립을, 상청액 중에 방출되는 β-헥소사미니다제를 측정함으로써 모니터링 한다(Kirshenbaum et al.(2003) "Characterization Of Novel Stem Cell Factor Responsive Human Mast Cell Lines LAD I And 2 Established From A Patient With Mast Cell Sarcoma/Leukemia; Activation Following Aggregation Of FcRI or FcγRI," Leukemia research, 27:677-82; 참조로서 그 모두를 본 명세서에

포함함).

[0169] 몇개의 구체예에서, 당해 분야에서 공지의 표준적인 방법, 예를 들면, FACS 염색 등을 사용하여 측정했을 때, 인간 마스트 세포의 내재성 FcγRIIB의 발현이 낮은 경우, 본 발명의 항 FcγRIIB 디아바디에 의해 매개되는 저해 경로의 활성화의 차이를 모니터링 및/또는 검출하는 것은 곤란할지도 모른다. 그 때문에, 본 발명은, 사이토카인 및 특정 증식조건을 사용하여 FcγRIIB 발현을 상방 제어(up-regulation)할 수 있는 다른 방법을 포함한다. FcγRIIB는 THP1이나 U937 등의 인간 단구계 세포주(Tridandapani et al.(2002) "Regulated Expression And Inhibitory Function Of Fcgamma RIIB In Human Monocytic Cells," J. Biol. Chem., 277(7): 5082-5089), 및 인간 초대 단구(Pricop et al.(2001) "Differential Modulation Of Stimulatory And Inhibitory Fc Gamma Receptors On Human Monocytes By Th1 And Th2 Cytokines," J. of Immunol, 166: 531-537)에서는, IL-4에 의해 고도로 상방 제어되는 것이 기재되어 있다. 디부티릴 환상 AMP에 의한 U937 세포의 분화는 FcγRII의 발현을 증가시키는 것이 기재되어 있다(Cameron et al.(2002) "Differentiation Of The Human Monocyte Cell Line, U937, With Dibutyryl Cyclic AMP Induces The Expression Of The Inhibitory Fc Receptor, FcgammaRIIB," Immunology Letters 83, 171-179). 따라서, 검출감도를 증강하기 위하여, 본 발명의 방법에서 사용하는 인간 마스트 세포에서의 내재성 FcγRIIB의 발현은, 예를 들면, IL-4, IL-13과 같은 사이토카인을 사용하여 상방 제어할 수 있다.

[0170] 항 FcγRIIB 디아바디는 B세포 수용체(BCR)를 통한 시그널 전달의 저해에 대하여 분석할 수도 있다. BCR을 통한 시그널 전달은, 적어도 1개 이상의 하류의 생물학적 응답, 예를 들면, B세포의 활성화 및 증식, 항체 생산 등을 포함할 수 있다. FcγRIIB와 BCR의 공응집은 세포주기의 진행 및 세포의 생존의 저해를 초래한다. 또한, FcγRIIB와 BCR의 공응집은 BCR 개재 시그널 전달의 저해를 초래한다.

[0171] 특히, BCR을 통한 시그널 전달은 이하의 적어도 1개 이상을 포함한다. 즉, 하류 시그널 전달분자의 조절, 예를 들면, FcγRIIB의 인산화 상태, SHIP의 동원, Btk 및/또는 PLCγ의 국부 존재, MAP 키나제 활성, Akt(항 어팝토시스 시그널)의 동원, 칼슘 동원, 세포주기의 진행, 및 세포증식을 들 수 있다.

[0172] BCR 시그널 전달의 FcγRIIB 개재 저해에 있어서의 이펙터 기능의 대부분은 SHIP을 통하고 있지만, 최근, SHIP 결손 마우스 유래의 리포다당(LPS) 활성화 B 세포가, 칼슘 동원, Ins(1,4,5)P_3 생산, 및 Erk 및 Akt의 인산화의 현저한 FcγRIIB 개재 저해를 나타내는 것이 입증되었다(Brauweiler et al.(2001) "Partially Distinct Molecular Mechanisms Mediate Inhibitory FcgammaRIIB Signaling In Resting And Activated B Cells," Journal of Immunology, 167(1): 204-211). 따라서, SHIP 결손 마우스 유래의 ex vivo B 세포를 사용하여, 본 발명의 항체를 특징지을 수 있다. 본 발명의 항체에 의한 BCR 시그널 전달의 FcγRIIB 개재 저해를 측정하기 위한 전형적인 분석은 이하의 스텝을 포함할 수 있다. 즉, SHIP 결손 마우스로부터 비장 B 세포를 분리하는 스텝, 상기 세포를 리포 다당으로 활성화하는 스텝, 및 상기 세포를 F(ab')2 항 IgM으로 자극하여 BCR을 응집시키거나, 또는 항 IgM으로 자극하여 BCR을 FcγRIIB와 공응집시키는 스텝이다. 완전한 항 IgM으로 자극하여, BCR을 FcγRIIB와 공응집시킨 세포를, 또한 본 발명의 항체와 프리 인큐베이트할 수 있다. 세포의 FcγRIIB 의존성 활성은 당해 분야에서 알려지는 표준적인 기술에 의해 측정할 수 있다. 항체와 프리 인큐베이트한 세포 및 프리 인큐베이트하지 않은 세포의 FcγRIIB 의존성 활성의 레벨을 비교함으로써, 그 항체에 의한 FcγRIIB 의존성 활성의 조절을 나타낼 수 있다.

[0173] FcγRIIB 의존성 활성의 측정은, 예를 들면, 플로우 사이토메트리로서 세포 내 칼슘 동원을 측정하는 것, Akt 및/또는 Erk의 인산화를 측정하는 것, PI(3,4,5)P_3의 BCR 개재 축적을 측정하는 것, 또는 B세포의 FcγRIIB 개재 증식을 측정하는 것을 포함할 수 있다.

[0174] 상기 분석을 사용하여, 예를 들면, 본 발명에서 사용하는 이하와 같은 디아바디 또는 항 FcγRIIB 항체를 동정할 수 있다. 즉, FcγRIIB 수용체의 리간드(IgG) 결합 부위를 블록하고, 또한 FcγRIIB와 BCR의 공응집을 방해함으로써 BCR 시그널 전달의 FcγRIIB 개재 저해에 길항함으로써, BCR 시그널 전달의 FcγRIIB 개재 저해를 조절하는 디아바디 또는 항 FcγRIIB 항체이다. 또, 상기 분석을 사용하여, FcγRIIB와 BCR의 공응집을 증강하고 또한 BCR 시그널 전달의 FcγRIIB 개재 저해에 어고나이즈 하는 항체를 동정할 수도 있다.

[0175] 항 FcγRIIB 항체는 인간 단구/마크로파지에서 FcγRII를 통한 시그널 전달에 대하여 분석할 수도 있다. FcγRIIB와 면역수용체 티로신 활성화 모티프(immunoreceptor tyrosine-based activation motif: ITAM)를 갖는 수용체와의 공응집은 SHIP를 이펙터로서 사용하는 FcγR 개재 식작용을 하방 제어(down-regulation)하도록 작용한다(Tridandapani et al.(2002) "Regulated Expression And Inhibitory Function Of Fcgamma RIIB In Human

Monocytic Cells," J. Biol. Chem., 277(7): 5082-5089). FcγRIIA와 FcγRIIB의 공응집은 FcγRIIB의 ITIM 모티프상의 티로신 잔기의 신속한 인산화를 초래하고, 이것은 SHIP의 인산화의 증강, SHIP와 Shc의 결합, 및 120kDa 및 60~65kDa의 분자량을 갖는 단백질의 인산화를 일으킨다. 또한, FcγRIIA와 FcγRIIB의 공응집은 Akt의 인산화의 하방 제어를 초래한다. Akt는 세린트레오닌 키나제이며, 세포 제어에 관여하고, 또 어팝토시스를 억제하는 활동을 갖는다.

[0176] 항-FcγRIIB 디아바디는 인간 단구/마크로파지에서 FcγR을 통한 식작용의 저해에 대하여 분석할 수 있다. 예를 들면, 인간 단구계 세포주 THP-1 유래의 세포를, FcγRII에 대한 마우스 단일 클론 항체 IV.3의 Fab 단편 및 염소 항 마우스 항체(FcγRIIA만을 공응집시킴)로 자극하거나, 완전한 IV.3 마우스 단일 클론 항체 및 염소 항 마우스 항체(FcγRIIA와 FcγRIIB를 공응집시킴)로 자극할 수 있다. 이 계에서는, 하류의 시그널 전달분자의 조절, 예를 들면, FcγRIIB의 티로신 인산화, SHIP의 인산화, SHIP와 Shc의 결합, Akt의 인산화, 및 120kDa 및 60~65kDa의 분자량을 갖는 단백질의 인산화 등을, 자극한 세포에 본 발명의 분자를 가함으로써 분석할 수 있다. 또한, 단구계 세포주의 FcγRIIB 의존성 식작용 효율을 본 발명의 항체의 존재하 및 비존재하에서 직접, 측정할 수 있다.

[0177] 본 발명의 항체에 의한 인간 단구/마크로파지에서의 FcγR 개재 식작용의 저해를 측정하기 위한 다른 전형적인 분석은 이하를 포함할 수 있다. 즉, THP-1 세포를 IV.3 마우스 항 FcγRII 항체의 Fab 및 염소 항 마우스 항체로 자극(FcγRIIA만을 응집시켜, FcγRIIA 개재 시그널 전달을 유도)하거나, 마우스 항 FcγRII 항체 및 염소 항 마우스 항체로 자극하는(FcγRIIA와 FcγRIIB를 공응집시켜, FcγRIIA 개재 시그널 전달을 저해하는) 것을 포함한다. 마우스 항 FcγRII 항체 및 염소 항 마우스 항체로 자극한 세포를, 또한 본 발명의 분자와 프리 인큐베이트할 수 있다. 본 발명의 분자와 프리 인큐베이트한 자극 완료된 세포 및 본 발명의 분자와 프리 인큐베이트하지 않은 세포의 FcγRIIA 의존성 활성을 측정하는 것, 및 이들 세포에 있어서의 FcγRIIA 의존성 활성의 레벨을 비교함으로써 본 발명의 항체에 의한 FcγRIIA 의존성 활성의 조절을 나타낼 수 있다.

[0178] 기재된 전형적인 분석을 사용하여, 예를 들면, 이하와 같은 결합 도메인을 동정할 수 있다. 즉, FcγRIIB 수용체의 리간드 결합을 블록하고, 또한 FcγRIIB와 FcγRIIA의 공응집을 방해함으로써 FcγRIIA 시그널 전달의 FcγRIIB 개재 저해에 길항하는 결합 도메인이다. 마찬가지로, 이 분석으로, FcγRIIB와 FcγRIIA의 공응집을 증강하고, 또한 FcγRIIA 시그널 전달의 FcγRIIB 개재 저해에 어고나이즈하는 결합 도메인을 동정할 수 있다.

[0179] 대상이 되는 FcγRIIB 결합 도메인은, 이전에 보고된 방법(Tridandapani et al.(2000) "The Adapter Protein LAT Enhances Fcgamma Receptor-Mediated Signal Transduction In Myeloid Cells," J. Biol. Chem. 275: 20480-7)에 의해, 플루오레세인화 IgG 옵소닌화 양 적혈구(SRBC)를 탐식하는 THP-1 세포의 능력을 측정함으로써 분석할 수 있다. 예를 들면, 식작용을 측정하기 위한 전형적인 분석은, THP-1 세포를 본 발명의 항체로 또는 FcγRII에 결합하지 않는 대조 항체로 처리하는 스텝, 상기 세포의 활성 레벨을 비교하는 스텝으로 구성된다. 그 때, 세포의 활성(예를 들면, 로제트 형성 활성(IgG 피복 SRBC와 결합하는 THP-1 세포의 수), 부착 활성(THP-1 세포에 결합한 SRBC의 총수), 및 식작용율)의 차이가 본 발명의 항체에 의한 FcγRIIA 의존성 활성의 조절을 나타낼 수 있다. 이 분석을 사용하여, 예를 들면, FcγRIIB 수용체의 리간드 결합을 블록하고, 또는 식작용의 FcγRIIB 개재 저해에 길항하는 항체를 동정할 수 있다. 이 분석은 FcγRIIA 시그널 전달의 FcγRIIB 개재 저해를 증강하는 항체를 동정할 수도 있다.

[0180] 바람직한 구체예에서, 결합 도메인은, 인간 단구/마크로파지에서의 FcγRIIB 의존성 활성을 이하의 적어도 1 이상의 방법으로 조절한다. 즉, 하류 시그널 전달분자의 조절(예를 들면, FcγRIIB의 인산화 상태의 조절, SHIP 인산화의 조절, SHIP와 Shc의 결합의 조절, Akt의 인산화의 조절, 약 120kDa 및 60~65kDa의 더한층의 단백질의 인산화의 조절) 및 식작용의 조절이다.

[0181] **5.1.2 CD16A 결합 도메인**

[0182] 이하의 섹션에서는, CD16A 결합 단백질에 대하여 논한다. 이 단백질은, 공유결합형 디아바디의 제작을 위한 경쇄 및 중쇄의 가변 영역의 소스로서 사용할 수 있다. 본 발명에서는, CD16A 결합 단백질은 항 CD16A 항체의 VL 및 VH 도메인으로 이루어지는 분자를 포함한다. 이 VL 및 VH 도메인을 본 발명의 디아바디의 제작에 사용한다.

[0183] 여러 CD16A 결합 단백질을 본 발명에 관련하여 사용할 수 있다. 적당한 CD16A 결합 단백질은, 인간 또는 인간화 단일 클론 항체, 및 CD16A 결합 항체 단편(예를 들면, scFv 또는 1쇄 항체, Fab 단편, 미니바디), 및 경쇄 가변 영역 도메인, 중쇄 가변 영역 도메인, 또는 그 양쪽과의 상호작용을 통하여 CD16A에 결합하는 다른 항체 유사 단백질을 포함한다.

[0184] 몇개의 구체예에서, 본 발명에 따라 사용하기 위한 CD16A 결합 단백질은 비인간 항 CD16A 항체(예를 들면, 마우스 항 CD16A 항체)에 유래하는 서열을 갖는 1 이상의 CDR과, 1 이상의 인간 면역 글로불린의 프레임워크 서열에 유래하는 1 이상의 프레임워크 영역을 갖는 VL 및/또는 VH 도메인을 포함한다. CDR 및 다른 서열을 얻을 수 있는 다수의 비인간 항 CD16A 단일 클론 항체가 알려져 있다(예를 들면, Tamm et al.(1996) "The Binding Epitopes Of Human CDl 6(Fc gamma RIII) Monoclonal Antibodies. Implications For Ligand Binding," J. Imm. 157:1576-81; Fleit et al.(1989) p.159; LEUKOCYTE TYPING II: HUMAN MYELOID AND HEMATOPOIETIC CELLS, Reinherz et al, eds. New York: Springer-Verlag; (1986); LEUCOCYTE TYPING III: WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS McMichael A J, ed., Oxford: Oxford University Press, 1986); LEUKOCYTE TYPING IV: WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS, Kapp et al., eds. Oxford Univ. Press, Oxford; LEUKOCYTE TYPING V: WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS, Schlossman et al., eds. Oxford Univ. Press, Oxford; LEUKOCYTE TYPING VI: WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS, Kishimoto, ed. Taylor & Francis를 참조하기 바람). 또한, 실시예에서 설명하는 바와 같이, 세포상에 제시되는 인간 CD16A를 인식하는 새로운 CD16A 결합 단백질은 단일 클론 항체 또는 관련되는 결합 단백질의 제작 및 선택을 위한 주지의 방법(예를 들면, 하이브리도마 기술, 파지 디스플레이법 등)을 사용하여 얻을 수 있다. 예를 들면, O'Connell et al.(2002) "Phage Versus Phagemid Libraries For Generation Of Human Monoclonal Antibodies," J. MoI. Biol. 321 :49-56; Hoogenboom et al.(2000) "Natural And Designer Binding Sites Made By Phage Display Technology," Imm. Today 21 :371078; Rrebs et al.(2001) "High-Throughput Generation And Engineering Of Recombinant Human Antibodies," J. Imm. Methods 254:67-84; 및 본 명세서에서 인용한 다른 문헌을 참조. 인간 이외의 종 유래의 단일 클론 항체를, 당해 분야에서 알려져 있는 항체의 인간화 기술을 사용하여 키메라화 또는 인간화할 수 있다.

[0185] 또는, CD16A에 대한 완전한 인간 항체는, 인간 면역계의 성분을 갖는 트랜스제닉 동물을 사용하여(예를 들면, 미국특허 제5,569,825호 및 제5,545,806호), 인간 말초혈 세포를 사용하여(Casali et al.(1986) "Human Monoclonals From Antigen-Specific Selection Of B Lymphocytes And Transformation By EBV," Science 234:476-479), 인간 B세포 유래의 DNA 라이브러리를 Huse et al.(1989) "Generation Of A Large Combinatorial Library Of The Immunoglobulin Repertoire In Phage Lambda," Science 246:1275-1281에서 개략적으로 설명된 통상의 프로토콜을 따라 스크리닝함으로써, 및 다른 방법에 의해 제작할 수 있다.

[0186] 바람직한 구체예에서, 결합 도너(donor)는, 예를 들면, 미국특허출원 제2004/0010124호(참조로서 그 모두를 본 명세서에 포함함)에 개시되어 있는 바와 같은, 3G8 항체 또는 그 인간화형 유래인 것이 구체예로서 바람직하다. 몇개의 목적으로는, 3G8이 결합하는 에피토프와 동일한 에피토프에서, 또는 3G8에 의한 결합을 블록하기 위하여 당해 에피토프에 적어도 충분히 근접하는 에피토프에서, CD16A 수용체에 결합하는 CD16A 결합 단백질을 사용하는 것이 유리하다고 생각된다. 원하는 결합특성을 갖는 결합 단백질을 동정하기 위한 에피토프 매핑법 및 경쟁적 결합 실험은 실험 면역학의 당업자에게는 주지이다. 예를 들면, 상기에서 인용한 Harlow와 Lane의 논문; Stahli et al.(1983) "Distinction Of Epitopes By Monoclonal Antibodies," Methods in Enzymology 92:242-253; Kirkland et al.(1986) "Analysis Of The Fine Specificity And Cross-Reactivity Of Monoclonal Anti-Lipid A Antibodies," J. Immunol. 137:3614-3619; Morel et al.(1988) "Monoclonal Antibodies To Bovine Serum Albumin: Affinity And Specificity Determinations," Molec. Immunol. 25:7-15; Cheung et al.(1990) "Epitope-Specific Antibody Response To The Surface Antigen Of Duck Hepatitis B Virus In Infected Ducks," Virology 176:546-552; and Moldenhauer et al.(1990) "Identity Of HML-I Antigen On Intestinal Intraepithelial T Cells And Of B-ly7 Antigen On Hairy Cell Leukaemia," Scand. J. Immunol. 32:77-82를 참조. 예를 들면, 2개의 항체가 동일부위에 결합하는지 아닌지는 일방의 항체를 사용하여 ELISA 플레이트상에서 항원을 포착하고, 그 후 포착된 항원에 결합하는 제 2 항체의 능력을 측정함으로써, 확인하는 것이 가능하다. 또, 에피토프의 비교는 제 1 항체를 직접적으로 또는 간접적으로 효소, 방사성핵종 또는 형광단으로 표지하고, 세포상의, 용액 중의 또는 고상상의 항원으로의 제 1 항체의 결합을 저해하는 미표지의 제 2 항체의 능력을 측정함으로써 달성할 수도 있다.

[0187] CD16A 수용체와 ELISA 플레이트상에 형성된 면역 복합체와의 결합을 블록하는 항체의 능력을 측정하는 것도 가능하다. 상기 면역 복합체는, 우선 플루오레세인 등의 항원으로 플레이트를 피복하고, 다음에 특이적인 항 플루오레세인 항체를 플레이트에 도포함으로써 형성된다. 이 면역 복합체는, 그 후, sFcRIIIa와 같은 가용성 Fc 수용체의 리간드로서 기능한다. 또는, 가용성의 면역 복합체를 형성시켜, 효소, 방사성핵종 또는 형광단으로 직접적으로 또는 간접적으로 표지해도 된다. 그 후, 이들 표지된 면역 복합체와, 세포상의, 용액 중의 또는 고상상

의 Fc 수용체와의 결합을 저해하는 항체의 능력을 측정할 수 있다.

[0188] 본 발명의 CD16A 결합 단백질은 인간 면역 글로불린 Fc 영역을 포함하고 있어도 되고, 포함하지 않아도 된다. Fc 영역은, 예를 들면, scFv 결합 단백질 중에는 존재하지 않는다. Fc 영역은, 예를 들면, 인간 또는 인간화 4량체 단일 클론 IgG 항체에는 존재한다. 상기한 바와 같이, 본 발명의 몇개의 구체예에서는, CD16A 결합 단백질은 이펙터 기능이 개변되어 있는 Fc 영역을 포함한다. 개변된 이펙터 기능으로서, 예를 들면, 미개변 Fc 영역(예를 들면, 천연의 IgG1 단백질의 Fc 등)과 비교한 경우의 Fc 수용체 또는 보체의 C1 성분과 같은 이펙터 리간드에 대한 친화성의 저하를 들 수 있다. 제 1의 구체예에서, Fc 영역은 297 자리에 상당하는 Fc 영역의 아미노산이 글리코실화되어 있지 않다. 이러한 항체는 Fc 이펙터 기능이 결여되어 있다.

[0189] 따라서, CD16A 결합 단백질은, 결합 단백질 중에 Fc 도메인이 결여되므로, Fc 수용체 또는 보체의 C1 성분과 같은 이펙터 리간드로의 Fc 개재 결합을 나타내지 않는 경우가 있지만, 다른 케이스에서는, 결합이나 이펙터 기능의 결여는 항체의 정상영역의 변화에 기인하고 있다.

[0190] **5.1.2.1 mAb 3G8 CDR 서열에 유사한 CDR 서열을 포함하는 CD16A 결합 단백질**

[0191] 본 발명의 실시시에 사용할 수 있는 CD16A 결합 단백질은 마우스 단일 클론 항체 3G8의 CDR에 유래하는(즉 동일 또는 유사의 서열을 가지고 있음) CDR 서열을 포함하는 단백질을 포함한다. 마우스 3G8 단일 클론 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 코딩하는 상보적 cDNA(CDR을 코딩하는 서열을 포함함)를, 기재한 바와 같이 클론화하여 서열 결정했다. 3G8의 핵산 서열 및 단백질 서열을 이하에 나타낸다. 마우스 가변 영역 및 CDR 서열을 사용하여, 3G8의 CDR에 유래하는 상보성 결정 영역을 포함하는 수많은 키메라 및 인간화 단일 클론 항체를 제작하고, 그것들의 특성을 해석했다. CD16A에 고친화성으로 결합하고, 또 다른 원하는 성질을 갖는 인간화 항체를 동정하기 위하여, 3G8 유래의 CDR을 갖는 VH 영역을 포함하는 항체 중쇄를 제작하고, 3G8 유래의 CDR을 갖는 VL 영역을 포함하는 항체 경쇄와(공발현에 의해) 결합시켜, 해석용의 4량체 항체를 제작했다. 얻어진 4량체 항체의 성질을 이하에 기재한 바와 같이 측정했다. 이하에서 설명한 바와 같이, 3G8의 CDR을 포함하는 CD16A 결합 단백질, 예를 들면, 본 명세서에 기재한 인간화 항체 단백질을 본 발명에 따라서 사용할 수 있다.

[0192] **5.1.2.1.1. VH 영역**

[0193] 1구체예에 있어서, 본 발명의 CD16A 결합 단백질은, 적어도 1개의 CDR(통상은 3개의 CDR)이 마우스 단일 클론 항체 3G8 중쇄의 1개의 CDR(일반적으로는 3개 모든 CDR)의 서열을 갖고, 이 결합 단백질의 나머지의 부분이 실질적으로 인간의 서열을 갖는(인간 항체의 중쇄 가변 영역에 유래하고, 실질적으로 그것에 유사한), 중쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0194] 1구체예에 있어서, 본 발명은, 실질적으로 인간의 프레임워크 중에 3G8 항체 유래의 CDR을 포함하는 인간화 3G8 항체 또는 항체 단편이며, 중쇄 가변 도메인의 적어도 1개의 CDR이 대응하는 마우스 항체 3G8 중쇄 CDR과 서열의 점에서 상이한, 상기 항체를 제공한다. 예를 들면, 1의 구체예에서, CDR은 당해 분야에서 공지의 또는 **표 3** 및 **표 4~11**에서 개시한 것과 같은, CD16A로의 3G8의 결합에 영향을 주는 것이 당해 분야에서 알려져 있는 1 이상의 CDR 치환을 적어도 가짐으로써, 3G8의 CDR서열과는 상이하다. 적당한 CD16 결합 단백질은 이들 치환을 0, 1개, 2개, 3개 또는 4개, 또는 그것 이상 포함하며(대부분의 경우, 1~4개의 치환을 가짐), 임의로, 추가의 치환도 가질 수 있다.

표 3

[0195] V_H 도메인의 치환

번호	카밧 위치	부위	치환
1	2	FR1	He
2	5	FR1	Lys
3	10	FR1	Thr
4	30	FR1	Arg
5	34	CDR1	Val
6	50	CDR2	Leu
7	52	CDR2	Phe 또는 Tyr 또는 Asp
8	54	CDR2	Asn

9	60	CDR2	Ser
10	62	CDR2	Ser
11	70	FR3	Thr
12	94	FR3	Gln 또는 Lys 또는 Ala 또는 His
13	99	CDR3	Tyr
14	101	CDR3	Asp

표 4

[0196] 3G8 V_H 유래의 V_H 서열*

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
3G8VH	A	A	A	A	A	A	A
Ch3G8VH	A	A	A	A	A	A	B
HxC	B	A	B	A	A	A	B
CxH	A	A	A	A	B	A	B
Hu3G8VH-1	B	A	B	A	B	A	B
Hu3G8VH-2	C	A	B	A	B	A	B
Hu3G8VH-3	D	A	B	A	B	A	B
Hu3G8VH-4	B	A	B	A	C	B	B
Hu3G8VH-5	B	A	B	A	C	A	B
Hu3G8VH-6	B	B	B	A	B	B	B
Hu3G8VH-7	B	B	B	A	B	A	B
Hu3G8VH-S	B	A	B	A	B	C	B
Hu3G8VH-9	B	A	B	B	B	B	B
Hu3G8VH-10	B	A	B	A	B	B	B
Hu3G8VH-11	B	A	B	B	B	A	B
Hu3G8VH-12	B	A	B	C	B	A	B
Hu3G8VH-13	B	A	B	D	B	A	B
Hu3G8VH-14	B	A	B	E	B	A	B
Hu3G8VH-15	B	A	B	A	D	A	B
Hu3G8VH-16	B	A	B	A	E	A	B
Hu3G8VH-17	B	A	B	A	F	A	B
Hu3G8VH-1S	B	A	B	A	G	A	B
Hu3G8VH-19	B	A	B	A	C	C	B
Hu3G8VH-20	B	B	B	C	B	A	B
Hu3G8VH-21	B	A	B	A	D	B	B
Hu3G8VH-22	B	B	B	C	B	C	B
Hu3G8VH-23	B	B	B	C	E	C	B
Hu3G8VH-24	B	B	B	C	F	C	B
Hu3G8VH-25	B	B	B	C	G	C	B
Hu3G8VH-26	B	B	B	C	C	C	B
Hu3G8VH-27	B	B	B	C	E	D	B
Hu3G8VH-28	B	B	B	C	F	D	B
Hu3G8VH-29	B	B	B	C	G	D	B
Hu3G8VH-30	B	B	B	C	C	D	B
Hu3G8VH-31	E	B	B	C	B	A	B
Hu3G8VH-32	E	B	B	H	B	A	B

Hu3G8VH-33	E	B	B	H	B	A	B
Hu3G8VH-34	E	B	B	C	B	C	B
Hu3G8VH-35	E	B	B	C	C	C	B
Hu3G8VH-36	E	B	B	H	C	D	B
Hu3G8VH-37	E	B	B	H	E	C	B
Hu3G8VH-38	E	B	B	F	B	A	B
Hu3G8VH-39	E	B	B	I	B	A	B
Hu3G8VH-40	E	B	B	G	B	A	B
Hu3G8VH-41	E	B	B	J	B	A	B
Hu3G8VH-42	E	B	B	C	H	A	B
Hu3G8VH-43	E	B	B	C	H	C	B
Hu3G8VH-44	E	B	B	C	I	D	B
Hu3G8VH-45	E	B	B	C	J	D	B

[0197] * 표시는 **표 5-11**에 있는 서열을 나타낸다.

표 5

[0198] FR1

A	B	C	D	E	잔기
Q	Q	Q	Q	Q	1
V	V	V	V	I	2
T	T	T	T	T	3
L	L	L	L	L	4
K	R	K	R	K	5
E	E	E	E	E	6
S	S	S	S	S	7
G	G	G	G	G	8
P	P	P	P	P	9
G	A	A	A	T	10
I	L	L	L	L	11
L	V	V	V	V	12
Q	K	K	K	K	13
P	P	P	P	P	14
S	T	T	T	T	15
Q	Q	Q	Q	Q	16
T	T	T	T	T	17
L	L	L	L	L	18
S	T	T	T	T	19
L	L	L	L	L	20
T	T	T	T	T	21
C	C	C	C	C	22
S	T	T	T	T	23
F	F	F	F	F	24
S	S	S	S	S	25
G	G	G	G	G	26
F	F	F	F	F	27
S	S	S	S	S	28
L	L	L	L	L	29
R	S	S	R	S	30
103	**104**	**105**	**106**	**107**	**서열번호**

서열번호	서열
103	QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLR
104	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLS
105	QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLS
106	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLR
107	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLS

[0199]

표 6

[0200]

CDR1

A	B	잔기
T	T	31
S	S	32
G	G	33
M	V	34
G	G	35
V	V	35A
G	G	35B
108	109	서열번호

서열번호	서열
108	TSGMGVG
109	TSGVGVG

[0201]

표 7

[0202]

FR2

A	B	잔기
W	W	36
I	I	37
R	R	38
Q	Q	39
P	P	40
S	P	41
G	G	42
K	K	43
G	A	44
L	L	45
E	E	46
W	W	47
L	L	48
A	A	49
110	111	서열번호

서열번호	서열
110	WIRQPSGKGLEWLA
111	WIRQPPGKALEWLA

[0203]

표 8

[0204] CDR2

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	잔기
H	H	H	H	H	L	H	L	H	L	50
I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	51
W	Y	W	Y	W	D	F	W	D	W	52
W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	53
D	N	D	D	N	D	D	D	D	N	54
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	55
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	56
K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	57
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	58
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	59
N	N	S	N	N	S	S	S	S	S	60
P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	61
A	A	S	A	A	S	S	S	S	S	62
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	63
K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	64
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	65
112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	서열번호

서열번호	서열
112	HIWWDDDKRYNPALKS
113	HIYWNDDKRYNPALKS
114	HIWWDDDKRYSPSLKS
115	HIYWDDDKRYNPALKS
116	HIWWNDDKRYNPALKS
117	LIDWDDDKRYSPSLKS
118	HIFWDDDKRYSPSLKS
119	LIWWDDDKRYSPSLKS
120	HIDWDDDKRYSPSLKS
121	LIWWNDDKRYSPSLKS

[0205]

표 9

[0206] FR3

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	잔기
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	66
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	67
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	68
I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	69
S	S	S	S	S	S	S	T	T	T	70
K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	71
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	72
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	73
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	74
S	K	K	K	K	K	K	K	K	K	75
N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	76
Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	77
V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	78
F	V	V	V	V	V	V	V	V	V	79
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	80
K	T	T	T	T	T	T	T	T	T	81
I	M	M	M	M	M	M	M	M	M	82
A	T	T	T	T	T	T	T	T	T	82A

S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	82B
V	M	M	M	M	M	M	M	M	M	82C
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	83
T	P	P	P	P	P	P	P	P	P	84
A	V	V	V	V	V	V	V	V	V	85
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	86
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	87
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	88
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	89
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	90
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	91
C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	92
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	93
Q	R	Q	T	K	A	H	R	H	Q	94
122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	82 서열번호
132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	82A 서열번호
142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	82B 서열번호
152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	82C 서열번호

서열번호	서열
122	RLTISKDTSSNQVFLKIDTADTATYYCAQ
123	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAR
124	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAQ
125	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAT
126	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAK
127	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAA
128	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAH
129	RLTITKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAR
130	RLTITKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAH
131	RLTITKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAQ
132	RLTISKDTSSNQVFLKADTADTATYYCAQ
133	RLTISKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAR
134	RLTISKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAQ
135	RLTISKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAT
136	RLTISKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAK
137	RLTISKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAA
138	RLTISKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAH
139	RLTITKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAR
140	RLTITKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAH
141	RLTITKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAQ
142	RLTISKDTSSNQVFLKSDTADTATYYCAQ
143	RLTISKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAR
144	RLTISKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAQ
145	RLTISKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAT
146	RLTISKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAK
147	RLTISKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAA
148	RLTISKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAH
149	RLTITKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAR
150	RLTITKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAH
151	RLTITKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAQ
152	RLTISKDTSSNQVFLKVDTADTATYYCAQ
153	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAR
154	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAQ
155	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAT
156	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAK
157	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAA
158	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAH
159	RLTITKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAR
160	RLTITKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAH
161	RLTITKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAQ

[0207]

표 10

[0208] CDR3

A	B	C	D	잔기
I	I	I	I	95
N	N	N	N	96
P	P	P	P	97
A	A	A	A	98
W	W	Y	Y	99
F	F	F	F	100
A	D	A	D	101
Y	Y	Y	Y	102
162	163	164	165	서열번호

서열번호	서열
162	INPAWFAY
163	INPAWFDY
164	INPAYFAY
165	INPAYFDY

[0209]

표 11

[0210] FR4

A	B	잔기
W	W	103
G	G	104
Q	Q	105
G	G	106
T	T	107
L	L	108
V	V	109
T	T	110
V	V	111
S	S	112
A	S	113
166	**167**	**서열번호**

서열목록	서열
166	WGQGTLVTVSA
167	WGQGTLVTVSS

[0211]

[0212] 1구체예에서, CD16A 결합 단백질은 Hu3G8VH-1 컨스트럭트(**서열번호 68**에 나타냄)의 VH 도메인과 동일한 또는 유사한 중쇄 가변 도메인의 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명은, (1) **표 1**에 기재한 0, 1 또는 그 이상의 CDR 치환에 의해 Hu3G8VH-1(**서열번호 68**)의 VH 도메인과는 다르고, (2) **표 1**에 기재한 0, 1 또는 그 이상의 프레임워크 치환에 의해 Hu3G8VH-1의 VH 도메인과는 다르고, (3) 나머지의 위치에서 Hu3G8VH-1의 VH 서열과 적어도 약 80% 동일이다, 많은 경우 적어도 약 90%, 때로는 적어도 약 95% 동일이다, 또는 적어도 약 98% 동일한, 서열을 갖는 VH 도메인을 포함하는 CD16A 결합 단백질을 제공한다.

[0213] 본 발명의 CD16A 결합 단백질의 전형적인 VH 도메인은 3G8VH, Hu3G8VH-5 및 Hu3G8VH-22의 서열(각각, **서열번호 79, 서열번호 69 및 서열번호 70**)을 갖는다. 3G8VH 및 Hu3G8VH-5의 서열(각각, **서열번호 79 및 서열번호 69**)을 코딩하는 전형적인 뉴클레오티드 서열을 각각 **서열번호 80** 및 **서열번호 81**에 나타낸다.

[0214] VH 도메인은, **표 3**에서 나타낸 치환의 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개 또는 적어도 6개에 의해 Hu3G8VH-1(**서열번호 68**)의 서열과 상이한 서열을 가질 수 있다. 이들 치환은 CD16A에 대한 친화성의 증가를 초래하고, 및/또는 인간에게 투여한 경우에 CD16A 결합 단백질의 면역원성을 줄인다고 생각되고 있다. 몇개의 구체예에서, 나머지 위치의 Hu3G8VH-1의 VH 도메인과의 서열 동일성의 정도는 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%이다.

[0215] 한정이 아니고 예시로서, 다수의 CD16A 결합 단백질의 VH 도메인의 서열을 **표 4-11**에 나타낸다. 인간 Cγ1 정상 영역과 융합시킨, 이들 서열을 포함하는 중쇄를, hu3G8VL-1 경쇄(이하에 기재)와 함께 공발현시켜, 4량체의 항체를 형성시켰다. 또, CD16A에 대한 이 항체의 결합성을 측정하여, 아미노산 치환의 효과를 hu3G8VH-1의 VH 도메인과 비교하여 평가했다. VH 도메인이 hu3G8VH-1, 2, 3, 4, 5, 8, 12, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 42, 43, 44 및 45의 서열을 갖는 컨스트럭트는 고친화 결합성을 나타내고, hu3G8VH-6 및 -40의 VH 도메인은 중간의 결합성을 나타냈다. hu3G8VH-5 및 hu3G8VH-22(각각, **서열번호 69 및 서열번호 70**)의 VH 도메인을 포함하는 CD16A 결합 단백질은 특히 바람직한 결합성질을 갖는다고 생각된다.

[0216] **5.1.2.2. VL 영역**

[0217] 바람직한 결합특성을 갖는 경쇄 가변 도메인 서열을 동정하기 위하여 동일한 연구를 행했다. 1의 구체예에서, 본 발명은 이하와 같은 경쇄 가변 도메인을 포함하는 CD16A 결합 단백질을 제공한다. 이 도메인에서는, 적어도 1개의 CDR(통상은 3개의 CDR)이 마우스 단일 클론 항체 3G8 경쇄의 1개의 CDR(통상은 3개 모든 CDR)의 서열을 갖고, 이 결합 단백질의 나머지 부분은 실질적으로 인간의 서열을 갖는다(인간 항체의 경쇄 가변 영역에 유래하고, 실질적으로 그것과 유사함).

[0218] 1구체예에서, 본 발명은, 실질적으로 인간의 프레임워크 중에 3G8 항체 유래의 CDR을 포함하는 인간화 3G8 항체의 단편으로서, 경쇄 가변 도메인의 적어도 1개의 CDR이 마우스 단일 클론 항체 3G8의 경쇄 CDR과 서열에 있어서 상이한, 상기 항체 단편를 제공한다. 1구체예에서, CDR은 1 이상의 아미노산 치환, 예를 들면, **표 2**에서 나타낸 1 이상의 치환(예를 들면, CDR1의 24위치의 아르기닌; CDR1의 25위치의 세린; CDR1의 32위치의 티로신; CDR1의 33위치의 류신; CDR2의 50위치의 아스파르트산, 트립토판 또는 세린; CDR2의 53위치의 세린; CDR2의 55위치의 알라닌 또는 글루타민; CDR2의 56위치의 트레오닌; CDR3의 93위치에 있어서의 세린; 및/또는 CDR3의 94위치의 트레오닌)을 CDR 속에 적어도 가짐으로써 3G8 서열과는 상이했다. 여러 구체예에서, 가변 도메인은, 이러한 치환을 0, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 그것 이상 갖고(대부분의 경우, 1~4개의 상기 치환), 임의로 추가의 치환도 가질 수 있다.

[0219] 구체예의 하나에 있어서, 적당한 CD16A 결합 단백질은 Hu3G8VL-1(**서열번호** 71) 컨스트럭트의 VL 도메인과 동일한 또는 유사한 경쇄 가변 도메인 서열을 포함할 수 있다. 이 서열을 **표 13-20**에 나타낸다. 예를 들면, 본 발명은, (1) 표 5에 기재한 0, 1 또는 그 이상의 CDR 치환에 의해 Hu3G8VL-1(**서열번호 71**)의 VL 도메인과는 다르고, (2) **표 12**에 기재한 0, 1 또는 그 이상의 프레임워크 치환에 의해 Hu3G8VL-1의 VL 도메인과는 다르고, (3) 나머지 위치에서 Hu3G8VL-1의 VL 서열(**서열번호 71**)과 적어도 약 80% 동일이다, 대부분의 경우 적어도 약 90%, 때로는 적어도 약 95% 동일하거나, 또는 적어도 약 98% 동일한, 서열을 갖는 VL 도메인을 포함하는 CD16A 결합 단백질을 제공한다.

표 12

[0220] 3G8 V_L 도메인의 치환

번호	카밧 위치	부위	치환
1	24	CDR1	Arg
2	25	CDR1	Ser
3	32	CDR1	Tyr
4	33	CDR1	Leu
5	50	CDR2	Asp 또는 Trp 또는 Ser
6	51	CDR2	Ala
7	53	CDR2	Ser
8	55	CDR2	Ala 또는 Gln
9	56	CDR2	Thr
10	93	CDR3	Ser
11	94	CDR3	Thr

표 13

[0221] 3G8 V_L 유래의 V_L 서열

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
3G8VL	A	A	A	A	A	A	A
Ch3G8VL	A	A	A	A	A	A	A
Hu3G8VL-1	B	A	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-2	B	B	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-3	B	C	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-4	B	D	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-5	B	E	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-6	B	F	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-7	B	G	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-8	B	A	A	B	B	A	B

Hu3G8VL-9	B	A	A	C	B	A	B
Hu3G8VL-10	B	A	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-11	B	A	A	E	B	A	B
Hu3G8VL-12	B	A	A	F	B	A	B
Hu3G8VL-13	B	A	A	G	B	A	B
Hu3G8VL-14	B	A	A	A	B	B	B
Hu3G8VL-15	B	A	A	A	B	C	B
Hu3G8VL-16	B	A	A	A	B	D	B
Hu3G8VL-17	B	A	A	A	B	E	B
Hu3G8VL-18	B	B	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-19	B	B	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-20	B	B	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-21	B	C	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-22	B	C	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-23	B	C	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-24	B	D	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-25	B	D	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-26	B	D	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-27	B	E	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-28	B	E	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-29	B	E	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-30	B	A	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-31	B	A	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-32	B	A	A	H	B	A	B
Hu3G8VL-33	B	A	A	I	B	A	B
Hu3G8VL-34	B	A	A	J	B	A	B
Hu3G8VL-35	B	B	A	H	B	D	B
Hu3G8VL-36	B	C	A	H	B	D	B
Hu3G8VL-37	B	E	A	H	B	D	B
Hu3G8VL-38	B	B	A	I	B	D	B
Hu3G8VL-39	B	C	A	I	B	D	B
Hu3G8VL-40	B	E	A	I	B	D	B
Hu3G8VL-41	B	B	A	J	B	D	B
Hu3G8VL-42	B	C	A	J	B	D	B
Hu3G8VL-43	B	E	A	J	B	D	B
Hu3G8VL-44	B	A	A	K	B	A	B

[0222] * 표시는, **표 14-20**의 서열을 나타낸다.

표 14

[0223] FR1

A	B	잔기
D	D	1
T	I	2
V	V	3
L	M	4
T	T	5
Q	Q	6
S	S	7
P	P	8
A	D	9
S	S	10
L	L	11
A	A	12
V	V	13
S	S	14

L	L	15
G	G	16
Q	E	17
R	R	18
A	A	19
T	T	20
I	I	21
S	N	22
C	C	23
168	169	서열번호

[0224]

서열번호	서열
168	DTVLTQSPASLAVSL
169	DIVMTQSPDSLAVSL

표 15

[0225]

CDR1

A	B	C	D	E	F	G	잔기
K	R	K	K	K	K	K	24
A	A	S	A	A	A	A	25
S	S	S	S	S	S	S	26
Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	27
S	S	S	S	S	S	S	27A
V	V	V	V	V	V	V	27B
D	D	D	D	D	D	D	27C
F	F	F	F	F	F	F	27D
D	D	D	D	D	D	D	28
G	G	G	G	G	G	G	29
D	D	D	D	D	D	D	30
S	S	S	S	S	S	S	31
F	F	F	Y	F	F	Y	32
M	M	M	M	L	M	L	33
N	N	N	N	N	A	A	34
170	171	172	173	174	175	176	27 서열번호
177	178	179	180	181	182	183	27A 서열번호
184	185	186	187	188	189	190	27B 서열번호
191	192	193	194	195	196	197	27C 서열번호
198	199	200	201	202	203	204	27D 서열번호

서열번호	서열
170	KASQDGDSFMN
171	RASQDGDSFMN
172	KSSQDGDSFMN
173	KASQDGDSYMN
174	KASQDGDSFLN
175	KASQDGDSFMA
176	KASQDGDSYLA
177	KASSDGDSFMN
178	RASSDGDSFMN
179	KSSSDGDSFMN
180	KASSDGDSYMN
181	KASSDGDSFLN
182	KASSDGDSFMA
183	KASSDGDSYLA
184	KASVDGDSFMN
185	RASVDGDSFMN
186	KSSVDGDSFMN
187	KASVDGDSYMN
188	KASVDGDSFLN
189	KASVDGDSFMA
190	KASVDGDSYLA
191	KASDDGDSFMN
192	RASDDGDSFMN
193	KSSDDGDSFMN
194	KASDDGDSYMN
195	KASDDGDSFLN
196	KASDDGDSFMA
197	KASDDGDSYLA
198	KASFDGDSFMN
199	RASFDGDSFMN
200	KSSFDGDSFMN
201	KASFDGDSYMN
202	KASFDGDSFLN
203	KASFDGDSFMA
204	KASFDGDSYLA

[0226]

표 16

[0227] FR2

A	잔기
W	35
Y	36
Q	37
Q	38
K	39
P	40
G	41
Q	42
P	43
P	44
K	45
L	46

L	47
I	48
Y	49
205	서열번호

서열목록	서열
205	WYQQKAPGQPPKLLIY

[0228]

표 17

[0229]

CDR2

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	잔기
T	D	W	T	D	D	S	S	S	T	T	50
T	A	A	T	A	A	A	T	T	T	T	51
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	52
N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	53
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	54
E	E	E	E	E	A	Q	E	Q	Q	Q	55
S	S	S	T	T	T	S	S	S	S	S	56
206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	서열번호

서열번호	서열
206	TTSNLES
207	DASNLES
208	WASNLES
209	TTSNLET
210	DASNLET
211	DASNLAT
212	SASNLQS
213	STSNLES
214	STSNLQS
215	TTSNLQS
216	TTSSLQS

[0230]

표 18

[0231]

FR3

A	B	잔기
G	G	57
I	V	58
P	P	59
A	D	60
R	R	61
F	F	62
S	S	63
A	G	64
S	S	65
G	G	66
S	S	67
G	G	68
T	T	69
D	D	70
F	F	71
T	T	72
L	L	73

N	T	74
I	I	75
H	S	76
P	S	77
V	L	78
E	Q	79
E	A	80
E	E	81
D	D	82
T	V	83
A	A	84
T	V	85
Y	Y	86
Y	Y	87
C	C	88
217	218	서열번호

서열번호	서열
217	GIPARFSASGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYC
218	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC

[0232]

표 19

[0233]

CDR3

A	B	C	D	E	잔기
Q	Q	Q	Q	Q	89
Q	Q	Q	Q	Q	90
S	S	S	S	S	91
N	Y	Y	N	N	92
E	S	E	S	E	93
D	T	D	D	T	94
P	P	P	P	P	95
Y	Y	Y	Y	Y	96
T	T	T	T	T	97
219	220	221	222	223	서열번호

서열번호	서열
219	QQSNEDPYT
220	QQSYSTPYT
221	QQSYEDPYT
222	QQSNSDPYT
223	QQSNETPYT

[0234]

표 20

[0235]

FR4

A	B	잔기
F	F	98
G	G	99
G	Q	100
G	G	101
T	T	102
K	K	103
L	L	104

E	E	105
I	I	106
K	K	107
224	225	서열번호

[0236]

서열번호	서열
224	FGGGTKLEIK
225	FGQGTKLEIK

[0237] 본 발명의 CD16 결합 단백질의 전형적인 VL 도메인은 **표 12-20**에 나타내는 바와 같이, 3G8VL, Hu3G8VL-1 또는 Hu3G8VL-43의 서열(각각, **서열번호 82, 서열번호 71 및 서열번호 72**)을 갖는다. 3G8VL(**서열번호 82**) 및 Hu3G8VL-1(**서열번호 71**)을 코딩하는 전형적인 뉴클레오티드 서열을 각각 **서열번호 83** 및 **서열번호 84**에 나타낸다.

[0238] VL 도메인은, **표 2**에서 나타낸 치환의 0, 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개 또는 적어도 9개에 의해 Hu3G8VL-1의 서열(**서열번호 71**)과는 상이한 서열을 가질 수 있다. 이들 치환은 CD16A에 대한 친화성의 증가를 초래하거나, 및/또는 인간에 투여한 경우에 CD16A 결합 단백질의 면역원성을 줄인다고 생각된다. 몇개의 구체예에서, 나머지 위치의 서열 동일성의 정도는 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%이다.

[0239] 한정이 아니라 예시로서, 다수의 CD16A 결합 단백질의 VL 도메인 서열을 **표** 13-20에 나타낸다. 인간 Cκ 불변 도메인과 융합시킨 이들 서열을 포함하는 경쇄를, Hu3G8VH 중쇄(상기)와 공발현시켜, 4량체의 항체를 형성시켰다. 또, CD16A에 대한 이 항체의 결합성을 측정하여, 아미노산 치환의 효과를 Hu3G8VL-1의 VL 도메인(**서열번호 71**)과 비교하여 평가했다. VL 도메인이 hu3G8VL-1, 2, 3, 4, 5, 10, 16, 18, 19, 21, 22, 24, 27, 28, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 및 42의 서열을 갖는 컨스트럭트는 고친화 결합성을 나타냈다. 또, hu3G8VL-15, 17, 20, 23, 25, 26, 29, 30, 31, 38, 39, 40 및 41은 중간의 결합성을 나타냈다. hu3G8VL-1, hu3G8VL-22 및 hu3G8VL-43(각각, **서열번호 71, 서열번호 73 및 서열번호 72**)의 VL 도메인을 포함하는 CD16A 결합 단백질은 특히 바람직한 결합성질을 갖는다고 생각되고 있다.

[0240] **5.1.2.2.1 VL 및/또는 VH 도메인의 조합**

[0241] 당해 분야에서는 공지이며, 또 본 명세서의 다른 부분에서도 기재한 바와 같이, 면역 글로불린의 경쇄 및 중쇄는, 그들 쇄가 결합하여 디아바디를 생산하는 조건하에서, 재조합 기술에 의해 발현시킬 수 있고, 또 in vitro에서 그렇게 조합시킬 수 있다. 따라서, 본 명세서에서 기재한 3G8 유래의 VL 도메인을 본 명세서에 기재한 3G8 유래의 VH 도메인과 조합하여, CD16A 결합성 디아바디를 제작할 수 있고, 그러한 조합의 모두가 의도되어 있는 것을 알 수 있을 것이다.

[0242] 한정이 아니라 예시로서, 유용한 CD16A 디아바디의 예는 적어도 1개의 VH 도메인과 적어도 1개의 VL 도메인을 포함하는 디아바디이며, 그 VH 도메인이 hu3G8VH-1, hu3G8VH-22 또는 hu3G8VH-5(각각, **서열번호 68, 서열번호 70 및 서열번호 69**)에 유래하고, 또 VL 도메인이 hu3G8VL-1, hu3G8VL-22 또는 hu3G8VL-43(각각, **서열번호 71, 서열번호 73 및 서열번호 41**)에 유래한다. 특히, hu3G8VH-22(**서열번호 22**)와 hu3G8VL-1, hu3G8VL-22 또는 hu3G8VL-43(각각, **서열번호 71, 서열번호 70 및 서열번호 72**), 또는 hu3G8VH-5(**서열번호 69**)와 hu3G8VL-1(**서열번호 71**)을 포함하는 인간화 항체는, 바람직한 성질을 갖는다.

[0243] 본 명세서에 기재한 VL 및 VH 도메인의 서열을, 당해 분야에서 공지인 방법, 예를 들면, 친화성 성숙 등(Schier et al.(1996) "Isolation Of Picomolar Affinity Anti-C-ErbB-2 Single-Chain Fv By Molecular Evolution Of The Complementarity Determining Regions In The Center Of The Antibody Binding Site," J. MoI. Biol. 263:551-567; Daugherty et al.(1998) "Antibody Affinity Maturation Using Bacterial Surface Display," Protein Eng. 11 :825-832; Boder et al.(1997) "Yeast Surface Display For Screening Combinatorial Polypeptide Libraries," Nat. Biotechnol. 15:553-557; Boder et al.(2000) "Directed Evolution Of Antibody Fragments With Monovalent Femtomolar Antigen-Binding Affinity," Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 97:10701-10705; Hudson et al.(2003) "Engineered Antibodies," Nature Medicine 9:129-39를 참조)에 의해, 더욱 개변할 수 있는 것은 당업자라면 충분히 이해할 수 있을 것이다. 예를 들면, CD16A 결합 단백질을, 친화성 성숙 기술을 사용하여 개변하고, CD16A에 대한 친화성이 증가한 및/또는 CD16B에 대한 친화성이 저하된 단백질

을 동정할 수 있다.

[0244] 전형적인 CD16 결합 단백질의 하나는 마우스 3G8 항체이다. 인간화 3G8의 VH 및 VL 도메인을 포함하는 아미노산 서열을 **도 2, 9, 14**에 기재하고, **서열번호 9, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 68, 서열번호 69, 서열번호 70, 서열번호 71 및 서열번호 72**로 나타낸다.

[0245] **5.2. Fc 영역 또는 그 일부를 포함하는 디아바디**

[0246] 본 발명은 Fc 도메인 또는 그 일부(예를 들면, CH2 또는 CH3도메인)를 포함하는 디아바디 분자를 포함한다. 몇 개의 구체예에서, Fc 도메인 또는 그 일부는 IgG2, IgG3 또는 IgG4의 Fc 영역(예를 들면, CH2 또는 CH3)의 1 이상의 불변 도메인을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 Fc 도메인 또는 그 일부를 포함하는 분자를 포함하고, 여기에서, 상기 Fc 도메인 또는 그 일부는, 필적하는 야생형 Fc 도메인 또는 그 일부에 대하여 적어도 1 개의 아미노산 개변(예를 들면, 치환)을 포함하고 있다. 상기 변형 Fc 도메인은 당해 분야에서는 잘 알려져 있고, 상기 변형 Fc 도메인을 포함하는 항체의 표현형(당해분야에서 주지의 결합활성 해석법 또는 이펙터 기능 해석법 중 어느 하나, 예를 들면, ELISA, SPR 해석 또는 ADCC 등으로 분석됨)을 바꾸는데 주로 사용된다. 이러한 변형 Fc 도메인 또는 그 일부는, Fc 도메인(또는 그 일부)을 포함하는 본 발명의 디아바디 분자에 의해 나타내어지는 이펙터 기능(예를 들면, NK 의존적 또는 마크로파지 의존적 분석 등에서 기능적으로 분석됨)을 부여하거나 또는 개변함으로써, 본 발명에서 사용된다. 이펙터 기능을 개변하면 동정된 Fc 도메인 변이체는 국제공개 WO 04/063351호, 미국특허출원 공개 제2005/0037000호 및 동 제2005/0064514호, 2004년 11월 10일에 출원된 미국 가출원 제60/626,510호, 2004년 12월 15일에 출원된 동 제60/636,663호 및 2006년 3월 10일에 출원된 동 제60/781,564호, 및 본 발명자의 동시출원인 2005년 11월 10일에 출원된 미국특허출원 제11/271,140호 및 2005년 12월 15일에 출원된 동 제11/305,787호 중에 개시되어 있다. 이것들은 모두 참조로서 그 모두를 본 명세서 중에 포함한다.

[0247] 다른 구체예에서, 본 발명은, 당해 분야에서 알려지는 모든 Fc 변이체의 사용도 포함한다. 예를 들면, Duncan et al.(1988) "Localization Of The Binding Site For The Human High-Affinity Fc Receptor On IgG," Nature 332:563-564; Lund et al.(1991) "Human Fc Gamma RI And Fc Gamma RII Interact With Distinct But Overlapping Sites On Human IgG," J. Immunol. 147:2657-2662; Lund et al.(1992) "Multiple Binding Sites On The CH2 Domain Of IgG For Mouse Fc Gamma RII," MoI. Immunol. 29:53-59; Alegre et al.(1994) "A Non-Activating "Humanized" Anti-CD3 Monoclonal Antibody Retains Immunosuppressive Properties In Vivo," Transplantation 57:1537-1543; Hutchins et al.(1995) "Improved Biodistribution, Tumor Targeting, And Reduced Immunogenicity In Mice With A Gamma 4 Variant Of Campath-1H " Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 92:11980-11984; Jefferis et al.(1995) "Recognition Sites On Human IgG For Fc Gamma Receptors: The Role Of Glycosylation," Immunol. Lett. 44:111-117; Lund et al.(1995) "Oligosaccharide-Protein Interactions In IgG Can Modulate Recognition By Fc Gamma Receptors," FASEB J. 9:115-119; Jefferis et al.(1996) "Modulation Of Fc(Gamma) R And Human Complement Activation By IgG3-Core Oligosaccharide Interactions," Immunol. Lett. 54:101-104; Lund et al.(1996) "Multiple Interactions Of Igg With Its Core Oligosaccharide Can Modulate Recognition By Complement And Human Fc Gamma Receptor I And Influence The Synthesis Of Its Oligosaccharide Chains," J. Immunol. 157:4963-4969; Armour et al.(1999) "Recombinant Human IgG Molecules Lacking Fcgamma Receptor I Binding And Monocyte Triggering Activities," Eur. J. Immunol. 29:2613-2624; Idusogie et al.(2000) "Mapping Of The C1Q Binding Site On Rituxan, A Chimeric Antibody With A Human IgG1 Fc," J. Immunol. 164:4178-4184; Reddy et al.(2000) "Elimination OfFc Receptor-Dependent Effector Functions OfA Modified IgG4 Monoclonal Antibody To Human CD4," J. Immunol. 164:1925-1933; Xu et al.(2000) "In Vitro Characterization Of Five Humanized OKT3 Effector Function Variant Antibodies," Cell. Immunol. 200:16-26; Idusogie et al.(2001) "Engineered Antibodies With Increased Activity To Recruit Complement," J. Immunol. 166:2571-2575; Shields et al.(2001) "High Resolution Mapping Of The Binding Site On Human IgG1 For Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, And FcRn And Design Of IgG1 Variants With Improved Binding To The Fc gamma R," J. Biol. Chem. 276:6591-6604; Jefferis et al.(2002) "Interaction Sites On Human IgG-Fc For FcgammaR: Current Models," Immunol. Lett. 82:57-65; Presta et al.(2002) "Engineering Therapeutic Antibodies For Improved Function," Biochem. Soc. Trans. 30:487-490; 미국특허 제5,624,821호; 미국특허 제5,885,573호; 미국특허 제6,194,551호; 국제공개 WO 00/42072호; 국제공개 WO 99/58572호(모두 참조로서 그 모두를 본 명세서 중에 포

함함)에서 개시된 Fc 변이체 등을 들 수 있다.

[0248] 몇개의 구체예에서, Fc 영역의 아미노산에 대한 상기 1 이상의 개변은, Fc 영역의, 따라서 본 발명의 디아바디 분자의, 1 이상의 FcγR 수용체에 대한 친화성 및 결합력을 감소한다. 특정 구체예에서, 본 발명은, 변형 Fc 영역 또는 그 일부를 포함하는 디아바디를 포함하고, 여기에서, 상기 변형 Fc 영역은, 야생형 Fc 영역과 비교하여 적어도 1개의 아미노산 개변을 포함하고, 변형 Fc 도메인만이 1개의 FcγR과 결합하고, 이 FcγR이 FcγRIIIA이다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명은, 변형 Fc 영역 또는 그 일부를 포함하는 디아바디를 포함하고, 여기에서, 상기 변형 Fc 영역은, 야생형 Fc 영역과 비교하여 적어도 1개의 아미노산 개변을 포함하고, 변형 Fc 영역만이 1개의 FcγR과 결합하고, 이 FcγR이 FcγRIIA이다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명은, 변형 Fc 영역 또는 그 일부를 포함하는 디아바디를 포함하고, 여기에서, 상기 변형 Fc 영역은, 야생형 Fc 영역과 비교하여 적어도 1개의 아미노산 개변을 포함하고, 변형 Fc 영역만이 1개의 FcγR과 결합하고, 이 FcγR이 FcγRIIB이다. 몇개의 구체예에서, 본 발명은, 변형 Fc 도메인을 포함하는 분자를 포함하고, 여기에서, 상기 변이체는, 당업자에게 공지이며, 또 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 측정했을 때, Fc 도메인을 포함하지 않는 분자 또는 야생형Fc 도메인을 포함하는 분자와 비교하여, ADCC 활성의 증가 및/또는 FcγRIIA(CD32A)에 대한 결합증가를 부여하거나 또는 중개한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 변형 Fc 도메인을 포함하는 분자를 포함하고, 여기에서, 상기 변이체는 당업자에게 공지이고, 또한 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 측정했을 때, Fc 도메인을 포함하지 않는 또는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 분자와 비교하여, ADCC 활성(또는 다른 이펙터 기능)의 저하 및/또는 FcγRIIB(CD32B)로의 결합 증대를 부여하거나, 또는 중개한다.

[0249] 본 발명은 또한 2 이상의 IgG 이소타입에 유래하는 도메인 또는 영역을 포함하는 Fc 도메인의 사용을 포함한다. 당해 분야에서 알려져 있는 바와 같이, Fc 영역의 아미노산 개변은 Fc를 통한 이펙터 기능 및/또는 결합활성에 큰 영향을 끼칠 수 있다. 그러나, 기능 특성의 이러한 개변은, 선택한 IgG 이소타입이라고 하는 배경에서 행하는 경우 더욱 세련되고, 및/또는 조작될 수 있다. 마찬가지로, Fc 이소타입의 천연의 특성은 1 이상의 아미노산 개변에 의해 조작할 수 있다. 복수의 IgG 이소타입(즉, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4)은, 힌지 및/또는 Fc 도메인의 아미노산 서열의 차이 때문에, 상이한 물리학적 및 기능적 성질, 예를 들면, 혈중반감기, 보체결합, FcγR 결합 친화성, 및 이펙터 기능 활성(예를 들면, ADCC, CDC)을 나타낸다. 몇개의 구체예에서, 원하는 특징을 갖는 디아바디를 설계하기 위하여, 아미노산 개변 및 IgG Fc 영역은, 그것들의 각각의 개별의 결합성 및/또는 이펙터 기능 활성에 기초하여 독립적으로 선택된다. 대개의 구체예에서는, 상기 아미노산 개변 및 IgG 힌지/Fc 영역은, IgG1이라고 하는 상황에서 본 명세서에 기재되고 또는 당해 분야에서 공지인 것과 같은 결합성 및/또는 이펙터 기능 활성에 관하여 각각 분석되어 있다. 몇개의 구체예에서, 상기 아미노산 개변 및 IgG 힌지/Fc 영역은, 디아바디 분자 또는 다른 Fc 함유 분자(예를 들면, 면역 글로불린)라고 하는 상황에서 FcγR 결합성 또는 이펙터 기능에 대하여 각각 분석했을 때, 유사의 기능성, 예를 들면, FcγRIIA에 대한 친화성의 증가 등을 나타낸다. 상기 아미노산 개변과 선택한 IgG Fc 영역의 조합은, 그 후, 추가적으로 또는 보다 바람직하게는 상승적으로 작용하여, 야생형 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 디아바디 분자와 비교하여, 본 발명의 디아바디 분자의 상기 기능성을 개변한다. 다른 구체예에서, 상기 아미노산 개변 및 IgG의 Fc 영역은, 본 명세서에 기재한 또는 당해 분야에서 공지의 야생형 Fc 영역을 포함하는 디아바디 분자 또는 다른 Fc 함유 분자(예를 들면, 면역 글로불린)라고 하는 상황에서 FcγR 결합성 및/또는 이펙터 기능에 대하여 별개로 분석했을 때, 상반되는 기능성, 예를 들면, FcγRIIA에 대한 친화성의 각각 증가 및 저하를 내보인다. 상기 「상반되는」 아미노산 개변 및 선택한 IgG 영역의 조합은, Fc 영역을 포함하지 않는 또는 동일 이소타입의 야생형 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 디아바디와 비교하면, 본 발명의 디아바디의 특이적 기능성을 선택적으로 약화시키거나 또는 감소시키도록 작용한다. 또는 또한, 본 발명은 신규한 성질을 나타내는, 당해 분야에서 공지의 아미노산 개변과 선택한 IgG 영역의 조합을 포함하는 변형 Fc 영역을 포함한다. 이러한 성질은 상기 개변 및/또는 영역을 본 명세서에서 기재한 것과 같이 독립적으로 분석한 경우에는 검출 불능이다.

[0250] 복수의 IgG 이소타입, 및 그 도메인의 기능특성은 당해 분야에서는 주지이다. IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 아미노산 서열을 **도 1a~1b**에 나타낸다. 본 발명의 방법에 사용하는 특정 IgG 이소타입에 유래하는 2 이상의 도메인의 선택 및/또는 조합은 FcγR에 대한 친화성을 포함하여, 친이소타입 중 어느 하나의 기지 파라미터를 기초로 할 수 있다(**표 21**; Flesch et al.(2000) "Functions Of The Fc Receptors For Immunoglobulin G," J. Clin. Lab. Anal. 14:141-156; Chappel et al.(1993) "Identification OfA Secondary Fc Gamma RI Binding Site Within A Genetically Engineered Human IgG Antibody," J. Biol. Chem. 33:25124-25131; Chappel et al.(1991) "Identification Of The Fc Gamma Receptor Class I Binding Site In Human IgG Through The Use Of Recombinant IgG1 /IgG2 Hybrid And Point-Mutated Antibodies," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9036-9040; 모두 참조로서 그 모두를 본 명세서 중에 원용함). 예를 들면, FcγRIIB로의 한정된 결합을 나타내거나,

또는 FcγRIIB로의 결합을 나타내지 않는 IgG 이소타입(예를 들면, IgG2 또는 IgG4)에 유래하는 영역 또는 도메인의 사용은 활성화 수용체로의 결합을 최대로 하고, 억제성 수용체로의 결합을 최소한으로 하도록 디아바디를 조작하는 것이 요망되는 경우에, 특히 유용하다. 마찬가지로, C1q 또는 FcγRIIIA와 우선적으로 결합하는 것이 알려진, 예를 들면, IgG3(Bruggemann et al.(1987) "Comparison Of The Effector Functions Of Human Immunoglobulins Using A Matched Set Of Chimeric Antibodies," J. Exp. Med. 166:1351-1361) 등의 IgG 이소타입에 유래하는 Fc 영역 또는 도메인의 사용은, ADCC를 증강하는 것이 당해분야에서 알려진 Fc아미노산 개변과 조합하여, 이펙터 기능 활성(예를 들면, 보체활성화 또는 ADCC)이 최대가 되도록 디아바디 분자를 조작할 수 있다.

표 21

[0251] FcγR에 결합하는 IgG의 일반적인 특징에 관한 것이다(Flesch abd Neppert, 1999, J. Clin. Lab. Anal. 14:141-156)

수용체	IgG에 대한 친화성 추정치(M^{-1})	상대적 친화성
FcγRI	10^8-10^9	IgG3 > IgG1 >> IgG4 결합하지 않음: IgG2
FcγRIIA $R^{131\,A}$	$< 10^7$	IgG3 > IgG1 결합하지 않음: IgG2, IgG4
FcγRIIA $H^{131\,A}$	$< 10^7$	IgG3 > IgG1 > IgG2 결합하지 않음: IgG4
FcγRIIB ^{A}	$< 10^7$	IgG3 > IgG1 > IgG4 결합하지 않음: IgG2
FcγRIII	$< 10^7$	IgG3 = IgG1 결합하지 않음: IgG2, IgG4

[0252] ^{A} IgG 복합체에만 결합

[0253] **5.3. 분자결합체**

[0254] 본 발명의 디아바디 분자를, 이종 폴리펩티드(즉, 관련성이 없는 폴리펩티드, 또는 그 일부, 바람직하게는 그 폴리펩티드의 적어도 10아미노산, 적어도 20아미노산, 적어도 30아미노산, 적어도 40아미노산, 적어도 50아미노산, 적어도 60아미노산, 적어도 70아미노산, 적어도 80아미노산, 적어도 90아미노산 또는 적어도 100아미노산)와, 재조합에 의해 융합시켜, 또는 화학적으로 결합(공유결합, 비공유결합 모두를 포함)시켜, 융합 단백질을 제작할 수 있다. 융합은 반드시 직접적일 필요는 없지만, 링커 서열을 통하여 일어날 수 있다.

[0255] 또한, 본 발명의 디아바디 분자(즉, 폴리펩티드)는 치료약 또는 주어진 생물학적 응답을 개변하는 약제성분과 결합할 수 있다. 직접적인 결합을 대신하는 것으로서, 본 발명의 다가(예를 들면, 4가)의 디아바디 분자상의 복수의 에피토프 결합 부위에 의해, 디아바디의 적어도 1개의 결합영역은 디아바디의 결합에 영향을 주지 않고, 치료약 또는 원하는 약제성분과 결합하도록 디자인할 수 있다.

[0256] 치료약 또는 약제성분은 고전적인 화학치료약인 것에 한정되지 않는다. 예를 들면, 약제성분은 원하는 생물학적 활성을 갖는 단백질 또는 폴리펩티드이어도 된다. 이러한 단백질로서는 이하가 포함된다: 아브린(abrin), 리신 A, 녹농균외독소(즉, PE-40) 또는 디프테리아독소 등의 독소, 리신, 겔로닌 및 포크위드(pokeweed) 항바이러스 단백질, 예를 들면 종양괴사 인자, α-인터페론(IFN-α) 및 β-인터페론(IFN-β)을 포함하지만 이것들에 한정은 되지 않는 인터페론, 신경성장 인자(NGF), 혈소판 유래 증식 인자(PDGF), 조직 플라스미노겐 활성화 인자(TPA), 어팝토시스제(예를 들면, TNF-α, TNF-β, 국제공개 WO 97/33899호에 기재된 AIM I), AIM II(국제공개 WO 97/34911호 참조), Fas리간드, 및 VEGI(국제공개 WO 99/23105호) 등의 단백질, 혈전제 또는 혈관 신생 저해제(예를 들면, 안지오스타틴 또는 엔도스타틴), 또는 예를 들면, 림포카인(예를 들면, 인터류킨1(IL-1), 인터류킨2(IL-2), 인터류킨6(IL-6), 과립구 대식세포 군체 자극 인자(GM-CSF), 및 과립구 군체 자극 인자(G-CSF), 대식세포 군체 자극 인자(M-CSF)), 또는 성장 인자(예를 들면, 성장 호르몬(GH))와 같은 생물학적 응답 개변 물질, 프로테아제, 또는 리보뉴클레아제.

[0257] 본 발명의 디아바디 분자(즉, 폴리펩티드)를, 예를 들면, 정제를 용이하게 하는 펩티드 등의 마커 서열과 융합시킬 수 있다. 바람직한 구체예에서, 마커 아미노산 서열은 헥사히스티딘 펩티드이며, 예를 들면, 시판품 중에서도 특히 pQE 벡터(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311) 중에서 제공되는 태그를 들 수 있다. Gentz 등이 1989, "Bioassay For Trans-Activation Using Purified Human Immunodeficiency Virus TAT-Encoded Protein: Trans-Activation Requires mRNA Synthesis," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:821-824에서 기재하고 있는 바와 같이, 예를 들면, 헥사히스티딘은 융합 단백질의 간편한 정제를 제공한다. 정제에 유용한 다른 펩티드 태그에는, 인플루엔자 헤마글루티닌 단백질의 에피토프에 상당하는 헤마글루티닌 「HA」태그(Wilson et al.(1984) "The Structure Of An Antigenic Determinant In A Protein," Cell, 37:767-778), 및 「Flag」태그((Knappik et al.(1994) "An Improved Affinity Tag Based On The FLAG Peptide For The Detection And Purification Of Recombinant Antibody Fragments," Biotechniques, 17(4):754-761)가 포함되는데, 이것들에 한정되지 않는다.

[0258] 또한 융합 단백질은 유전자 셔플링, 모티프 셔플링, 엑손 셔플링 및/또는 코돈 셔플링(정확하게는 「DNA 셔플링」이라고 불림)의 기술을 통하여 제작할 수 있다. DNA 셔플링을 사용하여, 본 발명의 분자의 활성(예를 들면, 보다 높은 친화성과 보다 낮은 해리속도를 가진 에피토프 결합 부위)을 변경할 수 있다. 일반적으로는, 미국특허 제5,605,793호; 제5,811,238호; 제5,830,721호; 제5,834,252호; 및 제5,837,458호, 및 Patten et al.(1997) "Applications Of DNA Shuffling To Pharmaceuticals And Vaccines," Curr. Opinion Biotechnol. 8:724-733; Harayama(1998) "Artificial Evolution By DNA Shuffling," Trends Biotechnol. 16:76-82; Hansson et al.(1999) "Evolution Of Differential Substrate Specificities In Mu Class Glutathione Transferases Probed By DNA Shuffling," J. MoL Biol. 287:265-276; 및 Lorenzo et al.(1998) "PCR-Based Method For The Introduction Of Mutations In Genes Cloned And Expressed In Vaccinia Virus," BioTechniques 24:308-313(모두 참조로서 이 모두를 본 명세서 중에 포함함)을 참조한다. 본 발명의 디아바디 분자, 또는 본 발명의 분자를 코딩하는 핵산은, 또한 에러 프론(error-prone) PCR법, 랜덤 뉴클레오티드 삽입법 또는 다른 방법을 사용한 랜덤 변이 유발에 의해, 재조합 전에 개변할 수 있다. 본 발명의 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 1 이상의 부분을, 1 이상의 이종분자의 1 이상의 성분, 모티프, 섹션, 부분, 도메인, 단편 등과 재조합할 수 있다.

[0259] 또한, 본 발명은, 진단약 또는 치료약, 또는 다른 어느 분자(혈중 반감기의 증가/감소가 요망되는 분자 및/ 또는 세포의 특정 소집단을 표적으로 하는 분자)와 결합한, 또는 그것들을 면역 특이적으로 인식하는 본 발명의 디아바디 분자도 포함한다. 본 발명의 분자를 진단에 사용해서, 예를 들면, 질환, 장애, 또는 감염의 발생 또는 진행을 임상시험의 일환으로서 모니터링하여, 예를 들면, 주어진 치료계획의 효과를 측정할 수 있다. 본 발명의 분자를 검출가능한 물질과 결합시킴으로써, 또는 검출가능한 물질을 면역 특이적으로 인식하는 분자에 의해, 검출을 용이하게 할 수 있다. 검출가능한 물질의 예에는, 각종 효소, 보결분자족, 형광 물질, 발광 물질, 생물발광 물질, 방사성 물질, 양전자 방출 금속, 및 비방사성 상자성 금속 이온이 포함된다. 검출가능한 물질은, 본 발명의 분자와 직접적으로, 또는 매개 물질(예를 들면, 당해 분야에서 공지의 링커)을 통하여 간접적으로, 당해 분야에서 공지의 방법을 사용하여 연결 또는 결합할 수 있다. 또는, 당해 분자가 검출가능한 물질을 면역 특이적으로 인식할(즉, 상기 물질과 면역 특이적으로 결합할) 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 진단약으로서 사용하기 위한 항체와 결합시킬 수 있는 금속이온에 대해서는, 미국특허 제4,741,900호를 참조한다. 상기 진단 및 검출은, 검출가능한 물질을 면역 특이적으로 인식하도록 이 분자를 디자인하거나, 또는 본 발명의 분자를 검출가능한 물질과 연결함으로써, 달성할 수 있다. 여기에서 검출가능한 물질은 한정은 되지 않지만, 각종 효소, 예를 들면, 양고추냉이 페록시다제, 알칼리 포스파타제, β-갈락토시다제, 또는 아세틸콜린에스테라제(단, 이것들에 한정은 되지 않음); 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴 등의 보결분자족 복합체(단, 이것들에 한정은 되지 않음); 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민플루오레세인, 염화단실, 또는 피코에리트린 등의 형광 물질(단, 이것들에 한정되지 않음), 루미놀 등의 발광 물질(단, 이것에 한정되지 않음), 루시페라제, 루시페린 및 에쿼린 등의 생물발광 물질(단, 이것들에 한정되지 않음), 비스무스(^{213}Bi), 탄소(^{14}C), 크롬(^{51}Cr), 코발트(^{57}Co), 불소(^{18}F), 가돌리늄(^{153}Gd, ^{159}Gd), 갈륨(^{68}Ga, ^{67}Ga), 게르마늄(^{68}Ge), 홀뮴(^{166}Ho), 인듐(^{115}In, ^{113}In, ^{112}In, ^{111}In), 요오드(^{131}I, ^{125}I, ^{123}I, ^{121}I), 란탄(^{140}La), 루테튬(^{177}Lu), 망간(^{54}Mn), 몰리브덴(^{99}Mo), 팔라듐(^{103}Pd), 아인산(^{32}P), 프라세오디뮴(^{142}Pr), 프로메튬(^{149}Pm), 레늄(^{186}Re, ^{188}Re), 로듐(^{105}Rh), 루테늄(^{97}Ru), 사마륨(^{153}Sm), 스칸듐(^{47}Sc), 셀렌(^{75}Se), 스트론튬(^{85}Sr), 황(^{35}S), 테크네튬(^{99}Tc), 탈륨(^{201}Ti), 주석(^{113}Sn, ^{117}Sn), 트리튬(^{3}H), 크세논(^{133}Xe), 이터븀(^{169}Yb, ^{175}Yb), 이트륨(^{90}Y), 아연

(^{65}Zn) 등의 방사성 물질(단, 이것들에 한정되지 않음), 여러 가지 양전자 방사 단층촬영에서 사용되는 양전자 방출 금속, 및 비방사성 상자성 금속 이온을 포함한다.

[0260] 본 발명의 디아바디 분자는 세포 독소(예를 들면, 세포증식 억제제 또는 살세포제), 치료제, 또는 방사성 원소(예를 들면, α방사체, γ방사체 등)과 같은 치료성분을 면역 특이적으로 인식하거나, 또는 그것과 결합할 수 있다. 세포 독소 또는 세포 독성제는 세포에 유해한 어떤 약제도 포함한다. 예로서, 파클리탁셀, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티듐브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜키신, 독소루비신, 아우노루비신, 디히드록시안트라신디온(dihydroxy anthracin dione), 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-디히디로테스토스테론, 당코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤 및 푸로마이신 또는 그것들의 유사체 또는 동족체를 포함한다. 치료제는 한정하지 않지만, 대사길항 물질(예를 들면, 메토트렉세이트, 6-메르캅토푸린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실, 다카르바진), 알킬화제(예를 들면, 메클로레타민, 티오테파, 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴(BSNU) 및 로무스틴(CCNU), 시클로포스파미드, 부술판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 및 시스디클로로디아민 백금(II)(DDP) 시스플라틴), 안트라시클린류(예를 들면, 다우노루비신(이전의 다우노마이신) 및 독소루비신), 항체(예를 들면, 닥티노마이신(이전의 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신, 및 안트라마이신(AMC), 및 유사분열 저해제(예를 들면, 빈크리스틴 및 빈블라스틴)를 포함한다.

[0261] 또한, 본 발명의 디아바디 분자는 치료 성분, 예를 들면, 방사성 물질 또는 방사성 금속 이온과 결합시키는데 유용한 대환상 킬레이트제와 결합시키거나, 또는 그것을 면역 특이적으로 인식하도록 디자인할 수 있다(방사성 물질의 상기 예를 참조하기 바람). 몇개의 구체예에서, 대환상 킬레이트제는 링커 분자를 통하여 폴리펩티드에 결합할 수 있는 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-N,N',N'',N'''-4아세트산(DOTA)이다. 상기 링커 분자는 당해 분야에서 일반적으로 알려져 있고, Denardo et al.(1998) "Comparison Of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-N,N',N",N"'-Tetraacetic Acid(DOTA)-Peptide-ChL6, A Novel Immunoconjugate With Catabolizable Linker, To 2-Iminothiolane-2-[p-(bromoacetamido)benzyl] -DOTA-ChL6 In Breast Cancer Xenografts," Clin. Cancer Res. 4:2483-2490; Peterson et al.(1999) "Enzymatic Cleavage Of Peptide-Linked Radiolabels From Immunoconjugates," Bioconjug. Chem. 10:553-; 및 Zimmerman et al, (1999) "A Triglycine Linker Improves Tumor Uptake And Biodistributions Of 67-Cu-Labeled Anti-Neuroblastoma mAb chCE7 F(ab')2 Fragments," Nucl. Med. Biol. 26:943-950에도 기재되어 있다. 이것들은 모두 참조로서 그 모두를 본 명세서 중에 원용한다.

[0262] 상기 치료 성분을, 예를 들면, Fc 도메인을 포함하여, 폴리뉴클레오티드와 결합시키는 방법은 주지다. 예를 들면, Arnon et al.,"Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al.(eds.), 1985, pp. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom et al,"Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery(2nd Ed.), Robinson et al.(eds.), 1987, pp. 623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe,"Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al.(eds.), 1985, pp. 475-506); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al.(eds.), 1985, pp. 303-16, Academic Press; 및 Thorpe et al.(1982) "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates," Immunol. Rev., 62:119-158를 참조한다.

[0263] 본 발명의 디아바디 분자는, 당해 분자와 결합한 치료 성분과 함께 또는 치료 성분 없이 투여해도 되고, 단독으로 투여해도 되며, 또는 치료 처치용의 세포 독성 인자 및/또는 사이토카인과 조합하여 투여해도 된다. 단독으로 투여하는 경우, 다가의, 예를 들면 4가의 디아바디 분자의 적어도 1개의 에피토프는 치료약(예를 들면, 세포 독성 인자 및/또는 사이토카인)을 면역 특이적으로 인식하도록 설계할 수 있다. 이 치료약은 본 발명의 분자와 동시에, 또는 그것에 이어서 투여할 수 있다. 이와 같이, 디아바디 분자는 직접적인 결합과 유사한 방법으로 치료약을 특이적으로 표적으로 할 수 있다. 또는, 또한 본 발명의 분자를 항체에 결합시켜, Segal이 미국특허 제4,676,980호에 기재하고 있는 것과 같이 항체 헤테로 결합체를 형성시킬 수 있다. 이 문헌은, 참조로서 그 모두를 본 명세서 중에 포함한다. 본 발명의 디아바디 분자는 고상 지지체에 결합할 수도 있다. 이것은 특히 표적 항원의 이뮤노분석 또는 정제에 유용하다. 이러한 고상 지지체는 유리, 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 나일론, 폴리스티렌, 폴리염화비닐 또는 폴리프로필렌을 포함하지만, 이것들에 한정은 되지 않는다.

[0264] **5.4. 디아바디 분자의 결합의 특성 분석**

[0265] 본 발명의 디아바디 분자는 각종 방법으로 특성 분석할 수 있다. 특히, 본 발명의 분자는, 예를 들면, FcRIIIA

또는 FcRIIB 등의 항원과 면역 특이적으로 결합하는 능력에 대하여, 또는 당해 분자가 Fc 도메인(또는 그 일부)을 포함하는 경우에는, Fc-FcγR 상호작용(즉, Fc 도메인(또는 그 일부)의 FcγR로의 특이적 결합)을 나타내는 능력에 대하여, 분석할 수 있다. 상기 분석은, 용액 중에서(예를 들면, Houghten(1992) "The Use Of Synthetic Peptide Combinatorial Libraries For The Identification Of Bioactive Peptides," BioTechniques, 13:412-421), 비드상에서(Lam(1991) "A New Type Of Synthetic Peptide Library For Identifying Ligand-Binding Activity," Nature, 354:82-84), 칩상에서(Fodor(1993) "Multiplexed Biochemical Assays With Biological Chips," Nature, 364:555-556), 세균상에서(미국특허 제5,223,409호), 포자상에서(미국특허 제5,571,698호, 제5,403,484호 및 제5,223,409호), 플라스미드상에서(Cull et al.(1992) "Screening For Receptor Ligands Using Large Libraries Of Peptides Linked To The C Terminus Of The Lac Repressor," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:1865-1869), 또는 페이지상에서(Scott et al.(1990) "Searching For Peptide Ligands With An Epitope Library," Science, 249:386-390; Devlin(1990) "Random Peptide Libraries: A Source Of Specific Protein Binding Molecules," Science, 249:404-406; Cwirla et al.(1990) "Peptides On Phage: A Vast Library Of Peptides For Identifying Ligands," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378-6382; and Felici(1991) "Selection Of Antibody Ligands From A Large Library Of Oligopeptides Expressed On A Multivalent Exposition Vector," J. MoI. Biol, 222:301-310)(이들 문헌은 참조로서 그 모두를 본 명세서 중에 포함함) 실시할 수 있다. 항원에 면역 특이적으로 결합하는 것이 동정되어 있는 분자, 예를 들면, FcγRIIIA는, 그 후, 항원에 대한 특이성 및 친화성에 대하여 분석할 수 있다.

[0266] 복수의 에피토프 결합 도메인을 포함하도록 제작한 본 발명의 분자는 1 이상의 항원(예를 들면, 암 항원)에 대한 면역 특이적인 결합성 및 다른 항원(FcγR)과의 교차반응성에 대하여, 또는 그분자가 Fc 도메인(또는 그 일부)을 포함하는 경우에는 Fc-FcγR 상호작용에 대하여, 당해 분야에서 공지의 어느 하나의 방법에 의해 분석할 수 있다. 면역 특이적 결합, 교차반응성, 및 Fc-FcγR 상호작용을 해석하기 위해서 사용할 수 있는 면역분석법에는 웨스턴블롯법, 방사면역분석법, ELISA법(효소결합 면역 흡착 해석법), 「샌드위치」 면역분석법, 면역침강 분석법, 침강반응, 겔확산 침강 반응, 면역확산 분석법, 응집 분석법, 보체결합 분석법, 면역 방사성계수 분석법, 형광 면역분석법, 단백질A 면역분석법 등과, 그저 여러 종류이지만, 이것들의 기술을 사용한 경쟁 및 비경쟁 분석계가 포함된다. 다만, 이것들의 기술에 한정은 되지 않는다. 상기 분석법은, 당해 분야에서는 일상적으로 행해지고 있으며, 널리 알려져 있다(예를 들면, Ausubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York를 참조. 이것들은 참조에 의해 그 모두를 본 명세서 중에 원용함).

