(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0092932
(43) 공개일자 2023년06월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2818 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-7014700
(22) 출원일자(국제) 2021년10월13일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년04월28일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2021/123438
(87) 국제공개번호 WO 2022/078357
국제공개일자 2022년04월21일
(30) 우선권주장
PCT/CN2020/120918 2020년10월14일 중국(CN)
PCT/CN2021/085335 2021년04월02일 중국(CN)

(71) 출원인
유큐(베이징) 바이오파마 코., 엘티디
중국 102629 베이징 다싱 디스트릭트, 다싱 바이오-메디슨 인더스트리 파크, 바오션 사우스 스트리트, 넘버12, 빌딩 1 플로어 4 룸 406
(72) 발명자
리우, 바이홍
중국, 베이징 102600, 다싱 디스트릭트, 다싱 바이오-메디슨 인더스트리 파크, 바오션 사우스 스트리트, 넘버 12
양, 이
중국, 베이징 102600, 다싱 디스트릭트, 다싱 바이오-메디슨 인더스트리 파크, 바오션 사우스 스트리트, 넘버 12
쉔, 유에레이
중국, 베이징 102600, 다싱 디스트릭트, 다싱 바이오-메디슨 인더스트리 파크, 바오션 사우스 스트리트, 넘버 12
(74) 대리인
한라특허법인(유한)

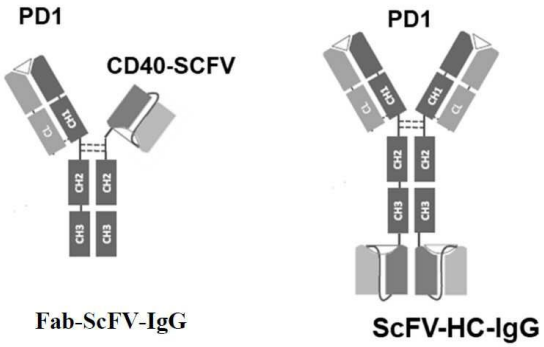
전체 청구항 수 : 총 92 항

(54) 발명의 명칭 **항 PD-1/CD40 이중특이성 항체 및 그 용도**

(57) 요 약

본 개시는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트)에 관한 것으로, 해당 항원 결합 단백질 작제물은 두 가지 상이한 항원(예를 들어, PD-1 및 CD40)에 특이적으로 결합한다.

대 표 도 - 도1



도 1A 도 1B

(52) CPC특허분류
C07K 16/2878 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2317/64 (2013.01)
C07K 2317/71 (2013.01)
C07K 2317/75 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

PD-1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 CD40에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하는 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 부위는 PD-1을 발현하는 세포에 결합하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제2 항원 결합 부위는 CD40을 발현하는 세포에 결합하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 작제물은 CD40 통로를 활성화시킬 수 있는 것으로, 상기 CD40 통로의 활성화는 상기 항원 결합 단백질 작제물과 PD-1을 발현하는 세포의 결합에 의해 결정되는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 작제물은 PD-1을 발현하는 하나 이상의 세포가 존재하는 경우 CD40 통로의 활성화를 유도하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 작제물은 종양 미세환경 또는 종양 배수 림프절에서 CD40 통로의 활성화를 유도하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 작제물은 PD-1을 발현하는 하나 이상의 세포가 존재하지 않는 경우 CD40 통로의 활성화를 유도하지 않는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, PD-1을 발현하는 상기 세포는 T세포, B세포, NK 세포 또는 골수성 세포(예를 들어, 대식세포, 골수 유래 억제 세포(MDSC))인, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, CD40을 발현하는 상기 세포는 항원제시세포인, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 작제물은 Fc 영역을 포함하는 것으로, 상기 제2 항원 결합 부위가 상기 Fc 영역에 연결되는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 작제물은 Fc 영역을 포함하는 것으로, 상기 제2 항원 결합 부위가 상기 Fc 영역의 C말단에 연결되는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 작제물은 Fc 영역을 포함하는 것으로, 상기 항원 결합 단백질 작제물은 Fc 수용체에 의해 매개된 메커니즘을 통해 CD40 통로를 활성화시킬 수 없는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 작제물은 이중특이성 항체인, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, PD-1에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 부위는 ScFv 또는 VHH 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 15

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, PD-1에 특이적으로 결합하는 상기 항원 결합 부위는 PD-1 리간드(예를 들어, PD-L1) 또는 그 가용성 부분을 포함하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, CD40에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 부위는 ScFv 또는 VHH 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 17

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, CD40에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 부위는 CD40 리간드(예를 들어, CD40L) 또는 그 가용성 부분을 포함하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 부위는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 19

제18항에 있어서, 여기서

상기 제1 항원 결합 부위의 상기 중쇄 가변 영역(VH1)은 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 것으로, 상기 VH1 CDR1 영역은 선택된 VH1 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VH1 CDR2 영역은 선택된 VH1 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VH1 CDR3 영역은 선택된 VH1 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 및

상기 제1 항원 결합 부위의 상기 경쇄 가변 영역(VL1)은 CDR1, 2 및 3을 포함하는 것으로, 상기 VL1 CDR1 영역은 선택된 VL1 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VL1 CDR2 영역은 선택된 VL1 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VL1 CDR3 영역은 선택된 VL1 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고;

여기서, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 다음 중 하나인, 항원 결합 단백질 작제물:

(1) Kabat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 1, 2 및 3에 제시된 바와 같고, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 4, 5 및 6에 제시된 바와 같음;

(2) Chothiat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 19, 20 및 21에 제시된 바와 같고, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 22, 23 및 24에 제시된 바와 같음;

(3) Kabat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 7, 8 및 9에 제시된 바와 같고, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 10, 11 및 12에 제시된 바와 같음;

(4) Chothiat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 25, 26 및 27에 제시된 바와 같고, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 28, 29 및 30에 제시된 바와 같음;

(5) Kabat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 13, 14 및 15에 제시된 바와 같고, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 16, 17 및 18에 제시된 바와 같음; 및

(6) Chothiat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 31, 32 및 33에 제시된 바와 같고, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 34, 35 및 36에 제시된 바와 같음.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 항원 결합 부위는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 21

제20항에 있어서, 여기서

상기 제2 항원 결합 부위의 상기 중쇄 가변 영역(VH2)은 CDR1, 2 및 3을 포함하는 것으로, 상기 VH2 CDR1 영역은 선택된 VH2 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VH2 CDR2 영역은 선택된 VH2 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VH2 CDR3

영역은 선택된 VH2 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 및

상기 제2 항원 결합 부위의 상기 경쇄 가변 영역(VL2)은 CDR1, 2 및 3을 포함하는 것으로, 상기 VL2 CDR1 영역은 선택된 VL2 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VL2 CDR2 영역은 선택된 VL2 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VL2 CDR3 영역은 선택된 VL2 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고;

여기서, 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열 및 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 다음 중 하나인, 항원 결합 단백질 작제물:

(1) Kabat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 59, 60 및 61에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 62, 63 및 64에 제시된 바와 같음;

(2) Chothiat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 77, 78 및 79에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 80, 81 및 82에 제시된 바와 같음;

(3) Kabat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 65, 66 및 67에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 68, 69 및 70에 제시된 바와 같음;

(4) Chothiat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 83, 84 및 85에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 86, 87 및 88에 제시된 바와 같음;

(5) Kabat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 71, 72 및 73에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 74, 75 및 76에 제시된 바와 같음; 및

(6) Chothiat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 89, 90 및 91에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 92, 93 및 94에 제시된 바와 같음.

청구항 22

항원 결합 단백질 작제물, 상기 항원 결합 단백질 작제물은

서로 결합되어 PD-1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위를 형성하는 제1 중쇄 가변 영역 및 제1 경쇄 가변 영역; 및

서로 결합되어 CD40에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 형성하는 제2 중쇄 가변 영역 및 제2 경쇄 가변 영역;을 포함하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 작제물은

상기 제1 중쇄 가변 영역, 제1 중쇄 고정 영역 2(CH2) 및 제1 중쇄 고정 영역 3(CH3)을 포함하는 제1 폴리펩티드; 및

상기 제2 중쇄 가변 영역, 제2 중쇄 고정 영역 2(CH2) 및 제2 중쇄 고정 영역 3(CH3)을 포함하는 제2 폴리펩티드;를 포함하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 작제물은

상기 제1 경쇄 가변 영역을 포함하는 제3 폴리펩티드; 및

상기 제2 경쇄 가변 영역을 포함하는 제4 폴리펩티드;를 포함하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 25

제23항에 있어서, 상기 제2 폴리펩티드는 상기 제2 경쇄 가변 영역을 또한 포함하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 작제물은 상기 제1 경쇄 가변 영역을 포함하는 제3 폴리펩티드를 포함하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 27

제23항 또는 제25항에 있어서, 상기 제1 폴리펩티드는 상기 제1 경쇄 가변 영역을 또한 포함하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 28

제22항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 작제물은

상기 제1 중쇄 가변 영역, 상기 제2 중쇄 가변 영역 및 상기 제2 경쇄 가변 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드; 및

상기 제1 경쇄 가변 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드;를 포함하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 제1 폴리펩티드는 중쇄 고정 영역 1(CH1), 중쇄 고정 영역 2(CH2) 및 중쇄 고정 영역 3(CH3)을 또한 포함하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 30

제22항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서

상기 제1 중쇄 가변 영역(VH1)은 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 것으로, 상기 VH1 CDR1 영역은 선택된 VH1 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VH1 CDR2 영역은 선택된 VH1 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VH1 CDR3 영역은 선택된 VH1 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 및

상기 제1 경쇄 가변 영역(VL1)은 CDR1, 2 및 3을 포함하는 것으로, 상기 VL1 CDR1 영역은 선택된 VL1 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VL1 CDR2 영역은 선택된 VL1 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VL1 CDR3 영역은, 선택된 VL1 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고;

여기서, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 다음 중 하나인, 항원 결합 단백질 작제물:

(1) Kabat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 1, 2 및 3에 제시

된 바와 같고, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 4, 5 및 6에 제시된 바와 같음;

(2) Chothiat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 19, 20 및 21에 제시된 바와 같고, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 22, 23 및 24에 제시된 바와 같음;

(3) Kabat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 7, 8 및 9에 제시된 바와 같고, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 10, 11 및 12에 제시된 바와 같음;

(4) Chothiat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 25, 26 및 27에 제시된 바와 같고, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 28, 29 및 30에 제시된 바와 같음;

(5) Kabat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 13, 14 및 15에 제시된 바와 같고, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 16, 17 및 18에 제시된 바와 같음; 및

(6) Chothiat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 31, 32 및 33에 제시된 바와 같고, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 34, 35 및 36에 제시된 바와 같음.

청구항 31

제22항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서

상기 제2 중쇄 가변 영역(VH2)은 CDR1, 2 및 3을 포함하는 것으로, 상기 VH2 CDR1 영역은 선택된 VH2 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VH2 CDR2 영역은 선택된 VH2 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VH2 CDR3 영역은 선택된 VH2 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 및

상기 제2 경쇄 가변 영역(VL2)은 CDR1, 2 및 3을 포함하는 것으로, 상기 VL2 CDR1 영역은 선택된 VL2 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VL2 CDR2 영역은 선택된 VL2 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VL2 CDR3 영역은 선택된 VL2 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고;

여기서, 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열 및 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 다음 중 하나인, 항원 결합 단백질 작제물:

(1) Kabat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 59, 60 및 61에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 62, 63 및 64에 제시된 바와 같음;

(2) Chothiat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 77, 78 및 79에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 80, 81 및 82에 제시된 바와 같음;

(3) Kabat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 65, 66 및 67에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 68, 69 및 70에 제시된 바와 같음;

(4) Chothiat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 83, 84 및 85에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 86, 87 및 88에 제시된 바와 같음;

(5) Kabat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 71, 72 및 73에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 74, 75 및 76에 제시된 바와 같음; 및

(6) Chothiat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 89, 90 및 91에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 92, 93 및 94에 제시된 바와 같음.

청구항 32

제30항 또는 제31항에 있어서, 여기서

(1) Kabat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 1, 2 및 3에 제시된 바와 같고, 또한 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 4, 5 및 6에 제시된 바와 같으며; 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 65, 66 및 67에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 68, 69 및 70에 제시된 바와 같고; 또는

(2) Chothia 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 19, 20 및 21에 제시된 바와 같고, 또한 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 22, 23 및 24에 제시된 바와 같으며; 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 83, 84 및 85에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 86, 87 및 88에 제시된 바와 같은, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 33

제22항 내지 제32중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 40, 41, 42 또는 53과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 제1 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 43, 44, 45 또는 54와 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 34

제22항 내지 제31중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 46, 47, 48, 49 또는 55와 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 제1 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 50, 51, 52 또는 56과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 35

제22항 내지 제31중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 57과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 제1 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 58과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 36

제22항 내지 제31중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 98, 99, 100 또는 120과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 제2 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 101, 102, 103, 104 또는 121과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 37

제22항 내지 제32중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 105, 106, 107, 108, 122, 126 또는 128과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 제2 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 109, 110, 111, 123, 127 또는 129와 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함

하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 38

제22항 내지 제31중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 112, 113, 114, 115 또는 124와 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 제2 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119 또는 125와 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 39

제22항 내지 제32항, 제33항 및 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 41과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 제1 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 45와 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하며, 상기 제2 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 108 또는 126과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 제2 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 110 또는 127과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 40

제26항에 있어서, 상기 제1 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 130과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 제3 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 131과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 41

제26항 또는 제40항에 있어서, 상기 제2 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 132 또는 133과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 42

제26항에 있어서, 상기 제1 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 130과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고; 상기 제2 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 132 또는 133과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하며; 상기 제3 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 131과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 43

제28항 또는 제29항에 있어서, 상기 제1 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 134 또는 135와 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 제2 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 136과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 44

제28항 또는 제29항에 있어서, 상기 제1 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 137 또는 138과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 제2 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 139와 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 작제물은 이중특이성 항체인, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 46

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 작제물은 Fab-scFv-Fc인, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 47

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 작제물은 TrioMab, 공유 경쇄를 갖는 이중특이성 항체, CrossMab, 2:1 CrossMab, 2:2 CrossMab, Duobody, 이중 가변 도메인 항체(DVD-Ig), scFv-IgG, IgG-IgG 형식 항체, Fab-scFv-Fc 형식 항체, TF, ADAPTIR, 이중특이성 T세포 관여항체(BiTE), BiTE-Fc, 이중친화적 재표적화 항체(DART), DART-Fc, 4가 DART, 직렬 이중 항체(TandAb), scFv-scFv-scFv, ImmTAC, 삼중특이성 나노항체 또는 삼중특이성 킬러 관여항체(TriKE)인, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 48

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, IgG1 또는 IgG4 유래의 하나 이상의 중쇄 고정 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 49

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 작제물은 하나 이상의 중쇄 고정 도메인을 포함하며, 상기 하나 이상의 중쇄 고정 도메인은 LALA 돌연변이 및/또는 놉-인투-홀(KIH) 돌연변이를 포함하는, 항원 결합 단백질 작제물.

청구항 50

이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트, 상기 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는

제1 중쇄 가변 영역을 포함하는 제1 중쇄 폴리펩티드;

제1 경쇄 가변 영역을 포함하는 제1 경쇄 폴리펩티드;

제2 중쇄 가변 영역을 포함하는 제2 중쇄 폴리펩티드; 및

제2 경쇄 가변 영역을 포함하는 제2 경쇄 폴리펩티드;를 포함하는 것으로,

상기 제1 중쇄 가변 영역 및 상기 제1 경쇄 가변 영역은 서로 결합되어 PD-1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 제2 중쇄 가변 영역 및 상기 제2 경쇄 가변 영역은 서로 결합되어 CD40에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 형성하는, 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트.

청구항 51

제50항에 있어서, 상기 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 다음을 포함하는 것으로

상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 상기 제1 중쇄 가변 영역(VH1), 상기 VH1 CDR1 영역은 선택된 VH1

CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VH1 CDR2 영역은 선택된 VH1 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VH1 CDR3 영역은 선택된 VH1 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고;

CDR1, 2 및 3을 포함하는 상기 제1 경쇄 가변 영역(VL1), 상기 VL1 CDR1 영역은 선택된 VL1 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VL1 CDR2 영역은 선택된 VL1 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VL1 CDR3 영역은 선택된 VL1 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고;

상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 상기 제2 중쇄 가변 영역(VH2), 상기 VH2 CDR1 영역은 선택된 VH2 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VH2 CDR2 영역은, 선택된 VH2 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VH2 CDR3 영역은 선택된 VH2 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 및

CDR1, 2 및 3을 포함하는 상기 제2 경쇄 가변 영역(VL2), 상기 VL2 CDR1 영역은 선택된 VL2 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VL2 CDR2 영역은 선택된 VL2 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VL2 CDR3 영역은 선택된 VL2 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며;

여기서, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열, 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열 및 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 다음 중 하나인, 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트:

(1) Kabat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 1, 2 및 3에 제시된 바와 같고, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 4, 5 및 6에 제시된 바와 같으며; 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 65, 66 및 67에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 68, 69 및 70에 제시된 바와 같음; 및

(2) Chothia 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 19, 20 및 21에 제시된 바와 같고, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 22, 23 및 24에 제시된 바와 같으며; 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 83, 84 및 85에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 86, 87 및 88에 제시된 바와 같음.

청구항 52

제50항 또는 제51항에 있어서, 상기 제1 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 41과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 제1 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 45와 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 제2 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 108 또는 126과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하며, 상기 제2 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 110 또는 127과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트.

청구항 53

제50항 내지 제52중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 중쇄 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 130과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 제1 경쇄 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 131과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트.

청구항 54

이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트, 상기 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는

제1 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 폴리펩티드;

제1 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄 폴리펩티드; 및

제2 중쇄 가변 영역 및 제2 경쇄 가변 영역을 포함하는 단쇄 가변 프래그먼트 폴리펩티드;를 포함하는 것으로,

상기 제1 중쇄 가변 영역 및 상기 제1 경쇄 가변 영역은 서로 결합되어 PD-1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 제2 중쇄 가변 영역 및 상기 제2 경쇄 가변 영역은 서로 결합되어 CD40에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 형성하는, 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트.

청구항 55

제54항에 있어서, 상기 단쇄 가변 프래그먼트 폴리펩티드는 N말단에서 C말단까지 상기 제2 중쇄 가변 영역, 링커 펩티드 서열, 상기 제2 경쇄 가변 영역, 중쇄 고정 영역 2(CH2) 및 중쇄 고정 영역 3(CH3)을 포함하는, 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트.

청구항 56

제55항에 있어서, 상기 링커 펩티드 서열은 ASTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO: 152)와 적어도 80%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트.

청구항 57

제54항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 다음을 포함하는 것으로

상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 상기 제1 중쇄 가변 영역(VH1), 상기 VH1 CDR1 영역은 선택된 VH1 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VH1 CDR2 영역은 선택된 VH1 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VH1 CDR3 영역은 선택된 VH1 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고;

CDR1, 2 및 3을 포함하는 상기 제1 경쇄 가변 영역(VL1), 상기 VL1 CDR1 영역은 선택된 VL1 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VL1 CDR2 영역은 선택된 VL1 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VL1 CDR3 영역은 선택된 VL1 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고;

상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 상기 제2 중쇄 가변 영역(VH2), 상기 VH2 CDR1 영역은 선택된 VH2 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VH2 CDR2 영역은, 선택된 VH2 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VH2 CDR3 영역은 선택된 VH2 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 및

CDR1, 2 및 3을 포함하는 상기 제2 경쇄 가변 영역(VL2), 상기 VL2 CDR1 영역은 선택된 VL2 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VL2 CDR2 영역은 선택된 VL2 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VL2 CDR3 영역은 선택된 VL2 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며;

여기서, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열, 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열 및 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 다음 중 하나인, 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트:

(1) Kabat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 1, 2 및 3에 제시된 바와 같고, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 4, 5 및 6에 제시된 바와 같으며; 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 65, 66 및 67에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 68, 69 및 70에 제시된 바와 같음; 및

(2) Chothia 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 19, 20 및 21에 제시된 바와 같고, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 22, 23 및 24에 제시된 바와 같으며; 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 83, 84 및 85에 제시된 바와 같고, 선택된

VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 86, 87 및 88에 제시된 바와 같음.

청구항 58

제54항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 41과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 제1 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 45와 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 제2 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 108 또는 126과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하며, 상기 제2 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 110 또는 127과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트.

청구항 59

제54항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서

(1) 상기 중쇄 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 130과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 경쇄 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 131과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고; 및

(2) 상기 단쇄 가변 프래그먼트 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 132 또는 133과 적어도 80%, 85%, 90%, 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트.

청구항 60

이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트, 상기 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는

제1 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 폴리펩티드; 및

제1 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄 폴리펩티드;를 포함하는 것으로,

여기서, 하나의 단쇄 가변 프래그먼트 폴리펩티드는 상기 중쇄 폴리펩티드의 C말단에 연결되고; 상기 단쇄 가변 프래그먼트는 제2 중쇄 가변 영역 및 제2 경쇄 가변 영역을 포함하며,

상기 제1 중쇄 가변 영역 및 상기 제1 경쇄 가변 영역은 서로 결합되어 PD-1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 제2 중쇄 가변 영역 및 상기 제2 경쇄 가변 영역은 서로 결합되어 CD40에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 형성하는, 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트.

청구항 61

제60항에 있어서, 상기 단쇄 가변 프래그먼트 폴리펩티드는 제1 링커 펩티드 서열을 통해 상기 제1 중쇄 폴리펩티드에 연결되는, 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트.

청구항 62

제61항에 있어서, 상기 제1 링커 펩티드 서열은 GGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO: 153)와 적어도 80%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트.

청구항 63

제60항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단쇄 가변 프래그먼트 폴리펩티드는 N말단에서 C말단까지 상기 제2 중쇄 가변 영역, 제2 링커 펩티드 서열 및 상기 제2 중쇄 가변 영역을 포함하는, 이중특이성 항체 또는

그 항원 결합 프래그먼트.

청구항 64

제63항에 있어서, 상기 제2 링커 펩티드 서열은 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO: 154)와 적어도 80%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트.

청구항 65

제60항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 다음을 포함하는 것으로

상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 상기 제1 중쇄 가변 영역(VH1), 상기 VH1 CDR1 영역은 선택된 VH1 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VH1 CDR2 영역은 선택된 VH1 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VH1 CDR3 영역은 선택된 VH1 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고;

CDR1, 2 및 3을 포함하는 상기 제1 경쇄 가변 영역(VL1), 상기 VL1 CDR1 영역은 선택된 VL1 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VL1 CDR2 영역은 선택된 VL1 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VL1 CDR3 영역은 선택된 VL1 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고;

상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 상기 제2 중쇄 가변 영역(VH2), 상기 VH2 CDR1 영역은 선택된 VH2 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VH2 CDR2 영역은, 선택된 VH2 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VH2 CDR3 영역은 선택된 VH2 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 및

CDR1, 2 및 3을 포함하는 상기 제2 경쇄 가변 영역(VL2), 상기 VL2 CDR1 영역은 선택된 VL2 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VL2 CDR2 영역은 선택된 VL2 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VL2 CDR3 영역은 선택된 VL2 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며;

여기서, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열, 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열 및 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 다음 중 하나인, 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트:

(1) Kabat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 1, 2 및 3에 제시된 바와 같고, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 4, 5 및 6에 제시된 바와 같으며; 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 65, 66 및 67에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 68, 69 및 70에 제시된 바와 같음; 및

(2) Chothia 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 19, 20 및 21에 제시된 바와 같고, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 22, 23 및 24에 제시된 바와 같으며; 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 83, 84 및 85에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 86, 87 및 88에 제시된 바와 같음.

청구항 66

제60항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 41과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 제1 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 45와 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 제2 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 108 또는 126과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하며, 상기 제2 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 110 또는 127과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합

프래그먼트.

청구항 67

제60항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서

(1) 상기 중쇄 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 134 또는 135와 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고; 및

(2) 상기 경쇄 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 136과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트.

청구항 68

제60항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서

(1) 상기 중쇄 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 137 또는 138과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고; 및

(2) 상기 경쇄 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 139와 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트.

청구항 69

이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트, 상기 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는:

Fc 영역을 포함하는 항체, 상기 항체는 표적에 특이적으로 결합하고; 및

CD40에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위;를 포함하는 것으로,

상기 항원 결합 부위는 상기 항체의 Fc 영역에 연결되는, 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트.

청구항 70

제69항에 있어서, 상기 이중특이성 항체는 상기 표적을 발현하는 하나 이상의 세포가 존재하는 경우 면역 세포 중 CD40 통로의 활성화를 유도하는, 이중특이성 항체.

청구항 71

제69항에 있어서, 상기 이중특이성 항체는 CD40 통로를 활성화시킬 수 있는 것으로, 상기 CD40 통로의 활성화는 상기 항원 결합 단백질 작제물과 상기 표적을 발현하는 세포의 결합에 의해 결정되는, 이중특이성 항체.

청구항 72

제69항에 있어서, 상기 이중특이성 항체는 종양 미세환경 또는 종양 배수 림프절에서 CD40 통로의 활성화를 유도하는, 이중특이성 항체.

청구항 73

제69항에 있어서, 상기 이중특이성 항체는 상기 표적을 발현하는 하나 이상의 세포가 존재하지 않는 경우 CD40 통로의 활성화를 유도하지 않는, 이중특이성 항체.

청구항 74

제69항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이성 항체는 Fc에 의해 매개된 메커니즘을 통해 CD40 통로를 활성화시킬 수 없는, 이중특이성 항체.

청구항 75

제69항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적은 면역 체크포인트 분자인, 이중특이성 항체.

청구항 76

제69항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적은 암 특이성 항원 또는 암 관련 항원인, 이중특이성 항체.

청구항 77

제69항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적은 PD-1인, 이중특이성 항체.

청구항 78

제69항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, CD40에 특이적으로 결합하는 상기 항원 결합 부위는 ScFv 또는 VHH 도메인을 포함하는, 이중특이성 항체.

청구항 79

제69항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, CD40에 특이적으로 결합하는 상기 항원 결합 부위는 CD40 리간드(예를 들어, CD40L) 또는 그 가용성 부분을 포함하는, 이중특이성 항체.

청구항 80

제69항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, CD40에 특이적으로 결합하는 상기 항원 결합 부위는 상기 Fc 영역의 C말단에 연결되는, 이중특이성 항체.

청구항 81

제69항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, CD40에 특이적으로 결합하는 상기 항원 결합 부위는 상기 Fc 영역에 삽입되는, 이중특이성 항체.

청구항 82

상기 항체 약물 접합체는 치료제와 공유 결합되는 제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 따른 항원 결합 단백질 작제물 또는 제50항 내지 제81항 중 어느 한 항에 따른 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트를 포함하는, 항체 약물 접합체.

청구항 83

제82항에 있어서, 상기 치료제는 세포 독성제 또는 세포 억제제인, 항체 약물 접합체.

청구항 84

암을 앓고 있는 피시험자를 치료하는 방법, 상기 방법은 상기 피시험자에게 치료 유효량의 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 상기 조성물은 제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 따른 항원 결합 단백질 작제물, 제50항 내지 제81항 중 어느 한 항에 따른 이중특이성 항체 또는 항원 결합 프래그먼트, 또는 제82항 또는 제83항에 따른 항체 약물 접합체를 포함하는, 방법.

청구항 85

제84항에 있어서, 상기 피시험자는 고형 종양을 앓고 있는, 방법.

청구항 86

제84항에 있어서, 상기 암은 비소세포폐암(NSCLC), 두경부 편평세포암종(SCCHN), 두경부암, 신세포암종(RCC), 흑색종, 방광암, 위암, 요로상피암, 메르켈 세포 암, 삼중 음성 유방암(TNBC) 또는 결장직장암인, 방법.

청구항 87

제84항에 있어서, 상기 암은 흑색종, 췌장암, 중피종 또는 혈액학적 악성종양인, 방법.

청구항 88

제84항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 피시험자에게 항 CTLA4 항체, 항 Her2 항체 또는 표적 종양 관련 항원(TAA)의 항체를 투여하는 단계를 또한 포함하는, 방법.

청구항 89

제84항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 피시험자에게 화학요법을 사용하는 단계를 또한 포함하는, 방법.

청구항 90

종양 성장 속도를 감소시키는 방법, 상기 방법은

이를 필요로 하는 피시험자에게 치료 유효량의 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 상기 조성물은 제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 따른 항원 결합 단백질 작제물, 제50항 내지 제81항 중 어느 한 항에 따른 이중특이성 항체 또는 항원 결합 프래그먼트, 또는 제82항 또는 제83항에 따른 항체 약물 접합체를 포함하는, 방법.

청구항 91

종양 세포를 죽이는 방법, 상기 방법은 상기 종양 세포로 하여금 유효량의 조성물과 접촉하도록 하는 단계를 포함하며, 상기 조성물은 제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 따른 항원 결합 단백질 작제물, 제50항 내지 제81항 중 어느 한 항에 따른 이중특이성 항체 또는 항원 결합 프래그먼트, 또는 제82항 또는 제83항에 따른 항체 약물

접합체를 포함하는, 방법.

청구항 92

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 따른 항원 결합 단백질 작제물, 제50항 내지 제81항 중 어느 한 항에 따른 이중특이성 항체 또는 항원 결합 프래그먼트, 또는 제82항 또는 제83항에 따른 항체 약물 접합체, 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 약물 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **우선권 성명**

[0002] **본 출원은 2020년 10월 14일 제출한 PCT 출원 번호 PCT/CN2020/120918 및 2021년 4월 2일 제출한 PCT 출원 번호 PCT/CN2021/085335에 대한 우선권을 주장하고 요구한다. 이 두 특허의 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 통합된다.**

[0003] **기술분야**

[0004] **본 개시는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트)에 관한 것이다.**

배 경 기 술

[0005] 이중특이성 항체는 두 가지 상이한 유형의 항원 또는 두 가지 상이한 에피토프에 동시에 결합할 수 있는 인공 단백질이다. 이와 같은 이중특이성 항체는 T세포의 종양 세포로의 리디렉션, 상이한 질환 매개체의 이중 표적화 및 페이로드(payload)의 표적 부위로의 전달을 포함한 광범위한 응용을 개척하였다. 카투막소맙(catumaxomab, 항 EpCAM 및 항 CD3) 및 블리나투모맙(blinatumomab, 항 CD19 및 항 CD3)에 대한 승인은 이중특이성 항체의 연구개발에 있어서 중요한 이정표가 되었다.

[0006] 이중특이성 항체는 다양한 응용을 갖는다. 따라서, 이중특이성 항체에 기반한 다양한 치료제에 대한 개발을 계속해 나가야 할 필요성이 있다.

발명의 내용

[0007] 본 개시는 항원 결합 단백질 작제물에 관한 것으로, 해당 항원 결합 단백질 작제물은 두 가지 이상의 상이한 항원(예를 들어, PD-1 및 CD40)에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 PD-1 및 CD40을 표적으로 하는 이중특이성 항체이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이성 항체는 다양한 메커니즘을 통해 암을 효과적으로 치료한다. 예를 들어, 이중특이성 항체는 PD-1/PD-L1 통로를 차단시킴으로써 면역 응답을 활성화시킬 수 있다. 또한, 이중특이성 항체는 항원제시를 촉진하고 APC 세포 중 CD40 통로를 활성화시키기 위하여, T세포와 APC세포를 브리징할 수 있고, 또한 이중특이성 항체는 PD-1 의존적 방식으로 CD40 통로를 활성화시킴으로써, 종양 미세환경 또는 종양 배수 림프절에서의 면역 응답 신호를 증폭시킬 수 있다. 해당 메커니즘은 전반적인 면역 활성을 낮추고, 간에서의 독성과 같은 부작용을 줄일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이성 항체는 Fc 수용체에 의해 매개된(예를 들어, FCγRIIB에 의해 매개된) CD40 군집화(clustering)를 통해 CD40 통로를 활성화시킬 수 없고, 이로써 독성, 예를 들어 고수준의 FCγRIIB를 발현하는 조직(예를 들어, 간) 중의 독성을 한층 더 떨어뜨릴 수 있다.

[0008] 한편으로, 본 개시는 항원 결합 단백질 작제물을 제공한 것으로, 해당 항원 결합 단백질 작제물은 PD-1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 CD40에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함한다.

[0009] 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 PD-1을 발현하는 세포에 결합할 때 CD40 통로의 활성화를 유도한다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 PD-1을 발현하는 하나 이상의 세포가 존재하는 경우 CD40 통로의 활성화를 유도한다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 종양 미세환경 또는 종양 배수 림프절에서 CD40 통로의 활성화를 유도한다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 PD-1을 발현하는 하나

이상의 세포가 존재하지 않는 경우 CD40 통로의 활성화를 유도하지 않는다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 CD40 통로를 활성화시킬 수 있는 것으로, 해당 CD40 통로의 활성화는 항원 결합 단백질 작제물과 PD-1을 발현하는 세포의 결합에 의해 결정된다.

[0010] 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 부위는 PD-1을 발현하는 세포에 결합한다. 일부 실시양태에서, PD-1을 발현하는 세포는 T세포, NK 세포 또는 골수세포(예를 들어, T세포)이다. 일부 실시양태에서, PD-1을 발현하는 세포는 T세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 골수성 세포(예를 들어, 대식세포, 골수 유래 억제 세포(MDSC) 또는 T세포)이다.

[0011] 일부 실시양태에서, 제2 항원 결합 부위는 CD40을 발현하는 세포에 결합한다. 일부 실시양태에서, CD40을 발현하는 세포는 항원제시세포이다.

[0012] 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 항원 결합 부위는 Fc 영역에 연결된다. 일부 실시양태에서, 제2 항원 결합 부위는 Fc 영역의 C말단에 연결된다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 Fc 수용체(예를 들어, FCγRIIB)에 의해 매개된 메커니즘 또는 Fc 수용체(예를 들어, FCγRIIB)에 의해 매개된 군집화를 통해 CD40을 활성화시킬 수 없다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 Fc 수용체(예를 들어, FCγRIIB)에 의해 매개된 군집화를 유도할 수 없다.

[0013] 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 이중특이성 항체이다.

[0014] 일부 실시양태에서, PD-1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위는 ScFv 또는 VHH 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위는 PD-1 리간드(예를 들어, PD-L1) 또는 그 가용성 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, CD40에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위는 ScFv 또는 VHH 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CD40에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위는 CD40 리간드(예를 들어, CD40L) 또는 그 가용성 부분을 포함한다.

[0015] 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 부위는 본원에 기재된 바와 같은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 항원 결합 부위는 본원에 기재된 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0016] 일부 실시양태에서, PD-1 리간드는 SEQ ID NO: 159의 아미노산 19-238과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CD40 리간드는 SEQ ID NO: 160의 아미노산 47-261과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0017] 한편으로, 본 개시는 항원 결합 단백질 작제물에 관한 것으로, 해당 항원 결합 단백질 작제물은 제1 중쇄 가변 영역 및 제1 경쇄 가변 영역; 제2 중쇄 가변 영역 및 제2 경쇄 가변 영역;을 포함하며, 일부 실시양태에서는, 해당 제1 중쇄 가변 영역 및 해당 제1 경쇄 가변 영역은 서로 결합되어, PD-1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위를 형성하고; 일부 실시양태에서는, 해당 제2 중쇄 가변 영역 및 해당 제2 경쇄 가변 영역은 서로 결합되어, CD40에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 형성한다.

[0018] 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 것으로, 해당 제1 폴리펩티드는 제1 중쇄 가변 영역, 제1 중쇄 고정 영역 2(CH2) 및 제1 중쇄 고정 영역 3(CH3)을 포함하며; 해당 제2 폴리펩티드는 제2 중쇄 가변 영역, 제2 중쇄 고정 영역 2(CH2) 및 제2 중쇄 고정 영역 3(CH3)을 포함한다.

[0019] 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 제3 폴리펩티드 및 제4 폴리펩티드를 포함하는 것으로, 해당 제3 폴리펩티드는 제1 경쇄 가변 영역을 포함하고; 해당 제4 폴리펩티드는 제2 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0020] 일부 실시양태에서, 제2 폴리펩티드는 제2 경쇄 가변 영역을 또한 포함한다.

[0021] 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 제3 폴리펩티드를 포함하는 것으로, 해당 제3 폴리펩티드는 제1 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0022] 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 제1 경쇄 가변 영역을 또한 포함한다.

[0023] 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 것으로, 해당 제1 폴리펩티드는 제1 중쇄 가변 영역, 제2 중쇄 가변 영역 및 제2 경쇄 가변 영역을 포함하고; 해당 제2 폴리펩티드는 제1 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0024] 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 중쇄 고정 영역 1(CH1), 중쇄 고정 영역 2(CH2) 및 중쇄 고정 영역

3(CH3)을 또한 포함한다.

[0025] 일부 실시양태에서, 제1 중쇄 가변 영역(VH1)은 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함한다. 일부 실시양태에서, VH1 CDR1 영역은 선택된 VH1 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, VH1 CDR2 영역은 선택된 VH1 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, VH1 CDR3 영역은 선택된 VH1 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 제1 경쇄 가변 영역(VL1)은 CDR1, 2 및 3을 포함한다. 일부 실시양태에서, VL1 CDR1 영역은 선택된 VL1 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, VL1 CDR2 영역은 선택된 VL1 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, VL1 CDR3 영역은 선택된 VL1 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 다음 중 하나이다.

[0026] (1) Kabat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 1, 2 및 3에 제시된 바와 같고, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 4, 5 및 6에 제시된 바와 같음;

[0027] (2) Chothiat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 19, 20 및 21에 제시된 바와 같고, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 22, 23 및 24에 제시된 바와 같음;

[0028] (3) Kabat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 7, 8 및 9에 제시된 바와 같고, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 10, 11 및 12에 제시된 바와 같음;

[0029] (4) Chothiat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 25, 26 및 27에 제시된 바와 같고, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 28, 29 및 30에 제시된 바와 같음;

[0030] (5) Kabat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 13, 14 및 15에 제시된 바와 같고, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 16, 17 및 18에 제시된 바와 같음; 및

[0031] (6) Chothiat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 31, 32 및 33에 제시된 바와 같고, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 34, 35 및 36에 제시된 바와 같음.

[0032] 일부 실시양태에서, 제2 중쇄 가변 영역(VH2)은 CDR1, 2 및 3을 포함한다. 일부 실시양태에서, VH2 CDR1 영역은 선택된 VH2 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, VH2 CDR2 영역은 선택된 VH2 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, VH2 CDR3 영역은 선택된 VH2 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 제2 경쇄 가변 영역(VL2)은 CDR1, 2 및 3을 포함한다. 일부 실시양태에서, VL2 CDR1 영역은 선택된 VL2 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, VL2 CDR2 영역은 선택된 VL2 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, VL2 CDR3 영역은 선택된 VL2 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열, 및 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 다음 중 하나이다.

[0033] (1) Kabat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 59, 60 및 61에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 62, 63 및 64에 제시된 바와 같음;

[0034] (2) Chothiat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 77, 78 및 79에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 80, 81 및 82에 제시된 바와 같음;

[0035] (3) Kabat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 65, 66 및 67에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 68, 69 및 70에 제시된 바와 같음;

[0036] (4) Chothiat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 83, 84 및 85에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 86, 87 및 88에 제시된 바와 같

음;

[0037] (5) Kabat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 71, 72 및 73에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 74, 75 및 76에 제시된 바와 같음; 및

[0038] (6) Chothiat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 89, 90 및 91에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 92, 93 및 94에 제시된 바와 같음.

[0039] 일부 실시양태에서, 본 개시는 항원 결합 단백질 작제물에 관한 것으로, 여기서

[0040] (1) Kabat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 1, 2 및 3에 제시된 바와 같고, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 4, 5 및 6에 제시된 바와 같으며; 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 65, 66 및 67에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 68, 69 및 70에 제시된 바와 같고; 또는

[0041] (2) Chothia 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 19, 20 및 21에 제시된 바와 같고, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 22, 23 및 24에 제시된 바와 같으며; 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 83, 84 및 85에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 86, 87 및 88에 제시된 바와 같다.

[0042] 일부 실시양태에서, 제1 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 40, 41, 42 또는 53과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 제1 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 43, 44, 45 또는 54와 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0043] 일부 실시양태에서, 제1 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 46, 47, 48, 49 또는 55와 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 제1 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 50, 51, 52 또는 56과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0044] 일부 실시양태에서, 제1 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 57과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 제1 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 58과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0045] 일부 실시양태에서, 제2 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 98, 99, 100 또는 120과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 제2 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 101, 102, 103, 104 또는 121과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0046] 일부 실시양태에서, 제2 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 105, 106, 107, 108, 122, 126 또는 128과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 제2 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 109, 110, 111, 123, 127 또는 129와 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0047] 일부 실시양태에서, 제2 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 112, 113, 114, 115 또는 124와 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 제2 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119 또는 125와 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0048] 일부 실시양태에서, 제1 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 41과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 제1 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 45와 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하며, 제2 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 108 또는 126과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 제2 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 110 또는 127과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0049] 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 130과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 제3 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 131과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0050] 일부 실시양태에서, 제2 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 132 또는 133과 적어도 80%, 85%, 90%, 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0051] 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 130과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고; 제2 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 132 또는 133과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하며; 제3 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 131과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0052] 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 134 또는 135와 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 136과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0053] 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 137 또는 138과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 139와 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0054] 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 이중특이성 항체이다.

[0055] 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 Fab-scFv-Fc이다.

[0056] 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 TrioMab, 공유 경쇄를 갖는 이중특이성 항체, CrossMab, 2:1 CrossMab, 2:2 CrossMab, Duobody, 이중 가변 도메인 항체(DVD-Ig), scFv-IgG, IgG-IgG 형식 항체, Fab-scFv-Fc 형식 항체, TF, ADAPTIR, 이중특이성 T세포 관여항체(BiTE), BiTE-Fc, 이중친화적 재표적화 항체(DART), DART-Fc(Fc의 DART 보유), 4가 DART, 직렬 이중 항체(TandAb), scFv-scFv-scFv, ImmTAC, 삼중특이성 나노항체 또는 삼중특이성 킬러 관여항체(TriKE)이다.

[0057] 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 IgG1 또는 IgG4 유래의 하나 이상의 중쇄 고정 도메인을 포함한다.

[0058] 일부 실시양태에서, 해당 하나 이상의 중쇄 고정 도메인은 LALA 돌연변이 및/또는 놉-인투-홀(knob-into-hole, KIH) 돌연변이를 포함한다.

[0059] 한편으로, 본 개시는 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트에 관한 것으로, 해당 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 제1 중쇄 폴리펩티드, 제1 경쇄 폴리펩티드, 제2 중쇄 폴리펩티드 및 제2 경쇄 폴리펩티드를 포함하고, 해당 제1 중쇄 폴리펩티드는 제1 중쇄 가변 영역을 포함하고, 해당 제1 경쇄 폴리펩티드는 제1 경쇄 가변 영역을 포함하며, 해당 제2 중쇄 폴리펩티드는 제2 중쇄 가변 영역을 포함하고, 해당 제2 경쇄 폴리펩티드는 제2 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0060] 일부 실시양태에서, 제1 중쇄 가변 영역과 제1 경쇄 가변 영역은 서로 결합되어 PD-1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 제2 중쇄 가변 영역과 제2 경쇄 가변 영역은 서로 결합되어 CD40에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 형성한다.

[0061] 일부 실시양태에서, 본 개시는 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트에 관한 것으로, 해당 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 상보성 결정 영역(CDR)1, 2 및 3을 포함하는 제1 중쇄 가변 영역(VH1); CDR1, 2 및 3을 포함하는 제1 경쇄 가변 영역(VL1); 상보성 결정 영역(CDR)1, 2 및 3을 포함하는 제2 중쇄 가변 영역(VH2); 및 CDR1, 2및 3을 포함하는 제2 경쇄 가변 영역(VL2);을 포함하며, 일부 실시양태에서는, 해당 VH1 CDR1 영역은 선택된 VH1 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 VH1 CDR2 영역은 선택된 VH1 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 VH1 CDR3 영역은 선택된 VH1 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 일부 실시양태에서는, 해당 VL1 CDR1 영역은 선택된 VL1 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 VL1 CDR2 영역은 선택된 VL1 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 VL1 CDR3 영역은 선택된 VL1 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 일부 실시양태에서는, 해당 VH2 CDR1 영역은 선택된 VH2 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 VH2 CDR2 영역은 선택된 VH2 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 VH2 CDR3 영역은 선택된 VH2 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 일부 실시양태에서는, 해당 VL2 CDR1 영역은 선택된 VL2 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 VL2 CDR2 영역은 선택된 VL2 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 VL2 CDR3 영역은 선택된 VL2 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0062] 일부 실시양태에서, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열, 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열 및 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 다음 중 하나이다.

[0063] (1) Kabat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 1, 2 및 3에 제시된 바와 같고, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 4, 5 및 6에 제시된 바와 같으며; 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 65, 66 및 67에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 68, 69 및 70에 제시된 바와 같음; 및

[0064] (2) Chothia 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 19, 20 및 21에 제시된 바와 같고, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 22, 23 및 24에 제시된 바와 같으며; 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 83, 84 및 85에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 86, 87 및 88에 제시된 바와 같음.

[0065] 일부 실시양태에서, 제1 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 41과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 제1 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 45와 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하며, 제2 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 108 또는 126과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 제2 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 110 또는 127과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0066] 일부 실시양태에서, 제1 중쇄 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 130과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 제1 경쇄 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 131과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0067] 한편으로, 본 개시는 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트에 관한 것으로, 해당 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 중쇄 폴리펩티드, 경쇄 폴리펩티드 및 단쇄 가변 프래그먼트 폴리펩티드를 포함하고, 해당 중쇄 폴리펩티드는 제1 중쇄 가변 영역을 포함하고, 해당 경쇄 폴리펩티드는 제1 경쇄 가변 영역을 포함하며, 해당 단쇄 가변 프래그먼트 폴리펩티드는 제2 중쇄 가변 영역 및 제2 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 중쇄 가변 영역과 제1 경쇄 가변 영역은 서로 결합되어 PD-1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 제2 중쇄 가변 영역과 제2 경쇄 가변 영역은 서로 결합되어 CD40에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 형성한다.

[0068] 일부 실시양태에서, 단쇄 가변 프래그먼트 폴리펩티드는 N말단에서 C말단까지 제2 중쇄 가변 영역, 링커 펩티드 서열, 제2 경쇄 가변 영역, 중쇄 고정 영역 2(CH2) 및 중쇄 고정 영역 3(CH3)을 포함한다.

[0069] 일부 실시양태에서, 링커 펩티드 서열은 ASTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO: 152)와 적어도 80%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0070] 일부 실시양태에서, 본 개시는 본원에 기재된 바와 같은 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트에 관한 것으로, 해당 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 상보성 결정 영역(CDR)1, 2 및 3을 포함하는 제1 중쇄 가변 영역(VH1); CDR1, 2 및 3을 포함하는 제1 경쇄 가변 영역(VL1); 상보성 결정 영역(CDR)1, 2 및 3을 포함하는 제2 중쇄 가변 영역(VH2); 및 CDR1, 2및 3을 포함하는 제2 경쇄 가변 영역(VL2);을 포함하며, 일부 실시양태에서는, 해당 VH1 CDR1 영역은 선택된 VH1 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 VH1 CDR2 영역은 선택된 VH1 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 VH1 CDR3 영역은 선택된 VH1 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 일부 실시양태에서는, 해당 VL1 CDR1 영역은 선택된 VL1 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 VL1 CDR2 영역은 선택된 VL1 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 VL1 CDR3 영역은 선택된 VL1 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 일부 실시양태에서는, 해당 VH2 CDR1 영역은 선택된 VH2 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 VH2 CDR2 영역은 선택된 VH2 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 VH2 CDR3 영역은 선택된 VH2 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 일부 실시양태에서는, 해당 VL2 CDR1 영역은 선택된 VL2 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 VL2 CDR2 영역은 선택된 VL2 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 VL2 CDR3 영역은 선택된 VL2 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0071] 일부 실시양태에서, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열, 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열 및 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 다음 중 하나이다.

[0072] (1) Kabat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 1, 2 및 3에 제시된 바와 같고, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 4, 5 및 6에 제시된 바와 같으며; 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 65, 66 및 67에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 68, 69 및 70에 제시된 바와 같음; 및

[0073] (2) Chothia 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 19, 20 및 21에 제시된 바와 같고, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 22, 23 및 24에 제시된 바와 같으며; 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 83, 84 및 85에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 86, 87 및 88에 제시된 바와 같음.

[0074] 일부 실시양태에서, 제1 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 41과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 제1 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 45와 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하며, 제2 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 108 또는 126과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 제2 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 110 또는 127과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0075] 일부 실시양태에서, 본 개시는 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트에 관한 것으로, 여기서

[0076] (1) 중쇄 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 130과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 경쇄 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 131과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고; 및

[0077] (2) 단쇄 가변 프래그먼트 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 132 또는 133과 적어도 80%, 85%, 90%, 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0078] 한편으로, 본 개시는 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트에 관한 것으로, 해당 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 중쇄 폴리펩티드 및 경쇄 폴리펩티드를 포함하며, 해당 중쇄 폴리펩티드는 제1 중쇄 가변 영역을 포함하고, 또한 해당 경쇄 폴리펩티드는 제1 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단쇄 가변 프래그먼트 폴리펩티드는 중쇄 폴리펩티드의 C말단에 연결된다. 일부 실시양태에서, 단쇄 가변 프래그먼트 폴리펩티드는 제2 중쇄 가변 영역 및 제2 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 중쇄 가변 영역과 제1 경쇄 가변 영역은 서로 결합되어 PD-1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 또한 제2 중쇄 가변 영역과 제2 경쇄 가변 영역은 서로 결합되어 CD40에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 형성한다.

[0079] 일부 실시양태에서, 단쇄 가변 프래그먼트 폴리펩티드는 제1 링커 펩티드 서열을 통해 제1 중쇄 폴리펩티드에 연결된다.

[0080] 일부 실시양태에서, 제1 링커 펩티드 서열은 GGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO: 153)와 적어도 80%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0081] 일부 실시양태에서, 단쇄 가변 프래그먼트 폴리펩티드는 N말단에서 C말단까지 제2 경쇄 가변 영역, 제2 링커 펩티드 서열 및 제2 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0082] 일부 실시양태에서, 제2 링커 펩티드 서열은 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO: 154)와 적어도 80%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0083] 일부 실시양태에서, 본 개시는 본원에 기재된 바와 같은 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트에 관한 것으로, 해당 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 상보성 결정 영역(CDR)1, 2 및 3을 포함하는 제1 중쇄 가변 영역(VH1); CDR1, 2 및 3을 포함하는 제1 경쇄 가변 영역(VL1); 상보성 결정 영역(CDR)1, 2 및 3을 포함하는 제2 중쇄 가변 영역(VH2); 및 CDR1, 2및 3을 포함하는 제2 경쇄 가변 영역(VL2);을 포함하며, 일부 실시양태에서는, 해당 VH1 CDR1 영역은 선택된 VH1 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 VH1 CDR2 영역은 선택된 VH1 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 VH1 CDR3 영역은 선택된 VH1 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 일부 실시양태에서는, 해당 VL1 CDR1 영역은 선택된 VL1 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 VL1 CDR2 영역은 선택된 VL1 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 VL1 CDR3 영역은 선택된 VL1 CDR3 아미노산 서열과 적

어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 일부 실시양태에서는, 해당 VH2 CDR1 영역은 선택된 VH2 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 VH2 CDR2 영역은 선택된 VH2 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 VH2 CDR3 영역은 선택된 VH2 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 일부 실시양태에서는, 해당 VL2 CDR1 영역은 선택된 VL2 CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 VL2 CDR2 영역은 선택된 VL2 CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 VL2 CDR3 영역은 선택된 VL2 CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0084] 일부 실시양태에서, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열, 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열 및 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 다음 중 하나이다.

[0085] (1) Kabat 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 1, 2 및 3에 제시된 바와 같고, 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 4, 5 및 6에 제시된 바와 같으며; 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 65, 66 및 67에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 68, 69 및 70에 제시된 바와 같음; 및

[0086] (2) Chothia 넘버링 규칙에 따라, 선택된 VH1 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 19, 20 및 21에 제시된 바와 같고, 또한 선택된 VL1 CDR1, 2 및 3의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 22, 23 및 24에 제시된 바와 같으며; 선택된 VH2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 83, 84 및 85에 제시된 바와 같고, 선택된 VL2 CDR1, 2 및 3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 86, 87 및 88에 제시된 바와 같음.

[0087] 일부 실시양태에서, 제1 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 41과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 제1 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 45와 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하며, 제2 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 108 또는 126과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 제2 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 110 또는 127과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0088] 일부 실시양태에서, 본 개시는 본원에 기재된 바와 같은 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트에 관한 것으로, 여기서

[0089] (1) 중쇄 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 134 또는 135와 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고; 및

[0090] (2) 경쇄 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 136과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0091] 일부 실시양태에서, 본 개시는 본원에 기재된 바와 같은 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트에 관한 것으로, 여기서

[0092] (1) 중쇄 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 137 또는 138과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함하고; 및

[0093] (2) 경쇄 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 139와 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0094] 한편으로, 본 개시는 이중특이성 항체를 제공하는 것으로, 해당 이중특이성 항체는 Fc 영역을 포함하는 항 PD-1 항체 및 CD40에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 부위는 항 PD-1 항체의 Fc 영역에 연결된다.

[0095] 일부 실시양태에서, 이중특이성 항체는 PD-1을 발현하는 하나 이상의 세포가 존재하는 경우 면역 세포 중 CD40 통로의 활성화를 유도한다. 일부 실시양태에서, CD40에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위는 ScFv 또는 VHH 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CD40에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위는 CD40 리간드(예를 들어, CD40L) 또는 그 가용성 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, CD40에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위는 Fc 영역의 C말단에 연결된다. 일부 실시양태에서, CD40에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위는 Fc 영역(예를 들어, 3A 부위 부분)에 삽입된다.

[0096] 한편으로, 본 개시는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트)를 제공하는 것으로, 해당 항원 결합 단백질 작제물은 Fc 영역을 함유하는 항체 및 CD40에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위(예를 들어, 하나 또는 두 개의 항원 결합 부위)를 포함하거나, 또는 이들로 구성되며, 해당 항체

는 표적에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 부위는 항체의 Fc 영역에 연결된다.

[0097] 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 표적을 발현하는 하나 이상의 세포가 존재하는 경우 면역 세포 중 CD40 통로의 활성화를 유도한다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 CD40 통로를 활성화시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, CD40 통로의 활성화는 항원 결합 단백질 작제물과 표적을 발현하는 세포의 결합에 의해 결정된다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 종양 미세환경 또는 종양 배수 림프절에서 CD40 통로의 활성화를 유도한다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 표적을 발현하는 하나 이상의 세포가 존재하지 않는 경우 CD40 통로의 활성화를 유도하지 않는다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 Fc 수용체에 의해 매개된 메커니즘 또는 Fc 수용체에 의해 매개된 군집화를 통해 CD40 통로를 활성화시킬 수 없다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 PD-1을 발현하는 세포가 존재하지 않는 경우 CD40 통로를 활성화시킬 수 없다.

[0098] 일부 실시양태에서, 표적은 면역 체크포인트 분자이다. 일부 실시양태에서, 표적은 암 특이적 항원 또는 암 관련 항원이다. 일부 실시양태에서, 표적은 PD-1이다. 일부 실시양태에서, CD40에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위는 ScFv 또는 VHH 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CD40에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위는 CD40 리간드(예를 들어, CD40L) 또는 그 가용성 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, CD40에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위는 Fc 영역의 C말단에 연결된다. 일부 실시양태에서, CD40에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위는 Fc 영역(예를 들어, 3A 부위 부분)에 삽입된다.

[0099] 한편으로, 본 개시는 항체 약물 접합체에 관한 것으로, 해당 항체 약물 접합체는 치료제와 공유 결합되는 본원에 기재된 바와 같은 항원 결합 단백질 작제물 또는 본원에 기재된 바와 같은 이중특이성 항체 또는 항원 결합 프래그먼트를 포함한다.

[0100] 일부 실시양태에서, 치료제는 세포 독성제 또는 세포 억제제이다.

[0101] 한편으로, 본 개시는 암을 앓고 있는 피시험자를 치료하는 방법에 관한 것으로, 해당 방법은 해당 피시험자에게 치료 유효량의 조성물을 투여하는 단계를 포함하고, 해당 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 항원 결합 단백질 작제물, 본원에 기재된 바와 같은 이중특이성 항체 또는 항원 결합 프래그먼트, 또는 본원에 기재된 바와 같은 항체 약물 접합체를 포함한다.

[0102] 일부 실시양태에서, 피시험자는 고형종양을 앓고 있다.

[0103] 일부 실시양태에서, 암은 비소세포폐암(NSCLC), 두경부 편평세포암종(SCCHN), 두경부암, 신세포암종(RCC), 흑색종, 방광암, 위암, 요로상피암, 메르켈 세포암(Merkel-cell carcinoma), 삼중 음성 유방암(TNBC) 또는 결장직장암이다.

[0104] 일부 실시양태에서, 암은 흑색종, 췌장암, 중피종 또는 혈액학적 악성종양이다.

[0105] 일부 실시양태에서, 방법은 피시험자에게 항 CTLA4 항체, 항 Her2 항체 또는 종양 관련 항원(TAA)을 표적으로 하는 항체를 투여하는 단계를 또한 포함한다.

[0106] 일부 실시양태에서, 방법은 피시험자에게 화학요법을 사용하는 단계를 또한 포함한다.

[0107] 한편으로, 본 개시는 종양의 성장 속도를 감소시키는 방법에 관한 것으로, 해당 방법은 이를 필요로 하는 피시험자에게 유효량의 조성물을 투여하는 단계를 포함하고, 해당 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 항원 결합 단백질 작제물, 본원에 기재된 바와 같은 이중특이성 항체 또는 항원 결합 프래그먼트, 또는 본원에 기재된 바와 같은 항체 약물 접합체를 포함한다.

[0108] 한편으로, 본 개시는 종양 세포를 죽이는 방법에 관한 것으로, 해당 방법은 이를 필요로 하는 피시험자에게 유효량의 조성물을 투여하는 단계를 포함하고, 해당 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 항원 결합 단백질 작제물, 본원에 기재된 바와 같은 이중특이성 항체 또는 항원 결합 프래그먼트, 또는 본원에 기재된 바와 같은 항체 약물 접합체를 포함한다.

[0109] 한편으로, 본 개시는 약물 조성물에 관한 것으로, 해당 약물 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 항원 결합 단백질 작제물 또는 본원에 기재된 바와 같은 이중특이성 항체 또는 항원 결합 프래그먼트, 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다.

[0110] 한편으로, 본 개시는 약물 조성물에 관한 것으로, 해당 약물 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 항체 약물 접합체, 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다.

[0111] 한편으로, 본 개시는 이중특이성 또는 다중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트에 관한 것으로, 해당 이중특이성 또는 다중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 CD40에 특이적으로 결합하는 단쇄 가변 프래그먼트 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단쇄 가변 프래그먼트 폴리펩티드는 이중특이성 또는 다중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트의 중쇄 폴리펩티드의 C말단에 연결된다.

[0112] 일부 실시양태에서, 이중특이성 또는 다중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 암 특이성 항원 또는 암 관련 항원에 특이적으로 결합한다.

[0113] 일부 실시양태에서, 이중특이성 또는 다중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 면역 체크포인트 분자에 특이적으로 결합한다.

[0114] 한편으로, 본 개시는 핵산을 제공하는 것으로, 해당 핵산은 본원에 기재된 바와 같은 임의의 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 이중특이성 항체를 인코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 cDNA이다.

[0115] 한편으로, 본 개시는 벡터를 제공하는 것으로, 해당 벡터는 본원에 기재된 핵산 중 하나 이상의 핵산을 포함한다.

[0116] 한편으로, 본 개시는 세포를 제공하는 것으로, 해당 세포는 본원에 기재된 벡터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 CHO 세포이다. 한편으로, 본 개시는 세포를 제공하는 것으로, 해당 세포는 본원에 기재된 핵산 중 하나 이상의 핵산을 포함한다.

[0117] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항원 결합 단백질 작제물"은 (i) 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 단일 폴리펩티드 또는 (ii) 하나 이상의 항원 결합 도메인을 함께 형성하는 두 개 이상의 폴리펩티드(예를 들어, 동일하거나 또는 동일하지 않은 폴리펩티드)의 복합물이다. 본원은 항원 결합 단백질 작제물의 비제한적인 예시 및 측면을 기재한다.

[0118] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항원 결합 도메인", "항원 결합 영역" 또는 "항원 결합 부위"란 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 단백질 도메인(예를 들어, 단일 폴리펩티드 유래 아미노산으로 형성되거나 또는 두 개 이상의 폴리펩티드(예를 들어, 동일하거나 또는 동일하지 않은 폴리펩티드) 유래 아미노산으로 형성됨)을 가리킨다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 천연적으로 존재하는 항체의 특이성 및 친화력과 유사한 특이성 및 친화력으로 항원 또는 에피토프에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 항체 또는 그 프래그먼트일 수 있다. 항원 결합 도메인의 한 예시는 VH-VL 이량체로 형성된 항원 결합 도메인이다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 대체 프레임워크를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 리간드(예를 들어, PD-L1, CD154 또는 그 가용성 부분)이다. 예를 들어, 항원은 PD-1 수용체일 수 있으며, 항원 결합 도메인(예를 들어, PD-L1의 가용성 부분)은 PD-1 수용체에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 VHH 도메인이다. 본원은 항원 결합 도메인의 비제한적인 예시를 기재한다.

[0119] 본원에 사용한 된 바와 같이, 용어 "항체"란 적어도 하나의(예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개) 상보성 결정 영역(CDR)을 함유하고(예를 들어, 면역글로불린 경쇄 유래의 3개 CDR 중 어느 하나 또는 면역글로불린 중쇄 유래의 3개 CDR 중 어느 하나), 또한 항원 또는 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 항원 결합 분자를 가리킨다. 항체의 비제한적인 예시는 단클론 항체, 다클론 항체, 다중특이성 항체(예를 들어, 이중특이성 항체), 단쇄 항체, 키메라 항체, 중쇄 항체, 단일 도메인 항체(나노항체), 인간 항체 및 인간화 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 항체의 Fc 영역을 함유할 수 있다. 용어 항체는 또한 유도체, 예를 들어 이중특이성 항체, 단쇄 항체, 이중 항체, 직쇄 항체 및 항체 프래그먼트로 형성된 다중특이성 항체를 포함한다.

[0120] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항원 결합 프래그먼트"란 전장 항체의 일분을 가리키는 것으로, 해당 항체의 해당 부분은 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 프래그먼트는 적어도 하나의 가변 도메인(예를 들어, 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인)을 함유한다. 항체 프래그먼트의 비제한적인 예시는 예를 들어, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv 프래그머트 및 VHH를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, "VHH"는 중쇄 항체의 가변 도메인이다.

[0121] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "인간 항체"란 인간 유래 핵산(예를 들어, 재배열된 인간 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄 유전자좌)으로 인코딩된 항체를 가리킨다. 일부 실시양태에서, 인간 항체는 인간으로부터 수집하거나 또는 인간 세포 배양물(예를 들어, 인간 하이브리도마)에서 생성되는 것이다. 일부 실시양태에서, 인간 항체는

비인간 세포(예를 들어, 마우스 또는 햄스터 세포주)에서 생성되는 것이다. 일부 실시양태에서, 인간 항체는 세균 또는 효모 세포에서 생성되는 것이다. 일부 실시양태에서, 인간 항체는 재배열되지 않았거나 또는 재배열된 인간 면역글리불린 유전자좌(예를 들어, 중쇄 또는 경쇄 인간 면역글리불린 유전자좌)를 함유하는 유전자 이식 비인간 동물(예를 들어, 소)에서 생성되는 것이다.

[0122] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "인간화 항체"란 비인간 항체를 가리키는 것으로, 이는 비인간(예를 들어, 마우스) 면역글로불린 유래의 최소한 서열을 함유하며, 인간 면역글로불린 유래의 서열을 함유한다. 비제한적 예시에서, 인간화 항체는 인간 항체(수용체 항체)인 것으로, 해당 수용체 항체의 초가변 영역(예를 들어, CDR) 잔기는 원하는 특이성, 친화력 및 능력을 갖추는 비인간 항체(예를 들어, 기증자 항체), 예를 들어 마우스 항체, 래트 항체 또는 토끼 항체의 초가변 영역(예를 들어, CDR) 잔기에 의해 치환된다. 일부 실시양태에서, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 잔기는 대응되는 비인간(예를 들어, 마우스) 면역글로불린 잔기에 의해 치환된다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체는 수용체 항체 또는 기증자 항체에서 발견되지 않은 잔기를 함유할 수 있다. 이러한 수식을 진행함으로써 항체 성능을 한층 더 개선시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체는 적어도 하나, 통상적으로는 두 개의 가변 도메인의 대체로 전부 부분을 포함하는 것으로, 전부 또는 대체로 전부의 초가변 루프(CDR)는 비인간(예를 들어, 마우스) 면역글로불린의 초가변 루프에 대응되며, 전부 또는 대체로 전부의 프레임워크 영역은 인간 면역글로불린의 프레임워크 영역이다. 인간화 항체는 면역글로불린 고정 영역(Fc)의 적어도 일부를 또한 포함할 수 있는 것으로, 통상적으로는 인간 면역글로불린의 고정 영역의 적어도 일부이다. 인간화 항체는 당업계에 이미 알려진 분자생물학 방법을 사용하여 생성할 수 있다. 본원은 인간화 항체를 생성하기 위한 방법에 대한 비제한적인 예시를 기재하였다.

[0123] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "키메라 항체"란 적어도 두 개의 상이한 물종에 존재하는 서열을 포함하는 항체(예를 들어, 인간과 마우스 항체와 같은 상이한 두 가지 포유동물 물종 유래의 항체)를 가리킨다. 키메라 항체의 비제한적인 예시는 비인간(예를 들어, 마우스) 항체의 가변 도메인 서열(예를 들어, 경쇄 및/또는 중쇄 가변 도메인 서열의 전부 또는 부분) 및 인간 항체의 고정 도메인을 함유하는 항체를 가리킨다. 키메라 항체의 기타 예시는 본원에 기재하며 이 또한 당업계에 이미 알려진 것이다.

[0124] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "다중특이성 항원 결합 단백질 작제물"은 두 개 이상의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합하는 두 개 이상의 상이한 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 단백질 작제물이다. 두 개 이상의 상이한 에피토프는 동일한 항원(예를 들어, 세표 표면에 존재하는 단일 폴리펩티드)에 있거나 또는 상이한 항원(예를 들어, 동일 세포 표면에 존재하거나 또는 상이한 세포 표면에 존재하는 상이한 단백질)에 있는 에피토프일 수 있다. 일부 측면에서, 다중특이성 항원 결합 단백질 작제물은 두 개의 상이한 에피토프에 결합한다(즉, "이중특이성 항원 결합 단백질 작제물"). 일부 측면에서, 다중특이성 항원 결합 단백질 작제물은 3개의 상이한 에피토프에 결합한다(즉, "삼중특이적 항원 결합 단백질 작제물"). 일부 측면에서, 다중특이성 항원 결합 단백질 작제물은 4개의 상이한 에피토프에 결합한다(즉, "사중특이적 항원 결합 단백질 작제물"). 일부 측면에서, 다중특이성 항원 결합 단백질 작제물은 5개의 상이한 에피토프에 결합한다(즉, "오중특이적 항원 결합 단백질 작제물"). 각각의 결합 특이성은 임의의 적합한 원자가로 존재할 수 있다. 본원은 다중특이성 항원 결합 단백질 작제물의 비제한적인 예시를 기재한다.

[0125] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "이중특이성 항체"란 두 개의 상이한 에피토프에 결합하는 항체를 가리킨다. 에피토프는 동일한 항원 또는 상이한 항원에 있을 수 있다.

[0126] 본원에 사용된 바와 같이, 항체를 언급할 때의 표현 "특이적으로 결합"이란 기타 분자에 비해 항체가 우선적으로 그 표적 분자(예를 들어, PD-1)와 상호 작용하는 것을 가리키는 것으로, 이는 상호 작용은 표적 분자의 특정 구조(즉, 항원 결정자 또는 에피토프)의 존재 여부에 의해 결정되기 때문이고; 다시 말해서, 시약은 통상적 상황 하에서의 모든 분자가 아닌 특정 구조를 포함하는 분자를 식별하여 결합하는 것이다. 표적 분자에 특이적으로 결합하는 항체를 표적 특이성 항체라고 할 수 있다. 예를 들어, PD-1 분자에 특이적으로 결합하는 항체를 PD-1 특이성 항체 또는 항 PD-1 항체라고 할 수 있다.

[0127] 별도로 설명하지 않는 한, 본원에 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자가 통상적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원은 본 발명에 사용되는 방법 및 재료를 기재하였으되 당업계에 이미 알려진 기타 적합한 방법 및 재료를 사용할 수도 있다. 재료, 방법 및 실시예는 단지 설명을 위한 것이뿐이고, 제한하려는 것은 아니다. 본원에 언급되는 모든 출판물, 특허출원, 특허, 서열, 데이터베이스 항목 및 기타 참고문헌은 모두 인용방식을 통해 그 전체 내용이 본원에 통합된다. 상충하는 경우, 본 명세서(정의 포함)를 기준으로 한다.

[0128] 이하 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용, 도면의 간단한 설명 및 청구범위로부터 본 발명의 기타 특징 및 장점을 명확하게 이해할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0129] **도 1A**는 이중특이성 항체 Fab-ScFV-IgG에 대한 개략적 구조이다.

도 **1B**는 이중특이성 항체 ScFV-HC-IgG에 대한 개략적 구조이다.

도 **2A**는 Fab-ScFV-IgG4의 전기영동 결과를 도시하였다. M은 marker이다. Fab-ScFV-IgG4는 레인 2에 있다.

도 2B는 ScFV-HC-IgG4의 전기영동 결과를 도시하였다. M은 marker이다. ScFV-HC-IgG4는 레인 3에 있다.

도 **3**은 항 PD1 항체 1A7-H2K3-IgG4(PD-1), Fab-ScFV-IgG4 또는 ScFV-HC-IgG4로 활성화시킨 후의 Jurkat-Luc-hPD-1 세포의 발광 수준을 도시하였다. 항체가 PD1/PD-L1 통로를 차단함으로써, Jurkat-Luc-hPD-1 세포를 활성화시키게 된다. 발광 신호는 상대적 발광 단위(Rlu)로 표시한다.

도 **4A**는 CHO-K1-hPD1 및 선택된 항체가 존재하는 경우, Jurkat-Luc-hCD40 세포의 발광 수준을 도시하였다. 항체는 항 PD-1 항체 1A7-H2K3-IgG4 및 항 CD40 항체 6A7-H4K2-IgG2의 1:1 비율의 조합(PD-1+CD40), Fab-ScFV-IgG4 및 ScFV-HC-IgG4로부터 선택된다. 발광 신호는 상대적 발광 단위(Rlu)로 표시한다.

도 4B는 선택된 항체가 존재하는 경우, Jurkat-Luc-hCD40 세포의 발광 수준을 도시하였다. 항체는 항 PD-1 항체 1A7-H2K3-IgG4 및 항 CD40 항체 6A7-H4K2-IgG2의 1:1 비율의 조합(PD-1+CD40), Fab-ScFV-IgG4 및 ScFV-HC-IgG4로부터 선택된다. 발광 신호는 상대적 발광 단위(Rlu)로 표시한다.

도 **5**는 CHO-K1-hFcɣRIIB 및 선택된 항체가 존재하는 경우, Jurkat-Luc-hCD40 세포의 발광 수준을 도시하였다. 항체는 항 CD40 단클론 항체 6A7-H4K2-IgG2(CD40), Fab-ScFV-IgG4 및 ScFV-HC-IgG4로부터 선택된다. 발광 신호는 상대적 발광 단위(Rlu)로 표시한다.

도 6A는 선택된 항체가 존재하는 경우, Jurkat-Luc-hCD40 세포의 발광 수준을 도시하였다. 항체는 항 CD40 단클론 항체 6A7-H4K2-IgG2(CD40), ScFV-HC-IgG4 및 ScFV-HC-IgG1-LALA로부터 선택된다. 발광 신호는 상대적 발광 단위(Rlu)로 표시한다.

도 6B는 Jurkat-PD1 세포 및 선택된 항체가 존재하는 경우, Jurkat-Luc-hCD40 세포의 발광 수준을 도시하였다. 항체는 항 CD40 단클론 항체 6A7-H4K2-IgG2(CD40), ScFV-HC-IgG4 및 ScFV-HC-IgG1-LALA로부터 선택된다. 발광 신호는 상대적 발광 단위(Rlu)로 표시한다.

도 6C는 CHO-K1-hFcɣRIIB 및 선택된 항체가 존재하는 경우, Jurkat-Luc-hCD40 세포의 발광 수준을 도시하였다. 항체는 항 CD40 단클론 항체 6A7-H4K2-IgG2(CD40), ScFV-HC-IgG4 및 ScFV-HC-IgG1-LALA로부터 선택된다. 발광 신호는 상대적 발광 단위(Rlu)로 표시한다.

도 7은 마우스 결장암 세포 MC38을 주사하고, 이중특이성 항체 ScFV-HC-IgG4 또는 ScFV-HC-IgG1-LALA로 처리한 B-hCD40 마우스의 시간에 따른 체중 변화를 나타내는 그래프를 도시하였다. 생리식염수(PS) 용액을 대조군으로 주사한다.

도 8은 마우스 결장암 세포 MC38을 주사하고, 이중특이성 항체 ScFV-HC-IgG4 또는 ScFV-HC-IgG1-LALA로 처리한 B-hCD40 마우스의 시간에 따른 체중 변화 백분율을 나타내는 그래프를 도시하였다. 생리식염수(PS) 용액을 대조군으로 주사한다.

도 9는 마우스 결장암 세포 MC38을 주사하고, 이중특이성 항체 ScFV-HC-IgG4 또는 ScFV-HC-IgG1-LALA로 처리한 상이한 그룹의 B-hCD40 마우스의 평균 종양 부피를 나타내는 그래프를 도시하였다. 생리식염수(PS) 용액을 대조군으로 주사한다.

도 10은 B16F10-hPD-L1 세포를 주사하고, 단일특이성 또는 이중특이성 항체로 처리한 B-hPD-1/hCD40 마우스의 시간에 따른 체중 변화를 나타내는 그래프를 도시하였다. 생리식염수(PS) 용액을 대조군으로 주사한다.

도 11은 B16F10-hPD-L1 세포를 주사하고, 단일특이성 또는 이중특이성 항체로 처리한 B-hPD-1/hCD40 마우스의 시간에 따른 체중 변화 백분율을 나타내는 그래프를 도시하였다. 생리식염수(PS) 용액을 대조군으로 주사한다.

도 12는 B16F10-hPD-L1 세포를 주사하고, 단일특이성 또는 이중특이성 항체로 처리한 상이한 그룹의 B-hPD-1/hCD40 마우스의 평균 종양 부피를 나타내는 그래프를 도시하였다. 생리식염수(PS) 용액을 대조군으로 주사한

다.

도 13은 MC38-hPD-L1 세포를 사용하여 주사하고, 단일특이성 또는 이중특이성 항체로 처리한 상이한 그룹의 B-hPD-1/hCD40 마우스가 그룹 나눈 후 25일째의 평균 종양 부피를 나타내는 그래프를 도시하였다. 생리식염수(PS) 용액을 대조군으로 주사한다.

도 14는 MC38-hPD-L1 세포를 주사하고, 단일특이성 또는 이중특이성 항체로 처리한 B-hPD-1/hCD40 마우스의 시간에 따른 체중 변화를 나타내는 그래프를 도시하였다. 생리식염수(PS) 용액을 대조군으로 주사한다.

도 15는 MC38-hPD-L1 세포를 주사하고, 단일특이성 또는 이중특이성 항체로 처리한 B-hPD-1/hCD40 마우스의 시간에 따른 체중 변화 백분율을 나타내는 그래프를 도시하였다. 생리식염수(PS) 용액을 대조군으로 주사한다.

도 16은MC38-hPD-L1 세포를 주사하고, 단일특이성 또는 이중특이성 항체로 처리한 상이한 그룹의 B-hPD-1/hCD40 마우스의 평균 종양 부피를 나타내는 그래프를 도시하였다. 생리식염수(PS) 용액을 대조군으로 주사한다.

도 17A는 MC38-hPD-L1 세포를 주사하고, 단일특이성 또는 이중특이성 항체로 처리한 상이한 그룹의 B-hPD-1/hCD40 마우스가 그룹 나눈 후 7일째의 마우스 혈액 ALT 수준을 나타내는 그래프를 도시하였다.

도 17B는 MC38-hPD-L1 세포를 주사하고, 단일특이성 또는 이중특이성 항체로 처리한 상이한 그룹의 B-hPD-1/hCD40 마우스가 그룹 나눈 후 13일째의 마우스 혈액 ALT 수준을 나타내는 그래프를 도시하였다.

도 17C는 MC38-hPD-L1 세포를 주사하고, 단일특이성 또는 이중특이성 항체로 처리한 상이한 그룹의 B-hPD-1/hCD40 마우스가 그룹 나눈 후 7일째의 마우스 혈액 AST 수준을 나타내는 그래프를 도시하였다.

도 17D는 MC38-hPD-L1 세포를 주사하고, 단일특이성 또는 이중특이성 항체로 처리한 상이한 그룹의 B-hPD-1/hCD40 마우스가 그룹 나눈 후 13일째의 마우스 혈액 AST 수준을 나타내는 그래프를 도시하였다.

도 17E는 MC38-hPD-L1 세포를 주사하고, PBS로 처리한 G1 그룹 B-hPD-1/hCD40 마우스의 마우스 간 및 신장의 대표적인 조직학적 슬라이드 이미지를 도시하였다.

도 17F는 MC38-hPD-L1 세포를 주사하고, 셀리크렐루맙(Selicrelumab)으로 처리한 G2 그룹 B-hPD-1/hCD40 마우스의 마우스 간 및 신장의 대표적인 조직학적 슬라이드 이미지를 도시하였다.

도 17G는 MC38-hPD-L1 세포를 주사하고, CD40 단클론 항체 6A7-H4K2-IgG2로 처리한 G3 그룹 B-hPD-1/hCD40 마우스의 마우스 간 및 신장의 대표적인 조직학적 슬라이드 이미지를 도시하였다.

도 17H는 MC38-hPD-L1 세포를 주사하고, 항 PD1 단클론 항체 1A7-H2K3-IgG4로 처리한 G4 그룹 B-hPD-1/hCD40 마우스의 마우스 간 및 신장의 대표적인 조직학적 슬라이드 이미지를 도시하였다.

도 17I는 MC38-hPD-L1 세포를 주사하고, ScFV-HC-IgG4로 처리한 G5 그룹 B-hPD-1/hCD40 마우스의 마우스 간 및 신장의 대표적인 조직학적 슬라이드 이미지를 도시하였다.

도 17J는 MC38-hPD-L1 세포를 주사하고, 항 PD1 단클론 항체 1A7-H2K3-IgG4 및 항 CD40 단클론 항체 6A7-H4K2-IgG2의 조합(Combo)으로 처리한 G1 그룹 B-hPD-1/hCD40 마우스의 마우스 간 및 신장의 대표적인 조직학적 슬라이드 이미지를 도시하였다.

도 18A는 이중특이성 항체 PD1-C40-6A7-FV3A에 대한 개략적 구조이다.

도 18B는 PD1-C40-6A7-FV3A의 전기영동 결과를 도시하였다. M은 marker이다. PD1-C40-6A7-FV3A은 레인 4에 있다.

도 18C는 CHO-K1-hFcɣRIIB 세포 및 선택된 항체가 존재하는 경우, Jurkat-Luc-hCD40 세포의 발광 수준을 도시하였다. 항체는 항 CD40 단클론 항체 6A7-H4K2-IgG2(CD40), Fab-ScFv-IgG4 및 PD1-C40-6A7-FV3A로부터 선택된다. 발광 신호는 상대적 발광 단위(Rlu)로 표시한다.

도 18D는 CHO-K1-hPD-1 세포(CHO PD-1) 및 선택된 항체가 존재하는 경우, Jurkat-Luc-hCD40 세포의 발광 수준을 도시하였다. 항체는 항 PD-1 단클론 항체 1A7-H2K3-IgG4 및 항 CD40 단클론 항체 6A7-H4K2-IgG2의 조합(PD-1+CD40), Fab-ScFv-IgG4 및 PD1-C40-6A7-FV3A로부터 선택된다. 발광 신호는 상대적 발광 단위(Rlu)로 표시한다.