[0267] 항원-결합 도메인의 상호작용, 또는 Fc-FcγR 상호작용의 결합친화성 및 해리속도를 경쟁결합 분석법에 의해 측정할 수 있다. 경쟁결합 분석법의 일례로 방사면역분석법이 있다. 이 방법은, 표지된 항원, 예를 들면, 4량체 FcγR(예를 들면, ^{3}H 또는 ^{125}I, 섹션 5.4.1을 참조)과 대상의 분자(예를 들면, 복수의 에피토프 결합 도메인을 포함하는 본 발명의 분자)를, 4량체 FcγR(섹션 5.4.1을 참조)과 같은 미표지 에피토프의 양을 증가해가면서, 인큐베이션하고, 표지 항원에 결합한 이 분자를 검출하는 것을 포함한다. 항원에 대한 본 발명의 분자의 친화성 및 결합해리속도는 Scatchard 해석법에 의한 포화율로부터 측정할 수 있다.

[0268] 항원 또는 FcγR에 대한 본 발명의 분자의 친화성 및 결합특성은 처음에 항원-결합 도메인 또는 Fc-FcγR 상호작용에 대하여 당해 분야에서는 공지의 in vitro 분석법(생화학 또는 면역학에 기초하는 분석법)을 사용하여 측정할 수 있다. 여기에서, in vitro 분석법은, ELISA법, 표면 플라즈몬 공명 해석법, 면역침강 분석법을 포함하지만, 이것들에 한정은 되지 않는다. 또한, 본 발명의 분자의 결합특성을, 섹션 5.4.2에 기재한 것과 같은 1 이상의 FcγR 개재 이펙터 세포 기능을 측정하기 위한 in vitro 기능 분석법에 의해 특징짓는 것이 바람직하다. 가장 바람직한 구체예에 있어서, 본 발명의 분자는, in vitro 베이스의 분석에 있어서의 결합특성과 동일한 결합특성을 in vivo 모델(예를 들면, 본 명세서에서 기재하고, 또한 개시한 것)에서도 갖는다. 그러나, 본 발명은, in vitro 베이스의 분석에서는 원하는 표현형이 나타나지 않지만, in vivo에서는 원하는 표현형을 나타내는 본 발명의 분자를 배제하는 것이 아니다.

[0269] 몇개의 구체예에서, 복수의 에피토프 결합 도메인, 및 임의로 Fc 도메인(또는 그 일부)을 포함하는 분자의 스크리닝 및 동정은 기능에 기초하는 분석법, 바람직하게는 고속처리 능력을 갖는 방법으로 행해진다. 기능에 기초하는 분석법은, 예를 들면, 본 명세서 중의 섹션 5.4.2 및 5.4.3에 기재되어 있는 바와 같은, 1 이상의 FcγR 개재 이펙터 세포 기능을 특성분석 위한 당해 분야에서 공지인 어느 하나의 분석법으로 할 수 있다. 본 발명의 방법에서 사용할 수 있는 이펙터 세포 기능의 비한정적인 예로서 항체 의존성 세포장애(ADCC), 항체 의존성 식작용, 식작용, 옵소닌화, 옵소닌 식작용, 세포결합성, 로제트 형성, Clq 결합, 및 보체 의존성 세포를 통한 세

포 독성을 포함한다. 단, 이것들에 한정되지 않는다.

[0270] BIAcore 동태 해석을 사용하여, 항원 또는 FcγR에 대한 본 발명의 분자의 결합속도 및 해리속도를 측정하는 구체예가 바람직하다. BIAcore 동태 해석은 항원 또는 FcγR의 결합과 해리를, 고정한 분자(예를 들면, 각각 에피토프 결합 도메인 또는 Fc 도메인(또는 그 일부)을 포함하는 분자)를 그 표면에 담지한 칩상에서 해석하는 것을 포함한다. BIAcore 해석은, 섹션 5.4.3에서 설명한다.

[0271] 당업자에게 공지인 어느 하나의 방법을 사용한 형광 활성화 셀 소팅 장치(FACS)를, 면역학 또는 기능에 기초하는 분석법에 사용하여, 본 발명의 분자를 특성 분석하는 것이 바람직하다. 플로 소터는 본 발명의 분자에 의해 결합된(예를 들면, 그것에 의해 옵소닌화 된) 다수의 세포를 개별적으로, 또한 신속하게 조사할 수 있다(예를 들면, 1시간당 1000만~1억개의 세포)(Shapiro 등, Practical Flow Cytometry, 1995). 또한, 디아바디의 거동을 최적화하는데 사용되는 특정 파라미터에는, 한정은 되지 않지만, 항원 농도(즉, FcγR 4량체 복합체, 섹션 5.4.1을 참조), 동태 경쟁 시간, 또는 FACS 스트린전시가 포함된다. 이것들을 각각 변화시켜, 특이적인 결합 특성(예를 들면, 복수의 에피토프로의 동시결합)을 나타내는 본 발명의 분자를 포함하는 디아바디 분자를 선택할 수 있다. 생체세포를 분취하여 조사하는 유세포 분석기는 당해 분야에서는 주지이다. 공지의 유세포 분석기는, 예를 들면, 미국특허 제4,347,935호; 제5,464,581호; 제5,483,469호; 제5,602,039호; 제5,643,796호; 및 제6,211,477호에 기재되어 있다. 이들 문헌의 내용 모두는, 참조로서 본 명세서 중에 포함된다. 다른 공지의 유세포 분석기로는 Becton Dickinson and Company로부터 시판되고 있는 FACS Vantage™ 시스템, 및 Union Biometrica로부터 시판되고 있는 COPAS™ 시스템이 있다.

[0272] 표적 항원 결합 친화성 또는 Fc-FcγR 결합 친화성의 특성 분석, 및 세포 표면상의 표적 항원 밀도 또는 FcγR 밀도의 평가는, 당해 분야에서 주지의 방법, 예를 들면, Scatchard 해석법 등에 의해, 또는 메이커 사용설명서에 따른 키트, 예를 들면, Quantum™ Simply Cellular(Simply CellulaR은 등록상표)(Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN)의 사용에 의해, 행할 수 있다. 1 이상의 기능 분석은, 당업자에게 공지의 또는 본 명세서 중에 기재한 것 같은 1 이상의 FcγR 개재 이펙터 세포 기능을 특성분석 위한 당해 분야에서 공지인 어느 하나의 분석이어도 된다. 특정 구체예에서, 복수의 에피토프 결합 도메인, 및 임의로 Fc 도메인(또는 그 일부)을 포함하는 본 발명의 분자는 1 이상의 표적 항원 또는 1 이상의 FcγR(예를 들면, FcγRIIIA, FcγRIIA, FcγRIIA)로의 결합에 대하여 ELISA 분석법으로 분석되고, 계속해서 1 이상의 ADCC 분석으로 분석된다. 몇개의 구체예에서, 본 발명의 분자는 또한 표면 플라즈몬 공명에 기초한 분석, 예를 들면, BIAcore를 사용하여 측정된다. 표면 플라즈몬 공명에 기초한 측정은, 당해 분야에서는 주지이지만, 섹션 5.4.3에서 더욱 설명하고, 본 명세서 중에서도 예를 들면 **실시예 6.1**에서 예증된다.

[0273] 가장 바람직한 구체예에서, 복수의 에피토프 결합 도메인, 및 임의로 Fc 도메인(또는 그 일부)를 포함하는 본 발명의 분자는 또한 표적 항원(예를 들면, FcγR)과의 상호작용 또는 Fc-FcγR 상호작용에 대하여 동물모델에서 특징지어진다. Fc-FcγR 상호작용을 분석하는 경우, 본 발명의 방법에서 사용하는데 바람직한 동물모델은, 예를 들면, 인간 FcγR을 발현하는 트랜스제닉 마우스, 예를 들면, 미국특허 제5,877,397호 및 제6,676,927호에 기재되어 있는 어느 하나의 마우스 모델이다. 이들 문헌은 참조로서 그 모두가 본 명세서 중에 포함한다. 또한, 상기 방법에서 사용하는 트랜스제닉 마우스는, 한정은 되지 않지만, 인간 FcγRIIIA를 담지하고 있는 FcγRIIIA 넉아웃 누드 마우스; 인간 FcγRIIA를 담지하고 있는 FcγRIIIA 넉아웃 누드 마우스; 인간 FcγRIIB 및 인간 FcγRIIIA를 담지하고 있는 FcγRIIIA 넉아웃 누드 마우스; 인간 FcγRIIB 및 인간 FcγRIIA를 담지하고 있는 FcγRIIIA 넉아웃 누드 마우스; 인간 FcγRIIIA 및 FcγRIIA를 담지하고 있는 FcγRIIIA 및 FcγRIIA 넉아웃 누드 마우스, 및 인간 FcγRIIIA, FcγRIIA 및 FcγRIIB을 담지하고 있는 FcγRIIIA, FcγRIIA 및 FcγRIIB 넉아웃 누드 마우스를 포함한다.

[0274] **5.4.1. FcγR을 포함하는 결합 분석**

[0275] Fc 도메인(또는 그 일부)을 포함하는, 및/또는 FcγR에 특이적인 에피토프 결합 도메인을 포함하는 분자에 의한 FcγR로의 결합을 특성 분석하는 것은, 한정은 되지 않지만 FcγR의 다형 돌연변이체를 포함하여, 어느 FcγR을 사용해도 행할 수 있다. 몇개의 구체예에서는, 158위치에 페닐알라닌을 포함하는 FcγRIIIA의 다형 돌연변이체가 사용된다. 다른 구체예에서는, 158위치에 발린을 포함하는 FcγRIIIA의 다형 돌연변이체를 사용하여 특성 분석이 행해진다. FcγRIIIA 158V는 IgG1에 대하여 158F보다도 높은 친화성, 및 ADCC 활성의 증가를 보인다(예를 들면, Koene et al.(1997) "Fc gammaRIIIa-158V/F Polymorphism Influences The Binding OfIgG By Natural Killer Cell Fc gammaRIIIa, Independently Of The Fc gammaRIIIa-48L/R/H Phenotype," Blood, 90:1109-14;

Wu et al.(1997) "A Novel Polymorphism Of FcgammaRIIIa(CD 16) Alters Receptor Function And Predisposes To Autoimmune Disease," J. Clin. Invest. 100: 1059-70; 모두 참조로서 그 모두를 본 명세서 중에 포함함). 이 잔기는 실제로 IgG1의 하부 힌지 영역과 직접 상호작용 하는데, 이것은 IgG1-FcγRIIIA의 공결정화 연구에 의해 최근 밝혀졌다(예를 들면, Sondermann et al.(2000) "The 3.2-A Crystal Structure Of The Human IgG1 Fc Fragment-Fc gammaRIII complex," Nature, 406(6793) :267-273을 참조. 이 문헌은 참조로서 그 모두가 본 명세서 중에 원용됨). 연구에 의해, 몇개의 케이스에 있어서, 치료용 항체는 FcγRIIIA-158V 호모 접합 환자에서 향상된 효과를 갖는 것이 밝혀졌다. 예를 들면, 인간화 항 CD20 단일 클론 항체 리툭시마브(Rituximab)는 FcγRIIIA-158F 호모 접합 환자와 비교하여 FcγRIIIA-158V 호모 접합 환자에서, 보다 치료 효과가 있었다(예를 들면, Cartron et al.(2002) "Therapeutic Activity Of Humanized Anti-CD20 Monoclonal Antibody And Polymorphism In IgG Fc Receptor FcgammaRIIIA Gene," Blood, 99(3): 754-758을 참조). 다른 구체예에서, 이 영역을 포함하는 치료용 분자는 또한 FcγRIIIA-158V 및 FcγRIIIA-158F에 관하여 이질 접합의 환자에 있어서, 및 FcγRIIIA-131H를 갖는 환자이어도 효과적일 수 있다. 특정 작용 기작에 얽매일 생각은 없지만, 다른 알로타이프를 사용한 본 발명의 분자의 선택은, 일단 치료용 디아바디로 제작되면, 그러한 알로타입에 대하여 호모 접합성의 환자에 대하여 임상적으로 보다 효과가 있다고 생각되는 돌연변이체를 제공할 수 있다.

[0276] FcγR 결합 분석이, 본 발명의 분자와 FcγR와의 결합을 측정하기 위하여, 특히, Fc 도메인과 FcγR과의 결합을 측정하기 위하여 개발되었다. 이 분석에 의해, 리간드에 대한 수용체의 친화성이 본질적으로 약해도, 예를 들면, FcγRIIB와 FcγRIIIA에 대하여 마이크로 몰의 범위이어도, Fc-FcγR 상호작용의 검출 및 정량이 가능하게 되었다. 상기 방법은 국제공개 WO 04/063351호 및 미국특허출원 공개 제2005/0037000호 및 제2005/0064514호에 그 상세가 기재되어 있다. 모두 참조로서 그 모두를 본 명세서에 원용한다. 간단하게 말하면, 이 방법은, 당해 분야에서 알려진 어느 하나의 표준적인 면역분석법, 예를 들면, FACS, ELISA, 표면 플라즈몬 공명 등으로 추적할 수 있는 FcγR 복합체의 형성을 포함한다. 또한, FcγR 복합체는 복합체를 형성하지 않은 FcγR과 비교하면, Fc 영역에 대하여 개선된 결합 활성을 가지고 있다. 본 발명에 의하면, 바람직한 분자 복합체는 4량체의 면역 복합체이며, 이 면역 복합체는, (a) FcγR의 가용성 영역(예를 들면, FcγRIIIA, FcγRIIA 또는 FcγRIIB의 가용성 영역); (b) FcγR의 가용성 영역(예를 들면, FcγRIIIA, FcγRIIA 또는 FcγRIIB의 가용성 영역)의 C말단으로 기능할 수 있도록 연결된 비오틴화 15아미노산 AVITAG 서열(AVITAG); 및 (c) 스트렙타비딘-피코에리트린(SA-PE)을, 4량체 FcγR 복합체를 형성하는 몰비로(바람직하게는 5:1의 몰비로) 포함해도 된다. 이 융합 단백질은, 예를 들면, 15아미노산 AVITAG 서열 중의 리신 잔기를 특이적으로 비오틴화하는 대장균 비오틴 리가제 BirA 효소를 사용하여, 효소적으로 비오틴화 되어 있다. 비오틴화된 가용성 FcγR 단백질을, 그 후, 4량체 FcγR 복합체를 형성시키기 위하여 SA-PE와, 1×SA-PE: 5×비오틴화 가용성 FcγR의 몰비로 혼합한다.

[0277] Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드는 단량체의 비복합 FcγR보다도 적어도 8배 높은 친화성으로 4량체 FcγR 복합체와 결합하는 것을 알았다. Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드의 4량체 FcγR 복합체로의 결합성은, 당업자에게는 공지의 표준적인 기술, 예를 들면, 형광 활성화 셀 소팅법(FACS), 방사 면역분석법, ELISA법 등을 사용하여 측정할 수 있다.

[0278] 본 발명은, 세포 베이스의 또는 무세포계의 분석에서 Fc 영역을 포함하는 분자의 기능성을 측정하기 위한, 상기 방법에 의해 형성되는 본 발명의 분자를 포함하는 면역 복합체의 사용을 포함한다.

[0279] 편의상, 시약은, 측정 키트에서, 즉 FcγR 4량체 복합체와 결합하는 Fc 영역을 포함한 분자의 능력을 측정하기 위하여 패키지 된 시약의 조합으로 제공될 수 있다. Fc-FcγR 상호작용을 측정하는데 사용하는 분자 복합체의 다른 형태는 본 발명의 방법에서의 사용도 고려되어 있다. 예를 들면, 2003년 1월 13일 출원의 미국 가출원 제60/439,709호(참조로서 그 모두를 본 명세서에 포함함)에 기재되어 있도록 형성된 융합 단백질을 들 수 있다.

[0280] **5.4.2. 변이형 중쇄를 갖는 분자의 기능성 분석**

[0281] 본 발명은, 복수의 에피토프 결합 도메인과, 경우에 따라 Fc 도메인(또는 그 일부)을 포함하는 본 발명의 분자를, 이 분자의 이펙터 세포 기능을 동정하기 위한 당업자에게 알려진 분석을 사용하여 특성 분석하는 것을 포함한다. 특히, 본 발명은, 본 발명의 분자를, FcγR 개재 이펙터 세포 기능에 대하여 특성 분석하는 것을 포함한다. 또한, 본 발명의 디아바디 분자의 표적 항원의 적어도 1개가 FcγR일 경우, 디아바디 분자에 의한 FcγR의 결합은 FcγR-Fc 결합에 의해 활성화되는 경로와 유사한 FcγR 개재 경로를 활성화하는데도 도움이 될 수 있다. 이렇게 하여, 디아바디 분자의 적어도 1개의 에피토프 결합 도메인이 FcγR을 인식하는 경우에는, 디아바디 분자는 Fc 도메인(또는 그 일부)을 포함하지 않고, 또는 부수되는 Fc-FcγR 결합 없이, FcγR 개재 이펙터 세포 기능을 유발할 수 있다. 본 발명에 따라 분석할 수 있는 이펙터 세포 기능의 예로서, 한정되는 것은 아니지만,

이하가 포함된다: 항체 의존성 세포 상해, 식작용, 옵소닌 작용, 옵소닌 식작용, Clq 결합, 및 보체 의존성 세포 상해. 이펙터 세포 기능 활성을 판정하기 위하여, 당업자에게 알려진 세포 베이스의 분석 또는 무세포 측정은 모두 사용할 수 있다(이펙터 세포 측정에 대해서는, 이하를 참조: Perussia et al.(2000) "Assays For Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity(ADCC) And Reverse ADCC(Redirected Cytotoxicity) In Human Natural Killer Cells," Methods MoL Biol. 121 : 179-92; Baggiolini et al.(1988) "Cellular Models For The Detection And Evaluation Of Drugs That Modulate Human Phagocyte Activity," Experientia, 44(10): 841-848; Lehmann et al.(2000) "Phagocytosis: Measurement By Flow Cytometry," J. Immunol. Methods, 243(1-2): 229-42; Brown(1994) "In Vitro Assays Of Phagocytic Function Of Human Peripheral Blood Leukocytes: Receptor Modulation And Signal Transduction," Methods Cell Biol, 45: 147-64; Munn et al.(1990) "Phagocytosis Of Tumor Cells By Human Monocytes Cultured In Recombinant Macrophage Colony-Stimulating Factor," J. Exp. Med., 172: 231-237, Abdul-Majid et al.(2002) "Fc Receptors Are Critical For Autoimmune Inflammatory Damage To The Central Nervous System In Experimental Autoimmune Encephalomyelitis," Scand. J. Immunol. 55: 70-81; Ding et al.(1998) "Two Human T Cell Receptors Bind In A Similar Diagonal Mode To The HLA-A2/Tax Peptide Complex Using Different TCR Amino Acids," Immunity 8:403-411(각각의 전체 내용을 참조로서 본 명세서 중에 포함함)).

[0282] 어떤 구체예에서는, 본 발명의 분자를 인간 단구에서 FcγR 개재 식작용에 대하여 분석할 수 있다. 또한, 본 발명의 분자의 FcγR 개재 식작용을 그 밖의 식세포, 예를 들면, 호중구(다형핵 백혈구; PMN); 인간 말초혈 단구, 단구 유래 마크로파지에서 분석할 수도 있다. 이것들은 당업자에게 알려진 표준적 수순을 사용하여 취득할 수 있다(예를 들면, Brown(1994) "In Vitro Assays Of Phagocytic Function Of Human Peripheral Blood Leukocytes: Receptor Modulation And Signal Transduction," Methods Cell Biol., 45: 147-164 참조). 1구체예에서는, 본 발명의 분자의 기능을, 기술된 방법(Tridandapani et al.(2000) "The Adapter Protein LAT Enhances Fcgamma Receptor-Mediated Signal Transduction In Myeloid Cells," J. Biol. Chem. 275: 20480-20487)에 의해, 플루오레세인화 IgG-옵소닌화 양 적혈구 세포(SRBC)를 탐식하는 THP-1 세포의 능력을 측정함으로써 특성분석한다.

[0283] 본 발명의 분자의 식작용을 판정하기 위한 다른 예시적인 분석은, 항체 의존성 옵소닌 식작용 분석(ADCP)이며, 이것은 이하의 스텝을 포함할 수 있다: 대장균(Escherichia coli)-표지 FITC(Molecular Probes) 또는 황색 포도상 구균(Staphylococcus aureus)-FITC 등의 표적 생체입자를, (i) 플루오레세인에 대한 항체인 야생형 4-4-20 항체(FcγR 의존성 ADCP에 관한 대조 항체로서)(전체 내용을 참조로서 본 명세서에 포함하는 Bedzyk et al.(1989) "Comparison Of Variable Region Primary Structures Within An Anti-플루오레세인 Idiotype Family," J. Biol. Chem, 264(3): 1565-1569 참조), 또는(ii) FcγRIII에의 결합을 넉아웃하는 D265A 돌연변이를 보유하는 4-4-20 항체(FcγR 의존성 ADCP에 대한 백그라운드 대조로서), (iii) 4-4-20의 에피토프 결합 도메인 및 Fc 도메인 및/또는 FcγRIII에 특이적인 에피토프 결합 도메인을 포함하는 디아바디로 코팅하는 것; 그리고 옵소닌화한 입자를 형성시키는 것; 기재한 옵소닌화 입자(i~iii) 중 어느 하나를 THP-1 이펙터 세포(단구세포계, ATCC로부터 입수 가능)에 1:1, 10:1, 30:1, 60:1, 75:1, 또는 100:1의 비로 첨가하여, FcγR 개재 식작용을 발생시키는 것; 바람직하게는 이 세포와 대장균-FITC/항체를 37℃에서 1.5시간 인큐베이트하는 것; 인큐베이션 후, 세포에 트리판블루를 첨가하여(바람직하게는 실온에서 2~3분), 내부로 받아들여지지 않고 세포 표면의 외측에 부착된 세균의 형광을 소실시키는 것; 세포를 FACS 버퍼(예를 들면, PBS 중의 0.1%BSA, 0.1%아지화나트륨) 속으로 옮기고, FACS(예를 들면, BD FACS Calibur)를 사용하여 THP1 세포의 형광을 분석하는 것. 바람직하게는, 이 분석에 사용되는 THP-1 세포를 FACS에 의해 세포 표면상의 FcγR의 발현에 대하여 분석한다. THP-1 세포는 CD32A와 CD64 양쪽을 발현한다. CD64는 본 발명의 방법에 따라 ADCP 분석을 실행할 때 블록되는, 고친화성 FcγR이다. THP-1 세포를, 바람직하게는 100μg/mL의 가용성 IgG1 또는 10% 인간 혈청으로 블록 한다. ADCP의 정도를 측정하기 위해, 게이트를 바람직하게는 THP-1 세포에 설정하고, 형광강도의 중앙값을 측정한다. 개개의 돌연변이체에 대한 ADCP 활성을 산출하고, 얻어진 야생형 chMab 4-4-20에 대하여 표준화한 수치로서 기록한다. 옵소닌화한 입자를 THP-1 세포에 첨가하여, T 옵소닌화 입자와 THP-1 세포의 비가 30:1 또는 60:1이 되도록 한다. 가장 바람직한 구체예에서는, ADCP 분석을 이하와 같은 대조를 사용하여 실시한다: 배지 중의 대장균-FITC, 대장균-FITC 및 THP-1 세포(FcγR 비의존성 ADCP 활성으로서 도움이 됨), 대장균-FITC, THP-1 세포 및 야생형 4-4-20 항체(FcγR 의존성 ADCP 활성으로서 도움이 됨), 대장균-FITC, THP-1 세포, 4-4-20 D265A(FcγR 의존성 ADCP 활성에 관한 백그라운드 대조로서 도움이 됨).

[0284] 다른 구체예에서는, 본 발명의 분자를, 당업자에게 알려진 표준적인 방법 중 어느 하나를 사용하여, 이펙터 세포, 예를 들면, 내추럴킬러 세포로, FcγR 개재 ADCC 활성에 대하여 분석할 수 있다(예를 들면, Perussia et

al.(2000) "Assays For Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity(ADCC) And Reverse ADCC(Redirected Cytotoxicity) In Human Natural Killer Cells," Methods MoI. Biol. 121 : 179-92; Weng et al.(2003) "Two Immunoglobulin G Fragment C Receptor Polymorphisms Independently Predict Response To Rituximab In Patients With Follicular Lymphoma," J. Clin. Oncol. 21 :3940-3947; Ding et al.(1998) "Two Human T Cell Receptors Bind In A Similar Diagonal Mode To The HLA-A2/Tax Peptide Complex Using Different TCR Amino Acids," Immunity 8:403-411 참조). 본 발명의 분자의 ADCC 활성을 판정하기 위한 예시적인 분석은 이하의 스텝을 포함하는 ^{51}Cr 방출 분석에 기초하는 것이다: 표적 세포를 [^{51}Cr]Na_2CrO_4로 표지 하는 것(이 세포막 투과성 분자가 표지용으로 일반적으로 사용된다. 왜냐하면, 이것은 세포질 단백질과 결합하고, 세포로부터 속도론적으로 완만하게 자발방출되지만, 표적 세포의 괴사 후, 대량으로 방출되기 때문임); 변이형 중쇄를 포함하는 본 발명의 분자로 표적 세포를 옵소닌화하는 것; 옵소닌화 한 방사성 표지 표적 세포와 이펙터 세포를, 표적 세포와 이펙터 세포의 적절한 비로, 마이크로타이터 플레이트에서 혼합하는 것; 세포의 혼합물을 16~18시간, 37℃에서 인큐베이트하는 것; 상청액을 회수하는 것; 및 방사 활성을 측정하는 것. 그 후, 본 발명의 분자의 세포 상해성을, 예를 들면, 이하의 식을 사용하여 산출할 수 있다: 용해%=(실험 cpm -표적 누출 cpm)/(계면활성제 용해 cpm -표적 누출 cpm)x100%, 또는, 용해%=(ADCC-AICC)/(최대 방출 -자발 방출). 비용해는 이하의 식을 사용하여 산출할 수 있다: 비용해=본 발명의 분자의 존재하에서의 용해%-본 발명의 분자의 부재하에서의 용해%. 표적: 이펙터 세포의 비 또는 항체 농도 중 어느 하나를 변경함으로써, 그래프를 작성할 수 있다.

[0285] 바람직하게는, 본 발명의 ADCC 분석에서 사용하는 이펙터 세포는 말초혈 단핵 세포(PBMC)이다. 이것은 바람직하게는, 당업자에게 알려진 표준적 방법, 예를 들면, Ficoll-Paque 밀도구배 원심분리를 사용하여, 정상 인간 혈액으로부터 정제된다. 본 발명의 방법에서 사용하는데 바람직한 이펙터 세포는 다른 FcγR 활성화 수용체를 발현한다. 본 발명은, 중쇄 항체 돌연변이체가 야생형 IgG1 항체에 비해 증가한 ADCC 활성 및 식작용을 나타내는지 아닌지를 판정하기 위해, 이펙터 세포, FcγRI, FcγRIIA 및 FcγRIIB를 발현하는 THP-1, 및 FcγRIIIA와 FcγRIIB 양쪽을 발현하는, 인간 전혈에 유래하는 단구 유래의 1차 마크로파지를 포함한다.

[0286] 인간 단구세포계인 THP-1은 고친화성 수용체 FcγRI 및 저친화성 수용체 FcγRIIA의 발현을 통하여 식작용을 활성화한다(Fleit et al.(1991) "The Human Monocyte-Like Cell Line THP-I Expresses Fc Gamma RI And Fc Gamma RII," J. Leuk. Biol. 49: 556-565). THP-1 세포는 FcγRIIA 또는 FcγRIIB를 구성적으로 발현하지 않는다. 사이토카인을 사용하여 이들 세포를 자극하면, FcR 발현 패턴이 영향을 받는다(Pricop et al.(2001) "Differential Modulation Of Stimulatory And Inhibitory Fc Gamma Receptors On Human Monocytes By ThI And Th2 Cytokines," J. of Immunol., 166: 531-537). 사이토카인 IL4의 존재하에서의 THP-1 세포의 생육은 FcγRIIB 발현을 유발하여, FcγRIIA 및 FcγRI 발현의 감퇴를 초래한다. 또한, FcγRIIB 발현도 세포밀도의 증가에 의해 증대된다(Tridandapani et al.(2002) "Regulated Expression And Inhibitory Function Of Fcgamma RIIB In Human Monocytic Cells," J. Biol. Chem., 277(7): 5082-5089). 대조적으로, IFNγ는 FcγRIIIA의 발현을 유도할 수 있다고 보고되어 있다(Pearse et al.(1993) "Interferon Gamma-Induced Transcription Of The High-Affinity Fc Receptor For IgG Requires Assembly Of A Complex That Includes The 91-kDa Subunit Of Transcription Factor ISGF 3," Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90: 4314-4318). 세포 표면상의 수용체의 존재 또는 부재는, 당업자에게 알려진 일반적 방법을 사용하여, FACS에 의해 확인할 수 있다. 사이토카인에 의해 유발되는 세포 표면상에서의 FcγR의 발현은 FcγRIIB의 존재하에서 활성화 및 억제 양쪽을 시험하는 계를 제공한다. THP-1 세포가 FcγRIIB를 발현할 수 없는 경우에는, 본 발명은 다른 인간 단구세포계인 U937을 더 포함한다. 이들 세포는 IFNγ 및 TNF의 존재하에서, 최종적으로 마크로파지로 분화하는 것을 알았다(Koren et al.(1979) "In Vitro Activation OfA Human Macrophage-Like Cell Line," Nature 279: 328-331).

[0287] FcγR 의존성 종양세포 사멸은 마우스 종양 모델에서는 마크로파지와 NK 세포에 의해 중개된다(Clynes et al.(1998) "Fc Receptors Are Required In Passive And Active Immunity To Melanoma," Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95: 652-656). 본 발명은 식작용 및 ADCC 분석 양쪽에서, 표적 세포의 세포 상해를 유발하는 Fc 돌연변이체의 효력을 측정하기 위하여, 이펙터 세포로서의 도너 유래의 세정한(elutriated) 단구의 사용을 포함한다. FcγRI, FcγRIIIA, 및 FcγRIIB의 발현 패턴은 다른 증식 조건에 의해 영향을 받는다. 세정하여 동결시킨 단구, 신선한 세정한 단구, 10% FBS 속에 유지한 단구, FBS+GM-CSF 속 및/또는 인간 혈청 속에서 배양한 단구로부터의 FcγR 발현은 당업자에게 알려진 일반적 방법을 사용하여 측정할 수 있다. 예를 들면, 세포를 FcγR 특이적 항체로 염색하고, FACS에 의해 측정하여 FcγR 프로필을 결정할 수 있다. 그 후에 마크로파지의 in vivo FcγR 발현을 가장 잘 모방하는 조건을 본 발명의 방법으로 사용한다.

[0288] 몇개의 구체예에서는, 본 발명은, 특히 적합한 FcγR 프로필을 갖는 인간 세포를 취득할 수 없는 경우에는, 마

우스 세포의 사용을 포함한다. 몇개의 구체예에서는, 본 발명은, 인간 FcγRIIIA로 트랜스펙트할 수 있는 마우스 마크로파지 세포계 RAW264.7(ATCC), 및 당 기술분야에서 알려진 방법을 사용하여 단리된 안정한 트랜스펙턴트를 포함한다(예를 들면, Ralph et al.(1977) "Antibody-Dependent Killing Of Erythrocyte And Tumor Targets By Macrophage-Related Cell Lines: Enhancement By PPD And LPS," J. Immunol. 119: 950-4 참조). 트랜스펙턴트는, 일반적인 실험조작을 사용한 FACS 측정에 의해, FcγRIIIA 발현에 대하여 정량하고, 고발현체를 본 발명의 ADCC 분석에 사용할 수 있다. 다른 구체예에서는, 본 발명은 본 명세서에서 개시한 것 등의 넉아웃 트랜스제닉 마우스로부터의, 인간 FcγR을 발현하는 비장 복강 마크로파지의 단리를 포함한다.

[0289] 림프구는 Ficoll-Paque 구배(Pharmacia)를 사용하여, 도너의 말초혈(PBM)로부터 회수할 수 있다. 단리된 세포의 단핵집단 내에서는, 대부분 ADCC 활성이, 그 표면에 FcγRIIIA를 포함하지만, FcγRIIB는 포함하지 않는 내추럴 킬러 세포(NK)를 통하여 생긴다. 이들 세포를 사용한 결과는, NK 세포 ADCC의 유발에 대한 돌연변이체의 효력을 나타내어, 세정한 단구를 사용하여 시험하기 위한 시약을 확립한다.

[0290] 본 발명의 ADCC 분석에서 사용하는 표적 세포로서, 한정하는 것은 아니지만, 이하가 포함된다: 유방암 세포계, 예를 들면, SK-BR-3(ATCC 수탁번호 HTB-30)(예를 들면, Tremp et al.(1976) "Human Breast Cancer In Culture," Recent Results Cancer Res. 33-41 참조); B 림프구; 버키트 림프종 유래의 세포, 예를 들면, Raji 세포(ATCC 수탁번호 CCL-86)(예를 들면, Epstein et al.(1965) "Characteristics And Mode Of Growth Of Tissue Culture Strain(EB1) Of Human Lymphoblasts From Burkitt's Lymphoma," J. Natl. Cancer Inst. 34: 231-240 참조), 및 Daudi 세포(ATCC 수탁번호 CCL-213)(예를 들면, Klein et al.(1968) "Surface IgM-Kappa Specificity On A Burkitt Lymphoma Cell In Vivo And In Derived Culture Lines," Cancer Res. 28: 1300-1310 참조). 표적 세포는 분석할 디아바디 분자의 항원 결합 영역에 의해 인식되는 것이 아니면 안 된다.

[0291] ADCC 분석은 어팝토시스 경로에 의해 세포사를 중개하는 NK 세포의 능력에 기초하고 있다. NK 세포는 일부에는 세포 표면의 항원에 결합한 IgG Fc 도메인의 FcγRIIIA 인식에 의해, 세포사를 중개한다. 본 발명의 방법에 따라 사용하는 ADCC 분석은 방사성 베이스의 분석 또는 형광 베이스의 분석이어도 된다. 변이형 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자를 특성분석 위해 사용하는 ADCC 분석은 이하의 스텝을 포함한다: 표적 세포, 예를 들면, SK-BR-3, MCF-7, OVCAR3, Raji, Daudi 세포를 표지하는 것; 표적 세포를 항원 결합 영역을 통하여 표적 세포상의 세포 표면 수용체를 인식하는 항체로 옵소닌화 하는 것; 표지한 옵소닌화 표적 세포와 이펙터 세포를 적절한 비(이것은 통상의 실험조작에 의해 결정할 수 있음)로 혼합하는 것; 세포를 회수하는 것; 사용한 표지에 기초하는 적절한 검출 스킴을 사용하여, 용해한 표적 세포의 상청 부분 중의 표지를 검출하는 것. 표적 세포는 당 기술분야에서 알려진 표준적 방법을 사용하여, 방사성 표지 또는 형광 표지로 표지할 수 있다. 예를 들면, 표지로서, 한정되는 것은 아니지만, 이하가 포함된다: $[^{51}Cr]Na_2CrO_4$; 및 형광 증강 리간드인 2,2':6',2''-터피리딘-6-6''-디카르복실산(TDA)의 아세톡시메틸에스테르.

[0292] 특정의 바람직한 구체예에서는, 형광 증강 리간드인 2,2':6',2''-터피리딘-6-6''-디카르복실산(TDA)의 아세톡시메틸에스테르로 표지한 표적 세포에 대한 ADCC 활성을 측정하기 위하여, 시간분해 형광 측정 분석을 사용한다. 이러한 형광 측정 분석은 당 기술분야에서 알려져 있다. 예를 들면, Blomberg et al.(1996) "Time-Resolved Fluorometric Assay For Natural Killer Activity Using Target Cells Labelled With A Fluorescence Enhancing Ligand," Journal of Immunological Methods, 193: 199-206(그 전체 내용을 참조로서 본 명세서에 포함함)을 참조. 간단하게 말하면, 표적 세포를 막 투과성 TDA의 아세톡시메틸디에스테르인(비스(아세톡시메틸)2,2':6',2''-터피리딘-6-6''-디카르복실산(BATDA))로 표지한다. 이것은 생세포의 세포막을 통과하여 신속히 확산한다. 세포내 에스테라제가 에스테르기를 개열시켜, 재생된 막 비투과성 TDA 분자는 세포내에 포착된다. 이펙터 세포 및 표적 세포를 예를 들면 적어도 2시간, 길어도 3.5시간, 37℃, 5% CO_2하에서 인큐베이트한 후, 용해 표적 세포로부터 방출된 TDA를 Eu3+로 킬레이트화하고, 생성한 유로퓸-TDA 킬레이트의 형광을 시간분해 형광 광도계(예를 들면, Victor 1420, PerkinElmer/Wallace)로 정량한다.

[0293] 다른 특정의 구체예에서는, 복수의 에피토프 결합 부위, 및 경우에 따라 Fc 도메인(또는 그 일부)을 포함하는 본 발명의 분자를 특성분석하기 위해서 사용하는 ADCC 분석은 이하의 스텝을 포함한다: 바람직하게는 4~$5x10^6$개의 표적 세포(예를 들면, SK-BR-3, MCF-7, OVCAR3, Raji 세포)를 비스(아세톡시메틸)2,2':6',2''-터피리딘-t-6''-디카르복실산(DELFIA BATDA 시약, Perkin Elmer/Wallac)으로 표지한다. 최적 표지효율을 위해, ADCC 분석에서 사용하는 표적 세포의 수는, 바람직하게는 $5x10^6$개를 초과하지 않도록 해야 한다. 이 세포에 BATDA 시약을 첨가하고, 혼합물을 37℃, 바람직하게는 5% CO_2하에서, 적어도 30분간 인큐베이트한다. 다음에 세포를 생리

학적 버퍼(예를 들면, 0.125mM 술핀피라졸을 포함하는 PBS), 및 0.125mM 술핀피라졸을 함유하는 배지에서 세정한다. 다음에 표지한 표적 세포를, FcγRIIA에 특이적인 에피토프 결합 도메인, 및 경우에 따라 Fc 도메인(또는 그 일부)을 포함하는 본 발명의 분자로 옵소닌화(코팅)한다. 바람직한 구체예에서는, ADCC 분석에서 사용하는 분자는 또한 세포 표면 수용체, 종양 항원, 또는 암 항원에 특이적이다. 본 발명의 디아바디 분자는 섹션 5.6.1에 열거하는 것 등의 암 또는 종양 항원과 특이적으로 결합할 수 있다. ADCC 분석에서 사용하는 표적 세포는, 본 발명의 디아바디가 표적 세포의 세포 표면 수용체와 특이적으로 결합하도록, 이 디아바디에 도입된 에피토프 결합 부위를 따라 선택된다.

[0294] 표적 세포를 이펙터 세포, 예를 들면, PBMC에, 이펙터: 표적의 비가 약 1:1, 10:1, 30:1, 50:1, 75:1, 또는 100:1이 되도록 첨가한다. 이펙터 및 표적 세포를 적어도 2시간, 길어도 3.5시간, 37℃, 5% CO_2하에서 인큐베이트 한다. 세포 상청액을 회수하고, 산성 유로퓸 용액(예를 들면, DELFIA 유로퓸 용액, Perkin Elmer/Wallac)에 첨가한다. 생성한 유로퓸-TDA 킬레이트의 형광을 시간분해 형광 광도계(예를 들면, Victor 1420, Perkin Elmer/Wallac)로 정량한다. 최대 방출(MR) 및 자발 방출(SR)은 표적 세포를 각각 1% TX-100 및 배지와만 인큐베이트 함으로써 측정한다. 항체 비의존성 세포 상해(AICC)를, 시험분자(예를 들면, 본 발명의 디아바디)의 부재하에서 표적 및 이펙터 세포를 인큐베이션 함으로써 측정한다. 각 측정은 바람직하게는 3회 반복하여 실시한다. 비용해의 평균 퍼센트를 이하에 의해 산출한다: 실험 방출값(ADCC)-AICC)/(MR-SR)x100.

[0295] 본 발명은, Fc 도메인(또는 그 일부)을 포함하는 본 발명의 분자에 의한 C1q의 결합 및 보체 의존성 세포 상해(CDC)의 중개를 특성분석 위한, 당 기술분야에서 공지이며 또한 본 명세서에 예시되는 측정을 포함한다. C1q 결합성을 측정하기 위하여, C1q 결합 ELISA를 실시할 수 있다. 예시적인 측정은 이하의 스텝을 포함할 수 있다: 측정 플레이트를 코팅 버퍼 중에서 본 발명의 분자 또는 출발 폴리펩티드(대조군)에 의해, 4℃에서 밤새 코팅한다. 이어서 이 플레이트를 세정하고, 블록 한다. 세정 후, 인간 C1q의 알리쿼트를 각 웰에 첨가하고, 실온에서 2시간 인큐베이트 한다. 또한 세정한 후, 100㎕의 양 항 보체 C1q 페록시다제 콘주게이트 항체를 각 웰에 첨가하고, 실온에서 1시간 인큐베이트 한다. 플레이트를 다시 세정 버퍼로 세정하고, OPD(O-페닐렌디아민2염산염(Sigma))를 포함하는 100㎕의 기질 버퍼를 각 웰에 첨가한다. 황색의 출현에 의해 관찰되는 산화반응을 30분간 진행시키고, 100㎕의 4.5 NH_2SO_4의 첨가에 의해 이 반응을 정지시킨다. 이어서 흡광도를(492~405)nm에서 읽어낸다.

[0296] 보체 활성화를 평가하기 위하여, 보체 의존성 세포 상해(CDC) 측정을, 예를 들면, 참조로서 그 전체를 본 명세서에 포함하는 Gazzano-Santoro et al.(1997) "A Non-Radioactive Complement-Dependent Cytotoxicity Assay For Anti-CD20 Monoclonal Antibody," J. Immunol. Methods 202:163-171에 기재되는 바와같이, 실시할 수 있다. 간결하게 말하면, (변이형) Fc 도메인(또는 그 일부)을 포함하는 분자 및 인간 보체를 여러 농도로 버퍼로 희석한다. 디아바디 분자가 결합하는 항원을 발현하는 세포는 1ml당 약 $1x10^6$ 세포의 밀도로 희석한다.(변이형) Fc 도메인(또는 그 일부)을 포함하는 디아바디 분자, 희석한 인간 보체 및 항원을 발현하는 세포의 혼합물을, 평평한 밑바닥 조직배양 96웰 플레이트에 첨가하고, 37℃, 5%CO_2하에서 2시간 인큐베이트 시켜, 보체 개재 세포 용해를 촉진시킨다. 이어서, 50㎕의 알라마 블루(Accumed International)를 각 웰에 첨가하고, 37℃에서 밤새 인큐베이트 한다. 흡광도는 530nm의 여기 및 590nm의 발광을 갖는 96웰 형광 광도계를 사용하여 측정한다. 결과는 상대 형광단위(RFU)로 나타낼 수 있다. 샘플 농도를 표준곡선으로부터 구하고, 비변이형 분자(즉, Fc 도메인을 포함하지 않거나 또는 비변이형 Fc 도메인을 포함하는 분자)와 비교한 활성%를 대상의 돌연변이체에 대해서 기록한다.

[0297] **5.4.3. 그 밖의 분석**

[0298] 복수의 에피토프 결합 도메인, 및 경우에 따라 Fc 도메인을 포함하는 본 발명의 분자는, 항원 결합 도메인 또는 Fc-FcγR 결합의 속도론적 파라미터를 특징 짓기 위한, 당 기술분야에서 알려진 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 기초하는 측정 중 어느 하나를 사용하여 분석할 수 있다. 한정하는 것은 아니지만 이하를 포함하는 시판의 SPR 장치 중 어느 하나를 본 발명에서 사용할 수 있다: Biacore AB제의 BIAcore 장치(Uppsala, Sweden); Affinity Sensors제의 IAsysdivise(Franklin, MA.); Windsor Scientific Limited제의 IBIS 시스템(Berks, UK); 일본 레이저 전자제의 SPR-CELLIA시스템(홋카이도, 일본); 및 Texas Instruments사제의 SPR Detector Spreeta(Dallas, TX). SPR에 기초하는 기법의 개략적인 설명에 대해서는, 이하를 참조하기 바란다: Mullet et al.(2000) "Surface Plasmon Resonance-Based Immunoassays," Methods 22: 77-91; Dong et al.(2002) "Some new aspects in biosensors," Reviews in MoI. Biotech. 82: 303-23; Fivash et al.(1998) "BIAcore For Macromolecular Interaction," Current Opinion in Biotechnology 9: 97-101; Rich et al.(2000) "Advances In Surface

Plasmon Resonance Biosensor Analysis," Current Opinion in Biotechnology 11 : 54-61(그 전체를 참조로서 본 명세서 중에 포함함). 또한, 미국특허 제6,373,577호; 제6,289,286호; 제5,322,798호; 제5,341,215호; 제6,268,125호(그 전체를 참조로서 본 명세서 중에 포함함)에 기재된 단백질-단백질 상호작용을 측정하기 위한 SPR 장치 및 SPR에 기초하는 방법의 어느 것도 본 발명의 방법에 포함하는 것으로 한다.

[0299] 간단하게 말하면, SPR 베이스의 분석은, 결합 페어 중 일방을 표면에 고정화하는 것, 및 용액 중의 결합 페어의 타방과의 상호작용을 실시간으로 모니터링 하는 것을 포함한다. SPR은 복합체의 형성 또는 해리시에 발생하는 표면 부근에서의 용매의 굴절율의 변화를 측정하는 것에 기초하는 것이다. 고정화를 행하는 표면은 센서칩이며, 이것이 SPR 기법의 심장부가 되는 것이다. 이것은 금의 박층으로 코팅된 유리 표면으로 이루어지고, 분자의 표면으로의 결합성을 최적화하도록 설계된 특수한 표면영역의 기초를 형성한다. 여러 센서 칩이 특히 상기의 회사로부터 시판되고 있고, 이들 모두를 본 발명의 방법에서 사용할 수 있다. 센서 칩의 예로서는 BIAcore AB, Inc.로부터 시판되고 있는 것, 예를 들면 Sensor Chip CM5, SA, NTA, 및 HPA를 들 수 있다. 본 발명의 분자는, 한정되는 것은 아니지만, 이하를 포함하는, 당 기술분야에서 알려진 고정화 방법 및 화학작용을 사용하여, 센서 칩의 표면에 고정화할 수 있다: 아민기를 통한 직접 공유결합, 술프히드릴기를 통한 직접 공유결합, 아비딘 코팅 표면으로의 비오틴 결합, 탄수화물기로의 알데히드 결합, 및 히스티딘 태그를 통한 NTA칩과의 결합.

[0300] 몇개의 구체예에서는, 복수의 에피토프 결합 부위 및 경우에 따라 Fc 도메인을 포함하는 본 발명의 분자와, 항원 또는 FcγR과의 결합의 속도론적 파라미터는 BIAcore 장치(예를 들면, BIAcore 장치 1000, BIAcore Inc., Piscataway, NJ)를 사용하여 측정할 수 있다. 위에서 기술한 바와 같이(섹션 5.4.1 참조), 디아바디 분자의 적어도 1개의 에피토프 결합 부위가 FcγR을 면역 특이적으로 인식하는 경우, 및/또는 디아바디 분자가 Fc 도메인(또는 그 일부)을 포함하는 경우, 임의의 FcγR을 사용하여 본 발명의 분자의 결합을 평가할 수 있다. 특정 구체예에서는, FcγR은 FcγRIIIA, 바람직하게는 가용성의 단량체 FcγRIIIA이다. 예를 들면, 1구체예에서는, 가용성 단량체 FcγRIIIA는 링커-AVITAG 서열에 결합된 FcγRIIIA의 세포외 영역이다(미국 가출원 번호 60/439,498호, 2003년 1월 9일 출원(대리인 정리번호 11183-004-888) 및 미국 가출원 번호 60/456,041호, 2003년 3월 19일 출원을 참조하기 바란다(이들 전체를 참조로서 본 명세서 중에 포함함)). 다른 특정 구체예에서는, FcγR은 FcγRIIB, 바람직하게는 가용성의 2량체 FcγRIIB이다. 예를 들면 1구체예에서는, 가용성 2량체 FcγRIIB 단백질을 이하에 기재된 방법에 따라 조제한다: 미국 가출원 번호 60/439,709호, 2003년 1월 13일 출원(그 전체를 참조로서 본 명세서에 포함함).

[0301] 모든 면역학적 측정에 있어서, 본 발명의 분자에 의한 FcγR의 인식/결합은 복수의 도메인에 의해 영향받는다. 어떤 특정 구체예에서는, 본 발명의 분자는 복수의 에피토프 결합 도메인 중 1개를 통하여 FcγR을 면역 특이적으로 인식한다. 본 발명의 분자가 Fc 도메인(또는 그 일부)을 포함하는, 또 다른 구체예에서는, 디아바디 분자는 Fc-FcγR 상호작용을 통하여 FcγR을 면역 특이적으로 인식할 수 있다. 본 발명의 분자가 Fc 도메인(또는 그 일부)과, FcγR을 면역 특이적으로 인식하는 에피토프 결합 부위 양쪽을 포함하는, 또 다른 구체예에서는, 디아바디 분자는 에피토프 결합 도메인과 Fc 도메인(또는 그 일부) 중 한쪽 또는 양쪽을 통하여 FcγR을 인식할 수 있다. 복수의 에피토프 결합 부위 및 경우에 따라 Fc 도메인(또는 그 일부)을 포함하는 본 발명의 분자의, 항원 및/또는 FcγR에 대한 속도론적 파라미터를, BIAcore 장치를 사용하여 측정하기 위한 예시적인 분석은, 이하를 포함한다: 제 1 항원을 센서 칩 표면의 4개의 플로우 셀 중 하나에, 바람직하게는 아민 커플링 화학을 통하여 고정화하고, 그것에 의해 약 5000 반응단위(RU)의 제 1 항원이 표면에 고정화되도록 한다. 적합한 표면이 조제된 시점에서, 제 1 항원을 면역 특이적으로 인식하는 본 발명의 분자를, 바람직하게는 20㎍/mL 용액의 유속 5㎕/mL에서의 1분간의 주입에 의해, 이 표면을 통과시킨다. 이 단계에서 이 표면에 결합한 본 발명의 분자의 레벨은 일반적으로 400~700RU의 범위이다. 다음에, HBS-P 버퍼(20mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, pH 7.5) 중의 제 2 항원(예를 들면, FcγR) 또는 FcγR 수용체의 일련의 희석 계열을 표면상에 100㎕/분으로 주입한다. 상이한 제 2 항원 또는 수용체 희석물 사이에서의 분자의 재생은 바람직하게는 100mM $NaHCO_3$ pH9.4; 3M NaCl의 1회의 5초간 주입에 의해 행해진다. 당 기술분야에서 알려진 어느 재생기술도 본 발명의 방법에서 상정되어 있다.

[0302] 모든 데이터 세트가 수집된 시점에서, 얻어지는 결합곡선을, SPR 장치 제조원, 예를 들면, BIAcore사(Piscataway, NJ)로부터 공급되고 있는 컴퓨터 알고리즘을 사용하여, 포괄적으로 적합시킨다. 이들 알고리즘에서는, K_{on} 및 K_{off} 양쪽을 산출하고, 이것들로부터 겉보기 평형결합 정수 Kd를 2개의 속도정수의 비(즉, K_{off}/K_{on})로서 연역한다. 개개의 속도정수를 어떻게 해서 유도하는지에 대한 더욱 상세한 처리법은 BIAevaluaion Software Handbook(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)로부터 얻어진다. 작성한 데이터의 해석은 당 기술분야에서

알려진 어느 방법을 사용해도 실시할 수 있다. 작성한 속도론적 데이터를 해석하는 각종 방법의 개략적 설명에 대해서는, 이하를 참조하기 바란다: Myszka(1997) "Kinetic Analysis Of Macromolecular Interactions Using Surface Plasmon Resonance Biosensors," Current Opinion in Biotechnology 8: 50-7; Fisher et al.(1994) "Surface Plasmon Resonance Based Methods For Measuring The Kinetics And Binding Affinities Of Biomolecular Interactions," Current Opinion in Biotechnology 5: 389-95; O'Shannessy(1994) "Determination Of Kinetic Rate And Equilibrium Binding Constants For Macromolecular Interactions: A Critique Of The Surface Plasmon Resonance Literature," Current Opinion in Biotechnology, 5:65-71; Chaiken et α/.(1992) "Analysis Of Macromolecular Interactions Using Immobilized Ligands," Analytical Biochemistry, 201 : 197-210; Morton et al.(1995) "Interpreting Complex Binding Kinetics From Optical Biosensors: A Comparison Of Analysis By Linearization, The Integrated Rate Equation, And Numerical Integration," Analytical Biochemistry 227: 176-85; O'Shannessy et al., 1996, Analytical Biochemistry 236: 275-83(이들 전체를 참조로서 본 명세서 중에 포함함).

[0303] 바람직한 구체예에서는, SPR 분석, 예를 들면, BIAcore를 사용하여 측정한 속도론적 파라미터는, 본 발명의 분자가 기능적 분석, 예를 들면, ADCC 속에서, 어떻게 기능할지를 예측하기 위한 지표로서 사용할 수 있다. SPR 분석으로부터 취득한 속도론적 파라미터에 기초하여 본 발명의 분자의 효력을 예측하기 위한 예시적인 방법은 이하를 포함한다: 본 발명의 분자의(에피토프 결합 도메인 및/또는 Fc 도메인(또는 그 일부)을 통한) FcγRIIIA 및 FcγRIIB의 결합에 관한 Koff값을 측정하는 것; ADCC 데이터에 대하여, (1) FcγRIIIA에 대한 $K_{off}(wt)/K_{off}(mut)$; (2) FcγRIIB에 대한 $K_{off}(mut)/K_{off}(wt)$를 플롯하는 것. 1 보다도 높은 수치가 야생형과 비교하여, FcγRIIIA에 대한 감소한 해리속도, 및 FcγRIIB에 대한 증가한 해리속도를 나타내고, 증대한 ADCC 기능을 갖는 것을 나타낸다.

[0304] **5.5. 본 발명의 디아바디 분자의 제조방법**

[0305] 본 발명의 디아바디 분자는, 당 기술분야에서 주지의 각종 방법에 의해 제조할 수 있고, de novo 단백질 합성, 결합 단백질을 코딩하는 핵산의 재조합 발현과 같은 방법이 있다. 원하는 핵산 서열은 재조합법(예를 들면, 원하는 폴리뉴클레오티드의 이전에 제작된 돌연변이체의 PCR 돌연변이 유발)에 의해, 또는 고상 DNA 합성에 의해 얻을 수 있다. 통상은 재조합 발현이 사용된다. 어떤 구체예에서, 본 발명은 CD16A VH 및/또는 VL을 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 다른 구체예에서는, 본 발명은 CD32B VH 및/또는 VL을 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 유전자 코드의 축중(degeneracy)때문에, 각각의 면역 글로불린 아미노산 서열을 여러 핵산 서열이 코딩되어 있고, 본 발명은 여기에 기재하는 결합 단백질을 코딩하는 모든 핵산을 포함한다.

[0306] **5.5.1 본 발명의 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드**

[0307] 본 발명은 본 발명의 분자(폴리펩티드 및 항체를 포함함)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드도 포함한다. 당 기술분야에서 알려진 어느 하나의 방법에 의해, 본 발명의 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 취득하고, 그 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 결정할 수 있다.

[0308] 본 발명의 방법에 의해 분류되는 분자의 뉴클레오티드 서열이 결정되면, 그 뉴클레오티드 서열을 당기 술분야에서 주지의 방법, 예를 들면, 재조합 DNA 기술, 부위 특이적 돌연변이 유발, PCR 등을 사용하여 조작하고(예를 들면, 이하에 기재된 기술을 참조하기 바란다: Sambrook 등, 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 제3판, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; 및 Ausubel 등 편집, 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY(이들 모두의 전체를 참조로서 본 명세서에 포함함)), 예를 들면, 아미노산의 치환, 결실, 및/또는 삽입을 생기게 함으로써, 예를 들면, 다른 아미노산 서열을 갖는 항체를 제작할 수 있다.

[0309] 1구체예에서는, 인간 라이브러리 또는 당 기술분야에서 이용할 수 있는 그 밖의 라이브러리를 당 기술분야에서 알려진 표준적 기술에 의해 스크리닝하여, 본 발명의 분자를 코딩하는 핵산을 클로닝할 수 있다.

[0310] **5.5.2 본 발명의 분자의 재조합 발현**

[0311] 본 발명의 분자(즉, 항체)를 코딩하는 핵산 서열이 얻어진 시점에서, 이 분자를 생산하기 위한 벡터를, 재조합 DNA 기술에 의해 당 기술분야에서 주지의 기술을 사용하여 제작할 수 있다. 당업자에게 주지의 방법을 이용하여, 본 발명의 분자의 코드 서열 및 적당한 전사번역 제어 시그널을 함유하는 발현 벡터를 구축할 수 있다. 이들의 방법으로서는, 예를 들면, in vitro 재조합 DNA 기술, 합성 기술, 및 in vivo 유전적 재조합을 들

수 있다(예를 들면, Sambrook 등, 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 제2판, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 및 Ausubel 등 편, 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY에 기재되는 기술을 참조하기 바람).

[0312] 본 발명의 방법에 의해 동정된 분자의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터는 종래기술(예를 들면, 일렉트로포레이션, 리포솜 트랜스펙션, 및 인산칼슘 침강)에 의해 숙주세포에 도입하고, 이어서 트랜스펙트한 세포를 종래기술에 의해 배양하여, 본 발명의 분자를 생산시킬 수 있다. 특정 구체예에서는, 본 발명의 분자의 발현을 구성적, 유도성, 또는 조직 특이적인 프로모터에 의해 제어한다.

[0313] 본 발명의 방법에 의해 동정된 분자를 발현시키기 위해서 이용하는 숙주세포는 세균세포, 예를 들면, 대장균(Escherichia coli)이거나, 또는 바람직하게는, 특히 완전한 재조합 면역 글로불린 분자를 발현시키기 위해서는, 진핵세포일 수 있다. 특히, 포유동물 세포, 예를 들면, 차이니즈 햄스터 난소 세포(CHO)는, 인간 사이토메갈로 바이러스 유래의 주요 중간 초기 유전자 프로모터 엘리먼트 등의 벡터와의 병용에 있어서, 면역 글로불린을 위한 유효한 발현 시스템이다(Foecking et al.(1986) "Powerful And Versatile Enhancer-Promoter Unit For Mammalian Expression Vectors," Gene 45:101-106; Cockett et al.(1990) "High Level Expression Of Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases In Chinese Hamster Ovary Cells Using Glutamine Synthetase Gene Amplification," Biotechnology 8:662-667).

[0314] 여러 숙주-발현 벡터계를 이용하여, 본 발명의 방법에 의해 동정된 분자를 발현시킬 수 있다. 이러한 숙주-발현 시스템는 본 발명의 분자의 코드 서열을 생산하고, 계속해서 정제할 수 있는 비히클에 상당하지만, 적당한 뉴클레오티드 코드 서열에 의해 형질전환 또는 트랜스펙트 되면 본 발명의 분자를 in situ로 발현할 수 있는 세포에도 상당한다. 이것들로서는 한정되는 것은 아니지만, 이하의 것을 들 수 있다: 예를 들면, 본 발명의 방법에 의해 동정된 분자의 코드 서열을 함유하는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터에 의해 형질전환된 세균(예를 들면, 대장균(E.coli)이나 고초균(B. subtilis) 등)의 미생물; 본 발명의 방법에 의해 동정된 분자를 코딩하는 서열을 함유하는 재조합 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모(예를 들면, 사카로미세스, 피키아속); 본 발명의 방법에 의해 동정된 분자를 코딩하는 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들면, 바큘로바이러스)를 감염시킨 곤충 세포계; 본 발명의 방법에 의해 동정된 분자를 코딩하는 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들면, 콜리플라워 모자이크 바이러스(CaMV) 및 담배 모자이크 바이러스(TMV))를 감염시킨 또는 재조합 플라스미드 발현 벡터(예를 들면, Ti 플라스미드)로 형질전환된 식물 세포계; 또는 포유동물 세포의 게놈 유래의 프로모터(예를 들면, 메탈로티오네인 프로모터) 또는 포유동물 바이러스 유래의 프로모터(예를 들면, 아데노 바이러스 후기 프로모터; 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터)를 함유하는 재조합 발현 컨스트럭트를 보유하는 포유동물 세포계(예를 들면, COS, CHO, BHK, 293, 293T, 3T3 세포, 림프구(미국특허 제5,807,715호를 참조), Per C.6 세포(Crucell에 의해 개발된 인간 망막 세포)).

[0315] 세균계에서는, 발현되는 분자에 대하여 의도되는 용도에 따라, 많은 발현 벡터를 유리하게 선택할 수 있다. 예를 들면, 항체의 의약 조성물을 조제하기 위하여 대량의 단백질을 생산시킬 필요가 있는 경우에는, 용이하게 정제되는 융합 단백질 산물의 고레벨의 발현을 지령하는 벡터가 바람직하다. 이러한 벡터로서는, 한정되는 것은 아니지만, 항체 코드 서열을 벡터 중에 lacZ 코드 영역과 함께 인 프레임으로 개별적으로 연결하여 융합 단백질이 생산되도록 하는 대장균 발현 벡터 pUR278(Ruther et al.(1983) "Easy Identification Of cDNA Clones," EMBO J. 2:1791-1794); pIN 벡터(Inouye et al.(1985) "Up-Promoter Mutations In The lpp Gene Of Escherichia Coli," Nucleic Acids Res. 13:3101-3110; Van Heeke et al.(1989) "Expression Of Human Asparagine Synthetase In Escherichia Coli," J. Biol. Chem. 24:5503-5509) 등을 들 수 있다. 또한 pGEX 벡터를 사용하여, 외래 폴리펩티드를 글루타티온S-트랜스페라제(GST)와의 융합 단백질로서 발현시킬 수도 있다. 일반적으로, 이러한 융합 단백질은 가용성이며, 용해한 세포로부터, 매트릭스 글루타티온-아가로스 비드에의 흡착 및 결합, 계속해서 유리 글루타티온의 존재하에서의 용출에 의해 용이하게 정제할 수 있다. pGEX 벡터는 트롬빈 또는 Xa 인자 프로테아제 절단부위를 포함하도록 설계되어 있고, 그 결과, 클로닝된 표적 유전자 산물을 GST 성분으로부터 절리하는 것이 가능하다.

[0316] 곤충계에 있어서는, 오토그라파칼리포니카 핵다각체병 바이러스(*Autographa* californica nuclear polyhedrosis virus)(ACNPV)가 외래 유전자를 발현시키기 위한 벡터로서 이용된다. 이 바이러스는 스포도프테라프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포 속에서 증식한다. 항체 코드 서열을 바이러스의 비필수 영역(예를 들면, 폴리헤드린 유전자) 중에 개별적으로 클로닝하여, AcNPV 프로모터(예를 들면, 폴리헤드린 프로모터)의 제어하에 배치시킬 수 있다.

[0317] 포유동물 숙주세포에서는, 많은 바이러스 베이스의 발현 시스템를 이용할 수 있다. 아데노바이러스를 발현 벡터로서 사용하는 경우에는, 원하는 항체 코드 서열을, 아데노바이러스 전사/번역 제어 복합체, 예를 들면, 후기 프로모터 및 3분절(tripartite) 리더 서열과 연결할 수 있다. 이 키메라 유전자를 뒤따라 아데노바이러스 게놈에 in vitro 또는 in vivo 재조합에 의해 삽입할 수 있다. 바이러스 게놈의 비필수 영역(예를 들면, E1 또는 E3 영역)으로의 삽입에 의해, 감염한 숙주 내에서 생존 가능하고 또한 면역 글로불린 분자를 발현할 수 있는 재조합 바이러스가 얻어진다(예를 들면, Logan et al.(1984) "Adenovirus Tripartite Leader Sequence Enhances Translation OfmRNAs Late After Infection," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 :3655-3659를 참조하기 바람). 특정 개시 시그널도, 삽입한 항체 코드 서열의 효율적인 번역을 위해 필요할 수 있다. 이들 시그널은 ATG 개시 코돈 및 인접 서열을 포함한다. 또한, 개시코돈은 전체 인서트의 번역을 확실하게 하기 위하여, 원하는 코드 서열의 리딩 프레임과 동일한 페이즈로 되어야 한다. 이들 외인성 번역 제어 시그널 및 개시코돈은 여러 기원이어도 되고, 천연이어도 합성이어도 된다. 발현의 효율은 적절한 전사 인헨서 엘리먼트, 전사 터미네이터 등을 포함시킴으로써 증강할 수 있다(Bitter et al.(1987) "Expression And Secretion Vectors For Yeast," Methods in Enzymol. 153:516-544를 참조).

[0318] 또한, 삽입한 서열의 발현을 모듈레이트하거나, 유전자 산물을 원하는 특정 양식으로 개변 또는 프로세싱하거나 하는 숙주세포주를 선택할 수 있다. 이러한 단백질 산물의 수식(예를 들면, 글리코실화) 및 프로세싱(예를 들면, 절단)은 단백질의 기능에 있어서 중요할 수 있다. 예를 들면, 특정 구체예에서는, 본 발명의 디아바디 분자를 포함하는 폴리펩티드는 단일 유전자 산물로서(예를 들면, 단일 폴리펩티드 사슬로서, 즉 폴리 단백질 전구체로서) 발현시킬 수 있지만, 이러한 단일 유전자 산물은 본 발명의 디아바디 분자의 별개인 폴리펩티드를 형성하기 위하여 천연의 또는 재조합의 세포 기구에 의한 단백질 분해 절단을 필요로 한다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드를 포함하는 폴리 단백질 전구체 분자를 코딩하는 핵산 서열(이 폴리 단백질 전구체의 번역 후 절단을 지령할 수 있는 코드 서열을 포함함)을 유전자 공학적으로 제작하는 것을 포함한다. 폴리 단백질 전구체의 번역 후 절단은 본 발명의 폴리펩티드를 야기시킨다. 본 발명의 폴리펩티드를 포함하는 전구체 분자의 번역 후 절단은 in vivo(즉, 천연의 또는 재조합의 세포계/기구, 예를 들면, 적절한 부위에서의 푸린 절단에 의하여 숙주세포 내)에서 일어나도 되고, in vitro(예를 들면, 기지의 활성 프로테아제 또는 펩티다제를 포함하는 조성물 및/또는 원하는 단백질 분해작용을 촉진하는 것이 알려져 있는 조건 또는 시약을 포함하는 조성물 중에서의 이 폴리펩티드 사슬의 인큐베이션)에서 일어나도 된다. 재조합 단백질의 정제 및 수식은 당 기술분야에서 잘 알려져 있어, 폴리 단백질 전구체의 설계에는 당업자가 용이하게 이해할 수 있는 몇개의 구체예가 포함된다. 상기의 전구체 분자의 수식을 위해서는 당 기술분야에서 알려진 프로테아제 또는 펩티다제를 사용할 수 있고, 예를 들면, 트롬빈(아미노산 서열 LVPR^GS(**서열번호 89**)를 인식함), 또는 Xa 인자(아미노산 서열 I(E/D)GR^(**서열번호 90**)을 인식하는(Nagai et al.(1985) "Oxygen Binding Properties Of Human Mutant Hemoglobins Synthesized In Escherichia CoIi," Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82:7252-7255, and reviewed in Jenny et al.(2003) "A Critical Review Of The Methods For Cleavage Of Fusion Proteins With Thrombin And Factor Xa," Protein Expr. Purif. 31 :1-11; 그 전체 내용을 참조로서 본 명세서에 포함함)), 엔테로키나제(아미노산 서열 DDDDK^(**서열번호 91**)를 인식하는(Collins-Racie et al.(1995) "Production Of Recombinant Bovine Enterokinase Catalytic Subunit In Escherichia CoIi Using The Novel Secretory Fusion Partner DsbA," Biotechnology 13:982-987; 그 전체 내용을 참조로서 본 명세서에 포함함)), 푸린(아미노산 서열 RXXR^을 인식하고, RX(K/R)R^을 우선적으로 인식하는(각각 **서열번호 92 및 서열번호 93**)(P6 위치의 추가의 R은 절단을 촉진하는 것 같음)), 및 AcTEV(아미노산 서열 ENLYFQ^G(**서열번호 94**)를 인식하는(Parks 등, 1994, "Release of Proteins and Peptides from Fusion Proteins Using a Recombinant Plant Virus Proteinase" Anal. Biochem. 216: 413-417; 그 전체 내용을 참조로서 본 명세서에 포함함)), 및 구제역 바이러스 프로테아제 C3이 사용된다. 예를 들면, 섹션 6.4를 참조.

[0319] 각각의 숙주세포는 단백질 및 유전자 산물의 번역 후 프로세싱 및 수식에 대한 특징적 또한 특이적인 기구를 갖는다. 적당한 세포주 또는 숙주계를 선택함으로써, 발현되는 외래 단백질의 올바른 수식과 프로세싱을 확실하게 할 수 있다. 이 때문에, 1차 전사물의 적절한 프로세싱, 유전자 산물의 글리코실화 및 인산화를 위한 세포기구를 갖는 진핵 숙주세포를 사용할 수 있다. 이러한 포유동물 숙주세포로서는, 한정되는 것은 아니지만, CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 및 T47D, CRL7030 및 Hs578Bst를 들 수 있다.

[0320] 재조합 단백질을 장기간, 고수율로 생산시키기 위해서는, 안정한 발현이 바람직하다. 예를 들면, 본 발명의 항체를 안정하게 발현하는 세포주를 유전자 공학적으로 제작할 수 있다. 바이러스의 복제 기점을 함유하는 발현

벡터를 사용하는 것 보다도 오히려, 선택 마커 및 적당한 발현 제어 엘리먼트(예를 들면, 프로모터, 인헨서 서열, 전사 터미네이터, 폴리아데닐화 부위 등)에 의해 제어되는 DNA로 숙주세포를 형질전환 한다. 외래 DNA를 도입한 후에, 유전자 조작한 세포를 부화 배지 중에서 1~2일간 증식시키고, 이어서 선택 배지로 전환한다. 재조합 플라스미드 중의 선택 마커는 선택에 대한 내성을 부여하므로, 세포가 안정하게 플라스미드를 그 염색체 중에 편입시키고, 증식하여 중심을 형성하고, 계속해서 클로닝하여 세포주로 증가시키는 것이 가능하다. 이 방법은, 본 발명의 항체를 발현하는 세포주를 유전자 공학적으로 제작하기 위하여 유리하게 사용할 수 있다. 이러한 유전자공학적으로 제작된 세포주는 본 발명의 분자와 직접적 또는 간접적으로 상호작용하는 화합물을 스크리닝하여 평가하는 점에서 특히 유용하다.

[0321] 많은 선택계를 이용할 수 있고, 그것들에는, 한정되는 것은 아니지만, 이하의 것이 포함된다: 단순 헤르페스 바이러스 디미딘 키나제(Wigler et al.(1977) "Transfer Of Purified Herpes Virus Thymidine Kinase Gene To Cultured Mouse Cells," Cell 11 : 223-232), 히포크산틴구아닌 포스포리보실 트랜스페라제(Szybalska et al.(1992) "Use Of The HPRT Gene And The HAT Selection Technique In DNA-Mediated Transformation Of Mammalian Cells: First Steps Toward Developing Hybridoma Techniques And Gene Therapy," Bioessays 14: 495-500), 및 아데닌포스포리보실 트랜스페라제(Lowy et al.(1980) "Isolation Of Transforming DNA: Cloning The Hamster aprt Gene," Cell 22: 817-823) 유전자는 각각 tk-, hgprt-또는 aprt-세포에서 사용할 수 있다. 또, 대사 길항 물질 내성은 이하의 유전자를 선택하기 위한 기초로서 사용할 수 있다: 메토트랙사이트 내성을 주는 dhfr(Wigler et al.(1980) "Transformation Of Mammalian Cells With An Amplifiable Dominant-Acting Gene," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3567-3570; O'Hare et al.(1981) "Transformation Of Mouse Fibroblasts To Methotrexate Resistance By A Recombinant Plasmid Expressing A Prokaryotic Dihydrofolate Reductase," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527-1531); 미코페놀산 내성을 주는 gpt(Mulligan et al.(1981) "Selection For Animal Cells That Express The Escherichia coli Gene Coding For Xanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072-2076); 아미노 글리코시드 G-418 내성을 주는 neo(Tolstoshev(1993) "Gene Therapy, Concepts, Current Trials And Future Directions," Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan(1993) "The Basic Science Of Gene Therapy," Science 260:926-932; and Morgan et al.(1993) "Human Gene Therapy," Ann. Rev. Biochem. 62:191-217); 및 히그로마이신 내성을 주는 hygro(Santerre et al.(1984) "Expression Of Prokaryotic Genes For Hygromycin B And G418 Resistance As Dominant-Selection Markers In Mouse L Cells," Gene 30: 147-156). 재조합 DNA 기술의 분야에서 일반적으로 알려지는 이용 가능한 방법은 Ausubel et al.(eds.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; and in Chapters 12 and 13, Dracopoli et al.(eds), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY.; Colberre-Garapin et al.(1981) "A New Dominant Hybrid Selective Marker For Higher Eukaryotic Cells," J. MoI. Biol. 150:1-14에 기재되어 있다.

[0322] 본 발명의 분자의 발현 레벨은 벡터 증폭에 의해 증가시킬 수 있다(개요에 대해서는, Bebbington 및 Hentschel, 「DNA 클로닝에 있어서의 포유동물 세포에서의 클론화 유전자의 발현을 위한 유전자 증폭에 기초하는 벡터의 이용(The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning)」, Vol.3, Academic Press, New York, 1987을 참조하기 바람). 항체를 발현하는 벡터계 중의 마커가 증폭가능할 때, 숙주세포의 배양물 중에 존재하는 저해제의 레벨을 증가시키면, 마커 유전자의 복사수가 증가할 것이다. 증폭된 영역은 디아바디 분자의 폴리펩티드의 뉴클레오티드 서열과 결부되어 있으므로, 이 폴리펩티드의 생산도 증가할 것이다(Crouse et al.(1983) "Expression And Amplification Of Engineered Mouse Dihydrofolate Reductase Minigenes," MoI. Cell. Biol. 3:257-266).

[0323] 숙주세포는, 본 발명의 2개의 발현 벡터, 즉, 디아바디 분자의 제 1 폴리펩티드를 코딩하는 제 1 벡터 및 디아바디 분자의 제 2 폴리펩티드를 코딩하는 제 2 벡터로 동시 트랜스펙트 할 수 있다. 이들 2개의 벡터는, 양쪽 폴리펩티드의 동등한 발현을 가능하게 하는 동일한 선택 마커를 함유해도 된다. 또는, 양쪽 폴리펩티드를 코딩하는 단일 벡터를 사용해도 된다. 본 발명의 분자의 폴리펩티드를 코딩하는 서열은 cDNA 또는 게놈 DNA일 수 있다.

[0324] 본 발명의 분자(즉, 디아바디)가 재조합에 의해 발현된 시점에서, 이것을, 당 기술분야에서 공지의, 폴리펩티드, 폴리 단백질 또는 디아바디를 정제하기 위한 당 기술분야에서 공지의 방법(항원 선택성에 기초하는 항체 정제 스킴과 유사)의 어느 하나로 정제할 수 있다. 이러한 정제법으로서, 예를 들면, 크로마토그래피(예를 들면, 이온교환, 친화성, 특히(임의이며, 디아바디 분자가 Fc 도메인 또는 그 일부를 포함하는 경우에는 단백질

A에 의한 선택의 후에) 특이적 항원에 대한 친화성에 의한 것, 및 사이징 컬럼 크로마토그래피), 원심분리, 시차 용해도, 또는 폴리펩티드, 폴리 단백질 또는 디아바디를 정제하기 위한 다른 표준적인 기법이 있다.

[0325] **5.6. 예방 및 치료방법**

[0326] 본 발명의 분자는 FcγR에 의해 중개되는 이펙터 세포 기능(예를 들면, ADCC)이 요망되는 질환, 장애 또는 감염(예를 들면, 암, 감염성 질환)을 치료 및/또는 예방하는데 특히 유용하다. 이하에서 기술하는 바와 같이, 본 발명의 디아바디는 Fc 도메인을 포함하지 않음에도 불구하고, 이펙터 기능을 끌어내는데 항체와 유사한 기능성을 나타낼 수 있다. FcγR을 면역 특이적으로 인식하는 적어도 1개의 에피토프 결합 도메인을 포함함으로써, 디아바디 분자는 Fc-FcγR 상호작용에 유사한 FcγR 결합 및 활성을 나타낼 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 분자는 면역 이펙터 세포(예를 들면, NK 세포)상의 세포 표면 항원과 FcγR(예를 들면, FcγRIIIA)과 결합하고, 이 세포에 대하여 이펙터 기능(예를 들면, ADCC, CDC, 식작용, 옵소닌화 등)을 자극한다.

[0327] 다른 구체예에서, 본 발명의 디아바디 분자는 Fc 도메인(또는 그 일부)을 포함하는 것이다. 이러한 구체예에서는, Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인(또는 그 일부)에 대하여 적어도 1개의 아미노산 수식을 더 포함하고, 또한/또는 1 이상의 IgG 아이소타입(예를 들면, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4) 유래의 도메인을 포함할 수 있다. 변이형 Fc 도메인을 포함하는 본 발명의 분자는, 야생형 Fc 도메인을 포함하는 분자와 비교하여, 부여된 또는 개변된 표현형, 예를 들면, 개변된 또는 부여된 이펙터 기능 활성(예를 들면, NK 의존성 또는 마크로파지 의존성 측정으로 측정됨)을 나타낼 수 있다. 이 구체예에서, 이펙터 기능 활성이 부여 또는 개변되어 있는 본 발명의 분자는 이펙터 기능 활성의 증대된 효력이 기대되는 질환, 장애 또는 감염의 치료 및/또는 예방에 유용하다. 어떤 특정 구체예에서는, Fc 도메인(또는 그 일부)을 포함하는 본 발명의 디아바디 분자가 보체 의존성 캐스케이드를 중개한다. 이펙터 기능을 개변하는 것으로서 확인된 Fc 도메인 돌연변이체는 국제출원 WO 04/063351, 미국특허출원 공개 2005/0037000 및 2005/0064514, 미국 가출원 60/626,510(2004년 11월 10일 출원), 60/636,663(2004년 12월 15일 출원), 및 60/781,564(2006년 3월 10일 출원), 및 미국특허출원 11/271,140(2005년 11월 10일 출원), 및 11/305,787(2005년 12월 15일 출원)(본 발명자들의 동시출원)에 개시되어 있으며, 각각의 전체 내용을 참조로서 본 명세서에 포함한다.

[0328] 본 발명은, 피험자에게, 치료가 유효한 양의 1종 이상의 분자를 투여하는 것을 포함하여 이루어지는, 피험자의 암을 치료, 예방 또는 관리하기 위한 방법 및 조성물을 포함하고, 상기 분자는 1개 이상의 에피토프 결합 부위 및 경우에 따라 본 발명을 따라 유전자 조작된 Fc 도메인(또는 그 일부)을 포함하고, 또한 이 분자는 암 항원과 더욱 결합한다. 본 발명의 분자는 원발성 종양, 암세포의 전이, 및 감염성 질환의 예방, 저지, 증식 억제 또는 퇴행에 특히 유용하다. 특정 작용기구에 의해 속박되는 것은 아니지만, 본 발명의 분자는 이펙터 기능을 중개하여 종양의 소실, 종양의 억제, 또는 그 양쪽을 초래한다. 다른 구체예에서는, 본 발명의 디아바디는 세포표면 항원 및/또는 수용체의 가교 및 어팝토시스 또는 부의 증식조절의 시그널 전달의 증가에 의해 치료 활성을 중개한다.

[0329] 특정 작용기구에 의해 속박되는 것은 아니지만, 본 발명의 디아바디 분자는 당 기술분야에서 알려진 치료용 항체와 비하여 증대된 치료 효력을 나타내지만, 이것은 일부에는, 예를 들면, 디아바디-에피토프 상호작용의 향상한 결합력 때문에 표적 세포상에 보다 오래 머물러 있는 디아바디의 능력에 의해, 디아바디가 특정 항원(예를 들면, FcγR)을 저레벨로 발현하는 표적 세포와 면역 특이적으로 결합할 수 있기 때문이다.

[0330] 항원(예를 들면, FcγR)에 대한 친화성 및 결합력이 증대해 있는 본 발명의 디아바디는, 표적 세포집단에서는 FcγR이 저레벨로 발현되는 피험자에 있어서, 암 또는 다른 질환 또는 장애를 치료, 예방 또는 관리하는데 특히 유용하다. 본 명세서 중에서 사용하는 경우, 세포에서의 FcγR 발현은 세포당의 이 분자의 밀도에 의해 정의되며, 이것은 당업자에게 공지의 통상의 방법을 사용하여 측정된다. 복수의 에피토프 결합 부위, 및 경우에 따라 FcγR(또는 그 일부)을 포함하는 본 발명의 분자는 또한, 바람직하게는, 표적 항원(예를 들면, 암 항원)을 30,000~20,000분자/세포의 밀도로, 20,000~10,000 분자/세포의 밀도로, 10,000분자/세포 또는 그 이하의 밀도로, 5000분자/세포 또는 그 이하의 밀도로, 또는 1000분자/세포 또는 그 이하의 밀도로 발현하는 세포에 있어서, 결합력 및 친화성 및/또는 이펙터 기능이 부여되어 있거나, 또는 증대되어 있다. 본 발명의 분자는, 표적 세포 집단에서는 표적 항원이 저레벨로 발현되는 아집단에 있어서, 암과 같은 질환 또는 장애를 치료, 예방 또는 관리하는데 특별히 이용된다.

[0331] 본 발명의 분자는 또한 암, 자가면역 질환, 염증성 질환, 또는 감염성 질환과 같은 질환을 치료 또는 예방하기 위한 당 기술분야에서 공지의 다른 치료약으로 조합하여, 유리하게 사용할 수도 있다. 특정, 구체예에서는, 본 발명의 분자를, 예를 들면, 이 분자와 상호작용하여 면역응답을 높이는 이펙터 세포의 수 또는 활성을 증가시키

는데 도움이 되는, 조혈성 증식 인자(예를 들면, IL-2, IL-3 및 IL-7 등), 림포카인, 또는 모노클로날 또는 키메라 항체와 병용해도 된다. 본 발명의 분자는 또한 질환, 장애, 또는 감염을 치료하기 위하여 사용하는 1종 이상의 약물, 예를 들면, 항암제, 항염증제 또는 항바이러스제와 조합하여 유리하게 이용할 수도 있고, 이것들은, 예를 들면, 이하의 섹션 5.7에 상세하게 기술된다.

[0332] 5.6.1. 암

[0333] 본 발명은, 피험자에게 치료상 유효한 양의, 복수의 에피토프 결합 도메인을 포함하는 1종 이상의 분자를 투여하는 것을 포함하는, 피험자의 암을 치료 또는 예방하기 위한 방법 및 조성물을 포함한다. 몇개의 구체예에서, 본 발명은 FcγR 다형을 갖는 피험자(예를 들면, FcγRIIIA-158V 또는 FcγRIIIA-158F 대립 유전자에 대하여 호모 접합성의 피험자)의 암을 치료 또는 예방하기 위한 방법 및 조성물을 포함한다. 몇개의 구체예에서, 본 발명은 FcγRIIIA(158F)와 면역 특이적으로 결합하는, 디아바디 분자의 적어도 1개의 에피토프 결합 도메인을 공학적으로 조작하는 것을 포함한다. 다른 구체예에서는, 본 발명은 FcγRIIIA(158V)과 면역 특이적으로 결합하는, 디아바디 분자의 적어도 1개의 에피토프 결합 도메인을 공학적으로 조작하는 것을 포함한다.

[0334] 표준적인 단일 클론 항체 요법의 효력은 피험자의 FcγR 다형에 의존한다(Cartron et al.(2002) "Therapeutic Activity Of Humanized Anti-CD20 Monoclonal Antibody And Polymorphism In IgG Fc Receptor FcRIIIa Gene," Blood 99: 754-758; Weng et al.(2003) "Two Immunoglobulin G Fragment C Receptor Polymorphisms Independently Predict Response To Rituximab In Patients With Follicular Lymphoma," J Clin Oncol. 21(21):3940-3947; 이 양자의 전체를 참조로서 본 명세서에 포함함). 이들 수용체는 이펙터 세포의 표면상에 발현되어, ADCC를 중개한다. 저친화성의 활성화 수용체의 고친화성 대립 유전자는 ADCC를 중개하는 이펙터 세포의 능력을 개선한다. Fc-FcγR 상호작용에 의지하여 이펙터 기능을 달성하는 것과는 대조적으로, 본 발명의 방법은, 저친화성의 활성화 수용체를 면역 특이적으로 인식하도록 분자를 조작하여, 이 분자를 특정 다형용으로 설계하는 것을 포함한다. 이것과는 별도로, 또는 이것에 더하여, 본 발명의 분자는 이펙터 세포상의 FcγR에 대하여(야생형 Fc 도메인과 비교하여) 증대한 친화성을 나타내는 변이형 Fc 도메인을 포함하도록 조작해도 된다. 본 발명의 조작된 분자는 환자에 대하여 그 FcγR 다형에 관계없이, 보다 좋은 면역요법 시약을 제공한다.

[0335] 본 발명에 따라 제작된 디아바디 분자는 배양 세포계 또는 환자 유래의 PMBC 세포를 사용한 ADCC에 의해 시험하여, ADCC를 증대시키는 Fc 돌연변이체의 능력을 판정한다. 본 명세서에 개시한 방법을 사용하여, 표준적 ADCC를 실시한다. Ficoll-Paque 구배(Pharmacia)를 사용하여, 림프구를 말초혈로부터 회수한다. 표적 세포(즉, 배양 세포계 또는 환자 유래의 세포)에 유로퓸(PerkinElmer)을 부하하고, 이펙터와 함께 37℃에서 4시간 인큐베이트 한다. 형광 플레이트 리더(Wallac)를 사용하여, 방출된 유로퓸을 검출한다. 얻어진 ADCC 데이터는 NK 세포 개재 세포 상해를 유발하는 본 발명의 분자의 효력을 나타내고, 어느 분자가 환자 샘플 및 세정한(elutriated) 단구 양쪽을 사용하여 시험할 수 있는지를 입증한다. 그 후, ADCC 활성을 유발시키는데 최대의 능력을 나타내는 디아바디 분자를 환자 유래의 PBMC를 사용한 ADCC 분석으로 시험한다. 건강한 도너 유래의 PBMC가 이펙터 세포로서 사용된다.

[0336] 따라서 본 발명은, 암 항원을 면역 특이적으로 인식하는 디아바디 분자를 제작함으로써, 암 항원에 의해 특징지어지는 암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하지만, 이 디아바디 분자는 그것 자체가 세포 상해성(어팝토시스 또는 증식성 시그널의 다운 레귤레이션을 증대시키는 세포표면 수용체의 가교에 따름)이며, 또한/또는 본 발명에 따라 Fc 도메인을 포함하고, 또한/또는 1 이상의 이펙터 기능(예를 들면, ADCC, 식작용)을 중개하도록 제작된다. 본 발명에 따라 제작된 디아바디는 세포 상해 활성(예를 들면, 증대한 종양세포 살상 및/또는 증대한 ADCC 활성 또는 CDC 활성)을 가지므로, 암의 예방 또는 치료에 유용하다.

[0337] 암 항원을 수반하는 암은 암 항원에 결합하고 또한 세포 상해성이며, 또한/또는 본 발명의 방법에 따라 조작함으로써 증대한 이펙터 기능을 나타내는 디아바디의 투여에 의해 치료 또는 예방할 수 있다. 예를 들면, 한정하는 것은 아니지만, 이하의 암 항원을 수반하는 암을 본 발명의 방법 및 조성물에 의해 치료 또는 예방할 수 있다: KS 1/4 범암종 항원(Perez et al.(1989) "Isolation And Characterization Of A Cdna Encoding The Ksl/4 Epithelial Carcinoma Marker," J. Immunol. 142:3662-3667; Miller et al.(1991) "Bispecific-Monoclonal-Antibody-Directed Lysis Of Ovarian Carcinoma Cells By Activated Human T Lymphocytes," Cancer Immunol. Immunother. 33(4):210-216), 난소암 항원(CA125)(Yu et al.(1991) "Coexpression Of Different Antigenic Markers On Moieties That Bear CA 125 Determinants," Cancer Res. 51(2):468-475), 전립선 산성 포스페이트(Tailor et al.(1990) "Nucleotide Sequence Of Human Prostatic Acid Phosphatase Determined From A Full-Length cDNA Clone," Nucl. Acids Res. 18(16):4928), 전립선 특이적 항원(Henttu et al.(1989) "cDNA Coding

For The Entire Human Prostate Specific Antigen Shows High Homologies To The Human Tissue Kallikrein Genes," Biochem. Biophys. Res. Comm. 10(2):903-910; Israeli et al.(1993) "Molecular Cloning OfA Complementary DNA Encoding A Prostate-Specific Membrane Antigen," Cancer Res. 53:227-230), 흑색종 관련 항원 p97(Estin et al.(1989) " Tr ansfected Mouse Melanoma Lines That Express Various Levels Of Human Melanoma-Associated Antigen p97 ," J. Natl. Cancer Instit. 81(6):445-454), 흑색종 항원 gp75(Vijayasardahl et al.(1990) "The Melanoma Antigen Gp75 Is The Human Homologue Of The Mouse B(Brown) Locus Gene Product," J. Exp. Med. 171(4): 1375-1380), 고분자량 흑색종 항원(HMW-MAA)(Natali et al.(1987) "Immunohistochemical Detection Of Antigen In Human Primary And Metastatic Melanomas By The Monoclonal Antibody 140.240 And Its Possible Prognostic Significance," Cancer 59:55-63; Mittelman et al.(1990) "Active Specific Immunotherapy In Patients With Melanoma. A Clinical Trial With Mouse Antiidiotypic Monoclonal Antibodies Elicited With Syngeneic Anti-High-Molecular-Weight-Melanoma-Associated Antigen Monoclonal Antibodies," J. Clin. Invest. 86:2136-2144), 전립선 특이적 막 항원, 암태아성 항원(CEA)(Foon et al.(1995) "Immune Response To The Carcinoembryonic Antigen In Patients Treated With An Anti-Idiotype Antibody Vaccine," J. Clin. Invest. 96(1):334-42), 다형성 상피 뮤신 항원, 인간 유지방 소공 항원, 결직장 종양 관련 항원(예를 들면, CEA, TAG-72(Yokota et al.(1992) "Rapid Tumor Penetration Of A Single-Chain Fv And Comparison With Other Immunoglobulin Forms," Cancer Res. 52:3402-3408), CO17-1A(Ragnhammar et al.(1993) "Effect Of Monoclonal Antibody 17-1 A And GM-CSF In Patients With Advanced Colorectal Carcinoma -Long-Lasting, Complete Remissions Can Be Induced," Int. J. Cancer 53:751-758); GICA 19-9(Herlyn et al.(1982) "Monoclonal Antibody Detection Of A Circulating Tumor-Associated Antigen. I. Presence Of Antigen In Sera Of Patients With Colorectal, Gastric, And Pancreatic Carcinoma," J. Clin. Immunol. 2:135-140), CTA-1 및 LEA, 버키트 림프종 항원-38. 13, CD19(Ghetie et al.(1994) "Anti-CD 19 Inhibits The Growth Of Human B-CeIl Tumor Lines In Vitro And Of Daudi Cells In SCID Mice By Inducing Cell Cycle Arrest," Blood 83:1329-1336), 인간B-림프종 항원-CD20(Reff et al.(1994) "Depletion Of B Cells In Vivo By A Chimeric Mouse Human Monoclonal Antibody To CD20," Blood 83:435-445) , CD33(Sgouros et al.(1993) "Modeling And Dosimetry Of Monoclonal Antibody MI 95(Anti-CD33) In Acute Myelogenous Leukemia," J. Nucl. Med. 34:422-430), 흑색종 특이적 항원(예를 들면, 강글리오시드 GD2(Saleh et al.(1993) "Generation Of A Human Anti-Idiotypic Antibody That Mimics The GD2 Antigen," J.Immunol., 151, 3390-3398), 강글리오시드 GD3(Shitara et al.(1993) "A Mouse/Human Chimeric Anti-(Ganglioside GDS) Antibody With Enhanced Antitumor Activities," Cancer Immunol. Immunother. 36:373-380), 강글리오시드 GM2(Livingston et al.(1994) "Improved Survival In Stage III Melanoma Patients With GM2 Antibodies: A Randomized Trial Of Adjuvant Vaccination With GM2 Ganglioside," J. Clin. Oncol. 12:1036-1044), 강글리오시드 GM3(Hoon et al.(1993) "Molecular Cloning OfA Human Monoclonal Antibody Reactive To Ganglioside GM3 Antigen On Human Cancers," Cancer Res. 53:5244-5250), 종양 특이적 이식형 세포표면 항원(TSTA)(예를 들면, DNA 종양 바이러스의 T 항원 및 RNA 종양 바이러스의 포락선 항원을 비롯한 바이러스 유발 종양 항원 등), 종양 태아 항원-알파페토프로틴(예를 들면, 결장의 CEA), 방광종양 태아 항원(Hellstrom et al.(1985) "Monoclonal Antibodies To Cell Surface Antigens Shared By Chemically Induced Mouse Bladder Carcinomas," Cancer. Res. 45:2210-2188), 분화 항원(예를 들면, 인간 폐암 항원 L6, L20(Hellstrom et al.(1986) "Monoclonal Mouse Antibodies Raised Against Human Lung Carcinoma," Cancer Res. 46:3917-3923), 섬유 육종의 항원, 인간 백혈병 T세포 항원-Gp37(Bhattacharya-Chatterjee et al.(1988) "Idiotype Vaccines Against Human T Cell Leukemia. II. Generation And Characterization OfA Monoclonal Idiotype Cascade(AbI, Ab2, andAb3)," J. Immunol. 141 :1398-1403), 신생 당단백질, 스핀골리피드, 유방암 항원(예를 들면, EGFR(표피성장 인자 수용체)), HER2 항원($p185^{HER2}$), 다형상피 뮤신(PEM)(Hilkens et al.(1992) "Cell Membrane-Associated Mucins And Their Adhesion-Modulating Property," Trends in Biochem. Sci. 17:359-363), 악성 인간 림프구 항원-APO-1(Trauth et al.(1989) "Monoclonal Antibody-Mediated Tumor Regression By Induction Of Apoptosis," Science 245:301-304), differentiation antigen(Feizi(1985) "Demonstration By Monoclonal Antibodies That Carbohydrate Structures Of Glycoproteins And Glycolipids Are Onco-Developmental Antigens," Nature 314:53-57)(예를 들면, 태아 적혈구 및 초기 내배엽 중의 I 항원), 위선암 중의 I(Ma), 유방 상피 중의 M18 및 M39, 골수세포 중의 SSEA-1, 결직장암 중의 VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5 및 D156-22, TRA-1-85(혈액형 H), 결장선암 중의 C14, 폐선암중의 F3, 위암중의 AH6, 배아성 암세포 중의 Y 하프텐인 Le^{Y}, TL5(혈액형 A), A431 세포 중의 EGF 수용체, 췌장암 중의 E_1 시리즈(혈액형 B), 배아성 암세포

중의 FC10.2, 위선암 항원, 선암 중의 CO-514(혈액형 Le^a), 선암 중의 NS-10, CO-43(혈액형 Le^b), G49, EGF 수용체, 결장선암 중의 MH2(혈액형 ALe^b/Le^y), 결장암, 위암 뮤신 중의 19.9, 골수세포 중의 T_5A_7, 흑색종 중의 R_{24}, 배아성 암세포 중의 4.2, G_{D3}, D1.1, OFA-1, G_{M2}, OFA-2, G_{D2}, 및 M1:22:25:8, 및 4~8 세포 배아 중의 SSEA-3 및 SSEA-4. 다른 구체예에서는, 항원은 피부 T 세포 림프종으로부터의 T 세포 수용체 유래 펩티드이다 (Edelson(1998) "Cutaneous T-Cell Lymphoma: A Model For Selective Immunotherapy," Cancer J Sci Am. 4:62-71 참조).

[0338] 본 발명의 방법 및 조성물에 의해 치료 또는 예방할 수 있는 암 및 이것에 관련되는 질환에는, 한정되는 것은 아니지만, 이하가 포함된다: 백혈병(한정되는 것 은 아니지만, 급성 백혈병, 급성 림프성 백혈병, 급성 골수성 백혈병(골수아구성, 전골수공성, 골수 단구성, 단구성, 적백혈구성 백혈병, 및 척수형성 이상증후군 등), 만성 백혈병(한정되는 것은 아니지만, 만성 골수성(과립구) 백혈병, 만성 림프성 백혈병, 털세포 백혈병 등)); 진성 적혈구 증가증; 림프종(한정되는 것은 아니지만, 호지킨병, 비호지킨병 등); 다발 골수종(한정되는 것은 아니지만, 비정형적 다발 골수종, 비분비성 골수종, 골경화성 골수종, 형질세포 백혈병, 고립성 형질세포종 및 수외성 형질세포종 등); 발덴스트롬 마쿠로글로불린혈증; 특징 미확정의 단클론 글로불린 혈증; 양성 단클론 글로불린 혈증; 중쇄병; 골 및 결합조직 육종(한정되는 것은 아니지만, 골부 육종, 골육종, 연골 육종, 이윙육종, 악성 거세포종, 골의 선유육종, 척삭종, 골막 육종, 연조직 육종, 혈관종(혈관육종), 선유육종, 카포시 육종, 평활근 육종, 지방육종, 림프관 육종, 신경초종, 횡문근육종, 활막 육종 등; 뇌종양(한정되는 것은 아니지만, 글리오마, 성상세포종, 뇌간 글리오마, 상의세포종, 희돌기 글리오마, 비글리알종, 청신경초종, 두개인두종, 수아종, 수막종, 송과체종, 송과체아종, 초발 뇌림프종 등); 유방암(한정되는 것은 아니지만, 선암, 소엽(소세포)암, 관내암, 수양 유방암, 점액 유방암, 관상 유방암, 유두암, 페이젯병, 및 염증성 유방암 등); 부신암, (한정되는 것은 아니지만, 크롬 친화성 세포종 및 부신피질암 등); 갑상선암(한정되는 것은 아니지만, 유두성 또는 소포성 갑상선암, 수양 갑상선암 및 미분화 갑상선암 등); 췌장암, (한정되는 것은 아니지만, 췌도세포종, 가스트리노마, 글루카고노마, 비포마, 소마토스타틴 분비 종양, 및 카시노이드 또는 췌도세포 종양 등): 하수체암(한정되는 것은 아니지만, 쿠싱병, 프로락틴 분비 종양, 말단비대증, 및 요붕증 등); 눈의 암(한정되는 것은 아니지만, 홍채흑색종, 맥락막 흑색종, 및 모양체 흑색종 등의 안부 흑색종, 및 망막아종 등; 질암(한정되는 것은 아니지만, 편평상피암, 선암, 및 흑색종 등); 외음부암(한정되는 것은 아니지만, 편평상피암, 흑색종, 선암, 기저악성종양, 육종, 및 패젯병 등); 자궁경부암(한정되는 것은 아니지만, 편평상피암, 및 선암 등); 자궁암(한정되는 것은 아니지만, 자궁내막암 및 자궁육종 등); 난소암(한정되는 것은 아니지만, 난소상피암, 경계성 종양, 배세포 종양, 및 간질종양 등); 식도암(한정되는 것은 아니지만, 편평상피암, 선암, 선양낭포암, 점막표피암, 선편평상피암, 육종, 흑색종, 형질세포종, 우상암, 및 연맥세포(소세포)암 등); 위암(한정되는 것은 아니지만, 선암, 균상(폴립상), 궤양성, 표재성, 확산성, 악성 림프종, 지방육종, 선유육종, 및 암육종 등); 결장암; 직장암; 간암(한정되는 것은 아니지만, 간악성종양 및 간아종 등); 담낭암(한정되는 것은 아니지만, 선암 등); 담관암(한정되는 것은 아니지만, 유두형, 결절성, 및 확산성 등); 폐암(한정되는 것은 아니지만, 비소세포 폐암, 편평상피암(표피암), 선암, 대악성종양 및 소세포 폐암 등); 정소암(한정되는 것은 아니지만, 배종양, 정령표피종, 미분화성, 고전적(전형적), 정자세포, 비정상피종, 태아성암, 기형종, 융모암(난황낭종양) 등); 전립선암(한정되는 것은 아니지만, 선암, 평활근육종, 및 횡문근육종 등); 음경암; 구강암(한정되는 것은 아니지만, 편평상피암 등); 기저암; 타액선암(한정되는 것은 아니지만, 선암, 점막표피암, 및 선양낭포암 등); 인두암(한정되는 것은 아니지만, 편평상피암, 및 우상암 등); 피부암(한정되는 것은 아니지만, 기저악성종양, 편평상피암 및 흑색종, 표재성 흑색종, 결절성 흑색종, 악성흑자흑색종, 말단성 흑자성 흑색종 등); 신장암(한정되는 것은 아니지만, 신장악성종양, 선암, 부신종, 선유육종, 이행성 악성종양(신골반 및/또는 자궁)); 바리어스 종양; 방광암(한정되는 것은 아니지만, 이행성 악성종양, 편평상피암, 선암, 암육종 등). 또한, 암은 이하를 포함한다: 점액 육종, 골원성 육종, 내피 육종, 림프관 내피 육종, 중피종, 활막종, 혈관아종, 상피암, 낭포선암, 기관지원성암, 한선암, 지선암, 유두암 및 유두선암(이러한 질환의 총설에 대해서는, 이하를 참조하기 바란다: Fishman et al.(1985) Medicine, 2d Ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia; and Murphy et al.(1997) Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., United States of America).

[0339] 따라서, 본 발명의 방법 및 조성물은, 한정되는 것은 아니지만, 이하를 포함하는 다양한 암 또는 그 밖의 이상 증식성 질환의 치료 또는 예방에서도 유용하다: 암(방광, 유방, 결장, 신장, 간장, 폐, 난소, 취장, 위, 전립선, 자궁경부, 갑상선 및 피부의 암을 포함함); 편평상피암 등; 림프조혈계 종양, 예를 들면, 백혈병, 급성 림프성 백혈병, 급성 림프성 백혈병, B세포 림프종, T세포 림프종, 버키트 림프종 등; 골수조혈계 종양, 예를

들면, 급성 및 만성 골수성 백혈병 및 전골수공성 백혈병 등; 간엽 기원의 종양, 예를 들면, 선유 육종 및 횡문근 육종 등; 그 밖의 종양, 예를 들면, 흑색종, 정령표피종, 기형암, 신경아종 및 글리오마 등; 중추 및 말초신경계의 종양, 예를 들면, 성장세포종, 신경아종, 글리오마, 및 신경초종 등; 간엽 기원의 종양, 예를 들면, 선유 육종, 횡문근육종, 및 골육종 등; 및 그 밖의 종양, 예를 들면, 흑색종, 색소성 건혈증(, 각화 가시세포종, 정령표피종, 갑상선 소포암 및 기형암 등. 어팝토시스의 이상에 기인하는 암도 본 발명의 방법 및 조성물에 의해 치료할 수 있는 것으로 상정된다. 이러한 암으로서, 한정되는 것은 아니지만 이하가 포함된다: 소포종, p53 돌연변이를 수반하는 암, 유방, 전립선 및 난소의 호르몬 의존성 종양, 및 가족성 선종님 폴립증 및 척수형성 이상 증후군 등의 전암성 병변. 특정 구체예에서는, 난소, 방광, 유방, 결장, 폐, 피부, 췌장 또는 자궁에 있어서, 악성질환 또는 증식 이상변화(이형성 및 형성부전 등), 또는 과잉증식성 질환을 본 발명의 방법 및 조성물에 의해 치료 또는 예방한다. 다른 특정 구체예에서는, 육종, 흑색종, 또는 백혈병을 본 발명의 방법 및 조성물에 의해 치료 또는 예방한다.

[0340] 특정 구체예에서는, 본 발명의 분자(예를 들면, 복수의 에피토프 결합 도메인, 및 임의로 Fc 도메인 또는 그 일부를 포함하는 디아바디)는, 암 세포의 증식을, 본 발명의 이 분자의 부재하에서의 암 세포의 증식과 비교하여, 적어도 99%, 적어도 95%, 적어도 90%, 적어도 85%, 적어도 80%, 적어도 75%, 적어도 70%, 적어도 60%, 적어도 50%, 적어도 45%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 35%, 적어도 30%, 적어도 25%, 적어도 20%, 또는 적어도 10% 억제하거나 또는 감소시킨다.

[0341] 특정 구체예에서는, 본 발명의 분자(예를 들면, 복수의 에피토프 결합 도메인, 및 임의로 Fc 도메인 또는 그 일부를 포함하는 디아바디)는, 친분자보다도, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 100% 많게, 세포를 살상하거나, 암 세포의 증식을 억제 또는 경감한다.

[0342] **5.6.2. 자가면역 질환 및 염증성 질환**

[0343] 몇개의 구체예에서, 본 발명의 분자는, 본 발명 방법에 따라 조작된, FcγRIIB에 특이적인 에피토프 결합 도메인 및/또는 변이형 Fc 도메인(또는 그 일부)을 포함하고, 이 Fc 도메인이 야생형 Fc 도메인과 비교하여 보다 큰 FcγRIIB에 대한 친화성, 및 저하된 FcγRIIIA 및/또는 FcγRIIA에 대한 친화성을 나타낸다. 그러한 결합특성을 갖는 본 발명의 분자는 면역 응답의 조절, 예를 들면, 자가면역 질환 또는 염증성 질환에 관련되는 면역응답의 억제에 있어서 유용하다. 어느 작용기구에도 구속되는 것을 의도하지 않지만, FcγRIIB에 대한 친화성을 갖는 및/또는 증대한 FcγRIIB에 대한 친화성과 저하된 FcγRIIIA 및/또는 FcγRIIA에 대한 친화성을 갖는 Fc 도메인을 포함하는, 본 발명의 분자는 FcγR에 대한 활성화 응답을 약화시키고, 또한 세포응답성의 억제를 초래하여, 따라서 자가면역 질환의 치료 및/또는 예방에 있어서 치료 효력을 갖는다고 생각된다.

[0344] 본 발명은 또한 피험자에 있어서의, 염증성 장애에 관련되는 1 이상의 증상을 예방하고, 치료하고, 또는 관리하는 방법을 제공하고, 이 방법은 1 이상의 항염증약의, 치료상 또는 예방상 유효한 양을 피험자에게 투여하는 것을 더 포함한다. 본 발명은 또한 자가면역 질환에 관련되는 1 이상의 증상을 예방하고, 치료하고, 또는 관리하는 방법을 제공하고, 이 방법은, 1 이상의 면역조절약의 치료상 또는 예방상 유효한 양을 피험자에게 투여하는 것을 더 포함한다. 섹션 5.7은 항염증약 및 면역조절약의 비한정적인 예를 게재한다.

[0345] 본 발명의 분자를 투여함으로써 치료할 수 있는 자가면역 장애의 예는, 한정 되는 것은 아니지만, 원형탈모증, 경직성 척추염, 항인지질 증후군, 자가면역 애디슨병, 부신의 자가면역 질환, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 자가면역 난소염 및 고환염, 자가면역 혈소판 감소증, 베체트병, 수포성류 천포창, 심근증, 셀리악 스프루 피부염(celiac sprue-dermatitis), 만성피로 면역기능 장애 증후군(CFIDS), 만성 염증성 탈수성 다발성 신경장애, 척-스트라우스 증후군, 반흔성류 천포창, CREST 증후군, 한랭응집소병, 클론병, 원판상 낭창, 본태성 혼합 클리오 글로불린 혈증, 선유근통-선유근염, 사구체 신염, 그레이브스병, 길랑-바레, 교본갑상선염, 특발성 폐선유증, 특발성 혈소판 감소성 자반병(ITP), IgA 신경 장애, 청년성 관절염, 편평태선, 홍반성 낭창, 메니에르병, 혼합 결합조직병, 다발성 경화증, I형 또는 면역을 통한 당뇨병, 중증 근무력증, 심상성 천포창, 악성 빈혈, 결절성 다발성 동맥염, 다발성 연골염, 다선 증후군, 류머티즘성 다발성 근통, 다발성 근염 및 피부근염, 원발성 무감마글로불린혈증, 원발성 담즙성 간경변, 건선, 건선성 관절염, 레이노 현상, 라이터 증후군, 관절류머티즘, 사르코이도시스, 강혈증, 쇼그렌 증후군, 스티프만 증후군, 전신성 에리테마토수스, 에리테마토수스, 타카야수 동맥염, 측두 동맥염/거세포성 동맥염, 궤양성 대장염, 포도막염, 포진상피부염 맥관염과 같은 혈관염, 백반, 및 베게너 육아종증을 포함한다. 염증성 장애의 예는, 한정되는 것은 아니지만, 천식, 뇌염, 염증성 장질환, 만성 폐색성 폐질환(COPD), 알레르기 장애, 패혈증 쇼크, 폐선유증, 미분화 척추관절증, 미분화

관절증, 관절염, 염증성 골용해, 및 만성적인 바이러스 또는 세균 감염으로부터 생기는 만성 염증을 포함한다. 본 명세서의 섹션 2.2.2에 기재된 바와 같이, 몇개의 자가면역 장애는 염증성 장애와 관련되어 있다. 이와 같이, 자가면역 장애로 생각되는 장애와 염증성 장애로 생각되는 장애 사이에는 중복이 있다. 따라서, 몇개의 자가면역 장애는 염증성 장애로서도 특징지을 수 있다. 본 발명의 방법에 따라서 예방, 치료 또는 관리할 수 있는 염증성 장애의 예로서는, 한정되는 것은 아니지만, 천식, 뇌염, 염증성 장질환, 만성 폐색성 폐질환(COPD), 알레르기 장애, 패혈증 쇼크, 폐선유증, 미분화 척추관절증, 미분화 관절증, 관절염, 염증성 골용해, 및 만성적인 바이러스 또는 세균 감염으로부터 생기는 만성 염증을 들 수 있다.

[0346] FcγRIIB에 특이적인 적어도 1개의 에피토프 결합 도메인 및/또는 증대한 FcγRIIB 친화성 및 저하된 FcγRIIIA 친화성을 갖는 변이형 Fc 도메인을 포함하는 본 발명의 분자는 또한, 염증성 장애가 있는 동물(특히 포유동물)이 받는 염증을 경감하기 위하여 사용할 수도 있다. 특정 구체예에서는, 본 발명의 분자는 동물의 염증을 상기 분자를 투여받지 않은 동물의 염증과 비교하여, 적어도 99%, 적어도 95%, 적어도 90%, 적어도 85%, 적어도 80%, 적어도 75%, 적어도 70%, 적어도 60%, 적어도 50%, 적어도 45%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 35%, 적어도 30%, 적어도 25%, 적어도 20%, 또는 적어도 10% 경감한다.

[0347] FcγRIIB에 특이적인 적어도 1개의 에피토프 결합 도메인 및/또는 증대된 FcγRIIB 친화성 및 저하된 FcγRIIIA 친화성을 갖는 변이형 Fc 도메인을 포함하는 본 발명의 분자는 또한, 이식의 거절반응을 방지하기 위하여 사용할 수도 있다.

[0348] **5.6.3. 감염성 질환**

[0349] 본 발명은 또한, 피험자에게 있어서의 감염증의 치료 또는 예방의 방법을 포함하고, 이 방법은, 감염증과 관련된 감염성 병원체에 특이적인 적어도 1개의 에피토프 결합 도메인을 포함하는, 1종 이상의 본 발명의 분자의 치료상 또는 예방상 유효한 양을 투여하는 것을 포함한다. 특정 구체예에 있어서, 본 발명의 분자는 감염성 병원체에 대하여 독성이며, 이 분자의 부재하에서의 면역 응답과 비교하여, 이 병원체에 대한 면역 응답을 증강하거나, 또는 이 병원체에 대한 이펙터 기능을 증강한다. 본 발명의 분자에 의해 치료 또는 예방할 수 있는 감염증은, 한정되는 것은 아니지만, 바이러스, 세균, 진균, 원충, 및 바이러스를 포함하는 감염성 병원체에 의해 야기된다.

[0350] 본 발명의 방법과의 관련에서, 본 발명의 분자를 사용하여 치료 또는 예방할 수 있는 바이러스성 질환은, 한정되는 것은 아니지만, A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 수두 바이러스, 아데노 바이러스, I형 단순 헤르페스 바이러스(HSV-I), II형 단순 헤르페스 바이러스(HSV-II), 우역 바이러스, 라이노 바이러스, 에코 바이러스, 로타 바이러스, 호흡기 합포체 바이러스, 파필로마 바이러스, 파포바 바이로스, 사이토메갈로 바이러스, 에키노 바이러스, 아르보 바이러스, 훈타 바이러스, 콕사키 바이러스, 유행성 이하선염 바이러스, 홍역 바이러스, 풍진 바이러스, 폴리오 바이러스, 천연두 바이러스, 엡스타인-바 바이러스, I형 인간 면역결핍 바이러스(HIV-I), II형 인간 면역결핍 바이러스(HIV-II), 및 바이러스성 수막염, 뇌염, 뎅기열 또는 천연두와 같은 바이러스성 질환의 병원체에 의해 야기되는 것을 포함한다.

[0351] 본 발명의 방법과의 관련에서, 본 발명의 분자를 사용하여 치료 또는 예방할 수 있는 세균성 질환은, 한정되는 것은 아니지만, 마이코박테리아, 리케차, 마이코플라즈마, 나이세리아, 폐렴 구균(S. pneumonia), 라임병 보렐리아(Borrelia burgdorferi)(라임병), 탄저균(탄저병), 파상풍균, 스트렙토코쿠스, 스타필로코쿠스, 마이코박테리움, 파상풍균, 백일해균, 콜레라균, 페스트균, 디프테리아균, 클라미디아, 황색 포도상 구균(S. aureus) 및 레지오넬라균을 포함하는 세균에 의해 야기되는 것을 포함한다.

[0352] 본 발명의 방법과의 관련에서, 본 발명의 분자를 사용하여 치료 또는 예방할 수 있는 원충성 질환은, 한정되는 것은 아니지만, 리슈마니아, 콕시지움(kokzidioa), 트리파노소마 또는 말라리아 원생충을 포함하는 원충에 의해 야기된다.

[0353] 본 발명의 방법과의 관련에서, 본 발명의 분자를 사용하여 치료 또는 예방할 수 있는 기생충성 질환은, 한정되는 것은 아니지만, 클라미디아 리케차를 포함하는 기생충에 의해 야기된다.

[0354] 본 발명의 1개의 구체예에 의하면, 감염성 병원체에 특이적인 적어도 1개의 에피토프 결합 도메인을 포함하는 본 발명의 분자는, 이 병원체(예를 들면, 병원성 단백질)에 대한 항체 이펙터 기능을 나타낸다. 감염성 병원체의 예로서, 한정되는 것은 아니지만, 세균(예를 들면, 대장균(Escherichia coli), 폐렴간균(Klebsiella pneumoniae), 황색 포도상 구균(Staphylococcus aureus), 장구균(Enterococcus faecials), 칸디다알비칸스(Candida albicans), 프로테우스불가리스(Proteus vulgaris), 스타필로코쿠스비리단스(Staphylococcus

viridans) 및 슈도모나스아에루기노사(Pseudomonas aeruginosa)), 병원체(예를 들면, B림프구 향성 파포바 바이러스(LPV); 보르다텔라페르투시아(Bordatella pertussis); 보르나병 바이러스(BDV); 소 코로나바이러스; 맥락수막염 바이러스; 뎅기열 바이러스; 바이러스, 대장균; 에볼라; 에코 바이러스1; 에코 바이러스11(EV); 엔도톡신(LPS); 장내 세균; 장내 고아 바이러스; 장내 바이러스; 고양이 백혈병 바이러스; 수족구병 바이러스; 긴팔원숭이 백혈병 바이러스(GALV); 그램 음성 세균; 헬리코박터파일로리(Heliocacter pylori); B형 간염 바이러스(HBV); 단순 헤르페스 바이러스; HIV-1; 인간 사이토메갈로 바이러스; 인간 코로나 바이러스, 인플루엔자 A, B 및 C; 레지오넬라균; 리슈마니아멕시카나(Leishmania mexicana); 리스테리아모노사이토게네스(Listeria monocytogenes); 홍역 바이러스; 수막염균; 마진 바이러스; 마우스 간염 바이러스; 마우스 백혈병 바이러스; 마우스 감마헤르페스 바이러스; 마우스 레트로 바이러스; 마우스 코로나 바이러스; 마우스 간염 바이러스; 미코박테리움알비움M(Mycobacterium avium-M); 임균(Neisseria gonorrhoeae); 뉴캐슬병 바이러스; 바르보 바이러스 B19; 열대열 말라리아 원충; 폭스 바이러스; 슈도모나스; 로타 바이러스; 살로넬라티피뮤리움(Samonella typhiurium); 적리균; 연쇄구균; T-세포 림프구 바이러스1; 백시니아 바이러스)을 들 수 있다.

[0355] **5.6.4. 해독**

[0356] 본 발명은 또한 독소(예를 들면, 독성의 약물 분자)에 노출된 피험자의 해독 방법을 포함하며, 이 방법은, 독성의 약물 분자에 특이적인 적어도 1개의 에피토프 결합 도메인을 포함하는 1종 이상의 본 발명의 분자의 치료상 또는 예방상 유효한 양을 투여하는 것을 포함한다. 특정한 구체예에서, 본 발명의 분자의 독소로의 결합은 이 독소의 유해한 생리학적 작용을 경감 또는 배제한다. 또 다른 구체예에서는, 본 발명의 디아바디의 독소에의 결합은, 이 디아바디의 부재하에서의 독소의 제거, 분해 또는 중화와 비교하여, 독소의 제거, 분해 또는 중화를 증대 또는 증강한다. 본 발명의 방법에 따른 면역 독소 요법은, 디곡신, PCP, 코카인, 콜히친, 3환식 항울약을 포함하는데, 이것들에 한정되는 약물의 과잉투여 또는 이 약물에 대한 폭로를 치료하기 위하여 사용할 수 있다.

[0357] **5.7. 병용 요법**

[0358] 본 발명은 또한, 한정되는 것은 아니지만, 현행의 표준적 및 실험적 화학 요법, 호르몬 요법, 생물학적 요법, 면역 요법, 방사선 요법 또는 외과수술을 포함하는, 암, 자가면역 질환, 감염증, 또는 중독의 치료 또는 예방에 대하여 당업자에게 알려진 그 밖의 요법과 병용하여, 본 발명의 분자를 투여하는 것을 포함한다. 몇개의 구체예에서는, 본 발명의 분자를, 치료상 또는 예방상 유효한 양의 1종 이상의 약제, 치료용 항체, 또는 암, 자가면역 질환, 감염증, 또는 중독의 치료 및/또는 예방에 대하여 당업자에게 알려진 다른 약제와 병용하여, 투여할 수 있다.

[0359] 특정 구체예에서는, 1종 이상의 본 발명의 분자를, 암의 치료에 유용한 그 밖의 1종 이상의 치료약과 동시에, 포유동물, 바람직하게는 인간에게 투여한다. 「동시에」라는 용어는, 예방약 또는 치료약의 정확한 동시투여에 한정되는 것이 아니고, 오히려 본 발명의 분자와 그 밖의 약제를 포유동물에게 연속적 또한 일정한 시간간격 이내에 투여해서, 본 발명의 분자가 그 밖의 약제와 함께 작용하여, 이것들을 각각 투여한 경우보다도 증대된 이익을 제공하도록 한 것을 의미한다. 예를 들면, 예방 또는 치료용(예를 들면, 화학 요법, 방사선 요법, 호르몬 요법 또는 생물학적 요법) 약의 각각을, 동시에, 또는 임의의 순서로 연속적으로, 상이한 시점에서 투여할 수 있다. 그러나, 동시에 투여하지 않는 경우에는, 원하는 치료 또는 예방 효과가 제공되도록, 시간적으로 충분히 근접시켜서 투여해야 한다. 각 치료약은, 임의의 적절한 형태로, 또한 임의의 적합한 경로로, 각각 투여할 수 있다. 여러 구체예에서는, 예방약 또는 치료약을 아하와 같이 투여한다: 1시간 미만의 간격, 약 1시간 간격, 약 1시간~약 2시간 간격, 약 2시간~ 약 3시간 간격, 약 3시간~약 4시간 간격, 약 4시간~약 5시간 간격, 약 5시간~약 6시간 간격, 약 6시간~약 7시간 간격, 약 7시간~약 8시간 간격, 약 8시간~약 9시간 간격, 약 9시간~약 10시간 간격, 약 10시간~약 11시간 간격, 약 11시간~약 12시간 간격, 24시간 간격 이하 또는 48시간 간격 이하. 바람직한 구체예에서는, 2종 이상의 성분을 환자의 동일 내진시에 투여한다.

[0360] 다른 구체예에서는, 예방약 또는 치료약을 약 2~4일 간격, 약 4~6일 간격, 약 1주간 간격, 약 1~2주간 간격, 2주간 이상의 간격으로 투여한다. 바람직한 구체예에서는, 예방약 또는 치료약을 양쪽 약제가 여전히 활성인 시간범위 내에, 투여한다. 당업자라면, 투여하는 약제의 반감기를 측정함으로써, 이러한 시간을 결정할 수 있을 것이다.

[0361] 특정 구체예에서는, 본 발명의 예방약 또는 치료약을, 피험자에게 주기적으로 투여한다. 주기적 치료에는, 제 1 약제를 어떤 기간 투여한 후, 제 2 약제 및/또는 제 3 약제를 어떤 기간 투여하고, 이 연속 투여를 반복하는 것을 포함한다. 주기적 치료는, 1종 이상의 요법에 대한 내성의 진행을 감소시켜, 요법의 1개의 부작용을 회피하거나 또는 감소시키거나, 또한/또는 치료의 효력을 향상시킬 수 있다.

[0362] 어떤 구체예에서는, 예방약 또는 치료약을, 약 3주간 미만의 주기로, 약 2주간마다 1회, 약 10일마다 1회, 또는 약 1주간마다 1회 투여한다. 1주기에는, 주기마다 약 90분간, 주기마다 약 1시간, 주기마다 약 45분간 걸쳐서 주입하는 것에 의한, 치료약 또는 예방약의 투여가 포함된다. 각 주기는 적어도 1주간의 중지, 적어도 2주간의 중지, 적어도 3주간의 중지기를 포함한다. 투여하는 주기의 회수는 약 1~약 12주기, 보다 전형적으로는 약 2~약 10주기, 보다 전형적으로는 약 2~약 8주기이다.

[0363] 또 다른 구체예에서는, 본 발명의 치료 및 예방약을, 메트로놈적 투약 방식으로, 장기의 중지 기간을 두지 않는 연속주입 또는 빈번 투여 중 어느 하나에 의해 투여한다. 이러한 메트로놈적 투여에는, 중지 기간이 없는, 일정한 간격으로의 투약이 포함될 수 있다. 전형적으로는, 치료약, 특히 세포 상해약을 저용량으로 사용한다. 이러한 투약 방식에는, 장기간의 비교적 저용량의 연일 투여가 포함된다. 바람직한 구체예에서는, 저용량의 사용은 독성 부작용을 최소로 하여, 중지 기간을 배제할 수 있다. 특정 구체예에서는, 치료 및 예방약은, 이하의 범위에서, 연일 저용량 투여 또는 연속주입에 의해 송달된다: 약 24시간부터 약 2일까지, 약 1주간까지, 약 2주간까지, 약 3주간까지, 약 1개월까지, 약 2개월까지, 약 3개월까지, 약 4개월까지, 약 5개월까지, 약 6개월까지. 이러한 투약 방식의 스케줄은 종양 전문가가 최적화 할 수 있다.

[0364] 다른 구체예에서는, 복수의 치료 코스를 포유동물에 동시에 투여한다. 즉, 개별의 용량의 치료약을 각각 투여하지만, 본 발명의 분자가 다른 약제와 협동하여 작용할 수 있는 것과 같은 시간간격 내에 투여한다. 예를 들면, 어떤 성분을 1주간에 1회 투여하고, 그것과 조합하여, 다른 성분을 2주간마다 1회, 또는 3주간마다 1회 투여해도 된다. 바꿔 말하면, 치료약의 투약 레지멘은, 치료약이 동시에 또는 환자의 동일 내진시에 투여되지 않을 때조차, 동시에 실시된다.

[0365] 다른 예방 및/또는 치료약과 병용하는 경우, 본 발명의 분자와 다른 예방 및/또는 치료약은 상가적으로, 보다 바람직하게는 상승적으로, 작용할 수 있다. 1개의 구체예에서는, 본 발명의 분자를 1 이상의 치료약과 함께 동일한 의약 조성물 중에서 동시에 투여한다. 다른 구체예에서는, 본 발명의 분자를 1 이상의 치료약과 함께 각각의 의약 조성물로서 동시에 투여한다. 또 다른 구체예에서는, 본 발명의 분자를, 다른 예방 또는 치료약의 투여 전, 또는 그 후에 투여한다. 본 발명은, 동일 또는 다른 투여경로, 예를 들면, 경구 및 비경구로, 본 발명의 분자를 다른 예방 또는 치료약과 병용하여 투여하는 것을 상정하고 있다. 특정 구체예에서는, 본 발명의 분자를, 한정하는 것은 아니지만, 독성 등의 유해부 작용을 초래할 가능성이 있는 다른 예방 또는 치료약과 동시에 투여하는 경우, 그 예방 또는 치료약은 유해부 작용이 유발되는 임계값보다 낮은 용량으로 투여하는 것이 유리하다.

[0366] 본 명세서에서 제공하는 투약량 및 투여 빈도는 치료상 유효한 및 예방상 유효하다는 용어에 의해 포함되어 있다. 투약량 및 빈도는 또한, 전형적으로는 각 환자에게 특유한 요인에 따라, 투여하는 특정 치료 또는 예방약, 암의 중독도 및 타입, 투여 경로, 및 환자의 연령, 체중, 응답성, 및 과거의 병력에 따라, 변경된다. 바람직한 치료계획은, 이러한 요인을 고려하고, 예를 들면, 문헌에 보고되어, 또 이하에서 추장되고 있는 투약량을 따름으로써, 당업자가 선택할 수 있는 것이다: Physician's Desk Reference(제56판, 2002).

[0367] **5.7.1. 항암제**

[0368] 특정 구체예에서는, 본 발명의 방법은, 1 이상의 본 발명의 분자를, 암의 치료 및/또는 예방을 위해 사용되는 1 이상의 치료약과 함께 투여하는 것을 포함한다. 1개의 구체예에서는, 혈관 신생 저해약을 본 발명의 분자와 병용하여 투여할 수 있다. 본 발명의 방법 및 조성물 중에서 사용할 수 있는 혈관 신생 저해약으로서는 한정되는 것은 아니지만 이하가 포함된다: 안지오스타틴(Angiostatin)(플라스미노겐 단편); 항혈관 신생 항트롬빈III; 안지오자임(Angiozyme); ABT-627; Bay 12-9566;베네핀(Benefin); 베바시주마브(Bevacizumab); BMS-275291; 연골유래 저해약(CDI); CAI; CD59 보체 단편; CEP-7055; Col 3; 콤브레타스타틴(Combretastatin)A-4; 엔도스타틴(콜라겐XVIII 단편); 피브로넥틴 단편; Gro-β; 할로푸기논(Halofuginone); 헤파리나제류; 헤파린 헥사사카라이드 단편; HMV833; 인간 융모성 고나도트로핀(hCG); IM-862; 인터페론 α/β/γ; 인터페론 유도성 단백질(IP-10); 인터류킨-12; 크링글(Kringle)5(플라스미노겐 단편); 마리마스타트(Marimastat); 메탈로프로테이나제 저해약(TIMPs); 2-메톡시에스트라디올; MMI 270(CGS 27023A); MoAb IMC-1C11; 네오바스타트(Neovastat); NM-3; 판젬(Panzem); PI-88; 태반 리보뉴클레아제 저해제; 플라스미노겐 활성화 인자 저해제; 혈소판 인자-4(PF4); 프리노마스타트(Prinomastat); 프로락틴16kDa 단편; 프로리페린(Proliferin) 관련 단백질(PRP); PTK787/ZK 222594; 레티노이드; 솔리마스타트(Solimastat); 스쿠알라민(Squalamine); SS3304; SU5416; SU6668; SU11248; 테트라히트로코르티졸-S; 테트라티오몰리브데이트; 탈리도마이드; 트롬보스폰딘-1(TSP-1); TNP-470; 트랜스포밍 증식 인자β(TGF-b); 바스큘로스타틴(Vasculostatin); 바소스타틴(Vasostatin)(칼레티큘린 단편); ZD6126; ZD6474; 파르네실 트랜스페라제 저해약(FTI); 및 비스포스포네이트류.

[0369] 본 발명의 의약 조성물 및 제형 및 키트를 포함하는, 본 발명의 각종 구체예에서 본 발명의 분자와 병용하여 사용할 수 있는 항암약으로서는, 한정되는 것은 아니지만, 이하가 포함된다: 아시비신(acivicin); 아클라루비신(aclarubicin); 염산아코다졸(acodazole); 아크로닌(acronine); 아도젤레신(adozelesin); 알데스류킨(aldesleukin); 알트레타민(altretamine); 암보마이신(ambomycin); 아세트산 아메탄트론(ametantrone); 아미노글루테티미드(aminoglutethimide); 암사크린(amsacrine); 아나스트로졸(anastrozole); 안트라마이신(anthramycin); 아스파라기나제; 아스페린(asperlin); 아자시티딘(azacitidine); 아제테파(azetepa); 아조토마이신(azotomycin); 바티마스타트(batimastat); 벤조데파(benzodepa); 비칼루타미드(bicalutamide); 염산비산트렌(bisantrene); 디메실산 비스타피드(bisnafide); 비젤레신(bizelesin); 황산 블레오마이신(bleomycin); 나트륨 브레퀴나르(brequinar); 브로피리민(bropirimine); 부술판(busulfan); 칵티노마이신(cactinomycin); 칼루스테론(calusterone); 카라세미드(caracemide); 카르베티머(carbetimer); 카르보플라틴(carboplatin); 카르무스틴(carmustine); 염산 카루비신(carubicin); 카르젤레신(carzelesin); 세데핀골(cedefingol); 클로람부실(chlorambucil); 시롤레마이신(cirolemycin); 시스플라스틴(cisplatin); 클라드리빈(cladribine); 메실산 크리스나톨(crisnatol); 시클로포스파미드; 시타라빈(cytarabine); 다카르바진(dacarbazine); 닥티노마이신(dactinomycin); 염산 다우노루비신(daunorubicin); 데시타빈(decitabine); 덱소르마플라틴(dexormaplatin); 데자구아닌(dezaguanine); 메실산 데자구아닌(dezaguanine); 디아지퀴온(diaziquone); 도세탁셀(docetaxel); 독소루비신(doxorubicin); 염산 독소루비신(doxorubicin); 드롤록시펜(droloxifene); 시트르산 드롤록시펜(droloxifene); 프로피온산 도로모스타놀론(dromostanolone); 두아조마이신(duazomycin); 에다트렉세이트(edatrexate); 염산 에플로르니틴(eflornithine); 엘사미트루신(elsamitrucin); 엔로플라틴; 엔프로메이트(enpromate); 에피프로피딘(epipropidine); 염산 에피루비신(epirubicin); 에르불로졸(erbulozole); 염산 에소루비신(esorubicin); 에스트라무스틴(estramustine); 인산 에스트라무스틴(estramustine)나트륨; 에타니다졸(etanidazole); 에토포시드(etoposide); 인산 에토포시드(etoposide); 에토프린(etoprine); 염산 파드로졸(fadrozole); 파자라빈(fazarabine) 펜레티니드(fenretinide); 플록수리딘(floxuridine); 인산 플루다라빈(fludarabine); 플루오로우라실; 플루로시타빈(flurocitabine); 포스퀴돈(fosquidone); 나트륨 포스트리에신(fostriecin); 겜시타빈(gemcitabine); 염산 겜시타빈(gemcitabine); 히드록시우레아; 염산 이다루비신(idarubicin); 이포스파미드(ifosfamide); 일모포신(ilmofosine); 인터류킨II(재조합 인터류킨II, 또는 rIL2를 포함함), 인터페론 α-2a; 인터페론 α-2b; 인터페론 α-nl; 인터페론 α-n3; 인터페론 β-Ia; 인터페론 γ-Ib; 이프로플라틴(iproplatin); 염산 이리노테칸(irinotecan); 아세트산 란레오티드(lanreotide); 레트로졸(letrozole); 아세트산 류프롤리드(leuprolide); 염산 리아로졸(liarozole); 로메트렉솔(lometrexol)나트륨; 로무스틴(lomustine); 염산 로소크산트론(losoxantrone); 마소프로콜(masoprocol); 메이스타신(maytansine); 염산 메클로레타민(mechlorethamine); 아세트산 메게스트롤(megestrol); 아세트산 멜렌게스트롤(melengestrol); 멜팔란(melphalan); 메노가릴(menogaril); 메르캅토푸린; 메토트렉세이트; 나트륨메토트렉세이트; 메토프린(metoprine);메투레데파(meturedepa);미틴도미드(mitindomide); 미토카르신(mitocarcin); 미토크로민(mitocromin); 미토길린(mitogillin); 미토말신(mitomalcin); 마토마이신; 미토스페르(mitosper); 미토탄(mitotane); 염산 미코크산트론(mitoxantrone); 미코페놀산(mycophenolic acid); 노코다졸(nocodazole); 노갈라마이신(nogalamycin); 오르마플라틴(ormaplatin); 옥시수란(oxisuran); 파클리탁셀(paclitaxel); 페가스파르가세(pegaspargase); 펠리오마이신(peliomycin); 펜타무스틴(pentamustine); 황산 페플로마이신(peplomycin); 페르포스파미드(perfosfamide); 피포브로만(pipobroman); 피포술판(piposulfan); 염산 피로크산트론(piroxantrone); 플리카마이신(plicamycin); 플로메스탄(plomestane); 포피머(porfimer)나트륨; 포피로마이신(porfiromycin); 프레드니무스틴(prednimustine); 염산 프로카르바진(procarbazine); 퓨로마이신(puromycin); 염산 퓨로마이신(puromycin); 피라조푸린(pyrazofurin); 리보프린(riboprine); 로글레티미드(rogletimide); 사핀골(safingol); 염산사핀골(safingol); 세무스틴(semustine); 심트라젠(simtrazene); 나트륨 스파르포세이트(sparfosate); 스파르소마이신(sparsomycin); 염산 스피로게르마늄(spirogermanium); 스피로무스틴(spiromustine); 스피 플래틴(spiroplatin); 스트렙토니그린(streptonigrin); 스트렙토조신(streptozocin); 술로페누르(sulofenur); 탈리소마이신(talisomycin); 테코갈란(tecogalan)나트륨; 테가푸르(tegafur); 염산텔록산트론(teloxantrone); 테모포르핀(temoporfin); 테니포시드(teniposide); 테록시론(teroxirone); 테스토락톤(testolactone); 티아미프린(thiamiprine); 티오구아닌(thioguanine); 치오테파(thiotepa); 치아조푸린(tiazofurin); 티라파자민(tirapazamine); 시트르산 토레미펜(toremifene); 아세트산 토레스톨론(trestolone); 인산 트리시리빈(triciribine); 트리메트렉세이트(trimetrexate); 글루쿠론산 트리메트렉세이트; 트리프토렐린(triptorelin); 염산 투불로졸(tubulozole); 우라실마스타드(uracil mustard); 우레데파(uredepa); 바프레오티드(vapreotide); 베르테포르핀(verteporfin); 황산 빈블라스틴(vinblastine); 황산 빈크리스틴(vincristine); 빈데신(vindesine); 황산 빈데신(vindesine); 황산 비네피딘(vinepidine); 황산 빈

글리시네이트(vinglycinate); 황산 빈류로신(vinleurosine); 타르타르산 비노렐빈(vinorelbine); 황산 빈로시딘(vinrosidine); 황산 빈졸리딘(vinzolidine); 보로졸(vorozole); 제니플라틴(zeniplatin); 지노스타틴(zinostatin); 염산 조루비신(zorubicin). 그 밖의 항 암약으로서, 한정되는 것은 아니지만, 이하가 포함된다: 20-에피-1,25디히드록시비타민D3; 5-에티닐우라실; 아비라테론(abiraterone); 아클라루비신(aclarubicin); 아실풀벤(acylfulvene); 아데시페놀(adecypenol); 아도젤레신(adozelesin); 알데스류킨(aldesleukin); ALL-TK 길항약; 알토레타민; 암바무스틴(ambamustine); 아미독스(amidox); 아미포스틴(amifostine); 아미노레불린산; 암루비신(amrubicin); 암사크린(amsacrine); 아나그렐리드(anagrelide); 아나스트로졸(anastrozole); 안드로그라폴리드(andrographolide); 혈관형성 저해약; 길항약D; 길항약G; 안타렐릭스(antarelix); 항배방화(抗背方化) 형태 발생 단백질-1; 항안트로겐 전립선암; 항에스트로겐; 항네오플라스톤; 안티센스 올리고뉴클레오티드; 글리신산 아피디콜린(aphidicolin); 어팝토시스 유전자 모듈레이터; 어팝토시스 레귤레이터; 아푸린산; 아라-CDP-DL-PTBA; 아르기닌 데아미나제; 아술라크린(asulacrine); 아타메스탄(atamestane); 아트리무스틴(atrimustine); 악시나스타틴(axinastatin)1; 악시나스타틴2; 악시나스타틴3; 아자세트론(azasetron); 아자톡신(azatoxin); 아자티로신(azatyrosine); 바카틴III 유도체; 발라놀(balanol); 바티마스타트(batimastat); BCR/ABL 길항약; 벤조클로린류; 벤조일스타우로스포린(benzoylstaurosporine); β락탐 유도체; β알레틴(beta-alethine); β클라마이신(betaclamycin)B; 베툴린산; bFGF 저해약; 비칼루타미드(bicalutamide); 비산트렌(bisantrene); 비사지리디닐스퍼민(bisaziridinylspermine); 비스나피드(bisnafide); 비스트라텐(bistratene)A; 비젤레신(bizelesin); 브레플레이트(breflate); 브로피리민(bropirimine); 부도티탄(budotitane); 부티오닌술폭시민(buthionine sulfoximine); 칼시포트리올(calcipotriol); 칼포스틴(calphostin)C; 캄프토테신(camptothecin) 유도체; 카나리폭스(canarypox)IL-2; 카페시타빈(capecitabine); 카르복사미드-아미노-트리아졸; 카르복시아미드트리아졸; CaRest M3; CARN 700; 연골 유래 저해약; 카르젤레신(carzelesin); 카세인키나제 저해약(ICOS); 카스타노스퍼민(castanospermine); 세크로핀(cecropin)B; 세트로렐릭스(cetrorelix); 클로른(chlorlns); 클로로퀴녹살린술폰아미드; 시카프로스트(cicaprost); cis 포스피린; 클라드리빈(cladribine); 클로미펜(clomifene) 유사체; 클로트리마졸(clotrimazole); 콜리스마이신(collismycin)A; 콜리스마이신B; 콤브레타스타틴(combretastatin)A4; 콤브레타스타틴 유사체; 코나게닌(conagenin); 크람베시딘(crambescidin)816; 크리스타놀(crisnatol); 크립토피신(cryptophycin)8; 크립토피신A 유도체; 큐라신(curacin)A; 시클로펜타안트라퀴논류; 시클로플라탐(cycloplatam); 시페마이신(cypemycin); 시타라빈오크포스페이트(cytarabineocfosfate); 세포용해 인자; 시토스타틴(cytostatin); 타클릭시마브(dacliximab); 데시타빈(decitabine); 디히드로디뎀닌(dehydrodidemnin)B; 데스로레린(deslorelin); 덱사메타손(dexamethasone); 덱시포스파미드(dexifosfamide); 덱스라족산(dexrazoxane); 덱스베라파밀(dexverapamil); 디아지쿠온(diaziquone); 디뎀닌(didemnin)B; 디독스(didox); 디에틸노르스페닌(diethylnorspennine); 디히드로-5-아자시티딘; 디히드로탁솔, 9-; 디옥사마이신(dioxamycin); 디페닐스피포무스틴(diphenyl spiromustine); 도세탁셀(docetaxel); 도코사놀(docosanol); 돌라세트론(dolasetron); 독시플루리딘(doxifluridine); 드롤록시펜(droloxifene); 드로나비놀(dronabinol); 듀로카마이신(duocarmycin)SA; 에브셀렌(ebselen); 에코무스틴(ecomustine); 에델포신(edelfosine); 에드레콜로마브(edrecolomab); 에플로니틴(eflornithine); 엘레멘(elemene); 에미테푸르(emitefur); 에피루비신(epirubicin); 에프리스테리드(epristeride); 에스트라무스틴(estramustine) 유사체; 에스트로겐 작동약; 에스트로겐 길항약; 에타니다졸(etanidazole); 인산 에토포시드(etoposide); 엑세메스탄(exemestane); 파드로졸(fadrozole); 파자라빈(fazarabine); 펜레티니드(fenretinide); 필그라스팀(filgrastim); 피나스테리드(finasteride); 플라보피리돌(flavopiridol); 플레젤라스틴(flezelastine); 플루아스테론(fluasterone); 플루다라빈(fludarabine); 염산 플루오로다우노루니신(fluorodaunorunicin); 포르페니멕스(forfenimex); 포르메스탄(formestane); 포스트리에신(fostriecin); 포테무스틴(fotemustine); 텍사피린 가돌리늄(gadolinium texaphyrin); 질산 갈륨; 갈로시타빈(galocitabine); 가니렐릭스(ganirelix); 겔라티나제 저해약; 겜시타빈(gemcitabine); 글루타티온 저해약; 펩술팜(hepsulfam); 헤레굴린(heregulin); 헥사메틸렌비스아세토아미드; 하이페리신(hypericin); 이반드론산; 이다루비신(idarubicin); 이독시펜(idoxifene); 이드라만톤(idramantone); 일모포신(ilmofosine); 일모스타트(ilomastat); 이미다조아크리돈류; 이미퀴모드(imiquimod); 면역 자극 펩티드류; 인슐린 유사 성장 인자-1수용체 저해약; 인터페론 작동약; 인터페론류; 인터류킨류; 이오벤구안(iobenguane); 요오도독소루비신(iododoxorubicin); 이포메아놀(ipomeanol), 4-; 이로플락트(iroplact); 이르소글라딘(irsogladine); 이소벤가졸(isobengazole); 이소호모할리콘드린(isohomohalicondrin)B; 이타세토론(itasetron); 자스플라시놀리드(jasplakinolide); 카할랄리드(kahalalide)F; 3아세트산 라멜라린(lamellarin)-N; 란레오디드(lanreotide); 레이나마이신(leinamycin); 레노그라스팀(lenograstim); 황산 렌티난(lentinan); 렙톨스타틴(leptolstatin); 레트로졸(letrozole); 백혈병 억제 인자; 백혈구 α인터페론; 류프롤리드+에스트로겐+프로게스테론; 류프로렐린(leuprorelin); 레바미솔(levamisole); 리아로졸(liarozole); 선

상 폴리아민 유사체; 친유성 디사카라이드펩티드; 친유성 백금 화합물; 리소클리나미드(lissoclinamide)7; 로바플라틴(lobaplatin); 롬브리신(lombricine); 로메트렉솔(lometrexol); 로니다민(lonidamine); 로속산트론(losoxantrone); 로바스타틴(lovastatin); 록소리빈(loxoribine); 루르토테칸(lurtotecan); 텍사피린 루테늄(lutetium texaphyrin); 리소필린(lysofylline); 용해성 펩티드류; 마이탄신(maitansine); 만노스타틴(mannostatin)A; 마리마스타트(marimastat); 마소프로콜(masoprocol); 마스핀(maspin); 마트릴리신(matrilysin) 저해약; 매트릭스 금속 프로테이나제 저해약; 메노가릴(menogaril); 메르바론(merbarone); 메테렐린(meterelin); 메티오니나제; 메토클로프라미드(metoclopramide); MIF 저해약; 미페프리스톤(mifepristone); 밀테포신(miltefosine); 미리모스팀(mirimostim); 미스매치 이중쇄 RNA; 미토구아존(mitoguazone); 미토락톨(mitolactol); 미토마이신 유사체; 미토나피드(mitonafide); 마이토톡신 선유아 성장 인자-사포린(saporin); 미톡산트론(mitoxantrone); 모파로텐(mofarotene); 몰그라모스팀(molgramostim); 모노클론 항체, 인간 융모 고나도트로핀; 모노포스포릴리피드A+미오막테리움 세포벽sk; 모피다몰(mopidamol); 다중 약제 내성 유전자 저해약; 다발성 종양 억제 인자 1 베이스의 치료; 머스타드 항암약; 마이카퍼옥시드B; 마이코박테리아 세포벽 추출물; 미리아포론; N-아세틸디날린(acetyldinaline); N-치환 벤즈아미드류; 나파렐린(nafarelin); 나그레스팁(nagrestip); 날록손(naloxone)+펜타조신(pentazocine); 나파빈(napavin); 나프테르핀(naphterpin); 나르토그라스팀(nartograstim); 네다플라틴(nedaplatin); 네모루비신(nemorubicin); 네리드론산; 중성 엔도펩티다제; 닐루타미드(nilutamide); 니사마이신(nisamycin); 일산화질소 모듈레이터; 니트록시드 항산화제; 니트룰린(nitrullyn); 06-벤질구아닌; 옥트레오티드(octreotide); 오키세논(okicenone); 올리고뉴클레오티드류; 오나프리스톤(onapristone); 온단세트론(ondansetron); 온단세트론(ondansetron); 오라신(oracin); 경구 사이토카인 유도약; 오르마플라틴(ormaplatin); 오사테론(osaterone); 옥살리플라틴(oxaliplatin); 옥사우노마이신(oxaunomycin); 파클리탁셀(paclitaxel); 파클리탁셀 유사체; 파클리탁셀 유도체류; 팔라우아민(palauamine); 팔미토일리족신(palmitoylrhizoxin); 팔미드론산; 파낙시트리올; 파노미펜(panomifene); 파라박틴(parabactin); 파젤립틴(pazelliptine); 페가스파르가스(pegaspargase); 펠데신(peldesine); 폴리황산 펜도산 나트륨; 펜토스타틴(pentostatin); 펜트로졸(pentrozole); 퍼플루브론(perflubron); 퍼포스파미드; 페릴릴알코올; 페나지노마이신(phenazinomycin); 아세트산 페닐; 인산염 저해약; 피시바닐(picibanil); 염산 필로카르핀(pilocarpine); 피라루비신(pirarubicin); 피리트렉심(piritrexim); 플라세틴(placetin)A; 플라세틴B; 플라스미노겐 활성화 인자 저해약; 백금 복합체; 백금 화합물; 백금-트리아민 복합체; 포미머(porfimer)나트륨; 포피로마이신(porfiromycin); 프레드니손(prednisone); 프로필bis-아크리돈; 프로스타글란딘J2; 프로테아솜 저해약; 단백질A 베이스의 면역 모듈레이터; 단백질 키나제C 저해약; 단백질 키나제C 저해약류, 미크로알갈(microalgal); 단백질 티로신포스파타제 저해약; 푸린뉴클레오시드포스포릴라제 저해약; 푸르푸린류; 피라졸로아크리딘; 피리독실화 헤모글로빈 폴리옥시에틸렌 콘주게이트; raf 길항약; 랄티트렉세드(raltitrexed); 라모세트론(ramosetron); ras 파르네실 단백질 트랜스페라제 저해약; ras 저해약; ras-GAP 저해약; 탈메틸화 레텔립틴(retelliptine); 네늄 Re186 에티드로네이트; 리족신(rhizoxin); 리보자임류; RII 레티나미드; 로글레티미드(rogletimide); 로히투킨(rohitukine); 로무르티드(romurtide); 로퀴니멕스(roquinimex); 루비기논(rubiginone)B1; 루복실(ruboxyl); 사핀골(safingol); 사인토핀(saintopin); SarCNU; 사르코피톨(sarcophytol)A; 사르그라모스팀(sargramostim); Sdi 1 모방체; 세무스틴(semustine); 세네센스 유도 저해약1; 센스 올리고뉴클레오티드류; 시그널 도입 저해약; 시그널 도입 모듈레이터; 단일쇄 항원 결합성 단백질; 시조피란(sizofiran); 소부족산(sobuzoxane); 보로캅트산 나트륨;페닐아세트산 나트륨; 솔베롤(solverol); 소마트메딘 결합성 단백질; 소네르민(sonermin); 스파르포스산(sparfosic acid); 스피카마이신D; 스피로무스틴(spiromustine); 스플레노펜틴(splenopentin); 스폰기스타틴(spongistatin)1; 스쿠알라민; 줄기세포 저해약; 줄기세포 분열 저해약; 스티피아미드(stipiamide); 스트로멜리신(stromelysin) 저해약; 술피노신(sulfinosine); 고작용성 혈관작용성 장내 펩티드 길항약; 수라디스타(suradista); 수라민(suramin); 스와인소닌(swainsonine); 합성 글리코사민오글리칸; 탈리무스틴(tallimustine); 타목시펜 메티오디드(tamoxifen methiodide); 타우로무스틴(tauromustine); 타자로텐(tazarotene); 테코갈란(tecogalan)나트륨; 테가푸르(tegafur); 텔루라피릴륨(tellurapyrylium); 텔로메라제 저해약; 테모포르핀(temoporfin); 테모졸로미드(temozolomide); 테니포시드(teniposide); 테트라클로로데카옥시드; 테트라조민(tetrazomine); 탈리블라스틴(thaliblastine); 티오코랄린(thiocoraline); 트롬보포에틴; 트롬보포에틴 모방체; 티말파신(thymalfasin); 티모포에틴(thymopoietin) 수용체 작동약; 치모트리난(thymotrinan); 갑상선 자극 호르몬; 티에닐에티오푸르푸린; 티라파자민(tirapazamine); 2염화 티타노센; 토프센틴(topsentin); 토레미펜(toremifene); 전능성 줄기세포 인자; 번역 저해약; 트레티노인(tretinoin); 트리아세틸우리딘; 트리시리빈(triciribine); 트리메트렉세이트; 트립토렐린(triptorelin); 트로피세트론(tropisetron); 투로스테리드(turosteride); 티로신 키나제 저해약; 티르포스틴류; UBC 저해약; 우베니멕스(ubenimex); 요생식동 유래 성장 억제 인자; 우로키나제 수용체 길항약; 바프

레오티드(vapreotide); 바리올린(variolin)B; 벡터 시스템, 적혈구 유전자 치료; 벨라레솔(velaresol); 베라민(veramine); 베르딘류; 베르테포르핀(verteporfin); 비노렐빈(vinorelbine); 빈크살틴(vinxaltine); 비탁신(vitaxin); 보로졸(vorozole); 자노테론(zanoterone); 제니플라틴(zeniplatin); 질라스코르브(zilascorb); 및 지노스타틴 스티말라머(zinostatin stimalamer). 바람직한 그 밖의 항암약은 5-플루오로우라실 및 류코보린(leucovorin)이다.

[0370] 본 발명의 방법에서 사용할 수 있는 치료용 항체의 예로서는, 한정되는 것은 아니지만, 이하가 포함된다: ZENAPAXS(등록상표)(daclizumab)(Roche Pharmaceuticals, Switzerland)(급성 신장 동종이식편 거절반응의 예방용의, 면역억제성 인간화 항 CD25 모노클론 항체); PANOREX™(마우스 항 17-IA 세포 표면 항원 IgG2a 항체)(Glaxo Wellcome/Centocor); BEC2(마우스 항 이디오타입(GD3 에피토프) IgG 항체)(ImClone System); IMC-C225(키메라 항 EGFR IgG 항체)(Clone System); VITAXIN™(인간화 항 αVβ3 인테그린 항체)(Applied Molecular Evolution/MedImmune); Smart M195(인간화 항 CD33 IgG 항체)(Protein Design Lab/Kanebo); LYMPHOCIDETM(인간화 항 CD22IgG 항체)(Immunomedics); ICM3(인간화 항 ICAM3 항체(ICOS Phann); IDEC-114(영장류화 항 CD80 항체)(IDECPharm/Mitsubishi); IDEC-131(인간화 항 CD40L 항체)(IDEC/Eisai); IDEC-151(영장류화 항 CD4 항체)(IDEC); IDEC-152(영장류화 항 CD23 항체)(IDEC/Seikagaku); SMART 항 CD3(인간화 항 CD3 IgG)(Protein Design Lab); 5G1.1(인간화 항 보체 인자 5(C5) 항체)(Alexion Pharm); D2E7(인간화 항 TNF-α항체)(CAT/BASF); CDP870(인간화 항 TNF-αFab 단편)(Celltech); IDEC-151(영장류화 항 CD4 IgG1 항체)(IDECPharm/SmithKline Beecham); MDX-CD4(인간 항 CD4 IgG 항체)(Medarex/Eisai/Genmab); CDP571(인간화 항 TNF-αIgG4 항체)(Celltech); LDP-02(인간화 항 α4β7 항체)(LeukoSite/Genentech); OrthoClone OKT4A(인간화 항 CD4 IgG 항체)(Ortho Biotech); ANTOVATM(인간화 항 CD40L IgG 항체)(Biogen); ANTEGRENTM(인간화 항 VLA-4 IgG 항체)(Elan); 및 CAT-152(인간 항 TGF-β2 항체)(Cambridge Ab Tech). 본 발명에 따라 사용할 수 있는 치료용 항체의 그 밖의 예를 **표 22**에 나타낸다.

표 22

[0371] 항암 치료용 항체

회사	제품	질환	표적
Abgenix	ABX-EGF	암	EGF 리셉터
AltaRex	OvaRex	난소암	종양 항원 CA125
	BravaRex	전이성 암	종양 항원 MUC1
Antisoma	Theragyn(pemtumomabyirrium-90)	난소암	PEM 항원
	Therex	유방암	PEM 항원
Boehringer Ingelheim	Blvatuzumab	두경부암	CD44
Centocor/J&J	Panorex	대장암	17-1A
	ReoPro	PTCA	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	급성 MI	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	빈혈 발작	gp IIIb/IIIa
Corixa	Bexocar	NHL	CD20
CRC Technology	MAb, 이디오타입 105AD7	대장암	gp72
		백신	
Crucell	항-EpCAM	암	Ep-CAM
Cytoclonal	MAb, 폐암	비소세포 폐암	NA
Genentech	Herceptin	전이성 유방암	HER-2
	Herceptin	초기 유방암	HER-2
	Rituxan	재발/저항성 저악성도 또는 여포성 NHL	CD20
	Rituxan	중악성도 및 고악성도 NHL	CD20
	MAb-VEGF	NSCLC, 전이성	VEGF
	MAb-VEGF	대장암, 전이성	VEGF
	AMD Fab	노화성 황반변성	CD18
	E-26(제2세대 IgE)	알러지성 천식과 비염	IgE

IDEC	Zevalin(Rituxan + 이트륨-90)	저악성도의 여포성, 재발 또는 저항성, CD20-양성, B세포 NHL 및 Rituximab 저항성 NHL	CD20
		저항성 대장암	
	Cetuximab+이노테칸	새롭게 진단된 또는 재발성	EGF 리셉터
ImClone	Cetuximab+시스플라틴 및 방사선	경두부암	EGF 리셉터
		새롭게 진단된 전이성 췌장암	
	Cetuximab+겜시타빈		EGF 리셉터
		재발성 또는 전이성 경두부암	
	Cetuximab+시스플라틴+5FU 또는 탁솔		EGF 리셉터
	Cetuximab+카보플라틴+파크리탁셀	새롭게 진단된 비소세포 폐암	
	Cetuximab+시스플라틴		EGF 리셉터
	Cetuximab+방사선	경두부암(광범위한 불치의 국소영역 질환 및 원거리 전이)	
			EGF 리셉터
	BEC2 + 바실러스카르메트게랑균	국소진행성 경두부암	
	BEC2 + 바실러스카르메트게랑균	소세포폐암	
			EGF 리셉터
	IMC-1C11	흑색종	미믹형 갱글리오시드 GD3
		간전이 수반 대장암	미믹형 갱글리오시드 GD3
			VEGF-리셉터
ImmonoGen	nuC242-DM1	대장암, 위암 및 췌장암	nuC242
ImmunoMedics	LymphoCide	비-Hodgkins 림프종	CD22
	LymphoCide Y-90	비-Hodgkins 림프종	CD22
	CEA-Cide	전이성 고형 종양	CEA
	CEA-Cide Y-90	전이성 고형 종양	CEA
	CEA-Scan(Tc-99m-표지 arcitumomab)	대장암(방사 이미징)	CEA
	CEA-Scan(Tc-99m-표지 arcitumomab)		
	CEA-Scan(Tc-99m-표지 arcitumomab)	유방암(방사 이미징)	CEA
	CEA-Scan(Tc-99m-표지 arcitumomab)		
	LeukoScan(Tc-99m-표지 sulesomab)	폐암(방사 이미징)	CEA
	LymphoScan(Tc-99m-표지)		
	AFP-Scan(Tc-99m-표지)	수술중 종양(방사 이미징)	CEA
		연조직 감염(방사 이미징)	
		림프종(방사 이미징)	CEA
		liver 7 gem-악성종양(방사 이미징)	
			CD22
			AFP
Intracel	HumaRAD-HN(+ 이트륨-90)	경두부암	NA
	HumaSPECT	대장 이미징	NA
Medarex	MDX-101(CTLA-4)	전립선암 및 다른 암	CTLA-4
	MDX-210(her-2 과발현)	전립선암	HER-2
	MDX-210/MAK	암	HER-2
	Vitaxin	암	$\alpha v\beta_3$
MedImmune	MAb 425	다양한 암	EGF 리셉터
Merck KGaA	IS-IL-2	다양한 암	Ep-CAM
Millennium	Campath(alemtuzumab)	만성 림프성 백혈병	CD52
NeoRx	CD20-스트렙타비딘(+ 비오틴-이트륨 90)	비-Hodgkins 림프종	CD20
		전이성 암	
	Avidicin(알부민+NRLU13)		NA

Peregrine	Oncolym(+요소-131) Cotara(+요소-131)	비-Hodgkins 림프종 절제불능 악성 신경교종	HLA-DR 10 베타 DNA 관련 단백질
Pharmacia Corporation	C215(+포도상구균 엔테로톡신) MAb, 폐/신장암 nacolomab tafenatox (C242 + 포도상구균 엔테로톡신)	췌장암 폐&신장암 대장암 및 췌장암	NA NA NA
Protein Design Labs Titan	Nuvion SMART M195 SMART 1D10 CEAVac TriGem TriAb	T세포 악성 종양 AML NHL 진행성 대장암 전이성 흑색종 및 소세포 폐암 전이성 유방암	CD3 CD33 HLA-DR 항원 CEA GD2-갱글리오시드 MUC-1
Trilex	CEAVac TriGem TriAb	진행성 대장암 전이성 흑색종 및 소세포 폐암 전이성 유방암	CEA GD2-갱글리오시드 MUC-1
Viventia Biotech	NovoMAb-G2 방사표지 Monopharm C GlioMAb-H(+ 겔로닌 독소)	비-Hodgkins 림프종 대장암 및 췌장암 신경교종, 흑색종 및 신경아세포종	NA SK-1 항원 NA
Xoma	Rituxan Rituxan ING-1	재발성/저항성 저악성도 또는 여포성 NHL 중악성도 및 고악성도의 NHL 선암	CD20 CD20 Ep-CAM

[0372] **5.7.2. 면역조절제 및 항염증제**

[0373] 본 발명은, 본 발명의 분자를 다른 치료약과 함께 투여하는 것을 포함하는, 자가면역 질환 및 염증성 질환의 치료방법을 제공한다. 면역 조절약의 예로서는, 한정되는 것은 아니지만, 메토트랙세이트, 엔브렐(ENBREL), 레미케이드(REMICADE™), 레플루노미드, 시클로포스파미드, 시클로스포린A, 및 마크롤리드 항생 물질(예를 들면, FK506(카크롤리무스)), 메틸프레드니솔론(MP), 코르티코스테로이드, 스테로이드, 미코페놀산 모페틸, 라파마이신(시롤리무스), 미조리빈, 데옥시스페르구알린(deoxysperguralin), 브레퀴나르(brequinar), 말로노니트릴아미드(예를 들면, 레플루나미드), T세포 수용체 모듈레이터, 및 사이토카인 수용체 모듈레이터를 포함한다.

[0374] 항염증약은, 염증성 질환 및 자가면역 질환의 치료에 있어서 성공을 거두었고, 현재, 이러한 질환을 위한 공통 또한 표준의 치료약으로 되어 있다. 당업자에게 알려진 어느 항염증약도 본 발명의 방법에 사용할 수 있다. 항염증약의 비한정적인 예는 비스테로이드계 항염증약(N상기), 스테로이드계 항염증약, β작동약, 항콜린 작동약, 및 메틸크산틴을 포함한다. N상기의 예는, 한정되는 것은 아니지만, 아스피인, 이부프로펜, 셀레콕시브(CELEBREX™), 디클로페낙(VOLTAREN™), 에토돌락(LODINE™), 페노프로펜(NALFON™), 인도메타신(INDOCIN™), 케토랄락(TORADOL™), 옥사프로진(DAYPRO™), 나부메톤(RELAFEN™), 술린닥(CLINORIL™), 톨메틴(TOLECTIN™), 로페콕시브(VIOXX™), 나프록센(ALEVE™, NAPROSYN™), 케토프로펜(ACTRON™) 및 나부메톤(RELAFEN™)을 포함한다. 이러한 N상기는 시클로옥시게나제 효소(예를 들면, COX-1 및/또는 COX-2)를 저해함으로써 기능한다. 스테로이드계 항염증약의 예는, 한정되는 것은 아니지만, 글루코코르티코이드, 덱사메타손(DECADRONTM), 코르티손, 히드로코르티손, 프레드니손(DELTASONETM), 프레드니솔론, 트리암시놀론, 아줄피딘, 및 에이코사노이드, 예를 들면, 프로스타글란딘, 트롬복산, 및 류코트리엔을 포함한다.

[0375] 염증성 질환의 치료 또는 예방을 위해 본 발명의 분자와 병용하여 사용할 수 있는 항체의 비한정적인 예를 **표 23**에 나타내고, 또한 자가면역 질환의 치료 또는 예방을 위해 사용할 수 있는 항체의 비한정적인 예를 **표 24**에 나타낸다.

표 23

[0376] 염증성 질환의 치료용 항체

항체명	표적 항원	산물형	아이소타입	스폰서	적응증
SG1.1	보체 (C5)	인간화	IgG	Alexion Pharm Inc	류마티스성 관절염
SG1.1	보체 (C5)	인간화	IgG	Alexion Pharm Inc	SLE
SG1.1	보체 (C5)	인간화	IgG	Alexion Pharm Inc	신염
SG1.1-SC	보체 (C5)	인간화	ScFv	Alexion Pharm Inc	심폐바이패스
SG1.1-SC	보체 (C5)	인간화	ScFv	Alexion Pharm Inc	심근경색
SG1.1-SC	보체 (C5)	인간화	ScFv	Alexion Pharm Inc	혈관성형술
ABX-CBL	CBL	인간		Abgenix Inc	GvHD
ABX-CBL	CD147	설치류	IgG	Abgenix Inc	동종이식 거부반응
ABX-IL8	IL-8	인간	IgG2	Abgenix Inc	건선
Antegren	VLA-4	인간화	IgG	Athena/Elan	심근경색
Anti-CD11a	CD11a	인간화	IgG1	Genentech Inc/Xoma	건선
Anti-CD18	CD18	인간화	Fab'2	Genentech Inc	심근경색
Anti-LFAI	CD18	설치류	Fab'2	Pasteur- Merieux/ Immunotech	동종이식 거부반응
Antova	CD40L	인간화	IgG	Biogen	동종이식 거부반응
Antova	CD40L	인간화	IgG	Biogen	SLE
BTI-322	CD2	Rat	IgG	Medimmune Inc	GvHD, 건선
CDP571	TNF-alpha	인간화	IgG4	Celltech	크론병
CDP571	TNF-alpha	인간화	IgG4	Celltech	류마티스성 관절염
CDP850	E-selectin	인간화		Celltech	건선
CorsevinM	Fact VII	키메라		Centocor	항응고약
D2E7	TNF-alpha	인간		CAT/BASF	류마티스성 관절염
Hu23F2G	CD11/18	인간화		ICaS Pharm Inc	심근경색
Hu23F2G	CD11/18	인간화	IgG	ICaS Pharm Inc	발작
IC14	CD14			ICaS Pharm Inc	중독성 쇼크
ICM3	ICAM-3	인간화		ICaS Pharm Inc	건선
IDEC-114	CD80	영장류화		IDEC PharmiMitsubishi	건선
IDEC-131	CD40L	인간화		IDEC PharmiEisai	SLE
IDEC-131	CD40L	인간화		IDEC PharmiEisai	심근경색
IDEC-151	CD4	영장류화	IgG1	IDEC PharmiGlaxo SmithKline	류마티스성 관절염
IDEC-152	CD23	영장류화		IDEC Pharm	천식/알러지
Infliximab	TNF-alpha	키메라	IgG1	Centocor	류마티스성 관절염
Infliximab	TNF-alpha	키메라	IgG1	Centocor	크론병
LDP-01	beta2-integrin	인간화	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	발작
LDP-01	beta2-integrin	인간화	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	동종이식 거부반응
LDP-02	alpha4beta7	인간화		Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	궤양성 대장염
MAK-195F	TNF alpha	설치류	Fab'2	Knoll Pharm, BASF	중독성 쇼크

MDX-33	CD64 (FeR)	인간		Medarex/Centeon	자가면역 혈액질환
MDX-CD4	CD4	인간	IgG	Medarex/Eisai/ Genmab	류마티스성 관절염
MEDI-507	CD2	인간화		Medimmune Inc	건선
MEDI-507	CD2	인간화		Medimmune Inc	GvHD
OKT4A	CD4	인간화	IgG	Ortho Biotech	동종이식 거부반응
OrthoClone OKT4A	CD4	인간화	IgG	Ortho Biotech	자가면역 질환
Orthoclone/anti-CD3 OKT3	CD3	설치류	mIgG2a	Ortho Biotech	동종이식 거부반응
RepPro/Abciximab	gpIIbIIIa	키메라	Fab	Centocor/Lilly	관상동맥혈관 형성술의 합병증
rhuMab-E25	IgE	인간화	IgG1	Genentech/Novartis/Tanox Biosystems	천식/알러지
SB-240563	IL5	인간화		GlaxoSmithKlme	천식/알러지
SB-240683	IL-4	인간화		GlaxoSmithKlme	천식/알러지
SCH55700	IL-5	인간화		Celltech/Schenng	천식/알러지
Simulect	CD25	키메라	IgG1	Novartis Pharm	동종이식 거부반응
SMART a-CD3	CD3	인간화		Protein Design Lab	자가면역 질환
SMART a-CD3	CD3	인간화		Protein Design Lab	동종이식 거부반응
SMART a-CD3	CD3	인간화	IgG	Protein Design Lab	건선
Zenapax	CD25	인간화	IgG1	Protein Design Lab/Hoffman - LaRoche	동종이식 거부반응

표 24

[0377] 자가면역질환의 치료용 항체

항체	적응증	표적 항원
ABX-RB2		T세포, B세포 및 NK세포상의 CBL 항원에 대한 항체 Xenomous에서 유래하는 완전한 인간 항체
5c8(항 CD-40 항원항체)	phase II 시험을 99년 10월중에 중지한 '유해반응'을 조사	CD40
IDEC 131	전신성 홍반성 낭창(SLE)	항CD40 인간화
IDEC 151	류마티스 관절염	영장류화; 항CD4
IDEC 152	천식	영장류화; 항CD23
IDEC 114	건선	영장류화; 항CD80
MEDI-507	류마티스 관절염; 다발성 경화증 크론병 건선	항CD2
LDP-02(항 b7 mAb)	염증성 장질환 크론병 궤양성 대장염	백혈구 세포상의 a4b7 인테그린 수용체
SMART 항γ 인터페론 항체	자가면역질환	항-γ 인터페론
Verteportin	류마티스 관절염	

MDX-33	자가면역반응에 의해 생기는 혈액질환 특발성 혈소판 감소성 자반증(ITP) 자가면역 용혈성 빈혈	FcRI 수용체에 대한 단일클론 항체
MDX-CD4	류마티스 관절염 및 다른 자가면역증을 치료	CD4 수용체 분자에 대한 단일클론 항체
VX-497	자가면역질환 다발성 경화증 류마티스 관절염 염증성 장질환 낭창 건선	이노신 인산 디히드로게나제(새로운 RNA 및 DNA를 만드는데 필요한 효소, 림프구 증식에 필요한 뉴클레오티드의 생산에 이용)의 저해제
VX-740	류마티스 관절염	ICE 인터루킨-1β(변환효소, 공격적인 면역반응에 이르는 경로를 제어)의 저해제
VX-745	염증에 특이적 면역반응 개시 및 염증의 진행의 화학적 시그널 전달에 관여	P38MAP 키나제의 저해제 마이토젠 활성화 단백질 키나제
Enbrel(etanercept)		TNF(종양괴사인자)를 표적화
IL-8		IL-8(인터루킨 8)에 대한 완전한 인간 단일클론 항체
Apogen MP4		재조합 항원 질환 관련 T세포를 선택적으로 파괴하는 어팝토시스를 유도하는 T세포는 프로그램된 세포사멸에 의해 제거되어, 자신의 세포를 더 이상 공격하지 않는 특정의 apogens은 특정의 T세포를 표적화한다.

[0378] **5.7.3. 감염증 치료용의 약제**

[0379] 몇 가지의 구체예에서는, 본 발명의 분자는 감염증의 치료 및/또는 예방을 위해, 당업자에 공지된 1종 이상의 추가적인 치료약의 치료상 또는 예방상 유효한 양과 조합시켜서 투여할 수 있다. 본 발명은 감염증의 치료 및/또는 예방을 위한 당업자에 공지된 항생 물질과 조합시킨 본 발명의 분자의 사용을 상정하고 있다. 본 발명의 분자와 조합시켜서 사용할 수 있는 항생 물질로서는 한정되는 것은 아니지만, 마크로라이드(예를 들면 토브라마이신(Tobi(등록상표)), 세팔로스포린(예를 들면 세팔렉신(Keflex(등록상표)), 세프라딘(Velocef(등록상표)), 세프록심(Ceftin(등록상표)), 세프프로질(Cefzil(등록상표)), 세파클로르(Ceclor(등록상표)), 세픽심(Suprax(등록상표)) 또는 세파드록실(Duricef(등록상표))), 클라리트로마이신(예를 들면 클라리트로마이신(Biaxin(등록상표)), 에리트로마이신(예를 들면 에리트로마이신(EMycin(등록상표)), 페니실린(예를 들면 페니실린 V(V-Cillin K(등록상표) 또는 Pen Vee K(등록상표))) 또는 퀴놀론(예를 들면 오플록사신(Floxin(등록상표)), 시프로플록사신(Cipro(등록상표)) 또는 노르플록사신(Noroxin(등록상표))), 아미노 배당체계 항생 물질(예를 들면 아프라마이신, 아르베카신, 밤베르마이신(bambermycin), 부티로신, 디베카신, 네오마이신, 네오마이신, 운데실레네이트, 네틸마이신, 파로모마이신, 리보스타마이신, 시소마이신, 및 스펙티노마이신), 암페니콜(amphenicol)계 항생 물질(예를 들면 아지드암페니콜(azidamphenicol), 클로르암페니콜, 플로르페니콜, 및 티암페니콜), 안사마이신계 항생 물질(예를 들면 리파마이드(riphamide) 및 리팜핀), 카르바세펨계(예를 들면 로라카르베프), 카르바페넴계(예를 들면 비아페넴 및 이미페넴), 세팔로스포린계(예를 들면 세파클로르, 세파드록실, 세파만돌, 세파트리진, 세파제돈(cefazedone), 세포조프란, 세프피미졸, 세프피라미드 및 세프피롬), 세파마이신계(예를 들면 세프부페라존, 세프메타졸 및 세프미녹스), 모노박탐계(예를 들면 아즈트레오남, 카루모남 및 티게모남(tigemonam)), 옥사세펨계(예를 들면 플로목세프 및 목살락탐), 페니실린계(예를 들면 암디노실린(amdinocillin), 암디노실린 피복실(amdinocillin pivoxil), 암옥시실린, 바캄피실린, 벤질페니실린산, 벤질페니실린나트륨, 에피실린, 펜베니실린, 플록사실린, 페남실린, 페네타메이트히드리오다이드(penethamate hydriodide), 페니실린o-베네타민, 페니실린O, 페니실린V, 페니실린V벤자틴, 페니실린V히드라바민(penicillin V hydrabamine), 페니메피시클린(penimepicycline) 및 펜시히실린(phencihicillin)칼륨), 린코사미드계(예를 들면 클린다마이신 및 린코마이

신), 암포마이신, 바시트라신, 카프레오마이신, 콜리스틴, 엔듀라시딘, 엔비오마이신, 테트라사이클린계(예를 들면 아피사이클린(apicycline), 클로르테트라사이클린, 클로모사이클린 및 데메클로사이클린), 2,4-디아미노피리미딘계(예를 들면 브로디모프림(brodimoprim)) 니트로푸란계(예를 들면 푸랄타돈 및 염화푸라졸륨(furazolium chloride)), 퀴놀론 및 그 유사체(예를 들면 시녹사신, 클리나플록사신, 플루메퀸 및 그레파글록사신(grepagloxacin)), 술폰아미드계(예를 들면 아세틸술파메톡시피라진, 벤질술파미드, 노프릴술파미드, 프타릴술프아세토아미드, 술프아크리소이딘(sulfachrysoidine) 및 술파시틴(sulfacytine)), 술폰계(예를 들면 디아티모술폰(diathymosulfone), 글루코술폰나트륨 및 솔라술폰(solasulfone)), 시클로세린, 무피로신 및 투베린(tuberin)을 포함한다.