도 19는 Kabat 넘버링 규칙을 통해 정의한 항 PD1 항체 25-1A7, 18-3F1 및 3-6G1의 CDR 서열을 나열하였다.

도 20은 Chothia 넘버링 규칙을 통해 정의한 항 PD1 항체 25-1A7, 18-3F1 및 3-6G1의 CDR 서열을 나열하였다.

도 21은 인간, 마우스 및 키메라 PD-1의 아미노산 서열을 나열하였다.

도 22는 인간화 및 마우스 항 PD1 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 나열하였다.

도 23은 Kabat 넘버링 규칙을 통해 정의한 항 CD40 항체 03-7F10, 06-6A7 및 07-4H6의 CDR 서열을 나열하였다.

도 24는 Chothia 넘버링 규칙을 통해 정의한 항 CD40 항체 03-7F10, 06-6A7 및 07-4H6의 CDR 서열을 나열하였다.

도 25는 인간, 마우스 및 키메라 CD40의 아미노산 서열을 나열하였다.

도 26은 인간화 및 마우스 항 CD40 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 나열하였다.

도 27은 B16F10-hPD-L1 세포를 주사하고, 단일특이성 또는 이중특이성 항체로 처리한 B-hPD-1/hCD40 마우스의 시간에 따른 체중 변화를 나타내는 그래프를 도시하였다. PBS 용액을 대조군으로 주사한다.

도 28은 B16F10-hPD-L1 세포를 주사하고, 단일특이성 또는 이중특이성 항체로 처리한 B-hPD-1/hCD40 마우스의 시간에 따른 종양 부피 변화를 나타내는 그래프를 도시하였다. PBS 용액을 대조군으로 주사한다.

도 29A는 B16F10-hPD-L1 세포를 주사하고, 0.1-30mg/kg 이중특이성 항체 ScFV-HC-IgG1-LALA로 처리한 B-hPD-1/hCD40 마우스(G2-G7)가 그룹 나눈 후 70일 동안의 종양 부피를 나타내는 그래프를 도시하였다. PBS 용액을 대조군(G1)으로 주사한다.

도 29B는 B16F10-hPD-L1 세포를 주사하고, 0.1mg/kg-30mg/kg 이중특이성 항체 ScFV-HC-IgG1-LALA(G2-G7)로 처리한 B-hPD-1/hCD40 마우스가 그룹 나눈 후 70일 동안의 생존율을 나타내는 그래프를 도시하였다. PBS 용액을 대조군(G1)으로 주사한다.

도 30A는 히스토그램인 것으로, 이는 MC38 종양 모델에서, CD45+ 백혈구 중 마우스 CD3+ T세포의 백분율(I); CD45+ 백혈구 중 마우스 CD8+ T세포의 백분율(II); 및 T세포 중 CD8+ T세포와 Treg 세포의 비율(III)을 도시하였다.

도 30B는 히스토그램인 것으로, 이는 MC38 종양 모델에서, CD8+ T세포 중 인간 PD-1(CD279) 양성 세포의 백분율(I); Treg 세포 중 인간 PD-1 양성 세포의 백분율(II); CD4+(비Treg) T세포 중 인간 PD-1 양성 세포의 백분율(III); 및 NK 세포 중 인간 PD-1 양성 세포의 백분율(IV)을 도시하였다.

도 30C는 히스토그램인 것으로, 이는 MC38 종양 모델에서, 마우스 CD45+ 백혈구 중 수지상 세포(DC)의 백분율(I); 마우스 CD45+ 백혈구 중 골수 유래 억제 세포(MDSC)의 백분율(II); DC 세포 중 CD80+ 세포의 백분율(III); 및 DC 세포 중 MHCII+ 세포의 백분율(IV)을 도시하였다.

도 30D는 히스토그램인 것으로, 이는 B16F10 종양 모델에서, CD45+ 백혈구 중 마우스 CD3+ T세포의 백분율(I); CD45+ 백혈구 중 마우스 CD8+ T세포의 백분율(II); 및 T세포 중 CD8+ T세포와 Treg 세포의 비율(III)을 도시하였다.

도 30E는 히스토그램인 것으로, 이는 B16F10 종양 모델에서, CD8+ T세포 중 인간 PD-1(CD279) 양성 세포의 백분율(I); Treg 세포 중 인간 PD-1 양성 세포의 백분율(II); CD4+(비Treg) T세포 중 인간 PD-1 양성 세포의 백분율(III); 및 NK 세포 중 인간 PD-1 양성 세포의 백분율(IV)을 도시하였다.

도 30F는 히스토그램인 것으로, 이는 B16F10 종양 모델에서, 마우스 CD45+ 백혈구 중 수지상 세포(DC)의 백분율(I); 마우스 CD45+ 백혈구 중 골수 유래 억제 세포(MDSC)의 백분율(II); DC 세포 중 CD80+ 세포의 백분율(III); DC 세포 중 CD86+ 세포의 백분율(IV); 및 DC 세포 중 MHCII+ 세포의 백분율(V)을 도시하였다.

도 31A 내지 도 31B는 유세포 분석 전략을 도시하였다.

도 32는 MC38-hPD-L1 세포를 주사하고, 단클론 항체(G2-G4), 이중특이성 항체(G5 및G6) 또는 단일특이성 항체의 조합(G7 및 G8)으로 처리한 B-hPD-1/hCD40 마우스의 시간에 따른 체중 변화를 나타내는 그래프를 도시하였다. PBS 용액을 대조군(G1)으로 주사한다.

도 33은 MC38-hPD-L1 세포를 주사하고, 단클론 항체(G2-G4), 이중특이성 항체(G5 및 G6) 또는 단일특이성 항체의 조합(G7 및 G8)으로 처리한 B-hPD-1/hCD40 마우스의 시간에 따른 체중 변화를 나타내는 그래프를

도시하였다. PBS 용액을 대조군(G1)으로 주사한다.

도 34는 MC38-hPD-L1 세포를 주사하고, 단클론 항체(G2-G4), 이중특이성 항체(G5 및 G6) 또는 단일특이성 항체의 조합(G7 및 G8)으로 처리한 B-hPD-1/hCD40 마우스의 시간에 따른 종양 부피 변화를 나타내는 그래프를 도시하였다. PBS 용액을 대조군(G1)으로 주사한다.

도 35는 단클론 항체(G2 및 G3)를 주사하고, 상이한 구조의 이중특이성 항체(G4-G7) 또는 이중특이성 항체 ScFV-HC-IgG1-LALA(G8)를 갖는 B-hPD-1/hCD40 마우스의 시간에 따른 체중 변화를 나타내는 그래프를 도시하였다. PBS 용액을 대조군(G1)으로 주사한다.

도 36은 단클론 항체(G2 및 G3)를 주사하고, 상이한 구조의 이중특이성 항체(G4-G7) 또는 이중특이성 항체 ScFV-HC-IgG1-LALA(G8)를 갖는 B-hPD-1/hCD40 마우스의 시간에 따른 체중 변화를 나타내는 그래프를 도시하였다. PBS 용액을 대조군(G1)으로 주사한다.

도 **37**은 이중특이성 항체 1A7-셀리크렐루맙-DART-IgG4의 DART-Fc에 대한 개략적 구조이다. DART란 이중 친화성 재표적화 항체를 가리킨다.

도 38A는 PBS(G1), 단클론 항체(G2 및 G3)를 주사하고, 상이한 구조의 이중특이성 항체(G4-G7) 또는 이중특이성 항체 ScFV-HC-IgG1-LALA(G8)를 갖는 상이한 그룹 B-hPD-1/hCD40 마우스가 그룹 나눈 후 7일째의 마우스 혈액 ALT 수준을 나타내는 그래프를 도시하였다.

도 38B는 PBS(G1), 단클론 항체(G2 및 G3)를 주사하고, 상이한 구조의 이중특이성 항체(G4-G7) 또는 이중특이성 항체 ScFV-HC-IgG1-LALA(G8)를 갖는 상이한 그룹 B-hPD-1/hCD40 마우스가 그룹 나눈 후 7일째의 마우스 혈액 AST 수준을 나타내는 그래프를 도시하였다.

도 39는 MC38-hPD-L1 세포를 주사하고, 단클론 항체(G2 및 G3), 단일특이성 항체의 조합(G4) 또는 이중특이성 항체(G5-G6)로 처리하거나, 또는 PBS 용액을 대조군(G1)으로 주사한 B-hPD-1/hCD40 마우스의 시간에 따른 체중 변화를 나타내는 그래프를 도시하였다.

도 40은 MC38-hPD-L1 세포를 주사하고, 단클론 항체(G2 및 G3), 단일특이성 항체의 조합(G4) 또는 이중특이성 항체(G5-G6)로 처리하거나, 또는 PBS 용액을 대조군(G1)으로 주사한 B-hPD-1/hCD40 마우스의 시간에 따른 체중 변화를 나타내는 그래프를 도시하였다.

도 41은 MC38-hPD-L1 세포를 주사하고, 단클론 항체(G2 및 G3), 단일특이성 항체의 조합(G4) 또는 이중특이성 항체(G5-G6)로 처리하거나, 또는 PBS 용액을 대조군(G1)으로 주사한 B-hPD-1/hCD40 마우스의 시간에 따른 종양 부피 변화를 나타내는 그래프를 도시하였다.

도 42A는 Jurkat-PD1 세포 및 선택된 항체가 존재하는 경우, Jurkat-Luc-hCD40 세포의 발광 수준을 도시하였다. 항체는 BsAb 펨브로리주맙-seli-HC-IgG4, 1A7-셀리크렐루맙-FV3A-IgG4, 1A7-셀리크렐루맙-FVHC-IgG4, 1A7-셀리크렐루맙-FVKH-IgG4, 1A7-셀리크렐루맙-DART-IgG4 및 항 CD40 단클론 항체 셀리크렐루맙-IgG2로부터 선택된다. 발광 신호는 상대적 발광 단위(Rlu)로 표시한다.

도 42B는 Jurkat-PD1 세포 및 선택된 항체가 존재하는 경우, Jurkat-Luc-hCD40 세포의 발광 수준을 도시하였다. 항체는 BsAb 펨브로리주맙-6A7-HC-IgG1-LALA, SdAb-6A7-FVHC-IgG1-LALA, 펨브로리주맙-APX005M-FVHC-IgG4; 항 CD40 단클론 항체 APX005M-IgG1-S267E 및 6A7-H4K2-IgG2로부터 선택된다. 발광 신호는 상대적 발광 단위(Rlu)로 표시한다.

도 42C는 Jukat-luc-PD1 세포 및 선택된 항체가 존재하지 않는 경우, Jurkat-Luc-hCD40 세포의 발광 수준을 도시하였다. 항체는 BsAb 펨브로리주맙-seli-HC-IgG4, 1A7-셀리크렐루맙-FV3A-IgG4, 1A7-셀리크렐루맙-FVHC-IgG4, 1A7-셀리크렐루맙-FVKH-IgG4, 1A7-셀리크렐루맙-DART-IgG4 및 항 CD40 단클론 항체 셀리크렐루맙-IgG2로부터 선택된다. 발광 신호는 상대적 발광 단위(Rlu)로 표시한다.

도 42D는 Jukat-luc-PD1 세포 및 선택된 항체가 존재하지 않는 경우, Jurkat-Luc-hCD40 세포의 발광 수준을 도시하였다. 항체는 BsAb 펨브로리주맙-6A7-HC-IgG1-LALA, SdAb-6A7-FVHC-IgG1-LALA, 펨브로리주맙-APX005M-FVHC-IgG4; 항 CD40 단클론 항체 APX005M-IgG1-S267E 및 6A7-H4K2-IgG2로부터 선택된다. 발광 신호는 상대적 발광 단위(Rlu)로 표시한다.

도 43A 내지 도 43B는 PD1/CD40 이중특이성 항체가 유도한 CD40 신호전달 통로 활성화에 대한 가상 메커니즘을 도시하였다.

도 44A는 MC38-hPD-L1 세포를 주사하고, 단클론 항체(G2, G3 및 G4), 이중특이성 항체(G5-G7) 또는 단일특이성 항체의 조합(G8 및 G9)으로 처리한 B-hPD-1/hCD40 마우스의 시간에 따른 체중 변화를 나타내는 그래프를 도시하였다. PS 용액을 대조군(G1)으로 주사한다.

도 44B는 MC38-hPD-L1 세포를 주사하고, 단클론 항체(G2, G3 및 G4), 이중특이성 항체(G5-G7) 또는 단일특이성 항체의 조합(G8 및 G9)으로 처리한 B-hPD-1/hCD40 마우스의 시간에 따른 체중 변화를 나타내는 그래프를 도시하였다. PS 용액을 대조군(G1)으로 주사한다.

도 44C는 MC38-hPD-L1 세포를 주사하고, 단클론 항체(G2, G3 및 G4), 이중특이성 항체(G5-G7) 또는 단일특이성 항체(G8 및 G9)의 조합으로 처리한 B-hPD-1/hPD-L1/hCD40 마우스의 시간에 따른 종양 부피 변화를 나타내는 그래프를 도시하였다. PS 용액을 대조군(G1)으로 주사한다.

도 45는 MC38-hPD-L1 세포를 주사하고, ScFV-HC-IgG1-LALA(G2 및 G5), 아테졸리주맙-6A7-FVHC-IgG1-LALA(G3 및 G6) 또는 아벨루맙-6A7-FVHC-IgG1-LALA(G4 및 G7)로 처리한 B-hPD-1/hPD-L1/hCD40 마우스의 시간에 따른 체중 변화를 나타내는 그래프를 도시하였다. PBS 용액을 대조군(G1)으로 주사한다.

도 46은 MC38-hPD-L1 세포를 주사하고, ScFV-HC-IgG1-LALA(G2 및 G5), 아테졸리주맙-6A7-FVHC-IgG1-LALA(G3 및 G6) 또는 아벨루맙-6A7-FVHC-IgG1-LALA(G4 및 G7)로 처리한 B-hPD-1/hPD-L1/hCD40 마우스의 시간에 따른 체중 변화를 나타내는 그래프를 도시하였다. PBS 용액을 대조군(G1)으로 주사한다.

도 47은 MC38-hPD-L1 세포를 주사하고, ScFV-HC-IgG1-LALA(G2 및 G5), 아테졸리주맙-6A7-FVHC-IgG1-LALA(G3 및 G6) 또는 아벨루맙-6A7-FVHC-IgG1-LALA(G4 및 G7)로 처리한 B-hPD-1/hPD-L1/hCD40 마우스의 시간에 따른 종양 부피 변화를 나타내는 그래프를 도시하였다. PBS 용액을 대조군(G1)으로 주사한다.

도 48은 본 개시에 기재된 서열을 나열하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0130] 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 동시에 두 개의 상이한 에피토프(예를 들어, 두 개의 상이한 항원에 있음)에 결합할 수 있는 인공 단백질이다.

[0131] 일부 실시양태에서, 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 면역글로불린(예를 들어, IgG)을 수식하는 것을 통해 구성될 수 있다. 예를 들어, 항 PD-1 IgG의 Fab 영역은 CD40을 표적으로 하는 scFv 도메인으로 치환할 수 있다. 대안적으로, CD40을 표적으로 하는 scFv 도메인은 항 PD-1 IgG 중쇄의 C말단에 연결될 수 있다.

[0132] 일부 실시양태에서, 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 두 개의 아암(아암 A 및 B)을 가질 수 있다. 각 아암은 하나의 중쇄 가변 영역과 하나의 경쇄 가변 영역을 구비하여, 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 부위)을 형성한다.

[0133] 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 IgG 유사 및 비 IgG 유사일 수 있다. IgG 유사 이중특이성 항체는 두 개의 Fab 아암과 하나의 Fc 영역을 가질 수 있으며, 이 두 개의 Fab 아암은 상이한 항원에 결합한다. 비 IgG 유사 이중특이성 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는 예를 들어, 화학적으로 연결되는 Fab(예를 들어, 두 개의 Fab 영역이 화학적으로 연결됨) 및 단쇄 가변 프래그먼트(scFv)일 수 있다. 예를 들어, scFv는 두 개의 중쇄 가변 영역과 두 개의 경쇄 가변 영역을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서는, 하나의 아암은 scFv 폴리펩티드이다. 일부 실시양태에서는, 두 개의 아암 모두가 scFv 폴리펩티드이다.

[0134] **항 PD-1/CD40 항원 결합 단백질 작제물**

[0135] 면역계는 체내의 정상 세포와 "외래의"세포로 판단되는 세포를 구분할 수 있으므로, 이는 면역계로 하여금 외래 세포를 공격하고, 정상 세포에는 영향을 끼치지 않도록 한다. 이와 같은 메커니즘은 면역 체크포인트라고 하는 단백질과 관련되기도 한다. 면역 체크포인트는 면역계에서 신호(공동 자극분자)를 켜거나 또는 신호를 끄는 분자이다.

[0136] 체크포인트 억제제는 면역계가 정상 조직을 공격하는 것을 방지함으로써 자가면역 질환을 예방할 수 있다. 많은 종양 세포 역시 체크포인트 억제제를 발현한다. 이러한 종양 세포는 일부 면역 체크포인트 경로를 "포섭"(co-opt)함으로써(특히 종양 항원에 대해 특이적인 T세포에서) 면역 감시를 회피하게 된다(Creelan, Benjamin C. "Update on immune checkpoint inhibitors in lung cancer", Cancer Control 21.1(2014년): 제80-89페이지). 왜냐하면 많은 면역 체크포인트는 리간드-수용체의 상호 작용에 의해 작동되기 때문에 이들은 리

간드 및/또는 그 수용체에 대한 항체에 의해 매우 쉽게 차단될 수 있다.

[0137] 본 개시는 본원에 기재된 바와 같은 다양한 형식의 항 PD1/CD40 항원 결합 단백질 작제물을 제공한다. 이론에 구애됨이 없이, 가령 PD-1 발현 세포가 존재하는 상황 하에서, PD1/CD40 이중특이성 항체가 CD40 신호전달 경로를 효과적으로 활성화시킬 수 있다면, 그 메커니즘은 아마도 CD40이 PD-1 발현 세포와 CD40 발현 세포의 접촉면에 군집화된 것일 수 있다. 이중특이성 항체는 CD40 및 PD1 분자의 접촉 표면에서의 농축을 촉진시킬 수 있다. 이와 같은 농축은 CD40 군집화를 한층 더 증가시킴으로써 CD40 통로를 활성화시키게 된다.

[0138] *PD-1*

[0139] PD-1(예정사-1)은 면역 체크포인트인 것으로, 림프절의 항원 특이성 T세포의 사멸(세포예정사)을 촉진하면서 조절성 T세포(항염성, 억제성 T세포)의 사멸을 감소시키는 이중 메커니즘을 통해 자가 면역을 방어한다.

[0140] PD-1은 주로 T세포와 원시 B세포의 표면에 발현되고; PD-1의 두 가지 리간드(PD-L1 및 PD-L2)는 항원제시세포(APC)에서 광범위하게 발현된다. PD-1과 그 리간드의 상호 작용은 면역 응답의 음성 조절에서 매우 중요한 역할은 한다. PD-1과 그 리간드의 결합을 억제하면 종양 세포로 하여금 면역계의 킬러 작용에 노출되도록 함으로써, 종양 조직을 죽이고 암을 치료하는 효과를 실현할 수 있다.

[0141] PD-L1은 많은 상이한 암의 종양 세포에서 발현된다. T세포에 있는 PD-1을 결합하는 것을 통해 이를 억제하고, PD-L1 발현은 종양 세포가 면역 공격을 회피하기 위한 주요 메커니즘이다. 개념적 측면에서 말하면, PD-L1의 과발현은 두 가지 메커니즘에 의해 촉발되는 것일 수 있는데, 즉 선천적 메커니즘과 적응성 메커니즘이다. 암 세포에 있는 PD-L1의 내적 발현은 이러한 종양 세포의 세포/유전 이상과 관련된다. AKT 및 STAT 통로를 포함한 세포 신호전달의 활성화가 PD-L1 발현 증가를 초래한다. 원발성 종격 B세포 림프종에 있어서, MHC II형 트랜스활성화인자(CIITA)는 PD-L1 또는 PD-L2와 유전자 융합이 이루어짐으로써, 이들 단백질의 과발현을 초래하게 된다. PD-L1 및 PD-L2가 위치되는 염색체 9p23-24의 증폭은 전형적인 호지킨 림프종에서 이와 같은 두 가지 단백질의 발현 증가를 초래한다. 적응성 메커니즘은 종양 미세환경에서 PD-L1 발현의 유도와 관련이 있다. PD-L1은 인터페론 γ에 응답하여 종양 세포에서 유도될 수 있다. 현미부수체 불안정성 결장암에 있어서, PD-L1은 주로 종양 내 골수성 세포에서 발현되어 세포독성 T세포 기능을 억제한다.

[0142] PD-1 차단을 사용하여 항종양 면역을 증강시키는 것은 만성 감염 모델에서 관찰된 결과로부터 비롯된 것이며, 이러한 모형에서, PD-1의 상호작용을 차단하면 T세포 고갈을 역전시키게 된다. 유사하게, PD-1 차단은 T세포 PD-1/종양 세포 PD-L1 또는 T세포 PD-1/종양 세포 PD-L2의 상호작용을 막음으로써 T세포에 의해 매개된 항종양 면역을 회복시키게 된다.

[0143] PD-1에 대한 상세한 설명 및 항 PD-1 항체의 암 치료에 관한 응용은 Topalian, Suzanne L. 등, "Safety, activity, and immuno correlations of anti-PD-1 antibody in cancer", New England Journal of Medicine 366.26 (2012년): 제2443-2454페이지; Hirano, Fumiya 등, "Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity", Cancer research 65.3 (2005년): 제1089-1096페이지; Raedler, Lisa A. "Keytruda(pembrolizumab): first PD-1 inhibitor approved for previously treated unresectable or metastatic melanoma", American health & drug benefits 8.Spec Featur (2015년) 96; Kwok, Gerry 등, "Pembrolizumab (Keytruda)", (2016년): 제2777-2789페이지; US 20170247454; US 9,834,606 B; 및 US 8,728,474에 기재되어 있으며, 이들 문헌 중 각각의 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 통합된다.

[0144] *CD40*

[0145] CD40(종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 5 또는 TNFRSF5라고도 함)은 수지상 세포(DC), 대식세포, B세포 및 단핵 세포와 같은 항원제시세포(APC) 및 수많은 비면역 세포와 광범위한 종양에서 발현되는 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원이다. 활성화된 보조 T세포에서 삼합체 리간드 CD154(CD40 리간드 또는 CD40L라고도 함)와의 상호작용은 APC 활성화를 일으킴으로써 적응성 면역을 유도하게 된다.

[0146] 생리학적으로 볼 때, CD40를 통한 APC의 신호전달을 대표적인 보조 T세포의 주요 구성 부분으로 보고 있으며, 또한 보조 T세포의 APC 허여(license) 능력을 대폭 매개한다. 예를 들어, CD40의 DC에서의 연결은 공동 자극분자 및 MHC 분자의 표면 발현 증가, 염증 유발 사이토카인의 생성 및 T세포 촉발 증강을 유도한다. CD40의 휴지기 B세포에서의 연결은 항원제시 기능 및 증식을 증가시킨다.

[0147] 전임상 모델에서, 래트 항 마우스 CD40 mAb는 CD40+ B세포 림프종 치료에서 유의한 치료 활성을 보였고(마우스의 80%-100%가 치유되었고 CD8 T세포 의존 방식으로 재도전에 면역됨), 또한 다양한 CD40 음성 종양에 대해서도

효과적이었다. 이러한 mAb는 말기에 가까운 질환을 앓고 있는 마우스의 대부분 종양을 제거할 수 있다. CD40 mAb는 임상 시험에서 이미 연구되고 있으며 흑색종, 췌장암, 중피종, 혈액 악성 종양, 특히 비호지킨 림프종, 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및 말기 고형 종양의 치료에 사용된다.

[0148] 치료용 항-CD40 항체는 강력한 효능 작용에서 길항 작용에 이르는 다양한 활성을 나타낸다. 현재로서는 이러한 이질성에 대한 만족스러운 설명이 없다. 효능성 CD40 mAb의 주요 메커니즘은 숙주 APC를 활성화하여 환자로부터 임상적으로 의미 있는 항종양 T세포 응답을 유도하는 것이다. 이러한 응답에는 T세포 비의존적이나 대식세포 의존적 종양 퇴치 개시를 포함한다. CD40 활성화된 대식세포는 종양을 죽이는 세포가 될 수 있으며, 적어도 췌장암에서는 종양 간질 고갈을 촉진함으로써 체내 종양 붕괴를 유도할 수 있다. 중요한 것은, 이러한 메커니즘은 종양의 CD40 발현을 필요로 하지 않으므로, 많은 임상 시험에 여러가지 종양 환자를 포함시킬 만한 사유가 존재한다. 이러한 전략의 목적이 DC, 대식세포 또는 양자 모두를 활성화시키는 것이라면, CD40 mAb의 목표가 예를 들어 보체에 의해 매개된 세포독성(CDC) 또는 항체 의존성 세포독성(ADCC)을 통해 그 결합을 죽이는 세포가 아닐 수도 있다. 따라서, 설계를 통해, 강력한 효능성 항체는 CDC 또는 ADCC를 매개하지 않는다.

[0149] 반면에, 기타 인간 CD40 mAb는 거의 모든 B세포 악성 종양, 일부 흑색종 및 일부 암과 같은 CD40+ 종양에 대한 CDC 및 ADCC의 저항을 매개할 수 있다. 마지막으로, CD40이 종양 세포에 결합하게 되면 세포 사멸을 촉진한다는 것을 나타낼 수 있는 일부 증거들도 있으며, 이는 그 어떠한 면역 이펙터 경로를 간섭하지 않는 상황 하에서 완성될 수 있다. 이는 CD40+ 암 및 흑색종과 같은 CD40+ B세포 악성 종양 및 일부 고형 종양에 적용된다는 것이 이미 증명되었다.

[0150] CD40 및 그 기능에 대한 상세한 설명은 예를 들어 Vonderheide 등, "Agonistic CD40 antibody and cancer therapy", (2013년): 제1035-1043페이지; Beatty 등, "CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans", Science 331.6024 (2011년): 제1612-1616페이지; Vonderheide 등, "Clinical activity and immune modulation in cancer patients treated with CP-870,893, a novel CD40 agonist monoclonal antibod", Journal of Clinical Oncology 25.7 (2007년): 제876-883페이지;를 참조할 수 있으며, 이들 문헌 중 각각의 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 통합된다.

[0151] 일부 실시양태에서, 본 개시는 두 가지 상이한 항원(예를 들어 PD-1 및 CD40)에 특이적으로 결합하는 항원 결합 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체)을 제공한다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체)은 PD-1 발현 세포(예를 들어, T세포) 및 CD40 발현 세포(예를 들어, APC 세포)를 브리징해줌으로써 항원 제시, CD40 연결 및/또는 T세포 활성화를 촉진시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 작제물은 PD-1/PD-L1 통로를 차단함으로써 면역 응답을 활성화시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체)은 항원제시세포(APC)(예를 들어, 수지상 세포 또는 대식세포)의 CD40 통로를 활성화시킴으로써 항종양 응답을 유도할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체)에 의해 유도된 CD40 활성화는 단지 PD-1을 발현하는 세포가 존재 시에만 발생한다(예를 들어, 브리징 효과를 통함). 따라서, 항원 결합 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체)은 국소 종양 미세환경 내에서 면역 응답을 유도하되, 부작용, 예를 들어 간에서의 독성을 유발할 수 있는 전신 면역 활성화는 일으키지 않을 수 있다. 또한, 일부 실시양태에서, 항원 결합 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체)은 Fc 수용체(예를 들어, FCɣRIIB)에 의해 매개된 CD40 군집화를 통해 CD40 통로를 활성화시킬 수 없다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 방법은 고 FCɣRIIB 발현 조직, 예를 들어 간 및/또는 신장에서의 독성을 한층 더 낮췄다.

[0152] 또한, 종양 다운스트림에 인접하는 림프절(종양 배수 림프절(TDLN))은 업스트림 종양의 존재로 인해 큰 변화를 일으킬 수 있다. 종양 배수 림프절(TDLN)에는 PD-L1+ 일반적 수지상 세포와 밀접하게 관련된 종양 특이적 PD-1+ T세포가 농축되어 있다. TDLN을 표적으로 하는 PD-1 통로 차단은 향상된 항종양 T 세포 면역을 유도하기 위해 전구체 고갈 T세포(progenitor-exhausted T cell)를 종양 부위에 접종함으로써, 종양 조절을 개선시킬 수 있다. TDLN에서는 조절성 T세포(Treg)의 수와 억제 활성도 증가한다. 이러한 Treg 세포 중 일부 Treg 세포는 특이적 종양 유래의 항원에 대해 드노보 합성될 수 있다. 어떤 경우에서는, TDLN에서 신생 항원의 제시가 보호 면역 응답을 유도하지 못할 뿐만 아니라 오히려 전신 내성을 적극적으로 생성하게 만든다. 따라서, 한편으로, 항원 결합 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체)은 또한 종양 배수 림프절에서의 면역 응답을 유도하고, 종양 배수 림프절에서의 Treg 세포 활성을 억제하며, 종양 항원에 대한 전신 내성을 억제할 수 있다.

[0153] 일부 실시양태에서, 본 개시는 항 CD40 단클론 항체(예를 들어, 셀리크렐루맙)의 독성을 낮추는 방법을 제공한다. 해당 방법은 항 CD40 단클론 항체의 항원 결합 프래그먼트를 포함하는 다중특이성(예를 들어, 이중특이성) 항체를 제조하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다중특이적 항체는 PD-1에 대한 항원 결합 프래그먼트를

갖는다. 일부 실시양태에서, 다중특이성(예를 들어, 이중특이성) 항체는 본원에 기재된 바와 같은 구조를 갖는다. 일부 실시양태에서, 혈액 생화학적 시험(예를 들어, ALT 및/또는 AST 수준 측정을 통함) 또는 간의 조직병리학적 검사를 통해 독성을 평가한다. 일부 실시양태에서, 비수식된 항 CD40 단클론 항체의 독성에 비해, 본원에 기재된 바와 같은 방법은 항 CD40 단클론 항체의 독성을 80% 미만, 70% 미만, 60% 미만, 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만 또는 10% 미만으로 떨어뜨릴 수 있다.

[0154] 일부 실시양태에서, 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 IgG4의 CH1, CH2 및/또는 CH3 도메인(예를 들어, CH2 및 CH3 도메인)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 놉-인투-홀(KIH) 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 제1 폴리펩티드 사슬에서 IgG4의 CH1, CH2, CH3 도메인을 포함하고, 제2 폴리펩티드 사슬에서 IgG4의 CH2, CH3 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 SEQ ID NO: 149, 150 또는 151과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0155] 일부 실시양태에서, 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 IgG1의 CH1, CH2 및/또는 CH3 도메인(예를 들어, CH1, CH2 및 CH3 도메인)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 LALA 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 제1 폴리펩티드 사슬에서 IgG1의 CH1, CH2, CH3 도메인을 포함하고, 제2 폴리펩티드 사슬에서 IgG1의 CH1, CH2, CH3 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 SEQ ID NO: 147 또는 148과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0156] 일부 실시양태에서, 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 IgG(예를 들어, IgG1 또는 IgG4) 중쇄 고정 도메인 3(CH3)의 C말단에서 라이신 잔기가 결실된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, IgG CH3의 C말단 라이신 잔기를 포함하는 항체 또는 항원 결합 프래그먼트에 비해, IgG CH3 도메인의 C말단 라이신 잔기의 결실은 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트의 분해 수준을 예를 들어 적어도 또는 약 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50%를 감소시킨다.

[0157] 일부 실시양태에서, 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 경쇄 고정 도메인(CL)을 포함한다. 일부 실시양태에서, CL은 SEQ ID NO: 146과 적어도 80%, 85%, 90%, 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0158] 한편으로, 본 개시는 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트를 제공하는 것으로, 해당 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는:

[0159] (a) 바람직하게는 N말단에서 C말단까지 제1 중쇄 가변 영역(VH1), 중쇄 고정 영역 1(CH1), 중쇄 고정 영역 2(CH2) 및 중쇄 고정 영역 3(CH3)을 포함하는 중쇄 폴리펩티드;

[0160] (b) 바람직하게는 N말단에서 C말단까지 제1 경쇄 가변 영역(VL1) 및 경쇄 고정 영역(CL)을 포함하는 경쇄 폴리펩티드; 및

[0161] (c) 바람직하게는 N말단에서 C말단까지 scFv 도메인, 중쇄 고정 영역 2(CH2) 및 중쇄 고정 영역 3(CH3)을 포함하는 단쇄 가변 프래그먼트 폴리펩티드;를 포함한다.

[0162] 일부 실시양태에서, scFv 도메인은 N말단에서 C말단까지 제2 중쇄 가변 영역, 링커 펩티드 서열, 제2 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0163] 일부 실시양태에서, scFv 도메인은 N말단에서 C말단까지 제2 경쇄 가변 영역, 링커 펩티드 서열, 제2 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0164] 일부 실시양태에서, 제1 중쇄 가변 영역과 제1 경쇄 가변 영역은 서로 결합되어 PD-1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위를 형성한다. 일부 실시양태에서, 제2 중쇄 가변 영역과 제2 경쇄 가변 영역은 서로 결합되어 CD40에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 형성한다.

[0165] 일부 실시양태에서, 제2 중쇄 가변 영역, 링커 펩티드 서열 및 제2 경쇄 가변 영역은 CD40에 특이적으로 결합하는 scFv 도메인을 함께 형성한다. 일부 실시양태에서, 링커 펩티드 서열은 SEQ ID NO: 152, 153 또는 154와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CH1, CH2, CH3 및/또는 CL 도메인은 인간 IgG(예를 들어, IgG1 또는 IgG4)로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 인간 IgG(예를 들어, IgG1 또는 IgG4)는 KIH 및/또는 LALA 돌연변이를 포함한다.

[0166] 일부 실시양태에서, 중쇄 폴리펩티드의 서열은 SEQ ID NO: 130에 제시된 바와 같다. 일부 실시양태에서, 경쇄

폴리펩티드의 서열은 SEQ ID NO: 131에 제시된 바와 같다. 일부 실시양태에서, 단쇄 가변 프래그먼트 폴리펩티드의 서열은 SEQ ID NO: 132 또는 133(예를 들어, SEQ ID NO: 132)에 제시된 바와 같다. 일부 실시양태에서, Fab-ScFV-IgG4의 PD-1 중쇄 및 경쇄의 서열은 각각 SEQ ID NO: 130 및 SEQ ID NO: 131에 제시된 바와 같으며; Fab-scFv-IgG4의 CD40 아암의 서열은 SEQ ID NO: 132에 제시된 바와 같다.

[0167] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 **도 1A**에 도시된 개략적 구조를 갖는다. 일부 실시양태에서, 중쇄 폴리펩티드의 서열은 SEQ ID NO: 166과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 경쇄 폴리펩티드의 서열은 SEQ ID NO: 167과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 단쇄 가변 프래그먼트 펩티드의 서열은 SEQ ID NO: 206과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트의 PD-1 아암의 중쇄 서열 및 경쇄 서열은 각각 SEQ ID NO: 166 및 SEQ ID NO: 167에 제시된 바오 같으며; 본원에 기재된 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트의 CD40 아암의 서열은 SEQ ID NO: 173에 제시된 바와 같다.

[0168] 한편으로, 본 개시는 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트를 제공하는 것으로, 해당 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는:

[0169] (a) 바람직하게는 N말단에서 C말단까지 제1 중쇄 가변 영역(VH1), 중쇄 고정 영역 1(CH1), 중쇄 고정 영역 2(CH2), 중쇄 고정 영역 3(CH3), 제1 링커 펩티드 서열 및 scFv 도메인을 포함하는 제1 중쇄 폴리펩티드;

[0170] (b) 바람직하게는 N말단에서 C말단까지 제1 경쇄 가변 영역(VL1) 및 제1 경쇄 고정 영역(CL)을 포함하는 제1 경쇄 폴리펩티드;를 포함한다.

[0171] 일부 실시양태에서, scFv 도메인은 N말단에서 C말단까지 제2 경쇄 가변 영역(VL2), 제2 링커 펩티드 서열 및 제2 중쇄 가변 영역(VH2)을 포함한다.

[0172] 일부 실시양태에서, scFv 도메인은 N말단에서 C말단까지 제2 중쇄 가변 영역(VH2), 제2 링커 펩티드 서열 및 제2 경쇄 가변 영역(VL2)을 포함한다.

[0173] 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 부위는 면역 체크포인트 분자에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 부위는 세포예정사 단백질 1(PD-1), 세포독성 T 림프구 관련 단백질 4(CTLA-4), 림프구 활성화 유전자 3(LAG-3), B 및 T 림프구 관련 단백질(BTLA), 세포예정사 1 리간드 1(PD-L1), CD27, CD28, CD47, CD137, CD154, Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T세포 면역 수용체(TIGIT), 글루코코르티코이드 유도 TNFR 관련 단백질(GITR), T세포 면역글로불린 및 뮤신 도메인-3(TIM-3) 또는 TNF 수용체 슈퍼패밀리 구성원 4(TNFRSF4 또는 OX40)에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 부위는 PD-1에 특이적으로 결합한다.

[0174] 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 부위는 암 특이적 항원 또는 암 관련 항원에 특이적으로 결합한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "암 특이적 항원"이란 암 세포 표면에 특이적으로 발현하는 항원을 가리킨다. 이러한 항원은 종양 세포 감정에 사용할 수 있다. 정상 세포는 암 특이적 항원을 거의 발현하지 않는다. 일부 예시적인 암 특이적 항원은, 예를 들어 CD20, PSA, PSCA, PD-L1, Her2, Her3, Her1, β-카테닌, CD19, CEACAM3, EGFR, c-Met, EPCAM, PSMA, CD40, MUC1 및 IGF1R 등을 포함한다. PSA는 주로 전립선 암 세포에서 발현되고, Her2는 주로 유방 암 세포에서 발현된다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "암 관련 항원"이란 상대적으로 높은 수준으로 암 세포에서 발현하되, 상대적으로 낮은 수준으로도 정상 세포에서 발현할 수 있는 항원을 가리킨다. CD55, CD59, CD46 및 많은 접착 분자(예컨대, N-카드헤린, VE-카드헤린, NCAM, Mel-CAM, ICAM, NrCAM, VCAM1, ALCAM, MCAM 등)는 암 관련 항원이다. 비록 암 특이적 항원과 암 관련 항원은 모두 암세포의 표면에서 발현되지만, 암 특이적 항원과 암 관련 항원의 차이점은 암 관련 항원은 정상 세포에서도 발현되는데, 단만 그 발현 수준은 암 세포에서의 수준과 비교하면 비교적 낮다는 점이다. 반면에, 암 특이적 항원은 정상 세포에서는 거의 발현되지 않으며, 설령 정상 세포에서 발현되더라도 그 양이 극히 적다.

[0175] 일부 실시양태에서, 제2 중쇄 가변 영역과 제2 경쇄 가변 영역은 서로 결합되어 CD40에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 형성한다. 일부 실시양태에서, 제2 항원 결합 부위는 ScFv 또는 VHH 도메인을 포함하거나 또는 이들로 구성된다.

[0176] 일부 실시양태에서, 제2 항원 결합 부위는 항체(예를 들어, IgG)의 Fc 영역에 연결된다. 일부 실시양태에서, 제2 항원 결합 부위는 Fc 영역의 C말단에 연결된다. 일부 실시양태에서, 제2 항원 결합 부위는 Fc 영역의 예를 들어 3A 부위에 삽입된다.

[0177] 3A 부위란 면역글로불린의 기능 또는 융합 폴리펩티드의 생물학적 활성을 방해하지 않고 비천연 펩티드가 삽입될 수 있는 Fc 내의 영역을 가리킨다. 3A 부위는 위치 344에서 시작하여 위치 382(EU 넘버링)까지이다. 일부 실시양태에서, 비천연 폴리펩티드는 융합 부위에서의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개, 32개, 33개, 34개, 35개, 36개, 37개, 38개 또는 39개의 아미노산을 치환하거나, 또는 해당 융합 부위에 있는 임의의 두 개의 아미노산 사이에 삽입된다. 일부 실시양태에서, 융합 부위는 위치 351 내지 362의 영역(EU 넘버링)에 위치된다. 일부 실시양태에서, 비천연 폴리펩티드는 융합 부위에서의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개 또는 모든 아미노산(예를 들어, 351-362)을 치환하거나, 또는 해당 융합 부위에 있는 임의의 두 개의 아미노산 사이에 삽입되며, 예를 들어, 위치 351-352, 352-353, 353-354, 354-355, 355-356, 356-357, 357-358, 358-359, 359-360, 360-361 또는 361-362에 삽입된다. 일부 실시양태에서, 두 개의 잔기는 EU 넘버링에 따른 중쇄 CH3 도메인의 위치 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362 및 363 중 임의의 두 개의 위치로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 비천연 폴리펩티드는 융합 부위에서 아미노산 358-362를 치환한다.

[0178] 일부 실시양태에서, 항 CD40 scFv는 항 PD-1 단클론 항체의 중쇄 CH3 도메인 각각에 융합된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 **도 18A**에 도시된 개략적 구조를 갖는다. 일부 실시양태에서, 융합 중쇄 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 161과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 경쇄 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 141과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 융합 중쇄 폴리펩티드는 본원에 기재된 바와 같은 항 PD-1 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 경쇄 폴리펩티드는 본원에 기재된 바와 같은 항 PD-1 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0179] 일부 실시양태에서, 융합 중쇄 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 168과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 경쇄 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 169와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는 서열을 갖는다.

[0180] 일부 실시양태에서, 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 제1 중쇄 폴리펩티드와 적어도 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는 제2 중쇄 폴리펩티드; 및 제1 경쇄 폴리펩티드와 적어도 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는 제2 경쇄 폴리펩티드;를 또한 포함한다.

[0181] 일부 실시양태에서, 제2 경쇄 가변 영역, 링커 펩티드 서열 및 제2 중쇄 가변 영역은 CD40에 특이적으로 결합하는 scFv 도메인을 함께 형성한다. 일부 실시양태에서, 제1 링커 펩티드 서열은 SEQ ID NO: 153 또는 154와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 링커 펩티드 서열은 SEQ ID NO: 153 또는 154와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CH1, CH2, CH3 및/또는 CL 도메인은 인간 IgG(예를 들어, IgG1 또는 IgG4)로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 인간 IgG(예를 들어, IgG1 또는 IgG4)는 KIH 및/또는 LALA 돌연변이를 포함한다.

[0182] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 PD-1/PD-L1 통로를 차단할 수 있다.

[0183] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 **도 1B**에 도시된 개략적 구조를 갖는다. 일부 실시양태에서, 제1 중쇄 폴리펩티드의 서열은 SEQ ID NO: 134 또는 135에 제시된 바와 같다. 일부 실시양태에서, 제1 경쇄 폴리펩티드의 서열은 SEQ ID NO: 136에 제시된 바와 같다. 일부 실시양태에서, 제1 중쇄 폴리펩티드의 서열은 SEQ ID NO: 137 또는 138에 제시된 바와 같다. 일부 실시양태에서, 제1 경쇄 폴리펩티드의 서열은 SEQ ID NO: 139에 제시된 바와 같다. 일부 실시양태에서, ScFv-HC-IgG4의 수식된 중쇄의 서열은 SEQ ID NO: 134에 제시된 바와 같고, ScFv-HC-IgG4의 경쇄의 서열은 SEQ ID NO: 136에 제시된 바와 같다. 일부 실시양태에서, ScFv-HC-IgG1-LALA의 수식된 중쇄의 서열은 SEQ ID NO: 137에 제시된 바와 같고, ScFv-HC-IgG1-LALA의 경쇄의 서열은 SEQ ID NO: 139에 제시된 바와 같다.

[0184] 일부 실시양태에서, 제1 중쇄 폴리펩티드의 서열은 SEQ ID NO: 162와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는 서열을 포함하며, 제1 경쇄 폴리펩티드의 서열은 SEQ ID NO: 163과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 중쇄 폴리펩티드의 서열은 SEQ ID NO: 164와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는 서열을 포함하며, 제1 경쇄 폴리펩티드의 서열은 SEQ ID NO: 165와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 중쇄 폴리펩티드의 서열은 SEQ ID NO: 175와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는 서열을 포함하며, 제1 경쇄 폴리펩티드의 서열은 SEQ ID NO: 176과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는

100%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 중쇄 폴리펩티드의 서열은 SEQ ID NO: 177과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는 서열을 포함하며, 제1 경쇄 폴리펩티드의 서열은 SEQ ID NO: 178과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0185] 일부 실시양태에서, 제1 중쇄 폴리펩티드의 서열은 SEQ ID NO: 172와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는 서열을 포함하며, 제1 경쇄 폴리펩티드의 서열은 SEQ ID NO: 174와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시는 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트를 제공하는 것으로, 해당 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 폴리펩티드 사슬을 포함하고, 해당 폴리펩티드 사슬은 바람직하게는 N말단에서 C말단까지 PD-1에 결합하는 단일 가변 도메인(VHH), 선택적으로 CH1, CH2, CH3, 링커 펩티드 서열, 및 scFv 도메이을 포함한다. 일부 실시양태에서, VHH는 SEQ ID NO: 204와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는100%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0186] 일부 실시양태에서, 선택된 항 PD-1 항체의 가변 영역(예를 들어, VH 및/또는 VL)은 이들의 서열에 근거하여 본원에 기재된 바와 같은 이중특이성 항체에 대응되는 항 PD-1 가변 영역(예를 들어, VH 및/또는 VL)을 치환하는 데 사용된다. 예를 들어, 선택된 항 PD-1 항체의 VH 서열은 SEQ ID NO: 179, 181, 183, 185, 187, 189, 207 또는 209로부터 선택될 수 있고; 선택된 항 PD-1 항체의 VL 서열은 SEQ ID NO: 180, 182, 184, 186, 188, 190, 208 또는 210으로부터 선택될 수 있다.

[0187] 일부 실시양태에서, 선택된 항 PD-1 항체의 VH 및 VL은 이들의 서열에 근거하여 본원에 기재된 바와 같은 이중특이성 항체에 대응되는 VH 및 VL을 치환하는 데 사용된다. 예를 들어, 선택된 항 PD-1 항체의 VH는 SEQ ID NO: 179이고, 선택된 항 PD-1 항체의 VL은 SEQ ID NO: 180이고; 선택된 항 PD-1 항체의 VH는 SEQ ID NO: 181이고, 선택된 항 PD-1 항체의 VL은 SEQ ID NO: 182이고; 선택된 항 PD-1 항체의 VH는 SEQ ID NO: 183이고, 선택된 항 PD-1 항체의 VL은 SEQ ID NO: 184이고; 선택된 항 PD-1 항체의 VH는 SEQ ID NO: 185이고, 선택된 항 PD-1 항체의 VL은 SEQ ID NO: 186이고; 선택된 항 PD-1 항체의 VH는 SEQ ID NO: 187이고, 선택된 항 PD-1 항체의 VL은 SEQ ID NO: 188이고; 선택된 항 PD-1 항체의 VH는 SEQ ID NO: 189이고, 선택된 항 PD-1 항체의 VL은 SEQ ID NO: 190이고; 선택된 항 PD-1 항체의 VH는 SEQ ID NO: 207이고, 선택된 항 PD-1 항체의 VL은 SEQ ID NO: 208이고; 선택된 항 PD-1 항체의 VH는 SEQ ID NO: 209이고, 선택된 항 PD-1 항체의 VL은 SEQ ID NO: 210이다.

[0188] 일부 실시양태에서, 선택된 항 CD40 항체의 가변 영역(예를 들어, VH 및/또는 VL)은 이들의 서열에 근거하여 본원에 기재된 바와 같은 이중특이성 항체에 대응되는 항 CD40 가변 영역(예를 들어, VH 및/또는 VL)을 치환하는 데 사용된다. 예를 들어, 선택된 항 PD-1 항체의 VH 서열은 SEQ ID NO: 191, 193, 195, 197 또는 199로부터 선택될 수 있고; 선택된 항 PD-1 항체의 VL 서열은 SEQ ID NO: 192, 194, 196, 198 또는 200으로부터 선택될 수 있다.

[0189] 일부 실시양태에서, 선택된 항 CD40 항체의 VH 및 VL은 모두 이들의 서열에 근거하여 본원에 기재된 바와 같은 이중특이성 항체에 대응되는 VH 및 VL을 치환하는 데 사용된다. 예를 들어, 선택된 항 CD40 항체의 VH는 SEQ ID NO: 191이고, 선택된 항 CD40 항체의 VL은 SEQ ID NO: 192이고; 선택된 항 CD40 항체의 VH는 SEQ ID NO: 193이고, 선택된 항 CD40 항체의 VL은 SEQ ID NO: 194이고; 선택된 항 CD40 항체의 VH는 SEQ ID NO: 195이고, 선택된 항 CD40 항체의 VL은 SEQ ID NO: 196이고; 선택된 항 CD40 항체의 VH는 SEQ ID NO: 197이고, 선택된 항 CD40 항체의 VL은 SEQ ID NO: 198이고; 선택된 항 CD40 항체의 VH는 SEQ ID NO: 199이고, 선택된 항 CD40 항체의 VL은 SEQ ID NO: 200이다.

[0190] **항 CD40 항체 및 항원 결합 프래그먼트**

[0191] 본 발명은 CD40에 특이적으로 결합하는 여러 항체 및 그 항원 프래그먼트를 제공한다. 항 PD-1/CD40 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체) 또는 다양한 항원 결합 단백질 작제물은 이러한 항체로부터 유래된 항원 결합 부위를 포함할 수 있다.

[0192] 본원에 기재된 항체 및 항원 결합 프래그먼트는 CD40에 결합할 수 있다. 본 개시는 예를 들어 마우스 항 CD40 항체 03-7F10("7F10"), 06-6A7("6A7") 및 07-4H6("4H6"), 키메라 항체, 및 이들의 인간화 항체를 제공한다.

[0193] 7F10 및 7F10 유래 항체(예를 들어, 인간화 항체)의 CDR 서열은 Kabat 넘버링에 의해 정의된 바와 같은 중쇄 가변 도메인의 CDR(SEQ ID NO: 59-61) 및 경쇄 가변 도메인의 CDR(SEQ ID NO: 62-64)을 포함한다. CDR은 또한 Chothia 시스템에 의해 정의될 수도 있다. Chothia 넘버링에 따르면, 중쇄 가변 도메인의 CDR 서열은 SEQ ID NO: 77-79에 제시된 바와 같고, 경쇄 가변 도메인의 CDR 서열은 SEQ ID NO: 80-82에 제시된 바와 같다.

[0194] 이와 유사하게, 6A7 및 6A7 유래 항체의 CDR 서열은 Kabat 넘버링에 의해 정의된 바와 같은 중쇄 가변 도메인의

CDR(SEQ ID NO: 65-67) 및 경쇄 가변 도메인의 CDR(SEQ ID NO: 68-70)을 포함한다. Chothia 넘버링에 따르면, 중쇄 가변 도메인의 CDR 서열은 SEQ ID NO: 83-85에 제시된 바와 같고, 경쇄 가변 도메인의 CDR 서열은 SEQ ID NO: 86-88에 제시된 바와 같다.

[0195] 4H6 및 4H6 유래 항체의 CDR 서열은 Kabat 넘버링에 의해 정의된 바와 같은 중쇄 가변 도메인의 CDR(SEQ ID NO: 71-73) 및 경쇄 가변 도메인의 CDR(SEQ ID NO: 74-76)을 포함한다. Chothia 넘버링에 따르면, 중쇄 가변 도메인의 CDR 서열은 SEQ ID NO: 89-91에 제시된 바와 같고, 경쇄 가변 도메인의 CDR 서열은 SEQ ID NO: 92-94에 제시된 바와 같다.

[0196] 또한 인간화 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 제공한다. 마우스 항체의 인간화 방법은 다르기 때문에(예를 들면, 서열은 상이한 아미노산에 의해 치환될 수 있음), 항체의 중쇄 및 경쇄는 하나의 버전보다 더 많은 인간화 서열을 가질 수 있다. 인간화 7F10 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 98-100에 제시된 바와 같다. 인간화 7F10 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 101-104에 제시된 바와 같다. 이러한 중쇄 가변 영역 서열(SEQ ID NO: 98-100) 중 임의의 하나의 서열은 이러한 경쇄 가변 영역 서열(SEQ ID NO: 101-104) 중 임의의 하나의 서열과 쌍을 이룰 수 있다.

[0197] 이와 유사하게, 인간화 6A7 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 105-108에 제시된 바와 같다. 인간화 6A7 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 109-111에 제시된 바와 같다. 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역 역시 수식되어 안정성 또는 상호 작용을 증가시킬 수 있다. 6A7-H4는 한층 더 수식되어 SEQ ID NO: 126을 획득할 수 있다. 6A7-K2는 한층 더 수식되어 SEQ ID NO: 127을 획득할 수 있다. 이와 유사하게, 마우스 6A7 항체의 중쇄 가변 영역은 한층 더 수식되어 SEQ ID NO: 128을 획득할 수 있다. 마우스 6A7 항체의 경쇄 가변 영역은 한층 더 수식되어 SEQ ID NO: 129를 획득할 수 있다. 이러한 중쇄 가변 영역 서열(SEQ ID NO: 105-108, 126 및 128) 중 임의의 하나의 서열은 이러한 경쇄 가변 영역 서열(SEQ ID NO: 109-111, 127 및 129) 중 임의의 하나의 서열과 쌍을 이룰 수 있다. 인간화 4H6 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 112-115에 제시된 바와 같다. 인간화 4H6 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 116-119에 제시된 바와 같다. 이러한 중쇄 가변 영역 서열(SEQ ID NO: 112-115) 중 임의의 하나의 서열은 이러한 경쇄 가변 영역 서열(SEQ ID NO: 116-119) 중 임의의 하나의 서열과 쌍을 이룰 수 있다.

[0198] **도 26**에 도시한 바와 같이, 인간화 백분율이란 국제 면역유전학 정보 시스템(IMGT) 데이터베이스에서, 인간 항체 서열과 비교하여 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 서열의 동일성 백분율을 의미한다. 탑 히트(top hit)란 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 서열이 다른 종보다 특정 종에 더 가깝다는 것을 의미한다. 예를 들어, 인간과의 탑 히트란 해당 서열이 다른 종보다 인간에 더 가깝다는 것을 의미한다. 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 탑 히트는 해당 서열이 인간 및 시노몰구스 원숭이 서열과 동일한 동일성 백분율을 가지며, 이러한 동일성 백분율이 다른 종의 서열과 비교하여 가장 높다는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 인간화 백분율은 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93 %, 94% 또는 95% 초과이다. 인간화 백분율을 확인하는 방법 및 탑 히트를 확인하는 방법에 대한 상세한 설명은 당업계에 이미 알려져 있고, 예를 들어 Jones, Tim D. 등, "The INNs and outs of antibody nonproprietary names", MAbs., 제8권, 제1호, Taylor & Francis, 2016년에 기재되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 통합된다. 고인간화 백분율은 통상적으로 여러 가지 장점이 있고, 예를 들어 인체 내에서 보다 안정하고 보다 효과적인 점, 인간 피시험자가 받아들 일 수 있는 가능성이 더 높은 점, 및/또는 부작용 있을 가능성이 보다 작음 점.

[0199] 또한, 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 또한, SEQ ID NO: 59-61, SEQ ID NO: 65-67, SEQ ID NO: 71-73, SEQ ID NO: 77-79, SEQ ID NO: 83-85 및 SEQ ID NO: 89-91로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 중쇄 가변 영역 CDR; 및/또는 SEQ ID NO: 62-64, SEQ ID NO: 68-70, SEQ ID NO: 74-76, SEQ ID NO: 80-82, SEQ ID NO: 86-88 및 SEQ ID NO: 92-94로부터 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 경쇄 가변 영역 CDR;을 함유할 수 있다.

[0200] 일부 실시양태에서, 항체는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2, 3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 가질 수 있는 것으로, 여기서 CDR1 영역은 선택된 VH CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이들로 구성될 수 있고, CDR2 영역은 선택된 VH CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이들로 구성되며, CDR3 영역은 선택된 VH CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이들로 구성되고; 또한 CDR1, 2, 3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 가질 수 있는 것으로, 여기서 CDR1 영역은 선택된 VL CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나

또는 이들로 구성될 수 있고, CDR2 영역은 선택된 VL CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이들로 구성되며, CDR3 영역은 선택된 VL CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이들로 구성된다. 선택된 VH CDR1, 2, 3 아미노산 서열과 선택된 VL CDR1, 2, 3 아미노산 서열은 **도 23**(Kabat CDR) 및 **도 24**(Chothia CDR)에 도시되어 있다.

[0201] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는: 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 59의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 60의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 61의 CDR; 중 1개, 2개 또는 3개의 CDR을 함유하는 중쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0202] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는: 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 65의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 66의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 67의 CDR; 중 1개, 2개 또는 3개의 CDR을 함유하는 중쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0203] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는: 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 71의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 72의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 73의 CDR; 중 1개, 2개 또는 3개의 CDR을 함유하는 중쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0204] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는: 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 77의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 78의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 79의 CDR; 중 1개, 2개 또는 3개의 CDR을 함유하는 중쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0205] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는: 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 83의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 84의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 85의 CDR; 중 1개, 2개 또는 3개의 CDR을 함유하는 중쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0206] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는: 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 89의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 90의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 91의 CDR; 중 1개, 2개 또는 3개의 CDR을 함유하는 중쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0207] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는: 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 62의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 63의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 64의 CDR; 중 1개, 2개 또는 3개의 CDR을 함유하는 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0208] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는: 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 68의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 69의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 70의 CDR; 중 1개, 2개 또는 3개의 CDR을 함유하는 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0209] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는: 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 74의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 75의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 76의 CDR; 중 1개, 2개 또는 3개의 CDR을 함유하는 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0210] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는: 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 80의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 81의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 82의 CDR; 중 1개, 2개 또는 3개의 CDR을 함유하는 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0211] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는: 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결

실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 86의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 87의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 88의 CDR; 중 1개, 2개 또는 3개의 CDR을 함유하는 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0212] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는: 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 92의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 93의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 94의 CDR; 중 1개, 2개 또는 3개의 CDR을 함유하는 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0213] 삽입, 결실 및 치환은 CDR 서열 내 일어날 수도 있고, CDR 서열의 하나 또는 두 개의 말단에 일어날 수도 있다.

[0214] 본 개시는 CD40에 결합하는 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트를 또한 제공한다. 해당 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 함유하는 것으로, 해당 중쇄 가변 영역은 선택된 VH 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되고, 해당 경쇄 가변 영역은 선택된 VL 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성된다. 일부 실시양태에서, 선택된 VH 서열은 SEQ ID NO: 98, 99, 100 또는 120이고, 선택된 VL 서열은 SEQ ID NO: 101, 102, 103, 104 또는 121이다. 일부 실시양태에서, 선택된 VH 서열은 SEQ ID NO: 105, 106, 107, 108, 122, 126 또는 128이고, 선택된 VL 서열은 SEQ ID NO: 109, 110, 111, 123, 127 또는 129이다. 일부 실시양태에서, 선택된 VH 서열은 SEQ ID NO: 112, 113, 114, 115 또는 124이고, 선택된 VL 서열은 SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119 또는 125이다.

[0215] 일부 실시양태에서, 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 본원에 기재된 바와 같은 임의의 VH 서열의 CDR과 동일한 VH CDR을 3개 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 본원에 기재된 바와 같은 임의의 VL 서열의 CDR과 동일한 VL CDR을 3개 가질 수 있다.

[0216] 본 개시는 또한 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산을 제공하는 것으로, 해당 폴리펩티드는 면역글로불린 중쇄 또는 면역글로불린 경쇄를 포함한다. 면역글로불린 중쇄 또는 면역글로불린 경쇄는 **도 23** 또는 **도 24**에 도시된 CDR을 포함하거나, 또는 **도 26**에 도시된 서열을 갖는다. 폴리펩티드가 대응되는 폴리펩티드(예를 들어, 대응되는 중쇄 가변 영역 또는 대응되는 경쇄 가변 영역)와 쌍을 이루는 경우, 쌍을 이루는 폴리펩티드는 CD40(예를 들어, 인간 CD40)에 결합한다.

[0217] 항 CD40 항체 및 항원 결합 프래그먼트 역시 항체 또는 항체 프래그먼트와 다중특이성(예를 들어, 이중특이성) 항체 또는 항체 프래그먼트의 항체 변이체(유도체 및 접합체 포함)일 수 있다. 본원에서 제공하는 기타 항체는 다클론 항체, 단클론 항체, 다중특이성(중합체, 예를 들어 이중특이성) 항체, 인간 항체, 키메라 항체(예를 들어, 인간-마우스 키메라), 단쇄 항체, 세포내 제조된 항체(즉, 인트라바디) 및 이들의 항원 결합 프래그먼트이다. 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 임의의 유형(예를 들어 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 클래스(예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 서브클래스일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 IgG 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트이다.

[0218] 전장 항체의 원하는 친화력 및 특이성을 보존하기만 하면 항체 프래그먼트는 제공되는 방법에 적용된다. 따라서, CD40에 결합하는 항체 프래그먼트는 CD40에 결합하는 능력을 보존하게 된다. Fv 프래그먼트는 온전한 항원 식별 및 결합 부위를 함유하는 항체 프래그먼트이다. 해당 영역은 긴밀하게 결합된 하나의 중쇄 가변 도메인과 하나의 경쇄 가변 도메인으로 된 이량체로 구성되는 것으로, 이는 scFv와 같이 천연 공유일 수 있다. 이와 같은 구조형태에서, 가변 도메인 각각의 3개 CDR의 상호작용이 VH-VL 이량체 표면에 있는 항원 결합 부위를 제한하였다. 6개의 CDR 또는 그 하위 그룹이 공동으로 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 하지만, 설령 단일 가변 도메인(또는 어느 항원에 대해 특이적인 3개의 CDR만 포함되는 반 개의 Fv)이라고 하더라도 항원 식별 및 결합 능력을 구비하며, 단, 친화력은 전체 결합 부위보다 낮다.

[0219] 일부 실시양태에서, 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 이중특이성 항체인 것으로, 이는 하나 이상(예를 들어, 1개, 2개, 3개 또는 4개)의 CD40(예를 들어, 인간 CD40)에 결합하는 scFv 도메인을 포함한다.

[0220] 일부 실시양태에서, 항 CD40 scFv는 IgG(예를 들어, IgG4) Fc 영역의 중쇄 고정 도메인 2(CH2)의 N말단에 연결된다. 일부 실시양태에서, 항 CD40 scFv는 IgG(예를 들어, IgG1 또는 IgG4) Fc 영역의 C말단에 연결된다. 일부 실시양태에서, 항 CD40 scFv는 IgG(예를 들어, IgG1 또는 IgG4)의 Fc 영역, 예를 들어 3A 부위에 삽입된다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트의 하나의 폴리펩티드 사슬은 항 CD40 scFv에 연결된다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트의 두 개의 폴리펩티드 사슬은 항 CD40 scFv에

연결된다.

[0221] 일부 실시양태에서, 항 CD40 scFv는 N말단에서 C말단까지 중쇄 가변 영역(VH), 링커 펩티드 및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항 CD40 scFv는 N말단에서 C말단까지 경쇄 가변 영역(VL), 링커 펩티드 및 중쇄 가변 영역(VH)을 포함한다. 일부 실시양태에서, VL-링커 펩티드-VH 구조는 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트의 발현을 향상시켰다(예를 들어, 적어도 또는 약 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 향상). 면역글로불린 중쇄(VH) 또는 면역글로불린 경쇄(VL)는 **도 23** 또는 **도 24**에 도시된 CDR을 포함하거나, 또는 **도 26**에 도시된 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 링커 펩티드는 SEQ ID NO: 152, 153 또는 154와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항 CD40 scFv는 SEQ ID NO: 155, 156, 157 또는 158과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0222] **항 PD-1 항체 및 항원 결합 프래그먼트**

[0223] 본 개시는 PD-1에 특이적으로 결합하는 항체 및 그 항원 결합 프래그먼트를 제공한다. 항 PD-1/CD40 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체)은 이러한 항체로부터 유래된 항원 결합 부위를 포함할 수 있다.

[0224] 본원에 기재된 항체 및 항원 결합 프래그먼트는 PD-1에 결합할 수 있다. 본 개시는 마우스 항 PD-1 항체 25-1A7("1A7"), 18-3F1("3F1") 및 3-6G1("6G1"), 및 이들의 인간화 항체를 제공한다.

[0225] 1A7 및 1A7 유래 항체(예를 들어, 인간화 항체)의 CDR 서열은 Kabat 넘버링에 의해 정의된 바와 같은 중쇄 가변 도메인의 CDR(SEQ ID NO: 1-3) 및 경쇄 가변 도메인의 CDR(SEQ ID NO: 4-6)을 포함한다. CDR은 또한 Chothia 시스템에 의해 정의될 수도 있다. Chothia 넘버링에 따르면, 중쇄 가변 도메인의 CDR 서열은 SEQ ID NO: 19-21에 제시된 바와 같으며, 경쇄 가변 도메인의 CDR 서열은 SEQ ID NO: 22-24에 제시된 바와 같다.

[0226] 이와 유사하게, 3F1 및 3F1 유래 항체의 CDR 서열은 Kabat 넘버링에 의해 정의된 바와 같은 중쇄 가변 도메인의 CDR(SEQ ID NO: 7-9) 및 경쇄 가변 도메인의 CDR(SEQ ID NO: 10-12)을 포함한다. Chothia 넘버링에 따르면, 중쇄 가변 도메인의 CDR 서열은 SEQ ID NO: 25-27에 제시된 바와 같으며, 경쇄 가변 도메인의 CDR은 SEQ ID NO: 28-30에 제시된 바와 같다.

[0227] 6G1 및 6G1 유래 항체의 CDR 서열은 Kabat 넘버링에 의해 정의된 바와 같은 중쇄 가변 도메인의 CDR(SEQ ID NO: 13-15) 및 경쇄 가변 도메인의 CDR(SEQ ID NO: 16-18)을 포함한다. Chothia 넘버링에 따르면, 중쇄 가변 도메인의 CDR 서열은 SEQ ID NO: 31-33에 제시된 바와 같으며, 경쇄 가변 도메인의 CDR은 SEQ ID NO: 34-36에 제시된 바와 같다.

[0228] 또한 인간화 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 제공한다. 마우스 항체의 인간화 방법은 다르기 때문에(예를 들면, 서열은 상이한 아미노산에 의해 치환될 수 있음), 항체의 중쇄 및 경쇄는 하나의 버전보다 더 많은 인간화 서열을 가질 수 있다. **도 22**는 이러한 인간화 서열의 인간화 백분율을 제공한다.

[0229] 인간화 1A7 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 40-42에 제시된 바와 같다. 인간화 1A7 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 43-45에 제시된 바와 같다. 이러한 중쇄 가변 영역 서열(SEQ ID NO: 40-42) 중 임의의 하나의 서열은 이러한 경쇄 가변 영역 서열(SEQ ID NO: 43-45) 중 임의의 하나의 서열과 쌍을 이룰 수 있다.

[0230] 이와 유사하게, 인간화 3F1 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 46-49에 제시된 바와 같다. 인간화 3F1 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 50-52에 제시된 바와 같다. 이러한 중쇄 가변 영역 서열(SEQ ID NO: 46-49) 중 임의의 하나의 서열은 이러한 경쇄 가변 영역 서열(SEQ ID NO: 50-52) 중 임의의 하나의 서열과 쌍을 이룰 수 있다.

[0231] 또한, 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 또한, SEQ ID NO: 1-3, SEQ ID NO: 7-9, SEQ ID NO: 13-15, SEQ ID NO: 19-21, SEQ ID NO: 25-27 및 SEQ ID NO: 31-33으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 중쇄 가변 영역 CDR; 및/또는 SEQ ID NO: 4-6, SEQ ID NO: 10-12, SEQ ID NO: 16-18, SEQ ID NO: 22-24, SEQ ID NO: 28-30 및 SEQ ID NO: 34-36으로부터 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 경쇄 가변 영역 CDR;을 함유할 수 있다.

[0232] 일부 실시양태에서, 항체는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2, 3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 가질 수 있는 것으로, 여기서 CDR1 영역은 선택된 VH CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이들로 구성될 수 있고, CDR2 영역은 선택된 VH CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이들로 구성되며, CDR3 영역은 선택된

VH CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이들로 구성되고; 또한 CDR1, 2, 3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 가질 수 있는 것으로, 여기서 CDR1 영역은 선택된 VL CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이들로 구성될 수 있고, CDR2 영역은 선택된 VL CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이들로 구성되며, CDR3 영역은 선택된 VL CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이들로 구성된다. 선택된 VH CDR1, 2, 3 아미노산 서열과 선택된 VL CDR1, 2, 3 아미노산 서열은 **도 19**(Kabat CDR) 및 **도 20**(Chothia CDR)에 도시되어 있다.

[0233] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는: 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 1의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 2의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 3의 CDR; 중 1개, 2개 또는 3개의 CDR을 함유하는 중쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0234] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는: 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 7의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 8의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 9의 CDR; 중 1개, 2개 또는 3개의 CDR을 함유하는 중쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0235] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는: 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 13의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 14의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 15의 CDR; 중 1개, 2개 또는 3개의 CDR을 함유하는 중쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0236] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는: 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 19의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 20의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 21의 CDR; 중 1개, 2개 또는 3개의 CDR을 함유하는 중쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0237] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는: 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 25의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 26의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 27의 CDR; 중 1개, 2개 또는 3개의 CDR을 함유하는 중쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0238] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는: 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 31의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 32의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 33의 CDR; 중 1개, 2개 또는 3개의 CDR을 함유하는 중쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0239] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는: 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 4의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 5의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 6의 CDR; 중 1개, 2개 또는 3개의 CDR을 함유하는 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0240] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는: 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 10의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 11의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 12의 CDR; 중 1개, 2개 또는 3개의 CDR을 함유하는 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0241] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는: 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 16의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 17의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 18의 CDR; 중 1개, 2개 또는 3개의 CDR을 함유하는 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0242] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는: 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 22의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 23의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 24의 CDR; 중 1개, 2개

또는 3개의 CDR을 함유하는 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0243] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는: 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 28의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 29의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 30의 CDR; 중 1개, 2개 또는 3개의 CDR을 함유하는 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0244] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는: 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 34의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 35의 CDR; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 SEQ ID NO: 36의 CDR; 중 1개, 2개 또는 3개의 CDR을 함유하는 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0245] 삽입, 결실 및 치환은 CDR 서열 내 일어날 수도 있고, CDR 서열의 하나 또는 두 개의 말단에 일어날 수도 있다.

[0246] 본 개시는 PD-1에 결합하는 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트를 또한 제공한다. 해당 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 함유하는 것으로, 해당 중쇄 가변 영역은 선택된 VH 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되고, 해당 경쇄 가변 영역은 선택된 VL 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성된다. 일부 실시양태에서, 선택된 VH 서열은 SEQ ID NO: 40, 41, 42 또는 53이고, 선택된 VL 서열은 SEQ ID NO: 43, 44, 45 또는 54이다. 일부 실시양태에서, 선택된 VH 서열은 SEQ ID NO: 46, 47, 48, 49 또는 55이고, 선택된 VL 서열은 SEQ ID NO: 50, 51, 52 또는 56이다. 일부 실시양태에서, 선택된 VH 서열은 SEQ ID NO: 57이고, 선택된 VL 서열은 SEQ ID NO: 58이다.

[0247] 일부 실시양태에서, 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 본원에 기재된 바와 같은 임의의 VH 서열의 CDR과 동일한 VH CDR을 3개 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 본원에 기재된 바와 같은 임의의 VL 서열의 CDR과 동일한 VL CDR을 3개 가질 수 있다.

[0248] 본 개시는 또한 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산을 제공하는 것으로, 해당 폴리펩티드는 면역글로불린 중쇄 또는 면역글로불린 중쇄를 포함한다. 면역글로불린 중쇄 또는 면역글로불린 경쇄는 **도 19** 또는 **도 20**에 도시된 CDR을 포함하거나, 또는 **도 22**에 도시된 서열을 갖는다. 폴리펩티드가 대응되는 폴리펩티드(예를 들어, 대응되는 중쇄 가변 영역 또는 대응되는 경쇄 가변 영역)와 쌍을 이루는 경우, 쌍을 이루는 폴리펩티드는 PD-1에 결합한다.

[0249] 항 PD-1 항체 및 항원 결합 프래그먼트 역시 항체 또는 항체 프래그먼트와 다중특이성(예를 들어, 이중특이성) 항체 또는 항체 프래그먼트의 항체 변이체(유도체 및 접합체 포함)일 수 있다. 본원에서 제공하는 기타 항체는 다클론 항체, 단클론 항체, 다중특이성(중합체, 예를 들어 이중특이성) 항체, 인간 항체, 키메라 항체(예를 들어, 인간-마우스 키메라), 단쇄 항체, 세포내 제조된 항체(즉, 인트라바디) 및 이들의 항원 결합 프래그먼트이다. 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 임의의 유형(예를 들어 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 클래스(예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 서브클래스일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 IgG 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트이다.

[0250] 전장 항체의 원하는 친화력 및 특이성을 보존하기만 하면 항체 프래그먼트는 제공되는 방법에 적용된다. 따라서, PD-1에 결합하는 항체 프래그먼트는 PD-1에 결합하는 능력을 보존하게 된다. Fv 프래그먼트는 온전한 항원 식별 및 결합 부위를 함유하는 항체 프래그먼트이다. 해당 영역은 긴밀하게 결합된 하나의 중쇄 가변 도메인과 하나의 경쇄 가변 도메인으로 된 이량체로 구성되는 것으로, 이는 scFv와 같이 천연 공유일 수 있다. 이와 같은 구조형태에서, 가변 도메인 각각의 3개 CDR의 상호작용이 VH-VL 이량체 표면에 있는 항원 결합 부위를 제한하였다. 6개의 CDR 또는 그 하위 그룹이 공동으로 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 하지만, 설령 단일 가변 도메인(또는 어느 항원에 대해 특이적인 3개의 CDR만 포함되는 반 개의 Fv)이라고 하더라도 항원 식별 및 결합 능력을 구비하며, 단, 친화력은 전체 결합 부위보다 낮다.

[0251] **항체 특징**

[0252] 항 PD1, 항 CD40 또는 항 PD-1/CD40 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어 항체, 이중특이성 항체 또는 그 항체 프래그먼터)은 본원에 기재된 바와 같은 임의의 항 PD-1 항체, 항 CD40 항체 또는 그 임의의 항원 결합 프래그먼트의 항원 결합 부위를 포함할 수 있다.

[0253] 본원에 기재된 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 PD-1에 결합하고, PD-1과 PD-L1 간의 결합 및/또는 PD-1과

PD-L2 간의 결합을 차단할 수 있다. PD-1과 PD-L1 간의 결합 및/또는 PD-1과 PD-L2 간의 결합을 차단하는 것을 통해, 항 PD-1/CD40 항체는 PD-1 억제 통로(예를 들어, PD-1과 PD-L1의 상호작용 차단을 통함)를 파괴하여 면역응답을 상향 조절한다.

[0254] 일반적인 기술(예를 들어 ELISA, RIA 및 표면 플라즈몬 공명(SPR)을 포함)을 사용하여 항체의 항원에 대한 친화력을 측정할 수 있다. 친화력은 동력학 속도 상수의 몫(KD=koff/ka)에 근거하여 도출할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체)은 $0.1s^{-1}$ 미만, $0.01s^{-1}$ 미만, $0.001s^{-1}$ 미만, $0.0001s^{-1}$ 미만 또는 $0.00001s^{-1}$ 미만의 해리상수(koff)로 PD-1(예를 들어 인간 PD-1, 마우스 PD-1 및/또는 키메라 PD-1)에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 해리상수(koff)는 $0.01s^{-1}$ 초과, $0.001s^{-1}$ 초과, $0.0001s^{-1}$ 초과 또는 $0.00001s^{-1}$ 초과이다. 일부 실시양태에서, 해리상수(koff)는 $1.4\times10^{-3}s^{-1}$, $1.3\times10^{-3}s^{-1}$ 또는 $1.2\times10^{-3}s^{-1}$ 미만이다.

[0255] 일부 실시양태에서, 동력학 결합 속도(kon)는 1×10^{2}/Ms 초과, 1×10^{3}/Ms 초과, 1×10^{4}/Ms 초과, 1×10^{5}/Ms 초과 또는 1×10^{6}/Ms 초과이다. 일부 실시양태에서, 동력학 결합 속도(ka)는 1×10^{5}/Ms 미만, 1×10^{6}/Ms 미만 또는 1×10^{7}/Ms 미만이다. 일부 실시양태에서, 동력학 결합 속도(ka)는 1.0×10^{5}/Ms, 1.2×10^{5}/Ms 또는 1.4×10^{5}/Ms 초과이다.

[0256] 일부 실시양태에서, 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체)은 1×10^{-6}M 미만, 1×10^{-7}M 미만, 1×10^{-8}M 미만, 1×10^{-9}M 미만 또는 1×10^{-10}M 미만의 KD로 PD-1(예를 들어 인간 PD-1, 마우스 PD-1 및/또는 키메라 PD-1)에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, KD는 30nM, 20nM, 15nM, 10nM, 9nM, 8nM, 7nM, 6nM, 5nM, 4nM, 3nM, 2nM 또는 1nM 미만이다. 일부 실시양태에서, KD는 1×10^{-7}M 초과, 1×10^{-8}M 초과, 1×10^{-9}M 초과 또는 1×10^{-10}M 초과이다. 일부 실시양태에서, 항체는 약 10nM, 9.5nM, 9nM, 8.5nM 또는 8nM 이하의 KD로 인간 PD-1에 결합한다.

[0257] 항 PD-1/CD40 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체)은 역시 본원에 기재된 바와 같은 임의의 항 CD40 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트 유래의 항원 결합 부위를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항 PD1/CD40 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 CD40과 CD40L 간의 결합을 차단할 수 있다. 일부 실시양태에서, CD40에 결합하는 것을 통해, 항체 역시 CD40 신호전달 경로를 촉진하여 면역응답을 상향조절할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 CD40 작용제이다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 CD40 길항제이다.

[0258] 일부 실시양태에서, 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체)은 $0.1s^{-1}$ 미만, $0.01s^{-1}$ 미만, $0.001s^{-1}$ 미만, $0.0001s^{-1}$ 미만 또는 $0.00001s^{-1}$ 미만의 해리상수(koff)로 CD40(예를 들어 인간 CD40, 마우스 CD40 및/또는 키메라 CD40)에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 해리상수(koff)는 $0.01s^{-1}$ 초과, $0.001s^{-1}$ 초과, $0.0001s^{-1}$ 초과 또는 $0.00001s^{-1}$ 초과이다. 일부 실시양태에서, 해리상수(koff)는 $5\times10^{-4}s^{-1}$, $4\times10^{-4}s^{-1}$ 또는 $3\times10^{-4}s^{-1}$ 미만이다.

[0259] 일부 실시양태에서, 동력학 결합 속도(kon)는 1×10^{2}/Ms 초과, 1×10^{3}/Ms 초과, 1×10^{4}/Ms 초과, 1×10^{5}/Ms 초과 또는 1×10^{6}/Ms 초과이다. 일부 실시양태에서, 동력학 결합 속도(ka)는 1×10^{5}/Ms 미만, 1×10^{6}/Ms 미만 또는 1×10^{7}/Ms 미만이다. 일부 실시양태에서, 동력학 결합 속도(ka)는 1.0×10^{5}/Ms, 1.5×10^{5}/Ms 또는 2×10^{5}/Ms 또는 2.5×10^{5}/Ms 초과이다.

[0260] 친화력은 동력학 속도 상수의 몫(KD=koff/ka)에 근거하여 도출할 수 있다. 일부 실시양태에서, KD는 1×10^{-6}M 미만, 1×10^{-7}M 미만, 1×10^{-8}M 미만, 1×10^{-9}M 미만 또는 1×10^{-10}M 미만이다. 일부 실시양태에서, KD는 30nM, 20nM, 15nM, 10nM, 9nM, 8nM, 7nM, 6nM, 5nM, 4nM, 3nM, 2nM 또는 1nM 미만이다. 일부 실시양태에서, KD는 1×10^{-7}M 초과, 1×10^{-8}M 초과, 1×10^{-9}M 초과 또는 1×10^{-10}M 초과, 1×10^{-11}M 초과 또는 1×10^{-12}M 초과이다. 일부 실시양태에서, 항체는 약 3.5nM, 3nM, 2.5nM, 2nM 또는 1.5nM 이하의 KD로 인간 CD40에 결합한다.