[0380] 특정의 구체예에서는, 본 발명의 분자는 치료상 또는 예방상 유효한 양의 1종 이상의 항진균제와 조합시켜서 투여할 수 있다. 본 발명의 분자와 조합시켜서 사용할 수 있는 항진균제에는 한정되는 것은 아니지만, 암포테리신 B, 이트라코나졸, 케토코나졸, 플루코나졸, 인트라티컬(intrathecal), 플루시토신, 미코나졸, 부토코나졸, 클로트리마졸, 니스타틴, 테르코나졸, 티오코나졸, 시클로피록스, 에코나졸, 할로프로그린(haloprogrin), 나프티핀, 테르비나핀, 운데실레네이트 및 그리세오풀빈이 포함된다.

[0381] 몇 가지의 구체예에서는, 본 발명의 분자는 치료상 또는 예방상 유효한 양의 1종 이상의 항바이러스약과 조합시켜서 투여할 수 있다. 본 발명의 분자와 조합시켜서 사용할 수 있는 유효한 항바이러스약에는 한정되는 것은 아니지만, 프로테아제 저해제, 뉴클레오티드 역전사효소 저해제, 비뉴클레오티드 역전사효소 저해제 및 뉴클레오티드 유사체가 포함된다. 항바이러스약의 예로서는 한정되는 것은는 아니지만, 지도부딘, 아시클로비르, 간시클로비르, 비다라빈, 이독스우리딘, 트리플루리딘 및 리바비린, 및 포스카르네트, 아만타딘, 리만타딘, 사퀴나비르, 인디나비르, 암프레나비르, 로피나비르, 리토나비르, α인터페론; 아데포비르, 클레바딘(clevadine), 엔테카비르, 프레코나릴을 들 수 있다.

[0382] **5.8. 백신 요법**

[0383] 본 발명은 본 발명의 조성물을 사용하여, 항원성 또는 면역원성 물질에 대한 면역 응답을 유발하는 것을 추가로 포함하고, 이 물질로서는 한정되는 것은 아니지만, 암항원 및 감염증항원(이들 예는 후술함)이 포함된다. 본 발명의 백신 조성물은 1 이상의 항원성 또는 면역원성 물질(그것에 대한 면역 응답이 요구됨)을 포함하고, 이 1 이상의 항원성 또는 면역원성 물질은 FcγRIIIA에 대한 증대한 친화성을 갖는 본 발명의 변이형 항체에 의해 코트된다. 본 발명의 백신 조성물은 항원성 또는 면역원성 물질에 대한 면역 응답, 바람직하게는 방어성 면역 응답을 야기함에 있어서 특히 유효하다.

[0384] 몇 가지의 구체예에서는, 본 발명의 백신 조성물중의 항원성 또는 면역원성 물질은 바이러스(그것에 대한 면역 응답이 요구됨)를 포함한다. 바이러스는 재조합체 또는 키메라여도 되고, 바람직하게는 약독화되어 있다. 재조합체, 키메라, 및 약독화 바이러스의 생산은 당업자에 공지된 표준적인 수법을 사용하여 행할 수 있다. 본 발명은 본 발명에 따라 제제화되는 생 재조합 바이러스 백신 또는 불활화 재조합 바이러스 백신을 포함한다. 생 백신이 바람직하고, 왜냐하면 숙주내에서의 복제가 자연스러운 감염으로 일어나는 것과 동종 또한 동일한 정도의 지속적인 자극을 초래하고, 따라서 충분하고 장기적인 면역을 부여하기 때문이다. 그러한 생 재조합 바이러스 백신 제제의 생산은 세포배양물 또는 닭 배뇨막중에서의 바이러스 증식과, 그것에 계속되는 정제를 포함하는 종래의 방법을 사용하여 달성할 수 있다.

[0385] 구체적인 구체예에서는, 재조합 바이러스는 그것이 투여되는 피험자에 대하여 비병원성의 것이다. 이것에 관하여, 백신용으로 유전자 조작 바이러스를 사용하기 위해서는, 이들 바이러스주가 약독화 특성을 가질 필요가 있다. 트랜스펙션에 사용하는 주형에 적당한 돌연변이(예를 들면 결실(缺失))를 도입하면, 약독화 특성을 갖는 신규 바이러스가 얻어진다. 예를 들면 온도 감수성 또는 한랭 적응에 관련되는 특정의 미스센스 돌연변이를 결실 돌연변이중에 도입할 수 있다. 이들 돌연변이는 한랭 또는 온도 감수성 변이체에 관련되는 점돌연변이보다 안정적일 것이며, 복귀 돌연변이의 빈도가 매우 낮을 것이다. 재조합 바이러스를 제작하기 위한 재조합 DNA 기술은 당 기술분야에서 공지이며, 본 발명에 포함된다. 예를 들면 부쇄 RNA 바이러스의 개변을 위한 기술이 당 기술분야에 있어서 공지이며, 예를 들면 미국 특허 제5,166,057호를 참조한다(그 전문을 참조로서 본 명세서에 편입시킨다).

[0386] 또 「자살」 특성을 갖는 키메라 바이러스가 본 발명의 피내 백신 제제에서의 사용을 위해 구축될 수 있다. 그러한 바이러스는 숙주내에서 불과 1회 내지 수회의 복제밖에 행하지 않는다. 백신으로서 사용했을 때에는, 재조합 바이러스는 한정된 복제 사이클을 행하고, 충분한 레벨의 면역 응답을 유발하지만, 인간 숙주 중에서 추가로 복제 사이클을 행하여 병을 야기하는 일은 없다. 또 불활화(사멸) 바이러스를 본 발명에 따라서 제제화할 수 있

다. 불활화 백신 제제는 키메라 바이러스를 「사멸시키기」 위한 종래의 방법을 사용해서 조제하는 것이 가능하다. 불활화 백신은 그 감염성이 파괴되어 있다는 의미로 「죽어있다」. 이상적으로는 바이러스의 감염성이 그 면역원성을 손상시키지 않고 파괴된다. 불활화 백신을 조제하기 위해서는, 키메라 바이러스를 세포배양물 또는 닭 배뇨막중에서 증식시켜, 존 초원심에 의해 정제하고, 포름알데히드 또는 β-프로피오락톤에 의해 불활화해서 풀한다.

[0387] 특정의 구체예에서는, 완전히 외래성의 에피토프(다른 바이러스성 또는 비바이러스성 병원체에 유래하는 항원을 포함함)가 본 발명의 피내 백신 제제에 사용하기 위한 바이러스로 유전자 공학적으로 조작된다. 예를 들면 HIV(gp160, gp120, gp41)와 같은 비관련 바이러스의 항원, 기생충 항원(예를 들면 말라리아), 세균 또는 진균 항원 또는 종양 항원을 조작하여 약독화주로 할 수 있다.

[0388] 사실상 모든 이종 유전자 서열이 피내 백신 제제로 사용하기 위한 본 발명의 키메라 바이러스로 구축될 수 있다. 바람직하게는, 이종 유전자 서열은 생물학적 응답의 개변 인자로서 작용하는 부분 또는 펩티드이다. 바람직하게는, 여러가지 병원체 중 어느 하나에 대하여 방어성 면역 응답을 야기하는 에피토프, 또는 중화항체에 결합하는 항원이 키메라 바이러스에 의해 또는 그 일부로서 발현된다. 예를 들면 본 발명의 키메라 바이러스에 구축될 수 있는 이종 유전자 서열은 한정되는 것은 아니지만, 인플루엔자 및 파라인플루엔자의 혈구 응집소, 뉴라미니다아제 및 융합당 단백질(예를 들면 인간 PIV3의 HN 및 F유전자)을 포함한다. 또 다른 구체예에서는, 키메라 바이러스로 조작할 수 있는 이종 유전자 서열에는 면역조절활성을 갖는 단백질을 코드하는 것이 포함된다. 면역조절 단백질의 예로서는, 한정되는 것은 아니지만, 사이트카인, I형 인터페론, γ인터페론, 콜로니 자극인자, 인터류킨 -1, -2, -4, -5, -6, -12 및 이들 물질의 안타고니스트가 포함된다.

[0389] 또 다른 구체예에서는, 본 발명은 변이형 항체를 표면에 발현하는 병원성 세포 또는 바이러스, 바람직하게는 약독화 바이러스를 포함한다.

[0390] 대체적인 구체예에서는, 본 발명의 백신 조성물은 항원성 또는 면역원성 물질이 FcγRIIIA에 대한 증대한 친화성을 갖는 본 발명의 변이형 항체와 기능적으로 연결되어 있는 융합 폴리펩티드를 포함한다. 본 발명의 백신 조성물에 사용하기 위한 융합 폴리펩티드의 조작은 관례적인 재조합 DNA 기술의 방법을 사용해서 행해지고, 통상의 기능의 범위내이다.

[0391] 본 발명은 본 발명의 조성물을 투여함으로써, 피험자에 있어서 면역 관용을 유발하는 방법을 추가로 포함한다. 바람직하게는, 피험자에 있어서 면역 관용을 유발하기에 적합한 조성물은 본 발명의 변이형 항체에 의해 코트된 항원성 또는 면역원성 물질을 포함하고, 그 때, 이 변이형 항체는 FcγRIIB에 대하여 보다 높은 친화성을 갖는 것이다. 특정의 작용기구에 구속되는 것을 의도하지 않지만, 그러한 조성물은 FcγRIIB를 통한 저해 경로를 활성화함으로써 면역 관용을 유발하는데 유효하다.

[0392] **5.9. 조성물 및 투여방법**

[0393] 본 발명은 복수의 에피토프 결합 도메인 및 임의로 Fc도메인(또는 그 일부)을 포함하는 본 발명의 분자(즉 디아바디)를 포함하여 이루어지는 방법 및 의약조성물을 제공한다. 본 발명은 또 질환, 장애 또는 감염에 관련된 1 이상의 증상을 치료, 예방, 및 개선하는 방법으로서, 피험자에 유효한 양의 본 발명의 융합 단백질 또는 콘쥬게이트 분자, 또는 본 발명의 융합 단백질 또는 콘쥬게이트 분자를 포함하는 의약조성물을 투여하는 것에 의한 상기 방법을 또한 제공한다. 바람직한 구체예에서는, 항체, 융합 단백질, 또는 콘쥬게이트 분자는 실질적으로 정제되어 있다(즉, 그 효과를 한정하거나 또는 바람직하지 않은 부작용을 발생시키는 물질을 실질적으로 포함하지 않는다). 구체적인 구체예에서는, 피험자는 동물, 바람직하게는 포유동물, 예를 들면 비영장류(예를 들면 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 래트 등) 및 영장류(예를 들면 원숭이, 예를 들면 게잡이 원숭이 및 인간)이다. 바람직한 구체예에서는 피험자는 인간이다. 또 다른 바람직한 구체예에서는, 본 발명의 항체는 피험자와 동일한 생물종에 유래하는 것이다.

[0394] 여러가지 송달계가 알려져 있고, 본 발명의 분자를 포함하는 조성물을 투여하기 위해서 이용할 수 있지만, 예를 들면 리포솜, 미립자, 마이크로캡슐내로의 봉입, 항체 또는 융합 단백질을 발현할 수 있는 재조합 세포, 수용체 개재 엔도시토시스(예를 들면 Wu et al.(1987) "Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System," J. Biol. Chem. 262:4429-4432를 참조), 레트로바이러스 또는 다른 벡터의 일부로서의 핵산의 구축 등이 있다. 본 발명의 분자를 투여하는 방법에는 한정되는 것은 아니지만, 비경구 투여(예를 들면 피내, 근육내, 복강내, 정맥내 및 피하), 경막외, 및 점막(예를 들면 비강내 및 구강경로)이 포함된다. 구체적인 구체예에서는, 본 발명의 분자를 근육내, 정맥내, 또는 피하에 투여한다. 조성물을 임의의 편리한 경

로에 의해, 예를 들면 주입 또는 볼루스 주사에 의해, 상피 또는 피부점막내층(예를 들면 구강점막, 직장 및 장관점막 등)을 통한 흡수에 의해 투여해도 되고, 다른 생물학적 활성약제와 함께 투여해도 된다. 투여는 전신적이어도 국소적이어도 된다. 또한, 예를 들면 흡입기 또는 분무기의 사용에 의해, 및 에어로졸화제를 사용하는 제제화에 의해 폐투여를 채용할 수도 있다. 예를 들면 미국 특허 제6,019,968; 5,985,320; 5,985,309; 5,934,272; 5,874,064; 5,855,913; 5,290,540; 및 4,880,078호; 및 PCT 공개 WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; 및 WO 99/66903을 참조하길 바란다(이들 각각의 전체를 참조로서 본 명세서에 편입시킨다).

[0395] 본 발명은 또 본 발명의 분자를 밀폐용기(예를 들면 앰플 또는 작은 봉투) 중에 패키징하여, 항체의 양을 표시하는 것을 제공한다. 일 구체예에서는, 본 발명의 분자를 건조한 무균동결건조분말 또는 무수농축물로서 밀폐용기에 넣어서 공급하고, 그리고 예를 들면 물 또는 생리식염수를 사용해서 피험자에 투여하기 위한 적당한 농도로 재조제한다. 바람직하게는, 본 발명의 분자를 건조한 무균동결건조분말 또는 무수농축물로서 밀폐용기에 넣고, 적어도 5mg, 더욱 바람직하게는 적어도 10mg, 적어도 15mg, 적어도 25mg, 적어도 35mg, 적어도 45mg, 적어도 50mg, 또는 적어도 75mg의 단위용량으로 공급한다. 동결건조한 본 발명의 분자는 그 원래의 용기내에서 2~8℃ 사이에서 저장해야 하며, 또한 이 분자는 재조제한 후 12시간 이내, 바람직하게는 6시간 이내, 5시간 이내, 3시간 이내, 또는 1시간 이내에 투여해야 한다. 대체적인 구체예에서는, 본 발명의 분자를 액제로서 밀폐용기에 넣고, 이 분자, 융합 단백질, 또는 콘쥬게이트 분자의 양 및 농도를 표시해서 공급한다. 바람직하게는, 본 발명의 분자의 액제를 밀폐용기에 넣고, 적어도 1mg/ml, 더욱 바람직하게는 적어도 2.5mg/ml, 적어도 5mg/ml, 적어도 8mg/ml, 적어도 10mg/ml, 적어도 15mg/ml, 적어도 25mg/ml, 적어도 50mg/ml, 적어도 100mg/ml, 적어도 150mg/ml, 적어도 200mg/ml의 이 분자로 공급한다.

[0396] 질환에 관련된 1 이상의 증상을 치료, 예방 또는 개선하기 위해서 유효할 수 있는 본 발명의 조성물의 양은 표준적인 임상기술에 의해 결정할 수 있다. 제제 중에서 사용하는 정확한 용량은 또 투여경로나 병상의 위독한 정도에도 좌우되며, 의사의 판단 및 각 환자의 상황에 따라 결정해야 한다. 유효한 용량을 in vitro 또는 동물 모델 시험계로부터 유도한 용량-응답곡선으로부터 추정할 수 있다.

[0397] 본 발명에 의해 포함되는 디아바디의 경우, 환자에게 투여되는 투여량은 전형적으로는 0.0001mg/kg~100mg/kg(환자의 체중)이다. 바람직하게는, 환자에게 투여되는 용량은 0.0001mg/kg~20mg/kg, 0.0001mg/kg~10mg/kg, 0.0001mg/kg~5mg/kg, 0.0001~2mg/kg, 0.0001~1mg/kg, 0.0001mg/kg~0.75mg/kg, 0.0001mg/kg~0.5mg/kg, 0.0001mg/kg~0.25mg/kg, 0.0001~0.15mg/kg, 0.0001~0.10mg/kg, 0.001~0.5mg/kg, 0.01~0.25mg/kg 또는 0.01~0.10mg/kg이다. 본 발명의 디아바디의 투여량과 빈도는 예를 들면 리피드화 등의 수식에 의해 디아바디의 받아들임 및 조직 침투를 증강함으로써, 저감 또는 변경할 수 있다.

[0398] 일 구체예에서는, 환자에게 투여되는 본 발명의 분자의 투여량은 단일제(團劑) 요법으로서 사용할 때 0.01mg~1000mg/일이다. 다른 구체예에서는, 본 발명의 분자를 다른 치료용 조성물과 함께 사용하여, 환자에게 투여되는 투여량을 상기 분자를 단제 요법으로서 사용할 때보다 낮게 한다.

[0399] 특정의 구체예에서는, 본 발명의 의약조성물을 치료가 필요한 부위에 국소 투여하는 것이 바람직하다. 이것은 예를 들면 한정되는 것은 아니지만, 국소주입에 의해, 주사에 의해, 또는 시알라스틱(sialastic)멤브레인 등의 멤브레인 또는 섬유를 포함하는 다공질, 비다공질, 또는 젤라틴 상태의 재료로 이루어지는 이식편을 사용해서 달성할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 분자를 투여할 때, 이 분자가 흡수되지 않는 재료를 사용하도록 주의해야 한다.

[0400] 다른 구체예에서는, 조성물을 소포, 특히 리포솜에 넣어서 송달할 수 있다(Langer(1990) "New Methods Of Drug Delivery," Science 249:1527-1533;Treat 외 「감염증과 암의 치료법에 있어서의 리포솜(Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer)」, Lopez-Berestein and Fidler(편), Liss, New York, pp.353-365(1989);Lopez-Berestein, 전술, pp.317-327을 참조하길 바란다; 일반적으로는 전술을 참조).

[0401] 또 다른 구체예에서는, 조성물을 제어 방출 또는 지속 방출 시스템으로 송달할 수 있다. 본 발명의 1종 이상의 분자를 포함하는 지속 방출 제제를 만들기 위해서, 당업자에 공지된 어떠한 기술을 사용해도 된다. 예를 들면 미국 특허 제4,526,938호; PCT 공개 WO 91/05548; PCT 공개 WO 96/20698; Ning 외, 1996, 「지속 방출 겔을 사용한 인간 대장암 이종 이식편의 종양내 방사선 면역요법(Intratumoral Radioimmunotheraphy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel)」 Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song 외, 1995, 「장순환 에멀전의 항체를 통한 폐 타겟팅(Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions)」 PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek 외, 1997, 「심혈관 적용을 위

한 bFGF 항체에 대한 생물분해성 폴리머 담체(Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application)」 Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.24:853-854; 및 Lam 외, 1997, 「국소 송달을 위한 재조합 인간화 단일클론 항체의 마이크로캡슐화(Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery)」 Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.24:759-760을 참조(각각의 전체를 참조로서 본 명세서에 편입시킨다). 일 구체예에서는, 펌프를 제어 방출 시스템에서 사용할 수 있다(Langer, 전술; Sefton, (1987) "Implantable Pumps," CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201-240; Buchwald et al.(1980) "Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis," Surgery 88:507-516; and Saudek et al.(1989) "A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery," N. Engl. J. Med. 321 :574-579를 참조). 다른 구체예에서는, 폴리머 재료를 사용해서 항체의 제어 방출을 달성할 수 있다(예를 들면 Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise(eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida(1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball(eds.), Wiley, New York(1984); Levy et al.(1985) "Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate," Science 228:190-192; During et al.(1989) "Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization," Ann. Neural. 25:351-356; Howard et al.(1989) "Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits," J. Neurosurg. 7(1): 105-112 참조); 미국 특허 제5,679,377호; 미국 특허 제5,916,597호; 미국 특허 제5,912,015호; 미국 특허 제5,989,463호; 미국 특허 제5,128,326호; PCT 공개 WO 99/15154; 및 PCT 공개 WO 99/20253을 참조). 지속 방출 제제에 사용되는 폴리머의 예로서는, 한정되는 것은 아니지만, 폴리(2-히드록시에틸메타크릴레이트), 폴리(메틸메타크릴레이트), 폴리(아크릴산), 폴리(에틸렌-코-아세트산비닐), 폴리(메타크릴산), 폴리글리코리드(PLG), 폴리 산무수물, 폴리(N-비닐피롤리든), 폴리(비닐알코올), 폴리아크릴아미드, 폴리(에틸렌글리콜), 폴리락티드(PLA), 폴리(락티드-코-글리콜리드)(PLGA), 및 폴리오르토에스테르를 들 수 있다. 또 다른 구체예에서는, 제어 방출 시스템을 치료 표적(예를 들면 폐)의 근방 위치에 배치함으로써 전신 용량의 일부밖에 필요없도록 할 수 있다(예를 들면 Goodson, 「제어 방출의 의료상의 응용(Medical Applications of Controlled Release)」, 전술, vol.2, pp.115-138(1984)을 참조). 다른 구체예에서는, 제어 방출 이식편으로서 유용한 폴리머 조성물이 Dunn 외(미국 특허 제5,945,155호를 참조)에 따라 사용된다. 이 특정의 방법은 폴리머계로부터의 생물활성 물질의 in situ 제어 방출의 치료 효과에 기초한다. 이식은 일반적으로 치료 처치를 필요로 하는 환자체내의 어떠한 장소에서 행해도 된다. 다른 구체예에서는 비폴리머계의 지속 송달 시스템이 사용되지만, 이 경우에는 피험자체내의 비폴리머 이식편이 약품 송달 시스템으로서 사용된다. 체내에 이식하면, 이식편의 유기용매가, 이 조성물로부터 주위 조직액중에 산일, 분산 또는 침출하여, 비폴리머 재료가 서서히 응집 또는 침강하고, 고체의 미공질 매트릭스를 형성한다(미국 특허 제5,888,533호를 참조).

[0402] 제어 방출 시스템은 Langer에 의한 문헌(1990, "New Methods Of Drug Delivery," Science 249:1527-1533)에 서술되어 있다. 본 발명의 1종 이상의 치료약을 포함하는 지속 방출 제제를 만들기 위해서, 당업자에 공지된 어느 기술을 사용해도 된다. 예를 들면 미국 특허 제4,526,938호; 국제공개 WO 91/05548 및 WO 96/20698; Ning et al.(1996) "Intratumoral Radioimmunotheraphy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al.(1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al.(1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. ReI. Bioact. Mater. 24:853-854; and Lam et al.(1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control ReI. Bioact. Mater. 24:759-760을 참조(각각의 전체를 참조로서 본 명세서에 편입시킨다).

[0403] 구체적인 구체예에서는, 본 발명의 조성물이 본 발명의 디아바디를 코드하는 핵산인 경우, 이것을 적당한 핵산 발현 벡터의 일부로서 구성하고, 그것이 세포내에 받아들여지도록 이것을 투여함으로써, 그 코드화된 디아바디의 발현을 촉진시키기 위해서 이 핵산을 in vivo로 투여할 수 있다. 세포내로 받아들여지는 것은, 예를 들면 레트로바이러스 벡터를 사용함으로써(미국 특허 제4,980,286호를 참조), 또는 직접 주사에 의해, 또는 미립자 충돌(예를 들면 유전자총; Biolistic, Dupont)에 의해, 또는 지질, 세포 표면 수용체 또는 트랜스펙트 시약으로 코팅함으로써, 또는 핵에 침입하는 것이 알려져 있는 호메오박스 유사 펩티드와 연결해서 투여하거나(예를 들면 Joliot et al.(1991) "Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868을 참조) 함으로써 행한다. 또 핵산을 세포내에 도입하여, 상동적 재조합에 의해 발현을

위해 숙주 세포 DNA내에 편입시킬 수 있다.

[0404] 치료상 또는 예방상 유효한 양의 본 발명의 분자를 사용하는 피험자의 치료는, 단회 치료여도 되지만, 바람직하게는 일련의 치료를 포함한다. 바람직한 예에 있어서는, 약 0.1~30mg/kg(체중)의 본 발명의 분자를 사용하여, 주 1회, 약 1~10주간에 걸쳐, 바람직하게는 약 2~8주간에 걸쳐, 더욱 바람직하게는 약 3~7주간에 걸쳐, 한층 더 바람직하게는 약 4, 5, 또는 6주간에 걸쳐 피험자를 치료한다. 다른 구체예에서는, 본 발명의 의약조성물을 1일 1회, 1일 2회, 또는 1일 3회 투여한다. 다른 구체예에서는, 의약조성물을 주 1회, 주 2회, 2주마다 1회, 월 1회, 6주마다 1회, 2개월마다 1회, 연 2회 또는 연 1회 투여한다. 치료에 사용하는 분자의 유효 투여량이 특정의 치료 기간을 통해서 증가하거나 감소하거나 하는 것도 또한 이해하길 바란다.

[0405] **5.9.1. 의약조성물**

[0406] 본 발명의 조성물은 의약조성물의 제조에 유용한 벌크 약 조성물(예를 들면 불순한 또는 비멸균의 조성물) 및 단위 투여 제형의 조제에 이용할 수 있는 의약조성물(즉, 피험자 또는 환자에 투여하기에 적합한 조성물)을 포함한다. 그러한 조성물은 예방상 또는 치료상 유효한 양의 본 명세서중에 개시한 예방약 및/또는 치료약 또는 그들 약제의 조합과, 제약상 허용할 수 있는 담체를 포함한다. 바람직하게는 본 발명의 조성물은 예방상 또는 치료상 유효한 양의 1종 이상의 본 발명의 분자 및 제약상 허용되는 담체를 포함한다.

[0407] 본 발명은 또 본 발명의 디아바디 분자와, 특정의 암항원에 특이적인 치료용 항체(예를 들면 종양 특이적 단일클론 항체)와, 제약상 허용되는 담체를 포함하는 의약조성물을 포함한다.

[0408] 특정의 구체예에 있어서, 「약학적으로 허용할 수 있다」는 용어는, 동물, 특히 인간에서의 사용에 대해서, 연방정부 또는 주정부의 규제 당국에 의해 인가되었거나 또는 미국약국방 또는 다른 일반적으로 인정된 약국방에 개제된 것을 의미한다. 「담체」라는 용어는 치료약이 그들과 함께 투여되는 희석제, 애쥬번트(예를 들면 프로인트 애쥬번트(완전 및 불완전)), 부형제, 또는 비히클을 의미한다. 이와 같은 제약상의 담체는 물이나 기름 등의 무균액체여도 되고, 석유, 동물, 식물 또는 합성기원의 것, 예를 들면 피너츠유, 대두유, 광유, 참기름 등을 포함한다. 의약조성물을 정맥내 투여할 때 물은 바람직한 담체이다. 생리식염수 및 수성 덱스트로스 및 글리세롤 수용액은 특히 주사액용의 액상 담체로서 이용할 수 있다. 적합한 제약상의 부형제는 전분, 글루코오스, 락토오스, 수크로오스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 소맥분, 초크, 실리카겔, 스테아르산나트륨, 모노스테아르산글리세롤, 탈크, 염화나트륨, 탈지분유, 글리세롤, 프로필렌글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 필요하면 조성물은 또 소량의 습윤제 또는 유화제, 또는 pH 완충제를 함유해도 된다. 이들 조성물은 용액, 현탁액, 유화액, 정제, 환약, 캡슐제, 분제, 지속 방출 제제 등의 제형을 취할 수 있다.

[0409] 일반적으로, 본 발명의 조성물의 성분은 각각 또는 함께 혼합해서 단위 투여 제형으로, 예를 들면 건조한 동결건조분말 또는 무수농축물로서, 밀폐용기, 예를 들면 앰플 또는 작은 봉투에 넣고, 활성약제의 양을 표시해서 공급된다. 조성물을 주입에 의해 투여하는 경우에는, 약품급의 멸균수 또는 생리식염수를 함유하는 주입 보틀을 사용해서 조제해도 된다. 조성물을 주사에 의해 투여하는 경우에는, 무균의 주사용수 또는 생리식염수의 앰플을 제공하여, 제성분이 투여전에 혼합되도록 할 수 있다.

[0410] 본 발명의 조성물을 중성 또는 염 형태로서 제제화해도 된다. 제약상 허용할 수 있는 염으로서는, 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면 염산, 인산, 아세트산, 옥살산, 타르타르산 등으로부터 유도되는 음이온에 의해 형성된 염, 및 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 수산화 제2철, 이소프로필아민, 트리에틸아민, 2-에틸아미노에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유도된 양이온에 의해 형성된 염이 포함된다.

[0411] **5.9.2. 유전자 치료**

[0412] 특정의 구체예에서는, 본 발명의 분자를 코드하는 서열을 포함하는 핵산을 투여함으로써, 유전자 치료를 사용해서 질환, 장애, 또는 감염에 관련된 1 이상의 증상을 치료, 예방, 또는 개선한다. 유전자 치료는 발현되는 또는 발현 가능한 핵산을 피험자에 투여함으로써 행해지는 치료를 의미한다. 본 발명의 본 구체예에서는 핵산이 치료 또는 예방 효과를 매개하는 그 코드화 항체 또는 융합 단백질을 생산한다.

[0413] 당 기술분야에서 이용할 수 있는 어느 유전자 치료법도 본 발명에 따라서 사용할 수 있다. 대표적인 방법을 이하에 기재한다.

[0414] 유전자 치료법의 일반적 총괄에 대해서는, Goldspiel et al.(1993) "Human Gene Therapy," Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu et al.(1991) "Delivery Systems For Gene Therapy," Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev(1993,) "Gene Therapy, Concepts, Current Trials And Future Directions," Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-

596; Mulligan(1993) "The Basic Science Of Gene Therapy," Science 260:926-932; and Morgan et al.(1993) "Human Gene Therapy," Ann. Rev. Biochem. 62 : 191-217를 참조. 이용할 수 있는 재조합 DNA 기술의 기술분야에서 공지된 방법은 Ausubel et al.(eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY(1993); 및 Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual. Stockton Press, NY(1990)에 기재되어 있다.

[0415] 바람직한 구체예에서는, 본 발명의 조성물은 본 발명의 디아바디를 코드하는 핵산을 포함하고, 이 핵산은 적합한 숙주내에서 항체를 발현하는 발현 벡터의 일부이다. 특히, 이와 같은 핵산은 항체 코드 영역과 기능적으로 연결된 프로모터, 바람직하게는 이종 프로모터를 갖고, 상기 프로모터는 유도성, 구성적, 경우에 따라서는 조직 특이적인 것일 수 있다. 다른 특정의 구체예에서는, 항체 코드 서열 및 다른 원하는 서열이 게놈내의 원하는 부위에서의 상동적 재조합을 촉진하는 영역에 의해 끼워져 있고, 그 결과로서 항체를 코드하는 핵산의 염색체내 발현을 초래하는 것 같은 핵산분자가 사용된다(Koller et al.(1989) "Inactivating The Beta 2-Microglobulin Locus In Mouse Embryonic Stem Cells By Homologous Recombination," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; 및 Zijlstra et al.(1989) "Germ-Line Transmission Of A Disrupted Beta 2 -Microglobulin Gene Produced By Homologous Recombination In Embryonic Stem Cells," Nature 342:435-438).

[0416] 다른 바람직한 구체예에서는, 본 발명의 조성물은 융합 단백질을 코드하는 핵산을 포함하고, 상기 핵산은 적합한 숙주에 있어서 융합 단백질을 발현하는 발현 벡터의 일부분이다. 특히, 이와 같은 핵산은 융합 단백질의 코드 영역과 기능적으로 연결된 프로모터, 바람직하게는 이종 프로모터를 갖고, 상기 프로모터는 유도성, 구성적, 경우에 따라서는 조직 특이적인 것일 수 있다. 다른 특정의 구체예에서는, 융합 단백질의 코드 서열 및 다른 원하는 서열이 게놈내의 원하는 부위에서의 상동적 재조합을 촉진하는 영역에 의해 끼워져 있고, 그 결과로서, 융합 단백질을 코드하는 핵산의 염색체내 발현을 초래하는 것 같은 핵산분자가 사용된다.

[0417] 핵산의 피험자에 대한 송달은 직접적(이 경우에는 피험자를 핵산 또는 핵산담지 벡터에 직접 노출) 또는 간접적(이 경우에는 세포를 먼저 핵산으로 in vitro로 형질 전환하고, 다음에 피험자에 이식)의 어느 쪽이어도 된다. 이들 2개의 수법은 각각 in vivo 또는 ex vivo 유전자 치료로서 알려져 있다.

[0418] 특정의 구체예에서는, 핵산 서열을 직접 in vivo로(거기서 발현되어, 코드된 산물을 초래함) 투여한다. 이것은 당 기술분야에서 공지된 다수의 방법 중 어느 하나에 의해, 예를 들면 그것을 적당한 핵산 발현 벡터의 일부로서 구축하고, 그것을 세포내에 받아들여지도록 투여함으로써 실시할 수 있다. 이와 같은 받아들임은 예를 들면 결손 또는 약독화 레트로바이러스 또는 다른 벡터를 사용한 감염에 의해(미국 특허 제4,980,286호를 참조), 또는 DNA 그대로의 직접 주입에 의해, 또는 미립자 밤바드먼트(예를 들면 유전자총;Biolistic, Dupont)에 의해, 또는 지질 또는 세포 표면 수용체 또는 트랜스펙션 시약의 코팅에 의해, 또는 리포솜, 미립자, 또는 마이크로캡슐내로의 봉입에 의해, 또는 핵에 침입하는 것이 알려진 펩티드와 그들을 연결해서 투여함으로써, 수용체 개재 엔도시토시스를 받는 항원과 연결해서 투여함으로써(예를 들면 Wu et al.(1987) "Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System," J. Biol. Chem. 262:4429-4432를 참조)(이 방법은 수용체를 특이적으로 발현하는 세포형을 표적으로 하기 위해서 사용됨) 실시할 수 있다. 다른 구체예에서는, 핵산-항원복합체(이 항원은 엔도솜을 파괴하는 융합성 바이러스 펩티드를 포함함)를 형성시켜, 핵산의 리소좀 분해를 회피시킬 수 있다. 또 다른 구체예에서는, 핵산은 특이적 수용체를 표적으로 함으로써, in vivo로 세포 특이적인 받아들임 및 발현으로 목표를 정할 수 있다(예를 들면 PCT 공개 WO 92/06180; WO 92/22635; WO 92/20316; WO 93/14188; WO 93/20221을 참조). 또 핵산은 세포내에 도입하여, 상동적 재조합에 의해, 발현을 위해 숙주세포 DNA내에 편입시킬 수 있다(Koller et al.(1989) "Inactivating The Beta 2-Microglobulin Locus In Mouse Embryonic Stem Cells By Homologous Recombination," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; 및 Zijlstra et al.(1989) "Germ-Line Transmission Of A Disrupted Beta 2 -Microglobulin Gene Produced By Homologous Recombination In Embryonic Stem Cells," Nature 342:435-438).

[0419] 특정의 구체예에서는, 본 발명의 분자(예를 들면 디아바디 또는 융합 단백질)을 코드하는 핵산 서열을 함유하는 바이러스 벡터가 사용된다. 예를 들면 레트로바이러스 벡터를 이용할 수 있다(Miller et al.(1993) "Use Of Retroviral Vectors For Gene Transfer And Expression," Meth. Enzymol. 217:581-599를 참조). 이들 레트로바이러스 벡터는 바이러스 게놈의 올바른 패키징 및 숙주세포 DNA중으로의 편입을 위해 필요한 성분을 함유한다. 유전자 치료에 이용하는 항체 또는 융합 단백질을 코드하는 핵산 서열은 1 이상의 벡터중에 클로닝되어, 이것에 의해 뉴클레오티드 서열의 피험자에 대한 송달이 용이해진다. 레트로바이러스 벡터에 대해 더욱 상세한 것은 Boesen 외((1993) "Circumvention Of Chemotherapy-Induced Myelosuppression By Transfer Of The Mdr1 Gene," Biotherapy 6:291-302)에서 찾아볼 수 있고, 이것은 화학요법에 의해 내성이 있는 조혈간 세포를

만들 목적으로 mdr 1유전자를 간세포로 송달하기 위한 레트로바이러스 벡터의 사용을 기재한다. 유전자 치료에 있어서의 레트로바이러스 벡터의 사용을 설명하는 다른 참고 문헌에는 이하의 것이 있다: Clowes et al.(1994) "Long-Term Biological Response Of Injured Rat Carotid Artery Seeded With Smooth Muscle Cells Expressing Retrovir ally Introduced Human Genes," J. Clin. Invest. 93:644-651; Keim et al.(1994) "Retrovirus-Mediated Gene Transduction Into Canine Peripheral Blood Repopulating Cells," Blood 83:1467-1473; Salmons et al.(1993) "Targeting Of Retroviral Vectors For Gene Therapy," Human Gene Therapy 4:129-141; 및 Grossman et al.(1993) "Retroviruses: Delivery Vehicle To The Liver," Curr. Opin. Genetics and Devel. 3:110-114.

[0420] 아데노바이러스는 유전자 치료에 이용할 수 있는 다른 바이러스 벡터이다. 아데노바이러스는 유전자를 호흡기 상피에 송달하는 운반체로서 특히 흥미를 자아낸다. 아데노바이러스는 원래 호흡기 상피에 감염하여 경도의 질환을 야기한다. 아데노바이러스에 기초하는 송달계의 다른 표적은 간장, 중추신경계, 내피세포, 및 근육이다. 아데노바이러스는 분열하지 않는 세포에 감염할 수 있으므로 유리하다. Kozarsky et al.(1993,"Gene Therapy: Adenovirus Vectors," Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503)은 아데노바이러스에 기초하는 유전자 치료법의 총설을 알리고 있다. Bout 외(1994, "Lung Gene Therapy: In Vivo Adenovirus-Mediated Gene Transfer To Rhesus Monkey Airway Epithelium," Human Gene Therapy, 5:3-10)는 유전자를 붉은털 원숭이의 호흡기 상피에 도입하기 위한 아데노바이러스 벡터의 이용을 실증했다. 유전자 치료에 있어서의 아데노바이러스의 이용의 다른 예는, Rosenfeld et al.(1991) "Adenovirus-Mediated Transfer Of A Recombinant Alpha I-Antitrypsin Gene To The Lung Epithelium In Vivo," Science 252:431-434; Rosenfeld et al.(1992) "In Vivo Transfer Of The Human Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene To The Airway Epithelium," Cell 68:143-155; Mastrangeli et al.(1993) "Diversity Of Airway Epithelial Cell Targets For In Vivo Recombinant Adenovirus-Mediated Gene Transfer," J. Clin. Invest. 91 :225-234; PCT 공개 WO94/12649; 및 Wang et al.(1995) "A Packaging Cell Line For Propagation Of Recombinant Adenovirus Vectors Containing Two Lethal Gene-Region Deletions," Gene Therapy 2:775-783에서 찾아볼 수 있다. 바람직한 구체예에서는 아데노바이러스 벡터가 사용된다.

[0421] 아데노 수반 바이러스(AAV)도 유전자 치료에 있어서의 이용이 제안되어 있다(예를 들면 Walsh et al.(1993) "Gene Therapy For Human Hemoglobinopathies," Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 및 미국 특허 제5,436,146호를 참조).

[0422] 유전자 치료에 대한 다른 어프로치는 일렉트로포레이션, 리포펙션, 인산칼슘을 통한 트랜스펙션, 또는 바이러스 감염 등의 방법에 의해, 조직배양물중의 세포에 유전자를 도입하는 것을 포함한다. 통상, 도입의 방법은 선택 마커의 세포로의 도입을 포함한다. 다음에 세포를 선택에 제공하여, 회수하고, 또한 도입한 유전자를 발현하는 세포를 단리한다. 다음에 그들 세포를 피험자에 송달한다.

[0423] 이 구체예에서는, 핵산을 세포중에 도입한 후에, 얻어지는 재조합 세포를 in vivo 투여한다. 이와 같은 도입은 당 기술분야에서 공지된 어떠한 방법, 예를 들면 한정되는 것은 아니지만, 트랜스펙션, 일렉트로포레이션, 마이크로인젝션, 핵산 서열을 함유하는 바이러스 또는 박테리오파지 벡터를 사용하는 감염, 세포 융합, 염색체를 통한 유전자 도입, 미소 세포를 통한 유전자 도입(microcell mediated gene transfer), 스페로플라스트 융합 등에 의해 실시할 수 있다. 외래 유전자를 세포중에 도입하기 위한 다수의 기술은 당 기술분야에서 공지이며(예를 들면 Loeffler et al.(1993) "Gene Transfer Into Primary And Established Mammalian Cell Lines With Lipopolyamine-Coated DNA," Meth. Enzymol. 217:599-618, Cotten et al.(1993) "Receptor-Mediated Transport Of DNA Into Eukaryotic Cells," Meth. Enzymol. 217:618-644 참조), 수용 세포의 필요한 발생적 및 생리학적 기능이 파괴되지 않는 것을 조건으로 하여 본 발명에 따라서 이용할 수 있다. 그 기술은 핵산의 세포에 대한 안정적인 도입을 제공하여, 그것에 의해 핵산이 세포에 의해 발현 가능하게 되고, 그리고 바람직하게는 그 세포 자손에게 유전되고 또한 발현될 수 있는 것이어야 한다.

[0424] 얻어지는 재조합 세포는 당 기술분야에서 공지된 여러가지 방법에 의해 피험자에 송달할 수 있다. 재조합 혈액세포(예를 들면 조혈간세포 또는 전구세포)는 바람직하게는 정맥내에 투여된다. 사용을 위해 상정되는 세포량은 원하는 효과, 환자의 상태 등에 의존하여, 당업자가 결정하는 것이 가능하다.

[0425] 유전자 치료의 목적으로 핵산이 도입되는 세포는 모든 원하는 입수 가능한 세포형을 포함하고, 한정되는 것은 아니지만, 상피세포, 내피세포, 케라티노사이트, 섬유아세포, 근육세포, 간세포; 혈액세포, 예를 들면 T림프구, B림프구, 단구, 마크로파지, 호중구, 호산구, 거핵구, 과립구; 여러가지 간세포 또는 전구세포, 특히 조혈간세

포 또는 전구세포, 예를 들면 골수, 제대혈, 말초혈, 태아간 등으로부터 얻어지는 것을 포함한다.

[0426] 바람직한 구체예에서는, 유전자 치료에 사용되는 세포는 피험자 자신에 유래하는 것이다.

[0427] 재조합 세포를 유전자 치료에 사용하는 구체예에서는, 항체 또는 융합 단백질을 코드하는 핵산 서열을 세포중에 도입하여, 그들이 이 세포 또는 그 자손에 의해 발현되도록 하고, 다음에 그 재조합 세포를 치료 효과를 위해 in vivo로 투여한다. 구체적인 구체예에서는, 간세포 또는 전구세포를 사용한다. 분리 가능하며 in vitro에서 유지할 수 있는 간세포 및/또는 전구세포는 어느 것이나 본 발명의 이 구체예에 따라서 이용할 수 있을 가능성이 있다(예를 들면 PCT 공개 WO 94/08598; Stemple et al.(1992) "Isolation Of A Stem Cell For Neurons And GHa From The Mammalian Neural Crest," Cell 7 1 :973-985; Rheinwald(1980) "Serial Cultivation Of Normal Human Epidermal Keratinocytes," Meth. Cell Bio. 21A:229-254; 및 Pittelkow et al.(1986) "New Techniques For The In Vitro Culture Of Human Skin Keratinocytes And Perspectives On Their Use For Grafting Of Patients With Extensive Burns," Mayo Clinic Proc. 61 :771-777을 참조).

[0428] 특정의 구체예에서는, 유전자 치료의 목적으로 도입되는 핵산은 코드 영역과 기능적으로 연결된 유도성 프로모터를 포함하고, 그것에 의해 적당한 전사 유도 물질의 존재 또는 부재를 제어함으로써 핵산의 발현이 제어 가능하게 된다.

[0429] **5.9.3. 키트**

[0430] 본 발명은 본 발명의 분자를 충전한 1 이상의 용기를 포함하는 의약팩 또는 키트를 제공한다. 또한, 질환의 치료에 유용한 1 이상의 다른 예방 또는 치료약을 의약팩 또는 키트중에 포함시켜도 된다. 본 발명은 또 본 발명의 의약조성물의 1 이상의 성분을 충전한 1 이상의 용기를 포함하는 의약팩 또는 키트도 포함한다. 경우에 따라서는, 이와 같은 용기에 의약 또는 생물학적 제품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부당국이 지시한 형식으로, 인간 투여를 위한 제조, 사용 또는 판매의 행정당국에 의한 인가를 반영하는 주의서를 첨부해도 된다.

[0431] 본 발명은 상기한 방법에서 사용할 수 있는 키트를 제공한다. 일 구체예에서는, 키트는 1 이상의 본 발명의 분자를 포함한다. 다른 구체예에서는, 키트는 또한 1 이상의 용기중에 암의 치료에 유용한 1 이상의 다른 예방 또는 치료약을 포함한다. 다른 구체예에서는, 키트는 또한 암에 관련된 1 이상의 암항원과 결합하는 1 이상의 세포 상해성 항체를 포함한다. 어떠한 구체예에서는, 다른 예방 또는 치료약은 화학요법제이다. 다른 구체예에서는, 예방 또는 치료약은 생물학적 또는 호르몬 치료약이다.

[0432] **5.10. 치료상의 유용성의 특징 및 검증**

[0433] 인간에게 사용하기 전에, 본 발명의 의약조성물, 예방 또는 치료약의 몇가지 구체예는, 바람직하게는, in vitro에서, 세포배양계에서, 및 동물 모델 생물에서, 예를 들면 치류동물 모델계에서, 원하는 치료 활성에 대해서 시험된다. 예를 들면 특정의 의약조성물의 투여가 적절한 것인지를 확인하는데 사용할 수 있는 분석은 세포 배양 분석을 포함하고, 이 분석에 있어서는, 환자 조직 샘플을 배양으로 증식시켜, 본 발명의 의약조성물에 노출시키거나 또는 다른 방법으로 접촉시키고, 그리고 조직 샘플에 대한 이 조성물의 효과를 관찰한다. 조직 샘플은 환자로부터의 생검에 의해 얻을 수 있다. 이 시험에 의해, 개개의 환자에 대하여 치료상 가장 유효한 예방 또는 치료 분자를 동정할 수 있다. 여러가지 구체적 구체예에서는 in vitro 분석을 자기 면역 질환 또는 염증성 질환에 관계된 세포형의 대표적 세포(예를 들면 T세포)를 사용해서 실시하고, 본 발명의 의약조성물이 그러한 세포형에 대하여 원하는 효과를 나타내는지를 확인할 수 있다.

[0434] 예방약 및/또는 치료약의 조합은 인간에게 사용하기 전에, 적당한 동물 모델계에서 시험할 수 있다. 이와 같은 동물 모델계로서는 한정되는 것은 아니지만, 래트, 마우스, 닭, 소, 원숭이, 돼지, 개, 토끼 등을 들 수 있다. 당 기술분야에서 주지된 어느 동물계를 사용해도 된다. 본 발명의 구체적인 구체예에서는, 예방 및/또는 치료약의 조합은 마우스 모델계에서 시험한다. 이와 같은 모델계는 널리 사용되고 있으며, 당업자에게 주지이다. 예방 및/또는 치료약은 반복해서 투여할 수 있다. 수순의 몇가지 양상은 다양할 수 있다. 이러한 양상에는 예방 및/또는 치료약의 투여의 시간적 관리, 및 이와 같은 약제를 따로 따로 투여하는 것인지 혼합물로서 투여하는 것인지가 포함된다.

[0435] 본 발명의 방법에 사용하는 바람직한 동물 모델은 예를 들면 마우스 이펙터 세포상에 FcγR을 발현하는 트랜스제닉 마우스이며, 예를 들면 미국 특허 제5,877,396호(그 전체를 참조로서 본 명세서에 편입시킨다)에 기재된 어느 하나의 마우스 모델을 본 발명에 사용할 수 있다. 본 발명의 방법에 사용하는 트랜스제닉 마우스로서는 한정되는 것은 아니지만, 인간 FcγRIIIA를 보유하는 마우스; 인간 FcγRIIA를 보유하는 마우스; 인간 FcγRIIB 및 인간 FcγRIIIA를 보유하는 마우스; 인간 FcγRIIB 및 인간 FcγRIIA를 보유하는 마우스를 들 수 있다. 바람

직하게는 상기한 기능적 분석에 있어서 최고 레벨의 활성을 나타낸 변이를 인간에서의 사용에 앞서 동물 모델 연구에서의 사용에 대해서 시험한다. 충분량의 항체는 상기한 방법을 사용하여, 동물 모델에서의 사용을 위해 조제하는 것이 가능하며, 예를 들면 본 명세서에 개시되어 예시되는 포유류 발현 시스템 및 정제법을 사용해서 조제할 수 있다.

[0436] 마우스 이종 이식 모델을 사용하여, 종양 특이적 표적에 대해서 제작된 마우스 항체의 효력을 본 발명의 디아바디 분자의 에피토프 결합 도메인의 친화성과 특이성, 및 면역응답을 끌어내는 디아바디의 능력에 기초하여 시험할 수 있다(Wu et al.(2001) "Mouse Models For Multistep Tumorigenesis," Trends Cell Biol. 11 : S2-9). 마우스 이펙터 세포상에 인간 FcγR을 발현하는 트랜스제닉 마우스는 유니크하며, 인간 Fc-FcγR 상호 작용의 효력을 시험하기 위한 테일러메이드 동물 모델이다. Jeffrey Ravetch 박사의 연구실에서 제작된 FcγRIIIA, FcγRIIB 및 FcγRIIA 트랜스제닉 마우스 계통의 페어가 이용 가능하며(Rockefeller 대학과 Sloan Kettering 암 센터의 라이센스 계약을 통하여), 이하의 **표 25**에 들고 있는 바와 같은 것이다.

표 25

[0437] 마우스 계통

계통 백그라운드	인간FcR
누드 / CD16A KG	없음
누드 / CD16A KG	FcγRIIIA
누드 / CD16A KG	FcγRIIA
누드 / CD16A KG	FcγRIIA 및 IIIA
누드 / CD32B KG	없음
누드 / CD32B KG	FcγRIIB

[0438] 본 발명의 병용 요법의 항염증 활성은 당 기술분야에서 공지된 또한 Crofford L. J. 및 Wilder R. L. 「동물의 관절염과 자가면역(Arthritis and Autoimmunity in Animals)」, Arthritis and Allied Conditions:A Textbook of Rheumatology, McCarty 외(편), 제30장(Lee and Febiger, 1993)에 기재된 여러가지 염증성 관절염의 실험 동물 모델을 이용해서 확인할 수 있다. 염증성 관절염 및 자가면역 류머티즘 질환의 실험적 및 자연발생적 동물 모델은 또 본 발명의 병용 요법의 항염증 활성을 평가하기 위해서 이용할 수도 있다. 이하는 예로서 든 몇가지의 분석이며 한정되는 것은 아니다.

[0439] 당 기술분야에서 공지된 또한 널리 이용되는 관절염 또는 염증성 질환의 주요한 동물 모델은 이하의 것을 포함한다: 애쥬번트 유도 관절염 래트 모델, 콜라겐 유도 관절염 래트 및 마우스 모델, 및, 항원 유도 관절염 래트, 토끼 및 햄스터 모델. 이들은 모두 Crofford L. J. 및 Wilder R. L. 「동물의 관절염과 자가면역(Arthritis and Autoimmunity in Animals)」, Arthritis and Allied Conditions:A Textbook of Rheumatology, McCarty 외(편), 제30장(Lee and Febiger), 1993에 기재되어 있다(그 전체를 참조로서 본 명세서에 편입시킨다).

[0440] 본 발명의 병용 요법의 항염증 활성은 카라게난 유도 관절염 래트 모델을 사용해서 평가할 수 있다. 카라게난이 유도하는 관절염은 또 만성관절염 또는 염증의 연구에 있어서, 토끼, 개 및 돼지에서도 이용되고 있다. 정량적인 조직 형태 계측적 평가가 치료 효력의 결정에 사용된다. 이와 같은 카라게난 유도 관절염 모델을 이용하는 방법은 Hansra P. 외, 「래트에 있어서의 카라게난 유도 관절염(Carrageenan-induced Arthritis in the Rat)」, Inflammation, 24(2):141-155, (2000)에 기재되어 있다. 또 자이모산 유도 염증 동물 모델도 일반적으로 이용되고 있으며, 당 기술분야에서 공지이다.

[0441] 본 발명의 병용 요법의 항염증 활성은 또 카라게난이 유도하는 래트의 발부종(paw edema)의 억제를 Winter C. A. 외, 「항염증약 분석으로서의 카라게난이 유도하는 래트 뒷다리부종(Carrageenan-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Anti-inflammatory Drugs)」 Proc. Soc. Exp. Biol Med.111, 544-547, (1962)에 기재되는 방법의 개변법을 사용해서 측정함으로써 평가할 수도 있다. 이 분석은 대부분의 N상기의 항염증 활성에 대한 1차 in vivo 스크리닝으로서 사용되고 있으며, 인간에서의 효력을 예측한다고 생각되고 있다. 시험 예방약 또는 치료약의 항염증 활성은 비히클을 투여한 대조군에 대한 시험군의 뒷다리 중량 증가의 억제 퍼센트로서 나타난다.

[0442] 또한, 염증성 장질환의 동물 모델을 본 발명의 병용 요법의 효력을 평가하는데 사용할 수도 있다(Kim et al.(1992) "Experimental Colitis In Animal Models," Scand. J. Gastroentrol. 27:529-537; Strober(1985)

"Animal Models Of Inflammatory Bowel Disease--An Overview," Dig. Dis. Sci. 30(12 Suppl):3S-10S). 궤양성 대장염 및 클론병은 동물에서 유도할 수 있는 인간 염증성 장질환이다. 황산화된 다당류(한정되는 것은 아니지만, 아밀로펙틴, 카라게난, 황산아밀로펙틴 및 황산덱스트란을 포함함) 또는 화학자극제(한정되는 것은 아니지만, 트리니트로벤젠술폰산(TNBS) 및 아세트산을 포함함)를 동물에게 경구 투여해서 염증성 장질환을 유도할 수 있다.

[0443] 자가면역질환의 동물 모델도 또 본 발명의 병용 요법의 효력을 평가하는데 사용할 수 있다. 자가면역질환, 예를 들면 I형 당뇨병, 갑상선 자가면역, 전신성 에리테마토데스, 및 사구체신염의 동물 모델이 개발되어 있다(Flanders et al.(1999) "Prevention Of Type I Diabetes From Laboratory To Public Health," Autoimmunity 29:235-246; Rasmussen et al.(1999) "Models To Study The Pathogenesis Of Thyroid Autoimmunity," Biochimie 81 :511-515; Foster(1999) "Relevance Of Systemic Lupus Erythematosus Nephritis Animal Models To Human Disease," Semin. Nephrol. 19:12-24).

[0444] 또한, 당업자에 공지된 분석은 어느 것이나 자가면역 및/또는 염증성 질환 에 대한 본 명세서에 개시한 병용 요법의 예방상 및/또는 치료상의 유용성을 평가하는데 사용할 수 있다.

[0445] 본 발명의 예방 및/또는 치료 프로토콜의 독성 및 효력은 세포배양 또는 실험동물에 있어서의 표준적인 약학적 수법에 의해 확인할 수 있고, 예를 들면 LD_{50}(집단의 50%에 대한 치사량) 및 ED_{50}(집단의 50%에 있어서의 치료 유효량)을 결정하는 수법에 의해 확인할 수 있다. 독성과 치료 효과간의 용량비가 치료 지수이며, LD_{50}/ED_{50}비로서 표현된다. 큰 치료 지수를 나타내는 예방 및/또는 치료약이 바람직하다. 독성 부작용을 나타내는 예방 및/또는 치료약을 사용할 수는 있지만, 이와 같은 약물을 이환 조직의 부위에 타겟팅하는 송달 시스템을 설계하여, 비감염 세포에 일어날 수 있는 손상을 최소한으로 억제하고, 그것에 의해 부작용을 경감시키도록 주의해야 한다.

[0446] 세포배양 분석 및 동물연구로부터 얻어진 데이터는 인간에 사용하는 예방 및/또는 치료약의 투여량의 범위를 결정하는데 이용할 수 있다. 이와 같은 약물의 투여량은 바람직하게는 독성이 낮거나 전혀 없고, ED_{50}을 포함하는 순환농도의 범위내에 있다. 투여량은 채용하는 투여제형 및 이용하는 투여경로에 의존하여 바뀔 수 있다. 본 발명의 방법에서 사용하는 어느 약품에 대해서도, 치료상 유효한 용량은 우선 세포배양 분석으로부터 추정할 수 있다. 용량은 세포배양에서 결정한 IC_{50}(즉, 증상의 최대의 2분의 1의 억제(half-maximal inhibition)를 달성하는 시험화합물의 농도)을 포함하는 순환혈장농도 범위를 달성하도록, 동물 모델에 있어서 결정해도 된다. 이와 같은 정보는 인간에 유용한 투여량을 더욱 정확하게 결정하는데 사용할 수 있다. 혈장중의 레벨은 예를 들면 고속 액체 크로마토그래피에 의해 측정할 수 있다.

[0447] 본 발명에 따라서 사용되는 치료법의 항암활성은 또 암연구용의 여러가지 실험동물 모델, 예를 들면 SCID 마우스 모델 또는 트랜스제닉 마우스 또는 인간 이종 이식편을 가지는 누드 마우스, 동물 모델, 예를 들면 햄스터, 토끼 등을 사용함으로써 결정할 수도 있고, 이들은 당 기술분야에서 공지이며, 또한 Relevance of Tumor Models for Anticancer Development(1999, Fiebig 및 Burger 편); Contributions to Oncology(1999, Karger); The Nude Mouse in Oncology Research(1991, Boven and Winograd 편); 및 Anticancer Drug Development Guide(1997 편 Teicher)(이들 전체를 참조로서 본 명세서에 편입시킨다)에 기재되어 있다.

[0448] 본 발명의 분자의 치료 효력을 결정하기에 바람직한 동물 모델은 마우스 이종 이식 모델이다. 이종 이식 종양의 공급원으로서 사용할 수 있는 종양세포주는 한정되는 것은 아니지만, SKBR3 및 MCF7 세포를 포함하고, 그들은 유선암의 환자에 유래한다. 이들 세포는 erbB2와 프로락틴 수용체의 양자를 갖는다. SKBR3 세포는 ADCC 및 이종 이식 종양 모델로서 당 기술분야에 있어서 통상 사용되고 있다. 이것과는 별도로 인간 난소 선암에 유래하는 OVCAR3 세포를 이종 이식 종양의 공급원으로서 사용할 수 있다.

[0449] 본 발명의 프로토콜과 조성물은 인간에게 사용하기 전에, 바람직하게는 in vitro에서, 다음에 in vivo에서, 원하는 치료 또는 예방 활성에 대해서 시험된다. 치료약 및 치료법은 종양 또는 악성배양 세포주의 세포를 사용해서 스크리닝할 수 있다. 당 기술분야에 있어서 표준적인 많은 분석을 이와 같은 생존 및/또는 증식을 평가하는데 사용할 수 있다; 예를 들면 세포증식은 ^{3}H-티미딘 받아들임을 측정함으로써, 직접 세포 계수로부터, 프로토 온코진(예를 들면 fos, myc) 또는 세포 주기 마커 등의 공지된 유전자의 전사 활성의 변화를 검출함으로써 평가할 수 있다; 세포생존율은 트리판 블루 염색에 의해 평가할 수 있고, 분화는 형태의 변화, 연한천중에서의 증식 및/또는 콜로니 형성의 감소 또는 삼차원 기저막 또는 세포외 매트릭스 조제물중의 관형상 네트워크 형성 등에

기초하여 시각적으로 평가할 수 있다.

[0450] 치료에 사용하는 화합물은 인간에서 시험하기 전에 적합한 동물 모델계에서 시험할 수 있고, 동물로서는 한정되는 것은 아니지만, 래트, 마우스, 닭, 소, 원숭이, 토끼, 햄스터 등이 있으며, 예를 들면 상기한 동물 모델에서 시험할 수 있다. 화합물은 그 후에 적당한 임상시험에서 사용된다.

[0451] 또한, 당업자에 공지된 분석은 어느 것이라도 암, 염증성 질환, 또는 자가면역질환의 치료 또는 예방에 대해서 본 명세서에 개시한 병용 요법의 예방상 및/또는 치료상의 유효성을 평가하는데 사용할 수 있다.

[0452] 6. EXAMPLES

[0453] **6.1. 공유결합형 이중특이성 디아바디의 설계와 특징**

[0454] 단일특이성 공유결합형 디아바디 및 이중특이성 공유결합형 디아바디를 구축하고, 각각의 재조합체의 제작, 정제 및 결합특성을 평가했다. 본 명세서에 기재한 재조합 발현 시스템에 의해 제작되고, 친화성 정제된 디아바디 분자는 SDS-PAGE 및 SEC 해석에 의해 단일의 2량체종으로 이루어지는 것이 판명되었다. ELISA 및 SPR 해석에 의해, 공유결합형 이중특이성 디아바디는 양쪽의 표적 항원에 친화성을 나타내는 점, 및 양쪽의 항원과 동시에 결합할 수 있는 점이 또한 분명해졌다.

[0455] **재료와 방법**

[0456] *폴리펩티드 분자의 구축 및 설계:* 핵산 발현 벡터를 설계하고, **도 2**에서 모식도에 의해 나타낸 4개의 폴리펩티드 컨스트럭트를 제작했다. 컨스트럭트 1(**서열번호 9**)은 FcγRIIB를 인식하는 인간화 2B6항체의 VL도메인, 및 FcγRIIIA를 인식하는 인간화 3G8항체의 VH도메인을 포함한다. 컨스트럭트 2(**서열번호 11**)는 Hu3G8의 VL도메인, 및 Hu2B6의 VH도메인을 포함한다. 컨스트럭트 3(**서열번호 12**)은 Hu3G8의 VL도메인, 및 Hu3G8의 VH도메인을 포함한다. 컨스트럭트 4(**서열번호 13**)는 Hu2B6의 VL도메인, 및 Hu2B6의 VH도메인을 포함한다.

[0457] *PCR 및 발현 벡터의 구축:* VL 및 VH도메인의 코드 서열을 제1 PCR산물이 중복 서열을 포함하도록 설계한 포워드 및 리버스 프라이머를 사용해서 주형 DNA로부터 증폭했다. 이것에 의해 중복 PCR로 원하는 폴리펩티드 컨스트럭트의 코드 서열을 제작하는 것이 가능하게 된다.

[0458] *주형 DNA의 제1 PCR 증폭:* 약 35ng의 주형 DNA(예를 들면 목적으로 하는 항체의 경쇄 및 중쇄), 1μl의 10μM 포워드 프라이머 및 리버스 프라이머, 2.5μl의 10×pfuUltra 버퍼(Stratagene, Inc.), 1μl의 10mM dNTP, 1μl의 2.5유닛/μl의 pfuUltra DNA 폴리머라아제(Stratagene, Inc.), 및 총량 25μl가 되도록 가한 증류수를 미량 원심 튜브내에서 조용히 혼합하고, 미량 원심기로 단시간 스핀해서 반응혼합물을 튜브의 바닥에 모았다. PCR 반응을 GeneAmp PCR System 9700(PE Applied Biosystem)을 사용해서 행했다. 반응은 94℃에서 2분간; 계속해서 94℃에서 15초간, 58℃에서 30초간 및 72℃에서 1분간을 25사이클로 설정했다.

[0459] Hu2B6의 VL은 Hu2B6의 경쇄로부터 포워드 및 리버스 프라이머(각각 **서열번호** 55 및 56)를 사용해서 증폭했다. Hu2B6의 VH는 Hu2B6의 중쇄로부터 포워드 및 리버스 프라이머(각각 **서열번호 57 및 58**)를 사용해서 증폭했다. Hu3G8의 VL은 Hu3G8의 경쇄로부터 포워드 및 리버스 프라이머(각각 **서열번호 55 및 59**)를 사용해서 증폭했다. Hu3G8 의 VH는 Hu3G8의 중쇄로부터 포워드 및 리버스 프라이머(각각 **서열번호 60 및 61**)를 사용해서 증폭했다.

[0460] 1% 아가로오스 겔에서 PCR산물을 120볼트에서 30분간, 전기영동했다. PCR 산물을 겔로부터 잘라낸 후, MinElute 겔 추출 키트(Qiagen, Inc.)를 사용해서 정제했다.

[0461] *중복 PCR:* 제1 PCR산물을 하기와 같이 결합시켜서, 주형 DNA의 최초의 증폭에서 설명한 PCR조건과 동일한 조건을 사용해서 증폭했다. 중복 PCR의 산물도 상기한 바와 같이 정제했다.

[0462] 컨스트럭트 1을 코드하는 핵산서열(**서열번호 9**)(**도 2**에 모식도로 나타냄)을 Hu2B6의 VL 및 Hu3G8의 VH의 PCR증폭산물, 및 포워드 및 리버스 프라이머(각각 **서열번호 55 및 61**)를 혼합해서 증폭했다. 컨스트럭트 2를 코드하는 핵산서열(**서열번호 11**)(**도 2**에 모식도로 나타냄)을 Hu3G8의 VL 및 Hu2B6의 VH의 PCR 증폭산물, 및 포워드 및 리버스 프라이머(각각 **서열번호 55 및 58**)를 혼합해서 증폭했다. 컨스트럭트 3을 코드하는 핵산서열(**서열번호 12**)(**도 2**에 모식도로 나타냄)을 Hu3G8의 VL 및 Hu3G8의 VH의 PCR증폭산물, 및 포워드 및 리버스 프라이머(각각 **서열번호 55 및 61**)를 혼합해서 증폭했다. 컨스트럭트 4를 코드하는 핵산서열(**서열번호 13**)(**도 2**에 모식도로 나타냄)을 Hu2B6의 VL 및 Hu2B6의 VH의 PCR증폭산물, 및 포워드 및 리버스 프라이머(각각 **서열번호 55 및 58**)를 혼합해서 증폭했다.

[0463] VL도메인의 포워드 프라이머(즉, **서열번호 55**) 및 VH도메인의 리버스 프라이머(즉, **서열번호 58 및 서열번호**

61)는 발현 벡터내로의 최종 산물의 클로닝을 가능하게 하는 유니크한 제한 부위를 포함하고 있다. 정제된 중복 PCR산물을 제한 엔도뉴클레아제 NheI 및 EcoRI로 절단하고, 포유 동물 발현 벡터 pCIneo(Promega, Inc.)내에 도입해서 클론화했다. 컨스트럭트를 코드하는 플라스미드를 **표 26**에 나타나 있는 바와 같이 명명했다.

표 26

[0464] 플라스미드 컨스트럭트

암호화 컨스트럭트	플라스미드 명	삽입물
1	pMGX0669	hu2B6VL-hu3 G8VH
2	pMGX0667	hu3G8VL-hu2B6VH
3	pMGX0666	hu3G8VL-hu3G8VH
4	pMGX0668	hu2B6VL-hu2B6VH

[0465] *폴리펩티드/디아바디의 발현:* 컨스트럭트 1을 코드하는 pMGX0669를 컨스트럭트 2를 코드하는 pMGX0667과 함께, 리포펙타민2000(Invitrogen)을 사용하여, 사용설명서에 따라서 HEK-293 세포에 동시형질도입했다. 이들 2개의 플라스미드의 동시형질도입은 FcγRIIB 및 FcγRIIIA의 양쪽에 대하여 면역 특이적인 공유결합형 이중특이성 디아바디(CBD)(h2B6-h3G8디아바디)가 발현하도록 설계되어 있다. 컨스트럭트 3 및 4를 각각 코드하는 pMGX0666 및 pMGX0668을 각각 FcγRIIIA에 대하여 면역 특이적인 공유결합형 단일특이성 디아바디(CMD)(h3G8 디아바디) 및 FcγRIIB에 대하여 면역 특이적인 공유결합형 단일특이성 디아바디(CMD)(h2B6 디아바디)의 발현을 위해 HEK-293 세포에 각각 트랜스펙트했다. 배양 3일후, 분비된 산물을 조건 배지로부터 정제했다.

[0466] *정제: 디아바디*를 조건 배지로부터 CNBr 활성형 세파로오스 4B와 결합시킨 관련된 항원을 사용해서 회수했다. 로딩전에 어피니티 세파로오스 수지를 20mM Tris/HCl(pH 8.0)로 평형화했다. 로딩후, 용출전에 수지를 평형 버퍼에서 세정했다. 디아바디를 50mM 글리신(pH 3.0)을 사용해서 세정이 끝난 수지로부터 용출했다. 용출한 디아바디를 1M Tris/HCl(pH 8.0)로 즉시 중화하고, 원심분리형 농축기를 사용해서 농축했다. 농축한 디아바디를 추가로 PBS로 평형화한 Superdex 200 칼럼을 사용해서 사이즈 배제 크로마토그래피(SEC)에 의해 정제했다.

[0467] *SEC:* 사이즈 배제 크로마토그래피를 사용하여, 칼럼으로부터 용출된 디아바디의 대략적인 사이즈와 이질성을 분석했다. SEC 해석은 PBS로 평형화한 GE헬스케어사의 Superdex 200HR 10/30 칼럼으로 행해졌다. 전체길이 IgG(약 150kDa), Fab 단편(약 50kDa) 및 1본쇄 Fv(약 30kDa)의 용출 프로필과의 비교를 대조로서 사용했다.

[0468] *ELISA:* 용출 및 정제된 디아바디의 결합성을 ELISA 분석에 의해 섹션 5.4.2에서 설명한 바와 같이 특성 분석했다. 1웰당 50μl의 2μg/ml의 sCD32B-Ig 용액을 탄산 버퍼가 들어간 96웰 Maxisorp 플레이트 상에 4℃에서 하룻밤 코팅했다. 플레이트를 PBS-T(PBS+0.1% Tween20)에서 3회 세정하고, PBS-T 중의 0.5% BSA에서 30분간, 실온에서 블로킹했다. 계속해서, h2B6-h3G8 CBD, h2B6 CMD 또는 h3G8 CMD를 블로킹 버퍼를 사용해서 2배 희석으로 연속 희석하고, 0.5μg/ml로부터 0.001μg/ml까지의 범위의 디아바디 농도를 제작했다. 그 후에 플레이트를 실온에서 1시간 인큐베이션했다. PBS-T에서 3회 세정한 후, 0.2μg/ml의 sCD16A-비오틴을 1웰당 50μl로 각 웰에 가했다. 플레이트를 다시 실온에서 1시간 인큐베이션했다. PBS-T에서 3회 세정한 후, 1:5000 희석한 HRP 결합 스트렙타비딘(Amersham Pharmacia Biotech)을 검출을 위해 1웰당 50μl 사용했다. HRP-스트렙타비딘을 45분간, 실온에서 인큐베이션했다. 플레이트를 PBS-T에서 3회 세정하고, TMB 기질을 1웰당 80μl 사용해서 발색시켰다. 10분간의 인큐베이션후, 1% H_2SO_4를 1웰당 40μl 가함으로써 HRP-TMB 반응을 정지시켰다. OD450을 96웰 플레이트 리더와 SOFTmax 소프트웨어를 사용해서 읽어들이고, 결과를 GraphPadPrism 3.03 소프트웨어를 사용해서 플롯했다.

[0469] *BIAcore 분석:* 용출 및 정제된 디아바디의 동태 파라미터를 섹션 5.4.3에서 설명한 바와 같이 BIAcore 분석(BIAcore instrument 1000, BIAcore Inc., Piscataway, N.J.) 및 부속의 소프트웨어를 사용해서 해석했다.

[0470] sCD16A, sCD32B, 또는 sCD32A(음성 대조)를 센서 칩 표면의 4개의 플로우 셀 중 1개(플로우 셀 2)에 어느 수용체도 약 1000의 응답 유닛(response units:RU)이 표면상에 고정되도록, (NHS/EDC의 혼합물에 의한 카르복시메틸기의 수식에 의해) 아민 결합 화학을 통하여 고정했다. 이것에 계속하여, 미반응의 활성 에스테르를 1M Et-NH_2를 가해서 「캡 오프(capped off)」했다. 적당한 표면이 조제되면, 공유결합형 이중특이성 디아바디(h2B6-h3G8 CBD) 또는 공유결합형 단일특이성 디아바디(h2B6 CMD 또는 h3G8 CMB)를 표면에, 6.25~200nM의 용액을 70mL/min의 유속으로 180초간 도입함으로써 흘렸다. h3G8 scFV도 비교용으로 테스트했다.

[0471] 전체 데이터 세트를 회수한 시점에서, 얻어진 결합곡선을 제조업자인 BIAcore, Inc.사(Piscataway, NJ)로부터 제공되는 컴퓨터 알고리즘을 사용하여, 전체적으로 피트(근사)시켰다. 이들 알고리즘에 의해 K_{on} 및 K_{off}의 양쪽이 산출되었다. 이것으로부터 외견의 평형결합상수(K_D)가 2개의 속도상수의 비(즉 K_{off}/K_{on})로서 추정된다. 개개의 속도상수를 어떻게 도출했는가에 대한 보다 상세한 처리에 대해서는 BIAevaluaion 소프트웨어 핸드북(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)에서 볼수 있다.

[0472] 결합기 및 해리기는 각각 피트시켰다. 해리속도상수를 180초의 해리기에 있어서 32~34초 간격으로 얻었다. 결합기 피트를 1:1 Langmuir 모델에서 얻었다. 기저 피트를 이중특이성 디아바디와 scFv에 관한 Rmax 및 카이 자승법에 기초하여 선택했다. 2가 측정물 피트는 CMD 결합에 사용되었다.

[0473] **결과**

[0474] 비환원 조건하에서의 SDS-PAGE 해석에 의해, h3G8 CMD, h2B6 CMD 및 h2B6-h3G8 CBD 발현 시스템의 정제산물은 각각 단일종이며, 약 50kDa(**도 3**의 각각 레인 4, 5 및 6)의 추정 분자량을 가진다는 것이 분명해졌다. 환원 조건하에서는 CMD의 각 발현 시스템로부터 정제된 산물은 단일 밴드(레인 1 및 2)로서 이동했지만, h2B6-h3G8 CBD계로부터 정제된 산물은 2개로 분리되는 단백질(**도 3**, 레인 3)인 것이 분명해졌다. 발현 시스템로부터 정제되어, 환원 조건하에서 SDS-PAGE에 의해 시각화된 전체 폴리펩티드는 약 28kDa의 위치로 이동했다.

[0475] 각 발현 시스템 산물의 SEC 해석에서도, 그들이 단일 분자종이며(**도 4b**), 각각 IgG의 Fab 단편(약 50kDa)와 거의 같은 시간에서 용출되는 것(**도 4a**)이 분명해졌다. 이들 결과는 친화성 정제한 산물이 CMD 발현 시스템의 경우는 동종의 공유결합형 호모 2량체이며, 또 h2B6-h3G8 CBD의 경우에는 동종의 공유결합형 헤테로 2량체인 것을 나타내고 있다.

[0476] ELISA 샌드위치 분석을 사용하여, CD32B 및/또는 CD16A의 어느 한쪽 또는 양쪽에 대한 h2B6-h3G8 CBD의 결합특이성을 시험했다(**도 5**). CD32B를 표적 항원으로서 사용하고, 또 CD16A를 제2 프로브로서 사용했다. ELISA의 양성 시그널에 의해, 헤테로 2량체인 h2B6-h3G8 CBD는 양 항원에 대하여 특이성을 갖는 것이 분명해졌다. h3G8 CMD(CD32B에 결합하지 않음)에서의 마찬가지의 시험에서는 시그널이 보여지지 않았다.

[0477] SPR 해석은 h3G8 CMD가 sCD16을 면역 특이적으로 인식하지만 sCD32B는 인식할 수 없는 것, h2B6 CMD가 sCD32B를 면역 특이적으로 인식하지만 sCD16은 인식할 수 없는 것, 그리고 h2B6-h3G8 CBD가 sCD16과 sCD32B의 양쪽을 면역 특이적으로 인식할 수 있는 것을 나타냈다(**도 6a~b**). 시험한 디아바디는 모두 대조군 수용체sCD32A에는 결합하지 않았다(**도 6c**).

[0478] 또 SPR 해석을 사용하여, sCD16 및/또는 sCD32B에 대한 2개의 CMD 및 h2B6-h3G8 CBD의 속도상수 및 평형상수를 추정했다. 결과를 h3G8 scFV에 대해서 산출한 상기 상수와 비교했다. **도 7a~e**는 SPR 해석의 결과를 그래프로 나타낸 것이다. **도 7**에서 그려진 결과로 계산된 on 및 off 속도, 및 평형상수를 **표 27**에 나타낸다.

표 27

[0479] BIAcore 데이터로부터 산출된 속도상수 및 평형상수

수용체/분석물	k-on	k-off	Kd
sCD 16 / h3G8 디아바디	2.3×10^5	0.004	18.0
sCD16 / h2B6-h3G8 CBD	4.6 x 105	0.010	22.7
sCD 16 / h3G8 scFv	3.2 x 105	0.013	38.7
sCD32B / h2B6-h3G8 CBD	3.6 x 105	0.005	15.0
sCD32B / h2B6 디아바디	6.2 x 105	0.013	21.0

[0480] ELISA 해석의 결과와 합하면, h2B6-h3G8 공유결합형 헤테로 2량체는 CD32B 및 CD16의 양쪽에 대하여 특이성을 유지하고 있는 것, 및 양 항원에 동시에 결합할 수 있는 것이 실험으로부터 뒷받침되었다. 본 분자를 **도 8**에 모식도로 나타냈다.

[0481] **6.2. Fc도메인을 포함하는 공유결합형 이중특이성 디아바디의 설계와 특성** 분석

[0482] IgG 유사 분자, 즉 Fc도메인을 포함하는 분자를 만들기 위해서, 실시예 6.1에서 나타낸 헤테로 2량체 CBD 분자를 포함하는 폴리펩티드의 1개를, Fc도메인을 추가로 포함하(항체의 중쇄 및 경쇄에 유사한 「무거운」쇄 및 「

가벼운」쇄를 만들어 내)도록 개변했다. 따라서, 헤테로 2량체의 이중특이성 분자가 동종분자와 2량체화하는 Fc 도메인을 포함함으로써 4가의 4량체 IgG 유사 분자(즉, 헤테로 2량체의 이중특이성 분자의 Fc도메인을 통하여 2량체화함으로써 형성되는 분자)가 형성될 것이다. 흥미롭게도 이와 같은 4량체 분자는 예를 들면 표적 항원에 대한 면역 특이적 결합성에 대해서 조건 배지를 시험한다는 기능 분석을 사용하여, 재조합 발현 시스템의 조건 배지중에는 검출되지 않았다. 그 대신에, VL, VH 및 Fc도메인으로 이루어지는 단량체를 포함하는 2량체 분자만이 상기 기능 분석에서 검출되었다. 이론상의 4량체 구조가 안정성의 면에서 문제가 될지 여부를 시험하기 위해서, Fc도메인을 포함하는 폴리펩티드가 힌지 영역을 추가로 포함하도록 유전자 조작하고, 한편 「가벼운」쇄를 포함하는 폴리펩티드는 인간κ형 경쇄의 불변 도메인의 6개의 C말단 아미노산을 포함하도록 유전자 조작했다. 이와 같이 유전자 조작한 「무거운」 및 「가벼운」쇄를 재조합 발현 시스템에서 공발현시켰을 때, 기능 분석에 의해, 표적 항원과 항Fc 항체 양쪽에 면역 특이적으로 결합할 수 있는 디아바디 분자가 검출되었다.

[0483] **재료와 방법**

[0484] *폴리펩티드 분자의 구축 및 설계:* 실시예 6.1에서 나타낸 컨스트럭트 1 및 2의 개변형을 제작하기 위해서, 핵산 발현 벡터를 설계했다. 컨스트럭트 5(**서열번호 14**) 및 6(**서열번호 15**)은 또한 Fc도메인을 포함하도록, 각각 컨스트럭트 1 및 2를 유전자 조작함으로써 제작되었다. 컨스트럭트 7(**서열번호 16**)은 컨스트럭트 1을 유전자 조작하고, 또한 그 C말단에 서열 FNRGEC(**서열번호 23**)를 포함하도록 제작되었다. 컨스트럭트 8(**서열번호 18**)은 컨스트럭트 2를 유전자 조작하고, 또한 힌지 영역과 Fc도메인(V215A 변이를 포함함)을 포함하도록 제작되었다. 컨스트럭트 5~8의 모식도를 도 9에 나타낸다.

[0485] *PCR 및 발현 벡터의 구축:* PCR 및 PCR산물의 정제 프로토콜은 모두 실시예 6.1에서 설명한 바와 같다. 플라스미드 pMGX0669 및 pMGX0667을 각각 컨스트럭트 1 및 2의 코드 서열용의 주형으로서 사용했다. HuIgG의 Fc도메인용의 및/또는 힌지 도메인용의 코드 서열은 각각 **서열번호 5 또는 서열번호 1 및 서열번호 5**로 했다. 주형 DNA의 코드 서열은 포워드 및 리버스 프라이머를 사용해서 증폭했는데, PCR산물이 중복 서열을 포함하고, 중복 PCR이 원하는 산물의 코드 서열을 생성시키는 것 같은 프라이머를 사용했다.

[0486] 컨스트럭트 1의 코드 서열은 pMGX0669로부터 포워드 및 리버스 프라이머(각각 **서열번호 55 및 서열번호 62**)를 사용해서 증폭되었다. 컨스트럭트 2의 코드 서열은 pMGX0667로부터 포워드 및 리버스 프라이머(각각 **서열번호 55 및 서열번호 63**)를 사용해서 증폭되었다. HuIgG 힌지-Fc는 포워드 및 리버스 프라이머(각각 **서열번호 65 및 서열번호 66**)를 사용해서 증폭했다. 컨스트럭트 7(**서열번호 16**)의 코드 서열은 pMGX0669로부터 포워드 및 리버스 프라이머(각각 **서열번호 55 및 서열번호 67**)를 사용해서 증폭되었다.

[0487] *중복(overlapping) PCR:* 제1 PCR산물을 이하에 기재한 바와 같이 조합하고, 실시예 6.1에서 설명한 바와 같이 증폭 및 정제했다.

[0488] 컨스트럭트 5(**서열번호 14**)(도 9에 모식도로 나타냄)를 코드하는 핵산 서열은 컨스트럭트 1 및 HuIgG Fc의 PCR 증폭산물, 및 포워드 및 리버스 프라이머(각각 **서열번호 55 및 서열번호 64**)를 조합시켜서 증폭했다. 컨스트럭트 6(서열번호 15)(도 9에 모식도로 나타냄)을 코드하는 핵산 서열은 컨스트럭트 2 및 HuIgG Fc의 PCR증폭산물, 및 포워드 및 리버스 프라이머(각각 **서열번호 55 및 서열번호 66**)를 조합시켜서 증폭했다. 컨스트럭트 8(**서열번호 18**)(도 9에 모식도로 나타냄)을 코드하는 핵산 서열은 컨스트럭트 2 및 HuIgG 힌지-Fc의 PCR증폭산물, 및 포워드 및 리버스 프라이머(각각 **서열번호 55 및 서열번호 66**)를 조합시켜서 증폭했다.

[0489] 최종 산물을 상기한 바와 같이 포유 동물 발현 벡터 pCIneo(Promega, Inc.)내에 클론화했다. 컨스트럭트를 코드하는 플라스미드는 **표 28**에 나타나 있는 바와 같이 명명했다.

표 28

[0490] 플라스미드 컨스트럭트

암호화 컨스트럭트	플라스미드명	삽입물
5	pMGX0676	hu2B6VL-hu3G8VH-huFc
6	pMGX0674	hu3G8VL-hu2B6VH-huFc
7	pMGX0677	Hu2B6VL-hu3G8VH-FNRGEC
8	pMGX0678	Hu3G8VL-hu2B6VH-hu 힌지-Fc (A215V)

[0491] *폴리펩티드/디아바디의 발현:* 섹션 6.1에서 기재한 바와 같이, 리포펙타민 2000(Invitrogen)을 사용해서 HEK-

293 세포내에 별개로 4개의 동시형질도입을 행했다. 상기 동시형질도입은 즉, 컨스트럭트 1 및 6을 각각 코드하는 pMGX0669 및 pMGX0674, 컨스트럭트 2 및 5를 각각 코드하는 pMGX0667 및 pMGX0676, 및 컨스트럭트 7 및 8을 각각 코드하는 pMGX0677 및 pMGX0678이다.

[0492] 이들 플라스미드의 동시형질도입은 FcγRIIB 및 FcγRIIIA의 양쪽에 면역 특이적인 IgG 유사 구조를 갖는 4가의 이중특이성 디아바디(CBD)를 발현하도록 설계되었다. 컨스트럭트 6 및 5를 각각 코드하는 pMGX0674 및 pMGX0676의 추가적인 동시형질도입도 행했다. 배양 3일후, 조건 배지를 회수했다. 조건 배지중의 분비 산물의 양을 정제된 Fc를 기준으로 사용하여, 항IgG Fc ELISA에 의해 정량화했다. 그 후에 샘플중의 산물의 농도를 정량값에 기초하여 정규화하고, 이 정규화한 샘플을 이후의 분석에 사용했다.

[0493] *ELISA:* 배지중에 분비된 디아바디 분자의 결합성을, 상기 샌드위치 ELISA에서 분석했다. 특별히 나타낸 경우를 제외하고, CD32B를 플레이트 코팅용으로, 즉 표적 단백질로서 사용했다. 또 HRP 결합 CD16을 프로브로서 사용했다.