[0261] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항원)은 PD-1 단클론 항체(예를 들어, 1A7-H2K3-IgG4)의 EC_{50} 값에 비해 약 50%, 약 80%, 약 100%, 약 2배, 약 3배, 약 4배 또는 약 5배의 EC_{50} 값(예를 들어, 리포터 세포 활성화 측정에 의해 확인)으로 PD-1/PD-L1 통로를 차단할 수 있다.

[0262] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항원)은 약 100 μg/mL, 50 μg/mL, 40 μg/mL, 30 μg/mL, 20 μg/mL, 10 μg/mL, 5 μg/mL, 4 μg/mL, 3 μg/mL, 2 μg/mL 또는 1 μg/mL 또는 이보다 작은 EC_{50} 값(예를 들어, 리포터 세포 활성화 측정에 의해 확인)으로 PD-1/PD-L1 통로를 차단할 수 있다.

[0263] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항원)은 약 1 μg/mL, 0.5 μg/mL, 0.1 μg/mL, 0.05 μg/mL, 0.04 μg/mL, 0.03 μg/mL 또는 0.02 μg/mL 또는 이보다 작은 EC_{50} 값(예를 들어, 리포터 세포 활성화 측정에 의해 확인)으로 T세포(예를 들어, PD-1 발현) 및 항원제시세포(예를 들어, CD40 발현)를 브리징할 수 있다.

[0264] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항원)은 항원제시세포(예를 들어, APC 세포의 CD40 통로 활성화)를 활성화시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, PD-1 발현 세포가 부재 시의 APC 세포 활성화(예를 들어, 트랜스 활성화)에 비해, PD-1 발현 세포의 존재는 APC 세포 활성화를 적어도 또는 약 1배, 2배, 5배, 10배, 20배, 50배, 100배, 200배, 500배 또는 500배 이상 증가시킬 수 있다.

[0265] 일부 실시양태에서, PD-1 또는 다른 표적(예를 들어 T세포, B세포, NK세포 또는 골수 세포)을 발현하는 세포 및 APC 세포는 본원에 기재된 바와 같은 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체)의 브리징을 통해 APC 세포에 있는 CD40 군집화를 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 2배, 3배, 5배, 10배 또는 20배를 자극할 수 있다.

[0266] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체)은 면역 응답, CD40 또는 CD40 관련 경로의 활성, APC 세포(예를 들어, 수지상 세포 또는 대식세포)의 활성 또는 수 및/또는 T세포(예를 들어, CD8+ 및/또는 CD4+ 세포)의 활성 또는 수를 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% %, 80%, 90%, 100%, 2배, 3배, 5배, 10배 또는 20배 증가시킬 수 있다.

[0267] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항원)은 FCγRIIB를 통해 약 1 μg/mL, 0.5 μg/mL, 0.1 μg/mL, 0.05 μg/mL, 0.04 μg/mL, 0.03 μg/mL 또는 0.02 μg/mL 또는 이보다 작은 EC_{50} 값(예를 들어, 리포터 세포 활성화 측정에 의해 확인)으로 APC 세포(예를 들어, CD40 발현)를 활성화시킬 수 있다.

[0268] 일부 실시양태에서, CD40 단클론 항체(예를 들어, 6A7-H4K2-IgG2)에 비해, 본원에 기재된 바와 같은 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체)은 FCγRIIB 수용체에 의해 매개되는 세포(예를 들어, APC 세포)의 활성화를 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 2배, 3배, 5배, 10배, 20배, 50배, 100배 또는 500배 감소시킬 수 있다.

[0269] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항원)은 CD40 작용제이다. 일부 실시양태에서, 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항원)은 CD40을 발현하는 표적 세포의 CD40 신호전달을 증가시킬 수 있다.

[0270] 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항원)의 차단 효과 또는 세포 활성화는 EC_{50}을 통해 측정할 수 있다. 반수효과량 농도(EC_{50})란 기준선과 최대값 사이의 절반의 응답을 유도하는 약물 농도를 가리킨다. 일부 실시양태에서, EC_{50}은 약 50 μg/mL, 40 μg/mL, 30 μg/mL, 20 μg/mL, 10 μg/mL, 5 μg/mL, 1 μg/mL, 0.5 μg/mL, 0.2 μg/mL, 0.1 μg/mL, 0.05 μg/mL, 0.04 μg/mL, 0.03 μg/mL, 0.02 μg/mL, 0.01 μg/mL, 0.008 μg/mL, 0.006 μg/mL, 0.005 μg/mL 또는 0.001 μg/mL이거나 또는 이보다 작다.

[0271] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체)은 종양 미세환경 또는 종양 배수 림프절 중의 면역 응답 신호를 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 2배, 3배, 5배, 10배 또는 20배 증폭시킬 수 있다. 일부 실시양태

에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체)은 전체 면역 응답 활성화를 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 2배, 3배, 5배, 10배 또는 20배 감소시킬 수 있다.

[0272] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체)은 유사한 종양 억제 작용(예를 들어, TGI%로 표시)을 가질 수 있는 것으로, 그 투여량 수준은 약 90%, 80%, 70%, 60%, 50%이거나 이보다 작거나, 또는 동일 항원을 표적으로 하는 단클론 항체(예를 들어, 동일 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단클론 항체)의 투여량 수준보다 작다.

[0273] 일부 실시양태에서, 유사한 투여량 수준으로 투여할 때, 본원에 기재된 바와 같은 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체)은 동일 항원을 표적으로 하는 단클론 항체의 종양 성장 억제 효과의 적어도 또는 약 1배, 2배, 3배, 5배, 10배, 20배 또는 50배 높은 종양 성장 억제 효과를 갖는다. 일부 실시양태에서, PD-1 발현 세포가 부재 시의 종양 성장 억제 작용에 비해, PD-1 발현 세포의 존재는 종양 성장 억제 작용을 적어도 또는 약 1배, 2배, 5배, 10배, 20배, 50배, 100배, 200배, 500배 또는 500배 이상 증가시킬 수 있다.

[0274] 일부 실시양태에서, 유사한 투여량 수준으로 투여할 때, 본원에 기재된 바와 같은 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체)은 동일 항원을 표적으로 하는 단클론 항체에 비해, 적어도 또는 약 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 감소된 체내 독성(예를 들어 혈액 AST, ALT 수준)을 갖는다.

[0275] 일부 실시양태에서, 동일 항원을 표적으로 하는 단클론 항체를 비슷한 투여량 수준으로 투여한 동물에 비해, 본원에 기재된 바와 같은 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체)을 투여한 동물(예를 들어, 마우스)은 적어도 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 감소된 염증 수준(예를 들어, 간 및/또는 신장의 병변 정도)을 갖는다.

[0276] 일부 실시양태에서, 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어 항 CD40 항체, 항 PD-1 항체 또는 이중특이성 항체)은 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190% 또는 200%를 초과하는 종양 성장 억제 백분율(TGI%)을 갖는다. 일부 실시양태에서, 항체는 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190 % 또는 200% 미만의 종양 성장 억제 백분율을 갖는다. TGI%는 예를 들어 치료 시작 후 3일째, 4일째, 5일째, 6일째, 7일째, 8일째, 9일째, 10일째, 11일째, 12일째, 13일째, 14일째, 15일째, 16일째, 17일째, 18일째, 19일째, 20일째, 21일째, 22일째, 23일째, 24일째, 25일째, 26일째, 27일째, 28일째, 29일째 또는 30일째, 또는 치료 시작 후 1개월째, 2개월째, 3개월째, 4개월째, 5개월째, 6개월째, 7개월째, 8개월째, 9개월째, 10개월째, 11개월째 또는 12개월째에 확인될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 종양 성장 억제 백분율(TGI% 또는 TGI_{TV}%)은 이하 식으로 계산한다.

[0277] $TGI(\%)=[1-(Ti-T0)/(Vi-V0)]\times 100\%$

[0278] Ti는 i일째 치료군의 평균 종양 부피이다. T0은 0일째 치료군의 평균 종양 부피이다. Vi는 i일째 대조군의 평균 종양 부피이다. V0은 0일째 대조군의 평균 종양 부피이다.

[0279] 일부 실시양태에서, 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항원)은 기능성 Fc 영역을 갖는다. 일부 실시양태에서, 기능성 Fc 영역의 이펙터 기능은 항체 의존성 세포에 의해 매개된 세포독성(ADCC)이다. 일부 실시양태에서, 기능성 Fc 영역의 이펙터 기능은 식세포 작용이다. 일부 실시양태에서, 기능성 Fc 영역의 이펙터 기능은 ADCC 및 식세포 작용이다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 인간 IgG1, 인간 IgG2, 인간 IgG3 또는 인간 IgG4이다. 일부 실시양태에서, 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항원)은 기능성 Fc 영역을 갖지 않는다. 예를 들어, 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는 Fab, Fab', $F(ab')_2$ 및 Fv 프래그머트이다.

[0280] **항체 및 항원 결합 프래그먼트**

[0281] 본 개시는 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체)을 제공한다. 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체)은 항 CD40 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트, 및 항 PD-1 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트를 포함할 수 있다. 이러한 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체), 항 CD40 항체, 항 PD-1 항체 및 그 항원 결합 프래그먼트는 여러 가지 형식을 가질 수 있다.

[0282] 통상적으로, 항체(면역글로불린이라고도 함)는 두 가지 폴리펩티드 사슬, 즉 경쇄 및 중쇄로 구성된다. 본 개시

의 비제한적 항체는 두 개의 중쇄 및 두 개의 경쇄를 포함하는 온전한 테트라 면역글로불린 사슬 항체일 수 있다. 항체의 중쇄는 임의의 아이소타입(IgM, IgG, IgE, IgA 또는 IgD 포함) 또는 서브아이소타입(IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, IgE1, IgE2 등 포함)일 수 있다. 경쇄는 κ경쇄 또는 λ경쇄일 수 있다. 항체는 두 개의 동일한 경쇄 사본 및/또는 두 개의 동일한 중쇄 사본을 포함할 수 있다. 각자 하나의 가변 도메인(또는 가변 영역, VH) 및 다수 개의 고정 도메인(또는 고정 영역)을 함유하는 중쇄는 고정 영역 내의 이황화 결합을 통해 서로 결합되어 항체의 "줄기"를 형성한다. 각자 하나의 가변 도메인(또는 가변 영역, VL) 및 하나의 고정 도메인(또는 고정 영역)을 함유하는 경쇄는 각각 이황화 결합을 통해 하나의 중쇄에 결합한다. 각 경쇄의 가변 영역은 그 결합된 중쇄의 가변 영역과 정렬된다. 경쇄 및 중쇄의 가변 영역은 모두 보다 보존적 프레임워크 영역(FR) 사이에 끼인 세 개의 초가변 영역을 포함한다.

[0283] 이러한 초가변 영역(상보성 결정 영역(CDR)이라고 함)은 항체를 포함하는 주요 항원 결합 표면의 루프를 형성한다. 네 개의 프레임워크 영역은 대부분 β-폴딩 구조를 채택하며, CDR은 연결을 형성하며, 일부 상황 하에서 β-폴딩 구조의 일부분의 루프를 형성한다. 각 사슬의 CDR은 프레임워크 영역을 통해 긴밀하게 함께 유지되어 있으며, 다른 하나의 사슬의 CDR과 함께 항원 결합 부위의 형성에 기여한다.

[0284] 항체의 아미노산 서열에 대한 분석을 통해 해당 항체의 CDR 영역을 확인하는 방법은 잘 알려져 있으며, CDR의 많은 정의가 통상적으로 사용된다. Kabat 정의는 서열 변이성을 기반으로 하며, Chothia 정의는 구조적 루프 영역의 위치를 기반으로 한다. 이러한 방법 및 정의에 대한 설명은 예를 들어 Martin, "Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains", Antibody engineering, Springer Berlin Heidelberg, 2001년, 제422-439페이지; Abhinandan 등, "Analysis and Improvement to Kabat and structurely correct numbering of antibody variable domains", Molecular immunology 45.14 (2008년): 제3832-3839페이지; Wu, T.T. 및 Kabat, E.A. (1970년) J. Exp. Med. 제132권: 제211-250페이지; Martin 등, Methods Enzymol. 제203권: 제121-53페이지(1991년); Morea 등, Biophys Chem. 제68권(제1-3호): 제9-16페이지(1997년 10월), Morea 등, J Mol Biol., 제275권(제2호): 제269-294페이지(1998년 1월), Chothia 등, Nature, 제342권(제6252호): 제877-883페이지(1989년 12월), Ponomarenko 및 Bourne, BMC Structural Biology, 제7권: 제64페이지(2007년)에 기재되어 있고, 이들 문헌 중 각각의 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 통합된다. 본 개시에서 별도로 설명하지 않는 한, 본 개시에서 기본 번호로서 Kabat 번호를 사용한다.

[0285] CDR은 항원의 에피토프 식별에 대하여 매우 중요하다. 본원에 사용된 바와 같이, "에피토프"는 항체의 항원 결합 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 있는 표적 분자의 가장 작은 부분이다. 에피토프의 최소 크기는 약 3개, 4개, 5개, 6개 또는 7개의 아미노산일 수 있지만, 에피토프는 항원 2급 및 3급 구조에 기반한 항원 3차원 구조형태에 의해 결정될 수 있기 때문에, 이들 아미노산은 항원 1급 구조의 연속적인 선형 서열에 있을 필요가 없다.

[0286] 일부 실시양태에서, 항체는 온전한 면역글로불린 분자(예를 들어 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, IgD, IgE, IgA)이다. IgG 서브클래스(IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4)는 고도로 보존적이고, 이들의 고정 영역, 특히 힌지 및 상부 CH2 도메인은 상이하다. IgG 서브클래스의 서열 및 차이점은 당업계에 알려져 있고, 예를 들어 Vidarsson 등, "IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions", Frontiers in immunology 5(2014년); Irani 등, "Molecular properties of human IgG subclasses and their implication for designing therapy monoclonal Abs against Infectious Diseases", Molecular immunology 67.2(2015년): 제171-182페이지, Shakib, Farouk, 편집, "The human IgG subclasses: molecular analysis, fusion of Regulation", Elsevier, 2016년에 기재되어 있으며, 이들 문헌 중 각각의 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 통합된다.

[0287] 항체는 또한 임의의 물종(예를 들어 인간, 설치류 동물, 마우스, 래트, 낙타류 동물)로부터 유래되는 면역글로불린 분자일 수 있다. 본원에 개시된 항체는 또한 다클론 항체, 단클론 항체, 단일특이성 항체, 다중특이성 항체 및 다른 하나의 폴리펩티드와 융합하는 면역글로불린 결합 도메인을 포함하는 키메라 항체를 포함하되 이에 한정되지는 않는다. 용어 "항원 결합 도메인" 또는 "항원 결합 프래그먼트"는 온전한 항체의 특이적 결합 활성을 보존하는 항체의 일부, 즉 온전한 항체의 표적 분자에 있는 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 임의의 부분이다. 이는 예를 들어 Fab, Fab', $F(ab')_2$ 및 이들 프래그먼트의 변이체를 포함한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 예를 들어 scFv, Fv, Fd, dAb, 이중특이성 항체, 이중특이성 scFv, 이중 항체, 선형 항체, 단쇄 항체 분자, 항체 프래그먼트로 형성된 다중특이성 항체, 및 항체 결합 도메인 또는 그와 동원의 결합 도메인으로서의 임의의 폴리펩티드일 수 있다. 항원 결합 도메인의 비제한적인 예시로는, 예를 들어 온전한 항체의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR, 온전한 항체의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역, 온전한

항체의 전장 중쇄 또는 경쇄, 또는 온전한 항체의 중쇄 또는 경쇄 유래의 단일 CDR을 포함한다.

[0288] 일부 실시양태에서, scFv는 두 개의 중쇄 가변 도메인과 두 개의 경쇄 가변 도메인을 갖는다. 일부 실시양태에서, scFv는 두 개의 항원 결합 부위(항원 결합 부위: A 및 B)를 가지며, 두 개의 항원 결합 부위는 상이한 친화력으로 각자의 표적 항원에 결합할 수 있다.

[0289] 일부 실시양태에서, 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항원)은 두 가지 상이한 항원 또는 두 가지 상이한 에피토프에 결합할 수 있다.

[0290] 일부 실시양태에서, 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항원)은 **도 19, 도 20, 도 23 및 도 24**로부터 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 중쇄 가변 영역 CDR을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항원)은 **도 19, 도 20, 도 23 및 도 24**로부터 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 경쇄 가변 영역 CDR을 포함할 수 있다.

[0291] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항원)은 치료제에 접합될 수 있다. 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트를 포함하는 항체 약물 접합체는 치료제에 공유 또는 비공유 결합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료제는 세포독성제 또는 세포성장 억제제(예를 들어 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티디움 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포사이드, 포사이드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디하이드록시안트라신디온, 메이탄시노이드(예컨대 DM -1 및 DM-4), 미토산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 퓨로마이신, 에피루비신 스타 및 시클로포스파미드 및 이의 유사체)이다.

[0292] 단쇄 Fv(scFv) 또는 항체 프래그먼트는 항체의 VH 및 VL 도메인(또는 영역)을 포함하며, 여기서 이러한 도메인은 단일 폴리펩티드 사슬에 존재한다. 통상적으로, Fv 폴리펩티드는 VH와 VL 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 또한 포함하며, 이는 scFv가 항원 결합에 필요한 원하는 구조를 형성할 수 있도록 한다.

[0293] Fab 프래그먼트는 경쇄의 가변 도메인과 고정 도메인, 및 중쇄의 가변 도메인과 제1 고정 도메인(CH1)을 함유한다. $F(ab')_2$ 항체 프래그먼트는 한 쌍의 Fab 프래그먼트를 포함하는 것으로, 이러한 프래그먼트는 통상적으로 그들 사이의 힌지 시스테인을 통해 그들의 카르복실 말단 근처에서 공유 결합된다. 항체 프래그먼트의 기타 화학적 커플링 역시 당업계에 알려져 있다.

[0294] 이중항체는 두 개의 항원 결합 부위를 갖는 작은 항체 프래그먼트이며, 이러한 프래그먼트는 동일한 폴리펩티드 사슬에서 VL과 연결되는 VH(VH 및 VL)를 포함한다. 동일한 사슬의 두 개의 도메인 사이에 쌍을 이루지 못하게 매우 짧은 링커를 사용하여, 해당 도메인을 다른 사슬의 상보성 도메인과 쌍을 이루게 강제하여 두 개의 항원 결합 부위를 생성한다.

[0295] 선형 항체는 상보적인 경쇄 폴리펩티드와 함께 한 쌍의 항원 결합 부위를 형성하는 한 쌍의 직렬 Fd 영역(VH-CH1-VH-CH1)을 포함한다. 선형 항체는 이중특이적 또는 단일특이적일 수 있다.

[0296] 항체의 다량체화는 항체의 천연적 군집화 또는 당업계에 알려진 화학적 또는 재조합 연결 기술을 통해 실현될 수 있다. 예를 들어, 소정 백분율의 정제된 항체 제제(예를 들어, 정제된 IgG1 분자)는 자발적으로 항체 동종이량체 및 기타 고급 항체 다량체를 함유하는 단백질 응집체를 형성한다.

[0297] 일부 실시양태에서, 다중특이성 항체는 이중특이성 항체이다. 이중특이성 항체는 재조합 세포 배양물로부터 회수된 이종이량체의 백분율을 최대화하기 위해, 한 쌍의 항체 분자 사이의 인터페이스를 조작함으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, 해당 인터페이스는 항체 고정 도메인의 CH3 도메인의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 해당 방법에서, 제1 항체 분자의 인터페이스로부터 유래되는 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄가 비교적 큰 측쇄(예를 들어, 티로신 또는 트립토판)에 의해 치환된다. 비교적 작은 아미노산 측쇄(예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)으로 큰 아미노산 측쇄를 치환하는 것을 통해, 제2 항체 분자의 인터페이스에서 큰 측쇄의 크기와 동일하거나 또는 유사한 보상적 "캐비티"를 생성한다. 이는 이종이량체의 수율이 기타 필요하지 않은 최종 산물(예컨대, 동종이량체)보다 더 높도록 하는 메커니즘을 제공한다. 해당 방법은 예를 들어 WO 96/27011에 기재되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 통합된다.

[0298] 이중특이성 항체는 가교 또는 "이형접합" 항체를 포함한다. 예를 들어, 이형 접합체 중 항체 중 하나는 아비딘에 커플링될 수 있고 다른 하나의 항체는 비오틴에 커플링될 수 있다. 또한 임의의 편리한 가교 방법을 사용하

여 이형 접합 항체를 제조할 수 있다. 적합한 가교제 및 가교 기술은 당업계에 잘 알려져 있으며, 미국 특허번호 No. 4,676,980에 개시되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 통합된다.

[0299] 항체 프래그먼트로부터 이중특이성 항체를 생성하는 방법은 또한 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 이중특이성 항체는 화학적 결합을 사용하여 제조될 수 있다. Brennan 등(Science, 제229권: 제81페이지, 1985년)은 온전한 항체를 단백질 분해를 통해 절단시켜 $F(ab')_2$ 프래그먼트를 생성하는 방법을 기재하였다. 이러한 프래그먼트는 인접한 디티올을 안정화시키고 분자 간 이황화물 형성을 방지하기 위해, 디티올 착화제 메타아비산나트륨의 존재 하에 환원된다. 그 다음, 생성된 Fab' 프래그먼트를 티오니트로벤조산(TNB) 유도체로 전환시킨다. 그 다음, 메르캅토에틸아민으로의 환원을 통해 Fab' TNB 유도체 중 하나를 Fab' 티올로 전환시키고, 등몰량의 다른 하나의 Fab' TNB 유도체와 혼합하여 이중특이성 항체를 형성한다.

[0300] 본원에 기재된 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항원) 중 임의의 하나는 안정화 분자(예를 들어, 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트의 피시험자 또는 용액 중에서의 반감기를 증가시키는 분자)에 접합될 수 있다. 안정화 분자의 비제한적 예시로는 중합체(예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜) 또는 단백질(예를 들어, 인간 혈청 알부민과 같은 혈청 알부민)을 포함한다. 안정화 분자의 접합은 항체 또는 항원 결합 프래그먼트가 체외(예를 들어, 조직 배양물 중 또는 약물 조성물 형식으로 저장될 때) 또는 체내(예를 들어, 인체내)에 있을 때의 반감기를 증가시키거나 또는 그 생물적 활성을 연장시킬 수 있다.

[0301] 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체)은 또한 다양한 형식을 가질 수 있다. 많은 상이한 형태의 항원 결합 작제물은 당업계에 알려져 있고, 예를 들어 Suurs 등, "A review of bispecific antibody and antibody constructs in oncology and clinical challenge", Pharmacology & therapys(2019년)에 기재되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 통합된다.

[0302] 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 BiTe, $(scFv)_2$, 나노항체-HSA, DART, TandAb, scDiabody, scDiabody-CH3, scFv-CH-CL-scFv, HSAbody, scDiabody-HAS 또는 직렬 scFv이다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 VHH-scAb, VHH-Fab, 이중 scFab, $F(ab')_2$, 이중항체, crossMab, DAF(투인원), DAF(포인원), DutaMab, DT- IgG, 놉-인투-홀 구조(knobs-in-hole) 공통 경쇄, 놉-인투-홀 구조 어셈블리, 전하 쌍, Fab 아암 교환, SEEDbody, LUZ-Y, Fcab, κλ-바디, 직교 Fab, DVD-IgG, IgG(H)-scFv , scFv-(H)IgG, IgG(L)-scFv, scFv-(L)IgG, IgG(L,H)-Fv, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V, V(L)-IgG, KIH IgG-scFab, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, Zybody, DVI-IgG, 이중항체-CH3, 삼중항체(triple body), 미니안티 항체(Miniantibody), 미니항체(minibody), TriBi 미니항체(TriBi minibody), scFv-CH3 KIH, Fab-scFv, $F(ab')_2$-scFv2, scFv-KIH, Fab-scFv-Fc, 4가 HCAb, sc 이중항체-Fc, 이중항체-Fc, 직렬 scFv-Fc, 인트라바디, 도킹 구조(dock and lock), lmmTAC, IgG-IgG 접합체, Cov-X-Body 또는 scFv1-PEG-scFv2이다.

[0303] 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 TrioMab일 수 있다. TrioMab에서, 두 개의 중쇄는 상이한 물종으로부터 유래되며, 여기서 상이한 서열이 중쇄-경쇄 페어링을 제한한다.

[0304] 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 두 개의 상이한 중쇄 및 하나의 공유 경쇄를 갖는다. 중쇄의 이종이량체화 작용은 놉-인투-홀 구조 또는 일부 기타 중쇄 페어링 기술에 기반할 수 있다.

[0305] 일부 실시양태에서, CrossMAb 기술을 사용하여 이중특이성 항체를 생성할 수 있다. CrossMAb 기술을 사용하여 이중특적 이종이량체 IgG 항체에서 정확한 경쇄 결합을 실현할 수 있는 것으로, 해당 기술은 이가-(1+1)、삼가-(2+1) 및 사가-(2+2) 이중특이성 항체, 및 비 Fc 직렬 항원 결합 프래그먼트(Fab)에 기반한 항체를 포함하는 다양한 이중특이성 항체 형식의 생성을 허용한다. 이러한 형식은 공유 경쇄의 검정, 번역 후 처리/체외 화학 조립 또는 올바른 경쇄 결합을 가능하게 하는 일련의 돌연변이 도입 없이 도메인 교차를 사용하여 기존 항체 쌍으로부터 유도될 수 있다. 해당 방법은 Klein 등, "The use of CrossMAb technology for the generation of bi-and multispecific antibody", MAbs., 제8권 제6호, Taylor & Francis, 2016년에 기재되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 통합된다. 일부 실시양태에서, 중쇄의 CH1과 경쇄의 CL 도메인은 교환된다.

[0306] 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 2:1 CrossMab일 수 있다. 별도의 Fab 프래그먼트를 CrossMab의 VH 도메인의 N말단에 첨가한다. CrossMab에 첨가된 Fab 프래그먼트는 2가 결합 실현을 통해 친화력이 증가된다.

[0307] 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 2:2 CrossMab일 수 있다. 해당 4가 이중특이성 항체는 Fab 프래그먼트를 CrossMab의 각 C말단과 융합시키는 것을 통해 생성된다. 이러한 Fab 프래그먼트는 이들의 CH1과 이들의 CL을 교환하는 방식으로 교차될 수 있다. VH가 이들의 CL과 융합하고, VL이 이들의 CH1과 융합한다. Fab 프

래그먼트의 CrossMab 기술은 특이적 페어링을 확보하게 된다. 친화력은 이중 2가 결합을 통해 증강될 수 있다.

[0308] 항원 결합 단백질 작제물은 Duobody일 수 있다. IgG4 항체 중 천연적으로 존재하는 Fab 교환 메커니즘과 IgG1 항체 중 제어물질은 유사하며, 이와 같은 메커니즘을 제어 Fab 교환이라고 한다. 해당 형식은 중-경쇄 간의 특이적 페어링을 확보할 수 있다.

[0309] 이중 가변 도메인 항체(DVD-Ig)에서, 별도의 VH와 가변 경쇄(VL) 도메인을 각 N말단에 첨가하여 이중특이성 표적에 사용한다. 이와 같은 형식은 IgG-scFv와 유사하긴 하나, 단 첨가된 결합 도메인이 이들 각자의 N말단에 단독으로 결합하되, scFv가 각 중쇄 N말단에 결합하는 것은 아니다.

[0310] scFv-IgG에서, 두 개의 scFv는 중쇄의 C말단에 연결된다(CH3). scFv-IgG 형식은 두 개의 상이한 2가 결합 부위를 가지기 때문에 4가라 불리기도 한다. scFv-IgG는 중쇄 및 경쇄 페어링 문제가 존재하지 않는다.

[0311] 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 IgG-IgG 형식을 가질 수 있다. 두 개의 온전한 IgG 항체는 중쇄의 C말단에 화학적 연결하는 것을 통해 접합된다.

[0312] 항원 결합 단백질 작제물 역시 Fab-scFv-Fc 형식을 가질 수 있다. Fab-scFv-Fc 형식에서, 경쇄, 중쇄 및 Fc 영역을 함유하는 scFv의 세번 째 사슬을 조립하였다. 이는 고효율 제조 및 정화를 확보할 수 있다.

[0313] 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 작제물은 TF일 수 있다. 세 개의 Fab 프래그먼트는 이황화 결합을 통해 브리징된다. TF 형식은 Fc 영역을 갖지 않는다.

[0314] ADAPTIR은 Fc 영역의 양측에 결합되는 두 개의 scFv를 갖는다. 이는 온전한 IgG를 그 작제물로 하는 기반은 포기하였으나, Fc 영역을 보존하여 반감기를 연장하고 정체를 촉진한다.

[0315] 이중특이성 T세포 관여항체("BiTE")는 하나의 펩티드 사슬에 있는 두 개의 scFv, VLA VHA 및 VHB VLB로 구성된다. 이는 단지 결합 도메인만 갖고 있을 뿐, Fc 영역은 없다.

[0316] BiTE-Fc에서, Fc 영역은 BiTE 작제물과 융합된다. Fc 영역의 첨가는 반감기를 향상시킴으로써, 유효 농도를 연장시키고, 연속적인 정맥 투약(IV)은 피하게 한다.

[0317] 이중친화적 재표적화(DART) 항체는 상반되는 프래그먼트를 연결하는 두 개의 펩티드 사슬, 즉 VLA과 VHB 및 VLB과 VHA를 가지며, 이들의 C말단에는 이들을 함께 융합시키는 황-결합이 존재한다. DART에서, 황-결합은 BiTE에 비해 그 안정성을 향상시킬 수 있다.

[0318] DART-Fc에서, Fc 영역은 DART 구조에 연결된다. 이는 세 개의 사슬에 대한 조립을 통해 생성할 수 있는 것으로, 여기서 두 개 사슬은 DART과 같이 이황화 결합을 통해 연결된다. 하나의 사슬은 절반의 Fc 영역을 함유하는 것으로, 해당 영역은 세번 째 사슬과 함께 이합체화될 것이고, Fc 영역만 발현시킨다. Fc 영역의 첨가는 반감기를 향상시킴으로써, 유효 농도를 연장시키고, 연속적인 정맥 투약(IV)은 피하게 한다.

[0319] 4가 DART에서, 4개의 펩티드 사슬이 조립되었다. 기본적으로 절반의 Fc 영역을 갖는 DART 분자 두 개가 생성되고 이합체화된다. 해당 형식은 두 개의 표적과 모두 2가 결합되므로, 따라서 이는 4가 분자이다.

[0320] 직렬 이중항체(TandAb)는 두 개의 이중항체를 포함한다. 각 이중항체는 VHA와 VLB 프래그먼트로 구성되며, VHA와 VLB 프래그먼트는 공유 결합된다. 이 두 개의 이중항체는 펩티드 사슬에 연결된다. 두 개의 scFv로 구성된 이중항체에 비해 안정성이 향상된다. 이는 두 개의 2가 결합 부위를 갖는다.

[0321] ScFv-scFv-독소는 독소 및 안정적 링커를 갖는 두 개의 scFv를 포함한다. 이는 페이로드를 특이적으로 전송하는 데 사용될 수 있다.

[0322] scFv-scFv-scFv 모듈에서, TAA에 대한 하나의 scFv는 식별 가능한 짧은 펩티드로 태그하고, 또한 두 개의 scFv로 구성된 bsAb로 조립되며, 여기서 하나의 scFv는 CD3에 대한 것이고 다른 하나의 scFv는 그 식별 가능한 펩티드에 대한 것이다.

[0323] ImmTAC에서, 안정적이고 용해 가능한 T세포 수용체가 CD3을 식별하는 scFv와 융합된다. ImmTAC는 TCR을 사용하여 처리된 단백질, 예를 들어 세포 내 단백질을 표적으로 하는 데 적합하다.

[0324] 삼중특이성 나노항체는 두 개의 단일 가변 도메인(나노항체), 및 반감기 연장을 위한 추가 모듈을 갖는다. 별도의 추가 모듈을 첨가하여 반감기를 향상시킨다.

[0325] 삼중특이성 킬러 관여항체(TriKE)에서, 두 개의 scFv는 인간 IL-15에 산입된 폴리펩티드 링커를 통해 연결된다.

IL-15를 연결하는 링커를 첨가하여 NK의 생존율 및 증식을 향상시킨다.

[0326] 한편으로, 본 개시는 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트를 제공하는 것으로, 해당 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는:

[0327] (a) 바람직하게는 N말단에서 C말단까지 제1 경쇄 가변 영역(VL1), 제1 링커 펩티드 서열, 제2 중쇄 가변 영역(VH2), 선택적으로 중쇄 고정 영역 1(CH1), 중쇄 고정 영역 2(CH2) 및 중쇄 고정 영역 3(CH3)을 포함하는 중쇄 폴리펩티드; 및

[0328] (b) 바람직하게는 N말단에서 C말단까지 제2 경쇄 가변 영역(VL2), 제2 링커 펩티드 서열, 제1 중쇄 가변 영역(VH1), 제1 경쇄 가변 영역(VL1) 및 선택적으로 경쇄 고정 영역(CL)을 포함하는 경쇄 폴리펩티드;를 포함한다.

[0329] 일부 실시양태에서, VH1과 VL1은 서로 결합되어 PD-1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위를 형성한다. 일부 실시양태에서, VH2와 VL2는 서로 결합되어 CD40에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위를 형성한다.

[0330] 일부 실시양태에서, VH1과 VL1은 서로 결합되어 CD40에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위를 형성한다. 일부 실시양태에서, VH2와 VL2는 서로 결합되어 PD-1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위를 형성한다.

[0331] 일부 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 링커 펩티드는 SEQ ID NO: 205와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CH1, CH2, CH3 및/또는 CL 도메인은 인간 IgG(예를 들어, IgG1 또는 IgG4)로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 인간 IgG(예를 들어, IgG1 또는 IgG4)는 KIH 및/또는 LALA 돌연변이를 포함한다.

[0332] 일부 실시양태에서, 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 제1 중쇄 폴리펩티드와 적어도 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는 제2 중쇄 폴리펩티드; 및 제1 경쇄 폴리펩티드와 적어도 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는 제2 경쇄 폴리펩티드;를 또한 포함한다.

[0333] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이성 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 **도 37**에 도시된 개략적 구조를 갖는다. 일부 실시양태에서, 중쇄 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 170에 제시된 바와 같고, 경쇄 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 171에 제시된 바와 같다.

[0334] **항원 결합 단백질 작제물의 제조방법**

[0335] 항체는 분리된 인간 단백질 프래그먼트를 면역원으로 사용하여, 다클론 및 단클론 항체를 사용하여 제조하는 표준 기술로 항체를 생성할 수 있다. 다클론 항체는 항원 펩티드 또는 단백질을 여러 번 주사(예를 들어, 피하 또는 복강내 주사)함으로써 동물 체내에서 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원 펩티드 또는 단백질은 적어도 하나의 보조제와 함께 주사된다. 일부 실시양태에서, 항원 펩티드 또는 단백질은 면역 대상 물종 중 면역원성을 갖는 약제에 접합될 수 있다. 동물은 항원 펩티드 또는 단백질을 1회 넘게(예를 들어, 2회, 3회 또는 4회) 주사할 수 있다.

[0336] 전장 폴리펩티드 또는 단백질, 또는 대안적으로 그 항원 펩티드 프래그먼트를 면역원으로 사용할 수 있다. 단백질의 항원 펩티드는 해당 단백질의 아미노산 서열의 적어도 8개(예를 들어, 적어도 10개, 15개, 20개 또는 30개)의 아미노산 잔기를 포함하며, 해당 단백질의 에피토프를 망라하여, 해당 펩티드에 대해 생성된 항체와 해당 단백질이 특이성 면역 복합체를 형성하도록 한다.

[0337] 면역원은 통상적으로 적합한 피시험자(예를 들어, 적어도 하나의 인간 면역글로불린 유전자좌를 발현하는 인간 또는 유전자 이식 동물)를 면역시킴으로써 항체를 제조하는 데 사용된다. 적합한 면역원성 제제는 예를 들어 재조합적으로 발현되거나 또는 화학적으로 합성되는 폴리펩티드를 함유할 수 있다. 해당 제제는 또한 보조제(예컨대, 프로인트 완전 또는 불완전 보조제) 또는 유사한 면역 자극제를 포함할 수 있다.

[0338] 다클론 항체는 앞에 기재된 바와 같이, 폴리펩티드 또는 그 항원 펩티드(예를 들어, 단백질의 일부)를 면역원으로서 사용하여 적절한 피시험자를 면역시킴으로써 제조될 수 있다. 면역화된 피시험자의 항체 역가는 고정화된 폴리펩티드 또는 펩티드를 사용하여 효소결합면역흡착측정법(ELISA)과 같은 표준 기술을 통해 시간 경과에 따라 모니터링할 수 있다. 필요한 경우, 포유동물로부터(예를 들어, 혈액으로부터) 항체 분자를 분리할 수 있으며, 숙지된 기술(예컨대, 단백질 A 또는 단백질 G 크로마토그래피)을 통해 한층 더 정제하여, IgG 분획을 획득할 수 있다. 면역화 후 적절한 시점에, 예를 들어 특이성 항체 역가가 가장 높을 때, 피시험자로부터 항체를 생성하는 세포를 획득할 수 있으며, 최초에 Kohler 등(Nature, 제256권: 제495-497페이지, 1975년)에서 기재된 하이브리도마 기술, 인간 B세포 하이브리도마 기술(Kozbor 등, Immunol. Today, 제4권: 제72페이지, 1983년), EBV-하이

브리도마 기술(Cole 등, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 제77-96페이지, 1985년) 또는 삼원 하이브리도마 기술(trioma technique)과 같은 표준 기술을 통하여 단클론 항체를 제조할 수 있다. 하이브리도마를 생성하는 기술은 잘 알려져 있다(일반적으로 Current Protocols in Immunology, 1994년, Coligan 등(편집), John Wiley & Sons, Inc., 뉴욕, NY 참조). 단클론 항체를 생성하는 하이브리도마 세포는 하이브리도마 배양물 상청액에서 목표 폴리펩타이드 또는 에피토프에 결합하는 항체를 선별함으로써, 예를 들어 표준 ELISA 측정을 사용하여 검출하게 된다.

[0339] 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 프래그먼트의 변이체는 적당한 뉴클레오티드 변화를 본원에 기재된 인간, 인간화 또는 키메라 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트를 인코딩하는 DNA에 도입하거나, 또는 펩티드 합성을 통해 제조될 수 있다. 이와 같은 변이체는 예를 들어, 항체 또는 항원 결합 도메인의 항원 결합 부위를 구성하는 아미노산 서열 내의 잔기의 결실, 삽입 또는 치환을 포함한다. 이와 같은 변이체 집단 내에서, 일부 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는 표적 단백질에 대해 증가된 친화성을 가질 것이다. 결실, 삽입 및/또는 조합의 임의의 조합을 통해, 표적에 대해 증가된 결합 친화력을 갖는 항체 또는 이의 항원 결합 프래그먼트를 획득할 수 있다. 항체 또는 항원 결합 프래그먼트에 도입된 아미노산 변화는 또한, 글리코실화 부위의 수 변화(예를 들어, 증가 또는 감소), 글리코실화 부위의 유형 변화(예를 들어, 세포에 존재하는 효소에 의해 상이한 당이 연결되도록 아미노산 서열에 대한 변화), 또는 새로운 글리코실화 부위 도입과 같이, 새로운 번역 후 수식을 항체 또는 항원 결합 프래그먼트에 변화시키거나 도입시킬 수 있다.

[0340] 본원에 개시된 항체는 포유동물을 포함하는 임의의 물종의 동물로부터 유래될 수 있다. 천연 항체의 비제한적 예시로는 인간, 영장류 동물(예를 들어, 원숭이 및 유인원), 소, 돼지, 말, 양, 낙타류 동물(예를 들어, 낙타 및 라마), 닭, 염소 및 설치류 동물(예를 들어 래트, 마우스, 햄스터 및 토끼)(인간 항체를 생성하기 위해 유전자 조작을 거친 유전자 이식 설치류 동물 포함)로부터 유래되는 항체를 포함한다.