[0494] **결과**

[0495] ELISA 분석을 사용하여, 컨스트럭트 1 및 6(pMGX669-pMGX674), 컨스트럭트 2 및 5(pMGX667-pNGX676), 그리고 컨스트럭트 5 및 6(pMGX674-pMGX676)을 포함하는 재조합 발현 시스템 유래의 정규화한 샘플을, CD32B 및 CD16A와 동시에 결합 가능한 디아바디 분자의 발현에 대해서 시험했다(**도 10**). ELISA 데이터는 컨스트럭트 1 및 6을 사용한 동시형질도입, 또는 컨스트럭트 2 및 5를 사용한 동시형질도입에서는 한쪽 또는 양쪽의 항원에 결합할 수 있는 산물은 생기지 않았다(**도 10**, 각각 □ 및 ▲). 그러나 컨스트럭트 5 및 6의 동시형질도입은 CD32B 및 CD16A의 양 항원에 결합할 수 있는 산물의 분비를 초래했다. 후자의 산물은 컨스트럭트 5 및 6의 2량체이며, **도 11**에 모식도로 나타낸 구조를 갖고, 각각의 항원에 대한 1개의 결합 영역을 포함하고 있다.

[0496] IgG 유사 헤테로 4량체 구조의 형성을 이끌기 위해서, 부가적인 6아미노산의 코드 서열을 컨스트럭트 1의 C말단에 부가하여, 컨스트럭트 7(**서열번호 16**; 도 9에 모식도로 나타냄)을 제작했다. 부가적인 6아미노산 FNRGEC(**서열번호 23**)는 κ형 경쇄의 C말단에 유래하고, 통상 IgG분자내에서 중쇄의 상부 힌지 도메인과 상호 작용한다. 또 힌지 도메인을 컨스트럭트 6의 내부에 유전자 조작으로 도입하고, 컨스트럭트 8(**서열번호 18**, 및 도 9)을 제작했다. 컨스트럭트 8은 또한 상부 힌지 영역중에 아미노산 변이 A215V를 포함하고 있었다. 컨스트럭트 7 및 컨스트럭트 8을 코드하는 발현 플라스미드인, 각각 pMGX677 및 pMGX678을 그 후 HEK-293 세포에 동시형질도입하고, 상기한 바와 같이 발현시켰다.

[0497] 컨스트럭트 7 및 8(pMGX0677+pMGX0678)을 포함하는 재조합 발현 시스템로부터 생산된 디아바디 분자는 ELISA 분석에서 CD32B 및 CD16A의 결합에 관하여, 컨스트럭트 1 및 6(pMGX669+pMGX674), 컨스트럭트 2 및 8(pMGX669+pMGX678), 그리고 컨스트럭트 6 및 7(pMGX67+pMGX674)(**도 12**)을 포함하는 발현 시스템로부터 생산된 디아바디 분자와 비교했다.

[0498] 이미 서술한 바와 같이, 컨스트럭트 1 및 6(pMGX669+pMGX674)을 포함하는 발현 시스템에 의해 생산된 분자는 CD32A 및 CD16A의 어느 쪽에도 결합할 수 없는 것을 알 수 있었다(**도 10 및 도 12**). 이것에 대해서 컨스트럭트 7 및 6(pMGX0677+pMGX0674)의 공발현, 또는 컨스트럭트 7 및 8(pMGX0677-pMGX0678)의 공발현으로부터 얻어지는 산물은 CD32A 및 CD16A의 양쪽과 결합할 수 있었다(**도 12**). 컨스트럭트 7이 C말단 서열 FNRGEC(**서열번호 23**)를 포함하는 것을 제외하면 컨스트럭트 1에 유사한 점, 그리고 컨스트럭트 8이 힌지 도메인 및 A215V 변이를 포함하는 것을 제외하면 컨스트럭트 6에 유사한 점이 주목된다. 이 데이터는 C-κ형 경쇄의 C말단에 유래하는 여분의 6아미노산(FNRGEC; **서열번호 23**)을 Fc를 가지지 않는 「가벼운」쇄에 부가하는 것이, 대응하는 중쇄가 힌지 도메인을 포함하는지 여부에 관계 없이(즉 pMGX0677+pMGX0674 및 pMGX0677-pMGX0678, **도 12**), 4량체 IgG 유사 디아바디 분자의 형성을 안정화하는데도 도움이 되는 것을 나타내고 있다. Fc를 갖는 「무거운」 폴리펩티드에 힌지 도메인을 부가하는 것은, 대응하는 「가벼운」쇄에 대한 C말단 서열 FNRGEC(**서열번호 23**)의 부가가 없는 경우에는 분명히 마찬가지의 안정화를 달성할 수 없었다(즉, 컨스트럭트 2 및 8(pMGX669+pMGX67)의 동시형질도입의 산물에 의한 결합이 결여되어 있다). 4량체 디아바디 분자의 구조를 **도 13**에 모식도로 나타낸다.

[0499] **6.3. 4량체 IgG 유사 디아바디의 형성에 있어서의 도메인의 순서 및 추가적**인 이황화 결합의 효과

[0500] 4량체 IgG 유사 디아바디 분자의 「가벼운」 및 「무거운」 폴리펩티드 사슬간의 추가적인 안정화의 효과를 폴리펩티드 사슬상의 선택된 잔기의 시스테인에 의한 치환에 의해 조사했다. 부가적인 시스테인 잔기는 「무거운」 및 「가벼운」쇄간에 부가적인 이황화 결합을 부여한다. 또한, Fc도메인 또는 힌지-Fc도메인을 폴리펩티드 사슬의 C말단로부터 N말단으로 옮김으로써 결합 활성에 있어서의 도메인의 순서를 조사했다. 부가적인 이황화

결합을 포함하는 분자의 결합 활성은 그러한 결합을 가지는 먼저 구축된 디아바디 분자에 비해 바뀌지 않았지만, Fc 또는 힌지-Fc도메인을 디아바디를 구성하는 「무거운」 폴리펩티드 사슬의 N말단으로 옮기면, 그 표적 항원의 한쪽 또는 양쪽에 대한 이중특이성 분자의 결합친화성 및/또는 결합력이 놀라울 정도로 개선되었다.

[0501] **재료와 방법**

[0502] *폴리펩티드 분자의 구축 및 설계:* 실시예 6.2에서 나타낸 컨스트럭트 5, 6 및 8의 개변형을 제작하기 위해서, 핵산 발현 벡터를 설계했다. 컨스트럭트 9(**서열번호 19**) 및 컨스트럭트 10(**서열번호 20**)(모두 **도 13**에 모식도로 나타냄)은 각각 Fc도메인 또는 힌지-Fc도메인이 폴리펩티드의 C말단로부터 N말단로 시프트하고 있는 것을 제외하면, 컨스트럭트 8 및 6과 유사하다. 또한, 사용한 Fc도메인은 모두 야생형 IgG1의 Fc도메인이다. 컨스트럭트 11(**서열번호 21**)(**도 14**에 모식도로 나타냄)은 C말단이 서열 FNRGEC(**서열번호 23**)를 추가로 포함하도록 설계되어 있는 것을 제외하면, 실시예 6.1로부터의 컨스트럭트 2에 유사하다. 컨스트럭트 12(**서열번호 22**)(**도 14**에 모식도로 나타냄)는 Fc도메인이 또한 힌지 영역을 포함하는 것을 제외하면, 실시예 6.2로부터의 컨스트럭트 5에 유사하다. 또 컨스트럭트 11 및 12에 관해서는, 2B6의 VL도메인 및 2B6의 VH도메인은 각 도메인중의 글리신을 시스테인으로 치환하기 위한 단일 아미노산 변이(각각 G105C 및 G44C)를 포함하고 있다.

[0503] *PCR 및 발현 벡터의 구축:* PCR 및 PCR산물의 정제 프로토콜은 모두 실시예 6.1 및 6.2에서 설명한 바와 같다.

[0504] *중복 PCR:* 실시예 6.1 및 6.2에 기재된 방법을 사용하여 최종 산물을 구축하고 증폭하고 정제했다.

[0505] 최종 산물을 상기한 바와 같이 포유 동물 발현 벡터 pCIneo(Promega, Inc.)내에 클론화했다. 컨스트럭트를 코드하는 플라스미드는 **표 29**에 나타나 있는 바와 같이 명명했다.

표 29

[0506] 플라스미드 컨스트럭트

암호화 컨스트럭트	플라스미드명	삽입물
9	pMGX0719	Hu힌지/Fc-hu3G8VL-hu2B6VH
10	pMGX0718	HuFc-hu2B6VL-hu3G8VH
11	pMGX0716	Hu2B6VL(G/C)-hu3G8VH-hu힌지FC
12	pMGX0717	Hu3G8VL-hu2B6VH(G/C)-FNRGEC

[0507] *폴리펩티드/디아바디의 발현:* 섹션 6.1에서 기재한 바와 같이 리포펙타민2000을 사용해서 HEK-293 세포내에 별개로 3개의 동시형질도입을 행했다. 상기 동시형질도입은 즉 컨스트럭트 1 및 9를 각각 코드하는 pMGX0669 및 pMGX0719, 컨스트럭트 1 및 10을 각각 코드하는 pMGX0669 및 pMGX0718, 그리고 컨스트럭트 11 및 12를 각각 코드하는 pMGX0617 및 pMGX0717이다. 이들 플라스미드의 동시형질도입은 FcγRIIB 및 FcγRIIIA의 양쪽에 면역 특이적인 IgG 유사 구조를 가진 4가의 이중특이성 디아바디(CBD)를 발현하도록 설계되어 있다. 배양 3일후, 조건 배지를 회수했다. 조건 배지중의 분비산물의 양을 항IgG Fc ELISA에 의해, 정제한 Fc를 기준으로서 사용해서 정량화했다. 그 후에 샘플중의 산물의 농도를 정량값에 기초하여 정규화하고, 이 정규화한 샘플을 이후의 분석에 사용했다.

[0508] *ELISA:* 배지중에 분비된 디아바디 분자의 결합성을, 상기 샌드위치 ELISA에 의해 분석했다. 특별히 나타낸 경우를 제외하고, CD32B를 플레이트 코팅용으로, 즉 표적 단백질로서 사용했다. 또 HRP 결합 CD16을 프로브로서 사용했다.

[0509] *웨스턴블랏:* 상기 3개의 동시형질도입으로부터의 조건 배지 약 15ml를 SDS-PAGE에 의해 비환원 조건하에서 해석했다. 1장의 겔을 Simply Blue Safestain(Invitrogen)으로 염색하고, 계속해서, 동일 겔을 일반적인 전사 방법을 사용해서 PVDF멤브레인(Invitrogen)에 전사했다. 전사후, 멤브레인을 1×PBS중의 5% 탈지분유에서 블로킹했다. 그 후에 멤브레인을 2% 탈지분유 1×PBS/0.1% Tween 20중의 1:8000 희석한 HRP 결합 염소 항인간 IgG1 H+L 항체 10ml 중에서 실온에서 1시간 조용히 교반하면서 인큐베이션했다. 1×PBS/0.3% Tween 20에서, 각각 5분간씩 2회 세정한 후, ECL 웨스턴블로팅 검출 시스템(Amersham Biosciences)을 사용하여, 사용설명서에 따라 실온에서 20분간 멤브레인을 노광했다. 필름을 X선처리장치로 현상했다.

[0510] **결과**

[0511] 컨스트럭트 1 및 9, 컨스트럭트 1 및 10, 및 컨스트럭트 11 및 12를 포함하는 재조합 발현 시스템 유래의 조건 배지를, SDS-PAGE(비환원 조건하) 해석 및 웨스턴블랏팅(항IgG를 프로브로서 사용)에 의해 해석했다. 웨스턴블랏에 의해 컨스트럭트 11 및 12를 포함하는 계 또는 컨스트럭트 9 및 1을 포함하는 계 유래의 산물은, 주로 약 150kDa의 단일 분자종(각각 **도 15**의 레인 3 및 2)을 형성하는 것이 분명해졌다. 이들 산물은 모두 내부 이황화 결합이 디아바디를 구성하는 「가벼운」 및 「무거운」 쇄간에 설계되어 있다. 한편, 「가벼운」 및 「무거운」 쇄간에 내부 이황화 결합이 설계되어 있지 않은 컨스트럭트 10 및 1로부터 형성된 분자는 분자량 약 75kDa 및 약 100kDa(**도 15**의 레인 1)의 적어도 2개의 분자종을 형성했다.

[0512] 웨스턴블랏의 결과에도 불구하고, 3개의 산물의 각각이 CD32A 및 CD16의 양쪽과 결합할 수 있는 것을 알 수 있었다(**도 16**). 놀랍게도 C말단에 힌지-Fc도메인을 포함하는 산물(컨스트럭트 11 및 12로부터 형성됨)에 비해, Fc(또는 Fc-힌지)도메인이 Fc함유 폴리펩티드 사슬(즉, 「무거운」쇄)의 아미노 말단에 있는 양쪽의 발현 시스템 유래의 산물(컨스트럭트 9+1 및 컨스트럭트 10+1)에서는 그 표적 펩티드(즉 CD32B 및/또는 CD16)의 한쪽 또는 양쪽에 대한 친화성 및/또는 결합력이 증강되는 것이 실증되었다.

[0513] **6.4. 폴리프로테인 전구체의 프로세싱에 있어서의 내부/외부 절단 부위의 효**과, 및 공유결합형 이중특이성 디아바디의 발현; 인간 IgG 람다쇄 및 힌지 도메인의 일부를 포함하는 이중특이성 디아바디의 설계 및 특성 분석

[0514] 본 명세서에서 설명한 바와 같이, 본 발명의 디아바디의 개개의 폴리펩티드 사슬 또는 디아바디 분자를 단일의 폴리프로테인 전구체 분자로서 발현시킬 수 있다. 실시예 6.1~6.3에서 설명한 재조합계의 상기 폴리프로테인 전구체로부터 기능적인 CBD를 적절히 프로세싱해서 발현하는 능력은 내부 절단 부위(특히 푸린 절단 부위)에 의해 분리되는 CBD의 제1 및 제2 폴리펩티드 사슬의 양쪽을 코드하는 핵산을 제작함으로써 시험했다. 기능적인 CBD는 폴리프로테인 전구체 분자를 포함하는 재조합계로부터 단리했다.

[0515] 실시예 6.3에서 이미 서술한 바와 같이, 인간κ 경쇄 유래의 C말단의 6아미노산 FNRGEC(**서열번호 23**)의 부가는 디아바디 형성을 안정화하는 것을 알 수 있었다. 아마도 이것은 **서열번호 23**을 포함하는 도메인과, Fc도메인 또는 힌지-Fc도메인을 포함하는 도메인간에서 쇄간 상호 작용이 증강되기 때문이라고 생각된다. 이 람다쇄/Fc 유사 상호 작용의 안정 효과를 어느 쪽의 폴리펩티드 사슬도 Fc도메인을 포함하지 않는 CBD에서 시험했다. 디아바디의 한쪽의 폴리펩티드 사슬을 유전자 조작하고, 그 C말단에 **서열번호 23**을 도입했다. 그 상대방이 되는 폴리펩티드 사슬은 IgG의 힌지 도메인에 유래하는 아미노산 서열 VEPKSC(**서열번호 77**)를 포함하도록 유전자 조작했다. 이 CBD와 컨스트럭트 1 및 2를 포함하는 CBD(실시예 6.1 유래)의 비교에 의해, 힌지 도메인 및 람다쇄에 유래하는 도메인을 포함하는 CBD는 그 표적 에피토프의 한쪽 또는 양쪽에 대하여 약간 큰 친화성을 나타내는 것이 분명해졌다.

[0516] **재료와 방법**

[0517] ●*폴리펩티드 분자의 구축 및 설계:* (폴리프로테인 전구체): 2개의 폴리프로테인 전구체 분자를 제작하기 위해서 핵산 발현 벡터를 설계했다. 양 분자 모두 **도 17**에 모식도로 나타내고 있다. 컨스트럭트 13(**서열번호 95**)은 폴리펩티드 사슬의 N말단측으로부터 순서대로 3G8의 VL도메인, 2.4G2의 VH도메인(mCD32B에 결합함), 푸린 절단 부위, 2.4G2의 VL도메인, 및 3G8의 VH도메인을 포함하고 있다. 컨스트럭트 13을 코드하는 뉴클레오티드 서열을 **서열번호 96**에 나타낸다. 컨스트럭트 14(**서열번호 97**)(**도 17**)는 폴리펩티드 사슬의 N말단측으로부터 순서대로 3G8의 VL도메인, 2.4G2의 VH도메인(mCD32B에 결합함), 푸린 절단 부위, FMD(구제역 바이러스 프로테아제 C3) 부위, 2.4G2의 VL도메인, 및 3G8의 VH도메인을 포함하고 있다. 컨스트럭트 14를 코드하는 뉴클레오티드 서열을 **서열번호 98**에 나타낸다.

[0518] 핵산 발현 벡터를 실시예 6.1에서 나타낸 컨스트럭트 1 및 2의 개변형을 제작하기 위해서 설계했다. 컨스트럭트 15(**서열번호 99**)(**도 17**)는 컨스트럭트 15의 C말단이 아미노산 서열 FNRGEC(**서열번호 23**)를 포함하는 것을 제외하면, 실시예 6.1에서 나타낸 컨스트럭트 1(**서열번호 9**)에 유사하다. 컨스트럭트 15를 코드하는 핵산 서열을 **서열번호 100**에 나타낸다. 컨스트럭트 16(**서열번호 101**)(**도 17**)은 컨스트럭트 16의 C말단이 아미노산 서열 VEPSK(**서열번호 77**)를 포함하는 것을 제외하면, 실시예 6.1에서 나타낸 컨스트럭트 2에 유사하다. 컨스트럭트 16을 코드하는 핵산 서열을 서열번호 102에 나타낸다.

[0519] *PCR 및 발현 벡터의 구축:* PCR 및 PCR산물의 정제 프로토콜은 모두 실시예 6.1 및 6.2에서 설명한 바와 같다.

[0520] *중복 PCR:* 실시예 6.1 및 6.2에 기재된 방법을 사용하고, 적당한 프라이머를 사용하여, 최종 산물을 구축하고 증폭하고 정제했다.

[0521] 최종 산물을 상기 서술한 바와 같이 포유 동물 발현 벡터 pCIneo(Promega, Inc.)내에 클론화했다. 컨스트럭트를 코드하는 플라스미드는 **표 30**에 나타나 있는 바와 같이 명명했다.

표 30

[0522] 플라스미드 컨스트럭트

암호화 컨스트럭트	플라스미드명	삽입물
13	pMGX0750	3G8VL-2.4G2VH-Furin-2.4G2VL-3G8VH
15	pMGX0752	Hu2B6VL-Hu3G8VH-FNRGEC
16	pMGX0753	Hu3G8VL-Hu2B6VH-VEPKSC

[0523] *폴리펩티드/디아바디의 발현:* 섹션 6.1에서 기재한 바와 같이 리포펙타민2000을 사용해서 HEK-293 세포내에 1회의 트랜스펙션 및 1회의 동시형질도입을 행했다. 단독의 트랜스펙션에서는 컨스트럭트 13을 코드하는 pMGX0750을, 또 동시형질도입에서는 컨스트럭트 15 및 16을 각각 코드하는 pMGX0752 및 pMGX0753을 사용했다. 배양 3일 후, 조건 배지를 회수하고, 분비된 산물을 상기한 바와 같이 친화성 정제했다.

[0524] *ELISA:* 배지중에 분비된 디아바디 분자의 결합성을 상기 샌드위치 ELISA에 의해 분석했다. 마우스 CD32B를 표적 단백질로서 사용해서 플레이트를 코팅했다. 또 HRP 결합 CD16을 컨스트럭트 15 및 16의 동시형질도입의 산물용 프로브로서 사용했다. mCD32B를 표적 단백질로서 사용하고, 또 비오틴 결합 CD16A를 컨스트럭트 13을 포함하는 재조합계용의 프로브로서 사용했다.

[0525] **결과**

[0526] 컨스트럭트 13을 포함하는 재조합 발현 시스템로부터 얻어진 조건 배지를 샌드위치ELISA에서 해석했다. ELISA 분석은 mCD32B 및/또는 CD16의 한쪽 또는 양쪽에 대한 특이성에 대해서 CBD의 결합성을 시험했다(**도 18**). CD32B를 표적 항원으로서 이용하고, 또 CD16A를 2차 프로브로서 사용했다. ELISA에 있어서의 양성 시그널에 의해, 폴리프로테인 전구체로부터 생성되는 헤테로 2량체 h2.4G2-h3G8 CBD는 양 항원에 대하여 특이성을 갖는 것이 분명해졌다.

[0527] 마찬가지로, 컨스트럭트 15 및 16을 코드하는 벡터의 동시형질도입에 의해 생긴 정제 산물을 ELISA 분석에서 시험하고, 컨스트럭트 1 및 2로 이루어지는 산물(실시예 6.1)과 비교했다. CD32B를 표적 항원으로서 이용하고, 또 CD16A를 2차 프로브로서 사용했다. 컨스트럭트 1 및 2로 이루어지는 산물과 마찬가지로, 컨스트럭트 15 및 16의 산물은 동시에 CD32B 및 CD16A와 결합할 수 있는 것을 알 수 있었다. 오히려, 컨스트럭트 15 및 16의 산물이 표적 항원, 즉 CD32B 또는 CD16A의 한쪽 또는 양쪽에 대하여 약간 증강된 친화성을 갖는 것을 알 수 있었다. 이것은 아마 컨스트럭트 1 및 2로 이루어지는 산물에는 없는 람다쇄 영역 FNRGEC(**서열번호 23**)와 힌지 영역 VEPKSC(**서열번호 77**)의 상호 작용에 의해 주어지는 쇄간 결합의 안정성 및/또는 충실도의 증가(야생형의 VH-VL도메인의 상호 작용과 비교했을 때)에 의한 것이라고 생각된다.

[0528] **6.5. 다중 친화도를 함께 연결하기 위한, 이중 친화성 재표적화 시약(DUAL AFFINITY RETARGETING REAGENTS("DART"))의 이용**

[0529] 본 발명의 하나의 구체예는, 다중 친화도를 함께 연결하는 새로운 방법 뿐 아니라, 신규의 이중 친화성 재표적화 시약(dual affinity retargeting reagents)("DARTs")에 관한 것이다. 이 "DART"는 단일 특이성, 이중 특이성, 삼중 특이성 등일 수 있고, 따라서 하나 이상의 상이한 에피토프(동일 또는 다른 항원의)에 동시에 결합할 수 있다. 또한, "DART"는 1가, 2가, 3가, 4가, 6가, 8가 등일 수 있고, 따라서 하나, 둘, 셋, 넷, 다섯, 여섯 또는 그 이상의 분자에 동시에 결합할 수 있다. **도 35**에 나타낸 바와 같이, DART의 이러한 두가지 특성이 조합되어, 예를 들면 4가 등의 이중 특이성 항체들을 생성할 수 있다.

[0530] 헵텐(hapten), 플루오레세인(플루오레세인)에 대한 친화성 뿐만 아니라, 원형의(prototypic) 면역 수용체인 huCD32B에 대한 친화성을 갖는 DART를 개발한 점은 발전된 것이다. "2B6/4420"라고 칭하는 이 DART는 보편적인 어댑터로서 작용하고, 플루오레세인이 연결된 결합 파트너와 반응하는 분자와 huCD32B를 같이 연결시킬 수 있다. CD32B는, 활성 신호와 면역 복합체를 집합시켜, 활성화 신호를 켄치(quench)하는 능력을 갖는 Fc 수용체이다. 초기 실시에서, 이 기술은 새로운 DART 컨스트럭트를 만들 필요없이 huCD32B를 모이게 하기 위한 몇몇 생물학적 표적을 신속히 스크리닝할 수 있게 해준다. 2B6/4420는 단지 세포 표면 수용체에 대한 플루오레세인화 항체와 혼합될 수 있고, 따라서 이 수용체에 대한 친화성을 갖는 DART의 작용을 모사할 수 있다(**도 20**).

더욱이, DART 시약은 쉽게 발현 또는 생산되지 않는 친화성 시약의 효율적인 연결(linkage)을 허용하기 때문에, 기술적인 제약을 극복할 수 있다. 2B6/4420-함유 DART는 리서치 도구와 임상적인 후보로서 매우 유용하다. HEK293 세포로부터 생성되는 2B6/4420는 ELISA 분석에서 CD32B 및 플루오레세인에 동시에 결합할 수 있다. 또한, 이것은 CD79와의 결합을 통하여 BCR 복합체에 대해 CD32B을 모음으로써 세포 증식을 저해할 수 있다. DART의 2B6 arm은 다른 관련된 특이성을 갖는 상이한 항체 서열 또는 결합 서열로 대체될 수 있다.

[0531] **재료와 방법**

[0532] ***플라스미드 컨스트럭트:*** 2B6/4420는 인간화 2B6 MAb(hu2B6, MGA321) 및 키메라 마우스 Fv/인간 Fc 버전의 항-플루오레세인 MAb, 4420의 서열에서 유래한다. 완전히 어셈블된 DART는 2개의 폴리펩티드로 구성되고, 2개의 Fv 영역이 공유결합한다. 제 1 폴리펩티드는 분비 신호 서열과 그 뒤에 hu2B6VL로 이루어지며, 이 hu2B6VL는 아미노산 잔기 GGGSGGGG로 구성되는 링커에 의해 분리된 4420VH와의 융합 단백질로서 생산된다. 카파 경쇄의 C-말단 유래의 서열 FNRGEC는 이 폴리펩티드의 C-말단에 첨부되어 있다. 나머지 폴리펩티드는 신호서열-4420VL-GGGSGGGG-hu2B6VH로 구성되고, 그 C-말단에는 인간 IgG1 Fd 단편의 C-말단에서 유래된 서열 VEPKSC이 첨부되어 있다. 이 2개의 쇄에 있는 시스테인은 이황화 결합을 형성하여, 2개의 폴리펩티드 사슬을 공유결합시킨다(**도 20**). 설명된 폴리펩티드를 암호화하는 DNA 서열은 존재하는 플라스미드로부터 PCR 증폭하고, 오버랩 PCR에 의해 결합하고, pCIneo(Promega)의 Nhe I와 EcoR I 사이내로 클로닝하였다. 마지막으로, 위에서 설명한 것과 유사한 방법을 이용하여 앞서 구성된 huCD32B 및 huCD1β(2B6/3G8)에 대해 친화성을 갖는 DART를 대조군으로서 이용하였다.

[0533] ***항체:*** 뮤린(murine) 단일클론 항체 항-인간 CD79b, CB3.1 및 CB3.2(하이브리도마)를 Dr. Cooper MD, University of Alabama at Birmingham, Birmingham AL로부터 구입하였다. CB3.1와 CB3.2는 제조사의 사용법(Pierce, Rockford IL)에 따라 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)로 표지하였다. Fc-단편-특이적인, 염소 항-마우스(GAM) IgG의 F(ab')2 단편은 Jackson Laboratories(West Grove, PA)로부터 구입하였다. 항-huCD32B 마우스 MAb, 3H7는 인하우스로 제조 및 정제하였다. 염소 항-2B6Fv는, hu2B6 전체 항체로 염소를 면역화하고, hu2B6의 Fv 영역에 대하여 친화성 정제함으로써 제조하였다. HuIgG, FITC-huIgG 및 HRP-항-마우스 IgG는 Jackson Immunoresearch로부터 구입하였다. HRP-항-염소는 Southern Biotech로부터 구입하였다.

[0534] ***DART 발현:*** 각 쇄를 암호화하는 플라스미드를 제조사의 사용법에 따라 리포펙타민 2000(Invitrogen)으로 293H 세포(Invitrogen)내로 공동삽입시켰다. 분비된 단백질을 3일 간격으로 3-4회 수집하여, CD32B의 고정화된 가용성 형태에 대해 액체 크로마토그래피하여 정제하였다.

[0535] ***ELISA:*** 2B6/4420 또는 2B6/3G8 DART를, FITC-표지된 단백질 S(Novagen), 인간 IgG 또는 FITC-huIgG로 코팅된 MaxiSorp 플레이트(NalgeNunc)상에 캡처하였다. 가용성 CD32B 엑토도메인(ectodomain)과, 이어서 3H7(CD32B에 특이적인 마우스 단일클론 항체)와, 마지막으로 항-마우스-HRP을 결합시킴으로써 검출을 실시하였다. 또는, 염소 항-2B6 Fv 다중클론 친화성 정제된 항혈청과, 이어서 항-염소-HRP을 결합시킴으로써 검출하였다. HRP 활성은 colorimetric TMB substrate(BioFX)을 이용하여 측정하고, VersaMax ELISA 플레이트 리더로 읽었다.

[0536] ***B 세포 정제 및 증식 분석:*** 말초 혈액 단핵세포를, 건강한 공여자의 혈액을 이용하여 Ficoll/Paque Plus(Amersham Pharmacia Biotech, UK) 구배 방법으로 분리하였다. B 림프구를 제조사의 사용법에 따라 Dynal B Cell Negative Isolation Kit(Dynal Biotechnology Inc., NY)을 이용하여 단리하였다. 단리된 B 세포(CD20)의 순도는 FACS 분석으로 계산한 결과 90%보다 높았다. 증식 분석을 위해, 정제된 B 세포를 평면 바닥의 96-웰 마이크로타이터 플레이트에서 완전 RPMI 1640 배지에 200μl의 최종 농도로서 웰당 $1x10^5$ 세포 밀도로 씨딩하고, 항체 및 디아바디의 존재 또는 부존재하에서 5% CO_2, 37℃에서 48시간 동안 배양하였다. 1μCi/well의 [^{3}H]티미딘(Perkin Elmer, Wellesley, MA)를 첨가하고, 수집 전에 16-18시간동안 계속 배양하였다. [^{3}H]티미딘 삽입은 액체섬광계수기(Liquid Scintillation Counter)로 측정하였다.

[0537] **결과**

[0538] 2B6/4420 DART가 활성이고 특이적임을 증명하기 위하여, 2개의 ELISA 실험을 수행하였다. 첫째, 2B6/4420 또는 2B6/3G8(음성 대조군)를 ELISA 플레이트상에 코팅된 플루오레세인-결합형 단백질(S-단백질)에 결합시켰다. 다음으로 DART의 2B6 arm을 가용성 CD32B으로 처리하였다. 2B6의 것과 오버랩되지 않는 에피토프를 갖는 CD32B에 대한 다른 항체, 이어서 HRP-연결형 2차 항체로 결합을 측정하였다. 2B6/4420 DART가 플루오레세인과 CD32B에 동시에 결합할 수 있는 반면, 2B6/3G8는 그렇지 못하였다(**도 21a**). DART를 가용성 CD32B로 코팅된 플레이트상에

캡처하여, hu2B6 Fv에 특이적인 항체에 의해 그 결합을 검출한 결과, 양 DART는 우수한 결합을 보인다. 2B6/4420 DART가 인간 IgG에 연결된 플루오레세인에 결합할 수 있음을 증명하기 위하여(이것이 이 시약의 초기 실시라는 조건에서), 플루오레세인으로 표지 또는 비표지된 HuIgG을 ELISA 플레이트에 결합시켜, 2B6/4420의 캡처에 이용하였다. 다시, 2B6/3G8을 음성 대조군으로 이용하였다. 결합은 Hu2B6 Fv에 특이적인 항체를 사용하여 검출하였다. 2B6/4420 DART는 FITC-HuIgG에는 결합하였지만, 비표지 HuIgG에는 결합하지 않았으며, 이는 DART가 항체에 결합된 플루오레세인에 결합할 수 있고, 항체 단독에는 유의있는 결합이 없음을 나타낸다. 예상한 바와 같이, 이러한 맥락에서, 2B6/3G8 DART에 의해 어떠한 결합도 검출되지 않았다.

[0539] 2B6/4420 DART가, 세포계 분석에서 신호전달에 영향을 미칠 수 있는 이중 친화성 시약으로서 작용할 수 있음을 증명하는 실험을 수행하였다. BCR와 CD32B의 공응집은 B 세포 활성을 저해하는 것으로 나타났다. 플루오레세인으로 표지된 αCD79b 항체로 코팅된 BCR와 CD32B의 공응집을 유도하여, 세포증식의 저해를 유도하는 2B6/4420 DART의 능력을 조사하였다. 인간 혈액에서 B 세포를 음성적으로 선택하고, FITC-표지된 마우스 항-인간-CD79b의 농도를 증가시켜 클론 CB3.1 및 CB3.2에 처리하고, BCR을 교차연결하기 위한 2차 시약으로서 Fc-특이적 GAM의 F(ab')2 단편을 고정된 농도(5μg/mL)의 2B6/4420 DART 또는 동량의 2B6/3G8 DART(플루오레세인을 표적화하지 않는 분자로서, 대조군으로 이용)와 함께 첨가하여 활성화시켰다. [^{3}H]-티미딘 삽입으로 측정되는 세포 증식은, DART의 부재 또는 대조군 2B6/3G8 DART의 존재하에서, 단일클론 항-CD79b-FITC 활성제의 농도가 증가함에 따라 증가하였다. 2B6/4420 DART가 존재하면 모든 농도의 항-인간 CD79b-FITC에서 B-세포 증식이 상당히 감소되었다 (**도 22, 패널 A 및 B, 도 23, 패널 A**)

[0540] 비표지된 CB3.2로 코팅되고, 같은 실험 조건으로 활성화된 B 세포가 2B6/4420 DART로 처리되었을 때는, 증식의 저해가 관찰되지 않았으며, 이는 표적-특이성을 증명하는 것이다(**도 23, 패널 B**). 이러한 데이터는, 2B6/4420 DART가 CD32B와 BCR을 교차결합시켜, 항원-수용체-유도된 세포 활성을 차단할 수 있는 저해 신호를 전달할 수 있음을 나타낸다.

[0541] **6.6. CD32B 발현 B세포 악성종양에 대한 DART 면역치료제**

[0542] 현재, B세포 악성종양은 리투산(Rituxan) 항-CD20 항체를 이용하여 치료된다. 그러나, 몇몇 B세포 악성종양은 CD20을 발현하지 않거나 또는 Rituxan에 저항성이 있다. 본 발명의 DART는 Rituxan 항-CD20 항체와 관련된 문제를 극복할 수 있는 대안적인 면역치료제를 제공한다.

[0543] MGD261은 hCD32B(h2B6 항체를 통하여) 및 hCD16A 및 hCD16B(h3G8 항체를 통하여)에 결합하는 이중 친화성 재표적화(DART) 분자이다.

[0544] MGD261의 효능(B 세포 제거) 및 안정성은 mCD32-/-hCD16A+ C57B1/6, mCD32-/-hCD32B+ C57B1/6 및 mCD32-/-hCD16A+ hCD32B+ C57B1/6에서 시험되었다. 이러한 반복 투여량(dose) 실험에서, 마우스는 3주동안 일주일에 2번 총 6번의 IV 주사를 받았다. B 세포 제거는 FACS로 모니터하였고, 안정성은 케이지 사이드(cage side) 관찰로 모니터하였다.

[0545] ***데이터:*** MacroGenics 사육 콜로니 유래의 mCD32-/-hCD16A+ C57B1/6, mCD32-/-hCD32B+ C57B1/6 및 mCD32-/-hCD16A+ hCD32B+ C57B1/6 마우스를, 0, 3, 7, 10, 14 및 17일째에, MGD261(10, 3, 1 또는 0.3mg/kg) 또는 무관한 항체(hE16 10mg/kg)로 IV 주사하였다. FACS 분석을 위해 -19(사육전), 4, 11, 18, 25 및 32일째에 혈액을 수집하였다. 일주일에 세번 동물의 건강 및 활동을 기록하였다.

[0546] *디자인:*

그룹	동물		시험 항목	투여량 (mg/kg)
	#	마우스		
A	4	*mCD32-1-* hCD16A+	hE16	10
B	5	*mCD32-1-* hCD16A+	MGD261	10
C	3	*mCD32-1-* hCD32B+	hE16	10
D	3	*mCD32-1-* hCD32B+	MGD261	10
E	5	*mCD32-1-* hCD16A+ hCD32B+	hE16	10
F	5	*mCD32-1-* hCD16A+ hCD32B+	MGD261	10
G	5	*mCD32-1-* hCD16A+ hCD32B+	MGD261	3
H	5	*mCD32-1-* hCD16A+ hCD32B+	MGD261	1
I	5	*mCD32-1-* hCD16A+ hCD32B+	MGD261	0.3

[0547]

[0548] ***FACS 분석방법:*** h2B6-h3G8 투여 전 18일째와 처리 후 4, 11, 18, 25 및 32일째에 전체 혈액 샘플을 수집하였다. FACS 분석으로 B 세포수에 미치는 h2B6-h3G8의 효과를 결정하기 위해 혈액 샘플을 분석하였다. Beckman Coulter사에서 구입한 FlowCount 비즈를 이용하여 B 세포, T 세포 및 PMN를 카운트하기 위해, 비세정 프로토콜을 사용하였다. 상기 분석에 이용된 항체의 패널은, PMN에 대하여는 1A8-FITC, T 세포에 대하여는 CD3-PE, B 세포에 대하여는 CD19-APC, 및 총 백혈구(leukocyte)에 대하여는 CD45-PerCP이다.

[0549] **결과**

[0550] 어떤 농도의 hE16 또는 MGD261로 처리된 마우스는 실험동안 불편함의 어떠한 징후도 보이지 않았다.

[0551] B 세포 제거는 hCD16A와 hCD32B의 이중 트랜스제닉 마우스에서 관찰되었다. 디아바디 h2B6-3G8가 hCD16A를 발현하는 이펙터 세포 및 hCD32B를 발현하는 B 세포에 관여한다; 이러한 관여는 B 세포 사멸에 필요하다. B 세포 제거는 단일 트랜스제닉 마우스에서는 관찰되지 않았다(**도 24**). 연구동안, T 세포와 PMN 수준의 유의있는 변화는 없었다.

[0552] 본 발명의 대안적인 치료제를 더욱 증명하기 위하여, "2.4G2-3G8 DB"라고 명명된 MGD261의 대용물을 제조하였다. 2.4G2-3G8 DB는 mCD32B(2.4G2 항체를 통하여) 및 hCD16A 및 hCD16B(h3G8 항체를 통하여)에 결합하는 이중 특이성 재표적화(DART) 분자이다.

[0553] 2.4G2-3G8 DB의 효능(B 세포 제거) 및 안정성은 mCD16-/-, mCD16-/-hCD16A+ C57B1/6, mCD16-/-hCD16B+ 및 mCD1β-/-hCD16A+ hCD16B+ 마우스에서 시험되었다. 이러한 반복 투여량(dose) 실험에서, 마우스는 3주동안 일주일에 3번 총 9번의 IV 주사를 받았다. B 세포 제거는 FACS로 모니터하였고, 안정성은 케이지 사이드(cage side) 관찰로 모니터하였다.

[0554] 데이터에 의하면, 2.4G2-3G8 DB는 어떠한 유의있는 부작용 없이 hCD16 트랜스제닉 마우스에서 B 세포를 제거할 수 있음을 보여준다.

[0555] ***데이터:*** MacroGenics 사육 콜로니 유래의 mCD16-/-, mCD16-/-hCD16A+ C57B1/6, mCD16-/-hCD16B+ 및 mCD16-/-hCD16A+ hCD16B+ 마우스를, 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 및 18일째에, 2.4G2-3G8 DB(75ug/마우스) 또는 PBS로 IP 주사하였다. FACS 분석을 위해 -10(사육전), 4, 11 및 18일째에 혈액을 수집하였다. 일주일에 세 번 동물의 건강 및 활동을 기록하였다.

그룹	동물의 수	투여량 ug/ms	시험 항목	루트	혈액 수집 시점
A	2 mCD16-/-	-	PBS	IP	-10, 4, 11, 18일 째
B	2 mCD16-/- 16A+ B6	-	PBS	IP	-10, 4, 11, 18일 째
C	2 mCD16-/ - 16B+	-	PBS	IP	-10, 4, 11, 18일 째
D	2 mCD16-/- 16A+ 16B+	-	PBS	IP	-10, 4, 11, 18일 째
E	6 mCDI6-/-	75	2.4G2-3G8 DB	IP	-10, 4, 11, 18일 째
F	6 mCD16-/- 16A+ B6	75	2.4G2-3G8 DB	IP	-10, 4, 11, 18일 째
G	6 mCD16-/- 16B+	75	2.4G2-3G8 DB	IP	-10, 4, 11, 18일 째
H	6 mCD16-/- 16A+ 16B+	75	2.4G2-3G8 DB	IP	-10, 4, 11, 18일 째

[0556]

[0557] ***FACS 분석방법:*** 2.4G2-3G8 투여 전 10일째와 처리개시 후 4, 11 및 18일째에 전체 혈액 샘플을 수집하였다.

FACS 분석으로 B 세포수에 미치는 2.4G2-3G8의 효과를 결정하기 위해 혈액 샘플을 분석하였다. BD Immunocytometry System사에서 구입한 TruCOUNT 튜브를 이용하여 B 세포, T 세포 및 PMN를 카운트하기 위해, 비세정 프로토콜을 사용하였다. 상기 분석에 이용된 항체의 패널은, PMN에 대하여는 1A8-FITC, T 세포에 대하여는 CD3-PE, B 세포에 대하여는 CD19-APC, 및 총 백혈구(leukocyte)에 대하여는 CD45-PerCP이다.

[0558] **결과**

[0559] hE16 또는 2.4G2-3G8 DB로 처리된 마우스는 실험동안 불편함의 어떠한 징후도 보이지 않았다.

[0560] B 세포 제거는 mCD16-/-hCD16A+ 또는 mCD 16-/-hCD16A+ hCD16B+ 마우스에서 관찰되었으나, mCD16-/-마우스에서는 관찰되지 않았다. 이러한 데이터는, hCD16A를 운반하는 이펙터 세포가 B 세포 사멸을 위해 필요하다는 것을 나타낸다(**도 25**). 연구동안, T 세포와 PMN 수준의 유의있는 변화는 없었다.

[0561] ***정맥(IV) 모델:*** 인간 종양세포주 Raji의 정맥(IV) 모델을 이용하여, MGD261의 항-종양 활성을 시험하였다. Raji는 hCD32B를 발현하는 인간 Burkitt 림프종 세포주이다. mCD16-/-, hCD16A+, RAG1-/-마우스에서 정맥 주사하면, 종양세포가 척추에 위치하고 다리 마비를 일으킨다.

[0562] 데이터에 의하면, MGD261가 mCD16-/-, hCD16A+, RAG1-/-*in vivo* 마우스에서 Raji 종양세포 성장을 차단할 수 있고, MGD261가 인간에서 CD32B를 발현하는 B세포 악성종양의 치료에 이용될 수 있음을 보여준다.

[0563] ***데이터:*** MacroGenics 사육 콜로니 유래의 12-20주령의 mCD16-/-, hCD16A+, RAG1-/-C57B1/6 마우스를 0일째 되는날 $5x10^6$ Raji 세포로 IV 주사하였다. 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27 및 30일째에, 마우스를 250, 25 또는 2.5ug의 MGD261 또는 PBS(대조군)로 복강(IP) 주사하였다. 마우스를 매일 관찰하여, 일주일에 두번씩 체중을 기록하였다. 다리 마비를 보이는 마우스를 희생시켰다.

[0564] **결과**

[0565] PBS로 처리한 마우스는 25일과 50일 사이에 죽었다. MGD261로 처리한 마우스는 적어도 90일까지는 생존하였다(**도 26**). 생존율이 증가한 점은 통계학적으로 중요하다. Logrank Test를 이용한 생존곡선의 비교결과 96.46의 χ^2(df 9; P값 < 0.0001)이었다.

[0566] **6.7. 원핵생물에서의 DART 발현**

[0567] 비-포유류 숙주에서 DART를 생산하는 능력을 증명하기 위한 실험을 수행하였다. 따라서, *E. coli*를 DART-발현 플라스미드로 형질전환하여, DART 발현을 모니터하였다.

[0568] **재료와 방법**

[0569] ***플라스미드 제조:*** 3G8은 HuCD16에 대한 인간화 단일클론 항체이다. 여기서 설명된 DART는 2개의 공유결합된 쇄로 구성되고, 이들 각각의 쇄는 VL-스페이서-VH-Cys를 갖고, 반대쇄와 이황화 결합을 형성한다. 3G8VL-GlyGlyGlySerGlyGlyGlyGly-3G8VH-LeuGlyGlyCys를 암호화하는 DART 서열은 존재하는 진핵 발현 컨스트럭트로부터 PCR 증폭하여, Nco I 및 EcoR I으로 절단하였다. 표적 벡터는 pET25b(+)(Novagen)이고, 이는 *E. coli*에서 분비를 위한 *pelB* 리더 서열을 포함한다. 3G8/3G8 DART 서열의 삽입 전에, 이 벡터를 다음과 같이 변형시켰다: 첫째, 콘드롤하에서, 가용성이지만 낮은 수준의 단백질 발현을 위해, T7 프로모터를 lac 프로모터로 치환하였다. 또한, *pelB* 리더의 시작점에 존재하는 Met에서의 개시를 위해, 다중 클로닝 사이트(MCS)의 시작점에 존재하는 2개의 인터널 Met 코돈을 제거하도록, 2개의 점돌연변이를 도입하였다. 이 컨스트럭트에 의해 생산되는 DART는 동일한 특이성, 즉 HuCD 16를 갖는 2개의 V-영역 arm으로 구성된다.

[0570] ***발현:*** BL21DE3 세포(Novagen)를 pET25b(+) T7-*lac*+3G8/3G8 플라스미드로 형질전환하고, amp-저항 콜로니를 씨드 배양에 사용하였다. 배양물이 0.5 OD 600 unit에 이르면, 발현을 유도하기 위하여 0.5mM IPTG를 첨가하였다. 배양액은 300℃에서 2시간동안 성장시키고, 세포가 없는 배지를 수집하였다.

[0571] ***정제:*** 3G8/3G8 DART를 친화성 및 사이즈 배제 크로마토그래피를 이용하여 2단계 공정으로 정제하였다. 이 DART를 친화성 크로마토그래피를 이용하여 조건배지로부터 캡처하였다. 특히, CD16A는 CNBr로 활성화된 Sepharose 4B(GE Healthcare)에 커플링되었다. 이 CD16A-Sepharose 수지를 로딩하기에 앞서 20mM Tris/HCl, pH 8.0로 평형화하였다. 로딩이 완성되면, 결합된 DART를 50mM 글리신 pH 3.0으로 용출하기에 앞서, 상기 수지를 평형 완충액으로 세정하였다. 용출된 DART는 즉시 1M Tris/HCl pH 8.0로 중화하고, 원심분리 타입 농축기(Vivaspin 20, 10k MWCO PES, VivaScience Inc.)으로 농축시켰다. 농축된 DART는, PBS로 평형화된 Superdex 200 칼럼(GE

Healthcare)을 이용하여 사이즈 배제 크로마토그래피로 더욱 정제하였다.

[0572] **결과**

[0573] 1.7리터의 E coli 배양 조건배지를 CD16A Sepharose 칼럼에 통과시켰다. DART의 수율은 0.12mg이었다. SDS-PAGE 및 SEC에 의해 정제된 DART를 분석한 결과, 포유동물 세포(CHO) 발현된 대조군 DART와 비슷한 양상을 보였다(**도 27**).

[0574] **E.*coli*에서 발현된 h3G8-h3G8 DART 결합 ELISA:** ELISA를 이용하여 *E.coli*에서의 h3G8-h3G8 DART 발현을 측정하였다. 2㎍/ml의 항-h3G8 Fv 특이 항체 2C11를, 50㎕/well의 양으로, 탄산 완충액중의 96-웰 Maxisorp 플레이트상에 4℃에서 밤새 코팅시켰다. 시험 DART를 첨가하기 전에, 이 플레이트를 PBS-T(PBS, 0.1% Tween 20)으로 3회 세정한 후, PBS-T중의 0.5% BSA로 실온에서 30분동안 블락킹시켰다. 블락킹 동안, *E.coli* 발현 h3G8-h3G8 DART, h2B6-h3G8 DART 및 h2B6-h2B6 DART(음성 대조군)을 PBST/BSA로 1㎍/ml 및 0.3㎍/ml로 희석시켰다. 희석된 DART를 50㎕/well의 양으로 각 웰에 첨가하였다. 이 플레이트를 실온에서 1시간동안 배양하였다. PBS-T로 3회 세정한 후, 0.1㎍/ml의 비오틴화 sCD16-Fc 융합단백질을 플레이트에 50㎕/well의 양으로 첨가하였다. 이 플레이트를 실온에서 1시간동안 배양하였다. PBS-T로 3회 세정한 후, 검출을 위해1:5000 희석된 HRP 결합 스트렙타비딘(Amersham Pharmacia Biotech)을 50㎕/well으로 이용한 후, 실온에서 1시간동안 배양하였다. 이 플레이트를 PBS-T로 3회 세정한 후, 80ul/well의 TMB 기질을 이용하여 현상하였다. 5분간 배양후, 이 반응을 1% H_2SO_4 40㎕/well로 정지시켰다. 96-웰 플레이트 리더기와 SOFTmax 소프트웨어를 이용하여 OD450nm를 판독하였다. GraphPadPrism 3.03 소프트웨어를 이용하여 그 결과를 플롯팅하였다(**도 28**).

[0575] **6.8. DART-유도 인간 B-세포 사멸**

[0576] 인간 PBMC를 밤새 CD16-CD32B-hu3G8-hu2b6(상기 설명); ch2B6-aglyc-aglycosylated 키메라 2B6 항체(본 명세서에 참조로서 포함되며, 미국출원계속중인 미국 특허출원 Serial 번호 11/108,135, 공개번호 US 2005/0260213에서 설명) 및 CD16-CD79로 배양하였다. CD16-CD79의 DNA 및 단백질 서열은 다음과 같다:

[0577] H3G8VL-CB3.1VH

[0578] **뉴클레오티드 서열 (서열번호 226):**

[0579] gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga 50

[0580] gagggccacc atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg 100

[0581] atagttttat gaactggtac caacagaaac caggacagcc acccaaactc 150

[0582] ctcatctata ctacatccaa tctagaatct ggggtcccag acaggtttag 200

[0583] tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc agcctgcagg 250

[0584] ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300

[0585] acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggagg 350

[0586] cggaggccag gtccaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaggcctg 400

[0587] gggcttcagt gaagctgtcc tgcaaggctt ctggctacac cttcaccagc 450

[0588] tactggatga actgggtgaa gcagaggcct ggacaaggcc ttgaatggat 500

[0589] tggtatggtt gatccttcag acagtgaaac tcactacaat caaatgttca 550

[0590] aggacaaggc cacattgact gttgacaaat cctccagcac agcctacatg 600

[0591] cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag 650

[0592] agctatgggc tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc tcctcagttg 700

[0593] agcccaaatc ttgt 714

[0594] **아미노산 서열 (서열번호 227):**

[0595] DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKASQSVD FDGDSFMNWY QQKPGQPPKL 50

[0596] LIYTTSNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQSNEDPY 100

[0597] TFGQGTKLEI KGGGSGGGGQ VQLQQPGAEL VRPGASVKLS CKASGYTFTS 150

[0598] YWMNWVKQRP GQGLEWIGMV DPSDSETHYN QMFKDKATLT VDKSSSTAYM 200

[0599] QLSSLTSEDS AVYYCARAMG YWGQGTSVTV SSVEPKSC 238

[0600] CB3.1VL-h3G8VH

[0601] **뉴클레오티드 서열 (서열번호 228):**

[0602] gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta acattggaca 50

[0603] accagcctcc atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg 100

[0604] gaaagacata tttgaattgg ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac 150

[0605] cgcctaatct atctggtgtc taaactggac tctggagtcc ctgacaggtt 200

[0606] cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc agcagagtgg 250

[0607] aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtac acattttccg 300

[0608] ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg 350

[0609] aggcggaggc caggttaccc tgagagagtc tggccctgcg ctggtgaagc 400

[0610] ccacacagac cctcacactg acttgtacct tctctgggtt ttcactgagc 450

[0611] acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt cagcctcccg ggaaggctct 500

[0612] agagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgacaagcgc tataatccag 550

[0613] ccctgaagag ccgactgaca atctccaagg atacctccaa aaaccaggta 600

[0614] gtcctcacaa tgaccaacat ggaccctgtg gatactgcca catactactg 650

[0615] tgctcaaata aaccccgcct ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg 700

[0616] tcactgtgag ctcattcaac aggggagagt gt 732

[0617] **아미노산 서열 (서열번호 229):**

[0618] DVVMTQTPLT LSVNIGQPAS ISCKSSQSLL DTDGKTYLNW LLQRPGQSPN 50

[0619] RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGI YYCWQGTHFP 100

[0620] LTFGAGTKLE LKGGGSGGGG QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLS 150

[0621] TSGMGVGWIR QPPGKALEWL AHIWWDDDKR YNPALKSRLT ISKDTSKNQV 200

[0622] VLTMTNMDPV DTATYYCAQI NPAWFAYWGQ GTLVTVSSFN RGEC 244

[0623] 어팝토시스는 FACS 분석으로 총 FSC/SSC ungated population 상의 B 세포(CD20+ 세포)의 PI+Annexin-V+ population의 퍼센트로서 분석하였다(**도 29**).

[0624] **6.9. 8B5-CB3.1 DART**

[0625] **8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC**

[0626] 프라이머로서 H9 및 lgh630R을 이용하고, 주형(template)으로서 ch8B5Lc을 이용하여 8B5VL를 증폭시켰다. 프라이머로서 lgh628F 및 lgh629R을 이용하고, 주형으로서 ch8B5Lc을 이용하여 CB3.1VH를 증폭시켰다. 링커 서열을 프라이머 lgh628F 및 lgh629R에 삽입시켰다. c-말단 링커와 정지코돈을 lgh629R 프라이머에 삽입시켰다. 이 PCR 산물을 겔정제하여 동등 몰비로 함께 혼합한 후, 프라이머로서 H9 및 lgh629R을 이용하여 증폭하였다. 오버랩된 PCR 산물을 NheI/EcoRI 제한효소로 절단한 후, pCIneo 벡터내로 클로닝하였다.

[0627] **CB3.1VL-8B5VH-FNRGEC**

[0628] H9 및 lgh630R을 이용하여 CB3.1VL를 증폭하고, H9 및 lgh630R는 프라이머로서 FR4의 8B5VL, 주형으로서 chCB3.1Lc와 동일한 서열을 공유하였다. 8B5VH는 프라이머로서 lgh631F 및 lgh640R을 이용하고, 주형으로서 ch8B5Hc을 이용하여 증폭하였다. 링커 서열을 프라이머 lgh631F 및 lgh640R에 삽입시켰다. c-말단 링커와 정지 코돈을 lgh640R 프라이머에 삽입시켰다. 이 PCR 산물을 겔정제하여 동등 몰비로 함께 혼합한 후, 프라이머로서 H9 및 lgh640R을 이용하여 증폭하였다. 오버랩된 PCR 산물을 NheI/EcoRI 제한효소로 절단한 후, pCIneo 벡터내로 클로닝하였다.

[0629] **항-Flag 태그-8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC**

[0630] 항-Flag 태그를 오버랩 PCR을 이용하여 신호서열과 8B5VL 사이에 삽입시켰다. 이 신호서열과 Flag 태그를, 프라이머로서 H9 및 lgh647R을 이용하고 주형으로서 ch8B5Lc을 이용하여 증폭하였다. 8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC를 프라이머로서 lgh647F 및 lgh629R을 이용하고 주형으로서 8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC을 이용하여 재증폭하였다. 이 PCR 산물을 겔정제하여 동등 몰비로 함께 혼합한 후, 프라이머로서 H9 및 lgh629R을 이용하여 증폭하였다. 오버랩된 PCR 산물을 NheI/EcoRI 제한효소로 절단한 후, pCIneo 벡터내로 클로닝하였다.

[0631] **8B5VL-CB3.1VH-LGGC**

[0632] 8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC 컨스트럭트내에 상이한 C-말단 링커를 만들기 위하여, 프라이머로서 H9 및 lgh646R을 이용하여 이 컨스트럭트를 재증폭하였다. C-말단 LGGC 링커를 lgh646R 프라이머내에 통합시켰다. 이 PCR 산물을 NheI/EcoRI 제한효소로 절단한 후, pCIneo 벡터내로 클로닝하였다.

[0633] **CB3.1VL-8B5VH-LGGC**

[0634] CB3.1VL-8B5VH-LGGC을 만들기 위하여 동일한 전략을 이용하였다. C-말단 LGGC 링커를 lgh648R 프라이머내에 통합시키고, CB3.1VL-8B5VH-FNRGEC를 주형으로서 이용하였다. 이 PCR 산물을 NheI/EcoRI 제한효소로 절단한 후, pCIneo 벡터내로 클로닝하였다.

[0635] **항-Flag 태그-8B5VL-CB3.1VH-LGGC**

[0636] 항-Flag 태그-8B5VL-CB3.1VH-LGGC을 만들기 위하여 동일한 전략을 이용하였다. C-말단 LGGC 링커를 lgh648R 프라이머내에 통합시키고, 항-Flag 태그-8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC를 주형으로서 이용하였다. 이 PCR 산물을 NheI/EcoRI 제한효소로 절단한 후, pCIneo 벡터내로 클로닝하였다.

[0637] **8B5-CB3.1-VEPKSC 뉴클레오티드 서열 (서열번호 230):**

[0638] gacattcaga tgacacagtc tccatcctcc ctacttgcgg cgctgggaga 50

[0639] aagagtcagt ctcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa 100

[0640] gctggcttca gcagaaacca gatggaacta ttaaacgcct gatctacgcc 150

[0641] gcatccactt tagattctgg tgtcccaaaa aggttcagtg gcagtgagtc 200

[0642] tgggtcagat tattctctca ccatcagcag tcttgagtct gaagattttg 250

[0643] cagactatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggtgct 300

[0644] gggaccaagc tggagctgaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt 350

[0645] ccaactgcag cagcctgggg ctgagctggt gaggcctggg gcttcagtga 400

[0646] agctgtcctg caaggcttct ggctacacct tcaccagcta ctggatgaac 450

[0647] tgggtgaagc agaggcctgg acaaggcctt gaatggattg gtatggttga 500

[0648] tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag gacaaggcca 550

[0649] cattgactgt tgacaaatcc tccagcacag cctacatgca gctcagcagc 600

[0650] ctgacatctg aggactctgc ggtctattac tgtgcaagag ctatgggcta 650

[0651] ctggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctcagttgag cccaaatctt 700

[0652] gt 702

[0653] **8B5-CB3.1-VEPKSC 아미노산 서열 (서열번호 231):**

[0654] DIQMTQSPSS LLAALGERVS LTCRASQEIS GYLSWLQQKP DGTIKRLIYA 50

[0655] ASTLDSGVPK RFSGSESGSD YSLTISSLES EDFADYYCLQ YFSYPLTFGA 100

[0656] GTKLELKGGG SGGGGQVQLQ QPGAELVRPG ASVKLSCKAS GYTFTSYWMN 150

[0657] WVKQRPGQGL EWIGMVDPSD SETHYNQMFK DKATLTVDKS SSTAYMQLSS 200

[0658] LTSEDSAVYY CARAMGYWGQ GTSVTVSSVE PKSC 234

[0659] **CB3.1-8B5-FNRGEC 뉴클레오티드 서열 (서열번호 232):**

[0660] gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta acattggaca 50

[0661] accagcctcc atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg 100

[0662] gaaagacata tttgaattgg ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac 150

[0663] cgcctaatct atctggtgtc taaactggac tctggagtcc ctgacaggtt 200

[0664] cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc agcagagtgg 250

[0665] aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtac acattttccg 300

[0666] ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg 350

[0667] aggcggaggc gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac 400

[0668] ctggaggatc catgaaactc tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt 450

[0669] gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct ccagagaagg ggcttgagtg 500

[0670] ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg 550

[0671] agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt 600

[0672] gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta 650

[0673] ctgtggggct ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag 700

[0674] tctcctcgtt caacagggga gagtgt 726

[0675] **CB3.1-8B5-FNRGEC 아미노산 서열 (서열번호 233):**

[0676] DVVMTQTPLT LSVNIGQPAS ISCKSSQSLL DTDGKTYLNW LLQRPGQSPN 50

[0677] RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGI YYCWQGTHFP 100

[0678] LTFGAGTKLE LKGGGSGGGG EVKLEESGGG LVQPGGSMKL SCEASGFTFS 150

[0679] DAWMDWVRQS PEKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDSKSS 200

[0680] VYLQMNSLRA EDTGIYYCGA LGLDYWGQGT TLTVSSFNRG EC 242

[0681] **8B5VL-CB3.1VH-LGGC**

[0682] 프라이머로서 H9 및 lgh694R을 이용하고, 주형으로서 ch8B5Lc을 이용하여 8B5VL를 증폭시켰다. 프라이머로서 lgh695F 및 lgh696R을 이용하고, 주형으로서 ch8B5Hc을 이용하여 8B5VH를 증폭시켰다. 링커 서열을 프라이머 lgh694R 및 lgh695F에 삽입시켰다. 프라이머로서 lgh355F 및 lgh366R을 이용하고, 주형으로서 ch8B5Hc을 이용하여 HuIgG1Fc를 증폭시켰다. 이 PCR 산물을 겔정제하여 동등 몰비로 함께 혼합한 후, 프라이머로서 H9 및 lgh366R을 이용하여 증폭하였다. 오버랩된 PCR 산물을 NheI/EcoRI 제한효소로 절단한 후, pCIneo 벡터내로 클로닝하였다.

[0683] **8B5VL-CB3.1VH-LGGC 뉴클레오티드 서열 (서열번호 234):**

[0684] gacattcaga tgacacagtc tccatcctcc ctacttgcgg cgctgggaga 50

[0685] aagagtcagt ctcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa 100

[0686] gctggcttca gcagaaacca gatggaacta ttaaacgcct gatctacgcc 150

[0687] gcatccactt tagattctgg tgtcccaaaa aggttcagtg gcagtgagtc 200

[0688] tgggtcagat tattctctca ccatcagcag tcttgagtct gaagattttg 250

[0689] cagactatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggtgct 300

[0690] gggaccaagc tggagctgaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt 350

[0691] ccaactgcag cagcctgggg ctgagctggt gaggcctggg gcttcagtga 400

[0692] agctgtcctg caaggcttct ggctacacct tcaccagcta ctggatgaac 450

[0693] tgggtgaagc agaggcctgg acaaggcctt gaatggattg gtatggttga 500

[0694] tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag gacaaggcca 550

[0695] cattgactgt tgacaaatcc tccagcacag cctacatgca gctcagcagc 600

[0696] ctgacatctg aggactctgc ggtctattac tgtgcaagag ctatgggcta 650

[0697] ctggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctcactggga ggctgc 696

[0698] **8B5VL-CB3.1VH-LGGC 아미노산 서열 (서열번호 235):**

[0699] DIQMTQSPSS LLAALGERVS LTCRASQEIS GYLSWLQQKP DGTIKRLIYA 50

[0700] ASTLDSGVPK RFSGSESGSD YSLTISSLES EDFADYYCLQ YFSYPLTFGA 100

[0701] GTKLELKGGG SGGGGQVQLQ QPGAELVRPG ASVKLSCKAS GYTFTSYWMN 150

[0702] WVKQRPGQGL EWIGMVDPSD SETHYNQMFK DKATLTVDKS SSTAYMQLSS 200

[0703] LTSEDSAVYY CARAMGYWGQ GTSVTVSSLG GC 232

[0704] **CB3.1-8B5-LGGC 뉴클레오티드 서열 (서열번호 236):**

[0705] gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta acattggaca 50

[0706] accagcctcc atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg 100

[0707] gaaagacata tttgaattgg ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac 150

[0708] cgcctaatct atctggtgtc taaactggac tctggagtcc ctgacaggtt 200

[0709] cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc agcagagtgg 250

[0710] aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtac acattttccg 300

[0711] ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg 350

[0712] aggcggaggc gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac 400

[0713] ctggaggatc catgaaactc tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt 450

[0714] gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct ccagagaagg ggcttgagtg 500

[0715] ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg 550

[0716] agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt 600

[0717] gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta 650

[0718] ctgtggggct ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag 700

[0719] tctcctcgct gggaggctgc 720

[0720] **CB3.1-8B5-LGGC 아미노산 서열 (서열번호 237):**

[0721] DVVMTQTPLT LSVNIGQPAS ISCKSSQSLL DTDGKTYLNW LLQRPGQSPN 50

[0722] RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGI YYCWQGTHFP 100

[0723] LTFGAGTKLE LKGGGSGGGG EVKLEESGGG LVQPGGSMKL SCEASGFTFS 150

[0724] DAWMDWVRQS PEKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDSKSS 200

[0725] VYLQMNSLRA EDTGIYYCGA LGLDYWGQGT TLTVSSLGGC 240

[0726] Primers:

[0727] Lgh628F **(서열번호 238):**

[0728] ggaggcggat ccggaggcgg aggccaggtc caactgcagc agcctgg 47

[0729] Lgh629R **(서열번호 239):**

[0730] tttgaattct aacaagattt gggctcaact gaggagacgg tgactgagg 49

[0731] Lgh630R **(서열번호 240):**

[0732] gcctccgcct ccggatccgc ctcctttcag ctccagcttg gtccc 45

[0733] Lgh631F **(서열번호 241):**

[0734] ggaggcggat ccggaggcgg aggcgaagtg aagcttgagg agtctgg 47

[0735] Lgh640R **(서열번호 242):**

[0736] tttgaattct aacactctcc cctgttgaac gaggagactg tgagagtgg 49

[0737] Lgh644R **(서열번호 243):**

[0738] tttgtcgtca tcatcgtctt tgtagtcgga gtggacacct gtggagag 48

[0739] Lgh646R **(서열번호 244):**

[0740] tttgaattct agcagcctcc cagtgaggag acggtgactg ag 42

[0741] Lgh647F **(서열번호 245):**

[0742] caaagacgat gatgacgaca aagacattca gatgacacag tctcc 45

[0743] Lgh648R **(서열번호 246):**

[0744] tttgaattct agcagcctcc cagcgaggag actgtgagag tgg 43

[0745] ***발현:*** 발현 플라즈미를 암호화하는 컨스트럭트 5와 6, 또는 6과 7, 또는 8과 9, 또는 9와 10(**도 30**)을, 리포펙타민 2000(Invitrogen)을 이용하여 항-flag 태그와 함께 또는 없이, HEK-293 세포내로 동시형질도입시켜 8B5-CB3.1 DART를 발현시켰다. 3일마다 3회 조건배지를 수집하여, CD32B 친화성 칼럼을 이용하여 조건배지를 정제하였다.

[0746] ***ELISA:*** ELISA를 다음과 같이 수행하였다: 2㎍/ml의 CD32B-Fc를, 50㎕/well의 양으로, 탄산 완충액중의 96-웰 Maxisorp 플레이트상에 4℃에서 밤새 코팅시켰다. 시험 단일쇄 Fc 융합 단백질을 첨가하기 전에, 이 플레이트를 PBS-T(PBS, 0.1% Tween 20)으로 3회 세정한 후, PBS-T중의 0.5% BSA로 실온에서 30분동안 블락킹시켰다. 블락킹 동안, 8B5-CB3.1 DART을 2㎍/ml에서 시작하여 일련의 2배 희석으로 희석시켰다. 25㎕/well의 희석물 DART를 25㎕/well의 50ng/ml ch8B5와 혼합하여, 희석 플레이트에서 ELISA 플레이트로 옮겼다. 이 플레이트를 실온에서 1시간동안 배양하였다. PBS-T로 3회 세정한 후, 1:10,000 희석된 HRP 결합 $F(ab')_2$ 염소 항 인간 IgG $F(ab')_2$(Jackson ImmunoResearch)을 50㎕/well의 양으로 플레이트에 첨가하였다. 이 플레이트를 실온에서 1시간동안 배양하였다. 이 플레이트를 PBS-T로 3회 세정한 후, 80ul/well의 TMB 기질을 이용하여 현상하였다. 5분간 배양후, 이 반응을 1% H_2SO_4 40㎕/well로 정지시켰다. 96-웰 플레이트 리더기와 SOFTmax 소프트웨어를 이용하여 OD450nm를 판독하였다. GraphPadPrism 3.03 소프트웨어를 이용하여 그 결과를 플롯팅하였다(**도 31**).

[0747] **6.10. Ig-유사 4가 DART의 디자인 및 특성분석**

[0748] 4개의 폴리펩티드 사슬을 이용하여 4가의 항원 결합 영역을 갖는 Ig-유사 DART 종들을 제조할 수 있다(**도 32, 도 33**). Ig-유사 DART는 특유의 특성을 갖는데, 그 이유는 그 도메인이 같은 에피토프(그 결과, 4가이며, 모노-에피토프 특이적이고, 4개의 동일한 항원 분자에 결합할 수 있는 Ig-유사 DART를 형성할 수 있다) 또는 다른 에피토프 또는 항원에 결합하도록 디자인될 수 있기 때문이다. 예를 들면, 그 도메인은 같은 항원의 2개의 에피토프(그 결과, 4가이며, 모노-항원 특이적이고, 2개의 에피토프에 특이적인 Ig-유사 DART를 형성할 수 있다) 또는 다른 항원 분자의 에피토프에 결합하도록 디자인될 수 있고, 그 결과 제 1 항원에 특이적인 한쌍의 결합 영역와 제 2 항원에 특이적인 두번째 쌍의 결합 영역을 갖는 4가 Ig-유사 DART를 형성할 수 있다. 이러한 특징의 조합을 갖는 하이브리드 분자를 쉽게 제조할 수 있다.

[0749] 이러한 Ig-유사 DART의 특성을 설명하기 위하여, CD32에 특이적인 한쌍의 결합 영역와 CD16A에 특이적인 두번째 쌍의 결합 영역을 갖는, 예시적인 4가 Ig-유사 DART 종을 제조하였다. 다음의 4개의 폴리펩티드 사슬을 이용하여 상기 Ig-유사 DART종을 제조하였다:

[0750] 2.4G2-3G8-hKappa 뉴클레오티드 서열**(서열번호 247)**:

[0751] gatgtccaga tgacccagtc tccatctaat cttgctgcct ctcctggaga 50

[0752] aagtgtttcc atcaattgca aggcaagtga gagcattagc aagtatttag 100

[0753] cctggtatct acagaaacct gggaaagcaa ataagcttct tatgtacgat 150

[0754] gggtcaactt tgcaatctgg aattccatcg aggttcagtg gcagtggatc 200

[0755] tggtacagat ttcactctca ccatcagaag cctggagcct gaagattttg 250

[0756] gactctatta ctgtcaacag cattatgaat atccagccac gttcggttct 300

[0757] gggaccaagc tggagatcaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt 350

[0758] taccctgaaa gagtctggcc ctgggatatt gcagccctcc cagaccctca 400

[0759] gtctgacttg ttctttctct gggttttcac tgaggacttc tggtatgggt 450

[0760] gtaggctgga ttcgtcagcc ttcagggaag ggtctagagt ggctggcaca 500

[0761] catttggtgg gatgatgaca agcgctataa tccagccctg aagagccgac 550

[0762] tgacaatctc caaggatacc tccagcaacc aggtattcct caaaatcgcc 600

[0763] agtgtggaca ctgcagatac tgccacatac tactgtgctc aaataaaccc 650

[0764] cgcctggttt gcttactggg gccaagggac tctggtcact gtgagctcac 700

[0765] tgggaggctg cggcggaggg agccgtacgg tggctgcacc atcggtcttc 750

[0766] atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt 800

[0767] gtgcctgctg aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg 850

[0768] tggataacgc cctccaatcg ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag 900

[0769] gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc agcaccctga cgctgagcaa 950

[0770] agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc acccatcagg 1000

[0771] gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt 1044

[0772] 2.4G2-3G8-hKappa Encoded 아미노산 서열**(서열번호 248)**:

[0773] DVQMTQSPSN LAASPGESVS INCKASESIS KYLAWYLQKP GKANKLLMYD 50

[0774] GSTLQSGIPS RFSGSGSGTD FTLTIRSLEP EDFGLYYCQQ HYEYPATFGS 100

[0775] GTKLEIKGGG SGGGGQVTLK ESGPGILQPS QTLSLTCSFS GFSLRTSGMG 150

[0776] VGWIRQPSGK GLEWLAHIWW DDDKRYNPAL KSRLTISKDT SSNQVFLKIA 200

[0777] SVDTADTATY YCAQINPAWF AYWGQGTLVT VSSLGGCGGG SRTVAAPSVF 250

[0778] IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ 300

[0779] DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC 350

[0780] 3G8-2.4G2-hG1 뉴클레오티드 서열**(서열번호 249)**:

[0781] gacactgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca 50

[0782] gagggccacc atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg 100

[0783] atagttttat gaactggtac caacagaaac caggacagcc acccaaactc 150

[0784] ctcatctata ctacatccaa tctagaatct gggatcccag ccaggtttag 200

[0785] tgccagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat cctgtggagg 250

[0786] aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300

[0787] acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaaggaggcg gatccggagg 350

[0788] cggaggcgag gtggagctag tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg 400

[0789] gaaggtccct gaaactctcg tgtgcagcct caggattcac tttcagtgac 450

[0790] tattacatgg cctgggtccg gcaggctcca acgacgggtc tggagtgggt 500

[0791] cgcatccatt agttatgatg gtggtgacac tcactatcga gactccgtga 550

[0792] agggccgatt tactatttcc agagataatg caaaaagcag cctatacctg 600

[0793] caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtgcaac 650

[0794] agagactacg ggaataccta caggtgttat ggatgcctgg ggtcaaggag 700

[0795] tttcagtcac tgtctcctca ctgggaggct gcggcggagg gagcgcctcc 750

[0796] accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc 800

[0797] tgggggcaca gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac 850

[0798] cggtgacggt gtcgtggaac tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc 900

[0799] ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc tactccctca gcagcgtggt 950

[0800] gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga 1000

[0801] atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gcccaaatct 1050

[0802] tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg 1100

[0803] gggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga 1150

[0804] tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa 1200

[0805] gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa 1250

[0806] tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg 1300

[0807] tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 1350

[0808] aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat 1400

[0809] ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc 1450

[0810] catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 1500

[0811] aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca 1550

[0812] gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct 1600

[0813] ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1650

[0814] gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta 1700

[0815] cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa 1734

[0816] 3G8-2.4G2-hG1 Encoded 아미노산 서열**(서열번호 250):**

[0817] DTVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSVD FDGDSFMNWY QQKPGQPPKL 50

[0818] LIYTTSNLES GIPARFSASG SGTDFTLNIH PVEEEDTATY YCQQSNEDPY 100

[0819] TFGGGTKLEI KGGGSGGGGE VELVESGGGL VQPGRSLKLS CAASGFTFSD 150

[0820] YYMAWVRQAP TTGLEWVASI SYDGGDTHYR DSVKGRFTIS RDNAKSSLYL 200

[0821] QMDSLRSEDT ATYYCATETT GIPTGVMDAW GQGVSVTVSS LGGCGGGSAS 250

[0822] TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT 300

[0823] FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS 350

[0824] CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE 400

[0825] DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY 450

[0826] KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV 500

[0827] KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ 550

[0828] GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 578

[0829] 상이한 플라스미드 분리체로부터 상기 서열을 갖는 Ig-유사 DART 분자를 얻어, "Ig DART 1" 및 "Ig DART 2"로 명명하였다. ELISA에서, mCD32-hCD16A에 결합하는 Ig-유사 DART 종의 능력을, 배지 단독, 단일 CD32 및 단일 CD16A 결합 영역("DART"), 및 대조군 항-ch-mCD32 mAb의 것과 비교하였다(**도 34**). 본 발명의 Ig-유사 DART는, DART 또는 대조군 항체의 어떤 것보다 항원 결합 친화성이 훨씬 더 컸다.

[0830] **6.11. CD32B-CD79-1 및 CD32B-CD79-2 이중특이성 디아바디의 디자인 및 특성**분석.

[0831] CD79VL-CD32BVH(서열 1), CD32BVL-CD79VH-1(서열 2), 및 CD32BVL-CD79VH-2(서열 3)를 암호화하는 유전자를 발현 벡터 pEE13내로 클로닝하여 각각 발현 컨스트럭트 1, 2 및 3을 얻었다. 컨스트럭트 1 발현 플라스미드를 발현 플라스미드 2 또는 3의 어느 하나와 함께 HEK-293 세포내로 동시형질도입시켜, 각각 CD32B-CD79-1 및 CD32B-CD79-2 이중특이성 디아바디를 제조하였다. 조건배지를 3일마다 3회 수거하여, CD32B 친화성 칼럼으로 정제하였다.

[0832] ELISA를 다음과 같이 수행하였다: 2㎍/ml의 CD32B-Fc를, 50㎕/well의 양으로, 탄산 완충액중의 96-웰 Maxisorp 플레이트상에 4℃에서 밤새 코팅시켰다. 시험 단일쇄 Fc 융합 단백질을 첨가하기 전에, 이 플레이트를 PBS-T(PBS, 0.1% Tween 20)으로 3회 세정한 후, PBS-T중의 0.5% BSA로 실온에서 30분동안 블락킹시켰다. 블락킹 동안, CD32B-CD79-1 또는 CD32B-CD79-2 이중특이성 디아바디를 2㎍/ml에서 시작하여 일련의 2배 희석으로 희석시켰다. 25㎕/well의 희석물 이중특이성 디아바디를 25㎕/well의 50ng/ml 항-CD32B 항체와 혼합하여, ELISA 플레이트에 첨가하였다. 이 플레이트를 실온에서 1시간동안 배양하였다. PBS-T로 3회 세정한 후, 1:10,000 희석된 HRP 결합 $F(ab')_2$ 염소 항 인간 IgG $F(ab')_2$(Jackson ImmunoResearch)을 50㎕/well의 양으로 플레이트에 첨가하였다. 이 플레이트를 실온에서 1시간동안 배양하였다. 이 플레이트를 PBS-T로 3회 세정한 후, 80ul/well의 TMB 기질을 이용하여 현상하였다. 5분간 배양후, 이 반응을 1% H_2SO_4 40㎕/well로 정지시켰다. 96-웰 플레이트 리더기와 SOFTmax 소프트웨어를 이용하여 OD450nm를 판독하였다. GraphPadPrism 3.03 소프트웨어를 이용하여 그 결과를 플롯팅하였다. 이 실험은 CD32B-CD79-1 및 CD32B-CD79-2 이중특이성 디아바디가, 항-CD32B 대조군 항체의 것과 등가의 친화성으로 CD32-Fc에 면역특이적으로 결합할 수 있음을 보여준다. 상기 컨스트럭트의 뉴클레오티드 및 인코딩된 아미노산 서열은 하기와 같다:

[0833] 서열 1 - CD79VL-CD32BVH 뉴클레오티드 서열**(서열번호 251):**

[0834] gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca 50

[0835] gccggcctcc atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg 100

[0836] gaaagacata tttgaattgg tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac 150

[0837] cgcctaattt atctggtgtc taaactggac tctggggtcc cagacagatt 200

[0838] cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc agcagggtgg 250

[0839] aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg 300

[0840] ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg 350

[0841] aggcggaggc gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac 400

[0842] ctggaggatc catgaaactc tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt 450

[0843] gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct ccagagaagg ggcttgagtg 500

[0844] ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg 550

[0845] agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt 600

[0846] gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta 650

[0847] ctgtggggct ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag 700

[0848] tctcctcgct gggaggctgc 720

[0849] 서열 2 - CD79VL-CD32BVH 아미노산 서열**(서열번호 252)**:

[0850] DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN 50

[0851] RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP 100

[0852] LTFGGGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS 150

[0853] DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS 200

[0854] LYLQMNSLRA EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LVTVSSLGGC 240

[0855] 서열 3 - CD32BVL-CD79VH-1 뉴클레오티드 서열**(서열번호 253)**:

[0856] gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga 50

[0857] tagagtcacc atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa 100

[0858] gctggctgca gcagaaacca ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc 150

[0859] gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc aggttcagtg gcagtgagtc 200

[0860] tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct gaagattttg 250

[0861] caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg 300

[0862] gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt 350

[0863] tcagctggtg cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga 400

[0864] aggtctcctg caaggcttct ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac 450

[0865] tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt gagtggatcg gaatgattga 500

[0866] tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag gacagagtca 550

[0867] ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc 600

[0868] ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta 650

[0869] ctgggggcaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgc 696

[0870] 서열 4 - CD32BVL-CD79VH-1 아미노산 서열**(서열번호 254)**:

[0871] DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA 50

[0872] ASTLDSGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG 100

[0873] GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMN 150

[0874] WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQMFK DRVTMTTDTS TSTAYMELRS 200

[0875] LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVTVSSLG GC 232

[0876] 서열 5 - CD32BVL-CD79VH-2 뉴클레오티드 서열(**서열번호 255**):

[0877] gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga 50

[0878] tagagtcacc atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa 100

[0879] gctggctgca gcagaaacca ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc 150

[0880] gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc aggttcagtg gcagtgagtc 200

[0881] tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct gaagattttg 250

[0882] caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg 300

[0883] gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt 350

[0884] tcagctggtg cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga 400

[0885] aggtctcctg caaggcttct ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac 450

[0886] tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt gagtggatcg gaatgattga 500

[0887] tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag gacagagtca 550

[0888] ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc 600

[0889] ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta 650

[0890] ctgggggcaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgc 696

[0891] 서열 6 - CD32BVL-CD79VH-2 아미노산 서열(**서열번호 256**):

[0892] DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA 50

[0893] ASTLDSGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG 100

[0894] GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMN 150

[0895] WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQKFK DRVTMTTDTS TSTAYMELRS 200

[0896] LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVTVSSLG GC 232

[0897] **6.12 H8B5-HBCRC 생물기능성 디아바디의 구축 및 최적화**

[0898] 디아바디는 CD32 및 B-세포 수용체 복합체("BCRC")에 결합할 수 있는 가변 부위를 함유하도록 구축되었다.

[0899] 클로닝. 컨스트럭트는 표준 PCR/중복 PCR을 사용하여 구축하였다: h8B5VL-G3SG4-hBCRCVH M48I-LGGC:

[0900] 완전히 인간화된 8B5 VL(CD32를 인식함)을 프라이머로서 lgh321F 및 lgh788R을 사용하여 증폭하였다. hBCRCVH M48I를 프라이머로서 lgh784F 및 lgh386R을 사용하여 증폭하였다. PCR 산물을 겔 정제하였고, 혼합한 뒤 lgh321F 및 lgh386R를 사용하여 증폭하였다. 이후 중복 PCR 단편은 XbaI-EcoRI 부위로 pEE6에 클로닝하였다. "G3SG4"는 서열: GGGSGGGG(**서열번호 10**)을 갖는 링커이다.

[0901] hBCRCVL R45N-G3SG4-h8B5VH-LGGC

[0902] hBCRCVL R45N은 프라이머로서 lgh321F 및 lgh785R을 사용하여 증폭하였다. h8B5VH은 프라이머로서 lgh787F 및 lgh786R를 사용하여 증폭하였다. PCR 산물을 젤 정제하였고, 혼합한 뒤 lgh321F 및 lgh786R을 사용하여 증폭하였다. 이후 중복 PCR 단편을 XbaI-EcoRI 부위로 pEE13에 클로닝하였다.

[0903] 단일 벡터 구축. pEEβhHBCRCVL R45N-h8B5VH를 BglH-SalI 부위로 절단하였고, 3.3kb 단편을 정제하였고, pEE13 hHBCRCVL 45N-h8B5VH에 BamHI-SalI 부위로 삽입하였다. BglII 및 BamHI는 상보적인 점착성 말단을 공유한다. DART를 구축하기 위해 사용한 DART 및 프라이머의 서열은 하기에서 묘사한다:

[0904] hHBCRCVL. R45N-h8B5VH-LGGC 뉴클레오티드 서열(**서열번호 257**):

[0905] gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca 50

[0906] gccggcctcc atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg 100

[0907] gaaagacata tttgaattgg tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac 150

[0908] cgcctaattt atctggtgtc taaactggac tctggggtcc cagacagatt 200

[0909] cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc agcagggtgg 250

[0910] aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg 300

[0911] ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg 350

[0912] aggcggaggc gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac 400

[0913] ctggaggatc catgaaactc tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt 450

[0914] gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct ccagagaagg ggcttgagtg 500

[0915] ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg 550

[0916] agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt 600

[0917] gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta 650

[0918] ctgtggggct ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag 700

[0919] tctcctcgct gggaggctgc 720

[0920] hHBCRCVL.R45N-h8B5VH-LGGC 아미노산 서열(**서열번호 258**):

[0921] DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN 50

[0922] RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP 100

[0923] LTFGGGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS 150

[0924] DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS 200

[0925] LYLQMNSLRA EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LVTVSSLGGC 240

[0926] H8B5VL-hHBCRCVH M48I-LGGC 뉴클레오티드 서열(**서열번호 259**):

[0927] gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga 50

[0928] tagagtcacc atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa 100

[0929] gctggctgca gcagaaacca ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc 150

[0930] gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc aggttcagtg gcagtgagtc 200

[0931] tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct gaagattttg 250

[0932] caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg 300

[0933] gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt 350

[0934] tcagctggtg cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga 400

[0935] aggtctcctg caaggcttct ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac 450

[0936] tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt gagtggatcg gaatgattga 500

[0937] tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag gacagagtca 550

[0938] ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc 600

[0939] ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta 650

[0940] ctgggggcaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgc 696

[0941] H8B5VL-HBCRCVH M48I-LGGC 아미노산 서열(**서열번호 260**):

[0942] DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA 50

[0943] ASTLDSGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG 100

[0944] GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMN 150

[0945] WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQMFK DRVTMTTDTS TSTAYMELRS 200

[0946] LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVTVSSLG GC 232

[0947] Lgh321F 프라이머(**서열번호 261**):

[0948] cgagctagct ctagatgaga tcacagttct ctctac 36

[0949] Lgh386R 프라이머(**서열번호 262**):

[0950] tttgaattct agcagcctcc cagtgaggag acggtgaccg tggtc 45

[0951] Lgh784F 프라이머(**서열번호 263**):

[0952] ggcggatccg gaggcggagg ccaggttcag ctggtgcag 39

[0953] Lgh785R 프라이머(**서열번호 264**):

[0954] cctccggatc cgcctccttt gatctcaagc ttggtccc 38

[0955] Lgh786R 프라이머(**서열번호 265**):

[0956] tttgaattct agcagcctcc caggctggag acggtcacca gg 42

[0957] Lgh787F 프라이머(**서열번호 266**):

[0958] ggaggcggat ccggaggcgg aggcgaagtg cagcttgtgg agtc 44

[0959] Hu3G8VL 1-G3SG4-Hu2B6VH 4-LGGC 발현 플라스미드는 CD32 및 CD79를 인식하는 Hu2B6 4.5-Hu3G8 5.1 생물특이적 디아바디를 만들기 위하여 Hu2B6VL 5-G3SG4-Hu3G8VH 5-LGGC와 함께 HEK-293 세포로 공동-형질도입시켰다. 동시에, Hu2B6VL 5-G3SG4-Hu2B6VH 4-LGGC 및 Hu3G8VL 1-G3SG4-Hu3G8VH 5-LGGC를 Hu2B6 4.5 및 Hu3G8 5.1 디아바디를 만들기 위하여 HEC-293 세포로 개별적으로 형질도입시켰다. 배양한지 3일 후, 조건 배지를 회수하였고, 결합 ELISA에 의해 특징화하였다. 이 실험의 결과는 **도 36**에 묘사하였다.