[0341] 파지 디스플레이(패닝)는 원하는 결합 친화력을 갖는 항체 서열을 최적화하는 데 사용될 수 있다. 이 기술에서는 단쇄 Fv(VH 또는 VL 포함)를 인코딩하는 유전자를 파지 코트 단백질 유전자에 삽입할 수 있어, 해당 파지로 하여금 내부에는 해당 단백질의 유전자를 포함시키면서 외측에는 scFv를 "디스플레이"할 수 있도록 함으로써, 유전자 유형과 표현형 간의 관련성을 생성하였다. 그 다음, 표적 항원에 대하여 이러한 디스플레이 파지를 선별하여, 디스플레이된 항원 결합 부위와 표적 항원 간의 상호작용을 검출할 수 있다. 따라서, 체외 선택이라고 하는 과정에서 큰 단백질 라이브러리를 선별하고 증폭시킬 수 있으며, 또한 원하는 결합 친화력을 갖는 항체 서열을 획득할 수 있다.

[0342] 인간 및 인간화 항체는, 인종계 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 영역 및 고정 영역을 갖는(또는 인종계 면역글로불린 서열로부터 유래된 항체와 동일한 아미노산 서열을 갖는) 항체를 포함한다. 인간 항체는 예를 들어, CDR에서 인종계 면역글로불린 서열에 의해 인코딩되지 않는 아미노산 잔기(예를 들어, 체외 무작위 또는 부위 특이적 돌연변이 유발 또는 체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다.

[0343] 인간화 항체는 통상적으로 비인간 CDR이 이식된 인간 프레임워크(FR)를 갖는다. 따라서, 인간화 항체는 인간이 아닌 공급원으로부터 도입된 하나 이상의 아미노산 서열을 갖는다. 이러한 비인간 아미노산 잔기는 통상적으로 "도입" 잔기라고 하며, 이는 통상적으로 "도입" 가변 도메인으로부터 가져온다. 인간화는 기본적으로 예를 들어, 설치류 동물 CDR 또는 CDR 서열로 인간 항체의 상응 서열을 치환함으로써 수행될 수 있다. 이러한 방법은 예를 들어 Jones 등, Nature, 제321권: 제522-525페이지(1986년); Riechmann 등, Nature, 제332권: 제323-327페이지(1988년); Verhoeyen 등, Science, 제239권: 제1534-1536페이지(1988년)에 기재되어 있으며, 이들 문헌 중 각각의 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 통합된다. 따라서, "인간화" 항체는 키메라 항체인 것으로, 여기서 온전한 인간 V 도메인의 작은 일부는 비인간 물종 유래의 상응 서열에 의해 치환된다. 실제로, 인간화 항체는 통상적으로 마우스 항체인 것으로, 여기서 일부 CDR 잔기 및 일부 FR 잔기는 인간 항체 유래의 유사한 부위에 있는 잔기에 의해 치환된다.

[0344] 더 중요한 것은, 항체가 인간화되는 동시에 항원에 대한 높은 특이성 및 치환력 및 기타 유리한 생물학적 특성을 보존한다는 것이다. 이 목표를 달성하기 위해, 인간화 항체는 부모 서열 및 인간화 서열의 3차원 모델을 사용하여 부모 서열 및 다양한 개념적 인간화 생성물을 분석함으로써 제조될 수 있다. 3차원 면역글로불린 모델은 당업자가 통상적으로 획득 가능한 것이며 또한 숙지된 것이다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3차원 형태 구조를 설명하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램을 획득할 수 있다. 이들 디스플레이에 대한 검사는 후보 면역글로불린 서열의 기능에서 잔기의 가능한 역할에 대한 분석, 즉 그의 항원에 결합하는 후보 면역글로불린의 능력에 영향을 미치는 잔기에 대한 분석을 가능하게 한다. 이와 같은 방법을 통해, 수용체 및 도입 서열로부터

FR 잔기를 선택하고 조합하여, 표적 항원에 대한 증가된 친화력과 같은 원하는 항체 특징을 획득할 수 있다.

[0345] 원시 서열에 대한 동일성 또는 동원성은 통상적으로 후보 서열을 원시 서열과 정렬하고 필요한 경우 빈자리를 도입하여 최대 백분율 서열 동일성을 실현하며, 또한 서열 동일성의 일부로서 그 어떠한 보존적 치환도 고려하지 않은 후, 후보 서열 내에 존재하는 인간, 인간화 또는 키메라 항체 또는 프래그먼트에 존재하는 서열과 동일한 아미노산 잔기의 백분율이다.

[0346] 일부 실시양태에서, 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항원)에 대해 공유 결합 수식을 수행한다. 이러한 공유 결합 수식은 화학적 또는 효소적 합성, 또는 효소적 또는 화학적 절단을 통해 수행될 수 있다. 항체 또는 프래그먼트의 표적화된 아미노산 잔기를 선택된 측쇄 또는 N 말단 또는 C말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화제와 반응시킴으로써, 항체 또는 항체 프래그먼트의 기타 유형의 공유 결합 수식을 분자 내로 도입하게 된다.

[0347] 일부 실시양태에서, Fc 영역에 연결된 푸코오스가 (직접 또는 간접적으로) 결여된 탄수화물 구조를 갖는 항체 변이체를 제공한다. 예를 들어, 이와 같은 항체에서 푸코오스의 양은 1% 내지 80%, 1% 내지 65%, 5% 내지 65%, 또는 20% 내지 40%일 수 있다. 푸코오스의 양은 Asn297에 부착된 모든 당 구조(예를 들어 복합형, 하이브리드형 및 고-만노오스 구조)의 총합에 대한 Asn297에 있는 당 사슬 내의 푸코오스의 평균 양을 계산하는 것을 통해 확인되는 것으로, 예를 들어 MALDI- TOF 질량 분석법(예를 들어, WO 2008/077546에 기재된 바와 같음)을 통해 측정한다. Asn297이란 Fc 영역의 약 위치 297에 위치하는 아스파라긴 잔기(Fc 영역 잔기의 Eu 넘버링; 또는 Kabat 넘버링에서 위치 314)를 가리키지만, 항체의 사소한 서열 변이로 인해 Asn297은 또한 위치 297의 업스트림 또는 다운스트림 약 ±3개 아니노산 위치에 위치할 수도 있는 것으로, 즉, 위치 294와 300 사이에 위치할 수도 있다. 이와 같은 푸코오실화된 변이체는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 글리칸 이질성을 낮추기 위해, 항체의 Fc 영역은 한층 더 조작되어, 위치 297의 아스파라긴(N297A)을 알라닌으로 대체할 수 있다.

[0348] 일부 실시양태에서, Fab 아암 교환을 피함으로써 생산 효율을 촉진시키기 위해, 항체의 Fc 영역은 IgG4의 위치 228(EU 넘버링)에 있는 세린(S228P)을 프롤린으로 대체하도록 추가로 조작된다. S228 돌연변이에 대한 상세한 설명은, 예를 들어 Silva 등 "The S228P mutation prevents in vivo and in vitro IgG4 Fab-arm exchange as demonstrated using a combination of novel quantitative immunoassays and physiological matrix preparation", Journal of Biological Chemistry, 290.9(2015년): 제5462-5469페이지에 기재되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 통합된다.

[0349] 일부 실시양태에서, Leu234Ala/Leu235Ala(EU 넘버링)(LALA)돌연변이를 도입하여 항체 이펙터 기능을 파괴한다.

[0350] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 이중특이성 항체를 제조하도록 설계된다. 이중특이성 항체는 재조합 세포 배양물로부터 회수된 이종이량체의 백분율을 최대화하기 위해, 한 쌍의 항체 분자 사이의 인터페이스를 조작함으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, 해당 인터페이스는 항체 고정 도메인의 CH3 도메인의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 해당 방법에서, 제1 항체 분자의 인터페이스로부터 유래되는 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄가 비교적 큰 측쇄(예를 들어, 티로신 또는 트립토판)에 의해 치환된다. 비교적 작은 아미노산 측쇄(예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)으로 큰 아미노산 측쇄를 치환하는 것을 통해, 제2 항체 분자의 인터페이스에서 큰 측쇄의 크기와 동일하거나 또는 유사한 보상적 "캐비티"를 생성한다. 이는 이종이량체의 수율이 기타 필요하지 않은 최종 산물(예컨대, 동종이량체)보다 더 높도록 하는 메커니즘을 제공한다. 해당 방법은 예를 들어 WO 96/27011에 기재되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 통합된다.

[0351] 일부 실시양태에서, 놉-인투-홀(KIH) 기술이 사용될 수 있는 것으로, 이는 이종이량체화를 촉진하기 위해 CH3 도메인을 조작하여 각 중쇄에 "노브" 또는 "홀"을 생성하는 것을 포함한다. KIH 기술은 예를 들어 Xu, Yiren 등, "Production of bispecific antibody in 'knobs-into-holes' using a cell-free expression system", MAbs, 제7권 제1호, Taylor & Francis, 2015년에 기재되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 통합된다. 일부 실시양태에서, 하나의 중쇄는 T366W 및/또는 S354C(노브) 치환(EU 넘버링)을 갖고, 다른 하나의 중쇄는 Y349C, T366S, L368A 및/또는 Y407V(홀) 치환(EU 넘버링)을 갖는다. 일부 실시양태에서, 하나의 중쇄는 Y349C 및 T366W(EU 넘버링) 치환 중 하나 이상을 갖는다. 다른 하나의 중쇄는 E356C, T366S, L368A 및 Y407V(EU 넘버링) 치환 중 하나 이상을 가질 수 있다. 또한, 두 개의 치환된 IgG의 힌지 영역 모두에 치환을 도입할 수도 있다(-ppcpScp-->-ppcpPcp-).

[0352] 또한, 음이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 이중특이성 항체를 정제할 수 있다. 음이온 교환 크로마토그래피는 양전하를 띤 그룹(예컨대, 디에틸아미노에틸(DEAE))을 함유하는 이온 교환 수지를 사용하여 물질의 전하를

기준으로 하여 물질을 분리하는 방법이다. 용액에서 수지는 양전하를 띤 상대 이온(양이온)이 코팅된다. 음이온 교환 수지는 음전하를 띤 분자에 결합하여 상대 이온을 치환한다. 음이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 단백질의 등전점(pI)에 기반하여 단백질을 정제할 수 있다. 등전점은 단백질이 순전하를 갖지 않는 때의 pH로 정의된다. pH>pI인 경우, 단백질은 순 음전하를 가지고, pH<pI인 경우 단백질은 순 양전하를 가진다. 따라서, 일부 실시양태에서, 상이한 아미노산 치환을 두 개의 중쇄에 도입하여, 두 개의 아암 A를 포함하는 동종이량체의 pI가 두 개의 아암 B를 포함하는 동종이량체의 pI와 상이하도록 할 수 있다. 아암 A 및 아암 B를 갖는 이중특이성 항체의 pI는 동종이량체의 두 가지 pI 사이에 있을 것이다. 따라서, 두 가지의 동종이량체 항체와 이중특이성 항체는 상이한 pH 조건 하에서 방출될 수 있다. 본 개시는 일부 아미노산 잔기 치환을 중쇄에 도입하여 pI를 조절할 수 있음을 나타낸다.

[0353] 따라서, 일부 실시양태에서, Kabat 넘버링에 의한 위치 83의 아미노산 잔기는 라이신, 아르기닌 또는 히스티딘이다. 일부 실시양태에서, 위치 1, 6, 43, 81 및 105(Kabat 넘버링) 중 하나 이상의 위치의 아미노산 잔기는 아스파르트산 또는 글루탐산이다. 일부 실시양태에서, 위치 13 및 105(Kabat 넘버링) 중 하나 이상의 위치의 아미노산 잔기는 아스파르트산 또는 글루탐산이다. 일부 실시양태에서, 위치 13 및 42(Kabat 넘버링) 중 하나 이상의 위치의 아미노산 잔기는 라이신, 아르기닌, 히스티딘 또는 글리신이다.

[0354] 이중특이성 항체는 또한 가교 또는 "이형접합" 항체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 이형 접합체 중 항체 중 하나는 아비딘에 커플링될 수 있고 다른 하나의 항체는 비오틴에 커플링될 수 있다. 또한 임의의 편리한 가교 방법을 사용하여 이형 접합 항체를 제조할 수 있다. 적합한 가교제 및 가교 기술은 당업계에 잘 알려져 있으며, 미국 특허번호 No. 4,676,980에 개시되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 통합된다.

[0355] 항체 프래그먼트로부터 이중특이성 항체를 생성하는 방법은 또한 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 이중특이성 항체는 화학적 결합을 사용하여 제조될 수 있다. Brennan 등(Science, 제229권: 제81페이지, 1985년)은 온전한 항체를 단백질 분해를 통해 절단시켜 $F(ab')_2$ 프래그먼트를 생성하는 방법을 기재하였다. 이러한 프래그먼트는 인접한 디티올을 안정화시키고 분자 간 이황화물 형성을 방지하기 위해, 디티올 착화제 메타아비산나트륨의 존재 하에 환원된다. 그 다음, 생성된 Fab' 프래그먼트를 티오니트로벤조산(TNB) 유도체로 전환시킨다. 그 다음, 메르캅토에틸아민으로의 환원을 통해 Fab' TNB 유도체 중 하나를 Fab' 티올로 전환시키고, 등몰량의 다른 하나의 Fab' TNB 유도체와 혼합하여 이중특이성 항체를 형성한다.

[0356] **재조합 벡터**

[0357] 본 개시는 또한, 본원에 개시된 분리된 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 폴리펩티드를 인코딩하는 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드)를 포함하는 재조합 벡터(예를 들어, 발현 벡터), 이들 재조합 벡터를 도입하는 숙주 세포(즉, 이들 숙주 세포들로 하여금 폴리뉴클레오티드 및/또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 함유시킴), 및 재조합 기술을 통해 생성되는 재조합 항체 폴리펩타이드 또는 그 프래그먼트를 제공한다.

[0358] 본원에 사용된 바와 같이, "벡터"는 벡터를 숙주 세포에 도입시킬 때, 하나 이상의 타겟 폴리뉴클레오티드를 해당 숙주 세포에 전달할 수 있는 임의의 작제물이다. "발현 벡터"는 해당 발현 벡터가 이미 도입된 숙주 세포에서 하나 이상의 타겟 폴리뉴클레오티드를 전달하여 이를 인코딩된 폴리펩티드로 발현시킬 수 있다. 따라서, 발현 벡터에서, 해당 벡터 내 또는 숙주 세포의 유전체 중 타겟 폴리뉴클레오티드의 통합 부위 또는 근처 또는 양측의 조절 요소(예컨대, 프로모터, 인핸서 및/또는 poly-A 꼬리)와 작동 가능하게 연결하는 것을 통해, 해당 타겟 폴리뉴클레오티드가 해당 벡터에서 발현되도록 위치시키고, 해당 타겟 뉴클레오티드로 하여금 해당 발현 벡터가 도입되는 숙주 세포에서 번역되도록 한다.

[0359] 벡터는 당업계에 이미 알려진 방법, 예를 들어 전기천공법, 화학적 형질감염(예를 들어, DEAE-덱스트란), 형질전환, 형질감염 및 감염 및/또는 형질도입(예를 들어, 재조합 바이러스 사용)을 통해 숙주 세포에 도입될 수 있다. 따라서, 벡터의 비제한적 예시로는 바이러스 벡터(재조합 바이러스를 생성하는 데 사용될 수 있음), 네이키드 DNA 또는 RNA, 플라스미드, 코스미드, 파지 벡터, 및 양이온성 축합제와 관련되는 DNA 또는 RNA 발현 벡터를 포함한다.

[0360] 일부 실시양태에서, 바이러스 발현 시스템(예를 들어, 백시니아 또는 기타 폭스바이러스, 레트로바이러스 또는 아데노바이러스)을 사용하여 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 폴리펩티드를 인코딩하는 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드)를 도입하는 것으로, 이는 비병원성(결함적), 복제 능력을 지닌 바이러스, 또는 복제 결함적 바이러스를 사용할 수 있다. 후자의 경우, 바이러스 증식은 통상적으로 상보적인 바이러스 패키징 세포에서만 발생한다. 적합한 시스템은 예를 들어 Fisher-Hoch 등, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 제86권: 제317-

321페이지, Flexner 등, 1989년, Ann. 제569권: 제86-103페이지; Flexner 등, 1990년, Vaccine, 제8권: 제17-21페이지; 미국 특허 번호 4,603,112, 4,769,330 및 5,017,487; WO 89/01973; 미국 특허 번호 4,777,127; GB 2,200,651, EP 0,345,242, WO 91/02805, Berkner-Biotechniques, 제6권: 제616-627페이지, 1988년, Rosenfeld 등, 1991년, Science, 제252권: 제431-434페이지, Kolls 등, 1994년, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 제91권: 제215-219페이지, Kass-Esisler 등, 1993년, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 제90권: 제11498-11502페이지; Guzman 등, 1993년, Circulation, 제88권: 제2838-2848페이지 및 Guzman 등, 1993년, Cir. Res., 제73권: 제1202-1207페이지에 개시되어 있다. DNA를 이와 같은 발현 시스템에 통합시키는 기술에 대하여 당업자는 잘 알고 있다. DNA는 또한 예를 들어 Ulmer 등, 1993년, Science, 제259권: 제1745-1749페이지 및 Cohen, 1993년, Science, 제259권: 제1691-1692페이지에 기재된 바와 같이 "네이키드"인 것일 수 있다. 네이키드 DNA의 흡수는 세포로 효율적으로 수송될 생분해성 비드에 DNA를 코팅함으로써 증가될 수 있다.

[0361] 발현을 위해, 항체를 인코딩하거나 또는 폴리펩티드를 인코딩하는 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 DNA 삽입 프래그먼트를 파지 ëPL 프로모터, 대장균 lac, trp 및 tac 프로모터, SV40 초기 및 후기 프로모터, 및 역전사 바이러스 LTR 프로모터 등과 같은 적합한 프로모터(예를 들어, 이종 프로모터)에 작동 가능하게 연결시킬 수 있다. 기타 적합한 프로모터에 대하여 당업자는 잘 알고 있다. 발현 작제물은 또한 전사 개시 부위, 종결 부위를 함유할 수 있으며, 전사 영역에서 번역을 위한 리보솜 결합 부위를 포함할 수 있다. 작제물에 의해 발현되는 성숙한 전사체의 인코딩 부분은 번역 대상인 폴리펩티드의 시작 위치의 번역 개시 코돈 및 번역 대상인 폴리펩티드의 말단의 적절한 위치의 정지 코돈(UAA, UGA 또는 UAG)에 포함될 수 있다.

[0362] 위에 기재된 바와 같이, 발현 벡터는 적어도 하나의 선택 가능한 표지를 포함할 수 있다. 이와 같은 표지는 진핵 세포 배양을 위한 디히드로폴레이트 환원효소 또는 네오마이신 저항성 유전자, 및 대장균 및 기타 박테리아에서의 배양을 위한 테트라사이클린 또는 암피실린 저항성 유전자를 포함한다. 적합한 숙주의 대표적인 예시로는 대장균, 스트렙토마이세스 및 살모넬라 티피뮤리움 세포와 같은 박테리아 세포; 효모 세포와 같은 진균 세포; 초파리 S2 세포 및 거세미나방 Sf9 세포와 같은 곤충 세포; CHO, COS, Bowes 흑색종 및 HEK 293 세포와 같은 동물 세포; 및 식물 세포;를 포함하되 이에 한정되지는 않는다. 본원에 기재된 숙주 세포에 사용하기 적합한 배지 및 조건은 당업계에 알려져 있다.

[0363] 박테리아를 위해 사용되는 비제한적 벡터는 Qiagen로부터 획득되는 pQE70, pQE60 및 pQE-9; Stratagene로부터 획득되는 pBS 벡터, Phagescript 벡터, Bluescript 벡터, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A; 및 Pharmacia로부터 획득되는 ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5;를 포함한다. 비제한적 진핵 벡터는 Stratagene로부터 획득되는 pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 및 pSG; 및 Pharmacia로부터 획득되는 pSVK3, pBPV, pMSG 및 pSVL;을 포함한다. 다른 적합한 프로모터에 대하여 당업자에게는 자명할 것이다.

[0364] 적합한 비제한적 박테리아 프로모터는 대장균 lacI 및 lacZ 프로모터, T3 및 T7 프로모터, gpt 프로모터, λPR 및 PL 프로모터, 및 trp 프로모터를 포함한다. 적합한 진핵생물 프로모터는 CMV 즉시 초기 프로모터, HSV 티미딘 키나제 프로모터, 초기 및 후기 SV40 프로모터, 역전사 바이러스 LTR의 프로모터(예컨대, 라우스 육종 바이러스(Rous sarcoma virus, RSV)의 프로모터), 및 메탈로티오네인 프로모터(예컨대, 마우스 메탈로티오네인-I 프로모터)를 포함한다.

[0365] 맥주효모에서는 α 인자, 알코올 산화 효소 및 PGH와 같은 구성형 또는 유도형 프로모터를 함유하는 많은 벡터를 사용할 수 있다. 총론에 관하여는 Ausubel 등(1989년) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 뉴욕, N.Y 및 Grant 등, Methods Enzymol. 제153권: 제516-544페이지(1997년)를 참조한다.

[0366] 작제물을 숙주 세포로 도입하는 것은 인산칼슘 형질감염, DEAE 덱스트란에 의해 매개된 형질감염, 양이온성 지질 매개에 의해 매개된 형질감염, 전기천공법, 형질도입, 감염 또는 기타 방법을 통해 실현할 수 있다. 이러한 방법은 Davis 등, Basic Methods In Molecular Biology(1986년)와 같은 다수의 표준 실험실 매뉴얼에 기재되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 통합된다.

[0367] 인핸서 서열을 벡터에 삽입함으로써 고등 진핵 생물의 본 개시의 항체를 인코딩하는 DNA에 대한 전사를 증가시킬 수 있다. 인핸서는 DNA의 시스 작용 요소이고, 통상적으로 약 10-300bp인 것으로, 그 역할은 주어진 숙주 세포 유형에서 프로모터의 전사 활성을 증가시키는 것이다. 인핸서의 예시로는 염기쌍 100-270에서 복제 기점의 후측(late side)에 위치한 SV40 인핸서, 사이토메갈로바이러스 초기 프로모터 인핸서, 복제 기점의 후측에 있는 폴리오마 인핸서 및 아데노바이러스 인핸서를 포함한다.

[0368] 번역된 단백질이 소포체의 내강, 주변세포질 공간 또는 세포외 환경으로 분비될 수 있도록, 적절한 분비 신호를

발현된 폴리펩티드에 병입시킬 수 있다. 신호는 폴리펩티드의 내인성 신호일 수도 있고 이종 신호일 수도 있다.

[0369] 폴리펩티드(예를 들어, 항체)는 융합 단백질(예를 들어, GST 융합 단백질) 또는 히스티딘 태그와 같은 수식된 형태로 발현될 수 있으며, 분비 신호뿐만 아니라 별도의 이종 기능적 영역도 포함될 수 있다. 예를 들어, 별도의 아미노산(특히 전하를 띤 아미노산)의 영역을 폴리펩티드의 N말단에 첨가하여 숙주 세포에서, 정제 과정에서 또는 후속의 처리 및 저장 과정에서의 안정성과 지속성을 개선시킬 수 있다. 또한, 정제를 촉진시키기 위해 펩티드 부분을 폴리펩티드에 첨가할 수 있다. 이러한 영역은 폴리펩티드의 최종 제조 전에 제거할 수 있다. 분비 또는 배설을 일으키고, 안정성을 향상시키고, 정제를 촉진시키기 위해 폴리펩티드에 펩티드 부분을 첨가하는 것은 당업계에서 숙지된 일반기술이다.

[0370] 본 개시는 또한, 본원에 기재된 바와 같은 임의의 뉴클레오티드 서열과 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 핵산 서열, 및 본원에 기재된 바와 같은 임의의 아미노산 서열과 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 제공한다.

[0371] 본 개시는 또한, 본원에 기재된 바와 같은 임의의 뉴클레오티드 서열과 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동원성을 갖는 핵산 서열, 및 본원에 기재된 바와 같은 임의의 아미노산 서열과 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동원성을 갖는 아미노산 서열을 제공한다.

[0372] 일부 실시양태에서, 본 개시는 본원에 기재된 바와 같은 임의의 펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 본원에 기재된 바와 같은 임의의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 임의의 아미노산 서열에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 핵산 서열은 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 110개, 120개, 130개, 150개, 200개, 250개, 300개, 350개, 400개, 500개 또는 600개 미만의 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 아미노산 서열은 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 110개, 120개, 130개, 140개, 150개, 160개, 170개, 180개, 190개, 200개, 250개, 300개, 350개 또는 400개 미만의 아미노산 잔기이다.

[0373] 일부 실시양태에서, 아미노산 서열은 (i) 아미노산 서열을 포함하거나; 또는 (ii) 아미노산 서열로 구성된 것으로, 해당 아미노산 서열은 본원에 기재된 바와 같은 서열 중 임의의 하나이다.

[0374] 일부 실시양태에서, 핵산 서열은 (i) 핵산 서열을 포함하거나; 또는 (ii) 핵산 서열로 구성된 것으로, 해당 핵산 서열은 본원에 기재된 바와 같은 서열 중 임의의 하나이다.

[0375] 두 개의 아미노산 서열 또는 두 개의 핵산 서열의 동일성 백분율을 확정하기 위하여, 최적의 비교 목적을 위해 이들 서열을 정렬한다(예를 들어, 최적의 정렬을 위해 제1 및 제2 아미노산 또는 핵산 서열 중의 하나 또는 둘을 빈자리에 유입시킬 수 있고, 또한 비교 목적을 위해서는 비동원 서열은 무시할 수 있다). 그 다음, 상응 아미노산 위치 또는 뉴클레오티드 위치의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드를 비교한다. 첫 번째 서열의 위치가 두 번째 서열의 상응 위치와 동일한 위치에 있는 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드에 의해 점유될 때, 이들 분자는 해당 위치에서는 동일한 것이다. 두 개의 서열의 최적 정렬을 위해 도입될 필요가 있는 빈자리의 수 및 각 빈자리의 길이를 고려하여, 두 개의 서열 간의 동일성 백분율은 서열이 공유되는 동일한 위치의 수의 함수이다. 설명의 목적을 위해, 서열에 대한 비교 및 두 개의 서열 간의 동일성 백분율에 대한 측정은 Blossum 62 스코어링 매트릭스를 사용하여 수행할 수 있는 것으로, 여기서 빈자리 페널티는 12, 빈자리 확장 패널티는 4, 프레임 시프트 빈자리 패널티는 5이다.

[0376] 서열 동원성(예를 들어, 아미노산 서열 동원성 또는 핵산 동원성)의 백분율 또한 확인될 수 있다. 서열 동원성 백분율 확정 방법은 당업계에 알려져 있다. 일부 실시양태에서, 유사한 물리화학적 특성(동원성 백분율)을 갖는 보존된 아미노산 잔기, 예를 들어 류신 및 이소류신을 사용하여 서열 유사성을 측정할 수 있다. 유사한 물리화학적 특성을 갖는 아미노산 잔기 패밀리의 경우 당업계에서는 이미 정의되어 있다. 이러한 패밀리에는 예를 들어 염기성 측쇄가 있는 아미노산(예를 들어 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄가 있는 아미노산(예를 들어 아스파르트산, 글루탐산), 극성 측쇄가 있는 전하를 띠지 않은 아미노산(예를 들어 글리신, 아스파라긴, 글

루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), β-분지쇄 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어 트레오닌, 발린산, 이소류신) 및 방향족 측쇄가 있는 아미노산(예를 들어 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)을 포함한다. 많은 경우, 동원성 백분율은 동일성 백분율보다 크다.

[0377] 본 개시는 본원에 기재된 바와 같은 폴리펩티드 중 임의의 하나를 인콩딩하는 하나 이상의 핵산을 제공한다. 일부 실시양태에서, 핵산(예를 들어, cDNA)은 본원에 기재된 바와 같은 중쇄 폴리펩티를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 본원에 기재된 바와 같은 경쇄 폴리펩티를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 본원에 기재된 바와 같은 scFv 폴리펩티를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0378] 일부 실시양태에서, 벡터는 본원에 기재된 바와 같은 핵산 중의 둘을 가질 수 있는 것으로, 여기서 벡터는 PD-1에 공동 결합하는 VL 영역 및 VH 영역을 인코딩한다. 일부 실시양태에서, 한 쌍의 벡터를 제공하는 것으로, 여기서 각 벡터는 본원에 기재된 바와 같은 핵산 중의 하나를 포함하며, 그 한 쌍의 벡터는 PD-1에 공동 결합하는 VL 영역 및 VH 영역을 공동 인코딩한다. 일부 실시양태에서, 벡터는 본원에 기재된 바와 같은 핵산 중의 둘을 가질 수 있는 것으로, 여기서 벡터는 CD40에 공동 결합하는 VL 영역 및 VH 영역을 인코딩한다. 일부 실시양태에서, 한 쌍의 벡터를 제공하는 것으로, 여기서 각 벡터는 본원에 기재된 바와 같은 핵산 중의 하나를 포함하며, 그 한 쌍의 벡터는 CD40에 공동 결합하는 VL 영역 및 VH 영역을 공동 인코딩한다.

[0379] 벡터는 또한 특이적 항체 또는 폴리펩티드를 발현하도록 구성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 벡터는 하나 이상의 항체 폴리펩티드 사슬을 공동 발현하도록 구성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 벡터는 5' 말단에서 3' 말단까지 사이토메갈로바이러스 프로모터(CMV), 제1 폴리펩티드 사슬을 인코딩하는 서열, 폴리아데닐화(PolyA), CMV, 제2 폴리펩티드 사슬을 인코딩하는 서열, PolyA, 유인원 액포 바이러스 40 터미네이터(SV40) 및 글루타민 신테타제 마커(GS) 서열을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 벡터는 항 CD40 항체 scFv 폴리펩티드 사슬을 발현하도록 구성될 수 있다.

[0380] **치료 방법**

[0381] 본원에 기재된 방법은 암 관련 병증을 치료하기 위한 방법을 포함한다. 통상적으로, 방법은 이와 같은 치료를 필요로 하거나 또는 이와 같은 치료가 필요하다고 확정된 피시험자에게 치료 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 조작된 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항원)을 투여하는 것을 포함한다.

[0382] 본원에 사용된 바와 같이 "치료"란 암 관련 병증의 적어도 하나의 증상을 개선시키는 것을 의미한다. 통상적으로, 암은 사망을 유발하므로; 따라서, 치료는 예상 수명을 증가시킬 수 있다(예를 들어, 적어도 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 또는 적어도 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 6년, 7년, 8년, 9년, 10년). 치료 유효량의 본원에 기재된 약제를 투여하여 암 관련 병증을 치료하면 암 세포의 수를 감소하고/하거나 증상을 경감시킨다.

[0383] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "암"이란 자율적으로 성장하는 능력을 가진 세포, 즉 빠르게 증식하는 세포 성장을 특징으로 하는 비정상 상태 또는 상황을 가리킨다. 해당 용어는 조직병리학적 유형이나 침습 단계를 막론하고 모든 유형의 암 성장 또는 발암 과정, 전이 조직 또는 악성으로 전환된 세포, 조직 또는 기관을 포함하고자 한다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "종양"이란 암 세포, 예를 들어 암 세포 덩어리를 가리킨다. 본원에 기재된 방법을 사용하여 치료 또는 진단할 수 있는 암은 폐, 유방, 갑상선, 림프계, 위장관 및 비뇨생식관에 영향을 미치는 악성 종양과 같은 다양한 기관계의 악성 종양; 및 대다수의 결정암, 신장 세포암, 전립선암 및/또는 고환 종양, 비소세포폐암, 소장암 및 식도암과 같은 악성 종양을 포함하는 선암이 포함된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 약제는 피시험자의 암을 치료하거나 또는 진단하도록 설계된다. 용어 "암"이란 당업계에서 알려져 있고 호흡기계암, 위장관계함, 비뇨생식기계함, 고환함, 유방암, 전립선암, 내분비계암 및 흑색종을 포함하는 상피 또는 내분비 조직의 악성 종양을 가리킨다. 일부 실시양태에서, 암은 신장암 또는 흑색종이다. 예시적인 암은 자궁경부, 폐, 전립선, 유방, 두경부, 결장 및 난소의 조직으로부터 형성된 암을 포함한다. 해당 용어는 또한 예를 들어 암 및 육종 조직으로 구성된 악성 종양을 포함하는 암육종을 포함한다. "선암"은 선 조직 유래의 암 또는 종양 세포가 식별 가능한 선 구조로 형성되는 암을 가리킨다. 용어 "육종"이란 당업계에서 알려져 있고, 간충직 유래의 악성 종양을 가리킨다.

[0384] 일부 실시양태에서, 암은 화학요법 내성 암이다.

[0385] 한편으로, 본 개시는 또한 피시험자의 암 치료용 방법, 피시험자의 시간 경과에 따른 종양부피의 증가 속도를 감소시키는 방법, 전이 발생 위험을 감소시키는 방법 또는 피시험자의 추가 전이 발생 위험을 감소시키는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 치료는 암의 진행을 종료, 둔화, 지연 또는 억제한다. 일부 실시양태에서, 치료는 피시험자의 암의 하나 이상의 증상의 수, 중증도 및/또는 지속 시간을 감소시킬 수 있다.

[0386] 한편으로, 본 개시는 이를 필요로 하는 피시험자, 예를 들어 암을 앓고 있거나 또는 확인되거나 진단된 피시험자에게 치료 유효량의 본원에 개시된 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체) 또는 항체 약물 접합체를 투여하는 것을 포함하는 방법이 존재하는 것으로, 해당 암은 예를 들면, 유방암(예를 들어, 삼중 음성 유방암), 카르시노이드, 자궁경부암, 자궁내막암, 신경아교종, 두경부암, 간암, 폐암, 소세포 폐암, 림프종, 흑색종, 난소암, 췌장암, 전립선암, 신장암, 결장직장암, 위암, 고환암, 갑상선암, 방광암, 요로암 또는 혈액계통 악성 종양이다. 일부 실시양태에서, 암은 절제 불가능한 흑색종 또는 전이성 흑색종, 비소세포폐암(NSCLC), 소세포 폐암(SCLC), 방광암 또는 전이성 호르몬 난치성 전립선암이다. 일부 실시양태에서, 피시험자는 고형종양을 앓고 있다. 일부 실시양태에서, 암은 두경부 편평 세포 암종(SCCHN), 신세포암종(RCC), 삼중 음성 유방암(TNBC) 또는 결장직장암이다. 일부 실시양태에서, 피시험자는 호지킨 림프종을 앓고 있다. 일부 실시양태에서, 피시험자는 삼중 음성 유방암(TNBC), 위암, 요로상피암, 메르켈 세포 암종 또는 두경부암을 앓고 있다.

[0387] 일부 실시양태에서, 암은 흑색종, 췌장암, 중피종, 혈액계통 악성종양, 특히 비호지킨 림프종, 림프종, 만성 림프구성 백혈병 또는 말기 고형 종양이다.

[0388] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 뜨거운 종양을 치료하는 데 사용될 수 있다. 뜨거운 종양은 강한 면역 응답을 유발할 가능성이 있는 종양이다. 뜨거운 종양은 통상적으로 표면에 많은 분자를 가지고 있는 것으로, 이러한 분자는 T세포가 종양 세포를 공격하고 죽일 수 있도록 허용한다. 본원에 기재된 방법은 면역 응답을 한층 더 향상시키고, CD8+ T세포의 증식 및 침윤을 촉진하고, 및/또는 종양에서의 골수 유래 억제 세포의 수를 감소시킬 수 있다.

[0389] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 차가운 종양을 치료하는 데 사용될 수 있다. 차가운 종양은 강한 면역 응답을 유발할 가능성이 그다지 없는 종양이다. 차가운 종양은 통상적으로 면역 응답을 억제하고 T세포가 종양 세포를 공격하고 죽이는 것을 막는 세포에 둘러싸여 있다. 본원에 기재된 방법은 DC 세포의 증식, 침윤 및/또는 활성화를 효과적으로 촉진함으로써 항원제시세포의 활성을 증가시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 방법은 T세포에서 PD-1의 발현을 하향 조절함으로써 PD-1과 PD-L1 간의 상호작용을 한층 더 감소시키고 면역 응답을 향상시킬 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "피시험자" 및 "환자"는 명세서 전반에 걸쳐 서로 교환해서 사용 가능하며, 본 발명의 방법에 따라 치료가 제공되는 동물(인간 또는 비인간)에 대하여 기재한다. 본 발명은 수의학적 및 비수의학적 적용 모두를 고려한다. 인간 환자는 성인 또는 청소년(예를 들어, 18세 미만 사람)일 수 있다. 인간 이외에, 환자는 마우스, 래트, 햄스터, 기니피그, 토끼, 흰족제비, 고양이, 개 및 영장류 동물을 포함하되 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 비인간 영장류 동물(예를 들어, 원숭이, 침팬지, 고릴라 등), 설치류 동물(예를 들어, 래트, 마우스, 게르빌루스쥐, 햄스터, 흰족제비, 토끼), 토끼류 동물, 돼지(예를 들어, 돼지, 소형 돼지), 말, 개, 고양이, 소 및 기타 가축 동물, 농장 동물 및 동물원 동물을 포함한다.

[0390] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 조합물 및 방법은 암 리스크가 있는 환자를 치료하는 데 사용될 수 있다. 암 환자는 당업계에 알려져 있는 다양한 방법을 통해 검정할 수 있다.

[0391] 본원에 사용된 바와 같이, "유효량"이란 질환(예를 들어, 암)의 진행을 종료, 둔화, 지연 또는 억제하는 것을 포함하는 유익하거나 원하는 결과를 실현하기에 충분한 양 또는 투여량을 가리킨다. 유효량은 예를 들어 항체, 항원 결합 프래그먼트, 항체 약물 접합체, 항체 인코딩 폴리뉴클레오티드, 해당 뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및/또는 조합물이 투여될 피시험자의 연령 및 체중, 증상의 중증도 및 투여 경로에 따라 달라지므로, 따라서 개체에 따라 투여를 확인할 수 있다.

[0392] 유효량은 한번 이상의 투여로 투여될 수 있다. 예를 들어, 항체, 항원 결합 프래그먼트 또는 항체 약물 접합체의 유효량은 자가면역성 질환 또는 암의 진행을 개선, 종료, 안정화, 역전, 억제, 둔화 및/또는 지연시키기에 충분한 양이거나, 또는 세포(예를 들어, 생검 세포, 본원에 기재된 암세포 중 임의의 하나 또는 세포주(예를 들어, 암세포주))의 체외에서 증식되는 양을 개선, 종료, 안정화, 역전, 둔화 및/또는 지연시키기에 충분한 양이다. 당업계에서 이해된 바와 같이, 항체, 항원 결합 프래그먼트 또는 항체 약물 접합체의 유효량은 특히 환자의

병력 및 기타 요인(예컨대, 사용하는 항체의 유형(및/또는 투여량))에 따라 달라질 수 있다.

[0393] 본원에 개시된 항체, 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 항체 약물 접합체 및/또는 조성물의 유효량 및 투약 방안은 경험에 의해 결정될 수 있으며, 이와 같은 결정을 내리는 것은 당업계의 기술 범위 내에 있다. 반드시 투여되어야 하는 투여량은 예를 들어 본원에 개시된 항체, 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 항체 약물 접합체 및/또는 조성물을 투여 받을 포유동물, 투여 경로, 본원에 개시된 항체, 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 항원 결합 프래그먼트, 항체 약물 접합체 및/또는 조성물의 구체적인 유형 및 포유동물에 투여되는 기타 약물에 따라 달라질 것으로 당업자는 이해할 것이다. 적절한 투여량의 항체 또는 항원 결합 프래그먼트를 선택하는 지침은 항체 및 항원 결합 프래그먼트의 치료 용도에 관한 문헌, 예를 들어 Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone 등 편집, Noges Publications, Park Ridge, N.J., 1985년, 제22장 제303-357페이지, Smith 등, Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber 등 편집, Raven Press, 뉴욕, 1977년, 제365-389페이지를 참조할 수 있다.

[0394] 유효량의 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체)에 대한 전형적인 1일 투여량은 0.01mg/kg 내지 100mg/kg이다. 일부 실시양태에서, 투여량은 100mg/kg, 50mg/kg, 40mg/kg, 30mg/kg, 20mg/kg, 10mg/kg, 9mg/kg, 8mg/kg, 7mg/kg, 6mg/kg, 5mg/kg, 4mg/kg, 3mg/kg, 2mg/kg, 1mg/kg, 0.5mg/kg 또는 0.1mg/kg 미만일 수 있다. 일부 실시양태에서, 투여량은 30mg/kg, 20mg/kg, 10mg/kg, 9mg/kg, 8mg/kg, 7mg/kg, 6mg/kg, 5mg/kg, 4mg/kg, 3mg/kg, 2mg/kg, 1mg/kg, 0.5mg/kg, 0.1mg/kg, 0.05mg/kg 또는 0.01mg/kg을 초과할 수 있다. 일부 실시양태에서, 투여량은 약 또는 적어도 30mg/kg, 20mg/kg, 10mg/kg, 9mg/kg, 8mg/kg, 7mg/kg, 6mg/kg, 5mg/kg, 4mg/kg, 3mg/kg, 2mg/kg, 1mg/kg, 0.9mg/kg, 0.8mg/kg, 0.7mg/kg, 0.6mg/kg, 0.5mg/kg, 0.4mg/kg, 0.3mg/kg, 0.2mg/kg 또는 0.1mg/kg이다.

[0395] 본원에 기재된 방법 중 임의의 하나에서, 적어도 하나의 항체, 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체), 항체 약물 접합체 또는 약물 조성물(예를 들어, 본원에 기재된 항체, 항원 결합 프래그먼트, 항체 약물 접합체 또는 약물 조성물 중 임의의 하나)과, 선택적으로 적어도 하나의 별도의 치료제는 적어도 주 1회(예를 들어, 주 1회, 주 2회, 주 3회, 주 4회, 1일 1회, 1일 2회 또는 1일 3회)로 피시험자에게 투여할 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 두 가지 상이한 항체 및/또는 항원 결합 프래그먼트는 동일 조성물(예를 들어, 액체 조성물)로서 투여된다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 항체, 그 항원 결합 프래그먼트, 항원 결합 단백질 작제물(예를 들어, 이중특이성 항체) 또는 항체 접합체, 및 적어도 하나의 별도의 치료제가 동일 조성물(예를 들어, 액체 조성물)로서 투여된다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 항체 또는 항원 결합 프래그먼트, 및 적어도 하나의 별도의 치료제가 두 가지 상이한 조성물(예를 들어, 적어도 하나의 항체 또는 항원 결합 프래그먼트를 함유하는 액체 조성물 및 적어도 하나의 별도의 치료제를 함유하는 고체 경구 조성물)로서 투여된다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 별도의 치료제는 알약, 정제 또는 캡슐의 형태로 투여된다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 별도의 치료제는 경구용 서방성 제제로 투여된다.

[0396] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 항체, 항원 결합 프래그먼트, 항체 약물 접합체 또는 약물 조성물(예를 들어, 본원에 기재된 항체, 항원 결합 프래그먼트 또는 약물 조성물 중 임의의 하나)을 투여 전 또는 투여 후에 피시험자에게 하나 이상의 별도의 치료제를 투여할 수 있다. 일부 실시양태에서, 피시험자에게 하나 이상의 별도의 치료제와 적어도 하나의 항체, 항원 결합 프래그먼트, 항체 약물 접합체 또는 약물 조성물(예를 들어, 본원에 기재된 항체, 항원 결합 프래그먼트 또는 약물 조성물 중 임의의 하나)을 투여하여, 피시험자에게서 하나 이상의 별도의 치료제와, 해당 적어도 하나 이상의 항체 또는 항원 결합 프래그먼트(예를 들어, 본원에 기재된 항체, 항원 결합 프래그먼트 또는 약물 조성물 중 임의의 하나)의 생물학적 활성기가 중첩되도록 한다.

[0397] 일부 실시양태에서, 연장된 기간 동안(예를 들어, 적어도 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 1년, 2년, 3년, 4년 또는 5년 기간 내) 피시험자에게 적어도 하나의 항체, 항원 결합 항체 프래그먼트, 항체 약물 접합체 또는 약물 조성물(예를 들어, 본원에 기재된 항체, 항원 결합 항체 프래그먼트 또는 약물 조성물 중 임의의 하나)을 투여할 수 있다. 숙련된 의료 전문가는 본원에 기재된 방법 중 임의의 하나를 사용하여 치료 기간을 확인하여, 치료 유효성(예를 들어, 적어도 하나의 암 증상 관찰)을 진단 또는 추적할 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 숙련된 의료 전문가는 또한 피시험자에게 투여되는 항체 또는 항원 결합 항체 프래그먼트, 항체 약물 접합체(및/또는 하나 이상의 별도의 치료제)의 정체 및 양을 변화시킬 수 있으며(예를 들어, 증가 또는 감소), 또한 치료 유효성의 평가(예를 들어, 본원에 기술되고 당업계에 공지된 임의의 방법을 사용하여)에 기반하여 피시험자에게 투여되는 적어도 하나의 항체 또는 항원 결합 항체 프래그먼트(및/또는 하나 이상의 별도의 치료제)의 투여량 또는 빈도를 조절(예를 들어, 증가

또는 감소)할 수 있다.

[0398] 일부 실시양태에서, 피시험자에게 하나 이상의 별도의 치료제를 투여할 수 있다. 해당 별도의 치료제는 B-Raf 억제제, EGFR 억제제, MEK 억제제, ERK 억제제, K-Ras 억제제, c-Met 억제제, 역형성 림프종 키나제(ALK) 억제제, 포스파티딜이노시톨 3-키나제(PI3K) 억제제, Akt 억제제, mTOR 억제제, 이중 PI3K/mTOR 억제제, 브루톤 티로신 키나제(BTK) 억제제, 및 이소시트레이트 탈수소효소 1(IDH1) 및/또는 이소시트레이트 탈수소효소 2(IDH2)의 억제제로부터 선택되는 하나 이상의 억제제를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 별도의 치료제는 인돌아민 2,3-디옥시게나제-1(IDO1) 억제제(예를 들어, epacadostat)이다.

[0399] 일부 실시양태에서, 별도의 치료제는 HER3 억제제, LSD1 억제제, MDM2 억제제, BCL2 억제제, CHK1 억제제, 활성화된 헤지호그 신호 경로(hedgehog signaling pathway)의 억제제 및 에스트로겐 수용체를 선택적으로 분해하는 약제로부터 선택되는 하나 이상의 억제제를 포함할 수 있다.

[0400] 일부 실시양태에서, 별도의 치료제는 트라벡테딘(Trabectedin), 냅-파클리탁셀(nab-paclitaxel), 트레바나닙(Trebananib), 파조파닙(Pazopanib), 세디라닙(Cediranib), 팔보시클립(Palbociclib), 에베로리무스(everolimus), 플루오로피리미딘, IFL, 레고라페닙(regorafenib), 레오리신(Reolysi), 알림타(Alimta), 세리티닙(Zykadia), 수니티닙(Sutent), 템시롤리무스(temsirolimus), 악시티닙(axitinib), 소라페닙(sorafenib), 볼트리엔트(Votrient), IMA-901, AGS-003, 카보잔티닙(cabozantinib), 빈플루닌(Vinflunine), Hsp90 억제제, Ad-GM-CSF, 테마졸로미드(Temazolomide), IL-2, IFNa, 빈블라스틴, 탈로미드(Thalomid), 다카르바진(dacarbazine), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 레날리도마이드(lenalidomide), 아자시티딘(azacytidine), 보르테조미드(bortezomid), 암루비신(amrubicin), 카르필조밉(carfilzomib), 프랄라트렉세이트(pralatrexate) 및 엔자스타우린(enzastaurin)로부터 선택되는 하나 이상의 치료제를 포함할 수 있다.

[0401] 일부 실시양태에서, 별도의 치료제는 보조제, TLR 작용제, 종양 괴사 인자(TNF) α, IL-1, HMGB1, IL-10 길항제, IL-4 길항제, IL-13 길항제, IL-17 길항제, HVEM 길항제, ICOS 작용제, CX3CL1 표적 요법, CXCL9 표적 요법, CXCL10 표적 요법, CCL5 표적 요법, LFA-1 작용제, ICAM1 작용제 및 단백질 선택 작용제로부터 선택되는 하나 이상의 치료제를 포함할 수 있다.

[0402] 일부 실시양태에서, 피시험자에게 카르보플라틴, 냅-파클리탁셀, 시스플라틴, 페메트렉세드, 젬시타빈, FOLFOX 또는 FOLFIRI를 투여한다.

[0403] 일부 실시양태에서, 별도의 치료제는 항 PD-1 항체, 항 PD-L1 항체, 항 LAG-3 항체, 항 TIGIT 항체, 항 BTLA 항체 또는 항 GITR이다.

[0404] 일부 실시양태에서, PD-1 발현 세포(예를 들어, T세포)가 존재하지 않는 경우, PD1/CD40 이중특이성 항체는 항원제시세포(APC)에서의 CD40 신호전달 경로를 효과적으로 활성화시킬 수 없다.

[0405] 일부 실시양태에서, PD-1 발현 세포가 존재하는 경우, PD1/CD40 이중특이성 항체는 CD40 신호전달 경로를 효과적으로 활성화시킬 수 있다.

[0406] **약물 조성물 및 투여 경로**

[0407] 본원은 또한 본원에 기재된 항원 결합 단백질 작제물, 항체(예를 들어, 이중특이성 항체), 항원 결합 프래그먼트 또는 항체 약물 접합체 중 적어도 하나(예를 들어, 하나, 둘, 셋 또는 넷)가 함유되는 약물 조성물을 제공한다. 본원에 기재된 항원 결합 단백질 작제물, 항체, 항원 결합 프래그먼트 또는 항체 약물 접합체 중 임의의 하나의 두 가지 이상(예를 들어 두 가지, 세 가지 또는 네 가지)은 임의의 조합으로 약물 조성물에 존재할 수 있다. 약물 조성물은 당업계에 알려진 임의의 방식으로 배합될 수 있다.

[0408] 약물 조성물은 예상 투여 경로(예를 들어, 정맥내, 동맥내, 근육내, 피내, 피하 또는 복강내)와 상용되도록 배합된다. 조성물은 멸균 희석제(예를 들어, 멸균수 또는 식염수), 고정 오일, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 또는 기타 합성 용매, 항세균제 또는 항진균제(예컨대, 벤질 알코올 또는 메틸파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등), 항산화제(예컨대, 아스코르브산 또는 아황산수소나트륨), 킬레이트제(예컨대, 에틸렌디아민테트라아세트산), 완충제(예컨대, 아세테이트, 시트레이트 또는 인산염) 및 등삼투압제(예컨대, 당(예를 들어, 포도당)), 폴리올(예를 들어, 만니톨 또는 소르비톨) 또는 염(예를 들어, 염화나트륨), 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 리포솜 현탁액은 또한 약제학적으로 허용 가능한 담체로서 사용될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 번호 4,522,811 참조). 조성물의 제제는 배합되고 앰플, 일회용 주사기 또는 다회 투여량 바이알에 패키징될 수 있다. 필요하는 경우(예를 들어, 주사 가능한 제제의 경우), 예를 들어 코팅제(예를

들어, 레시틴) 또는 계면활성제를 사용하여 적절한 유동성을 유지할 수 있다. 흡수를 지연시키는 약제(예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴)를 통해 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트의 흡수를 연장시킬 수 있다. 대안적으로, 이식물 및 마이크로 캡슐화 전달 시스템을 통해 방출 조절을 실현할 수 있는 것으로, 이는 생물 분해 가능한 생체적합성 중합체(예를 들어 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르소에스테르 및 폴리락트산; Alza 회사 및 Nova 제약사)를 포함할 수 있다.

[0409] 본원에 기재된 항원 결합 단백질 작제물, 항체, 항원 결합 프래그먼트, 항체 약물 접합체 중 임의의 하나를 함유하는 하나 이상의 조성물은 투여량 단위 형식(즉, 투여 및 투여량 균일성을 위하여 예정된 양의 활성 화합물을 함유하는 물리적 이산 단위)으로 배합되어 경구외(예를 들어 정맥내, 동맥내, 근육내, 피내, 피하 또는 복강내) 투여할 수 있다.

[0410] 표준 약학 방법에 의해, 세포 배양물 또는 실험동물(예를 들어, 원숭이)에서 조성물의 독성 및 치료 효능을 확인할 수 있다. LD50(집단의 50%에 대한 치사량) 및 ED50(집단의 50%에 대한 치료 유효량)을 확인할 수 있고; 치료 지수는 LD50:ED50의 비율이다. 높은 치료 지수를 표시하는 약제가 바람직하다. 약물이 원하지 않는 부작용을 나타내는 경우, 잠재적 손상을 최대한 감소시키기 위해(즉, 원하지 않는 부작용 감소) 주의를 기울여야 한다. 독성 및 치료 효능은 기타 표준 약학 방법으로 확인할 수 있다.

[0411] 세포 배양 측정 및 동물 연구에서 획득한 데이터는 피시험자(예를 들어, 인간)에게 사용하기 위한 적절한 투여량의 임의의 미리 정해진 약제를 배합하는 데 사용될 수 있다. 하나 이상(예를 들어 하나, 두 가지, 세 가지 또는 네 가지)의 항원 결합 단백질 작제물, 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트(예를 들어, 본원에 기재된 항체 또는 항체 프래그먼트 중 임의의 하나)의 치료 유효량은 피시험자(예를 들어, 암에 걸린 것으로 확인된 인간 피시험자) 또는 발병 위험이 있다고 진단받은 피시험자(예를 들어, 이전에 암에 걸렸지만 현재 완치된 피시험자)의 질환을 치료하고(예를 들어, 암세포 죽임), 피시험자(예를 들어, 인간)의 질환의 하나 이상 증상의 중증도, 빈도 및/또는 지속 시간을 감소시키는 양이 될 것이다. 본원에 기재된 항원 결합 단백질 작제물, 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트 중 임의의 하나의 유효량 및 투여량은 의료보건 전문가 또는 수의학 전문가에 의해 당업계에 알려진 방법을 사용하고 피시험자(예를 들어, 인간)의 질환의 하나 이상 증상을 관찰하는 것을 통해 확인될 수 있다. 일부 요소는 피시험자를 효과적으로 치료하는 데 필요한 투여량 및 시기에 영향을 끼칠 수 있다(예를 들어, 질환 또는 병증의 중증도, 이전 요법, 피시험자의 일반적인 건강상태 및/또는 연령, 및 기타 다른 질환의 존재 여부).

[0412] 예시적인 투여량은 밀리그램 또는 마이크로그램 양의 본원에 기재된 항원 결합 단백질 작제물, 항체 또는 항원 결합 프래그먼트 또는 항체 약물 접합체 중 임의의 하나/킬로그램 피시험자의 체중(예를 들어, 약 1μg/kg 내지 약 500mg/kg; 약 100mg/kg 내지 약 500mg/kg, 약 100μg/kg 내지 약 50mg/kg, 약 10μg/kg 내지 약 5mg/kg, 약 10μg/kg 내지 약 0.5mg/kg, 약 0.1mg/kg 내지 약 0.5mg/kg)이다. 이들 투여량은 넓은 범위를 망라하지만, 당업자는 치료제(항원 결합 단백질 작제물, 항체 및 그 항원 결합 프래그먼트 포함)가 **약효**는 서로 다르며 유효량은 알려진 방법에 의해 확인될 수 있음을 이해할 것이다. 통상적으로, 우선 상대적으로 낮은 투여량을 투여한 후, 담당 의료보건 전문가 또는 수의사 전문가(치료 적용의 경우) 또는 연구원(여전히 개발 단계에 처한 경우)이 적절한 반응을 얻을 때까지 그 투여량을 점차적으로 증가시킬 수 있다. 또한, 임의 특정 피시험자에 대한 구체적인 투여량 수준은 여러 가지 요소에 의해 결정되는 것으로 이해해야 하며, 이는 사용된 구체적 화합물의 활성, 피시험자의 연령, 체중, 전반적인 건강상태, 성별 및 식사, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 항체 또는 항체 프래그먼트의 체내에서의 반감기를 포함한다.

[0413] 약물 조성물은 투여 지침서와 함께 용기, 포장 또는 분배기에 포함될 수 있다. 본 개시는 또한 본원에 기재된 바와 같은 다양한 용도를 위해 사용되는 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트 또는 항체-약물 접합체를 제조하는 방법을 제공한다.

[0414] **실시예**

[0415] 이하 실시예에서 본 발명에 대해 한층 더 설명할 것이나, 이들 실시예는 청구범위에 기재된 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0416] **실시예1: 항 PD-1/CD40 이중특이성 항체의 제조**

[0417] 두 가지 항 PD-1/CD40 이중특이성 항체(BsAb)를 설계한다. 도 **1A**에 도시된 바와 같이, Fab-ScFV-IgG BsAb는 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항 PD-1 아암, 및 IgG의 CH2 및 CH3 도메인에 연결되는 단쇄 가변 프래그먼트(scFv)를 포함하는 항 CD40 아암을 갖는다. **도 1B**에 도시된 바와 같이, ScFV-HC-IgG BsAb는 항 PD-1 단클론 항체의 중쇄

C말단 중 각각에 연결되는 항 CD40 scFv를 갖는다. PD-1 항체 1A7과 관련되는 서열에 대한 내용은 PCT/CN2018/077016에 기재되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 통합된다. CD40 항체 6A7과 관련되는 서열에 대한 내용은 PCT/CN2018/096494에 기재되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 통합된다.

[0418] BsAb 각 폴리펩티드 사슬을 발현하는 벡터를 CHO 세포에 공동 형질감염시킨다. 배양 14일 후, 세포 상청액을 수집하고 단백질 A 친화성 크로마토그래피로 정제하여, 다시 크기 배제 크로마토그래피(SEC)로 정제하고 이중특이성 항체를 얻는다. 이중특이성 항체의 고정 영역은 인간 IgG1 또는 IgG4로부터 선택된다. 특히, IgG1은 돌연변이, 예를 들어 LALA(L234A/LS235A) 돌연변이를 도입하여, Fc 수용체 결합 친화력을 낮춘다. 이러한 Fc 돌연변이는 항체 이펙터 기능을 최소화하여 항체 안전성을 개선할 수 있다.

[0419] 이러한 항체의 발현을 위한 다양한 벡터를 제조하여 이하 실험을 수행한다. 이하 실험에서, Fab-ScFV-IgG 및 ScFV-HC-IgG 중 항 PD-1의 VH 및 VL은 항 PD1 항체 1A7-H2K3으로부터 유래된다. 항 CD40 ScFV의 VH 및 VL은 6A7-H4K2 항 CD40 항체로부터 유래된다.

[0420] Fab-ScFV-IgG 항체에서, 놉-인투-홀(KIH) 돌연변이도 고정 영역에 도입시킨다. Fab-ScFV-IgG4의 PD-1 아암은 1A7-H2K3의 VH와, KIH 돌연변이를 갖는 IgG4 고정 영역(SEQ ID NO: 41 및 150)을 포함한다. ScFV 아암은 6A7-H4K2의 VH 및 VL(SEQ ID NO: 108 및 110; 또는 SEQ ID NO: 126 및 127) 및 상응 KIH 돌연변이를 갖는 IgG4 고정 영역(SEQ ID NO: 151)을 포함한다. ScFV-HC-IgG에서, 링커 서열을 사용하여 항 PD-1 항체의 C말단에 항 CD40 ScFV를 첨가한다.

[0421] 도 **2A 내지 2B**에 도시된 바와 같이, 비환원 겔 전기영동(6% 분해 겔)을 사용하여 정제된 BsAb를 검출한다. 각 레인에 2㎍의 단백질을 추가한다. 결과는 모든 BsAb가 다 발현되었고 정확하게 조립되었음을 보여준다.

[0422] **실시예 2: 항체 결합 친화력**

[0423] BsAb의 인간 PD-1(hPD-1) 또는 인간 CD40(hCD40)에 대한 결합 친화력은 Biacore 시스템을 통해 확인된다. 인간 PD-1 단백질(인간 PD-1/PDCD1 단백질, His 태그) 및 인간 CD40 단백질(인간 CD40/TNFRSF5 단백질, His 태그)은 모두 ACRO Biosystems로부터 구매한 것이고, 카탈로그 번호는 각각 PD1-H5221 및 CD0-H5228이다. 결과는 이하 표에 정리되어 있다.

표 1

[0424]

포획 1 용액	hPD-1		
	Kon(1/Ms))	Koff(1/s)	KD(M)
Fab-ScFV-IgG4	1.20E+05	1.17E-03	9.78E-09
ScFV-HC-IgG4	1.48E+05	1.22E-03	8.28E-09
PD-1(1A7-H2K3-IgG4)	1.46E+05	1.25E-03	8.56E-09

표 2

[0425]

포획 1 용액	hCD40		
	Kon(1/Ms)	Koff(1/s)	KD(M)
Fab-ScFV IgG4	2.85E+05	5.00E-04	1.75E-09
ScFV-HC IgG4	2.61E+05	3.40E-04	1.30E-09
CD40(6A7-H4K2-IgG2)	1.05E+05	3.22E-04	3.06E-09

[0426] 결과는 두 가지 유형의 이중특이성 항체 모두가 부모 단클론 항체와의 상당한 결합 친화력을 가짐을 보여준다. 따라서, Fc 영역 돌연변이(예를 들어, LALA 돌연변이)는 결합 친화력에 영향을 미치지 않는다.

[0427] **실시예 3: Jurkat-luc-hPD1 리포터 세포 활성화 측정**

[0428] BsAb Fab-ScFV-IgG4 및 ScFV-HC-IgG4가 PD-1/PD-L1 경로를 차단할 수 있는지 여부를 테스트하기 위해 실험을 수행한다.

[0429] 기저 세포 CHO-aAPC-hPD-L1(Promega, 카탈로그 번호: J1255)을 96웰 플레이트(세포 밀도: 4×10^4개 세포/웰)에 접종하고 37° C에서 밤새 인큐베이션한다. 이중특이성 항체 Fab-ScFV-IgG4, ScFV-HC-IgG4 및 항 PD-1 단클론

항체 1A7-H2K3-IgG4를 연속 희석(3배)하여 최고 농도가 100μg/mL로 한다. 완충액은 10% 태아 소 혈청(FBS)이 보충된 RPMI 1640 배지임을 측정한다. 다음 날, 이펙터 세포 Jurkat-Luc-hPD-1(Promega, 카탈로그 번호: J1255)을 120g으로 10분 동안 원심분리한 다음, 96웰 플레이트에 접종한다(세포 밀도 5×10^4개 세포/웰). 그 다음, CHO-aAPC-hPD-L1이 접종된 플레이트의 상청액을 버리고, Jurkat-Luc-hPD-1 세포 50μL를 25μL의 항체와 함께 각 웰에 첨가한다. 위의 96웰 플레이트를 37℃ 인큐베이터에서 6시간 동안 인큐베이션한다. 인큐베이션 완료 후, 플레이트를 꺼내 Bio-lite 루시페라아제 검출시약(Novazyme Biotechnology Co., Ltd., 카탈로그 번호: DD1201-02-AB) 75μL를 첨가하고, 실온에서 5-10분 동안 인큐베이션한다. 그 다음, 플레이트를 발광 검출기에 넣어 형광 신호를 검출한다. 만약 항체가 PD-1과 PD-L1 간의 상호 작용을 차단할 수 있다면 이펙터 세포가 신호를 보고하게 된다.

[0430] **도 3** 및 표3에 도시된 바와 같이, BsAb는 모두 PD-1/PD-L1 통로에 대한 차단 작용을 보여준다. 1A7-H2K3-IgG4 및 ScFV-HC-IgG4는 두 개의 항 PD-1 아암을 채택하는 것에 비해, Fab-ScFV-IgG4는 하나의 항 PD-1 아암으로 PD-1에 결합하는 것이므로, Fab-ScFV-IgG4의 EC_{50} 값이 상대적으로 더 높다는 것이다.

표 3

[0431]

항체 명칭	EC_{50} 값(μg/mL)	R^2 값
1A7-H2K3-IgG4	5.605	0.9968
Fab-ScFV-IgG4	23.37	0.999
ScFV-HC-IgG4	4.356	0.9997

[0432] **실시예 4: 이중특이성 항체의 T세포/APC 세포 브리징 효과**

[0433] 이하 리포터 세포를 사용하여 실험을 수행하여, BsAb Fab-ScFV-IgG4 및 ScFV-HC-IgG4가 T세포 및 APC 세포를 브리징할 수 있는지 여부를 테스트한다.

[0434] 기저 세포 CHO-K1-hPD1을 96웰 플레이트(세포 밀도: 5×10^4개 세포/웰)에 접종하고 37° C에서 밤새 인큐베이션한다. BsAb Fab-ScFV-IgG4 및 ScFV-HC-IgG4를 연속 희석(3배)하여 최고 농도가 5μg/mL로 한다. 이와 동시에, 항 PD-1 항체 1A7-H2K3-IgG4 및 항 CD40 항체 6A7-H4K2-IgG2를 1:1의 비율로 조합한 다음, 연속 희석(3배)하여 최고 농도가 10μg/mL(각 단클론 항체가 5μg/mL임)으로 한다. 완충액은 10% 태아 소 혈청(FBS)이 보충된 RPMI 1640 배지임을 측정한다. 다음 날, 이펙터 세포 Jurkat-Luc-hCD40(Promega, 카탈로그 번호: JA2125)을 120g으로 10분 동안 원심분리한 다음, 96웰 플레이트에 접종한다(세포 밀도 5×10^4개 세포/웰). 그 다음, CHO-K1-hPD1이 접종된 플레이트의 상청액을 버리고, Jurkat-Luc-hCD40 세포 50μL를 25μL의 항체와 함께 각 웰에 첨가한다. 위의 96웰 플레이트를 37℃ 인큐베이터에서 6시간 동안 인큐베이션한다. 인큐베이션 완료 후, 플레이트를 꺼내 Bio-lite 루시페라아제 검출시약(Novazyme Biotechnology Co., Ltd., 카탈로그 번호: DD1201-02-AB) 75μL를 첨가하고, 실온에서 5-10분 동안 인큐베이션한다. 그 다음, 플레이트를 발광 검출기에 넣어 형광 신호를 검출한다.

[0435] 도 **4A**에 도시된 바와 같이, CHO-K1-hPD1 세포가 존재하는 경우, Fab-ScFV-IgG4 및 ScFv-HC-IgG4 모두가 리포터 세포를 트랜스활성화시킨다. 반면에, 단클론 항체의 조합은 리포터 세포를 활성화시키지 않는다. 이는 CD40의 활성화가 기저 세포에 의해 촉진되는 CD40 군집화를 필요로 하기 때문일 수 있다. 도 **4B**에 도시된 바와 같이, CHO-K1-hPD1이 존재하지 않는 경우, BsAb 및 단클론 항체의 조합 모두가 리포터 세포를 활성화시키지 않는다. EC_{50} 값은 이하 표에 나타난 바와 같다. 따라서, 테스트한 이중특이성 항체는 T세포 및 APC 세포를 브리징할 수 있다.

표 4

[0436]

항체 명칭	EC_{50} 값(μg/mL)	R^2 값
Fab-ScFV-IgG4	0.0103	0.9938
ScFV-HC-IgG4	0.0108	0.9943

[0437] 여기서, Jurkat-Luc-hCD40 세포는 PD-1을 발현하지 않으며, APC 세포(예를 들어, 수지상 세포 또는 대식세포)에

서의 CD40 통로 활성화를 검증하는 데 사용된다. T세포(예를 들어, PD-1 또는 기타 표적 발현) 및 APC 세포는 BsAb를 통한 브리징으로 APC 세포에서의 CD40 군집화를 자극함으로써, 종양 미세환경에서의 면역 응답 신호를 증폭시킬 수 있다. 결과는 또한, 이중특이성 항체가 CD40 경로에 대한 활성화는 이들의 PD-1을 발현하는 세포와의 브리징 효과에 의해 결정된다는 것을 보여준다. PD-1을 발현하는 면역 세포는 종양 미세환경으로 모집될 것이고, PD-1 발현은 통상적으로 종양 미세환경에서 상향조절되기 때문에, 해당 메커니즘은 또한 면역 활성을 종양 미세환경에 제한시킬 수 있는 가능성이 크며, 또한 부작용, 예를 들어 간에서의 독성을 감소시킬 수 있다. 또한, 종양 배수 림프절은 항원제시세포 및 PD-1을 발현하는 T세포를 갖는다. 이중특이성 항체는 종양 배수 림프절에서의 면역 응답을 효과적으로 증가시킬 수 있다. 이와 동시에, 조절성 T세포(Treg)의 억제 활성을 억제함으로써 계통 내성을 억제할 수 있다.

[0438] **실시예 5: Fc 수용체에 의해 매개되는 리포터 세포 활성화 측정**

[0439] BsAb Fab-ScFV-IgG4 및 ScFV-HC-IgG4가 FcR 가교(예를 들어, FCγRIIB 수용체)를 통해 리포터 세포를 활성화시킬 수 있는지 여부를 테스트하기 위해 실험을 수행한다.

[0440] 기저 세포 CHO-K1-hFcγRIIB(Promega, 카탈로그 번호: JA2251)를 96웰 플레이트(세포 밀도: 5×10^4개 세포/웰)에 접종하고 37° C에서 밤새 인큐베이션한다. 항 CD40 단클론 항체 6A7-H4K2-IgG2 및 이중특이성 항체 Fab-ScFV-IgG4, ScFV-HC-IgG4를 연속 희석(3배)하여 최대 농도가 10μg/mL로 한다. 완충액은 10% 태아 소 혈청(FBS)이 보충된 RPMI 1640 배지임을 측정한다. 다음 날, 이펙터 세포Jurkat-Luc-hCD40(Promega, 카탈로그 번호: JA2251)을 120g으로 10분 동안 원심분리한 다음, 96웰 플레이트에 접종한다(세포 밀도 5×10^4개 세포/웰). 그 다음, CHO-K1-hFcγRIIB이 접종된 플레이트의 상청액을 버리고, Jurkat-Luc-hCD40 세포 50μL를 25μL의 항체와 함께 각 웰에 첨가한다. 위의 96웰 플레이트를 37℃ 인큐베이터에서 6시간 동안 인큐베이션한다. 인큐베이션 완료 후, 플레이트를 꺼내 Bio-lite 루시페라아제 검출시약(Novazyme Biotechnology Co., Ltd., 카탈로그 번호: DD1201-02-AB) 75μL를 첨가하고, 실온에서 5-10분 동안 인큐베이션한다. 그 다음, 플레이트를 발광 검출기에 넣어 형광 신호를 검출한다.

[0441] **도 5** 및 **표 5**에 도시된 바와 같이, CHO-K1-hFcγRIIB 세포가 존재하는 경우, Fab-ScFV-IgG4가 리포터 세포를 활성화시키며, 그 EC_{50}은 항 CD40 단클론 항체 6A7-H4K2-IgG2와 상당하다. 하지만, ScFV-HC-IgG4는 FCγRIIB 수용체에 의해 매개된 리포터 세포의 활성화를 보여주지 않았다.

표 5

[0442]

항체 명칭	EC_{50} 값(μg/mL)	R^2 값
6A7-H4K2-IgG2	0.0203	0.997
Fab-ScFV-IgG4	0.0543	0.998

[0443] CD40 항체 6A7-H4K2-IgG2는 FCγRIIB 수용체 가교를 통해 리포터 세포를 활성화시킬 수 있다. 하지만, 항 CD40 scFv가 Fc 영역에 연결된 경우, FCγRIIB는 FCγRIIB에 의해 매개된 군집화를 통해 CD40 통로를 활성화시킬 수 없다. ScFV-HC-IgG4가 FCγRIIB 수용체에 의해 매개된 리포터 세포 활성화를 나타내지 않기 때문에, ScFV-HC-IgG4는 높은 수준의 FCγRIIB를 발현하는 조직에서의 독성, 예를 들어 간에서의 독성을 효과적으로 감소시킬 수 있다.

[0444] **표 6**은 두 가지 이중특이성 항체 Fab-ScFV-IgG 및 ScFV-HC-IgG의 체외 활성에 대해 정리되어 있다. CHO-K1-hPD1 세포가 존재하는 경우, ScFV-HC-IgG4는 APC 세포에서 CD40 통로 활성화를 보여주나, FCγRIIB 수용체에 의해 매개된 T세포 활성화는 보여주지 않기 때문에, ScFV-HC-IgG4 및 Fab-ScFV-IgG4 모두가 FcR 비의존성 방식으로 암을 효과적으로 치료할 수 있다.

표 6

[0445]

CD40 활성	Fab-ScFV-IgG4	ScFV-HC-IgG4	mAb 또는 조합
기저 세포 없음	없음	없음	없음
CHO-K1-hPD1	있음	있음	없음
CHO-K1-hFCγRIIB	있음	없음	있음

[0446] **실시예6: ScFV-HC-IgG 아형의 리포터 세포에 대한 활성화**

[0447] 이 실험을 수행하여, ScFV-HC-IgG의 아형(ScFV-HC-IgG4 및 ScFV-HC-IgG1-LALA 포함)이 PD-1을 발현하는 기저 세포가 존재하는 경우 리포터 세포를 활성화시킬 수 있는지 여부를 테스트한다. 이 실험의 수행은 실시예 4에 기재된 단계와 유사하나, 다른 점은 Jurkat-hPD1로 기저 세포 CHO-K1-hPD1을 대체한다는 것이다. 도 **6A**에서는 기저 세포를 사용하지 않는다. **도 6B** 및 **표 7**에 도시된 바와 같이, BsAb ScFV-HC-IgG4 및 ScFV-HC-IgG1-LALA, 및 항 CD40 단클론 항체 6A7-H4K2-IgG2는 모두 리포터 세포를 활성화시킨다.

표 7

[0448]

항체 명칭	EC_{50} 값(μg/mL)	R^2 값
CD40	0.0089	0.9612
ScFV-HC-IgG4	0.0079	0.9473
ScFV-HC-IgG4-LALA	0.0065	0.9642

[0449] 또한, CHO-K1-hFcγRIIB 세포가 존재하는 경우 리포터 세포 활성화에 대해서도 평가하였다. **도 6C**에 도시된 바와 같이, ScFV-HC-IgG4 및 ScFV-HC-IgG1-LALA는 모두 FCγRIIB 수용체에 의해 매개된 리포터 세포의 활성화를 보여주지 않으며, 이는 **도 5**에 도시된 결과와 일치하다. 따라서, ScFV-HC-IgG4 및 ScFV-HC-IgG1-LALA는 주로 PD-1을 발현하는 세포에 의존하여 APC 세포 중의 CD40 통로를 활성화시킨다.

[0450] **실시예 7: 이중특이성 항체의 종양 성장 억제에 대한 체내 테스트**

[0451] 체내에서 이중특이성 항체를 테스트하고 및 이러한 항체의 인간 체내에서의 작용을 예측하기 위해 인간화 CD40 마우스 모델을 준비하였다. 인간화 CD40 마우스 모델은, 키메라 CD40 단백질(SEQ ID NO: 97)을 발현하도록 조작된 것으로, 여기서 마우스 CD40 단백질의 세포외 영역은 상응 인간 CD40 세포외 영역으로 대체된다. 마우스 CD40의 아미노산 잔기 20-192(SEQ ID NO: 96)는 인간 CD40의 아미노산 잔기 20-192(SEQ ID NO: 95)로 대체된다. CD40 인간화 마우스를 PD-1 인간화 마우스와 교잡시키는 것을 통해, 이중 인간화 CD40/PD-1 마우스 모델도 생성하였다. 인간화 PD1 마우스 모델은, 키메라 PD1 단백질(SEQ ID NO: 39)을 발현하도록 조작된 것으로, 여기서 마우스 PD1 단백질의 세포외 영역은 상응 인간 PD1 세포외 영역으로 대체된다. 마우스 PD1의 아미노산 잔기 31-141(SEQ ID NO: 38)은 인간 PD1의 아미노산 잔기 31-141(SEQ ID NO: 37)로 대체된다.

[0452] 인간화 마우스 모델(예를 들어, B-hCD40 마우스) 또는 이중 인간화 CD40/PD-1 마우스(B-hPD-1/hCD40 마우스)는 신규의 도구를 제공하며, 이는 인간과 마우스 CD40 또는 PD-1을 발현하는 일반 마우스의 임상 결과를 유의하게 감소시키는 것을 통해 임상 환경에서의 새로운 치료법을 테스트하는 데 사용된다. 인간화 CD40, 인간화 PD-1 또는 이중 인간화 CD40/PD-1 마우스 모델에 대한 자세한 설명은 PCT/CN2018/091845 및 PCT/CN2017/090320을 참조할 수 있으며; 이들 문헌 중 각각의 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 통합된다.

[0453] *BsAb 항결장암의 체내 결과*

[0454] 결장암 모델에서, 이중특이성 항체 ScFV-HC-IgG4 및 ScFV-HC-IgG1-LALA의 체내 종양 성장에 대한 작용을 테스트한다. MC-38 종양 세포(결장선암 세포)를 CD40 인간화 B-hCD40 마우스에 피하 주사한다. 마우스의 종양 부피가 $100mm^3$-$150mm^3$에 이르게 되면, 마우스를 종양 부피에 따라 무작위로 상이한 그룹으로 나눈다.

[0455] 각 그룹에서, B-hCD40 마우스에 각각 식염수(PS)(G1), 4mg/kg ScFV-HC-IgG4(G2) 또는 4mg/kg ScFV-HC-IgG1-LALA(G3)를 복강내(ip) 주사한다. 투약 빈도는 주 2회(총 4회 투약)이다.

[0456] 마우스의 체중에 따라 4mg/kg으로 주사 부피를 계산한다. 종양의 장축과 단축의 길이를 측정하고, 0.5×(장축)×(단축)^{2}로 종양의 부피를 계산한다. 주사 전, 마우스를 상이한 그룹으로 나눌 때(첫 번째 항체 주사 전), 항체 주사 기간(주 2회), 및 안락사 전의 각 시기에 마우스의 체중을 측정한다.

[0457] 이하 식: TGI(%)=[1-(Ti-T0)/(Vi-V0)]×100%를 사용하여, 종양 성장 억제 백분율(TGI%)을 계산한다. Ti는 i일째 치료군의 평균 종양 부피이다. T0은 0일째 치료군의 평균 종양 부피이다. Vi는 i일째 대조군의 평균 종양 부피이다. V0은 0일째 대조군의 평균 종양 부피이다.

[0458] t-테스트를 채택하여 통계학 분석을 수행한다. TGI%가 60%를 초과하는 것은 종양 성장이 유의하게 억제되었다는 것을 보여준다. $P<0.05$는 유의한 차이의 임계값을 의미한다.

표 8

[0459]

그룹 별	항체	투여량(mg/kg)	경로	투약 빈도	투약 총 횟수
G1	PS(대조)	-	i.p.	BIW	4
G2	ScFV-HC-IgG4	4mg/kg	i.p.	BIW	4
G3	ScFV-HC-IgG1-LALA	4mg/kg	i.p.	BIW	4

[0460] 전체 처리 기간 내내 마우스의 체중을 모니터링한다. 상이한 그룹에 있는 마우스의 평균 체중은 모두 상이한 정도로 증가되었다(**도 7** 및 **도 8**). 처리 기간 종료 시, 상이한 그룹 간에 체중의 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 결과는 ScFV-HC-IgG4 및 ScFV-HC-IgG1-LALA가 마우스에 대한 내성이 양호하고, 현저한 독성이 없다는 것을 보여준다.

[0461] ScFV-HC-IgG4 및 ScFV-HC-IgG1-LALA로 처리된 그룹 중 종양 부피는 **도 9**에 도시되어 있다. 20일째(그룹 나눈 후 20일째)의 TGI%를 계산하여 이하 표에 나타난 바와 같다.

표 9

[0462]

		종양 부피(mm^3)				생존율	TGI_{TV}%	P값	
		0일째	6일째	13일째	20일째			체중	종양 부피
대조군	G1	139 ±8	519 ±52	935 ±159	2007 ±336	5/5	n.a.	n.a.	n.a.
치료군	G2	139 ±10	624 ±99	1235 ±186	2688 ±316	5/5	-36.5%	0.626	0.178
	G3	140 ±9	549 ±43	1001 ±62	2270 ±141	5/5	-14.1%	0.717	0.492

[0463] 결과는, 인간 PD-1을 발현하는 세포가 존재하지 않는 경우, 이중특이성 항체 ScFV-HC-IgG4 및 ScFV-HC-IgG1-LALA는 종양 성장을 억제하지 않는다는 것을 보여준다.

[0464] *BsAb 항 흑색종의 체내 결과*

[0465] 흑색종 모델에서, 이중특이성 항체 ScFV-HC-IgG4 및 ScFV-HC-IgG1-LALA의 체내 종양 성장에 대한 작용을 테스트한다. 인간 PD-L1을 발현하는 B16F10 세포(흑색종 세포)(B16F10-hPD-L1)를 이중 인간화 CD40/PD-1 마우스(B-hPD-1/hCD40 마우스)에 피하 주사한다. 마우스의 종양 부피가 $100mm^3$-$150mm^3$에 이르게 되면, 마우스를 종양 부피에 따라 무작위로 상이한 그룹으로 나눈다.