[0960] ***실험 계획:*** 100 ng/웰의 가용성 FcRIIb-G2-Agly를 탄산염 버퍼에서 96-웰 Maxisorp 플레이트에 40℃에서 밤새 코팅하였다. 플레이트를 PBS/0.1% Tween20으로 3회 세척하였고, PBS/0.1% Tween 20에 있는 0.5% BSA로 30분간 상온에서 디아바디를 첨가하기 전에 차단시켰다. Hu2B6 4.5-Hu3G8 5.1 생물특이적 디아바디, Hu2B6 4.5 디아바디, 및 hu3G8 5.1 디아바디의 조건 배지의 25ng/웰에서 시작하는 일련의 2배 희석을 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 상온에서 1시간 동안 배양하였다. PBS/0.1% Tween20으로 3회 세척한 다음, 10ng/웰의 FcRIIIa-G2-바이오틴을 플레이트에 첨가하였다. 플레이트를 상온에서 1시간 동안 배양하였다. PBS/0.1% Tween20로 3회 세척한 다음, 1:5000로 희석한 50 ul의 HRP 접합 스트렙타비딘(Amersham Pharmacia Biotech)을 검출을 위해 사용하였다. 상온에서 45분간 배양한 다음, 플레이트를 PBS/0.1% Tween20로 3회 세척하고, TMB 기질을 사용하여 현상하였다. 10분간 배양한 후, 반응을 1% H_2SO_4에 의해 정지시켰다. OD450 nm을 SOFTmax에 의해 읽었다. OD450 nm를 GraphPadPrism 3.03 소프트웨어를 사용하여 그래프화하였다.

[0961] **6.13 IgDART 디아바디의 구축**

[0962] IgDART 디아바디는 CD32 및 B-세포 수용체 복합체("BCRC")에 결합할 수 있는 가변 부위를 함유하도록 구축되었다. 제 1 디아바디는 분자의 VH 서열 및 Fc 서열 사이에 LGGCGGGS(**서열번호 267**) 링커를 사용하였다. 제 2 디아

바디는 서열: LEIK(**서열번호 268**)를 갖는 LEIK 링커 또는 서열 TVSS(**서열번호 269**)를 갖는 TVSS 링커 중 어느 하나를 사용하였다. 이들 디아바디 및 이를 암호화하는 뉴클레오티드의 사슬의 서열은 하기에서 나타낸다:

[0963] H8B5VL-hBCRCVH M48I, M62K_LGGCG3S_hKappa(**서열번호 270**):

[0964] DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA 50

[0965] ASTLDSGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG 100

[0966] GTKVEIK**GGG SGGGG**QVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMN 150

[0967] WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQKFK DRVTMTTDTS TSTAYMELRS 200

[0968] LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVTVSS**LG GCGGGS**RTVA APSVFIFPPS 250

[0969] DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS 300

[0970] TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC 343

[0971] H8B5VL 서열은 위치 108-115에 위치한 링커 GGGSGGGG(**서열번호 10**)에 의해 hBCRCVH 서열에 융합된다. hBCRCVH 서열은 위치 229-236에 위치한 링커 LGGCGGGS(**서열번호 267**)에 의해 Fc 서열에 융합된다(둘 다 위에서 밑줄쳐 보여줌). H8B5VL-hBCRCVH M48I, M62K_LGGCG3S_hKappa 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열은:

[0972] (**서열번호 271**):

[0973] gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga 50

[0974] tagagtcacc atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa 100

[0975] gctggctgca gcagaaacca ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc 150

[0976] gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc aggttcagtg gcagtgagtc 200

[0977] tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct gaagattttg 250

[0978] caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg 300

[0979] gggaccaagg tggaaataaa a**ggaggcgga tccggaggcg gaggc**caggt 350

[0980] tcagctggtg cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga 400

[0981] aggtctcctg caaggcttct ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac 450

[0982] tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt gagtggatcg gaatgattga 500

[0983] tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag gacagagtca 550

[0984] ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc 600

[0985] ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta 650

[0986] ctgggggcaa gggaccacgg tcaccgtctc ctca**ctggga ggctgcggcg** 700

[0987] **gagggagc**cg aactgtggct gcaccatcgg tcttcatctt cccgccatct 750

[0988] gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa 800

[0989] cttctatccc agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc 850

[0990] aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag caaggacagc 900

[0991] acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag actacgagaa 1000

[0992] acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctcgcccg 1050

[0993] tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt ag 1082이고,

[0994] 여기서 링커: GGGSGGGG(**서열번호 10**) 및 LGGCGGGS(**서열번호 267**)를 암호화하는 서열은 각각 위치 322-345 및 685-708에 위치한다(둘 다 위에서 밑줄쳐 보여줌).

[0995] HBCRCVL R45N-h8B5VH_LGGCGGGS-hG1

[0996] (**서열번호 272**):

[0997] DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN 50

[0998] RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP 100

[0999] LTFGGGTKLE IK**GGGSGGGG** EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS 150

[1000] DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS 200

[1001] LYLQMNSLRA EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LVTVSS**LGGC GGGS**ASTKGP 250

[1002] SVFPLAPSSK STSGGTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV 300

[1003] LQSSGLYSLS SVVTVPSSSL GTQTYICNVN HKPSNTKVDK RVEPKSCDKT 350

[1004] HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV 400

[1005] KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV 450

[1006] SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY 500

[1007] PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF 550

[1008] SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK 574

[1009] hBCRCVL 서열은 위치 113-120에 위치한 링커 GGGSGGGG(**서열번호 10**)에 의해 H8B5VH 서열에 융합된다. H8B5VH 서열은 위치 237-244에 위치한 링커 LGGCGGGS(**서열번호 267**)에 의해 Fc 서열에 융합된다(둘 다 위에서 밑줄쳐 보여줌).

[1010] HBCRCVL R45N-h8B5VH_LGGCGGGS-hG1 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티스 서열은 :

[1011] (**서열번호 273**):

[1012] gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca 50

[1013] gccggcctcc atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg 100

[1014] gaaagacata tttgaattgg tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac 150

[1015] cgcctaattt atctggtgtc taaactggac tctggggtcc cagacagatt 200

[1016] cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc agcagggtgg 250

[1017] aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg 300

[1018] ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaa**ggag gcggatccgg** 350

[1019] **aggcggaggc** gaagtgcagc ttgtggagtc tggaggaggc ttggtgcaac 400

[1020] ctggaggatc cctgagactc tcttgtgccg cctctggatt cacttttagt 450

[1021] gacgcctgga tggactgggt ccgtcaggcc ccaggcaagg ggcttgagtg 500

[1022] ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg 550

[1023] agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgacgc caaaaacagt 600

[1024] ctgtacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg ccgtgtatta 650

[1025] ctgtggggct ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc ctggtgaccg 700

[1026] tctccagc**ct gggaggctgc ggcggaggga gc**gcctccac caagggccca 750

[1027] tcggtcttcc ccctggcacc ctcctccaag agcacctctg ggggcacagc 800

[1028] ggccctgggc tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg gtgacggtgt 850

[1029] cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc 900

[1030] ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc 950

[1031] cagcagcttg ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca 1000

[1032] gcaacaccaa ggtggacaag agagttgagc ccaaatcttg tgacaaaact 1050

[1033] cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa ctcctggggg gaccgtcagt 1100

[1034] cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc 1150

[1035] ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 1200

[1036] aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa 1250

[1037] gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca 1300

[1038] ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1350

[1039] tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa 1400

[1040] agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg 1450

[1041] agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat 1500

[1042] cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa 1550

[1043] ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct 1600

[1044] acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1650

[1045] tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag 1700

[1046] cctctccctg tctccgggta aa 1722이고,

[1047] 여기서 링커: GGGSGGGG(**서열번호 10**) 및 LGGCGGGS(**서열번호 267**)를 암호화하는 서열은 각각 위치 337-360 및 709-732에 위치한다(둘 다 위에서 밑줄쳐 보여줌).

[1048] H8B5VL-HBCRCVH M48I, M62K_(-4)LEIK_hKappa

[1049] (**서열번호 274**):

[1050] DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA 50

[1051] ASTLDSGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG 100

[1052] GTKVEIK**GGG SGGGG**QVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMN 150

[1053] WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQKFK DRVTMTTDTS TSTAYMELRS 200

[1054] LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTV**LEIK**RT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT 250

[1055] ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL 300

[1056] TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC 335

[1057] H8B5VL 서열은 위치 108-115에 위치한 링커 GGGSGGGG(**서열번호 10**)에 의해 HBCRCVH 서열에 융합된다. HBCRCVH 서열은 위치 225-228에 위치한 링커 LEIK(**서열번호 268**)에 의해 Fc 서열에 융합된다(둘 다 위에서 밑줄쳐 보여줌). 폴리뉴클레오티드 암호화 H8B5VL-HBCRCVH M48I, M62K_(-4)LEIK_hKappa 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는:

[1058] (**서열번호 275**):

[1059] gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga 50

[1060] tagagtcacc atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa 100

[1061] gctggctgca gcagaaacca ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc 150

[1062] gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc aggttcagtg gcagtgagtc 200

[1063] tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct gaagattttg 250

[1064] caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg 300

[1065] gggaccaagg tggaaataaa a**ggaggcgga tccggaggcg gaggc**caggt 350

[1066] tcagctggtg cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga 400

[1067] aggtctcctg caaggcttct ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac 450

[1068] tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt gagtggatcg gaatgattga 500

[1069] tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag gacagagtca 550

[1070] ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc 600

[1071] ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta 650

[1072] ctgggggcaa gggaccacgg tc**ctggagat caag**cgaact gtggctgcac 700

[1073] catcggtctt catcttcccg ccatctgatg agcagttgaa atctggaact 750

[1074] gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc tatcccagag aggccaaagt 800

[1075] acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc caggagagtg 850

[1076] tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 900

[1077] acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt 950

[1078] cacccatcag ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag 1000

[1079] agtgt 1005이고,

[1080] 여기서 링커: GGGSGGGG(**서열번호 10**) 및 LEIK(**서열번호 268**)를 암호화하는 서열은 각각 위치 322-345 및 673-684에 위치한다(둘 다 위에서 밑줄쳐 보여줌).

[1081] HBCRCVL R45N-h8B5VH_(-4)TVSS-hG1 = HBCRCVL R45N-h8B5VH_-hG1

[1082] (**서열번호 276**):

[1083] DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN 50

[1084] RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP 100

[1085] LTFGGGTKLE IK**GGGSGGGG** EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS 150

[1086] DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS 200

[1087] LYLQMNSLRA EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LV**TVSS**ASTK GPSVFPLAPS 250

[1088] SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS 300

[1089] LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKRVEPKSCD KTHTCPPCPA 350

[1090] PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG 400

[1091] VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP 450

[1092] IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW 500

[1093] ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA 550

[1094] LHNHYTQKSL SLSPGK 566

[1095] HBCRCVL 서열은 위치 113-120에 위치한 링커 GGGSGGGG(**서열번호 10**)에 의해 h8B5VH 서열에 융합된다. h8B5VH 서열은 위치 233-236에 위치한 링커 TVSS(**서열번호 269**)에 의해 Fc 서열에 융합된다(둘 다 위에서 밑줄쳐 보여

쥼). 폴리뉴클레오티드 암호화 HBCRCVL R45N-h8B5VH_(-4)TVSS-hG1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는:

[1096] (**서열번호 277**):

[1097] gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca 50

[1098] gccggcctcc atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg 100

[1099] gaaagacata tttgaattgg tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac 150

[1100] cgcctaattt atctggtgtc taaactggac tctggggtcc cagacagatt 200

[1101] cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc agcagggtgg 250

[1102] aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg 300

[1103] ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaa**ggag gcggatccgg** 350

[1104] **aggcggaggc** gaagtgcagc ttgtggagtc tggaggaggc ttggtgcaac 400

[1105] ctggaggatc cctgagactc tcttgtgccg cctctggatt cacttttagt 450

[1106] gacgcctgga tggactgggt ccgtcaggcc ccaggcaagg ggcttgagtg 500

[1107] ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg 550

[1108] agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgacgc caaaaacagt 600

[1109] ctgtacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg ccgtgtatta 650

[1110] ctgtggggct ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc ctggtg**accg** 700

[1111] **tctccagc**gc ctccaccaag ggcccatcgg tcttcccccc ggcaccctcc 750

[1112] tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtcaagga 800

[1113] ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc gccctgacca 850

[1114] gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 900

[1115] ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta 950

[1116] catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag 1000

[1117] ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 1050

[1118] cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa 1100

[1119] ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc gtggtggtgg 1150

[1120] acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 1200

[1121] gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag 1250

[1122] cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga 1300

[1123] atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 1350

[1124] atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt 1400

[1125] gtacaccctg cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc 1450

[1126] tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1500

[1127] gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct 1550

[1128] ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga 1600

[1129] gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1650

[1130] ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa 1698 이고,

[1131] 여기서 링커: GGGSGGGG(**서열번호 10**) 및 TVSS(**서열번호 269**)를 암호화하는 서열은 각각 위치 337-360 및 697-708에 위치한다(둘 다 위에서 밑줄쳐 보여줌).

[1132] **6.14 링커의 최적화**

[1133] 상술한 바와 같이, 본 발명의 IgDART 디아바디는 분자의 VH 서열 및 Fc 서열 사이에 링커를 함유하는 것이 바람직하다. 실험은 수율 및 활성을 최대화하기 위해 링커를 최적화하기 위해 수행되었다. 하기 링커를 사용하였다.

[1134]

서열번호	링커
278	FNRGECGGGS
279	FNRGECLQVYYRM
280	LEGEEG
281	LEGEEGC
282	LEIK
283	LGEEG
284	LGEEGC
285	LGGCGGGS
286	LGKKG
287	LGKKGC
288	LKGKKG
289	LKGKKGC
290	LQVYYRM
291	LQVYYRMC
292	TVSS
293	VEPKSCGGGS
294	VEPKSCYLYLRARV
295	VQVHYRM
296	VQVHYRMC
297	YLYLRARV
298	YLYLRARVC

[1135] 상기 링커는 링커의 다른 조합을 갖는 IgDART 디아바디의 세트를 제조하기 위해 플라스미드로 도입하였다:

[1136]

플라스미드 pMGX	사슬 A 링커 서열번호	pEE13.4	사슬 B 링커 서열번호	pEE6.4	ELISA (ug/ml)	정제된 단백질 (SEC 후) (1 liter)
900	285	√	285	√	0.799	0.3 mg
901	283	√	286	√	0.628	0.4 mg
902	284	√	287	√	0.896	0.47 mg
903	280	√	288	√	0.557	
904	281	√	289	√	0.450	0.4 mg
905	293	√	278	√	0.360	
906	294	√	279	√	N/A	
907	282	√	292	√	N/A	
908	297	√	295	√	0.428	0.2 mg
909	297	√	290	√	0.305	0.3 mg
910	298	√	296	√	N/A	
911	298	√	291	√	0.218	

[1137] 생산된 IgDART의 응집 성질을 결정하였다.

[1138]

IgDART 링커	전체 단백질 (mg)	올리고머 0/0	단량체 0/0	단편 0/0	SB 순위
900A1900B	0.51	12	45	43	4
901A1901B	0.72	5	83	12	1
902A1902B	0.78	21	48	31	4
903A1903B	0.5	3	84	13	1
904A1904B	0.66	16	65	26	4
905A1905B	0.5	20	60	20	3
908A1908B	0.5	13	65	17	2
908A1909B	0.38	22	50	28	3
910A1911B	0.2	45	10	45	5

[1139] 901A/901B; 903A/903B; 및 908A/908B에서 사용한 것과 같은 링커를 갖는 컨스트럭트가 예상치 못하게 보여준 데이터는 910A/911B와 같은 링커를 갖는 대조군보다 극적으로 뛰어난 결과를 주었다(더 적은 저중합체화 및/또는 더 적은 단편 생산).

[1140] **6.15 E-코일/K-코일 DART**

[1141] 상기의 관점에서 올바로 인식될 것인바, 이중특이성 DART의 개별 폴리펩티드는 두 종의 동형 이량체 및 한 종의 이형이량체를 형성할 수 있다. 본 발명의 한 구체예에서, 전하를 띤 폴리펩티드는 하나, 또는 더욱 바람직하게는 두 DART 폴리펩티드의 C-말단에 첨가될 수 있다. 이중특이성 DART의 개별 폴리펩티드에 대하여 반대 전하의 전하를 띤 폴리펩티드를 선별함으로써, 이런 전하를 띤 폴리펩티드의 세포함유물은 이형이량체의 형성을 선호하고, 동형이량체의 형성을 적게한다. 바람직하게는, 양성 전하를 띤 폴리펩티드는 아르기닌, 글루타민, 히스티딘 및/또는 라이신(또는 이런 아미노산의 혼합물)의 실질적 내용물을 함유할 것이고, 음성 전하를 띤 폴리펩티드는 아스파레이트 또는 글루타메이트(또는 이런 아미노산의 혼합물)의 실질적 내용물을 함유할 것이다. 실질적 내용물로 리신을 함유하는 양성 전하를 띤 폴리펩티드 및 실질적 내용물로 글루타메이트를 함유하는 음성 전하를 띤 폴리펩티드가 특히 바람직하다. 이런 상반된 전하를 띤 폴리펩티드 사이의 정전기적 인력을 최대화하기 위하여,

[1142] 나선형 배좌를 자발적으로 취할 수 있는 폴리펩티드를 사용하는 것이 바람직하다.

[1143] 따라서, 바람직한 구체예에서, 양성 전하를 띤, "E-코일"이 이중 특이성 DART를 형성하는 데 사용될 폴리펩티드 중 하나에 첨가될 것이고, 음성 전하를 띤 "K-코일"이 DART의 제 2의 폴리펩티드에 첨가될 것이다(**도 37**).

[1144] 특히 바람직한 E-코일은 서열:(**EVAALEK**)$_4$:

[1145] **서열번호 299 EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK**를 가질 것이다.

[1146] 특히 바람직한 K-코일은 서열:(**KVAALKE**)$_4$:

[1147] **서열번호 300 KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE**를 가질 것이다.

[1148] 이런 E-코일을 소유하는 바람직한 DART 폴리펩티드는 일반적 서열: [VL 도메인]-[**GGGSGGGG**]-[VH 도메인]-[(**EVAALEK**)$_4$]-**GGGNS**을 가질 것이고, 여기서 VL은 DART의 가변 경 Ig 도메인이고, **GGGSGGGG**는 **서열번호 10**이고, VH는 DART의 가변 중 Ig 도메인이고, (**EVAALEK**)$_4$는 **서열번호 299**이고, 그리고 **GGGNS**는 **서열번호 301**이다. 이런 K-코일을 소유하는 바람직한 DART 폴리펩티드는 일반적 서열: [VL 도메인]-[**GGGSGGGG**]-[VH 도메인]-[(**KVAALKE**)$_4$]-**GGGNS**을 가질 것이고, 여기서 VL은 DART의 가변 경 Ig 도메인이고, **GGGSGGGG**는 **서열번호 10**이고, VH는 DART의 가변 중 Ig 도메인이고, (**KVAALKE**)$_4$는 **서열번호 300**이고, 그리고 **GGGNS**는 **서열번호 301**이다.

[1149] **6.16 E-코일/K-코일 FC-함유 DART**

[1150] 나아간 구체예에서, Fc-부위는 E-코일 또는 K-코일 DART의 E 및/또는 K에 연결될 수 있다.

[1151] Fc-함유 DART의 Fc 영역 및 DART VH 도메인 사이의 한층 더한 분리가 이런 도메인의 덜 분리된 배열이 이런 도메인 및 그들의 결합 리간드 사이의 감소된 상호작용을 야기하거나 달리 DART 회합을 방해하는 경우에 바람직하다. 임의의 아미노산 서열이 사용될 수 있을지라도, 가변 도메인으로부터 Fc 도메인을 최대한 멀리 연장하고 돌출시킬 수 있도록 α 헬릭스 코일을 형성할 수 있는 분리자를 사용하는 것이 바람직하다(**도 37**). 상반되는 전하

의 상술한 코일화 폴리펩티드가 이형이량체 형성을 증진시키기 위하여 추가적으로 기능하기 때문에, 이런 분자는 분리자가 특히 바람직하다. 이런 코일-함유 Fc-DART 분자는 개선된 혈청 반감기 및 이펙터 기능 보충을 포함하는 Fc-DART의 것들과 유사한 이익을 제공한다. 상술한 E-코일 및 K-코일 폴리펩티드는 이 목적에 특히 바람직하다.

[1152] 따라서, 바람직한 구체예에서, E-코일 Fc-함유 DART는 일반적 서열: [VL 도메인]-[**GGGSGGGG**]-[VH 도메인]-[(**EVAALEK**)$_4$]-**GGG**-D234에서 시작하는 Fc 도메인(Kabat 넘버링)을 가질 것이고, 여기서 VL은 DART의 가변 경 Ig 도메인이고, **GGGSGGGG**은 **서열번호 10**이고, VH은 DART의 가변 중 Ig 도메인이고, 그리고 (**EVAALEK**)$_4$는 **서열번호 299**이다.

[1153] 유사하게, 바람직한 구체예에서, K-코일 Fc-함유 DART는 일반적 서열: [VL 도메인]-[**GGGSGGGG**]-[VH 도메인]-[(**KVAALKE**)$_4$]-GGG-D234에서 시작하는 Fc 도메인(Kabat 넘버링)을 가질 것이고, 여기서 VL은 DART의 가변 경 Ig 도메인이고, **GGGSGGGG**는 **서열번호 10**이고, VH는 DART의 가변 중 Ig 도메인이고 (**KVAALKE**)$_4$는 **서열번호 300**이다.

[1154] 앞에서 나타낸 바와 같이, 코일-함유 DART 분자 또는 코일-함유 Fc-함유 DART 분자는 오직 단일의 이런 코일 분리자를 함유할 수 있거나, 하나 이상의 이런 분리자를 함유할 수 있다(예컨대, 두 개의 분리자, 바람직하게는 이 중 하나가 DART의 폴리펩티드의 VH 도메인의 각각에 연결된 상반되는 전하). 이런 분리자 분자에 Fc 영역을 연결함으로써, 사슬 스와핑에 의해 Fc-DART 분자의 이량체, 사량체 등의 버전을 만들기 위한 능력이 향상된다(도 39). **도 39**에서 보여준 바와 같이, Fc-DART 분자는 Fc 도메인이 DART VH 도메인의 하나 또는 양쪽에 연결되어 있는지 여부에 의존하여 단량체 또는 이량체를 형성하도록 생산할 수 있다.

[1155] **6.17 E-코일/K-코일 FC-함유 DART의 기능적 활성**

[1156] E-코일 및/또는 K-코일 Fc-DART 종은 :(1) CD79b(BCR 복합체)-반응 항체, CB3의 가변 경 및 중 부위, 및 (2) CD32B-반응 항체, 2B6의 저친화성 변이체("YA" 변이체로 불림)의 가변 경 및 중 부위를 갖는 이중-특이성 DART 분자로부터 생산된다. 이 항체의 이 경쇄 가변 부위는 돌연변이: N50Y 및 V51A를 함유하는 항체 2B6의 것과 다르다. 따라서, 항체 YA2B6은 경쇄 가변 부위 서열:

[1157] EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRTSQSIGTNIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQSNTWPFTFGGGT KVEIK(**서열번호 302**)를 갖는다.

[1158] 이 항체의 중쇄 가변 부위의 서열은:

[1159] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWIHWVRQAPGQGLEWMGVIDPSDTYPNYNKKFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARNGDS DYYSGMDYWGQGTTVTVSS(**서열번호 303**)이다.

[1160] 저친화성 항체는 CD79b를 발현하는 세포(B 세포)에서 시스(cis)로 CD32B에 선택적으로 결합할 것인 것으로부터 선별하였다. 그 자체로, 상대적 배치는 다른 CD32B-발현 세포(단핵구, 내피세포, 간)와의 상호작용뿐만 아니라 원하지 않는 트랜스 상호작용을 줄일 것이다.

[1161] 이런 h2B6YAhCB3 DART의 E-코일 및/또는 K-코일 유도체 및 E-코일 및/또는 K-코일 Fc-함유 유도체를 제조하였다. 크기 배재 크로마토그래피를 생산된 분자의 대략적 크기 및 이질성을 분석하기 위해 사용하였다. **도 40**에서 보여준 바와 같이, 이량체는 K-코일 도메인에 연결된 단독으로 연결된 Fc 영역을 갖는 E-코일/K-코일뿐만 아니라 E-코일 도메인에 연결된 단독으로 연결된 Fc 영역을 갖는 E-코일/K-코일 DART로부터 형성되었다. 원하는 단량체뿐만 아니라 이량체 분자는 Fc 영역이 동일한 DART 분자의 E 및 K 코일 모두에 연결된 표본으로부터 회수되었다. **도 41**은 생산된 이량체 분자의 가능한 구조를 보여준다.

[1162] 크기 배재 크로마토그래피 분획을 생산된 분자의 구조의 나아간 분석을 위해 SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동을 사용하여 분석하였다(**도 42**). E-코일/K-코일 DART 유도체(Fc 영역 없음)는 대략 28 kD(KFc-함유 폴리펩티드 및 약간 작은 EFc-함유 폴리펩티드에 상응함)의 각각의 두 개의 우세한 밴드 및 대략 49 kD(E-코일/K-코일 DART에 상응함)에서의 덜 우세한 밴드로서 이동하였다. 크기 배재 크로마토그래피로부터의 E-코일/K-코일 Fc-함유 DART 유도체(EFc/K 또는 E/KFc)의 단량체 분획은 오직 대략 28 kD에서 더 크거나 더 작은 분자량 밴드 중 어느 하나(DART가 KFc-함유 DART(더 큰 분자량 밴드)인지 또는 EFc-함유 DART(더 적은 분자량 밴드)인지 여부에 따라 상응함)를 보였다. 물질은 대략 49KD(E-코일/K-코일 DART에 상응함)에서 우세하게 이동하였다. 유의하게 높은 분자량 밴드가 또한 관찰되었다.

[1163] 이중특이성 결합 ELISA는 생산된 분자를 특징화하기 위해 수행하였다. CD79를 ELISA 플레이트 위에 올려두었다.

이후 DART를 플레이트에 결합시켰다. DART 결합을 sCD32B-바이오틴의 사용에 이어 스트렙타비딘-HRP과 배양에 의해 검출하였다. **도 43**에서 보여준 바와 같이, E-코일/K-코일 Fc-함유 h2B6YAhCB3 DART 유도체(EFc/K 또는 E/KFc)는 h2B6YAhCB3 DART, 또는 EFc/KFc h2B6YAhCB3 DART 유도체와 비교하여 결합의 유의한 상승을 보여주었다.

[1164] CD79b에 결합한 항체의 교차-결합이 B세포 활성화에 이른다(Van Kooten, C. et al.(1997) "Cross-Linking Of Antigen Receptor Via Ig-B(B29, CD79b) Can Induce Both Positive And Negative Signals In CD40-Activated Human B Cells," Clin. Exp. Immunol. 110:509-515). h2B6YAhCB3 DART 분자가 CD79b 및 CD32B 억제 수용체 모두에 결합할 수 있으므로, 그들은 CD79b 결합 영역에 CD32B를 "보완"할 수 있는 능력이 있고, 따라서 B 세포 증식을 차단할 수 있다. 이 능력을 증명하기 위하여, DART를 교차 결합하여 결합된 항-CD79b 항체에 노출된 B 세포와 함께 배양하였다. 이 실험의 결과는 **도 44**에서 보여준다. 결과는 CD79b 또는 CD32B에 대해서만 단지 지시된 항체(각각, Ch2B6N297Q 및 ChCB3.1N297Q, 각각)가 B 세포 증식에 실해하였음을 보여준다. EFc/KFc h2B6YA x hCB3 DART 유도체는 B 세포 증식을 억제하는 것에서 h2B6YA x hCB3 DART 그 자체 및 h2B6YA x hCB3 VF 대조군보다 실질적으로 더 효과적이었다. 오직 단일 연결 Fc 영역을 갖는 E-코일/K-코일 DART(E/KFc h2B6YA x hCB3 DART 유도체 및 EFc/K h2B6YA x hCB3 DART 유도체)는 B 세포 증식에서 가장 큰 억제를 발휘하는 것을 발견하였다.

[1165] **6.18 생체 내 혈청 반감기를 바꾸기 위한 DART 변형**

[1166] 상술한 바와 같이, 이중특이성 단일-사슬 분자와 같은 작은 재조합 항체 분자(예컨대, 대략 55 kDa의 분자 크기로 처리하는 것)는 순환으로부터 급속히 제거되고, 마우스에서의 DART 분자의 생체 내 약동학적 연구는 예상된 대략 2시간의 짧은 말단 반감기를 보여주었다.

[1167] 일부 구체예에서, 급성 염증 조건의 치료에서와 같이, 이런 짧은 반감기가 요구되지만, 그러나 암, 및 만성 질환 및 이상의 치료에서와 같이 다른 구체예에서, 더 긴 반감기를 나타내는 본 발명의 DART 분자가 바람직하다.

[1168] 이런 용도를 위한 DART 분자의 생체 내 약동학적 성질을 개선시키기 위하여, DART 분자는 DART 분자의 하나 이상의 말단에서 혈청-결합 단백질의 폴리펩티드 부분을 함유하기 위하여 변형될 수 있다. 가장 바람직하게는, 혈청-결합 단백질의 이런 폴리펩티드 부분은 DART 분자의 C-말단에 장치될 것이다. 이 목적을 위한 혈청-결합 단백질의 특히 바람직한 폴리펩티드 부분은 연쇄상구균 단백질 G의 알부민-결합 도메인(ABD)이다. 스트렙토코쿠스 균주 G 148의 단백질 G의 알부민-결합 도메인 3(ABD3)이 특히 바람직하다.

[1169] 스트렙토코쿠스 균주 G 148의 단백질 G의 알부민-결합 도메인3(ABD3)은 안정된 세 가지-헬릭스 묶음을 형성하는 46개 아미노산 잔기로 구성되고, 넓은 알부민 결합 특이성을 갖는다(Johansson, M.U. et al.(2002) "Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules" J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120). 알부민은 혈장에서 가장 풍부한 단백질이고, 인간에서 19일의 반감기를 갖는다. 알부민은 그것을 다른 단백질에 비-공유적으로 결합할 수 있게 하는 몇몇의 작은 분자 결합 영역을 소유하고, 그것에 의해 그들의 혈청 반감기를 증가시킨다.

[1170] DART의 반감기를 확장하기 위한 혈청 단백질의 폴리펩티드 부분의 능력을 증명하기 위하여, 연쇄상구균 단백질 G의 ABD3 도메인을 재조합 항체 분자, hCD16-hCD32B ABD-DART을 생산하기 위하여 재조합 이중특이성 DART(hCD16 및 hCD32B 항원과 면역반응함)에 융합시켰다(**도 45**). 이 ABD-DART는 두 항원뿐만 아니라 인간 혈청 알부민(HSA)과 특이적 결합을 보여주었고, 시험관 내에서 이펙터 세포를 재표적할 수 있었다. 대조군 DART와 비교하여, 이 ABD-DART는 마우스에서 혈청 반감기의 강한 증가를 보여주었다. 이 접근은 DART아 같은 잠재적으로 중요한 약제의 반감기를 90분 이상, 2시간 이상, 5시간 이상, 10시간 이상, 20시간 이상, 및 가장 바람직하게는, 30시간 이상 증가시키기 위하여 실행가능한 루트로서 사용할 수 있다.

[1171] **물질 및 방법:**

[1172] ***ABD DART의 설계 및 구축:*** hCD16-hCD32B ABD DART를 사슬 1로서:

[1173] hCD16VL-G3SG4-hCD32BVH-K 코일[$(KVAALKE)_4$]를 사용하고,

[1174] 여기서 CD16VL은 3G8 CD16VL을 표시하고, G3SG4는 **서열번호 10**을 표시하고, hCD32BVH는 2B6 CD32BVH를 표시하고, 그리고 $(KVAALKE)_4$는 **서열번호 300**을 표시하고;

[1175] 그리고 사슬 2로써:

[1176] hCD32BVL-G3SG4-hCD16VH-GGCGGG-E 코일 $[(EVAALEK)_4]$-GGGNS-ABD를 사용하여 제조하였고,

[1177] 여기서 CD32BVL은 CD32BVL을 표시하고, G3SG4는 **서열번호 10**을 표시하고, hCD16VH는 CD16VH을 표시하고, GGCGGG는 **서열번호 267**의 잔기 2-7이고, E 코일 $[(EVAALEK)_4]$는 **서열번호 299**이고, GGGNS는 **서열번호 301**이고, 및 ABD는 LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLINNAKT VEGVKALID EILAALP(**서열번호 304**)이다.

[1178] 따라서, 사슬 1(h3G8VL1-G3SG4-h2B6VH4-K코일-GGGNS)의 서열은:

[1179] DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKASQSVD FDGDSFMNWY QQKPGQPPKL

[1180] LIYTTSNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQSNEDPY

[1181] TFGQGTKLEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTN

[1182] YWIHWVRQAP GQGLEWIGVI DPSDTYPNYN KKFKGRVTMT VVVSTSTAYM

[1183] ELRSLRSDDT AVYYCARNGD SDYYSGMDYW GQGTTVTVSS GGCGGGKVAA

[1184] LKEKVAALKE KVAALKEKVA ALKEGGGNS (**서열번호 305**)이다.

[1185] 바람직한 폴리뉴클레오티드 암호화 사슬 1(h3G8VL1-G3SG4-h2B6VH4-K코일-GGGNS)은:

[1186] gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc

[1187] atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac

[1188] caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct

[1189] ggggtcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc

[1190] agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga agatccgtac

[1191] acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggcgg cggaggccag

[1192] gttcagctgg tgcagtctgg agctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc

[1193] tgcaaggctt ctggttacac ctttaccaac tactggatac actgggtgcg acaggcccct

[1194] ggacaagggc ttgagtggat tggagtgatt gatccttctg atacttatcc aaattacaat

[1195] aaaaagttca agggcagagt caccatgacc gtagtcgtat ccacgagcac agcctacatg

[1196] gagctgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag aaacggtgat

[1197] tccgattatt actctggtat ggactactgg gggcaaggga ccacggtcac cgtctcctcc

[1198] ggaggatgtg gcggtggaaa agtggccgca ctgaaggaga aagttgctgc tttgaaagag

[1199] aaggtcgccg cacttaagga aaaggtcgca gccctgaaag agggcggcgg gaattct **(서열번**호 306)이다.

[1200] 따라서, 사슬 2(h2B6VL5-G3SG4-h3G8VH5-E코일-GGGNS-ABD)의 서열은:

[1201] EIVLTQSPDF QSVTPKEKVT FTCRTSQSIG TNIHWYQQKP DQSPKLLIKE

[1202] VSESISGVPS RFSGSGSGTD FTLTINSLEA EDAATYYCQQ SNTWPFTFGG

[1203] GTKVEIKGGG SGGGGQVTLR ESGPALVKPT QTLTLTCTFS GFSLSTSGMG

[1204] VGWIRQPPGK ALEWLAHIWW DDDKRYNPAL KSRLTISKDT SKNQVVLTMT

[1205] NMDPVDTATY YCAQINPAWF AYWGQGTLVT VSSGGCGGGE VAALEKEVAA

[1206] LEKEVAALEK EVAALEKGGG NSLAEAKVLA NRELDKYGVS DYYKNLINNA

[1207] KTVEGVKALI DEILAALP **(서열번호 307)**이다.

[1208] 바람직한 폴리뉴클레오티드 암호화 사슬 2(h2B6VL5-G3SG4-h3G8VH5-E코일-GGGNS-ABD)는:

[1209] gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc

[1210] ttcacctgca ggaccagtca gagcattggc acaaacatac actggtacca gcagaaacca

[1211] gatcagtctc caaagctcct catcaaggag gtttctgagt ctatctctgg agtcccatcg

[1212] aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct

[1213] gaagatgctg caacgtatta ctgtcaacaa agtaatacct ggccgttcac gttcggcgga

[1214] gggaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt taccctgaga

[1215] gagtctggcc ctgcgctggt gaagcccaca cagaccctca cactgacttg taccttctct

[1216] gggttttcac tgagcacttc tggtatgggt gtaggctgga ttcgtcagcc tcccgggaag

[1217] gctctagagt ggctggcaca catttggtgg gatgatgaca agcgctataa tccagccctg

[1218] aagagccgac tgacaatctc caaggatacc tccaaaaacc aggtagtcct cacaatgacc

[1219] aacatggacc ctgtggatac tgccacatac tactgtgctc aaataaaccc cgcctggttt

[1220] gcttactggg gccaagggac tctggtcact gtgagctccg gaggatgtgg cggtggagaa

[1221] gtggccgcac tggagaaaga ggttgctgct ttggagaagg aggtcgctgc acttgaaaag

[1222] gaggtcgcag ccctggagaa aggcggcggg aattctctgg ccgaagcaaa agtgctggcc

[1223] aaccgcgaac tggataaata tggcgtgagc gattattata agaacctgat taacaacgca

[1224] aagaccgtgg aaggcgtgaa agcactgatt gatgaaattc tggccgccct gcct **(서열번호** 308)이다.

[1225] 각각의 VL 및 VH 단편을 주형으로써 hCD 16-hCD32B DART를 사용하여 PCR에 의해 증폭시켰다. 사슬 2에 있어서, E 코일 및 ABD을 함유하는 뉴클레오티드 서열은 프라이머 이량체에 의해 형성되었고, 이후, 제한효소 분해 및 리게이션을 사용하여 hCD16의 VH 부위의 C-말단 끝에 서브클로닝하였다. 두 사슬 모두는 NheI-NotII 부위에서 pCIneo 벡터(Promega, inc.)로 클로닝되었다. 저마다 NgoMIV-NheI에서 효소분해된 사슬1 및 BstBI-PmeI에서 효소분해된 사슬2 발현 카세트를 품고 있는 개별 플라스미드를 이후 안정 세포주를 생성하기 위해 CHO 세포로 형질도입하기 위하여 단일 플라스미드로 클로닝하였다.

[1226] ***단백질의 발현 및 정제:*** 안정된 형질 도입을 위해, CHO-S 세포를 hCD16-hCD32B EK ABD-DART 플라스미드 DNA로 형질전환시켰다. ABD-DART 단백질을 CNBr 활성화 Sepharose 4B와 결합된 FcRIIB 항원의 가용성 버전을 이용하여 친화성 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 농축된 단백질을 Superdex 200HR 10/30을 사용한 크기 배재 크로마토그래피에 의해 더 정제하였다.

[1227] ***ELISA에 의한 결합 분석:*** CD-16 기반 포획에 있어서, 플레이트는 FcRIIB 항원을 2ug/mL의 농도로 4℃에서 밤새 코팅하였다. 이후 플레이트를 PBS-T에 있는 0.5% 펩톤으로 차단하였다. 두배의 일련의 희석으로 희석한 정제된 단백질을 플레이트에 1시간 동안 상온에서 결합시켰다. 최종적으로 검출을 바이오틴화 CD32B(50 ng/niL)에 이은 HRP 접합 스트렙타비딘(1/1000, BD-Pharm)을 사용하여 수행하였다. HRP 활성을 TMB의 첨가에 의해 측정하였고, 플레이트를 OD 450nm로 플레이트 리더에서 읽었다.

[1228] 인간 혈청 알부민(HSA) 포획, 플레이트를 2ug/mL의 농도에서 HSA를 4℃에서 밤새 코팅하였다. 이후 동일한 절차가 이중 친화성 ELISA를 수행하기 위해 뒤따랐다.

[1229] ***말초-혈액 단핵구 세포-매개 ADCC 분석:*** 세포 독성은 LDH 분비 분석에 의해 측정되었다. 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC)는 Ficoll-Hypaque(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) 농도 기울기 원심분리에 의해 전체 인간 혈액(Lonza Walkersville, Inc, Gaithersburg, MD)으로부터 제조사의 지침서에 따라 정제되었다. 2×10^4 표적 세포를 둥근-바닥 96-웰 조직 배양 플레이트의 각각의 웰에 깐다. 다른 DART 또는 항체 분자의 하나 내지 네 개의 일련의 희석을 플레이트에서 세포에 첨가한다. 이후, 6×10^5 PBMC를 동일한 웰에 첨가한다. 이후, 플레이트는 37℃ 및 5% CO_2 배양기에서 밤새 배양한다. 플레이트는 이후 5분 동안 1200 rpm으로 원심분리하고, 50 μl의 상청액을 편평한 바닥 ELISA 플레이트에 옮긴다. 50 μl의 LDH 기질 용액(Promega)을 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 암조건에서 30분 동안 상온에서 배양한다. 이후 50 μl의 정지 용액을 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 1시간 내에 490 nm에서 읽는다. 각각의 웰의 퍼센트 세포 독성을 하기와 같이 읽은 가공하지 않은 O.D.와 함

께 계산하고,

[1230] (Sample-AICC)/(표적 Max-표적 자발적)×100

[1231] 여기서 AICC는 항체-의존성 세포 독성이다. 투여량 반응 곡선을 Prism 소프트웨어를 사용하여 생성한다.

[1232] ***약동학적 연구:*** C57B1/6 마우스에 5mg/kg으로 hCD16-hCD32B DART의 단일 정맥 주사를 주입하였다. 마우스 혈청을 투여 전, 2, 30분; 1, 3, 6, 24 및 72시간에서 수득하였다. 혈청에서 hCD16-hCD32B DART 농도를 정량하였다. hCD16-hCD32B DART의 약동학적 계산은 약동학적 소프트웨어 패키지 WinNonlin Professional 5.1(Pharsight Corporation, USA)의 수단에 의해 수행되었다. 매개변수를 비-구획화 분석(NCA)에 의해 결정하였다. 비-구획화 분석은 약물의 정맥 주사를 요구하는 모델(Model 201)에 기반을 두었다. 직선의 사다리꼴 방법을 매개변수 계산을 위해 사용하였다.

[1233] **결과**

[1234] ***ELISA에 의한 발현 및 결합 연구:*** hCD 16-hCD32B ABD-DART는 포유동물 CHO-S 세포에서 리터당 6.5 mg의 농도에서 효과적으로 발현되었다. 저마다의 항원에 대한 정제된 ABD-DART 단백질의 결합 활성을 ELISA에 의해 평가하였다. 결과는 hCD16-hCD32B ABD-DART가 항원, CD16뿐만 아니라 CD32B 모두에서 동시에 결합하는 것을 보여주었다(**도 46a**). 결합 프로파일은 대조군 hCD16-hCD32B DART 단백질 결합과 일치하였다. 인간 혈청 알부민(HSA)에 대하여 정제된 hCD16-hCD32B ABD-DART의 친화성을 또한 ELISA에 의해 증명하였다(**도 46b**). 결과는 HSA에 대한 ABD 융합 DART의 강력한 결합을 보여주는데 반해, 대조군 hCD16-hCD32B DART에 대하여 결합을 보여주지 않았다.

[1235] ***ABD-DART의 시험관 내 세포 독성***: 이펙터 세포 위의 하나 및 표적 세포 위의 하나의 두 항원에 대한 이 이중특이성 ABD-DART의 동시에 일어나는 결합을 증명하기 위하여, 재추적 세포 사멸 분석을 수행하였다. 이펙터 세포로서 인간 PBMC를 사용하여, hCD16-hCD32B ABD-DART는 강력하고, 투여량-의존적이며, CD32B 양성 B 세포주, Daudi에 대한 세포 독성을 유도하였다(**도 47**). 결과는 ABD-DART의 효능이 모 DART의 그것과 동등함을 보여주었다.

[1236] ***ABD-DART의 약동학적 성질:*** 약동학적 성질 of hCD16-hCD32B ABD-DART의 약동학적 성질을 C57B1/6 마우스로의 단일 투여량 i.v. 주사 후 혈청 샘플의 ELISA에 의해 분석하였다(**도 48**). 단백질, DART 및 ABD-DART 모두는 순환으로부터 이상(biphasic)으로 제거되는 것을 보여주었다. ABD-DART의 PK 연구는 일반적 DART의 1.2 시간과 비교하여 35.1시간의 연장된 순환 시간을 보여주었다(**도 48, 표 31**). 또한 약동학적 성질의 향상도 곡선하 면적(AUG)의 비교에 의해 증명되었다. 컨스트럭트 ABD-DART에 대하여, AUC는 ABD에 대한 융합 후 거의 30개의 인자에 의해 증가되었다(**표 31**).

표 31

[1237]

	ABD-DART	DART
$T_{1/2}$ (hr)	35.1	1.2
Cmax (ug/ml.)	156.3	103.7
Tmax (hr)	0.5	0.033
AUC	4408.2	138.3

[1238] 요약하자면, DART 단백질에 융합된 알부민 결합 도메인(ABD-DART로서 지칭됨)은 성공적으로 설계되고 생산되었다. hCD16-hCD32B ABD-DART는 그것의 두 가지 인식된 항원성 결정자: CD16 및 CD32B에 대하여 특이성을 유지하는 것을 확인하였다. ABD-DART는 인간 혈청 알부민과 높은 친화성을 보여주는 것으로 발견되었다. ABD의 융합은 생물학적 활성을 감소시키지 않았다(즉, 종양 세포 사멸을 재추적하기 위한 DART의 효능). ABD에 대한 DART 분자의 융합은 그것의 생체 내 반감기에서 실질적인 향상(증가)을 이끌었고, 크기에서 극적인 증가 없이 이 목적을 달성하였다. 작은 크기를 유지하는 능력은 종양 조직으로 확산하기 위한 DART의 능력을 촉진하기 때문에 중요하고 유리하다.

[1239] **6.19 Her2/B 세포 수용체 DART**

[1240] IgDART 디아바디는 Her2/neu 및 T-세포 수용체("TCR")에 결합할 수 있는 가변 부위를 함유하도록 구축되었다.

[1241] 상술한 바와 같이, TCR은 CD4+ 또는 CD8+ T-세포에 의해 천연적으로 발현되고, 이런 세포가 항원-제시 세포의 클래스 I 또는 클래스 II MHC 단백질에 의해 결합되고 제시된 항원성 펩티드를 인식할 수 있게 한다. TCR에 의

한 pMHC(펩티드-MHC) 복합체의 인식은 사이토카인의 생산 및 항원-제시 세포의 용해를 야기하는 세포 면역 반응의 전파를 개시한다. ErbB 패밀리의 중요한 멤버인 HER2/neu는 그것의 몇몇의 인간 암종 및 포유동물 발달에서의 역할 때문에 널리 연구되어왔다(Hynes and Stern(1994) Biochim. et Biophys. Acta 1198:165-184; 및 Dougall et al.(1994) Oncogene 9:2109-2123; Lee et al.(1995) Nature 378:394-398). 인간 HER2/neu 유전자 및 HER2/neu 단백질은 Semba et al.(1985) Proc. Natl. Acad. Sci.(U.S.A.) 82:6497-6501 및 Yamamoto et al.(1986) Nature 319:230-234에서 기술하고, 서열은 접근 번호 X03363으로서 GenBank에서 사용가능하다. HER2/neu는 네 개의 도메인: 리간드에 결합하는 세포밖 도메인; 친유성 막통과 도메인; 보존된 세포 내 티로신 키나아제 도메인; 및 인산화될 수 있는 몇몇의 티로신 잔기를 보유하는 카르복실-말단 신호전달 도메인을 포함한다(Plowman et al.(1993) Proc. Natl. Acad. Sci.(U.S.A.) 90:1746-1750). HER2/neu 세포밖(ECD) 도메인의 서열은 Franklin et al.(2004) Cancer Cell. 5(4):317-328에 의해 기술되었으며, Protein DataBank Record 1S78(2004)에서 사용할 수 있다.

[1242] HER2/neu는 성장 인자 수용체로서 기능하고, 유방암 세포주, 결장암, 방광 세포암, 난소암 및 폐암과 같은 종양에서 종종 발현된다. HER2/neu는 인간 유방암 및 난소암의 25~30%에서 과발현되고, 이들 환자에서 공격적인 임상 진행 및 나쁜 예후와 관련된다.(Slamon et al.(1987) Science 235:177-182; Slamon et al.(1989) Science 244:707-712). HER2/neu의 과발현이 또한 위, 자궁내막, 침샘, 폐, 신장, 결장, 갑상선, 췌장 및 방광의 암종을 포함하는 다른 암종에서 관찰되었다.(예컨대, King et al.(1985) Science 229:974; McCann et al.(1990) Cancer 65:88-92; Yonemura et al.(1991) Cancer Research 51 :1034을 참조하라).

[1243] 특히, 단백질의 막통과 부위와 매우 근접하여 존재하는 HER2/neu의 시스테인-풍부 II 도메인에서 세포밖 에피토프(아미노산 529 내지 627)를 인식하고 4D5(HERCEPTIN, Genentech, Inc.)로 알려진 설치류 단일클론 항체의 인간화 변이체를 포함하는, HER-1 또는 HER2/neu를 표적하는 다수의 단일클론 항체 및 소분자 티로신 키나아제 억제자가 개발되었다. 연구는 HER2/neu 과발현 유방암 세포주 세포에서 화학 요법 제제(예컨대, 시스플라틴, 독소유비신, 탁솔)와 조합된 HER2/neu에 특이적인 항체를 사용한 치료가 화학 요법 단독만을 사용한 치료보다 더 높은 세포 독성 반응을 이끌어내는 것을 보여주었다.(Hancock et al.(1991) Cancer Res. 51 :4575-4580; Arteaga et al.(1994) Cancer 54:3758-3765; Pietras et al.(1994) Oncogene 9:1829-1838). HER2/neu 항체가 화학 요법 제제에 대한 반응을 향상시킬 수 있는 한 가지 가능한 기작은 HER2/neu 단백질 발현을 조절하거나 DNA 복구를 간섭하는 것에 의한 것이다.(Stancovski et al.(1991) Proc. Natl. Acad. Sci.(U.S.A.) 88:8691-8695; Bacus et al.(1992) Cell Growth & Diff. 3:401-411; Bacus et al.(1993) Cancer Res. 53:5251-5261; Klapper et al.(1997) Oncogene 14:2099-2109; Klapper et al.(2000) Cancer Res. 60:3384-3388; Arteaga et al.(2001) J Clinical Oncology 19(18s):32s-40s. 특정 경우에서, HERCEPTIN과 같은 항-HER2/neu 항체가 환자에 대한 치료적 이점을 제공함에도 불구하고, 유방암 세포주의 과반수 및 다른 환자는 이런 항체에 대하여 난치성 반응을 나타낸다. 일부에서 이들 반응은 환자의 암세포에 의한 HER2/neu의 과발현의 범위에서의 차이를 반영한다.

[1244] Her2/neu 및 T-세포 수용체("TCR")에 결합할 수 있는 가변 부위를 함유하는 결과로서, DART는 HER2-발현 세포에 결합할 수 있는 능력을 갖고, 그로 인해 T-세포 수용체에 결합 할 수 있는 이런 세포 도메인에 부착한다. 이런 T 세포가 이 도메인에 결합하였을 때, 그들은 HER2-발현 세포의 사멸을 야기하는 면역 반응의 개시를 활성화시킨다.

[1245] 이런 DART에 대한 아미노산 및 핵산 서열을 하기에 제공하고, VL 및 VH 서열은 평이한 문자, VL-VH 링커는 밑줄친 문자, C-말단 이형이량체화 모티프를 암호화하는 서열(**서열번호 313**: GFNRGEC 또는 **서열번호 314**: GVEPKSC)은 볼드체 및 이탤릭체로 나타내었다.

[1246] **TCRVL-HER2VH 아미노산 서열(서열번호 315)**

[1247] EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCSATSSVS YMHWYQQKPG KAPKRWIYDT SKLASGVPSR

[1248] FSGSGSGTEF TLTISSLQPE DFATYYCQQW SSNPLTFGQG TKLEIKGGGS GGGGQVQLQQ

[1249] SGPELVKPGA SLKLSCTASG FNIKDTYIHW VKQRPEQGLE WIGRIYPTNG YTRYDPKFQD

[1250] KATITADTSS NTAYLQVSRL TSEDTAVYYC SRWGGDGFYA MDYWGQGASV TVSS***GFNRGE***

[1251] ***C***

[1252] **TCRVL-HER2VH-암호화 핵산 서열(서열번호 316)**

[1253] gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc

[1254] ctctcctgca gtgccacctc aagtgtaagt tacatgcact ggtatcagca gaaaccaggg

[1255] aaagccccta agcgctggat ctatgacaca tccaaactgg cttctggggt cccatcaagg

[1256] ttcagcggca gtggatctgg gacagaattt actctcacaa tcagcagcct gcagcctgaa

[1257] gattttgcaa cttattactg tcagcagtgg agtagtaacc cgctcacgtt tggccagggg

[1258] accaagcttg agatcaaagg aggcggatcc ggcggcggag gccaggttca gctgcagcag

[1259] tctgggccag agcttgtgaa gccaggggcc tcactcaagt tgtcctgtac agcttctggc

[1260] ttcaacatta aagacaccta tatacactgg gtgaaacaga ggcctgaaca gggcctggaa

[1261] tggattggaa ggatttatcc tacgaatggt tatactagat atgacccgaa gttccaggac

[1262] aaggccacta taacagcaga cacatcctcc aacacagcct acctgcaggt cagccgcctg

[1263] acatctgagg acactgccgt ctattattgt tctagatggg gaggggacgg cttctatgct

[1264] atggactact ggggtcaagg agcctcggtc accgtgagct cc***ggattcaa caggggagag***

[1265] ***tgt***

[1266] **HER2VL-TCRVH 아미노산 서열(서열번호 317)**

[1267] DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS ITCKASQDVN TAVAWYQQKP GHSPKLLIYS ASFRYTGVPD

[1268] RFTGSRSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYTTPPTFGG GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV

[1269] QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYKFTSYVMH WVRQAPGQGL EWIGYINPYN DVTKYNEKFK

[1270] GRVTITADKS TSTAYMELSS LRSEDTAVHY CARGSYYDYD GFVYWGQGTL VTVSS***GVEPK***

[1271] ***SC***

[1272] **HER2VL-TCRVH-암호화 핵산 서열(서열번호 318)**

[1273] gacatcgtga tgacccagtc ccacaagttc atgtccacct ctgtgggcga tagggtcagc

[1274] atcacctgca aggccagcca ggatgtgaat actgctgtag cctggtatca gcagaaacca

[1275] ggacattctc ccaaactgct gatttactcc gcatccttcc ggtacactgg agtccctgat

[1276] cgcttcactg gcagcagatc tgggacagat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct

[1277] gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatacta cacctcccac cttcggaggg

[1278] ggtaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt tcagctggtg

[1279] cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggg gcctcagtga aggtctcctg caaggccagc

[1280] ggttacaagt ttaccagcta cgtgatgcac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt

[1281] gagtggatcg gatatattaa tccttacaat gatgttacta agtacaatga gaagttcaaa

[1282] ggcagagtca cgattaccgc ggacaaatcc acgagcacag cctacatgga gctgagcagc

[1283] ctgagatccg aggacacggc cgtgcactac tgtgcgagag ggagctacta tgattacgac

[1284] gggtttgttt actggggcca agggactctg gtcactgtga gctcc***ggagt tgagcccaaa***

[1285] ***tcttgt***

[1286] 바람직한 구체예에서, 이런 컨스트럭트는 이형이량체의 형성을 촉진시킬 수 있는 E 코일 또는 K 코일 도메인을 함유하도록 변형된다(즉, TCRVL-HER2VH x HER2VL-TCRVH 이량체). 이런 DART에 대한 아미노산 및 핵산 서열은 하기에서 제공되고, VL 및 VH 서열은 평이한 문자, VL-VH 링커는 밑줄친 문자, 이량체화를 위한 Cys-함유 링커를 암호화하는 서열(GGCGGG; **서열번호 267**의 잔기 2-7)은 이탤릭체로 나타내었다. K 코일 이형이량체화 도메인

의 E 코일은 기울기-밑줄쳐 나타내었다(바람직한 "E-코일" 서열은 4개의 EVAALEK의 7량체 반복; **서열번호 299**이고; 바람직한 "K-코일" 서열은 4개의 KVAALKE의 7량체 반복:**서열번호 300**이다). E 코일 또는 K 코일 뒤에 따르는 서열은 기능이 없다.

[1287] **TCRVL-HER2VH-E 코일 아미노산 서열(서열번호 319)**

[1288] EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCSATSSVS YMHWYQQKPG KAPKRWIYDT SKLASGVPSR

[1289] FSGSGSGTEF TLTISSLQPE DFATYYCQQW SSNPLTFGQG TKLEIKGGGS GGGGQVQLQQ

[1290] SGPELVKPGA SLKLSCTASG FNIKDTYIHW VKQRPEQGLE WIGRIYPTNG YTRYDPKFQD

[1291] KATITADTSS NTAYLQVSRL TSEDTAVYYC SRWGGDGFYA MDYWGQGASV TVSS***GGCGGG***

[1292] *EVAALEKEVA ALEKEVAALE KEVAALEK*GG GNS

[1293] **TCRVL-HER2VH-E 코일-암호화 핵산 서열(서열번호 320)**

[1294] gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc

[1295] ctctcctgca gtgccacctc aagtgtaagt tacatgcact ggtatcagca gaaaccaggg

[1296] aaagccccta agcgctggat ctatgacaca tccaaactgg cttctggggt cccatcaagg

[1297] ttcagcggca gtggatctgg gacagaattt actctcacaa tcagcagcct gcagcctgaa

[1298] gattttgcaa cttattactg tcagcagtgg agtagtaacc cgctcacgtt tggccagggg

[1299] accaagcttg agatcaaagg aggcggatcc ggcggcggag gccaggttca gctgcagcag

[1300] tctgggccag agcttgtgaa gccaggggcc tcactcaagt tgtcctgtac agcttctggc

[1301] ttcaacatta aagacaccta tatacactgg gtgaaacaga ggcctgaaca gggcctggaa

[1302] tggattggaa ggatttatcc tacgaatggt tatactagat atgacccgaa gttccaggac

[1303] aaggccacta taacagcaga cacatcctcc aacacagcct acctgcaggt cagccgcctg

[1304] acatctgagg acactgccgt ctattattgt tctagatggg gaggggacgg cttctatgct

[1305] atggactact ggggtcaagg agcctcggtc accgtgagct cc***ggaggatg tggcggtgga***

[1306] *gaagtggccg cactggagaa agaggttgct gctttggaga aggaggtcgc tgcacttgaa*

[1307] *aaaaaaatca caaccctaaa gaaa*ggcggc gggaattct

[1308] HER2VL-TCRVH-K 코일 아미노산 서열(**서열번호 321**)

[1309] DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS ITCKASQDVN TAVAWYQQKP GHSPKLLIYS ASFRYTGVPD

[1310] RFTGSRSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYTTPPTFGG GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV

[1311] QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYKFTSYVMH WVRQAPGQGL EWIGYINPYN DVTKYNEKFK

[1312] GRVTITADKS TSTAYMELSS LRSEDTAVHY CARGSYYDYD GFVYWGQGTL VTVSS***GGCGG***

[1313] ***G****KVAALKEKV AALKEKVAAL KEKVAALKE*G GGNS

[1314] HER2VL-TCRVH-K 코일-암호화 핵산 서열(**서열번호 322**)

[1315] gacatcgtga tgacccagtc ccacaagttc atgtccacct ctgtgggcga tagggtcagc

[1316] atcacctgca aggccagcca ggatgtgaat actgctgtag cctggtatca gcagaaacca

[1317] ggacattctc ccaaactgct gatttactcc gcatccttcc ggtacactgg agtccctgat

[1318] cgcttcactg gcagcagatc tgggacagat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct

[1319] gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatacta cacctcccac cttcggaggg

[1320] ggtaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt tcagctggtg

[1321] cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggg gcctcagtga aggtctcctg caaggccagc

[1322] ggttacaagt ttaccagcta cgtgatgcac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt

[1323] gagtggatcg gatatattaa tccttacaat gatgttacta agtacaatga gaagttcaaa

[1324] ggcagagtca cgattaccgc ggacaaatcc acgagcacag cctacatgga gctgagcagc

[1325] ctgagatccg aggacacggc cgtgcactac tgtgcgagag ggagctacta tgattacgac

[1326] gggtttgttt actggggcca agggactctg gtcactgtga gct***ccggagg a tgtggcggt***

[1327] ***gga****aaagtgg ccgcactgaa ggagaaaatt gctgctttga aagagaaggt cgccgcactt*

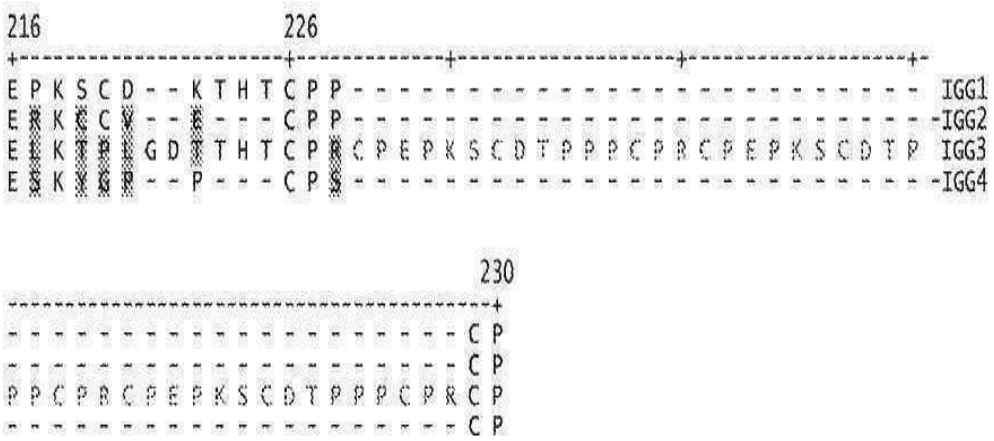
[1328] *aaggaaaagg tcgcagccct gaaagag*ggc ggcgggaatt ct

[1329] Her2 및 T-세포 수용체(TCR) 결합 도메인을 갖는 DART를 저수준의 HER2 발현을 나타내는 것으로서 이전에 특징화된 다양한 유방암 세포주, 결장암 및 방광암 세포주에서 그들의 세포 독성의 매개하는 능력에 대하여 시험하였다(그리고 따라서 항-Her2/neu 항체, Herceptin를 사용한 치료에 대하여 난치성인지). 시험한 유방암 세포주는 ZR75-1(HER2 2+)(**도 49a**), MCF-7(HER2 1+)(**도 49b**) 및 MDA-MB468(HER2-ve)(**도 49c**)이다. 시험한 비-유방암 세포주는 HT-29(결장암 세포주)(**도 49d**) 및 SW780(방광암 세포주)(**도 49e**)이다. **도 49a-e**에서 보여준 것과 같이, 이런 DART 분자는 동등한 세포 독성을 달성하기 위해 필요한 농도의 면에서, 및 관찰된 세포 독성의 최대 수준의 면에서 모두 종양-유래 세포주의 세포 독성을 매개하는 것에서 HERCEPTIN보다 실질적으로 더욱 효과적이었다.

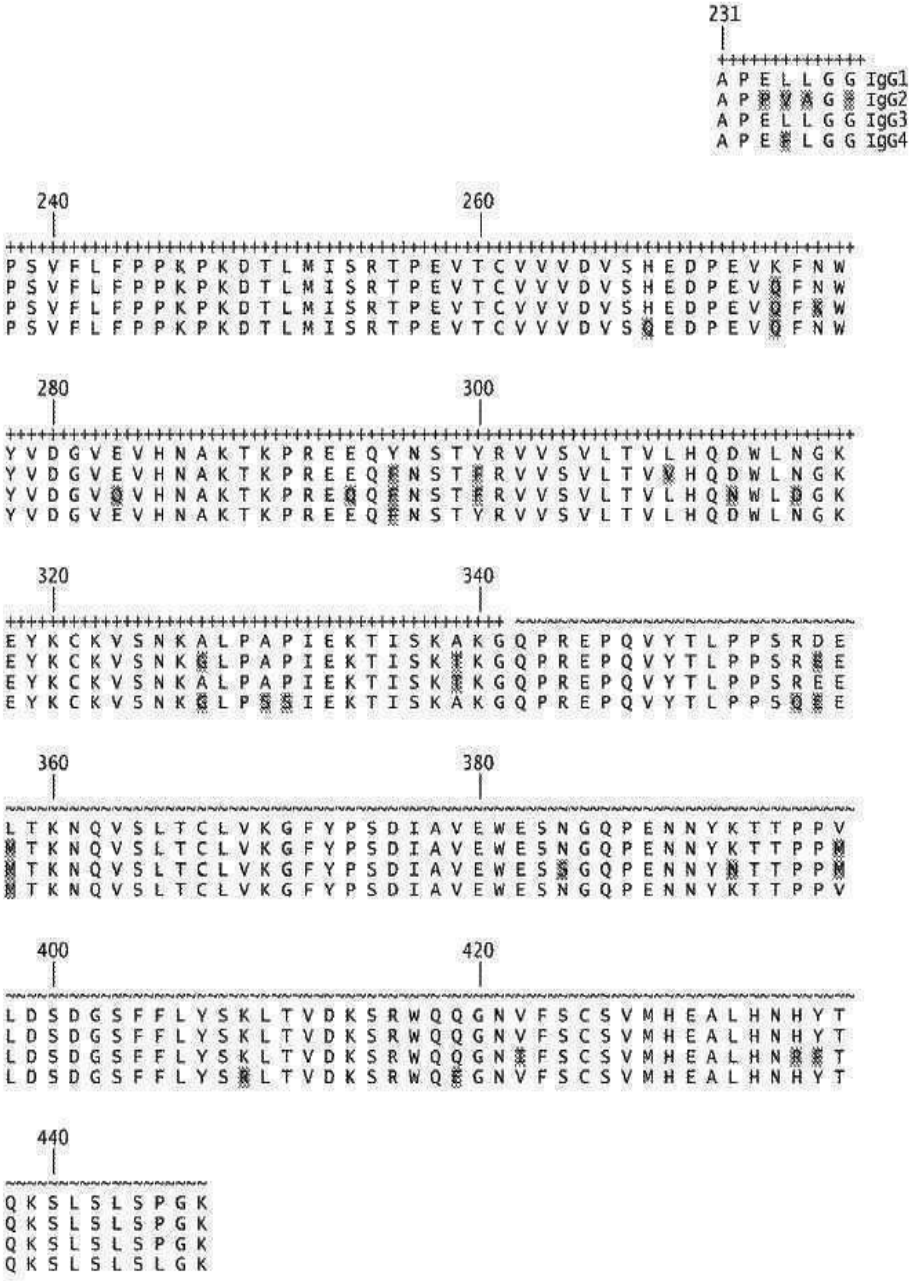
[1330] 본 발명의 많은 변경 및 변형이 당업자에 의해 명백할 것 인바 그것의 정신 및 범주를 벗어나지 않고 만들어질 수 있다. 본 발명에서 기술한 특이적 구체예는 오직 예시의 방법으로만 제공되고, 본 발명은 이런 청구 범위가 주장하는 등가물의 전체 범주에 따라서 첨부한 청구항의 용어에 의해서만 오직 제한될 것이다. 본 발명에 인용된 모든 참고문헌, 특허 및 비-특허는, 마치 각각의 개별 발행물, 또는 특허 또는 특허 출원이 명확하고 개별적으로 모든 목적에 대하여 그 전체가 참고문헌으로써 포함되는 것처럼 동일한 범위로 모든 목적에 대하여 그 전체가 참고 문헌으로써 본 발명에 포함된다.

도면

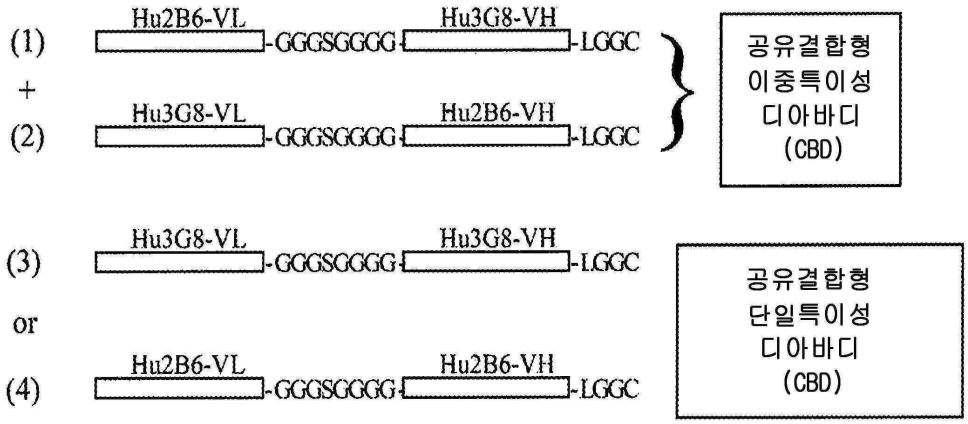
도면1a



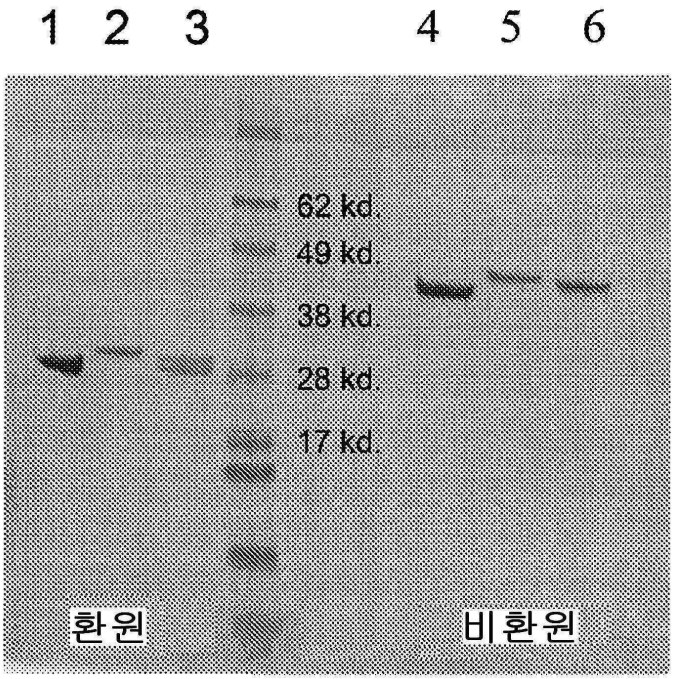
도면1b


231
A P E L L G G IgG1
A P X X A G X IgG2
A P E L L G G IgG3
A P E X L G G IgG4
240
260
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V Q F N W
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V Q F X W
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W
280
300
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q X N S T X R V V S V L T V X H Q D W L N G K
Y V D G V Q V H N A K T K P R E Q Q X N S T X R V V S V L T V L H Q N W L D G K
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q X N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
320
340
E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E
E Y K C K V S N K G L P A P I E K T I S K X K G Q P R E P Q V Y T L P P S R X E
E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K X K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E
E Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q X E
360
380
L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
X T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P X
X T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S S G Q P E N N Y N T T P P X
X T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
400
420
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N X F S C S V M H E A L H N X X T
L D S D G S F F L Y S X L T V D K S R W Q X G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
440
Q K S L S L S P G K
Q K S L S L S P G K
Q K S L S L S P G K
Q K S L S L S L G K

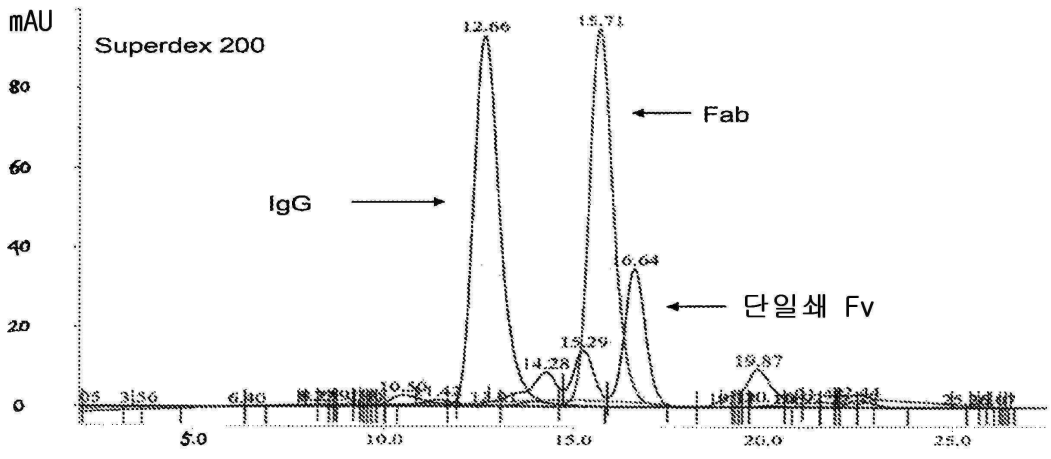
도면2


(1)
Hu2B6-VL
-GGGSGGGG-
Hu3G8-VH
-LGGC
+
(2)
Hu3G8-VL
-GGGSGGGG-
Hu2B6-VH
-LGGC
공유결합형
이중특이성
디아바디
(CBD)
(3)
Hu3G8-VL
-GGGSGGGG-
Hu3G8-VH
-LGGC
or
(4)
Hu2B6-VL
-GGGSGGGG-
Hu2B6-VH
-LGGC
공유결합형
단일특이성
디아바디
(CBD)

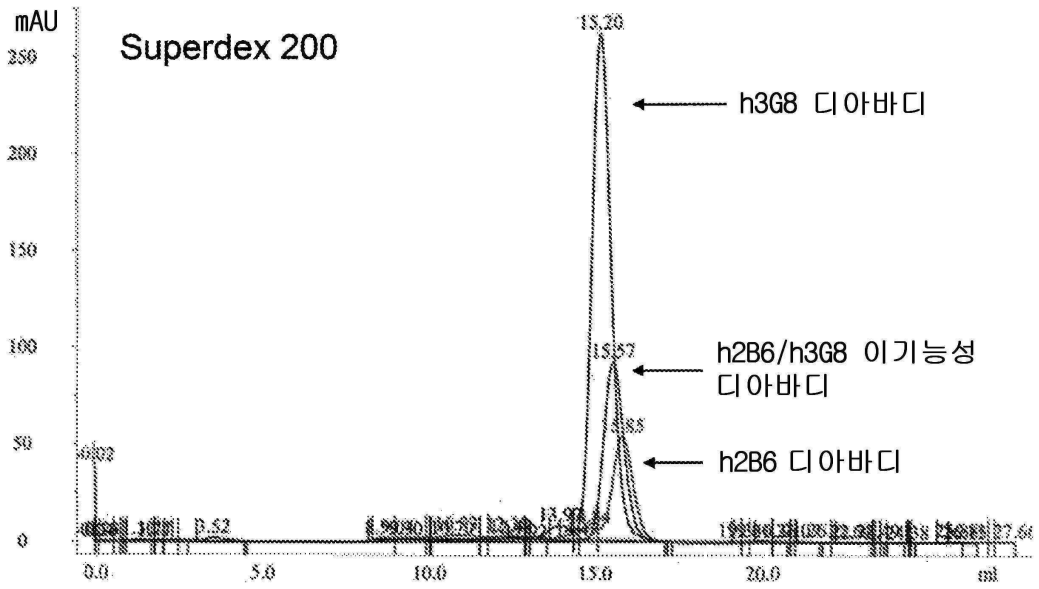
도면3


1 2 3 4 5 6
62 kd.
49 kd.
38 kd.
28 kd.
17 kd.
환원
비환원

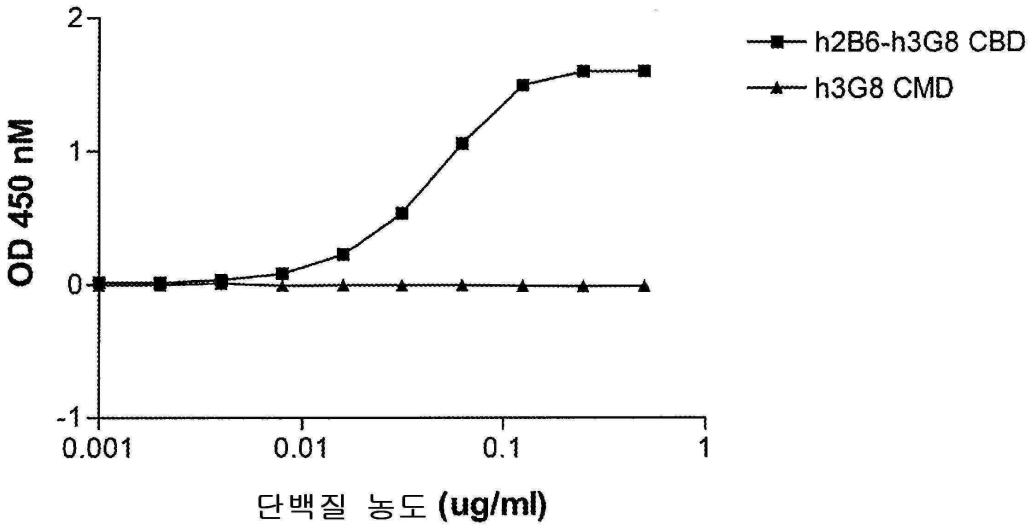
도면4a


mAU
Superdex 200
80
60
40
20
0
12.66
15.71
Fab
IgG
16.64
단일쇄 Fv
15.29
14.28
18.87
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0

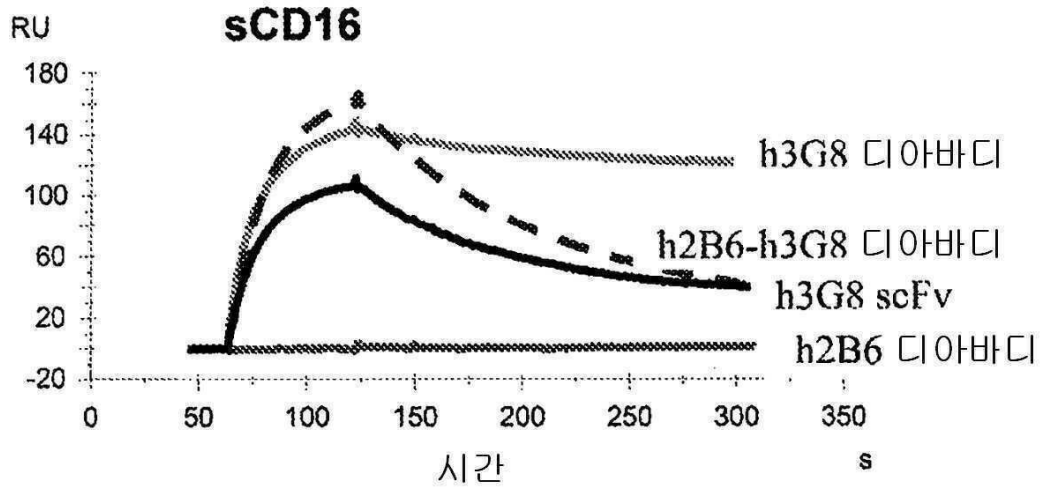
도면4b


mAU
Superdex 200
h3G8 디아바디
h2B6/h3G8 이기능성 디아바디
h2B6 디아바디
ml

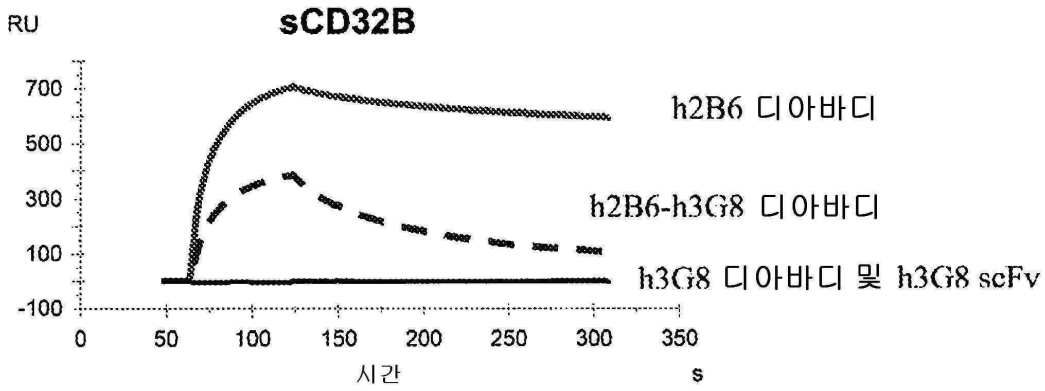
도면5


h2B6-h3G8 CBD
h3G8 CMD
OD 450 nM
단백질 농도 (ug/ml)

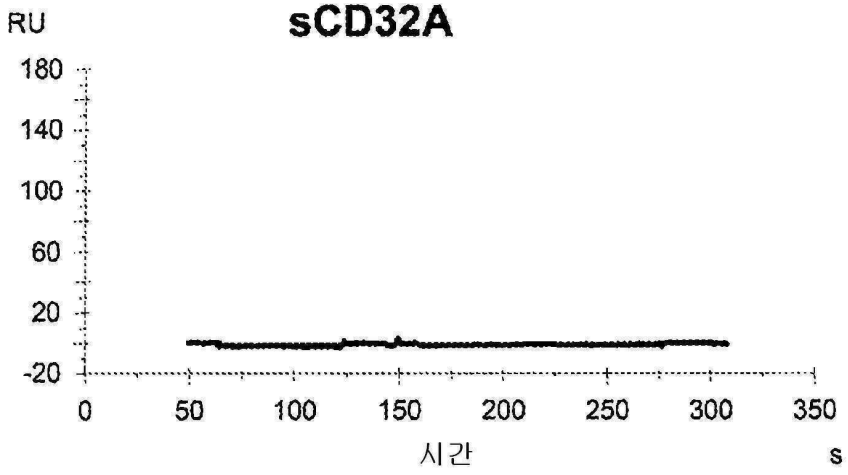
도면6a



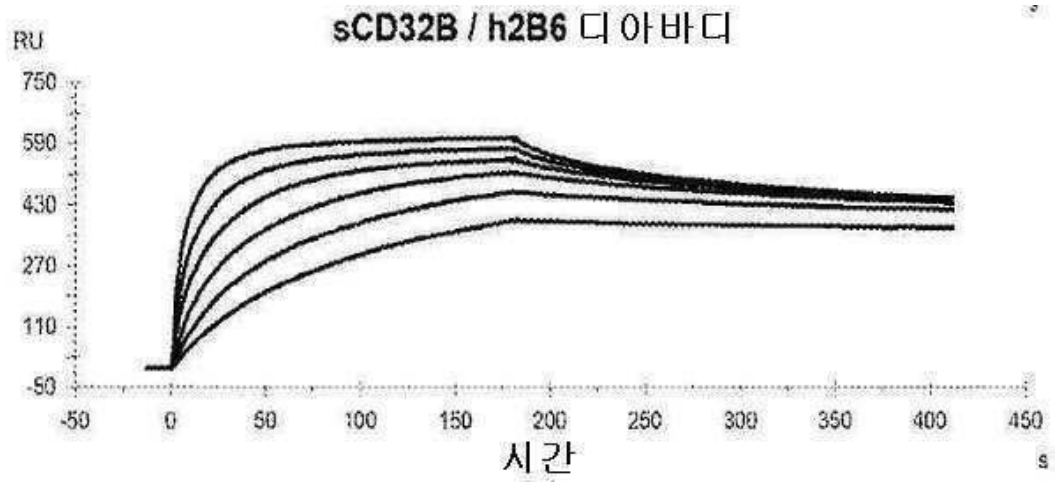
도면6b



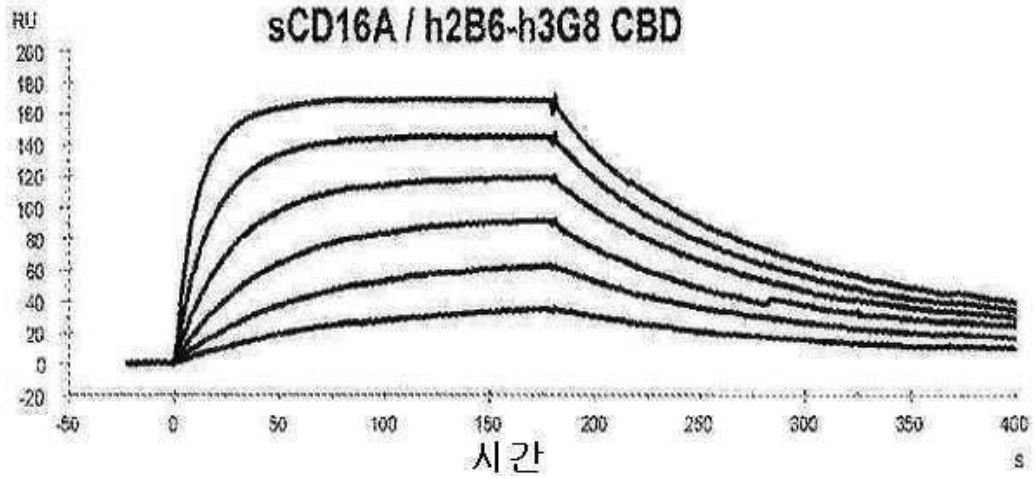
도면6c



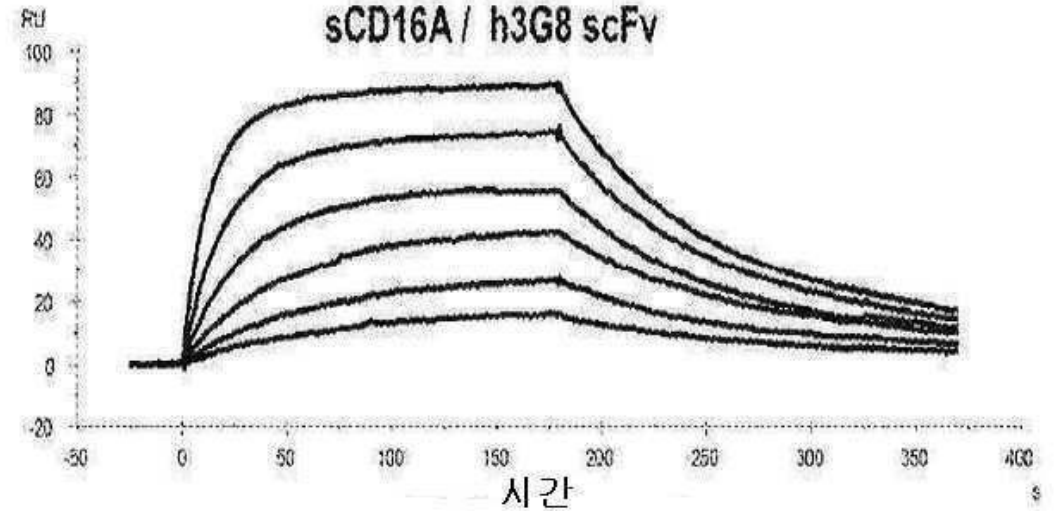
도면7a



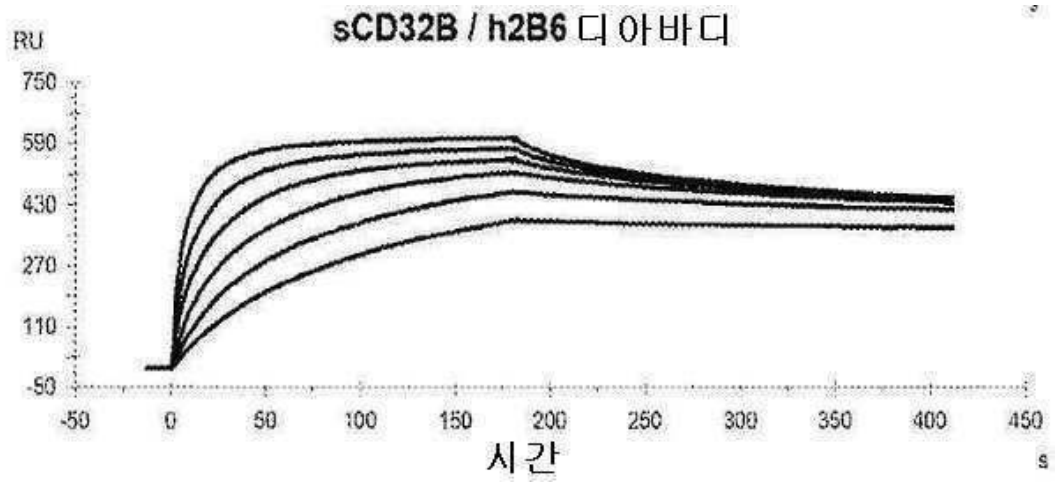
도면7b



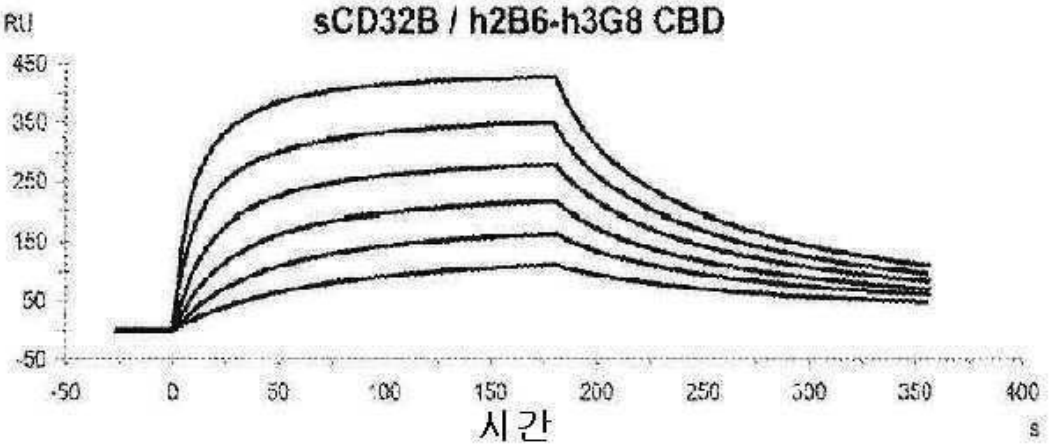
도면7c



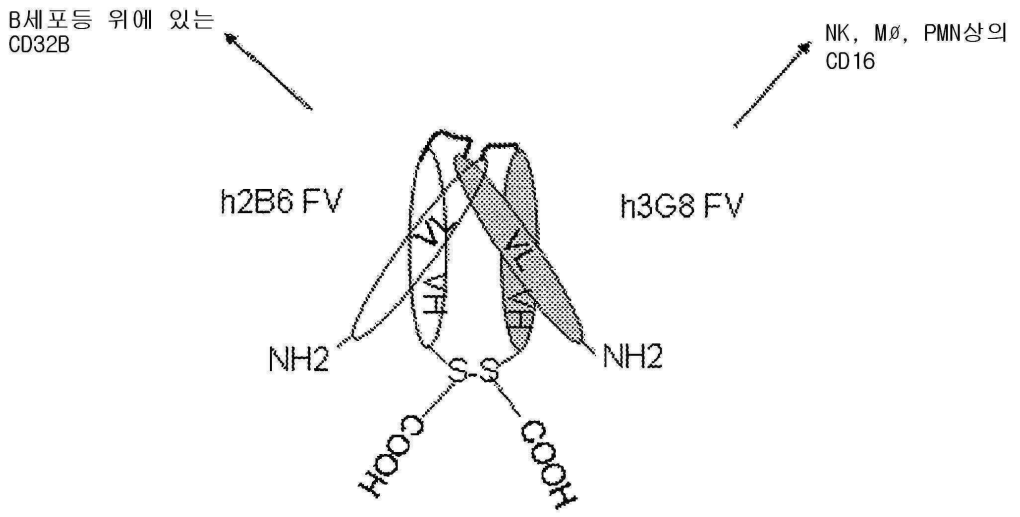
도면7d



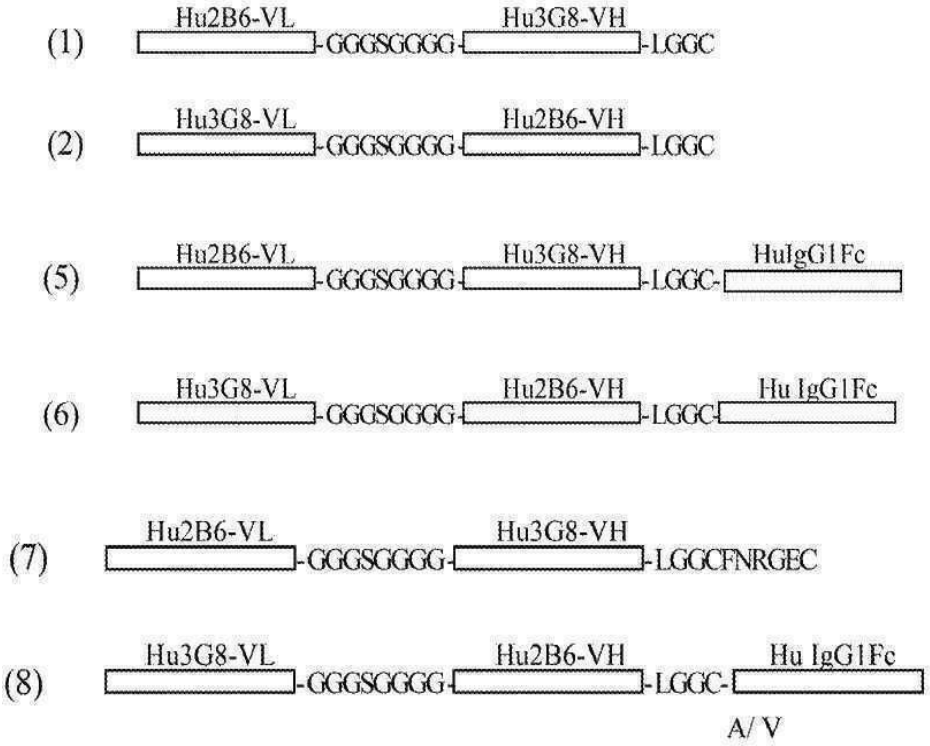
도면7e



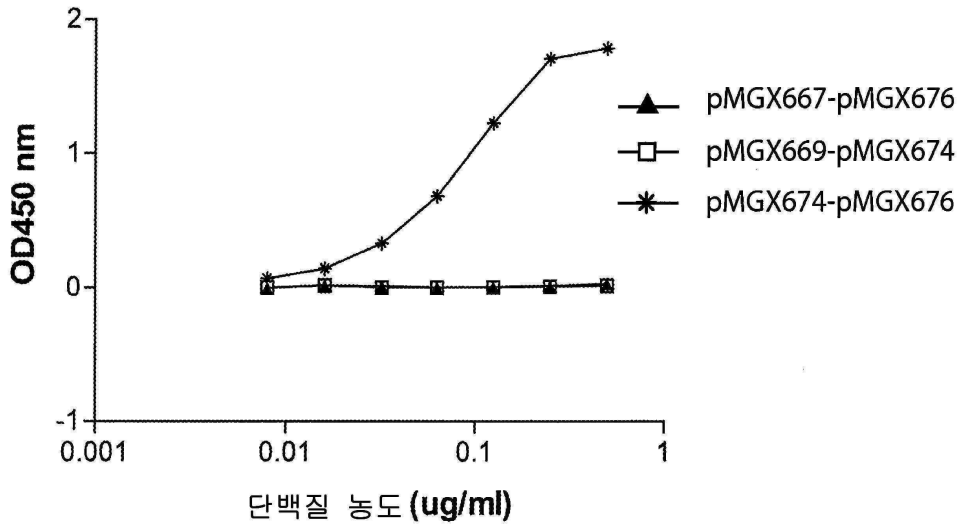
도면8



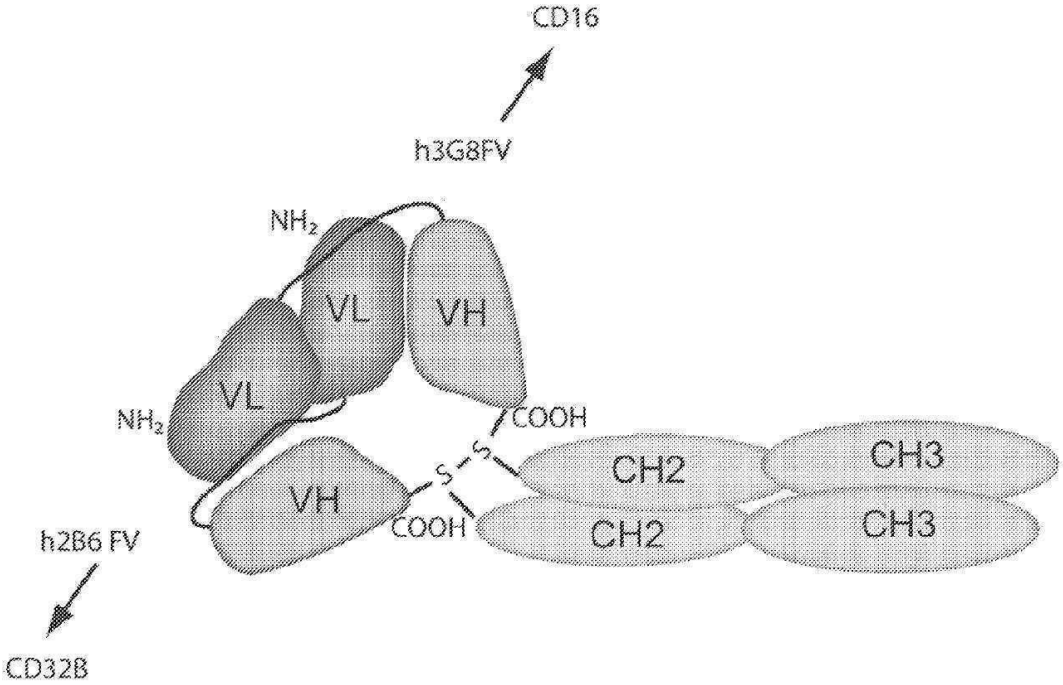
도면9


(1)
Hu2B6-VL
-GGGSGGGG-
Hu3G8-VH
-LGGC
(2)
Hu3G8-VL
-GGGSGGGG-
Hu2B6-VH
-LGGC
(5)
Hu2B6-VL
-GGGSGGGG-
Hu3G8-VH
-LGGC-
HuIgG1Fc
(6)
Hu3G8-VL
-GGGSGGGG-
Hu2B6-VH
-LGGC-
Hu IgG1Fc
(7)
Hu2B6-VL
-GGGSGGGG-
Hu3G8-VH
-LGGCFNRGEC
(8)
Hu3G8-VL
-GGGSGGGG-
Hu2B6-VH
-LGGC-
Hu IgG1Fc
A/ V

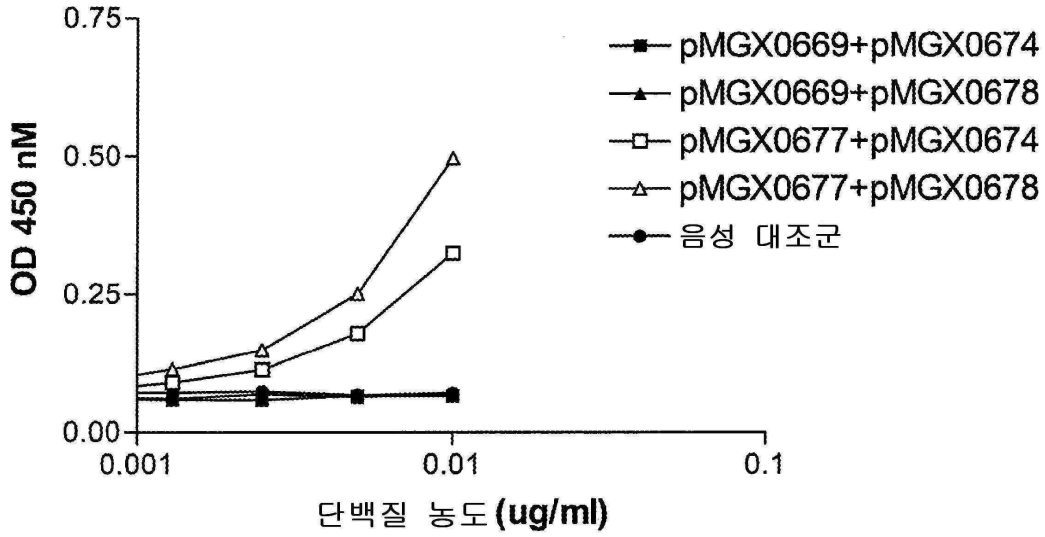
도면10


OD450 nm
2
1
0
-1
0.001
0.01
0.1
1
단백질 농도 (ug/ml)
pMGX667-pMGX676
pMGX669-pMGX674
pMGX674-pMGX676

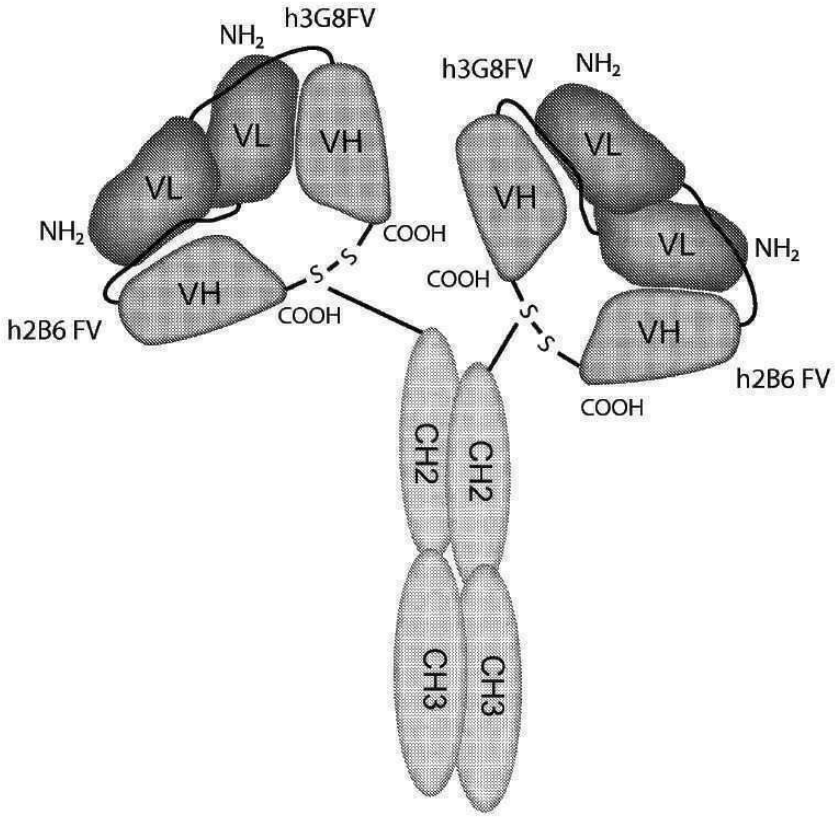
도면11


CD16
h3G8FV
NH2
VL
VH
VL
NH2
COOH
S-S
CH2
CH3
VH
COOH
CH2
CH3
h2B6 FV
CD32B

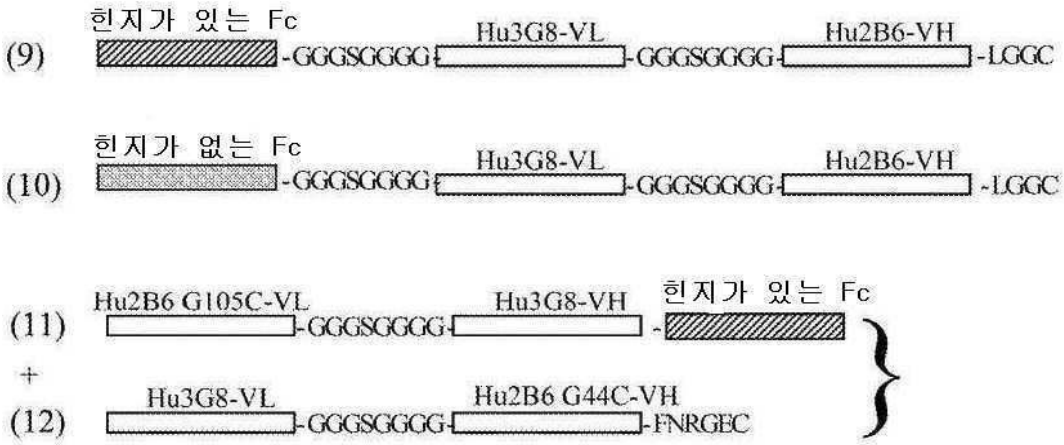
도면12


0.75
0.50
0.25
0.00
OD 450 nM
0.001
0.01
0.1
단백질 농도 (ug/ml)
pMGX0669+pMGX0674
pMGX0669+pMGX0678
pMGX0677+pMGX0674
pMGX0677+pMGX0678
음성 대조군

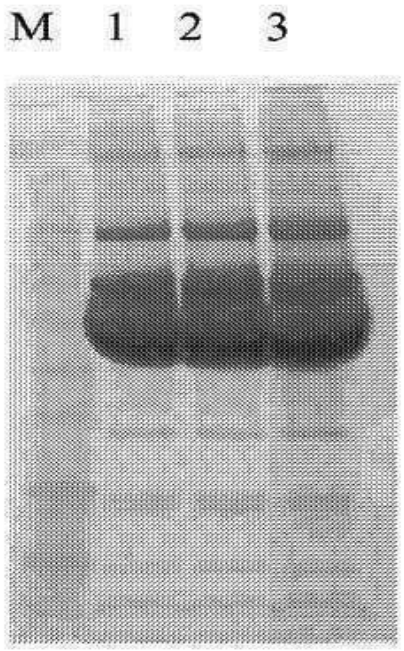
도면13


h3G8FV
NH2
VL
VH
COOH
h2B6 FV
CH2
CH3
S-S

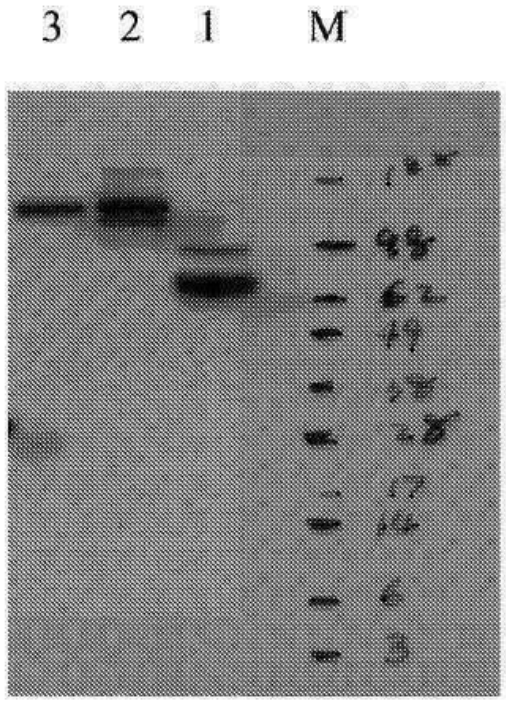
도면14


(9)
힌지가 있는 Fc
-GGGSGGGG-
Hu3G8-VL
Hu2B6-VH
-LGGC
(10)
힌지가 없는 Fc
(11)
Hu2B6 G105C-VL
Hu3G8-VH
+
(12)
Hu3G8-VL
Hu2B6 G44C-VH
-FNRGEC

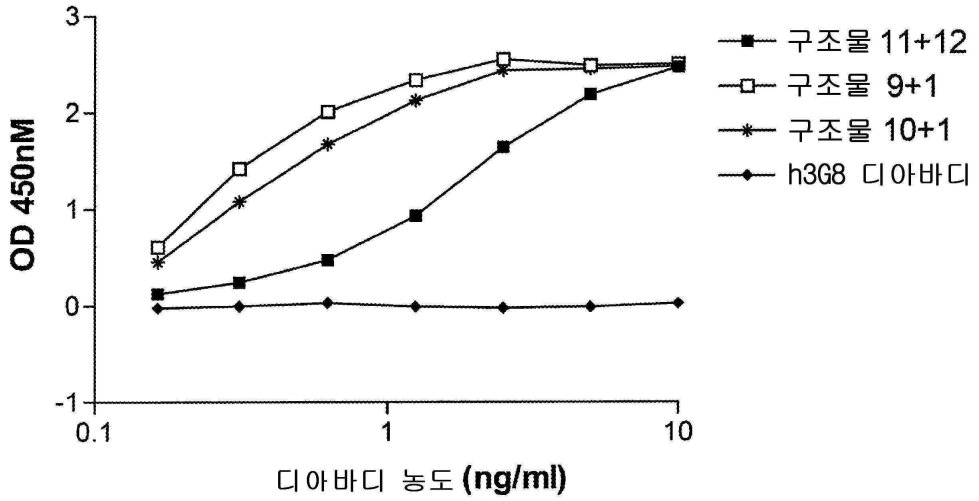
도면15a



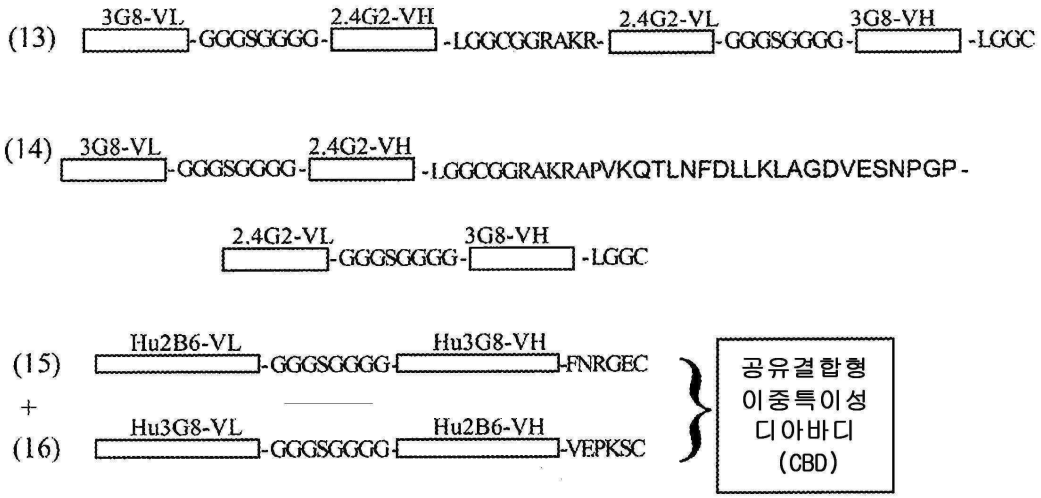
도면15b



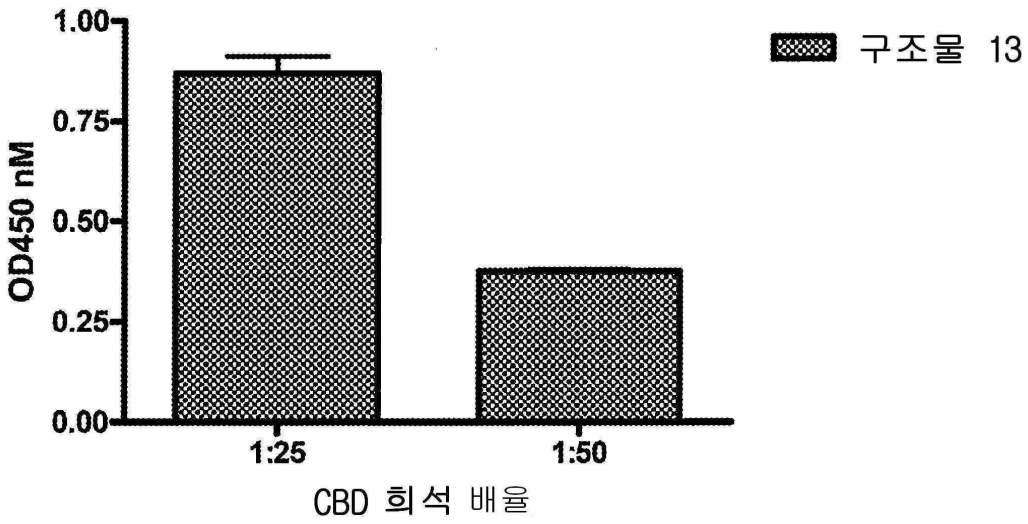
도면16



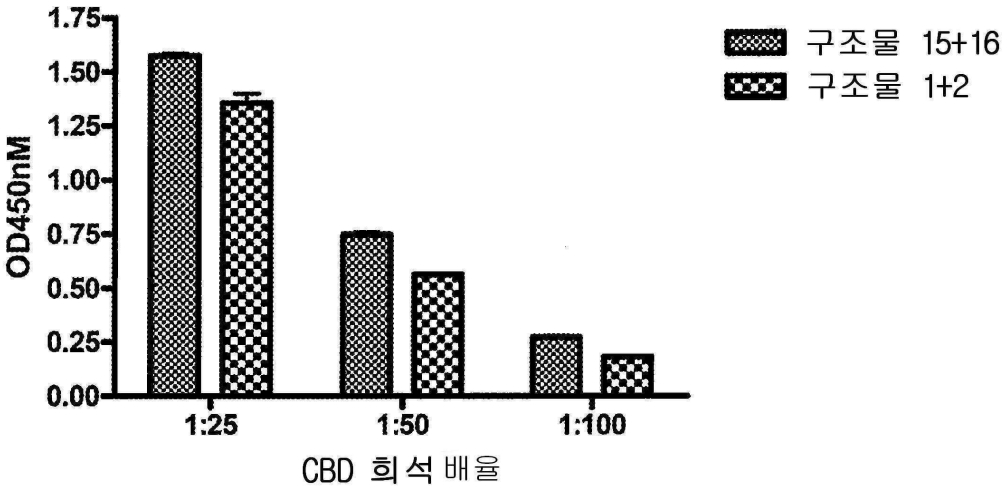
도면17



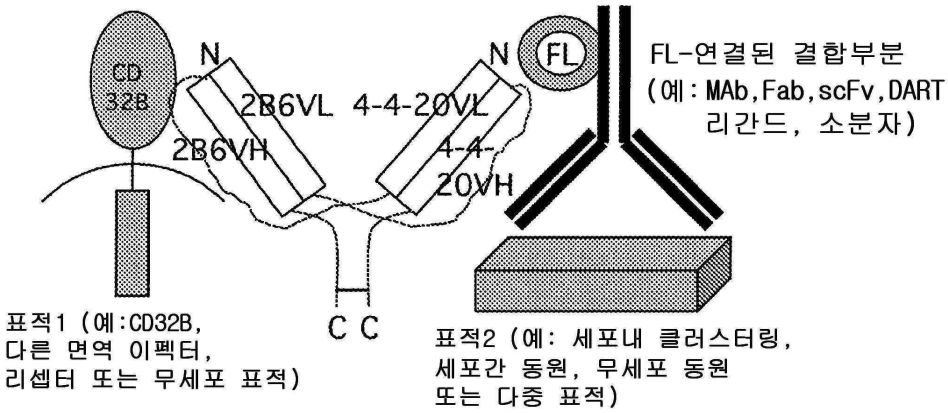
도면18



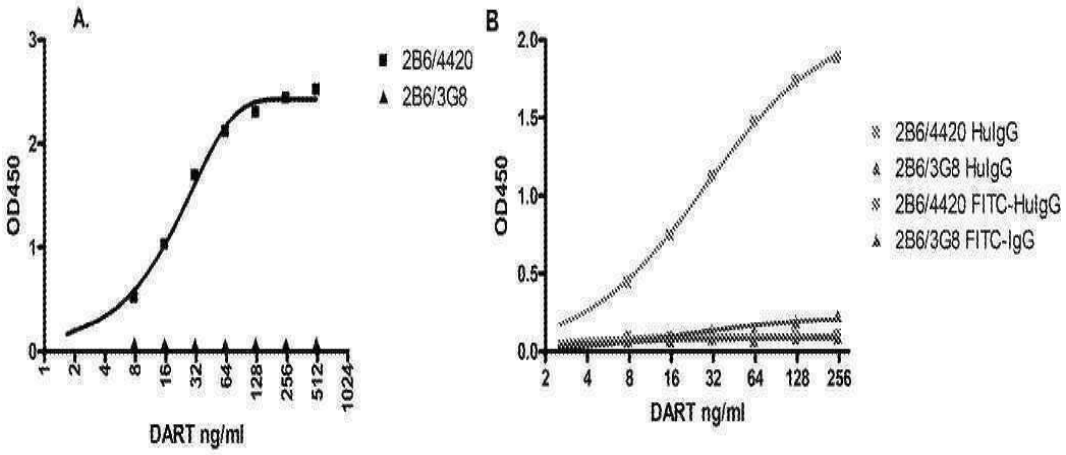
도면19



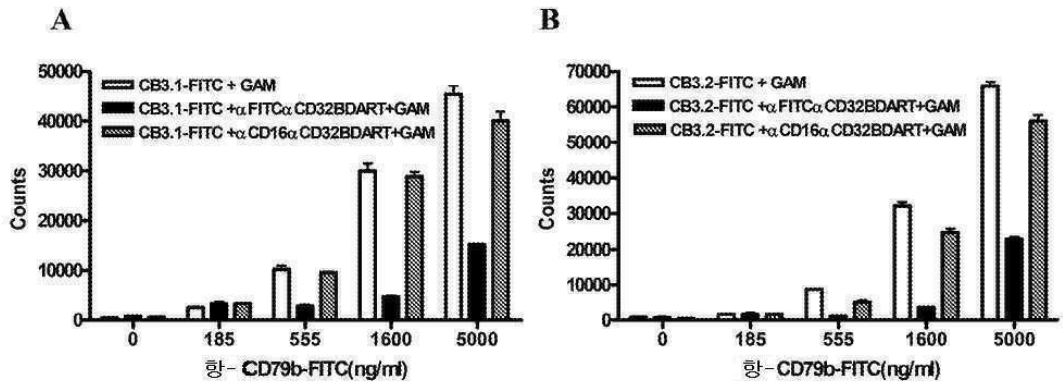
도면20



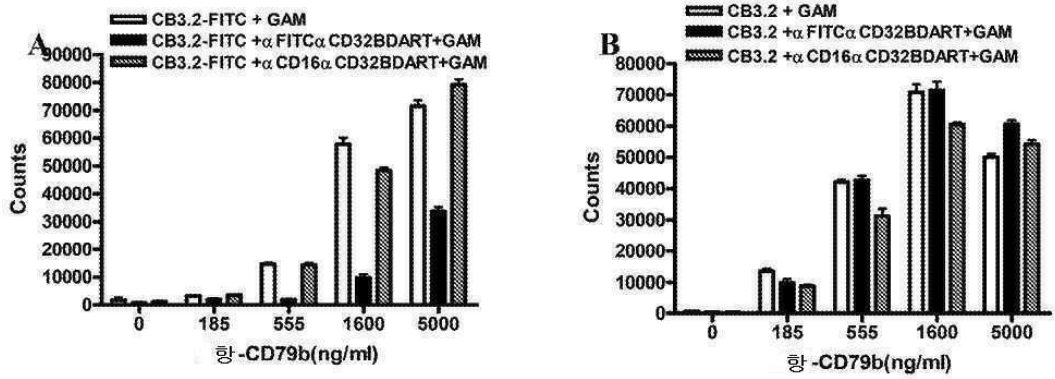
도면21



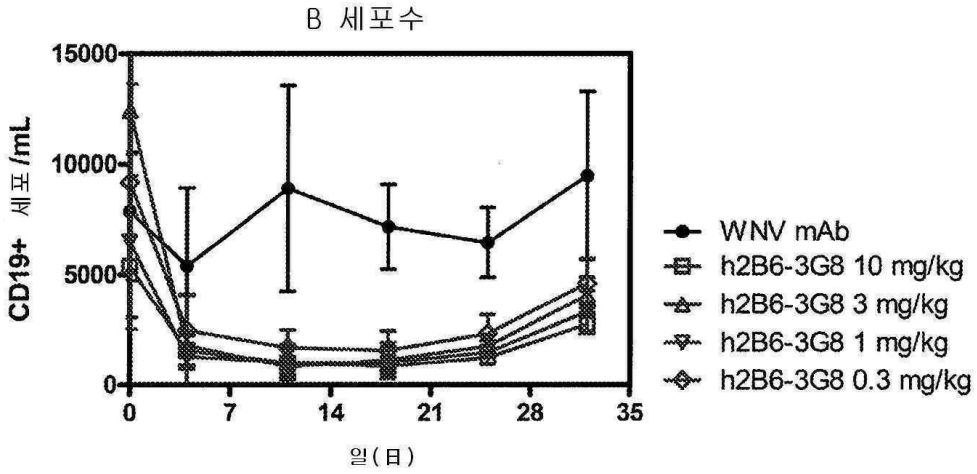
도면22

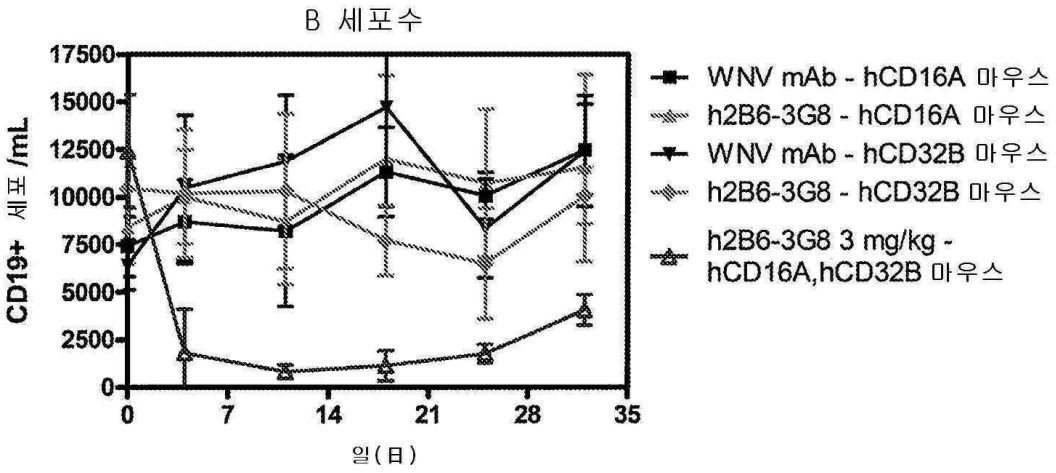

A
CB3.1-FITC + GAM
CB3.1-FITC +α FITCα CD32BDART+GAM
CB3.1-FITC +α CD16α CD32BDART+GAM
Counts
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
185
555
1600
5000
항- CD79b-FITC(ng/ml)
B
CB3.2-FITC + GAM
CB3.2-FITC +α FITCα CD32BDART+GAM
CB3.2-FITC +α CD16α CD32BDART+GAM
Counts
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
185
555
1600
5000
항-CD79b-FITC(ng/ml)

도면23

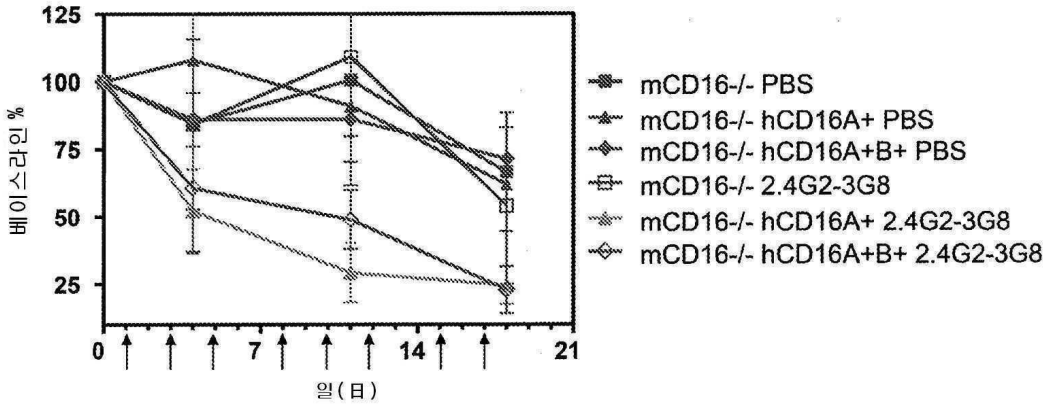

A
CB3.2-FITC + GAM
CB3.2-FITC +α FITCα CD32BDART+GAM
CB3.2-FITC +α CD16α CD32BDART+GAM
Counts
90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
185
555
1600
5000
항-CD79b(ng/ml)
B
CB3.2 + GAM
CB3.2 +α FITCα CD32BDART+GAM
CB3.2 +α CD16α CD32BDART+GAM
Counts
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
185
555
1600
5000
항-CD79b(ng/ml)

도면24

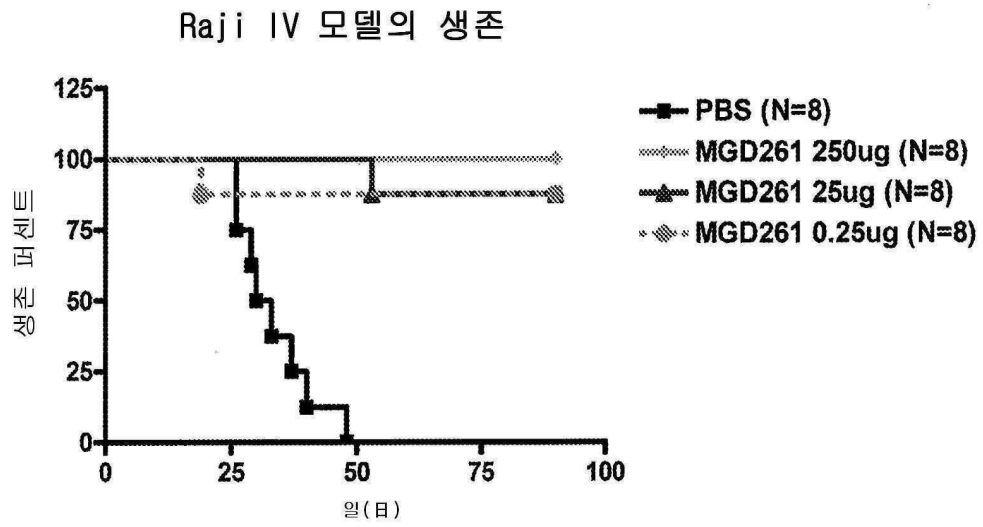

B 세포수
CD19+ 세포/mL
15000
10000
5000
0
0
7
14
21
28
35
일(日)
WNV mAb
h2B6-3G8 10 mg/kg
h2B6-3G8 3 mg/kg
h2B6-3G8 1 mg/kg
h2B6-3G8 0.3 mg/kg


B 세포수
CD19+ 세포/mL
17500
15000
12500
10000
7500
5000
2500
0
0
7
14
21
28
35
일(日)
WNV mAb - hCD16A 마우스
h2B6-3G8 - hCD16A 마우스
WNV mAb - hCD32B 마우스
h2B6-3G8 - hCD32B 마우스
h2B6-3G8 3 mg/kg - hCD16A,hCD32B 마우스

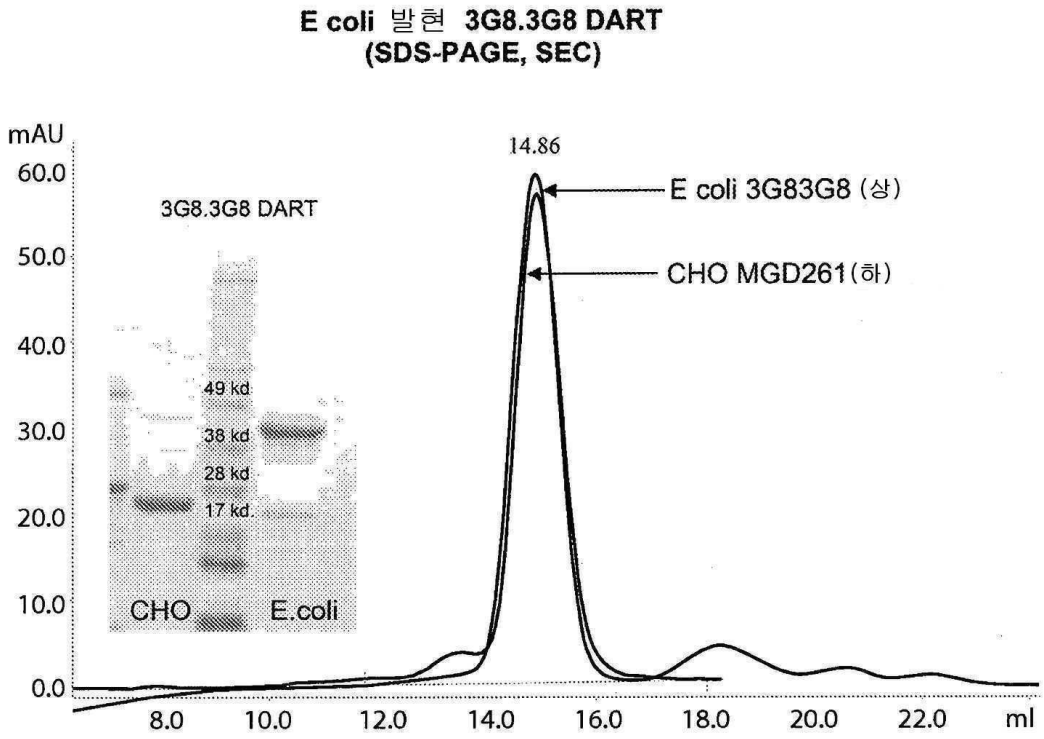
도면25


베이스라인 %
125
100
75
50
25
0
7
14
21
일(日)
mCD16-/- PBS
mCD16-/- hCD16A+ PBS
mCD16-/- hCD16A+B+ PBS
mCD16-/- 2.4G2-3G8
mCD16-/- hCD16A+ 2.4G2-3G8
mCD16-/- hCD16A+B+ 2.4G2-3G8

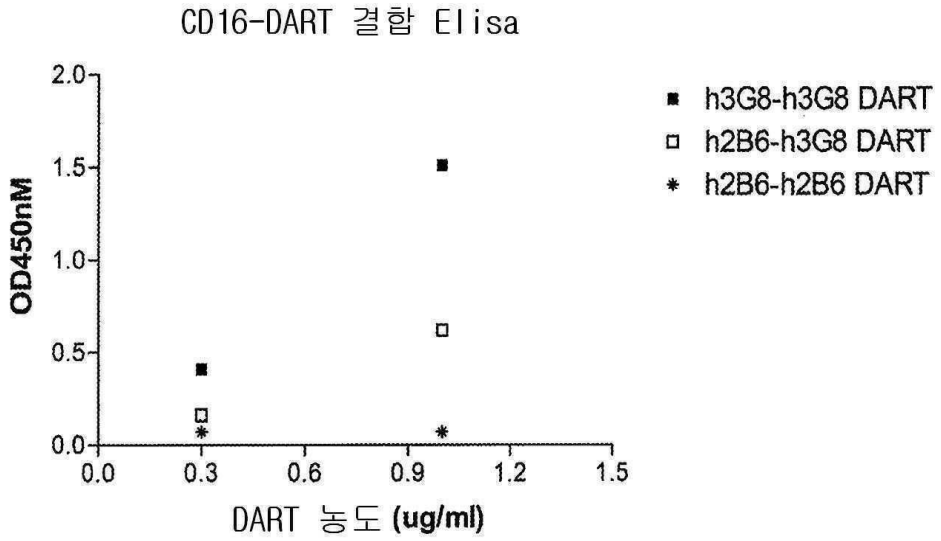
도면26


Raji IV 모델의 생존
125
100
75
50
25
0
생존 퍼센트
0
25
50
75
100
일(日)
PBS (N=8)
MGD261 250ug (N=8)
MGD261 25ug (N=8)
MGD261 0.25ug (N=8)

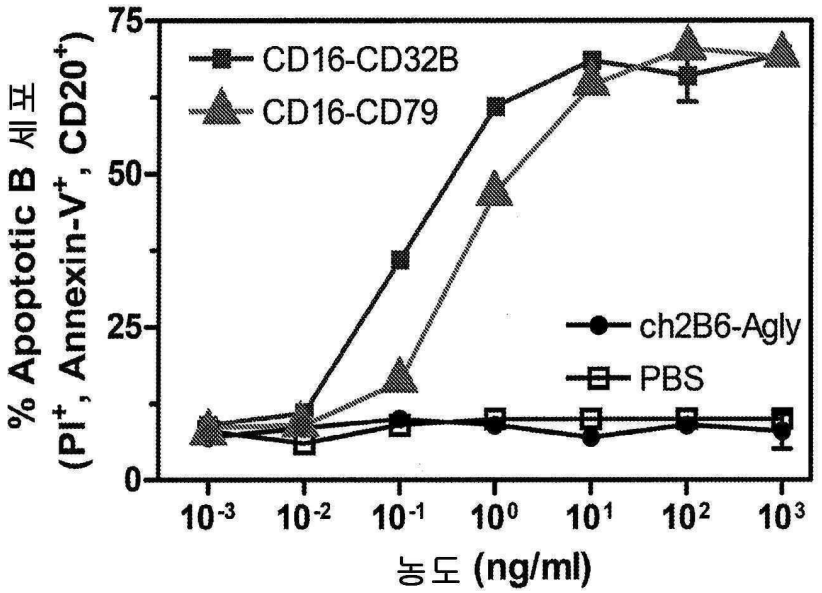
도면27


E coli 발현 3G8.3G8 DART
(SDS-PAGE, SEC)
mAU
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
3G8.3G8 DART
49 kd
38 kd
28 kd
17 kd
CHO
E.coli
14.86
E coli 3G83G8 (상)
CHO MGD261(하)
8.0
10.0
12.0
14.0
16.0
18.0
20.0
22.0
ml

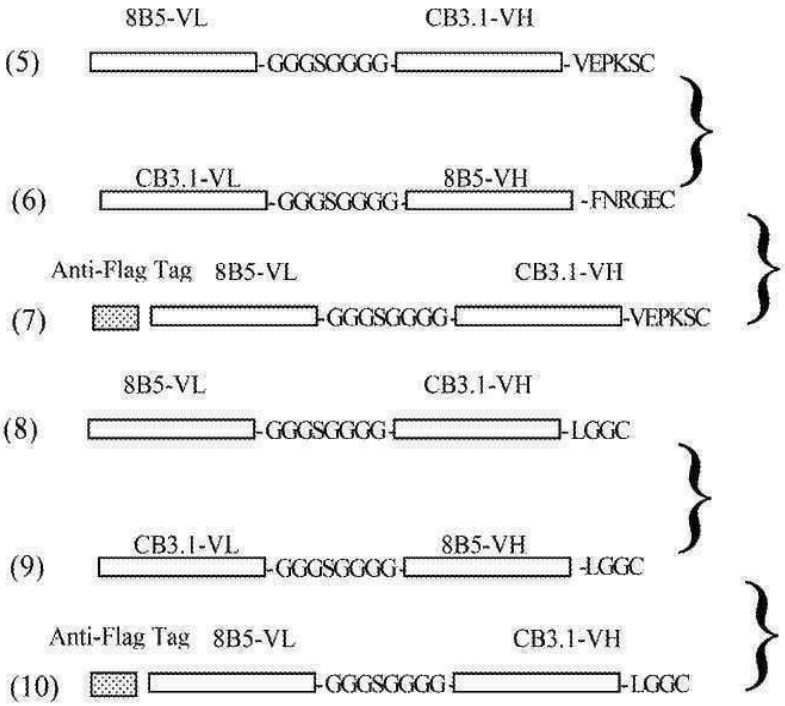
도면28


CD16-DART 결합 Elisa
OD450nM
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.0
0.3
0.6
0.9
1.2
1.5
DART 농도 (ug/ml)
h3G8-h3G8 DART
h2B6-h3G8 DART
h2B6-h2B6 DART

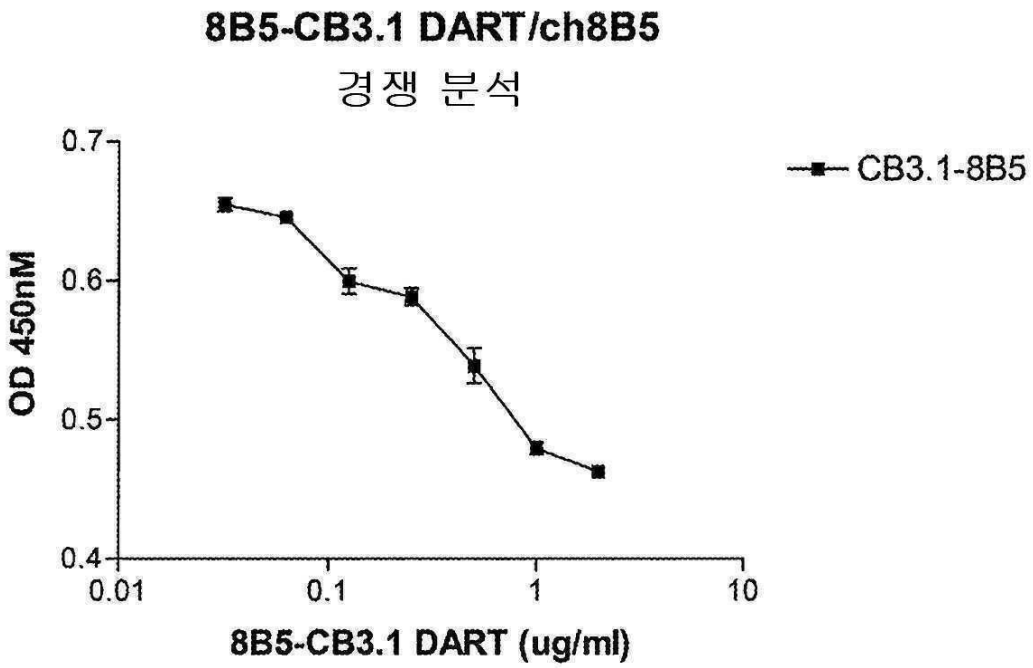
도면29


% Apoptotic B 세포
(PI+, Annexin-V+, CD20+)
75
50
25
0
CD16-CD32B
CD16-CD79
ch2B6-Agly
PBS
10-3
10-2
10-1
100
101
102
103
농도 (ng/ml)

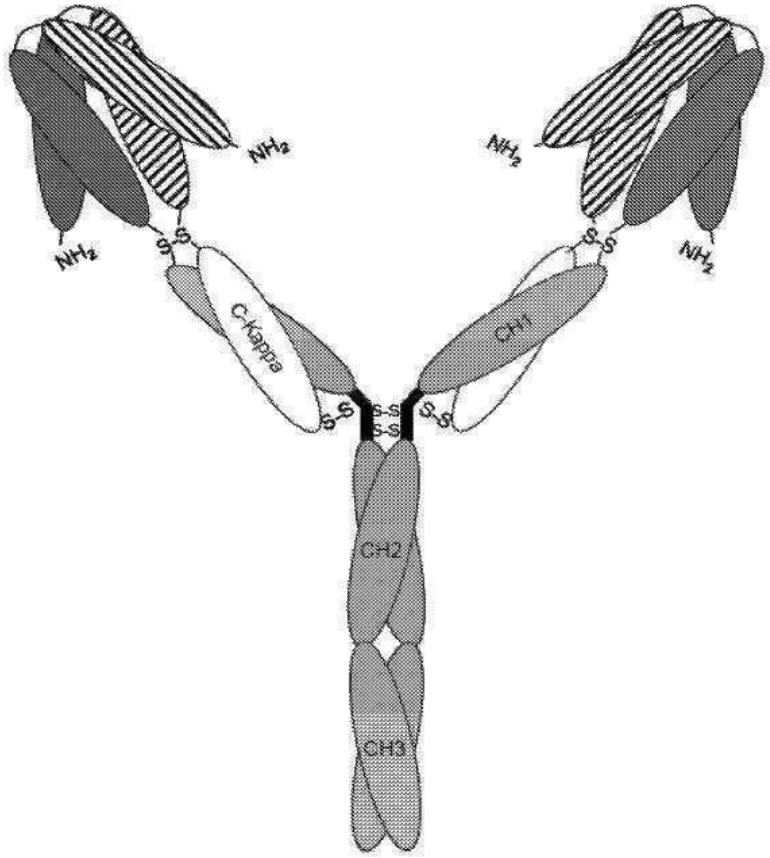
도면30


8B5-VL
CB3.1-VH
(5)
-GGGSGGGG-
-VEPKSC
CB3.1-VL
8B5-VH
(6)
-GGGSGGGG-
-FNRGEC
Anti-Flag Tag
8B5-VL
CB3.1-VH
(7)
-GGGSGGGG-
-VEPKSC
8B5-VL
CB3.1-VH
(8)
-GGGSGGGG-
-LGGC
CB3.1-VL
8B5-VH
(9)
-GGGSGGGG-
-LGGC
Anti-Flag Tag
8B5-VL
CB3.1-VH
(10)
-GGGSGGGG-
-LGGC

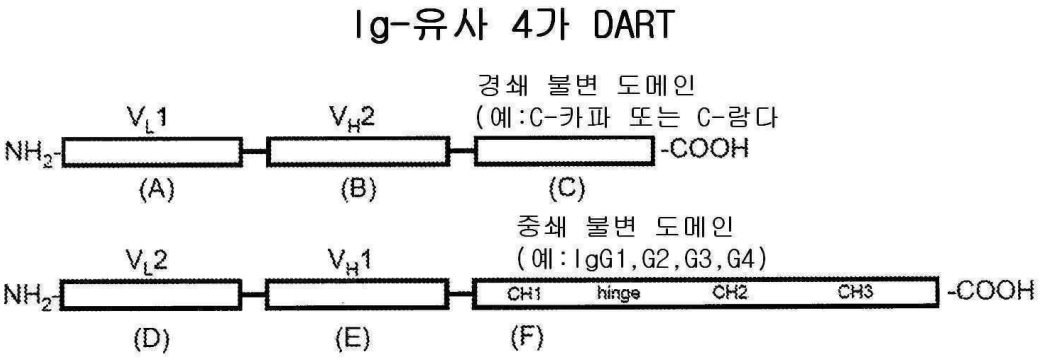
도면31


8B5-CB3.1 DART/ch8B5
경쟁 분석
CB3.1-8B5
OD 450nM
0.7
0.6
0.5
0.4
0.01
0.1
1
10
8B5-CB3.1 DART (ug/ml)

도면32

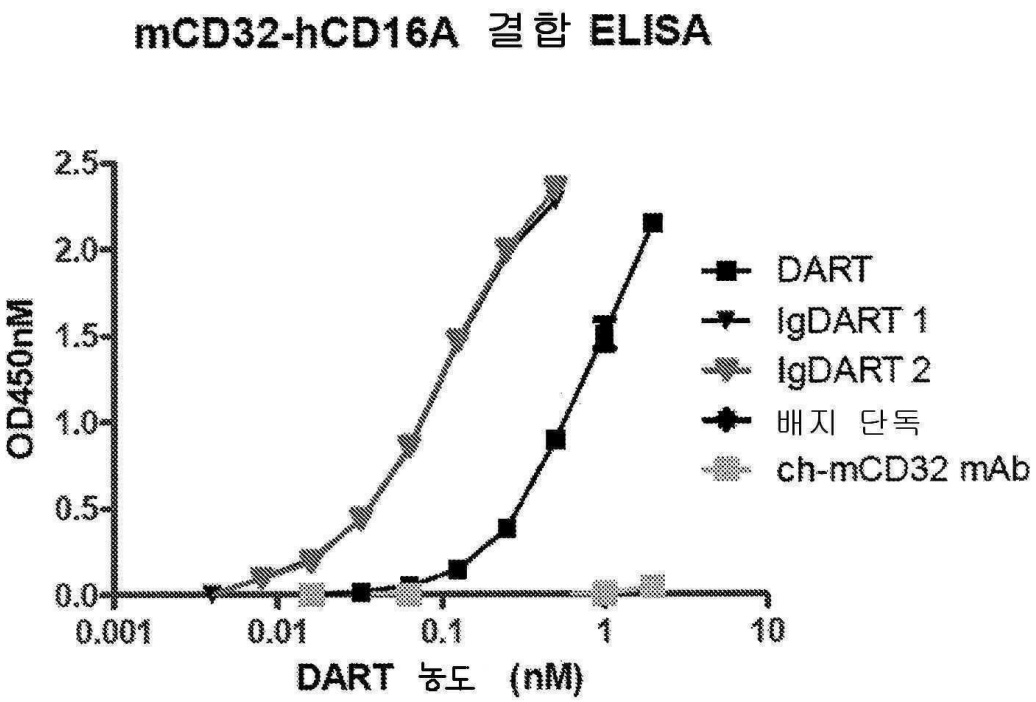


도면33

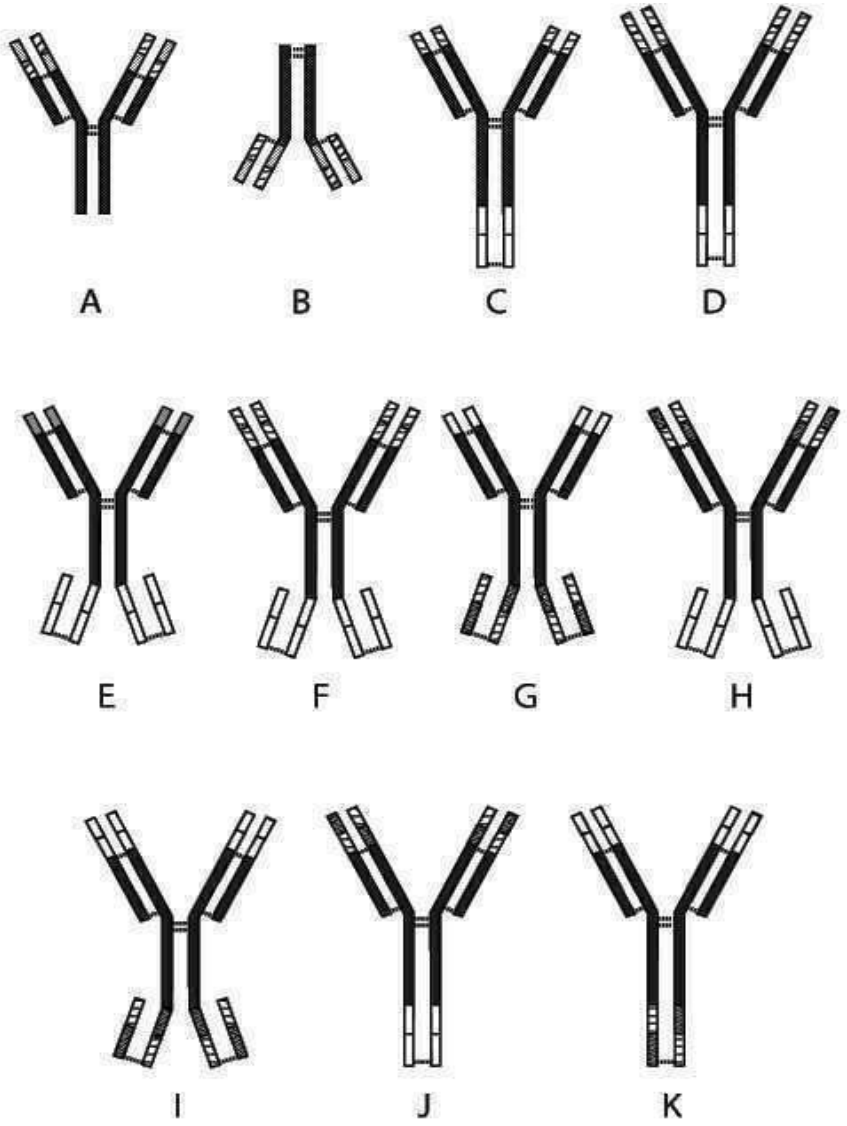


(A) + (E) = 에피토프 1 결합부위
(D) + (B) = 에피토프 2 결합부위
(C) + (F) = C-카파/람다+CH_1(전통적인Ig과 유사한 결합)
힌지-CH2-CH3는 Fc를 형성하도록 회합하게 됨

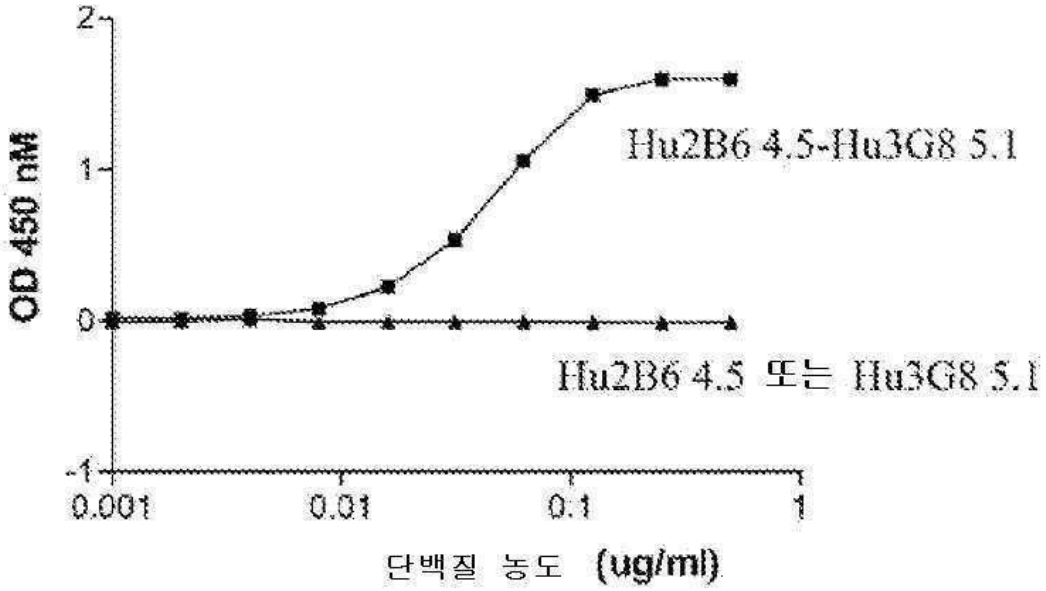
도면34


mCD32-hCD16A 결합 ELISA
OD450nM
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.001
0.01
0.1
1
10
DART 농도 (nM)
DART
IgDART 1
IgDART 2
배지 단독
ch-mCD32 mAb

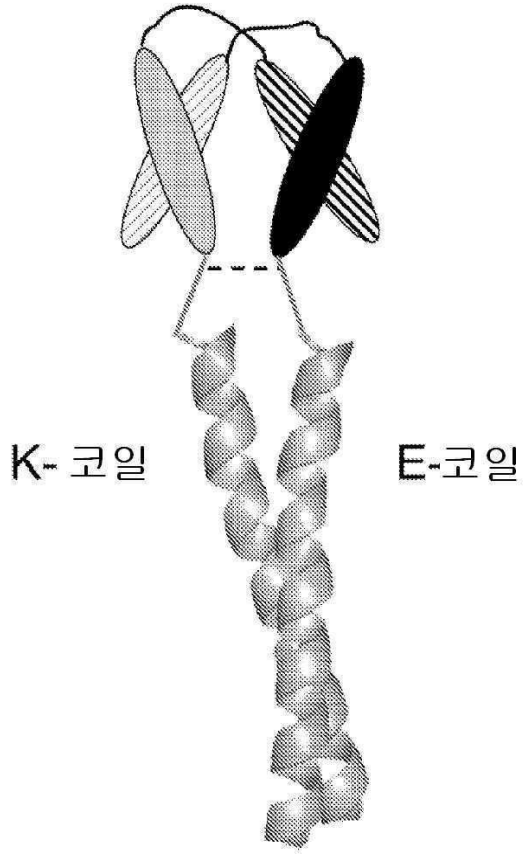
도면35



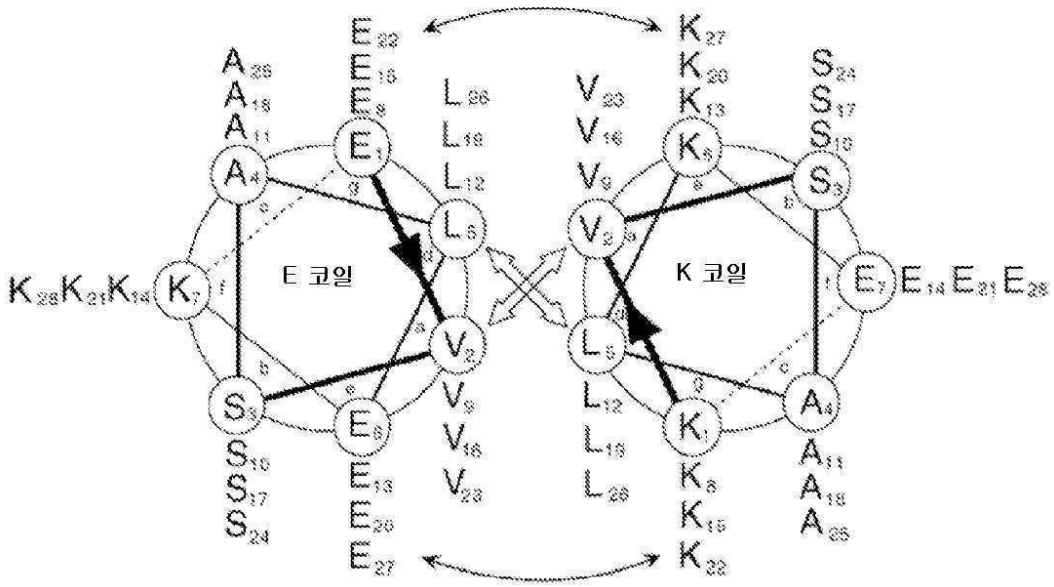
도면36


OD 450 nM
2
1
0
-1
0.001
0.01
0.1
1
Hu2B6 4.5-Hu3G8 5.1
Hu2B6 4.5 또는 Hu3G8 5.1
단백질 농도 (ug/ml)

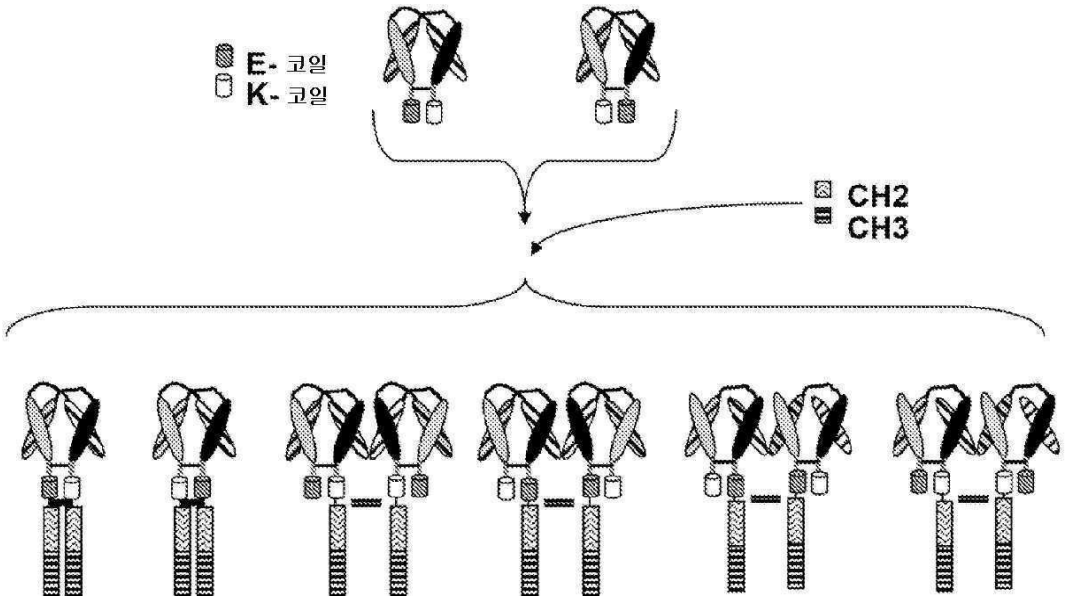
도면37


K- 코일
E-코일

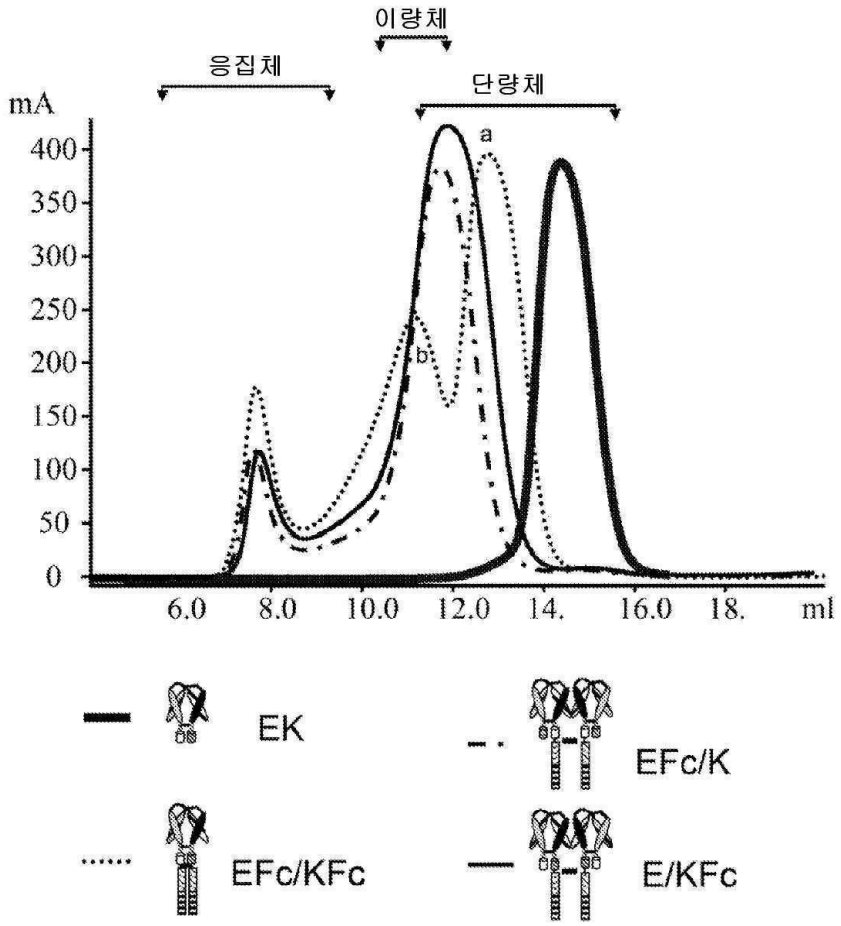
도면38



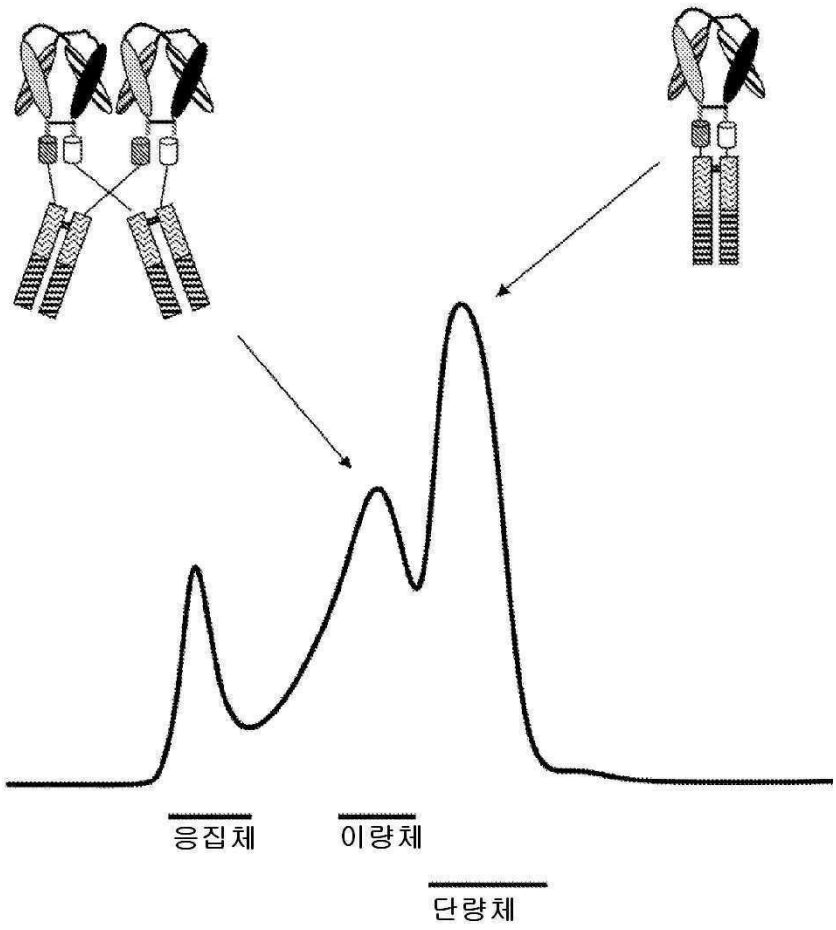
도면39



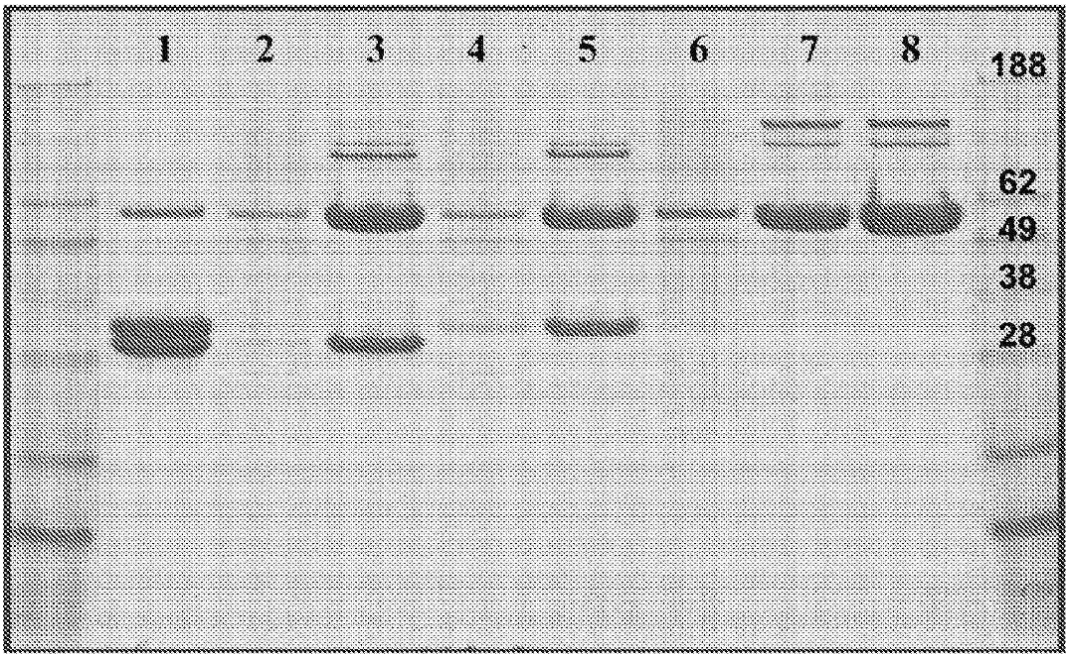
도면40


이량체
응집체
단량체
mA
400
350
300
250
200
150
100
50
0
a
b
6.0
8.0
10.0
12.0
14.
16.0
18.
ml
EK
EFc/K
EFc/KFc
E/KFc

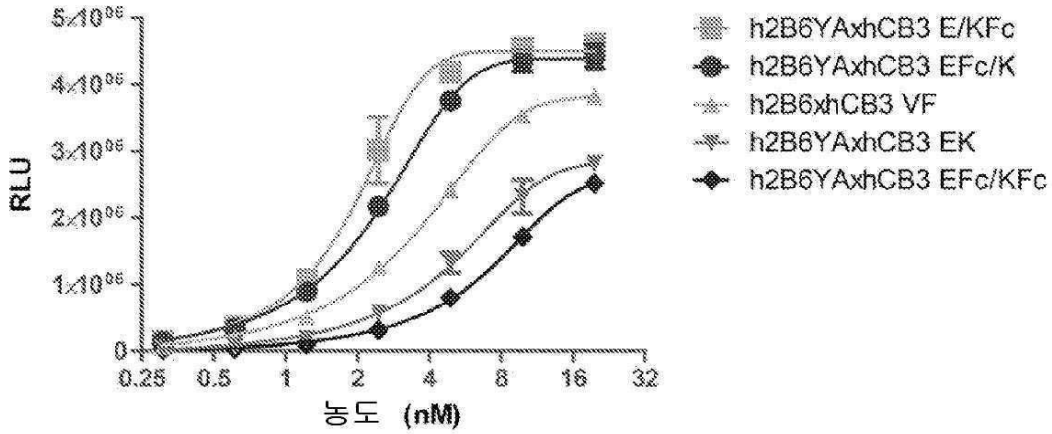
도면41



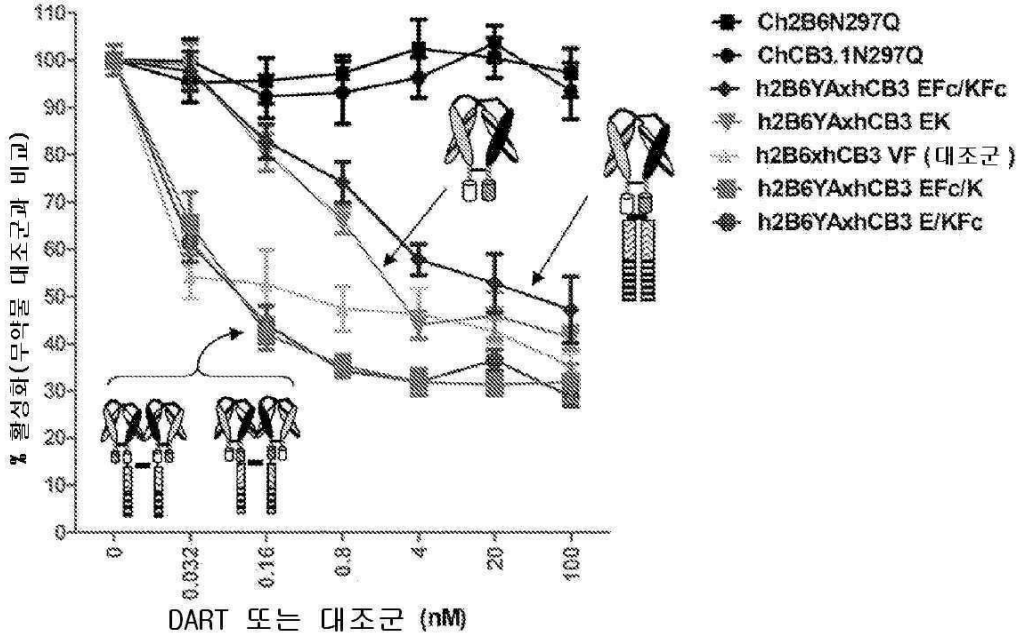
도면42



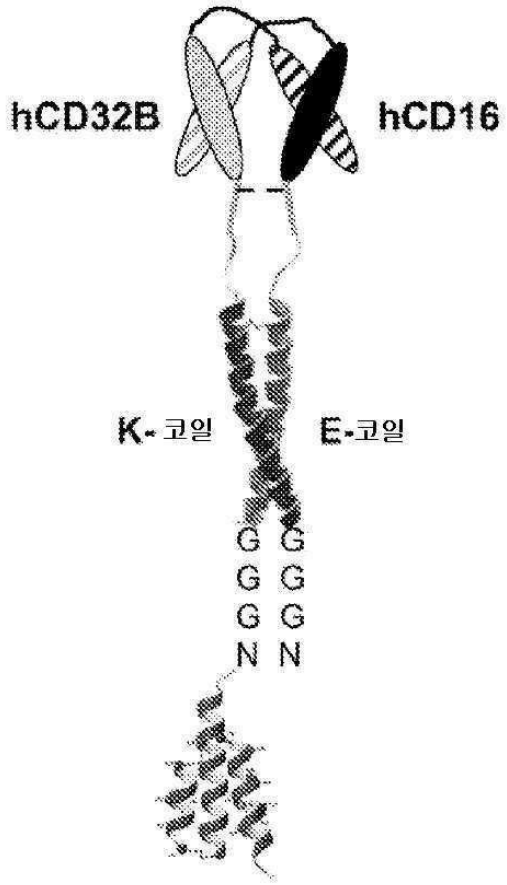
도면43


RLU
5x10^06
4x10^06
3x10^06
2x10^06
1x10^06
0
0.25
0.5
1
2
4
8
16
32
농도 (nM)
h2B6YAxhCB3 E/KFc
h2B6YAxhCB3 EFc/K
h2B6xhCB3 VF
h2B6YAxhCB3 EK
h2B6YAxhCB3 EFc/KFc

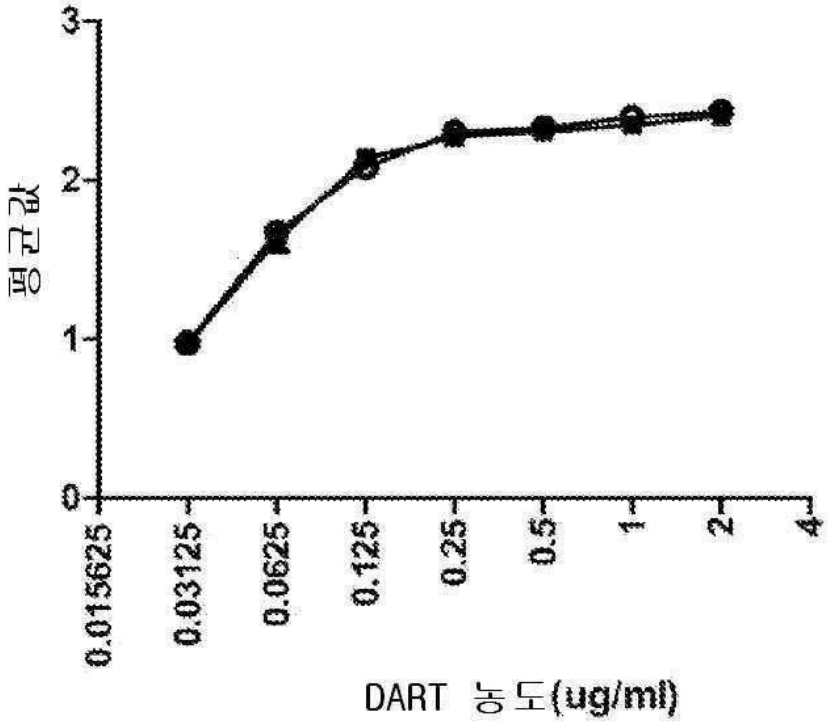
도면44


% 활성화(무약물 대조군과 비교)
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
0.032
0.16
0.8
4
20
100
DART 또는 대조군 (nM)
Ch2B6N297Q
ChCB3.1N297Q
h2B6YAxhCB3 EFc/KFc
h2B6YAxhCB3 EK
h2B6xhCB3 VF (대조군)
h2B6YAxhCB3 EFc/K
h2B6YAxhCB3 E/KFc

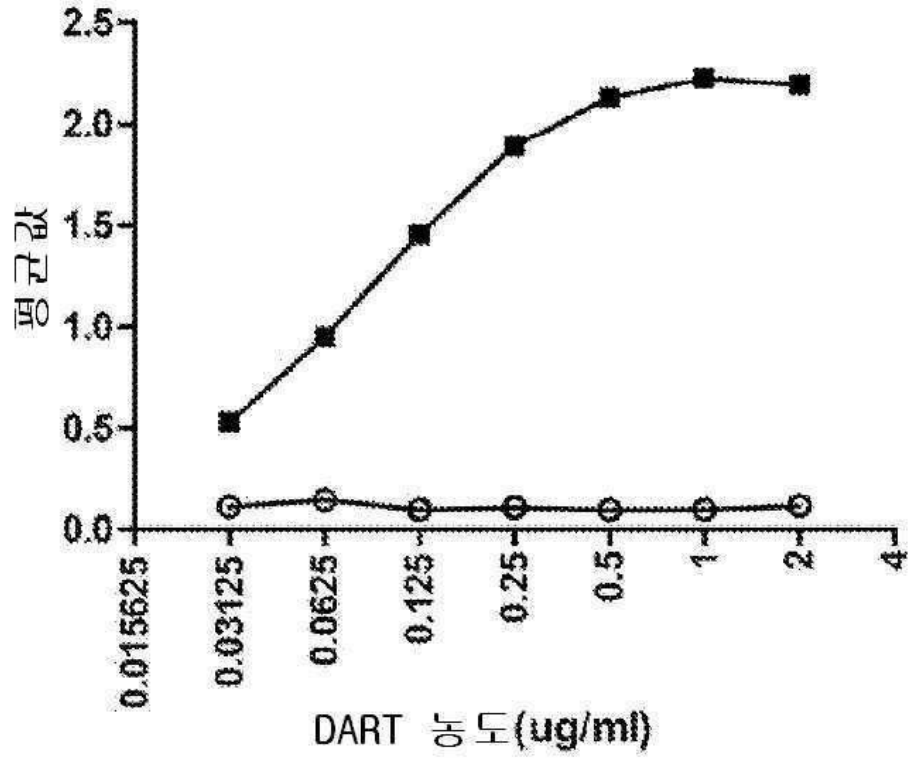
도면45


hCD32B
hCD16
K-코일
E-코일
G G
G G
G G
N N

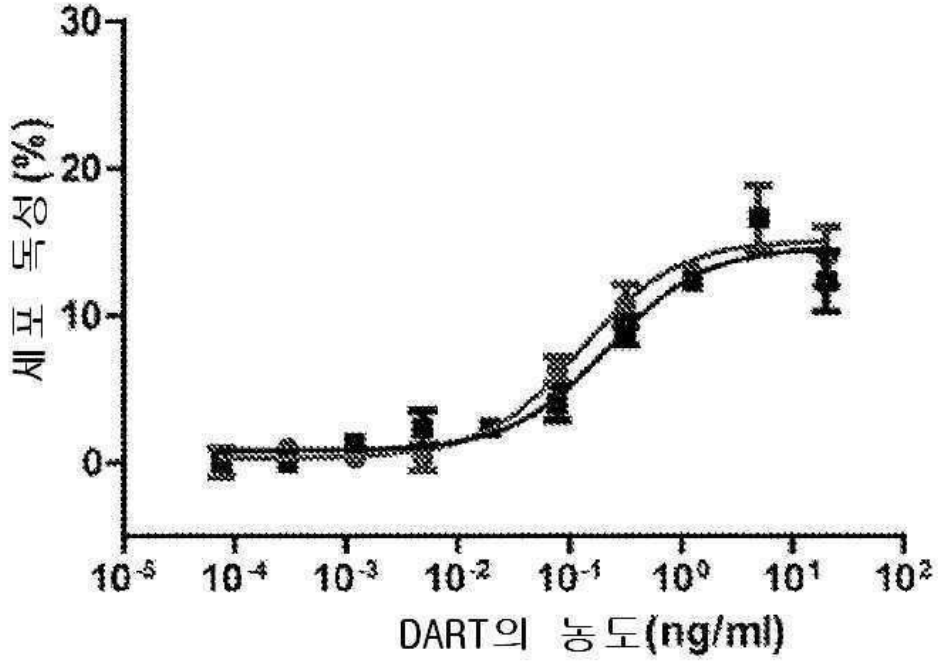
도면46a


3
2
1
0
평균값
0.015625
0.03125
0.0625
0.125
0.25
0.5
1
2
4
DART 농도(ug/ml)

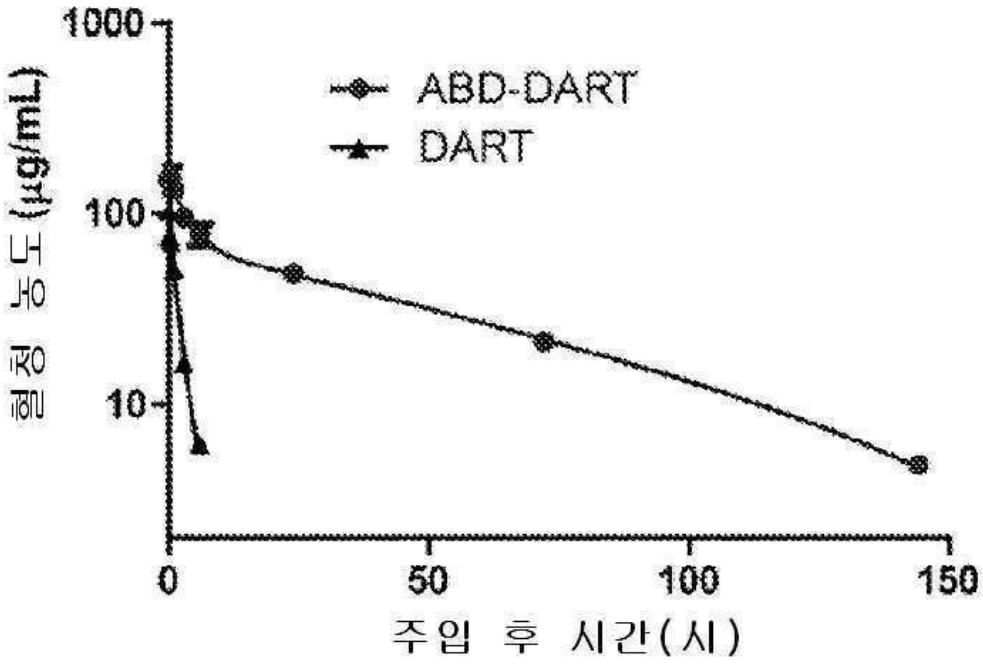
도면46b


2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
평균값
0.015625
0.03125
0.0625
0.125
0.25
0.5
1
2
4
DART 농도(ug/ml)

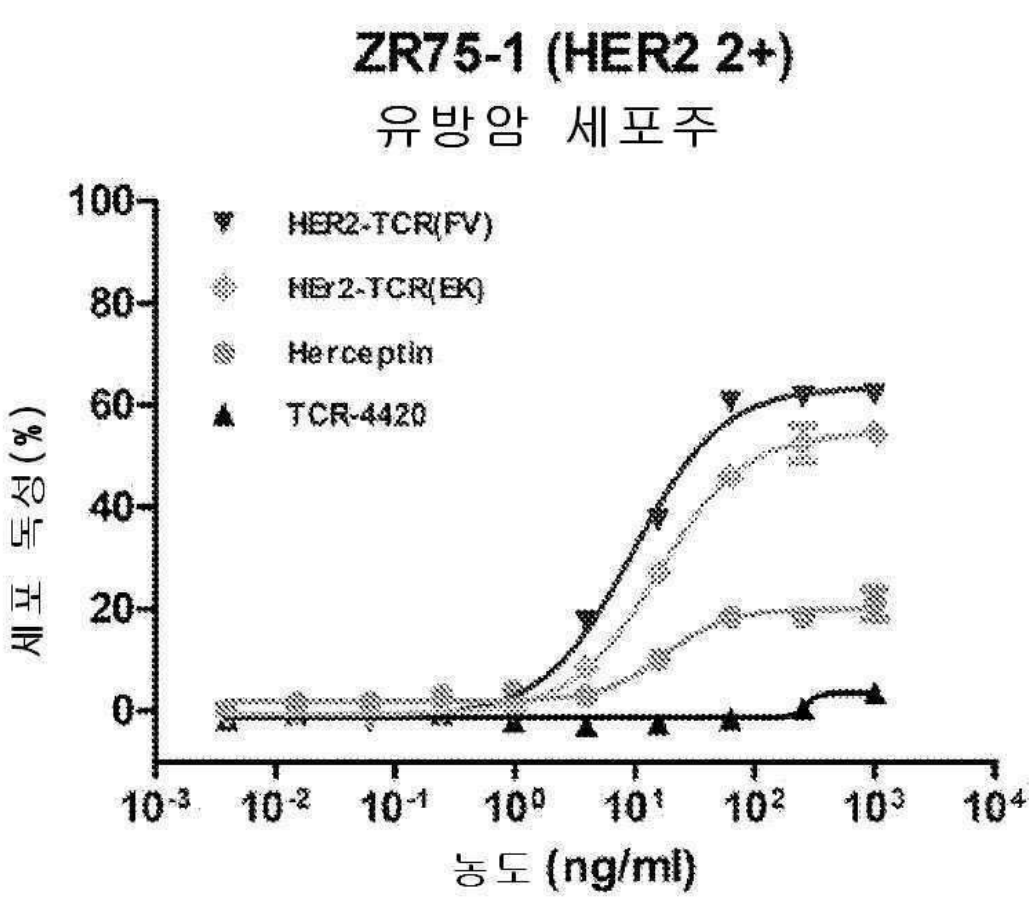
도면47


30
20
10
0
세포 독성 (%)
10-5
10-4
10-3
10-2
10-1
100
101
102
DART의 농도(ng/ml)

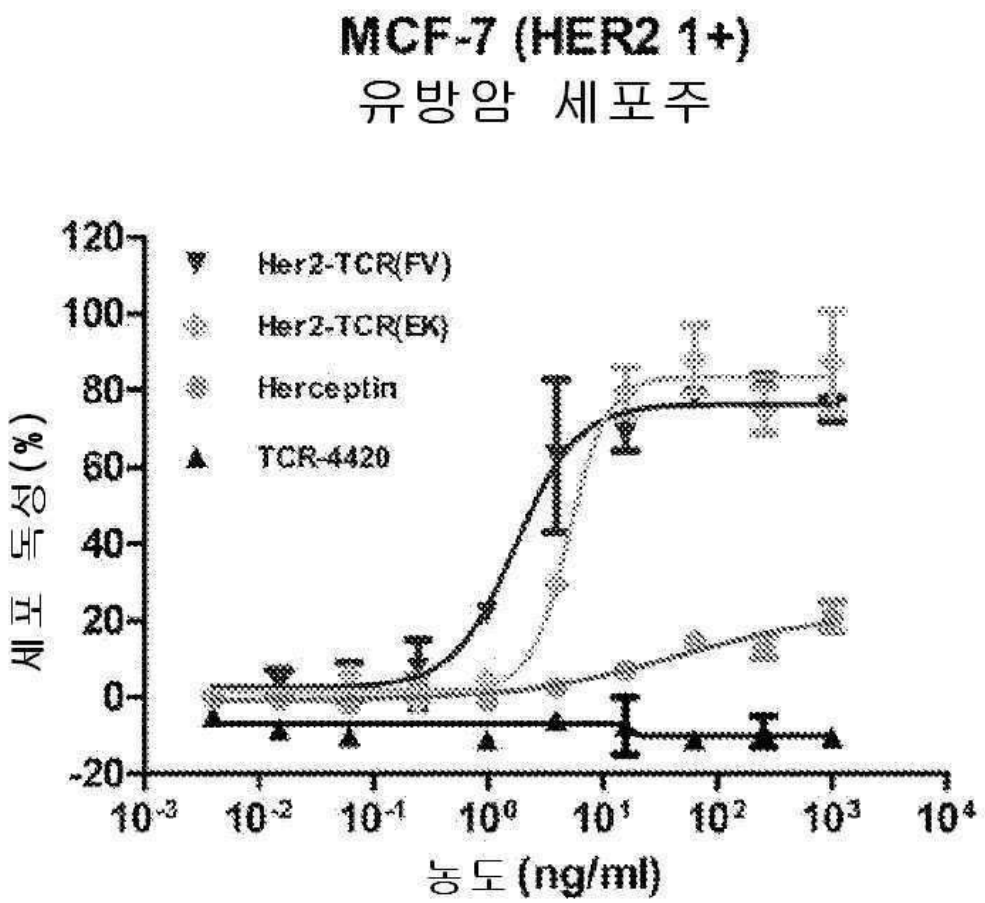
도면48


1000
100
10
혈청 농도 (μg/mL)
ABD-DART
DART
0
50
100
150
주입 후 시간(시)

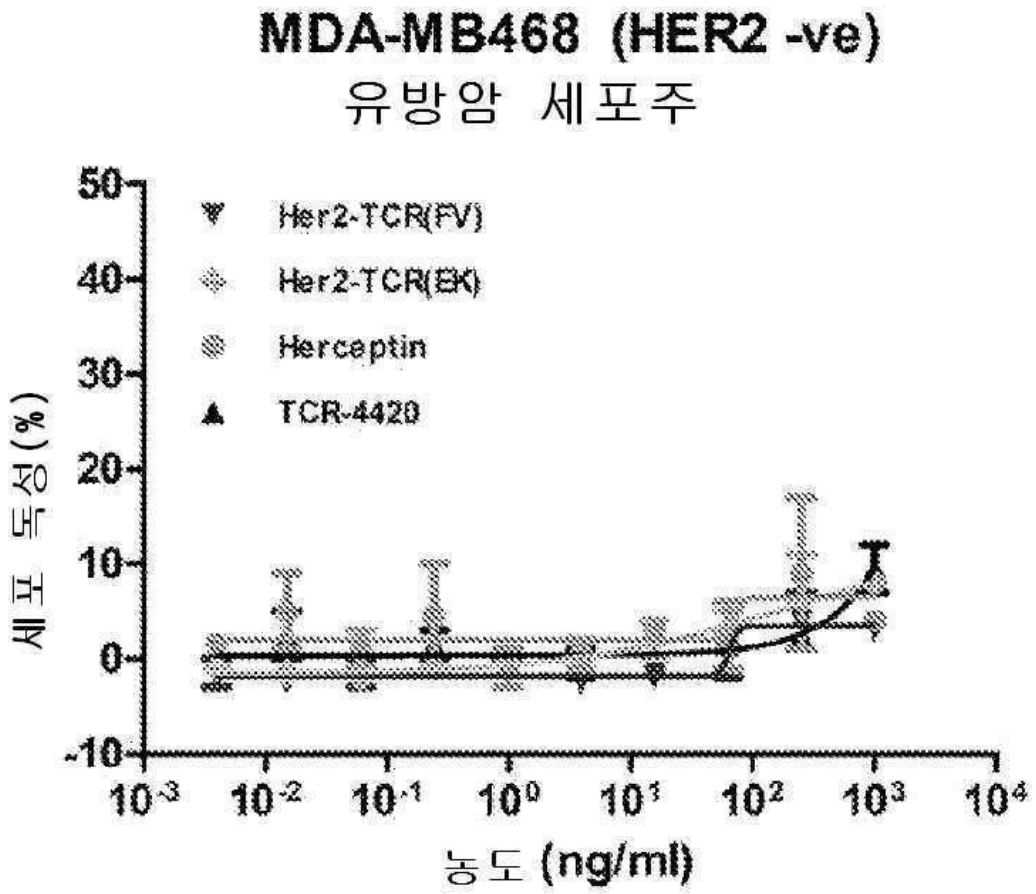
도면49a


ZR75-1 (HER2 2+)
유방암 세포주
100
80
60
40
20
0
세포 독성 (%)
HER2-TCR(FV)
HEr2-TCR(EK)
Herceptin
TCR-4420
10-3
10-2
10-1
100
101
102
103
104
농도 (ng/ml)

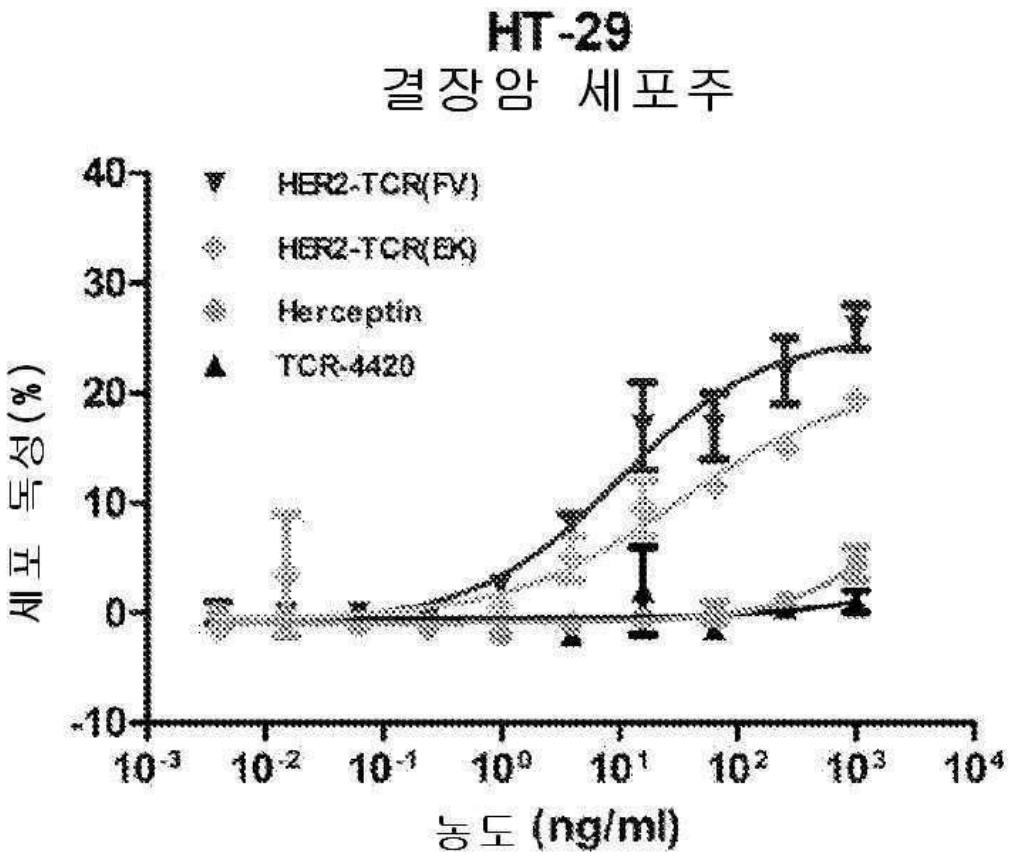
도면49b


MCF-7 (HER2 1+)
유방암 세포주
Her2-TCR(FV)
Her2-TCR(EK)
Herceptin
TCR-4420
세포 독성(%)
120
100
80
60
40
20
0
-20
10-3
10-2
10-1
100
101
102
103
104
농도 (ng/ml)

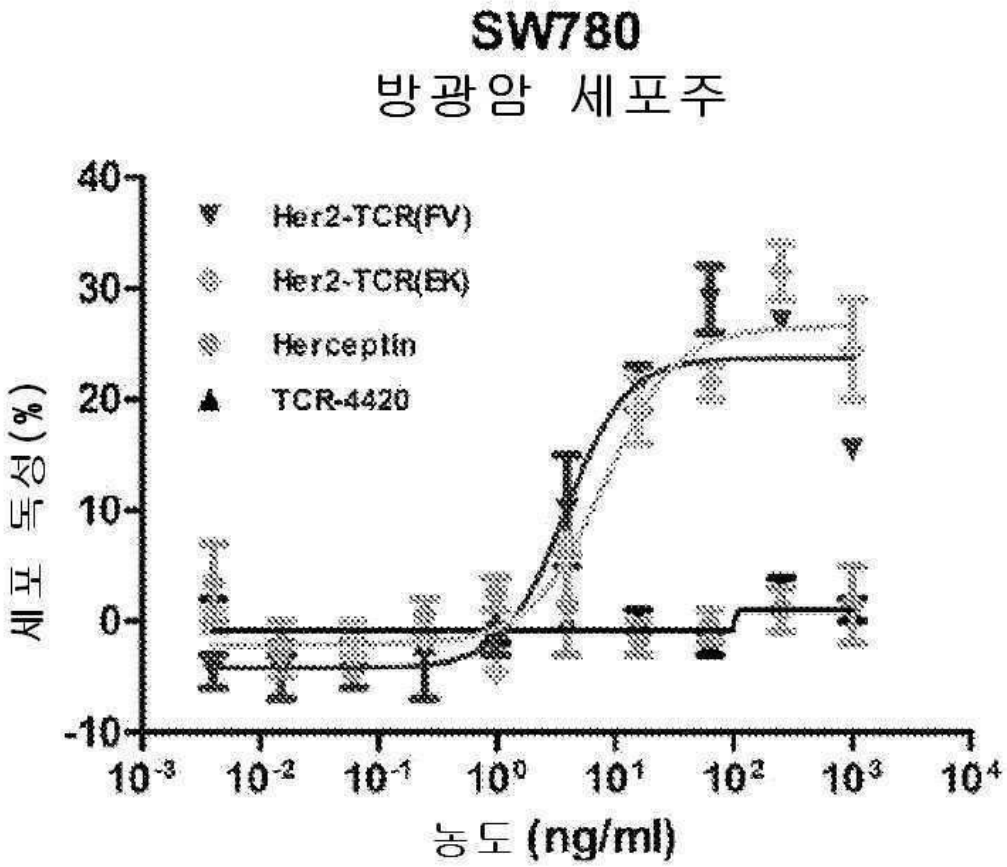
도면49c


MDA-MB468 (HER2 -ve)
유방암 세포주
Her2-TCR(FV)
Her2-TCR(EK)
Herceptin
TCR-4420
세포 독성(%)
50
40
30
20
10
0
-10
10-3
10-2
10-1
100
101
102
103
104
농도 (ng/ml)

도면49d


HT-29
결장암 세포주
HER2-TCR(FV)
HER2-TCR(EK)
Herceptin
TCR-4420
세포 독성(%)
40
30
20
10
0
-10
10-3
10-2
10-1
100
101
102
103
104
농도 (ng/ml)

도면49e



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> MacroGenics, Inc.

<120> Covalent Diabodies And Uses Thereof

<130> US11P0541

<150> US 60/671,657

<151> 2005-04-15

<150> US 11/409,339

<151> 2006-04-17

<150> PCT/US06/014481

<151> 2006-04-17

<150> US 60/945,523

<151> 2007-06-21

<150> US 61/019,051

<151> 2008-01-04

<150> US 12/138,867

<151> 2008-06-13

<150> PCT/US08/66957

<151> 2008-06-13

<150> US 61/139,352

<151> 2008-12-19

<150> US 61/156,035

<151> 2009-02-27

<150> US 61/256,779

<151> 2009-10-30

<160> 322

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 1

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro

1 5 10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 2

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro

1 5 10

<210> 3

<211> 60

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 3

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys

1 5 10 15

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro

20 25 30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu

35 40 45

Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg

50 55 60

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 4

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser

1 5 10

<210> 5

<211> 217

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

180 185 190

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

195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

210 215

<210> 6

<211> 216

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

145 150 155 160
Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
165 170 175
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
180 185 190
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
195 200 205
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 7
<211> 217
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 7
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
35 40 45
Val Asp Gly Val Gln Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Gln

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile

180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln

195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

210 215

<210> 8

<211> 217

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 8

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

210 215

<210> 9

<211> 237

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 9

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn

20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala

65 70 75 80

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

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

180 185 190
Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
195 200 205
Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
210 215 220
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225 230 235

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 10
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 11
<211> 244
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 11

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

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

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

180 185 190
Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp
195 200 205
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr
210 215 220
Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240
Leu Gly Gly Cys

<210> 12

<211> 240
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 12

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

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

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

180 185 190
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
195 200 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp
210 215 220
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225 230 235 240

<210> 13
<211> 241
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 13
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30
Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

180 185 190

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

<210> 14
<211> 470
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 14
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys

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

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

130 135 140

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys

145 150 155 160

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr

165 170 175

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys

180 185 190

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala

195 200 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly

210 215 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys Val Glu Pro

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

465 470

<210> 15

<211> 477

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 15

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp

20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

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

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

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

355 360 365

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser

370 375 380

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

385 390 395 400

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

405 410 415

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly

420 425 430

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

435 440 445

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

450 455 460

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

465 470 475

<210> 16

<211> 243

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 16

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn

20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110
Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys
115 120 125

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

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

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> linker plus C-terminus of human IgG-kappa chain

<400> 17
Leu Gly Gly Cys Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5 10
<210> 18
<211> 477
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 18

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
165 170 175

Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
180 185 190

Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr
210 215 220

Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

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

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

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

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
435 440 445
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
450 455 460
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470 475
<210> 19
<211> 485

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 19

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

195 200 205

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

210 215 220

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

225 230 235 240

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

245 250 255

Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe

260 265 270

Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro

275 280 285

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala

385 390 395 400

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

405 410 415

Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val

420 425 430

Val Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser

435 440 445

Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr

450 455 460

Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

465 470 475 480

Ser Leu Gly Gly Cys

485

<210> 20

<211> 469

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 20

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

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

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

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

405 410 415
Val Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser
420 425 430
Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr

435 440 445

Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

450 455 460

Ser Leu Gly Gly Cys

465

<210

> 21

<211> 466

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 21

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn

20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys

145 150 155 160

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr

165 170 175

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys

180 185 190

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala

195 200 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly

210 215 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

225 230 235 240

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

245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

275 280 285

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

290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

435 440 445

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

450 455 460

Gly Lys

465

<210> 22

<211> 246

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 22

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp

20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro

145 150 155 160

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

Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
245

<210> 23
<211> 6
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 23
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5
<210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> 2B6 heavy chain variable region CDR1
<400> 24
Asn Tyr Trp Ile His
1 5
<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213
> artificial

<220><223> 3H7 Heavy chain variable region CDR1

<400> 25

Asp Ala Trp Met Asp

1 5

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> 2B6 Heavy chain variable region CDR2

<400> 26

Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 27

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3H7 Heavy chain variable region CDR2

<400>

27

Glu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Asn Leu Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> 2B6 Heavy chain variable region CDR3

<400> 28

Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 29

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> 3H7 heavy chain variable region CDR3

<400> 29

Tyr Ser Pro Phe Ala Tyr

1 5

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> 2B6 Light chain variable region CDR1

<400> 30

Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His

1 5 10

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> 3H7 light chain variable region CDR1

<400> 31

Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Ser

1 5 10

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial

<220

><223> 2B6 light chain variable region CDR2

<400> 32

Asn Val Ser Glu Ser Ile Ser

1 5

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> 2B6 light chain variable region CDR2

<400> 33

Tyr Val Ser Glu Ser Ile Ser

1 5

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> 2B6 light chain variable region CDR2

<400> 34

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser

1 5

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> 3H7 light chain variable region CDR2

<400> 35

Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> 2B6 Light chain variable region CDR3

<400> 36

Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe Thr

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> 3H7 light chain variable region CDR3

<400> 37

Leu Gln Tyr Val Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 38

<211> 121

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> 2B6 heavy chain variable region

<400> 38

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 Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 39

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> 2B6 light chain variable region Hu2B6VL-1

<400> 39

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn

20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Lys Asn Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 40

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Humanized 2B6 light chain variable region Hu2B6VL-2

<400> 40

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn

20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Lys Tyr Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 41

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Humanized 2B6 light chain variable region Hu2B6VL-3

<400> 41

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn

20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 42

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Arg Arg Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Trp Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Val Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> IgG binding site of FcgammaRIIB receptor

<400> 43

Lys Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn

1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> IgG binding site of FcgammaRIIB receptor

<400> 44

Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Asn

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> IgG binding site of FcgammaRIIB receptor

<400> 45

Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr

1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> IgG binding site of FcgammaRIIB receptor

<400> 46

Lys Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr

1 5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> IgG binding site of FcgammaRIIB receptor

<400> 47

Gln Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr

1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> IgG binding site of FcgammaRIIB receptor

<400> 48

Lys Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr

1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> IgG binding site of FcgammaRIIB receptor

<400> 49

Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Asn

1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> IgG binding site for FcgammaRIIB receptor

<400> 50

Lys Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn

1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> IgG binding site of FcgammaRIIB receptor

<400> 51

Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr

1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> IgG binding site of FcgammaRIIB receptor

<400> 52

Gln Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr

1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> IgG binding site of FcgammaRIIB receptor

<400> 53

Lys Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr

1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> IgG binding site of FcgammaRIIB receptor

<400> 54

Lys Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr

1 5

<210> 55

<211> 36

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Primer Lgh321F

<400> 55

cgagctagct ctagatgaga tcacagttct ctctac 36

<210> 56

<211> 47

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Primer Lgh318R

<400> 56

gcctccgcct ccggatccgc ctcctttgat ctccaccttg gtccctc 47

<210> 57

<211> 47

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Primer Lgh319F

<400> 57

ggaggcggat ccggaggcgg aggccaggtt cagctggtgc agtctgg 47

<210> 58

<211> 43

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Primer Lgh320R

<400> 58

tttgaattct agcagcctcc cagtgaggag acggtgaccg tgg 43

<210> 59

<211> 46

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Primer Lgh315R

<400> 59

gcctccgcct ccggatccgc ctcctttgat ctcaagcttg gtcccc 46

<210> 60

<211> 48

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Primer Lgh316F

<400> 60

ggaggcggat ccggaggcgg aggccaggtt accctgagag agtctggc 48

<210> 61

<211> 47

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Primer Lgh317R

<400> 61

tttgaattcc tagcagcctc ccagtgagct cacagtgacc agagtcc 47

<210> 62

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Primer Lgh339R

<400> 62

ctcaacgcag cctcccagtg agctcac 27

<210> 63

<211> 31

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Primer Lgh340R

<400> 63

aacgcagcct cccagtgagg agacggtgac c 31

<210> 64

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Primer Lgh366R

<400> 64

tttgaattct atttacccgg agacagg 27

<210> 65

<211> 33

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Primer Lhg367F

<400> 65

ctgggaggct gcgcagagcc caaatcttgt gac 33

<210> 66

<211> 33

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Primer Lgh368R

<400> 66

gtcacaagat ttgggctctg cgcagcctcc cag 33

<210> 67

<211> 50

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Primer Lgh369R

<400> 67

tttgaattct aacactctcc cctgttgaag cagcctccca gtgaggagac 50

<210> 68

<211> 118

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> humanized anti-CD16A Heavy Chain Variable Region Hu3G8VH-1

<400> 68

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

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

85 90 95
Cys Ala Arg Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 69

<211> 118

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Humanized anti-CD16A heavy chain variable region Hu3G8VH-5

<400> 69

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

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

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 70
<211> 117
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> Humanized anti-CD16A heavy chain variable region Hu3G8VH-22
<400> 70
Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln

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

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

<210> 71
<211> 111

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Humanized anti-CD16A light chain variable region Hu3G8VL-1

<400

> 71

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

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

<210> 72

<211> 111

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Humanized anti-CD16A light chain variable region Hu3G8VL-43

<400> 72

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

50 55 60

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

<210> 73
<211> 111
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> Humanized anti-CD16A light chain variable region Hu3G8VL-22

<400> 73
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30
Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

<210> 74
<211> 24
<212> DNA
<213> DNA sequence of SEQ ID NO:10
<400> 74

ggaggcggat ccggaggcgg aggc 24

<210> 75

<211> 18

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 75

ttcaacaggg gagagtgt 18

<210> 76

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Linker plus C-terminus of human IgG kappa chain

<400> 76

ctgggaggct gcttcaacag gggagagtgt 30

<210> 77

<211> 6

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 77

Val Glu Pro Lys Ser Cys

1 5

<210> 78

<211> 18

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 78

gttgagccca aatcttgt 18

<210> 79

<211> 118

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 79

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Arg Thr Ser

20 25 30

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

35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 80

<211> 354

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 80

caggttaccc tgaaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtctg 60

acttgttctt tctctgggtt ttcactgagg acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt 120

cagccttcag ggaagggtct agagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgacaagcgc 180

tataatccag ccctgaagag ccgactgaca atctccaagg atacctccag caaccaggta 240

ttcctcaaaa tcgccagtgt ggacactgca gatactgcca catactactg tgctcaaata 300

aaccccgcct ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtgag ctca 354

<210> 81

<211> 354

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 81

caggttaccc tgagagagtc tggccctgcg ctggtgaagc ccacacagac cctcacactg 60

acttgtacct tctctgggtt ttcactgagc acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt 120

cagcctcccg ggaaggctct agagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgacaagcgc 180

tataatccag ccctgaagag ccgactgaca atctccaagg atacctccaa aaaccaggta 240

gtcctcacaa tgaccaacat ggaccctgtg gatactgcca catactactg tgctcaaata 300

aaccccgcct ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtgag ctca 354

<210> 82

<211> 111

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 82

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

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

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

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

<210> 83

<211> 333

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 83

gacactgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180

gggatcccag ccaggtttag tgccagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240

cctgtggagg aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa 333

<210> 84

<211> 332

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Humanized anti-CD16A light chain variable region Hu3G8VL-1

<400> 84

gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60

atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180

ggggtcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc 240

agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300

acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aa 332

<210> 85

<211> 121

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Humanized 2B6 heavy chain variable region

<400> 85

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 Asn Tyr

20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 86

<211> 363

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> humanized 2B6 heavy chain variable region

<400> 86

caggttcagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggtta cacctttacc aactactgga tacactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gattggagtg attgatcctt ctgatactta tccaaattac 180

aataaaaagt tcaagggcag agtcaccatg accgtagtcg tatccacgag cacagcctac 240

atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaaacggt 300

gattccgatt attactctgg tatggactac tgggggcaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 87

<211> 111

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Humanized 2B6 light chain variable region

<400> 87

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp

20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 88

<211> 321

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> humanized 2B6 light chain variable region

<400> 88

gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60

ttcacctgca ggaccagtca gagcattggc acaaacatac actggtacca gcagaaacca 120

gatcagtctc caaagctcct catcaaggag gtttctgagt ctatctctgg agtcccatcg 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct 240

gaagatgctg caacgtatta ctgtcaacaa agtaatacct ggccgttcac gttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 89

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> thrombin cleavage recognition site

<400> 89

Leu Val Pro Arg Gly Ser

1 5

<210> 90

<211> 4

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Factor Xa cleavage recognition site

<220><

221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> Xaa=Glu or Asp

<400> 90

Ile Xaa Gly Arg

1

<210> 91

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> enterokinase cleavage recognition site

<400> 91

Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 92

<211> 4

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> furin cleavage recognition site

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(3)

<223> Xaa=any amino acid

<400> 92

Arg Xaa Xaa Arg

1

<210> 93

<211> 4

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> preferred furin cleavage recognition site

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> Xaa=any amino acid

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> Xaa=Lys or Arg

<400> 93

Arg Xaa Xaa Arg

1

<210> 94

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> AcTEV cleavage recognition site

<400> 94

Gln Asn Leu Tyr Phe Gln Gly

1 5

<210> 95

<211> 487

<212> PRT

<213> artificial

<220><223>

covalent diabody polyprotein precursor

<400> 95

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

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp

20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His

65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn

85 90 95

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

100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly

115 120 125

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

130 135 140

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro

145 150 155 160

Thr Thr Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Tyr Asp Gly Gly Asp

165 170 175

Thr His Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

180 185 190

Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu

195 200 205

Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr Glu Thr Thr Gly Ile Pro Thr

210 215 220

Gly Val Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Val Ser Val Thr Val Ser Ser

225 230 235 240

Leu Gly Gly Cys Gly Gly Arg Ala Lys Arg Asp Val Gln Met Thr Gln

245 250 255

Ser Pro Ser Asn Leu Ala Ala Ser Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Asn

260 265 270

Cys Lys Ala Ser Glu Ser Ile Ser Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Leu Gln

275 280 285

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

290 295 300

Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

305 310 315 320

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

325 330 335

Tyr Cys Gln Gln His Tyr Glu Tyr Pro Ala Thr Phe Gly Ser Gly Thr

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Arg Thr Ser Gly Met Gly

385 390 395 400

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

405 410 415

His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser

420 425 430

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys

435 440 445

Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln

450 455 460

Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

465 470 475 480

Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys

485

<210> 96

<211> 1464

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> DNA sequence of SEQ ID NO:97 (covalent diabody polyprotein

precursor)

<400> 96

gacactgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180

gggatcccag ccaggtttag tgccagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240

cctgtggagg aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaaggaggcg gatccggagg cggaggcgag 360

gtggagctag tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaaggtccct gaaactctcg 420

tgtgcagcct caggattcac tttcagtgac tattacatgg cctgggtccg gcaggctcca 480

acgacgggtc tggagtgggt cgcatccatt agttatgatg gtggtgacac tcactatcga 540

gactccgtga agggccgatt tactatttcc agagataatg caaaaagcag cctatacctg 600

caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtgcaac agagactacg 660

ggaataccta caggtgttat ggatgcctgg ggtcaaggag tttcagtcac tgtctcctca 720

ctgggaggct gcggcgggag agctaagagg gatgtccaga tgacccagtc tccatctaat 780

cttgctgcct ctcctggaga aagtgtttcc atcaattgca aggcaagtga gagcattagc 840

aagtatttag cctggtatct acagaaacct gggaaagcaa ataagcttct tatgtacgat 900

gggtcaactt tgcaatctgg aattccatcg aggttcagtg gcagtggatc tggtacagat 960

ttcactctca ccatcagaag cctggagcct gaagattttg gactctatta ctgtcaacag 1020

cattatgaat atccagccac gttcggttct gggaccaagc tggagatcaa aggaggcgga 1080

tccggaggcg gaggccaggt taccctgaaa gagtctggcc ctgggatatt gcagccctcc 1140

cagaccctca gtctgacttg ttctttctct gggttttcac tgaggacttc tggtatgggt 1200

gtaggctgga ttcgtcagcc ttcagggaag ggtctagagt ggctggcaca catttggtgg 1260

gatgatgaca agcgctataa tccagccctg aagagccgac tgacaatctc caaggatacc 1320

tccagcaacc aggtattcct caaaatcgcc agtgtggaca ctgcagatac tgccacatac 1380

tactgtgctc aaataaaccc cgcctggttt gcttactggg gccaagggac tctggtcact 1440

gtgagctcac tgggaggctg ctag 1464

<210> 97

<211> 511

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> covalent diabody polyprotein precursor

<400> 97

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

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp

20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

50 55 60

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

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

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

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

Gly Pro Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Asn Leu Ala Ala Ser
275 280 285
Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Asn Cys Lys Ala Ser Glu Ser Ile Ser
290 295 300
Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ala Asn Lys Leu

305 310 315 320

Leu Met Tyr Asp Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe

325 330 335

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

340 345 350

Glu Pro Glu Asp Phe Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Glu Tyr

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys

435 440 445

Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr

450 455 460

Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp

465 470 475 480

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr

485 490 495

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

500 505 510

<210> 98

<211> 1536

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> DNA sequence of SEQ ID NO:99 (covalent diabody polyprotein

precursor)

<400> 98

gacactgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180

gggatcccag ccaggtttag tgccagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240

cctgtggagg aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaaggaggcg gatccggagg cggaggcgag 360

gtggagctag tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaaggtccct gaaactctcg 420

tgtgcagcct caggattcac tttcagtgac tattacatgg cctgggtccg gcaggctcca 480

acgacgggtc tggagtgggt cgcatccatt agttatgatg gtggtgacac tcactatcga 540

gactccgtga agggccgatt tactatttcc agagataatg caaaaagcag cctatacctg 600

caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtgcaac agagactacg 660

ggaataccta caggtgttat ggatgcctgg ggtcaaggag tttcagtcac tgtctcctca 720

ctgggaggct gcggcgggag agctaagagg gcccctgtga agcagaccct gaacttcgac 780

ctgctgaagc tggccggaga cgtggagagc aaccccggcc ccgatgtcca gatgacccag 840

tctccatcta atcttgctgc ctctcctgga gaaagtgttt ccatcaattg caaggcaagt 900

gagagcatta gcaagtattt agcctggtat ctacagaaac ctgggaaagc aaataagctt 960

cttatgtacg atgggtcaac tttgcaatct ggaattccat cgaggttcag tggcagtgga 1020

tctggtacag atttcactct caccatcaga agcctggagc ctgaagattt tggactctat 1080

tactgtcaac agcattatga atatccagcc acgttcggtt ctgggaccaa gctggagatc 1140

aaaggaggcg gatccggagg cggaggccag gttaccctga aagagtctgg ccctgggata 1200

ttgcagccct cccagaccct cagtctgact tgttctttct ctgggttttc actgaggact 1260

tctggtatgg gtgtaggctg gattcgtcag ccttcaggga agggtctaga gtggctggca 1320

cacatttggt gggatgatga caagcgctat aatccagccc tgaagagccg actgacaatc 1380

tccaaggata cctccagcaa ccaggtattc ctcaaaatcg ccagtgtgga cactgcagat 1440

actgccacat actactgtgc tcaaataaac cccgcctggt ttgcttactg gggccaaggg 1500

actctggtca ctgtgagctc actgggaggc tgctag 1536

<210> 99

<211> 239

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 99

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn

20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys

145 150 155 160

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr

165 170 175

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys

180 185 190

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala

195 200 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly

210 215 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230 235

<210> 100

<211> 720

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 100

gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60

ttcacctgca ggaccagtca gagcattggc acaaacatac actggtacca gcagaaacca 120

gatcagtctc caaagctcct catcaaggag gtttctgagt ctatctctgg agtcccatcg 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct 240

gaagatgctg caacgtatta ctgtcaacaa agtaatacct ggccgttcac gttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt taccctgaga 360

gagtctggcc ctgcgctggt gaagcccaca cagaccctca cactgacttg taccttctct 420

gggttttcac tgagcacttc tggtatgggt gtaggctgga ttcgtcagcc tcccgggaag 480

gctctagagt ggctggcaca catttggtgg gatgatgaca agcgctataa tccagccctg 540

aagagccgac tgacaatctc caaggatacc tccaaaaacc aggtagtcct cacaatgacc 600

aacatggacc ctgtggatac tgccacatac tactgtgctc aaataaaccc cgcctggttt 660

gcttactggg gccaagggac tctggtcact gtgagctcat tcaacagggg agagtgttag 720

<210> 101

<211> 246

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 101

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

85 90 95

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

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

Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240
Val Glu Pro Lys Ser Cys
245

<210> 102
<211> 741
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 102
gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60
atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac 120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180
ggggtcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc 240

agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300

acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggagg cggaggccag 360

gttcagctgg tgcagtctgg agctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 420

tgcaaggctt ctggttacac ctttaccaac tactggatac actgggtgcg acaggcccct 480

ggacaagggc ttgagtggat tggagtgatt gatccttctg atacttatcc aaattacaat 540

aaaaagttca agggcagagt caccatgacc gtagtcgtat ccacgagcac agcctacatg 600

gagctgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag aaacggtgat 660

tccgattatt actctggtat ggactactgg gggcaaggga ccacggtcac cgtctcctca 720

gttgagccca aatcttgtta g 741

<210> 103

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH FR1

<400> 103

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Arg

20 25 30

<210> 104

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH FR1

<400> 104

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

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser

20 25 30

<210> 105

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH FR1

<400> 105

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

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser

20 25 30

<210> 106

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH FR1

<400> 106

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

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Arg

20 25 30

<210> 107

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH FR1

<400> 107

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

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser

20 25 30

<210> 108

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * CDR1

<400> 108

Thr Ser Gly Met Gly Val Gly

1 5

<210> 109

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * CDR1

<400> 109

Thr Ser Gly Val Gly Val Gly

1 5

<210> 110

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR2

<400> 110

Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 111

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR2

<400> 111

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 112

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * CDR2

<400> 112

His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 113

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * CDR2

<400> 113

His Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 114

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * CDR2

<400> 114

His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 115

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * CDR2

<400> 115

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 116

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * CDR2

<400> 116

His Ile Trp Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 117

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * CDR2

<400> 117

Leu Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 118

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * CDR2

<400> 118

His Ile Phe Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 119

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * CDR2

<400> 119

Leu Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 120

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * CDR2

<400> 120

His Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 121

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * CDR2

<400> 121

Leu Ile Trp Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 122

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 122

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys

1 5 10 15

Ile Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln

20 25

<210> 123

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 123

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25

<210> 124

<211> 29

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 124

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln

20 25

<210> 125

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 125

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr

20 25

<210> 126

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 126

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys

20 25

<210> 127

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 127

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ala

20 25

<210> 128

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 128

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His

20 25

<210> 129

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 129

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25

<210> 130

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 130

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His

20 25

<210> 131

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 131

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln

20 25

<210> 132

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 132

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys

1 5 10 15

Ala Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln

20 25

<210> 133

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 133

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25

<210> 134

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 134

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln

20 25

<210> 135

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 135

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr

20 25

<210> 136

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 136

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys

20 25

<210> 137

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 137

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ala

20 25

<210> 138

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 138

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His

20 25

<210> 139

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 139

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25

<210> 140

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 140

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His

20 25

<210> 141

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 141

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln

20 25

<210> 142

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 142

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys

1 5 10 15

Ser Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln

20 25

<210> 143

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 143

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25

<210> 144

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 144

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln

20 25

<210> 145

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 145

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr

20 25

<210> 146

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 146

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys

20 25

<210> 147

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 147

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ala

20 25

<210> 148

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 148

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His

20 25

<210> 149

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 149

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25

<210> 150

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 150

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His

20 25

<210> 151

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 151

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln

20 25

<210> 152

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 152

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys

1 5 10 15

Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln

20 25

<210> 153

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 153

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25

<210> 154

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 154

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln

20 25

<210> 155

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 155

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr

20 25

<210> 156

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 156

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys

20 25

<210> 157

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 157

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ala

20 25

<210> 158

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 158

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His

20 25

<210> 159

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 159

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25

<210> 160

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 160

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His

20 25

<210> 161

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR3

<400> 161

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln

20 25

<210> 162

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * CDR3

<400> 162

Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr

1 5

<210> 163

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * CDR3

<400> 163

Ile Asn Pro Ala Trp Phe Asp Tyr

1 5

<210> 164

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * CDR3

<400> 164

Ile Asn Pro Ala Tyr Phe Ala Tyr

1 5

<210> 165

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * CDR3

<400> 165

Ile Asn Pro Ala Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 166

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR4

<400> 166

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

1 5 10

<210> 167

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Sequences Derived from 3G8 VH * FR4

<400> 167

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 168

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* FR1

<400> 168

Asp Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu

1 5 10 15

<210> 169

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* FR1

<400> 169

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

1 5 10 15

<210> 170

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400> 170

Lys Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn

1 5 10

<210> 171

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400> 171

Arg Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn

1 5 10

<210> 172

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400> 172

Lys Ser Ser Gln Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn

1 5 10

<210> 173

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400> 173

Lys Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn

1 5 10

<210> 174

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400> 174

Lys Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn

1 5 10

<210> 175

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400>

175

Lys Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Phe Met Ala

1 5 10

<210> 176

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400> 176

Lys Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 177

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400> 177

Lys Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn

1 5 10

<210> 178

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400> 178

Arg Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn

1 5 10

<210> 179

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400> 179

Lys Ser Ser Ser Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn

1 5 10

<210> 180

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400> 180

Lys Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn

1 5 10

<210> 181

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400> 181

Lys Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn

1 5 10

<210> 182

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400>

182

Lys Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Phe Met Ala

1 5 10

<210> 183

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400> 183

Lys Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 184

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400> 184

Lys Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn

1 5 10

<210> 185

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400> 185

Arg Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn

1 5 10

<210> 186

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400> 186

Lys Ser Ser Val Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn

1 5 10

<210> 187

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400> 187

Lys Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn

1 5 10

<210> 188

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400> 188

Lys Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn

1 5 10

<210> 189

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400>

189

Lys Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Phe Met Ala

1 5 10

<210> 190

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400> 190

Lys Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 191

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400> 191

Lys Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn

1 5 10

<210> 192

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400> 192

Arg Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn

1 5 10

<210> 193

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400> 193

Lys Ser Ser Asp Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn

1 5 10

<210> 194

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400> 194

Lys Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn

1 5 10

<210> 195

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400> 195

Lys Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn

1 5 10

<210> 196

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400>

196

Lys Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Phe Met Ala

1 5 10

<210> 197

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400> 197

Lys Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 198

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400> 198

Lys Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn

1 5 10

<210> 199

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400> 199

Arg Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn

1 5 10

<210> 200

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400> 200

Lys Ser Ser Phe Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn

1 5 10

<210> 201

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400> 201

Lys Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn

1 5 10

<210> 202

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400> 202

Lys Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn

1 5 10

<210> 203

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400>

203

Lys Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Phe Met Ala

1 5 10

<210> 204

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR1

<400> 204

Lys Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 205

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* FR2

<400> 205

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

1 5 10 15

<210> 206

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR2

<400> 206

Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 207

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR2

<400> 207

Asp Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 208

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR2

<400> 208

Trp Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 209

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR2

<400> 209

Thr Thr Ser Asn Leu Glu Thr

1 5

<210> 210

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR2

<400> 210

Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr

1 5

<210> 211

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR2

<400> 211

Asp Ala Ser Asn Leu Ala Thr

1 5

<210> 212

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR2

<400> 212

Ser Ala Ser Asn Leu Gln Ser

1 5

<210> 213

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR2

<400>

213

Ser Thr Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 214

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR2

<400> 214

Ser Thr Ser Asn Leu Gln Ser
1 5

<210> 215

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR2

<400> 215

Thr Thr Ser Asn Leu Gln Ser
1 5

<210> 216

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR2

<400> 216

Thr Thr Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 217

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* FR3

<400> 217

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

<210> 218

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* FR3

<400> 218

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 219

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR3

<400> 219

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr

1 5

<210> 220

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR3

<400> 220

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 221

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR3

<400> 221

Gln Gln Ser Tyr Glu Asp Pro Tyr Thr

1 5

<210

> 222

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR3

<400> 222

Gln Gln Ser Asn Ser Asp Pro Tyr Thr

1 5

<210> 223

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* CDR3

<400> 223

Gln Gln Ser Asn Glu Thr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 224

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* FR4

<400> 224

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 225

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Sequences Derived from 3G8 VL* FR4

<400> 225

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 226

<211> 714

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H3G8VL-CB3.1VH

<400> 226

gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60

atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180

ggggtcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc 240

agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300

acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggagg cggaggccag 360

gtccaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaggcctg gggcttcagt gaagctgtcc 420

tgcaaggctt ctggctacac cttcaccagc tactggatga actgggtgaa gcagaggcct 480

ggacaaggcc ttgaatggat tggtatggtt gatccttcag acagtgaaac tcactacaat 540

caaatgttca aggacaaggc cacattgact gttgacaaat cctccagcac agcctacatg 600

cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag agctatgggc 660

tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc tcctcagttg agcccaaatc ttgt 714

<210> 227

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H3G8VL-CB3.1VH

<400> 227

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp

20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala

115 120 125

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

130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro

145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Val Asp Pro Ser Asp Ser Glu

165 170 175

Thr His Tyr Asn Gln Met Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp

180 185 190

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

195 200 205

Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln

210 215 220

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Val Glu Pro Lys Ser Cys

225 230 235

<210> 228

<211> 732

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CB3.1VL-h3G8VH

<400> 228

gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta acattggaca accagcctcc 60

atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg gaaagacata tttgaattgg 120

ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac cgcctaatct atctggtgtc taaactggac 180

tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtac acattttccg 300

ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg aggcggaggc 360

caggttaccc tgagagagtc tggccctgcg ctggtgaagc ccacacagac cctcacactg 420

acttgtacct tctctgggtt ttcactgagc acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt 480

cagcctcccg ggaaggctct agagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgacaagcgc 540

tataatccag ccctgaagag ccgactgaca atctccaagg atacctccaa aaaccaggta 600

gtcctcacaa tgaccaacat ggaccctgtg gatactgcca catactactg tgctcaaata 660

aaccccgcct ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtgag ctcattcaac 720

aggggagagt gt 732

<210> 229

<211> 244

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CB3.1VL-h3G8VH

<400> 229

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Thr

20 25 30

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

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly
115 120 125

Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe
130 135 140

Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg

145 150 155 160

Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp

165 170 175

Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser

180 185 190

Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp

195 200 205

Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp

210 215 220

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

225 230 235 240

Arg Gly Glu Cys

<210> 230

<211> 702

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8B5-CB3.1-VEPKSC

<400> 230

gacattcaga tgacacagtc tccatcctcc ctacttgcgg cgctgggaga aagagtcagt 60

ctcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggcttca gcagaaacca 120

gatggaacta ttaaacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccaaaa 180

aggttcagtg gcagtgagtc tgggtcagat tattctctca ccatcagcag tcttgagtct 240

gaagattttg cagactatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggtgct 300

gggaccaagc tggagctgaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt ccaactgcag 360

cagcctgggg ctgagctggt gaggcctggg gcttcagtga agctgtcctg caaggcttct 420

ggctacacct tcaccagcta ctggatgaac tgggtgaagc agaggcctgg acaaggcctt 480

gaatggattg gtatggttga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag 540

gacaaggcca cattgactgt tgacaaatcc tccagcacag cctacatgca gctcagcagc 600

ctgacatctg aggactctgc ggtctattac tgtgcaagag ctatgggcta ctggggtcaa 660

ggaacctcag tcaccgtctc ctcagttgag cccaaatctt gt 702

<210> 231

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8B5-CB3.1-VEPKSC

<400> 231

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

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
35 40 45

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

Ser Glu Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
115 120 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
130 135 140

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Met Val Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
165 170 175

Gln Met Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
180 185 190

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

195 200 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val

210 215 220

Thr Val Ser Ser Val Glu Pro Lys Ser Cys

225 230

<210> 232

<211> 726

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CB3.1-8B5-FNRGEC

<400> 232

gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta acattggaca accagcctcc 60

atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg gaaagacata tttgaattgg 120

ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac cgcctaatct atctggtgtc taaactggac 180

tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtac acattttccg 300

ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg aggcggaggc 360

gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc 420

tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct 480

ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca 540

tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt 600

gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtggggct 660

ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcgtt caacagggga 720

gagtgt 726

<210> 233

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CB3.1-8B5-FNRGEC

<400> 233

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Thr

20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser

145 150 155 160

Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys

165 170 175

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile

180 185 190

Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu

195 200 205

Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp

210 215 220

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

225 230 235 240

Glu Cys

<210> 234

<211> 696

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8B5VL-CB3.1VH-LGGC

<400> 234

gacattcaga tgacacagtc tccatcctcc ctacttgcgg cgctgggaga aagagtcagt 60

ctcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggcttca gcagaaacca 120

gatggaacta ttaaacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccaaaa 180

aggttcagtg gcagtgagtc tgggtcagat tattctctca ccatcagcag tcttgagtct 240

gaagattttg cagactatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggtgct 300

gggaccaagc tggagctgaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt ccaactgcag 360

cagcctgggg ctgagctggt gaggcctggg gcttcagtga agctgtcctg caaggcttct 420

ggctacacct tcaccagcta ctggatgaac tgggtgaagc agaggcctgg acaaggcctt 480

gaatggattg gtatggttga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag 540

gacaaggcca cattgactgt tgacaaatcc tccagcacag cctacatgca gctcagcagc 600

ctgacatctg aggactctgc ggtctattac tgtgcaagag ctatgggcta ctggggtcaa 660

ggaacctcag tcaccgtctc ctcactggga ggctgc 696

<210> 235

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8B5VL-CB3.1VH-LGGC

<400> 235

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Glu Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Ser Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Met Val Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val

210 215 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys

225 230

<210> 236

<211> 720

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CB3.1-8B5-LGGC

<400> 236

gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta acattggaca accagcctcc 60

atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg gaaagacata tttgaattgg 120

ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac cgcctaatct atctggtgtc taaactggac 180

tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtac acattttccg 300

ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg aggcggaggc 360

gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc 420

tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct 480

ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca 540

tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt 600

gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtggggct 660

ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcgct gggaggctgc 720

<210> 237

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CB3.1-8B5-LGGC

<400> 237

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Thr

20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser

145 150 155 160

Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys

165 170 175

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile

180 185 190

Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu

195 200 205

Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp

210 215 220

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

225 230 235 240

<210> 238

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lgh628F Primer

<400> 238

ggaggcggat ccggaggcgg aggccaggtc caactgcagc agcctgg 47

<210> 239

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lgh629R Primer

<400> 239

tttgaattct aacaagattt gggctcaact gaggagacgg tgactgagg 49

<210> 240

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lgh630R Primer

<400> 240

gcctccgcct ccggatccgc ctcctttcag ctccagcttg gtccc 45

<210> 241

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lgh631F Primer

<400> 241

ggaggcggat ccggaggcgg aggcgaagtg aagcttgagg agtctgg 47

<210> 242

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lgh640R Primer

<400> 242

tttgaattct aacactctcc cctgttgaac gaggagactg tgagagtgg 49

<210> 243

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lgh644R Primer

<400> 243

tttgtcgtca tcatcgtctt tgtagtcgga gtggacacct gtggagag 48

<210> 244

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lgh646R Primer

<400> 244

tttgaattct agcagcctcc cagtgaggag acggtgactg ag 42

<210> 245

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lgh647F Primer

<400> 245

caaagacgat gatgacgaca aagacattca gatgacacag tctcc 45

<210> 246

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lgh648R Primer

<400> 246

tttgaattct agcagcctcc cagcgaggag actgtgagag tgg 43

<210> 247

<211> 1044

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2.4G2-3G8-hKappa

<400> 247

gatgtccaga tgacccagtc tccatctaat cttgctgcct ctcctggaga aagtgtttcc 60

atcaattgca aggcaagtga gagcattagc aagtatttag cctggtatct acagaaacct 120

gggaaagcaa ataagcttct tatgtacgat gggtcaactt tgcaatctgg aattccatcg 180

aggttcagtg gcagtggatc tggtacagat ttcactctca ccatcagaag cctggagcct 240

gaagattttg gactctatta ctgtcaacag cattatgaat atccagccac gttcggttct 300

gggaccaagc tggagatcaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt taccctgaaa 360

gagtctggcc ctgggatatt gcagccctcc cagaccctca gtctgacttg ttctttctct 420

gggttttcac tgaggacttc tggtatgggt gtaggctgga ttcgtcagcc ttcagggaag 480

ggtctagagt ggctggcaca catttggtgg gatgatgaca agcgctataa tccagccctg 540

aagagccgac tgacaatctc caaggatacc tccagcaacc aggtattcct caaaatcgcc 600

agtgtggaca ctgcagatac tgccacatac tactgtgctc aaataaaccc cgcctggttt 660

gcttactggg gccaagggac tctggtcact gtgagctcac tgggaggctg cggcggaggg 720

agccgtacgg tggctgcacc atcggtcttc atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa 780

tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg aataacttct atcccagaga ggccaaagta 840

cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag 900

gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc agcaccctga cgctgagcaa agcagactac 960

gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca 1020

aagagcttca acaggggaga gtgt 1044

<210> 248

<211> 348

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2.4G2-3G8-hKappa

<400> 248

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

Glu Ser Val Ser Ile Asn Cys Lys Ala Ser Glu Ser Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ala Asn Lys Leu Leu Met
35 40 45

Tyr Asp Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Glu Tyr Pro Ala
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

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

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
130 135 140

Arg Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
145 150 155 160

Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
165 170 175

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser
180 185 190

Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala

195 200 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly

210 215 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys Gly Gly Gly

225 230 235 240

Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp

245 250 255

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn

260 265 270

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

275 280 285

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345

<210> 249

<211> 1734

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3G8-2.4G2-hG1

<400> 249

gacactgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180

gggatcccag ccaggtttag tgccagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240

cctgtggagg aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaaggaggcg gatccggagg cggaggcgag 360

gtggagctag tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaaggtccct gaaactctcg 420

tgtgcagcct caggattcac tttcagtgac tattacatgg cctgggtccg gcaggctcca 480

acgacgggtc tggagtgggt cgcatccatt agttatgatg gtggtgacac tcactatcga 540

gactccgtga agggccgatt tactatttcc agagataatg caaaaagcag cctatacctg 600

caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtgcaac agagactacg 660

ggaataccta caggtgttat ggatgcctgg ggtcaaggag tttcagtcac tgtctcctca 720

ctgggaggct gcggcggagg gagcgcctcc accaagggcc catcggtctt ccccctggca 780

ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca gcggccctgg gctgcctggt caaggactac 840

ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc 900

ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc 960

tccagcagct tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc 1020

aaggtggaca agagagttga gcccaaatct tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 1080

ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac 1140

accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa 1200

gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 1260

aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 1320

caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca 1380

gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 1440

accctgcccc catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 1500

aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 1560

aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag 1620

ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1680

gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa 1734

<210> 250

<211> 578

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3G8-2.4G2-hG1

<400> 250

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

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp

20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His

65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn

85 90 95

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

100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly

115 120 125

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

130 135 140

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro

145 150 155 160

Thr Thr Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Tyr Asp Gly Gly Asp

165 170 175

Thr His Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

180 185 190

Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu

195 200 205

Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr Glu Thr Thr Gly Ile Pro Thr

210 215 220

Gly Val Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Val Ser Val Thr Val Ser Ser

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

370 375 380

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

385 390 395 400

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

405 410 415

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

545 550 555 560

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

565 570 575

Gly Lys

<210> 251

<211> 720

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD79VL-CD32BVH

<400> 251

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60

atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120

tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctggtgtc taaactggac 180

tctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240

agcagggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg 300

ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg aggcggaggc 360

gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc 420

tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct 480

ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca 540

tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt 600

gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtggggct 660

ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcgct gggaggctgc 720

<210> 252

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD79VL-CD32BVH

<400> 252

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp 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 Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
130 135 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys
165 170 175

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
180 185 190

Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
195 200 205

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

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

225 230 235 240

<210> 253

<211> 696

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD32BVL-CD79VH-1

<400> 253

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc 60

atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggctgca gcagaaacca 120

ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc 180

aggttcagtg gcagtgagtc tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct 240

gaagattttg caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg 300

gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tcagctggtg 360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct 420

ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt 480

gagtggatcg gaatgattga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag 540

gacagagtca ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc 600

ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctgggggcaa 660

gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgc 696

<210> 254

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD32BVL-CD79VH-1

<400> 254

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Arg Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Glu Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn

165 170 175

Gln Met Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser

180 185 190

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

195 200 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val

210 215 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys

225 230

<210> 255

<211> 696

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD32BVL-CD79VH-2

<400> 255

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc 60

atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggctgca gcagaaacca 120

ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc 180

aggttcagtg gcagtgagtc tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct 240

gaagattttg caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg 300
gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tcagctggtg 360
cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct 420
ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt 480
gagtggatcg gaatgattga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag 540
gacagagtca ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc 600
ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctgggggcaa 660

gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgc 696

<210> 256
<211> 232
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CD32BVL-CD79VH-2
<400> 256

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
20 25 30
Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Arg Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Glu Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110
Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
115 120 125

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

165 170 175
Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
180 185 190
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
195 200 205
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
210 215 220
Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225 230

<210> 257
<211> 720
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> hHBCRCVL. R45N-h8B5VH-LGGC
<400> 257
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60
atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120
tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctggtgtc taaactggac 180
tctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
agcagggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg 300
ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg aggcggaggc 360

gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc 420
tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct 480
ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca 540
tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt 600
gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtggggct 660
ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcgct gggaggctgc 720

<210> 258

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hHBCRCVL. R45N-h8B5VH-LGGC

<400> 258

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

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

180 185 190
Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

<210> 259

<211> 696

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H8B5VL-hHBCRCVH M48I-LGGC

<400> 259

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc 60

atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggctgca gcagaaacca 120

ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc 180

aggttcagtg gcagtgagtc tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct 240

gaagattttg caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg 300

gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tcagctggtg 360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct 420

ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt 480

gagtggatcg gaatgattga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag 540

gacagagtca ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc 600

ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctgggggcaa 660

gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgc 696

<210> 260

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H8B5VL-HBCRCVH M48I-LGGC

<400> 260

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Arg Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Glu Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn

165 170 175

Gln Met Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser

180 185 190

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

195 200 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val

210 215 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys

225 230

<210> 261

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lgh321F Primer

<400> 261

cgagctagct ctagatgaga tcacagttct ctctac 36

<210> 262

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lgh386R Primer

<400> 262

tttgaattct agcagcctcc cagtgaggag acggtgaccg tggtc 45

<210> 263

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lgh784F Primer

<400> 263

ggcggatccg gaggcggagg ccaggttcag ctggtgcag 39

<210> 264

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lgh785R Primer

<400> 264

cctccggatc cgcctccttt gatctcaagc ttggtccc 38

<210> 265

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lgh786R Primer

<400> 265

tttgaattct agcagcctcc caggctggag acggtcacca gg 42

<210> 266

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lgh787F Primer

<400> 266

ggaggcggat ccggaggcgg aggcgaagtg cagcttgtgg agtc 44

<210> 267

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 267

Leu Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 268

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 268

Leu Glu Ile Lys

1

<210> 269

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 269

Thr Val Ser Ser

1

<210> 270

<211> 343

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H8B5VL-hBCRCVH M48I, M62K_LGGCG3S_hKappa

<400> 270

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

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

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

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

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

245 250 255

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

340

<210> 271

<211> 1032

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H8B5VL-hBCRCVH M48I, M62K_LGGCG3S_hKappa

<400> 271

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc 60

atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggctgca gcagaaacca 120

ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc 180

aggttcagtg gcagtgagtc tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct 240

gaagattttg caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg 300

gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tcagctggtg 360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct 420

ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt 480

gagtggatcg gaatgattga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag 540

gacagagtca ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc 600

ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctgggggcaa 660

gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgcggcg gagggagccg aactgtggct 720

gcaccatcgg tcttcatctt cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct 780

gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat 840

aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag caaggacagc 900

acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc 960

tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg 1020

ggagagtgtt ag 1032

<210> 272

<211> 574

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HBCRCVL R45N-h8B5VH_LGGCGGGS-hG1

<400> 272

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp 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 Trp Gln Gly

85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala

145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys
165 170 175
Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile

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

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

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

370 375 380
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
385 390 395 400
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

405 410 415

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

420 425 430

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

435 440 445

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser

450 455 460

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

465 470 475 480

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

485 490 495

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

500 505 510

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

515 520 525

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

530 535 540

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

545 550 555 560

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

565 570

<210> 273

<211> 1722

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HBCRCVL R45N-h8B5VH_LGGCGGGS-hG1

<400> 273

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60

atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120

tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctggtgtc taaactggac 180

tctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240

agcagggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg 300

ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg aggcggaggc 360
gaagtgcagc ttgtggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc cctgagactc 420
tcttgtgccg cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcaggcc 480
ccaggcaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca 540
tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgacgc caaaaacagt 600
ctgtacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg ccgtgtatta ctgtggggct 660
ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc ctggtgaccg tctccagcct gggaggctgc 720

ggcggaggga gcgcctccac caagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctcctccaag 780
agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg 840
gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc 900
ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg 960
ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 1020
agagttgagc ccaaatcttg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa 1080
ctcctggggg gaccgtcagt cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc 1140

tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 1200
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 1260
gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 1320
ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag 1380
aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 1440
tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat 1500
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1560

acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac 1620
aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 1680
aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aa 1722

<210> 274
<211> 335
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> H8B5VL-HBCRCVH M48I, M62K_(-4)LEIK_hKappa
<400> 274

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

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

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

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

210 215 220
Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
225 230 235 240
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu

245 250 255

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

260 265 270

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp

275 280 285

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

290 295 300

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln

305 310 315 320

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

325 330 335

<210> 275

<211> 1005

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H8B5VL-HBCRCVH M48I, M62K_(-4)LEIK_hKappa

<400> 275

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc 60

atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggctgca gcagaaacca 120

ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc 180

aggttcagtg gcagtgagtc tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct 240

gaagattttg caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg 300

gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tcagctggtg 360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct 420

ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt 480

gagtggatcg gaatgattga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag 540

gacagagtca ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc 600

ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctgggggcaa 660

gggaccacgg tcctggagat caagcgaact gtggctgcac catcggtctt catcttcccg 720

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 780

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 840

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 900

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 960

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 1005

<210> 276

<211> 566

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HBCRCVL R45N-h8B5VH_(-4)TVSS-hG1 = HBCRCVL R45N-h8B5VH_-hG1

<400> 276

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp 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 Trp Gln Gly

85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala

145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys

165 170 175

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile

180 185 190

Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu

195 200 205

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

210 215 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

565

<210> 277

<211> 1698

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HBCRCVL R45N-h8B5VH_(-4)TVSS-hG1

<400> 277

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60

atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120

tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctggtgtc taaactggac 180

tctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240

agcagggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg 300

ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg aggcggaggc 360

gaagtgcagc ttgtggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc cctgagactc 420

tcttgtgccg cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcaggcc 480

ccaggcaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca 540

tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgacgc caaaaacagt 600

ctgtacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg ccgtgtatta ctgtggggct 660

ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc ctggtgaccg tctccagcgc ctccaccaag 720

ggcccatcgg tcttcccccc ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 780

ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc 840

gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 900

ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 960

gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag ttgagcccaa atcttgtgac 1020

aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc 1080

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 1140

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 1200

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 1260

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 1320

aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1380

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggatgagct gaccaagaac 1440

caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1500

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1560

ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1620

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1680

tccctgtctc cgggtaaa 1698

<210> 278

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 278

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 279

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 279

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met

1 5 10

<210> 280

<211> 6

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 280

Leu Glu Gly Glu Glu Gly

1 5

<210> 281

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 281

Leu Glu Gly Glu Glu Gly Cys

1 5

<210> 282

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 282

Leu Glu Ile Lys

1

<210> 283

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 283

Leu Gly Glu Glu Gly

1 5

<210> 284

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 284

Leu Gly Glu Glu Gly Cys

1 5

<210> 285

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 285

Leu Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 286

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 286

Leu Gly Lys Lys Gly

1 5

<210> 287

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 287

Leu Gly Lys Lys Gly Cys

1 5

<210> 288

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 288

Leu Lys Gly Lys Lys Gly

1 5

<210> 289

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 289

Leu Lys Gly Lys Lys Gly Cys

1 5

<210> 290

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Linker

<400> 290

Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met

1 5

<210> 291

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 291

Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Cys

1 5

<210> 292

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 292

Thr Val Ser Ser

1

<210> 293

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 293

Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 294

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 294

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

1 5 10

<210> 295

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 295

Val Gln Val His Tyr Arg Met

1 5

<210> 296

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400

> 296

Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys

1 5

<210> 297

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 297

Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg Val

1 5

<210> 298

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 298

Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys

1 5

<210> 299

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> E-coil Linker

<400> 299

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val

1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys

20 25

<210> 300

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> K-coil Linker

<400> 300

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val

1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu

20 25

<210> 301

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 301

Gly Gly Gly Asn Ser

1 5

<210> 302

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> YA2B6 light chain variable region

<400> 302

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn

20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 303

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> YA2B6 hheavy chain variable region

<400> 303

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 Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 304

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Albumin Binding Domain

<400> 304

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15
Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu

20 25 30
Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 305

<211> 279

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> h3G8VL1-G3SG4-h2B6VH4-Kcoil-GGGNS

<400> 305

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

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

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

145 150 155 160

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

Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240
Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala
245 250 255
Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu
260 265 270
Lys Glu Gly Gly Gly Asn Ser
275

<210> 306
<211> 837
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> h3G8VL1-G3SG4-h2B6VH4-Kcoil-GGGNS
<400> 306
gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60
atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac 120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180
ggggtcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc 240
agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga agatccgtac 300
acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggcgg cggaggccag 360

gttcagctgg tgcagtctgg agctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 420
tgcaaggctt ctggttacac ctttaccaac tactggatac actgggtgcg acaggcccct 480

ggacaagggc ttgagtggat tggagtgatt gatccttctg atacttatcc aaattacaat 540

aaaaagttca agggcagagt caccatgacc gtagtcgtat ccacgagcac agcctacatg 600

gagctgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag aaacggtgat 660

tccgattatt actctggtat ggactactgg gggcaaggga ccacggtcac cgtctcctcc 720

ggaggatgtg gcggtggaaa agtggccgca ctgaaggaga aagttgctgc tttgaaagag 780

aaggtcgccg cacttaagga aaaggtcgca gccctgaaag agggcggcgg gaattct 837

<210> 307

<211> 318

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> h2B6VL5-G3SG4-h3G8VH5-Ecoil-GGGNS-ABD

<400> 307

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys
115 120 125

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
130 135 140

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
145 150 155 160

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr

165 170 175

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys

180 185 190

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala

195 200 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly

210 215 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu

225 230 235 240

Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala

245 250 255

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

260 265 270

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly

275 280 285

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu

290 295 300

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro

305 310 315

<210> 308

<211> 954

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> h2B6VL5-G3SG4-h3G8VH5-Ecoil-GGGNS-ABD

<400> 308

gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60

ttcacctgca ggaccagtca gagcattggc acaaacatac actggtacca gcagaaacca 120

gatcagtctc caaagctcct catcaaggag gtttctgagt ctatctctgg agtcccatcg 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct 240

gaagatgctg caacgtatta ctgtcaacaa agtaatacct ggccgttcac gttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt taccctgaga 360

gagtctggcc ctgcgctggt gaagcccaca cagaccctca cactgacttg taccttctct 420

gggttttcac tgagcacttc tggtatgggt gtaggctgga ttcgtcagcc tcccgggaag 480

gctctagagt ggctggcaca catttggtgg gatgatgaca agcgctataa tccagccctg 540

aagagccgac tgacaatctc caaggatacc tccaaaaacc aggtagtcct cacaatgacc 600

aacatggacc ctgtggatac tgccacatac tactgtgctc aaataaaccc cgcctggttt 660

gcttactggg gccaagggac tctggtcact gtgagctccg gaggatgtgg cggtggagaa 720

gtggccgcac tggagaaaga ggttgctgct ttggagaagg aggtcgctgc acttgaaaag 780

gaggtcgcag ccctggagaa aggcggcggg aattctctgg ccgaagcaaa agtgctggcc 840

aaccgcgaac tggataaata tggcgtgagc gattattata agaacctgat taacaacgca 900

aagaccgtgg aaggcgtgaa agcactgatt gatgaaattc tggccgccct gcct 954

<210> 309

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 309

Ala Pro Ser Ser Ser

1 5

<210> 310

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 310

Val Pro Ser Met Gly Ser Ser Ser

1 5

<210> 311

<211> 383

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 311

Met Gly Leu Gly Pro Val Phe Leu Leu Leu Ala Gly Ile Phe Pro Phe

1 5 10 15

Ala Pro Pro Gly Ala Ala Ala Glu Pro His Ser Leu Arg Tyr Asn Leu

20 25 30

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

35 40 45

Val His Leu Asp Gly Gln Pro Phe Leu Arg Cys Asp Arg Gln Lys Cys

50 55 60

Arg Ala Lys Pro Gln Gly Gln Trp Ala Glu Asp Val Leu Gly Asn Lys

65 70 75 80

Thr Trp Asp Arg Glu Thr Arg Asp Leu Thr Gly Asn Gly Lys Asp Leu

85 90 95

Arg Met Thr Leu Ala His Ile Lys Asp Gln Lys Glu Gly Leu His Ser

100 105 110

Leu Gln Glu Ile Arg Val Cys Glu Ile His Glu Asp Asn Ser Thr Arg

115 120 125

Ser Ser Gln His Phe Tyr Tyr Asp Gly Glu Leu Phe Leu Ser Gln Asn

130 135 140

Leu Glu Thr Lys Glu Trp Thr Met Pro Gln Ser Ser Arg Ala Gln Thr

145 150 155 160

Leu Ala Met Asn Val Arg Asn Phe Leu Lys Glu Asp Ala Met Lys Thr

165 170 175

Lys Thr His Tyr His Ala Met His Ala Asp Cys Leu Gln Glu Leu Arg

180 185 190

Arg Tyr Leu Lys Ser Gly Val Val Leu Arg Arg Thr Val Pro Pro Met

195 200 205

Val Asn Val Thr Arg Ser Glu Ala Ser Glu Gly Asn Ile Thr Val Thr

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

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

340 345 350
Pro Val Gly Thr Ser Asp His Arg Asp Ala Thr Gln Leu Gly Phe Gln
355 360 365
Pro Leu Met Ser Asp Leu Gly Ser Thr Gly Ser Thr Glu Gly Ala
370 375 380

<210> 312
<211> 305
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 312
Pro His Ser Leu Arg Tyr Asn Leu Met Val Leu Ser Gln Asp Gly Ser
1 5 10 15

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

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

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

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

Asp Phe Pro Tyr Val Ser Ala Ala Met Pro Cys Phe Val Ile Ile Ile
275 280 285
Ile Leu Cys Val Pro Cys Cys Lys Lys Lys Thr Ser Ala Ala Glu Gly
290 295 300
Pro
305
<210> 313
<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 313

Gly Phe Asn Arg Gly Glu Cys

1 5

<210> 314

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Linker

<400> 314

Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys

1 5

<210> 315

<211> 241

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TCRVL-HER2VH

<400> 315

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

1 5 10 15

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

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Asp Pro

165 170 175

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

180 185 190

Ala Tyr Leu Gln Val Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr

195 200 205

Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp

210 215 220

Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Phe Asn Arg Gly Glu

225 230 235 240

Cys

<210> 316

<211> 723

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TCRVL-HER2VH

<400> 316

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gtgccacctc aagtgtaagt tacatgcact ggtatcagca gaaaccaggg 120

aaagccccta agcgctggat ctatgacaca tccaaactgg cttctggggt cccatcaagg 180

ttcagcggca gtggatctgg gacagaattt actctcacaa tcagcagcct gcagcctgaa 240

gattttgcaa cttattactg tcagcagtgg agtagtaacc cgctcacgtt tggccagggg 300

accaagcttg agatcaaagg aggcggatcc ggcggcggag gccaggttca gctgcagcag 360

tctgggccag agcttgtgaa gccaggggcc tcactcaagt tgtcctgtac agcttctggc 420

ttcaacatta aagacaccta tatacactgg gtgaaacaga ggcctgaaca gggcctggaa 480

tggattggaa ggatttatcc tacgaatggt tatactagat atgacccgaa gttccaggac 540

aaggccacta taacagcaga cacatcctcc aacacagcct acctgcaggt cagccgcctg 600

acatctgagg acactgccgt ctattattgt tctagatggg gaggggacgg cttctatgct 660

atggactact ggggtcaagg agcctcggtc accgtgagct ccggattcaa caggggagag 720

tgt 723

<210> 317

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HER2VL-TCRVH

<400> 317

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly His Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
115 120 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe
130 135 140

Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145 150 155 160
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn

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

225 230 235 240
Ser Cys

<210> 318
<211> 726
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> HER2VL-TCRVH
<400> 318
gacatcgtga tgacccagtc ccacaagttc atgtccacct ctgtgggcga tagggtcagc 60
atcacctgca aggccagcca ggatgtgaat actgctgtag cctggtatca gcagaaacca 120
ggacattctc ccaaactgct gatttactcc gcatccttcc ggtacactgg agtccctgat 180
cgcttcactg gcagcagatc tgggacagat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct 240
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatacta cacctcccac cttcggaggg 300

ggtaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt tcagctggtg 360
cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggg gcctcagtga aggtctcctg caaggccagc 420
ggttacaagt ttaccagcta cgtgatgcac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt 480
gagtggatcg gatatattaa tccttacaat gatgttacta agtacaatga gaagttcaaa 540
ggcagagtca cgattaccgc ggacaaatcc acgagcacag cctacatgga gctgagcagc 600
ctgagatccg aggacacggc cgtgcactac tgtgcgagag ggagctacta tgattacgac 660

gggtttgttt actggggcca agggactctg gtcactgtga gctccggagt tgagcccaaa 720

tcttgt 726

<210> 319

<211> 273

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TCRVL-HER2VH-E coil

<400> 319

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro
115 120 125

Gly Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
130 135 140

Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu
145 150 155 160

Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Asp Pro
165 170 175

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

180 185 190

Ala Tyr Leu Gln Val Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr

195 200 205

Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp

210 215 220

Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly

225 230 235 240

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val

245 250 255

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Gly Gly Gly Asn

260 265 270

Ser

<210> 320

<211> 819

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TCRVL-HER2VH-E coil

<400> 320

Gly Ala Ala Ala Thr Thr Gly Thr Gly Thr Thr Gly Ala Cys Ala Cys

1 5 10 15

Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Cys Cys Ala Cys Cys Cys Thr

20 25 30

Gly Thr Cys Thr Thr Thr Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Gly Gly

35 40 45

Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Cys Cys Ala Cys Cys Cys Thr Cys Thr

50 55 60

Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Thr Gly Cys Cys Ala Cys Cys Thr Cys

65 70 75 80

Ala Ala Gly Thr Gly Thr Ala Ala Gly Thr Thr Ala Cys Ala Thr Gly

85 90 95

Cys Ala Cys Thr Gly Gly Thr Ala Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala

100 105 110

Ala Ala Cys Cys Ala Gly Gly Gly Ala Ala Ala Gly Cys Cys Cys Cys

115 120 125

Thr Ala Ala Gly Cys Gly Cys Thr Gly Gly Ala Thr Cys Thr Ala Thr

130 135 140

Gly Ala Cys Ala Cys Ala Thr Cys Cys Ala Ala Ala Cys Thr Gly Gly

145 150 155 160

Cys Thr Thr Cys Thr Gly Gly Gly Gly Thr Cys Cys Cys Ala Thr Cys

165 170 175

Ala Ala Gly Gly Thr Thr Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Ala Gly Thr

180 185 190

Gly Gly Ala Thr Cys Thr Gly Gly Gly Ala Cys Ala Gly Ala Ala Thr

195 200 205

Thr Thr Ala Cys Thr Cys Thr Cys Ala Cys Ala Ala Thr Cys Ala Gly

210 215 220

Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Ala Ala

225 230 235 240

Gly Ala Thr Thr Thr Thr Gly Cys Ala Ala Cys Thr Thr Ala Thr Thr

245 250 255

Ala Cys Thr Gly Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr Gly Gly Ala Gly

260 265 270

Thr Ala Gly Thr Ala Ala Cys Cys Cys Gly Cys Thr Cys Ala Cys Gly

275 280 285

Thr Thr Thr Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Gly Ala Cys Cys Ala

290 295 300

Ala Gly Cys Thr Thr Gly Ala Gly Ala Thr Cys Ala Ala Ala Gly Gly

305 310 315 320

Ala Gly Gly Cys Gly Gly Ala Thr Cys Cys Gly Gly Cys Gly Gly Cys

325 330 335

Gly Gly Ala Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Thr Thr Cys Ala Gly Cys

340 345 350

Thr Gly Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Gly Cys Cys

355 360 365

Ala Gly Ala Gly Cys Thr Thr Gly Thr Gly Ala Ala Gly Cys Cys Ala

370 375 380

Gly Gly Gly Gly Cys Cys Thr Cys Ala Cys Thr Cys Ala Ala Gly Thr

385 390 395 400

Thr Gly Thr Cys Cys Thr Gly Thr Ala Cys Ala Gly Cys Thr Thr Cys

405 410 415

Thr Gly Gly Cys Thr Thr Cys Ala Ala Cys Ala Thr Thr Ala Ala Ala

420 425 430

Gly Ala Cys Ala Cys Cys Thr Ala Thr Ala Thr Ala Cys Ala Cys Thr

435 440 445

Gly Gly Gly Thr Gly Ala Ala Ala Cys Ala Gly Ala Gly Gly Cys Cys

450 455 460

Thr Gly Ala Ala Cys Ala Gly Gly Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Ala

465 470 475 480

Thr Gly Gly Ala Thr Thr Gly Gly Ala Ala Gly Gly Ala Thr Thr Thr

485 490 495

Ala Thr Cys Cys Thr Ala Cys Gly Ala Ala Thr Gly Gly Thr Thr Ala

500 505 510

Thr Ala Cys Thr Ala Gly Ala Thr Ala Thr Gly Ala Cys Cys Cys Gly

515 520 525

Ala Ala Gly Thr Thr Cys Cys Ala Gly Gly Ala Cys Ala Ala Gly Gly

530 535 540

Cys Cys Ala Cys Thr Ala Thr Ala Ala Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala

545 550 555 560

Cys Ala Cys Ala Thr Cys Cys Thr Cys Cys Ala Ala Cys Ala Cys Ala

565 570 575

Gly Cys Cys Thr Ala Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Gly Thr Cys Ala

580 585 590

Gly Cys Cys Gly Cys Cys Thr Gly Ala Cys Ala Thr Cys Thr Gly Ala

595 600 605

Gly Gly Ala Cys Ala Cys Thr Gly Cys Cys Gly Thr Cys Thr Ala Thr

610 615 620

Thr Ala Thr Thr Gly Thr Thr Cys Thr Ala Gly Ala Thr Gly Gly Gly

625 630 635 640

Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ala Cys Gly Gly Cys Thr Thr Cys Thr Ala

645 650 655

Thr Gly Cys Thr Ala Thr Gly Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly

660 665 670

Gly Gly Thr Cys Ala Ala Gly Gly Ala Gly Cys Cys Thr Cys Gly Gly

675 680 685

Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Gly Ala Gly Cys Thr Cys Cys Gly Gly

690 695 700

Ala Gly Gly Ala Thr Gly Thr Gly Gly Cys Gly Gly Thr Gly Gly Ala

705 710 715 720

Gly Ala Ala Gly Thr Gly Gly Cys Cys Gly Cys Ala Cys Thr Gly Gly

725 730 735

Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Gly Thr Thr Gly Cys Thr Gly Cys

740 745 750

Thr Thr Thr Gly Gly Ala Gly Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gly Thr Cys

755 760 765

Gly Cys Thr Gly Cys Ala Cys Thr Thr Gly Ala Ala Ala Ala Gly Gly

770 775 780

Ala Gly Gly Thr Cys Gly Cys Ala Gly Cys Cys Cys Thr Gly Gly Ala

785 790 795 800

Gly Ala Ala Ala Gly Gly Cys Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ala Ala Thr

805 810 815

Thr Cys Thr

<210> 321

<211> 274

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HER2VL-TCRVH-K coil

<400> 321

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly His Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly

100 105 110

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

115 120 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe

130 135 140

Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn

165 170 175

Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser

180 185 190

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

195 200 205

His Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr

210 215 220

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

225 230 235 240

Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys

245 250 255

Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Gly Gly Gly

260 265 270

Asn Ser

<210> 322

<211> 822

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HER2VL-TCRVH-K coil

<400> 322

gacatcgtga tgacccagtc ccacaagttc atgtccacct ctgtgggcga tagggtcagc 60

atcacctgca aggccagcca ggatgtgaat actgctgtag cctggtatca gcagaaacca 120

ggacattctc ccaaactgct gatttactcc gcatccttcc ggtacactgg agtccctgat 180

cgcttcactg gcagcagatc tgggacagat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct 240

gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatacta cacctcccac cttcggaggg 300

ggtaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt tcagctggtg 360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggg gcctcagtga aggtctcctg caaggccagc 420

ggttacaagt ttaccagcta cgtgatgcac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt 480

gagtggatcg gatatattaa tccttacaat gatgttacta agtacaatga gaagttcaaa 540

ggcagagtca cgattaccgc ggacaaatcc acgagcacag cctacatgga gctgagcagc 600

ctgagatccg aggacacggc cgtgcactac tgtgcgagag ggagctacta tgattacgac 660

gggtttgttt actggggcca agggactctg gtcactgtga gctccggagg atgtggcggt 720

ggaaaagtgg ccgcactgaa ggagaaagtt gctgctttga aagagaaggt cgccgcactt 780

aaggaaaagg tcgcagccct gaaagagggc ggcgggaatt ct 822