[0466] 각 그룹에서, B-hPD-1/hCD40 마우스에 식염수(PS)(G1), 3mg/kg 항 PD1 단클론 항체 1A7-H2K3-IgG4(G2), 3mg/kg 항 CD40 단클론 항체 6A7-H4K2-IgG2(G3), 4mg/kg ScFV-HC-IgG1-LALA(G4), 4mg/kg ScFV-HC-IgG4(G5), 3mg/kg 항 PD1 단클론 항체 1A7- H2K3-IgG4와 3mg/kg 항 CD40 단클론 항체 6A7-H4K2-IgG2의 조합(G6) 또는 4mg/kg 이중특이성 항체 PD-1-MOCK-ScFV-HC-IgG4(G7)를 복강내 주사(i.p.)한다. BsAb PD-1-MOCK-ScFV-HC-IgG4는 ScFV-HC-IgG와 동일한 구조를 가지나, scFv는 CD40을 표적으로 하지 않고 OX40을 표적으로 한다. 투약 빈도는 주 2회(총 4회 투약)이다.

[0467] 마우스의 체중에 따라 주사 부피를 계산한다. 종양의 장축과 단축의 길이를 측정하고, 0.5×(장축)×(단축)^{2}로 종양의 부피를 계산한다. 주사 전, 마우스를 상이한 그룹으로 나눌 때(첫 번째 항체 주사 전), 항체 주사 기간(주 2회), 및 안락사 전의 각 시기에 마우스의 체중을 측정한다.

[0468] t-테스트를 채택하여 통계학 분석을 수행한다. TGI%가 60%를 초과하는 것은 종양 성장이 유의하게 억제되었다는 것을 보여준다. $P<0.05$는 유의한 차이의 임계값을 의미한다.

표 10

[0469]

그룹 별	항체	투여량(mg/kg)	경로	투약 빈도	투약 총 횟수
G1	PS(대조)	-	i.p.	BIW	4
G2	PD-1	3mg/kg	i.p.	BIW	4
G3	CD40	3mg/kg	i.p.	BIW	4

G4	ScFV-HC-IgG1-LALA	4mg/kg	i.p.	BIW	4
G5	ScFV-HC-IgG4	4mg/kg	i.p.	BIW	4
G6	PD-1+CD40	3+3mg/kg	i.p.	BIW	4
G7	PD-1-MOCK-ScFV-HC-IgG4	4mg/kg	i.p.	BIW	4

[0470] 전체 처리 기간 내내 마우스의 체중을 모니터링한다. 상이한 그룹에 있는 마우스의 평균 체중은 모두 상이한 정도로 증가되었다(**도 10** 및 **도 11**). 처리 기간 종료 시, 상이한 그룹의 마우스의 체중은 모두 증가하였다.

[0471] 항체로 처리된 그룹의 종양 부피는 **도 12**에 도시되어 있다. 14일째 및 21일째(그룹 나눈 후 14일째 또는 21일째)의 TGI%도 계산하여 이하 표에 나타난 바와 같다. P값은 21일째의 데이터를 기반으로 한다. **도 12에는** 25일째의 데이터도 포함되어 있다.

표 11

[0472]

		종양 부피(mm^3)				21일째의 생존율	14일째의 TGI_{TV}%	21일째의 TGI_{TV}%	21일째의 P값	
		0일째	7일째	14일째	21일째				체중	종양 부피
대조군	G1	132 ±4	1203 ±236	3213 ±503	4491	1/7*	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
치료군	G2	132 ±5	284 ±81	254 ±126	1240 ±417	7/7	96.0%	74.6%	< 0.007	< 0.001
	G3	132 ±5	621 ±95	677 ±186	2311 ±488	7/7	82.3%	50.0%	< 0.021	< 0.001
	G4	132±7	425 ±61	201 ±78	355 ±127	7/7	97.8%	94.9%	< 0.008	< 0.001
	G5	132±5	252 ±43	67 ±40	234 ±157	7/7	102.1%	97.6%	< 0.006	< 0.001
	G6	132±7	310 ±62	197 ±70	431 ±176	7/7	97.9%	93.1%	< 0.003	< 0.001
	G7	132±6	445 ±38	430 ±26	1714 ±250	7/7	90.3%	63.7%	< 0.016	< 0.001

[0473] 주의: *21 일째 되기 전 여섯 마리 마우스의 종양 부피가 $3000mm^3$을 초과하였기 때문에, 초기에 이들에 대해 안락사를 실행하였다.

[0474] 결과는, 단클론 항체에 비해, 이중특이성 항체 ScFV-HC-IgG4 및 ScFV-HC-IgG1-LALA가 비교적 높은 TGI%로 종양 성장을 억제한다는 것을 보여준다. 특히, 4mg/kg의 ScFV-HC-IgG4(G5) 및 ScFV-HC-IgG1-LALA(G4)는 6mg/kg의 항 PD1 및 항-CD40 항체의 조합(G6)과 비교하면 유사한 TGI%를 갖는다. 결과는 또한, 항 CD40 scFv 도메인이 종양 억제에 대한 협동 작용이 있음을 보여준다.

[0475] 또한, PD-1-MOCK-ScFV-HC-IgG4(G7)의 TGI%는 항 PD1 단클론 항체 1A7-H2K3-IgG4(G2)의 TGI%와 비슷하긴 했으나, ScFV-HC-IgG4(G5) 및 ScFV-HC-IgG1-LALA(G4)의 TGI%보다(예를 들어, 21일째) 훨씬 더 낮았다. 이는 ScFV-HC-IgG4(G5) 및 ScFV-HC-IgG1-LALA(G4)에 의해 유도된 종양 억제 작용이 부분적으로는 PD-1을 발현하는 세포(예를 들어, T세포) 및 CD40을 발현하는 세포(예를 들어, APC 세포)에 의해 브리징하여 유도된다는 것을 보여준다.

[0476] *BsAb 항결장암의 체내 결과*

[0477] 결장암 모델에서, 이중특이성 항체 ScFV-HC-IgG4, ScFV-HC-IgG1-LALA 및 Fab-ScFV-IgG4의 체내 종양 성장에 대한 작용을 테스트한다. 인간 PD-L1을 발현하는 MC-38 종양 세포(결장선암 세포)(MC38-hPD-L1)를 이중 인간화 CD40/PD-1 마우스(B-hPD-1/hCD40 마우스)에 피하 주사한다. 마우스의 종양 부피가 약 $400mm^3$에 이르게 되면, 마우스를 종양 부피에 따라 무작위로 상이한 그룹으로 나눈다(그룹당 7마리).

[0478] 각 그룹에서, B-hPD-1/hCD40 마우스에 식염수(NC; G1), 1mg/kg 항 PD1 단클론 항체 1A7-H2K3-IgG4(G2), 1mg/kg 항 CD40 단클론 항체 6A7-H4K2-IgG2(G3), 1.35mg/kg ScFV-HC-IgG4(G4), 1mg/kg Fab-ScFV-IgG4(G5) 또는 1mg/kg 항 PD1 단클론 항체 1A7-H2K3-IgG4와 1mg/kg 항 CD40 단클론 항체 6A7-H4K2-IgG2의 조합(Combo(PD-

1+CD40); G6)을 복강내 주사(i.p.)한다. 투약 빈도는 주 2회(총 5회 투약)이다. 자세한 정보는 이하 표에 나타난 바와 같다.

표 12

[0479]

그룹 별	항체	투여량(mg/kg)	경로	투약 빈도	투약 총 횟수
G1	PS(NC)	-	i.p.	BIW	5
G2	PD-1	1mg/kg	i.p.	BIW	5
G3	CD40	1mg/kg	i.p.	BIW	5
G4	ScFV-HC-IgG4	1.35mg/kg	i.p.	BIW	5
G5	Fab-ScFV-IgG4	1mg/kg	i.p.	BIW	5
G6	PD-1+CD40	1+1mg/kg	i.p.	BIW	5

[0480] 마우스의 체중에 따라 주사 부피를 계산한다. 종양의 장축과 단축의 길이를 측정하고, 0.5×(장축)×(단축)^{2}로 종양의 부피를 계산한다.

[0481] 위 그룹의 마우스가 그룹 나눈 후 25일째의 종양부피는 **도 13**에 나타난 바와 같다. 결과는, 이중특이성 항체 ScFV-HC-IgG4 및 Fab-ScFV-IgG4는 종양 성장을 억제한다는 것을 보여준다. 특히, ScFV-HC-IgG4(G4; 1.35mg/kg) 및 Fab-ScFV-IgG4(G5; 1mg/kg)는 2mg/kg 항 PD1 및 항 CD40 항체의 조합(G6)과 비교하면 유사한 TGI_{TV}%를 갖는다.

[0482] 다른 실험에서는, ScFv-HC-IgG1-LALA 및 항 PD-1 단클론 항체Keytruda®(펨브로리주맙)(VH SEQ ID NO: 207; VL SEQ ID NO: 208)를 또한 포함한다.

[0483] 각 그룹에서, B-hPD-1/hCD40 마우스에 식염수(NC; G1), 1mg/kg 항 PD1 단클론 항체 1A7-H2K3-IgG4(G2), 1mg/kg 항 CD40 단클론 항체 6A7-H4K2-IgG2(G3), 1.35mg/kg ScFV-HC-IgG4(G4), 1mg/kg ScFV-HC-IgG1-LALA(G5), 1mg/kg 항 PD1 단클론 항체 1A7-H2K3-IgG4와 1mg/kg 항 CD40 단클론 항체 6A7-H4K2-IgG2의 조합(Combo(PD-1+CD40); G6) 또는 1mg/kg 항 PD1 단클론 항체 펨브로리주맙과 1mg/kg 항 CD40 단클론 항체 6A7-H4K2-IgG2의 조합(Combo(펨브로리주맙+CD40); G7)을 복강내 주사(i.p.)한다. 투약 빈도는 주 2회(총 5회 투약)이다. 자세한 정보는 이하 표에 나타난 바와 같다.

표 13

[0484]

그룹 별	항체	투여량(mg/kg)	경로	투약 빈도	투약 총 횟수
G1	PS	-	i.p.	BIW	6
G2	PD-1	1mg/kg	i.p.	BIW	6
G3	CD40	1mg/kg	i.p.	BIW	6
G4	ScFV-HC-IgG4	1.35mg/kg	i.p.	BIW	6
G5	ScFV-HC-IgG1-LALA	1.35mg/kg	i.p.	BIW	6
G6	PD-1+CD40	1+1mg/kg	i.p.	BIW	6
G7	펨브로리주맙+CD40	1+1mg/kg	i.p.	BIW	6

[0485] 전체 처리 기간 내내 마우스의 체중을 모니터링한다. 상이한 그룹에 있는 마우스의 평균 체중은 모두 상이한 정도로 증가되었다(**도 14** 및 **도 15**). 처리 기간 종료 시, 상이한 그룹의 마우스의 체중은 모두 증가하였다.

[0486] 항체로 처리된 그룹의 종양 부피는 **도 16**에 도시되어 있다. 18일째 및 25일째(그룹 나눈 후 18일째 및 25일째)의 TGI%도 계산하여 이하 표에 나타난 바와 같다. 대조군 중 대량의 마우스가 사망했기 때문에, 25일째의 P값은 사용할 수 없다. 이하 표의 P값은 18일째의 데이터에 근거하여 계산한 것이다.

표 14

[0487]

		종양 부피(mm^3)				18일째의 생존율	25일째의 생존율	18일째의 TGI_{TV}%	25일째의 TGI_{TV}%	18일째의 P값	
		0일째	11일째	18일째	25일째					체중	종양 부피
대조군	G1	411 ±3	1739 ±117	2679 ±214	3196	7/7	1/7	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

치료군	G2	411 ±6	926 ±118	1512 ±302	2073 ±360	7/7	6/7	51.5%	40.3%	0.810	0.008
	G3	411 ±4	1458 ±120	2692 ±194	n.a.	7/7	0/7	-0.5%	n.a.	0.928	0.967
	G4	411±4	566 ±99	651 ±152	930 ±334	7/7	7/7	89.4%	81.4%	0.077	5.40E-06
	G5	411±4	243 ±63	86 ±50	0	7/7	7/7	114.3%	113.4%	0.003	5.85E-08
	G6	411±4	854 ±79	1048 ±195	1561 ±383	7/7	7/7	71.9%	58.7%	0.102	1.11E-04
	G7	411±5	656 ±96	1084 ±270	1326 ±291	7/7	6/7	70.3%	67.2%	0.216	0.001

[0488] 결과는 ScFV-HC-IgG1-LALA(G5)는 종양 성장을 억제하며, 그 TGI%(예를 들어, 18일째)는 ScFV-HC-IgG4(G4)보다 높다는 것을 보여준다. 또한, 1A7-H2K3-IgG4 및 6A7-H4K2-IgG2의 조합(G6)은 펨브로리주맙 및 6A7-H4K2-IgG2의 조합(G7)에 비해 상당한 종양 억제 작용을 보여준다.

[0489] **실시예 8: 이중특이성 항체 독성 체내 테스트**

[0490] 결장암 모델에서, 이중특이성 항체 ScFV-HC-IgG4의 체내 독성을 테스트한다. 인간 PD-L1을 발현하는 MC-38 종양 세포(결장선암 세포)(MC38-hPD-L1)를 이중 인간화 CD40/PD-1 마우스(B-hPD-1/hCD40 마우스)에 피하 주사한다. 마우스의 종양 부피가 약 100mm^3-150mm^3에 이르게 되면, 마우스를 종양 부피에 따라 무작위로 상이한 그룹으로 나눈다(그룹당 3마리).

[0491] 각 그룹에서, B-hPD-1/hCD40 마우스에 인산염 식염수(PBS)(G1), 20mg/kg 셀리크렐루맙(중쇄 SEQ ID NO: 144; 경쇄 SEQ ID NO: 145)(G2), 20mg/kg 항 CD40 단클론 항체 6A7-H4K2-IgG2(G3), 20mg/kg 항 PD1 단클론 항체 1A7-H2K3-IgG4(G4), 26mg/kg ScFV-HC-IgG4(G5) 또는 20mg/kg 항 PD1 단클론 항체 1A7-H2K3-IgG4와 20mg/kg 항 CD40 단클론 항체 6A7-H4K2-IgG2의 조합(Combo; G6)을 복강내 주사(i.p.)한다. 투약 빈도는 주 3회(총 3회 투약)이다. 자세한 정보는 이하 표에 나타난 바와 같다.

표 15

[0492]

그룹 별	항체	투여량(mg/kg)	경로	투약 빈도	투약 총 횟수
G1	PBS(대조)	-	i.p.	0일째, 3일째, 6일째	3
G2	셀리크렐루맙	20mg/kg	i.p.	0일째, 3일째, 6일째	3
G3	CD40	20mg/kg	i.p.	0일째, 3일째, 6일째	3
G4	PD-1	20mg/kg	i.p.	0일째, 3일째, 6일째	3
G5	ScFV-HC-IgG4	26mg/kg	i.p.	0일째, 3일째, 6일째	3
G6	PD-1+CD40	20+20mg/kg	i.p.	0일째, 3일째, 6일째	3

[0493] *혈액 생화학 시험*

[0494] 그룹 나눈 후 7일째 및 13일째에 마우스의 혈액을 채취하여 알라닌아미노전달효소(ALT) 및 아스파라긴아미노전달효소(AST) 수준을 테스트한다. **도 17A 내지 도 17D**에 도시된 바와 같이, 셀리크렐루맙(G2)으로 처리된 마우스는 기타 그룹의 마우스에 비해 가장 높은 수준의 혈액 ALT 및 AST를 나타냈다. 또한, ScFV-HC-IgG4(G5)로 처리된 마우스는 단클론 항체(G3 및 G4) 또는 이들의 조합(G6)으로 처리된 마우스에 비해 유사한 ALT 및 AST 수준을 나타냈다.

[0495] *간의 조직병리학적 검사*

[0496] 그룹 나눈 후 13일째 마우스의 간을 분리하여 현미경으로 검사한다. G1 그룹 및 G5 그룹의 마우스 간은 현저한 이상적인 변화가 없었다. G2 그룹의 3마리 마우스 모두에서 만성염증, 예를 들어 섬유모세포 증식이 나타났으며, 손상 정도는 중등도이다. G3 그룹에서는 3마리 마우스의 간에서 모두 국소성 간질성 염증성 세포 침윤이 나타났으며, 손상 정도는 경도이다. G4 그룹에서는 1마리 마우스의 간에서 국소성 혈관주위성 염증성 세포 침윤이 나타났으며, 손상 정도는 경도이다. G7 그룹에서는 3마리 마우스의 간에서 모두 국소성 간질성 염증

성 세포 침윤이 나타났다. 그 중에, 1마리 마우스의 손상 정도는 경미하고, 다른 2마리 마우스의 손상 정도는 경도이다.

[0497] 간의 손상 정도에 대한 자세한 내용은 이하 표에 나타난 바와 같다. 손상 정도는 간간질/혈관주위성 세포 침윤 또는 만성 간염증(주로 섬유아세포 증식)에 의해 결정된다. 각 그룹 마우스의 간 및 신장의 대표적인 조직 절편 이미지는 **도 17E 내지 도 17J**에 도시된 바와 같다.

표 16

[0498]

손상 정도	G1	G2	G3	G4	G5	G6
NVL*	3	0	0	2	3	0
경미(+)	0	0	3	1	0	1
경도(+)	0	0	0	0	0	2
중등도(+)	0	3	0	0	0	0
중도(+)	0	0	0	0	0	0

[0499] *: 비가시적 손상

[0500] **실시예 9: PD1-C40-6A7-FV3A의 정제 및 리포터 세포 활성**

[0501] *PD1-C40-6A7-FV3A 제조*

[0502] **도 18A**에 도시된 바와 같이, BsAb PD1-C40-6A7-FV3A는 항 PD-1 단클론 항체의 각 중쇄의 CH3 도메인에 융합되는 항 CD40 scFv를 갖는다. 구체적으로, 항 CD40 scFv는 항 PD-1 단클론 항체의 중쇄 CH3 도메인의 위치 358 내지 362(EU 넘버링)에 융합된다. PD1-C40-6A7-FV3A의 융합 중쇄 서열은 SEQ ID NO: 161에 제시된 바와 같다. PD1-C40-6A7-FV3A의 경쇄 서열은 그 부모 항체 인 PD1-1A7-H2K3-IgG4의 경쇄와 동일하며, 해당 경쇄는 SEQ ID NO: 141에 제시된 바와 같다. 서열은 항 PD-1 항체 1A7 및 항 CD40 항체 6A7로부터 유래된다.

[0503] 도 **18B**에 도시된 바와 같이, 비환원 겔 전기영동(6% 분해 겔)으로 정제된 PD1-C40-6A7-FV3A를 검출한다. 겔어서 하나의 단일 띠(레인 4)가 검출된다면 PD1-C40-6A7-FV3A가 높은 순도로 발현되었음을 나타낸다. 또한, PD1-C40-6A7-FV3A의 농도가 84 μg/mL임이 측정되었다.

[0504] *hCD40에 대한 결합 친화력*

[0505] Biacore 시스템을 통해 인간 CD4(hCD40)에 대한 결합 친화력을 측정한다. PD1-C40-6A7-FV3A 및 그 부모 단클론 항체인 6A7-H4K2-IgG2에 대한 결과는 이하 표에 정리되어 있다.

표 17

[0506]

샘플	**분석**	**ka(1/Ms)**	**kd(1/s)**	**KD(M)**
PD1-C40-6A7-FV3A	hCD40	6.08E+05	2.55E-04	4.19E-10
C40(6A7-H4K2-IgG2)	hCD40	1.05E+05	3.22E-04	3.06E-09

[0507] 결과는 PD1-C40-6A7-FV3A가 부모 단클론 항체와의 상당한 결합 친화력을 가짐을 보여준다.

[0508] *Fc 수용체에 의해 매개되는 리포터 세포 활성화 측정*

[0509] PD1-C40-6A7-FV3A가 Fc 수용체(예를 들어, FCγRIIB)를 통해 리포터 세포를 활성화시킬 수 있는지 여부를 테스트하기 위해 실험을 수행한다. 실시예 5에 기재된 바와 같이 유사한 실험 단계를 수행한다.

[0510] **도 18C**에 도시된 바와 같이, CHO-K1-hFcγRIIB 세포가 존재할 경우, Fab-ScFV-IgG4 및 항 CD40 단클론 항체 6A7-H4K2-IgG2 모두가 리포터 세포를 활성화시킨다. 하지만, PD1-C40-6A7-FV3A는 FCγRIIB 수용체에 의해 매개된 리포터 세포의 활성화를 보여주지 않았다.

[0511] 결과는, 항 CD40 scFv가 항 PD-1 항체의 중쇄 CH3 도메인에 결합될 때, Fc 수용체(예를 들어, FCγRIIB)는 Fc 수용체(예를 들어, FCγRIIB)에 의해 매개된 군집화를 통해 CD40 통로를 활성화시킬 수 없다는 것을 보여준다. PD1-C40-6A7-FV3A가 Fc 수용체에 의해 매개된 리포터 세포 활성화를 나타내지 않기 때문에, PD1-C40-6A7-FV3A는 조직 중의 독성을 효과적으로 감소시킬 수 있으며, 특히 높은 수준의 FCγRIIB를 발현하는 조직, 예를

들어 간 조직에서의 독성을 효과적으로 감소시킬 수 있다.

[0512] *T세포/APC 세포 브리징 효과*

[0513] 이하 리포터 세포를 사용하여 실험을 수행하여, PD1-C40-6A7-FV3A가 T세포 및 APC 세포를 브리징할 수 있는지 여부를 테스트한다. 실시예 4에 기재된 바와 같이 유사한 실험 단계를 수행한다.

[0514] 도 **18D**에 도시된 바와 같이, CHO-K1-hPD1 세포가 존재하는 경우, Fab-ScFV-IgG4 및 PD1-C40-6A7-FV3A 모두가 리포터 세포를 트랜스활성화시킨다. 반면에, 단클론 항체의 조합은 리포터 세포를 활성화시키지 않는다.

[0515] 결과는 또한, PD1-C40-6A7-FV3A가 CD40 경로에 대한 활성화는 PD-1을 발현하는 세포와의 브리징 효과에 의해 결정된다는 것을 보여준다. PD-1을 발현하는 면역 세포는 종양 미세환경으로 모집될 것이고, PD-1 발현은 통상적으로 종양 미세환경에서 상향조절되기 때문에, 해당 메커니즘은 또한 면역 활성을 종양 미세환경에 제한시킬 수 있는 가능성이 크며, 또한 부작용, 예를 들어 간에서의 독성을 감소시킬 수 있다. 또한, 종양 배수 림프절은 항원제시세포 및 PD-1을 발현하는 T세포를 갖는다. 이중특이성 항체는 종양 배수 림프절에서의 면역 응답을 효과적으로 증가시킬 수 있다. 이와 동시에, 조절성 T세포(Treg)의 억제 활성을 억제함으로써 계통 내성을 억제할 수 있다.

[0516] *FcRn에 대한 결합 친화력*

[0517] Biacore® 시스템을 통해 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 결합 친화력을 측정한다. PD1-C40-6A7-FV3A 및 항 PD-1 단클론 항체인 1A7에 대한 결과는 이하 표에 정리되어 있다.

표 18

[0518]

포획 1 용액	**분석물 1 용액**	**KD(M)**
PD1-C40-6A7-FV3A	FcRn	1.68E-06
PD-1(1A7-H2K3-IgG4)	FcRn	2.21E-06

[0519] 결과는, FcRn에 대한 PD1-C40-6A7-FV3A의 결합 친화력이 항 PD-1 항체(1A7-H2K3-IgG4)의 결합 친화력과 비슷하다는 것을 보여주었으며, 이는 항 CD40 scFv가 항 PD-1 항체의 중쇄 CH3 도메인의 위치 358 내지 362(EU 넘버링) 영역에서의 융합은 FcRn 결합에 영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다.

[0520] **실시예 10: ScFV-HC-IgG1-LALA와 시판 중인 항 PD-1 단클론 항체 간의 약효 비교**

[0521] 현재 이미 약 10종의 항 PD-1 단클론 항체가 미국 식품의약국(FDA)과 중국 국가약품감독관리국(NMPA)의 승인을 받았다. 승인을 받은 항 PD-1 단클론 항체는 머크(Merck & Co.)에서 연구개발한 Keytruda®(펨브로리주맙); 브리스톨 마이어스 스퀴브(Bristol Myers Squibb, BMS)에서 연구개발한 Opdivo®(니볼루맙, VH SEQ ID NO: 209; VL SEQ ID NO: 210), 사노피(Sanofi S.A.) 및 리제네론 파마슈티컬스(Regeneron Pharmaceuticals, Inc.)에서 공동으로 연구개발한 Libtayo®(세미플리맙, VH SEQ ID NO: 185; VL SEQ ID NO: 186); 이노벤트 SEQ ID NO: 183; VL SEQ ID NO: 184); 베이진(BeiGene)에서 연구개발된 티스렐리주맙(BGB-A317, VH SEQ ID NO: 187; VL SEQ ID NO: 188) 및 준시(Junshi Biotech)에서 연구개발한 Toripalimab(VH SEQ ID NO: 181; VL SEQ ID NO: 182)을 포함한다. 또한, 여러 가지 항 PD-1 단클론 항체가 현재 임상 및 임상전 단계에 처 있다. 이 실험에서, 이중특이성 항체 ScFV-HC-IgG1-LALA의 체내 약효를 이러한 승인을 받은 항 PD-1 단클론 항체의 **약효**와 비교를 진행한다.

[0522] 실험은 다음과 같이 수행한다. 마우스 흑색종 모델에서, 5종의 항 PD-1 항체인 펨브로리주맙, 시미프리주맙, 신틸리맙, 티스렐리주맙, 토리팔리맙 및 이중특이성 항체인 ScFV-HC-IgG1-LALA의 체내 종양 성장에 대한 억제 작용을 테스트한다. 구체적으로, 인간 PD-L1을 발현하는 B16F10 세포(흑색종 세포)(B16F10-hPD-L1)를 이중 인간화 CD40/PD-1 마우스(B-hPD-1/hCD40 마우스)에 피하 주사한다. 마우스의 종양 부피가 약 100mm^3-150mm^3에 이르게 되면, 마우스를 종양 부피에 따라 무작위로 상이한 그룹으로 나눈다(그룹당 7마리). 대조군에서, B-hPD-1/hCD40 마우스에 PBS(G1)를 주사한다. 치료군(G2-G7)에서, B-hPD-1/hCD40 마우스에 3mg/kg의 펨브로리주맙(G2), 3mg/kg의 시미프리주맙(G3), 3mg/kg의 신틸리맙(G4), 3mg/kg 티스렐리주맙(G5), 3mg/kg 토리팔리맙(G6) 또는 4mg/kg 이중특이성 항체 ScFV-HC-IgG1-LALA(G7)를 복강내 주사(i.p.)한다. 투약 빈도는 주 2회(총 4회 투약)이

다. 종양 부피를 주 2회씩 측정하고, 마우스의 체중을 기록한다. 마우스의 종양부피가 3000mm^{3}에 이르면 안락사를 실행한다.

표 19

[0523]

그룹 별	항체	투여량(mg/kg)	경로	투약 빈도	투약 총 횟수
G1	PBS(대조)	-	i.p.	BIW	4
G2	펨브로리주맙-IgG4	3mg/kg	i.p.	BIW	4
G3	시미프리주맙-IgG4	3mg/kg	i.p.	BIW	4
G4	신틸리맙-IgG4	3mg/kg	i.p.	BIW	4
G5	티스렐리주맙-IgG4	3mg/kg	i.p.	BIW	4
G6	토리팔리맙-IgG4	3mg/kg	i.p.	BIW	4
G7	ScFV-HC-IgG1-LALA	4mg/kg	i.p.	BIW	4

[0524] 실험 결과는 위의 투약량 및 빈도 하, 치료군 마우스의 모든 항 PD-1 단클론 항체 및 ScFV-HC-IgG1-LALA에 대한 내성은 양호하다는 것을 보여준다. **도 27**에 도시된 바와 같이, 전반적인 실험기간 동안, 마우스의 평균 체중은 유의한 차이를 보이지 않았다. 하지만, 종양 부피(**도 28**)에 대하여, 이중특이성 항체 ScFV-HC-IgG1-LALA(G7)가 가장 훌륭한 약효를 보여준다(TGI_{TV}%).

표 20

[0525]

		종양 부피(mm^3)				14일째의 생존율	18일째의 생존율	14일째의 TGI_{TV}%	18일째의 TGI_{TV}%	18일째 종양 없음	18일째의 P값	
		0일째	11일째	14일째	18일째						체중	종양 부피
대조군	G1	132 ±5	2087 ±203	3159 ±290	3480 ±363	7/7	3/7	n.a.	n.a.	0	n.a.	n.a.
치료군	G2	132 ±5	784 ±251	1543 ±514	2179 ±545	7/7	6/7	53.4%	38.9%	1	0.699	0.162
	G3	132 ±6	592 ±175	859 ±285	1606 ±615	7/7	7/7	76.0%	56.0%	0	0.398	0.097
	G4	132 ±6	381 ±99	590 ±154	1084 ±410	7/7	7/7	84.9%	66.1%	1	0.072	0.012
	G5	132 ±6	520 ±138	653 ±196	884 ±245	7/7	7/7	82.8%	77.6%	0	0.059	3.85E-04
	G6	132 ±8	694 ±391	1253 ±818	734 ±308	7/7	6/7	63.0%	82.0%	1	0.041	0.001
	G7	132 ±9	202 ±65	176 ±67	198 ±83	7/7	7/7	98.6%	98.0%	2	0.001	1.20E-06

[0526] **실시예 11: ScFV-HC-IgG1-LALA의 체내 약효 및 독성**

[0527] 여러 가지 종양 모델에서, 이중특이성 항체 ScFV-HC-IgG1-LALA의 체내 독성 및 약효를 테스트한다. 예를 들어, B16F10-hPD-L1 세포를 이중 인간화 CD40/PD-1 마우스(B-hPD-1/hCD40 마우스)에 피하 주사한다. 마우스의 종양 부피가 100mm^3-150mm^{3}에 이르게 되면, 마우스를 종양 부피에 따라 무작위로 상이한 그룹으로 나눈다(그룹당 7마리).

[0528] 대조군 G1에서, B-hPD-1/hCD40 마우스에 식염수(PS)를 주사한다. 치료군 G2-G7에서, B-hPD-1/hCD40 마우스에 각각 0.1mg/kg-30mg/kg(즉, 0.1mg/kg, 0.3mg/kg, 1mg/kg, 3mg/kg, 10mg/kg 또는 30mg/kg)의 이중특이성 항체 ScFV-HC-IgG1-LALA를 복강내 주사(i.p.)한다. 투약 빈도는 주 2회(총 4회 투약)이다. 종양 부피를 주 2회씩 측정하고, 마우스의 체중을 기록한다. 마우스의 종양부피가 3000mm^{3}에 이르면 안락사를 실행한다. 그룹 나눈 후 70일째 실험을 종료한다.

[0529] 앞의 결과와 유사하게, 실험 결과는 위에 기재된 투여량 수준 및 투약 빈도 하에서, 치료군 마우스가 상이한 투여량의 ScFV-HC-IgG1-LALA에 대해 매우 우수한 내성을 가지며, 전반적인 실험기간 동안 마우스 체중의 평균값은

유의한 차이를 보이지 않았다는 것으로 보여준다. 그러나, 종양 부피(**도 29A**) 및 마우스 생존율(**도 29B**)에 대하여, TGI_{TV}%는 증가 추세를 나타내었으며, 즉 마우스의 생존율은 투여량 수준이 증가함에 따라 유의하게 향상되었다. 구체적으로, 그룹 나눈 후 21일째, 생존하는 마우스의 수는 다음과 같다: G1 그룹(PBS) 3마리; G2 그룹(0.1mg/kg) 2마리; G3 그룹(0.3mg/kg) 5마리, 관찰 가능한 치료 효과(TGI_{TV}%=29.7%) 보임; G4 그룹(1mg/kg) 6마리, 유의한 치료 효과(TGI_{TV}%=62.6%) 보임; G5 그룹(3mg/kg) 7마리, 2마리 종양이 없는 마우스 포함하여 유의한 치료 효과(TGI_{TV}%=78.3%) 보임; G6 그룹(10mg/kg) 7마리, 5마리 종양이 없는 마우스를 포함하여 유의한 치료 효과(TGI_{TV}%=99.4%) 보임; 및 G7 그룹(30mg/kg) 7마리, 4마리 종양이 없는 마우스를 포함하여 유의한 치료 효과(TGI_{TV}%=87.3%) 보임. 21일째 나머지 마우스(비생존 마우스)는 종양 부피가 3000 mm^3를 초과하기 때문에 안락사시켰다. 대조군의 모든 마우스는 그룹 나눈 후 21일째에 안락사 표준에 부합하게 되고, 18일째 및 21일째에 종양 부피 및 TGI_{TV}%, 및 실험기간 종료(70일째) 시점에서의 생존 상태는 다음과 같이 정리되어 있다.

표 21

[0530]

		종양 부피(mm^3)			21일째의 생존율	70일째의 생존율	최후 생존 시간(일)	18일째의 TGI_{TV}%	21일째의 TGI_{TV}%	21일째 종양 없음	21일째의 P값	
		0일째	18일째	21일째							체중	종양 부피
대조군	G1	124 ±4	2853 ±130	3215 ±97	3/7	0/7	21	n.a.	n.a.	0	n.a.	n.a.
치료군	G2	124 ±4	3605 ±311	3622 ±335	2/7	0/7	21	-27%	-13%	0	0.953	0.241
	G3	124 ±5	2094 ±443	2298 ±424	5/7	0/7	28	27.8%	29.7%	0	0.272	0.159
	G4	124 ±5	1337 ±634	1281 ±412	6/7	0/7	39	55.6%	62.6%	0	0.130	0.015
	G5	124 ±5	698 ±328	796 ±376	7/7	2/7	70	79.0%	78.3%	2	0.005	0.004
	G6	124 ±5	117 ±87	143 ±117	7/7	4/7	70	100.2%	99.4%	5	0.082	2.45E-07
	G7	124 ±7	404 ±292	517 ±361	7/7	4/7	70	89.7%	87.3%	4	0.019	1.20E-06

[0531] 실험기간 종료 시점에, 종양 부피가 지나치게 큰 것으로 인해, G1-G4 그룹의 모든 마우스에 대해 안락사를 실행하였고; G5-G7 그룹 중 생존하는 마우스의 수는 각각 2, 4 및 4마리이다. 이는 마우스에서 이중특이성 항체 ScFV-HC-IgG1-LALA의 약효가 투여량과 연관있다고 보여준다. 또한, G6 그룹(10mg/kg)과 G7 그룹(30mg/kg)에서 ScFV-HC-IgG1-LALA의 치료 효과는 유사한 것으로, 이는 10mg/kg이 ScFV-HC-IgG1-LALA의 체내 포화 투여량 수준임을 보여준다.

[0532] **실시예 12: 종양 침윤 림프 세포(TIL) 분석**

[0533] TILs 분석은 다음과 같이 수행한다. MC38-hPD-L1 세포를 이중 인간화 CD40/PD-1 마우스(B-hPD-1/hCD40 마우스)에 피하 주사한다. 주사 후 11일째, 14일째 및 18일째에, 각각 PBS(G1), 3mg/kg 항 PD-1 단클론항체 1A7-H2K3-IgG4(G2), 3mg/kg 항 CD40 단클론 항체 6A7-H4K2-IgG2(G3), 4mg/kg 이중특이성 항체 ScFV-HC-IgG1-LALA(G4) 또는 3mg/kg 항 PD-1 단클론항체 1A7-H2K3-IgG4와 3mg/kg 항 CD40 단클론 항체 6A7-H4K2-IgG2(G5)의 조합을 복강내 주사(i.p.)한다. 주사 후 21일째 대조군 G1 및 치료군 G2-G5의 종양 조직에 대해 TILs 분석을 수행한다. 테스트 결과는 **도 30A 내지 도 30C**에 도시되어 있다.

[0534] 유사한 실험에서, B16F10-hPD-L1 세포를 이중 인간화 CD40/PD-1 마우스(B-hPD-1/hCD40 마우스)에 피하 주사한다. 주사 후 9일째 및 13일째에, 각각 PBS(G1), 3mg/kg 항 PD-1 단클론항체 1A7-H2K3-IgG4(G2), 3mg/kg 항 CD40 단클론 항체 6A7-H4K2-IgG2(G3), 4mg/kg 이중특이성 항체 ScFV-HC-IgG1-LALA(G4) 또는 3mg/kg 항 PD-1 단클론항체 1A7-H2K3-IgG4와 3mg/kg 항 CD40 단클론 항체 6A7-H4K2-IgG2(G5)의 조합을 복강내 주사(i.p.)한다. 주사 후 15일째 대조군 G1 및 치료군 G2-G5의 종양 조직에 대해 TILs 분석을 수행한다. 테스트 결과는 **도 30D 내지 도 30F**에 도시되어 있다.

[0535] **도 30A-III 및 도 30D-III**의 결과에 따르면, MC38 종양 모델 및 B16F10 종양 모델에서, 대조군(G1)에 비해 이중특이성 항체 ScFV-HC-IgG1-LALA 그룹(G4)이 T세포 중 CD8+ T세포와 Treg 세포의 비율(CTLS/Tregs)을 효과적으로 증가시켰다.

[0536] 또한, PD-1 발현 분석 결과(**도 30B 및 도 30E**)에 따르면, MC38 종양 모델 및 B16F10 종양 모델에서 이중특이성 항체 그룹(G4) 중 CD8+ T세포, Treg 세포, CD4+(비Treg) T세포 또는 NK 세포 중 PD-1 양성 세포의 비율은, 단클론 항체 그룹(G2 또는 G3) 및 대조군(G1)에 비해 유의하게 감소하였다. 특히 B16F10 종양 모델에서, CD8+ T세포 중 PD-1 양성 세포의 비율이 유의하게 감소하였다는 것($P<0.0001$, **도 30E 내지 도 30I** 참조)은, ScFV-HC-IgG1-LALA로 처리한 후, PD-1의 이들 세포 표면에서의 발현이 하향 조절되었다는 것을 보여준다.

[0537] 골수 유래 세포를 한층 더 분석한다. MC38 종양 모델에서, 백혈구(CD45+) 중 수지상 세포(DC) 및 골수 유래 억제 세포(MDSC)의 백분율은 감소 추세를 보였다(**도 30C-I 및 도 30C-II**). 반면에, B16F10 종양 모델에서, 백혈구 중 이와 같은 두 가지 세포 유형(CD45+)의 백분율은 상승 추세를 보였다(**도 30F-I 및 도 30F-II**). MC38 종양 모델(**도 30C-III 및 도 30C-IV**) 및 B16F10 종양 모델(**도 30F-III 및 도 30F-IV**)에서 DC 세포 활성화(CD80/CD86+DC 및 MHCII+DC)의 검출 결과를 종합하면, MC38 종양 모델에서 이중특이항체 그룹(G4)이 단일클론 항체 그룹(G2 또는 G3) 및 항체 조합 그룹(G5)에 비해 킬러 T세포의 증식/침윤을 촉진하는 작용, 및 골수 유래 억제 세포(골수 유래 억제 세포, MDSC) 비율을 감소시키는 작용이 더 훌륭하다는 것이며; B16F10 종양 모델에서, 이중특이항체 그룹(G4)이 단일클론 항체 그룹(G2 또는 G3) 및 항체 조합 그룹(G5)에 비해, 주로 DC 세포의 증식/침윤 및 활성화, 및 CD8+ T세포에서 PD-1의 비율에 대한 하향 조절을 촉진한다는 것을 발견하였다. MC38 종양 모델은 뜨거운 종양 특징을 갖는다. 결과는, 뜨거운 종양 모델에서, 이중특이성 항체는 CD8+ T세포의 증식 및 침윤을 촉진하고, 골수 유래 억제 세포의 수를 감소시킬 수 있다는 것을 보여준다. 차가운 종양 특징을 갖는 B16F10-PDL1 종양 모델에서, 이중특이성 항체는 DC 세포의 증식, 침윤 및 활성을 효과적으로 촉진하고, PD1의 CD8+ T세포에서의 발현을 하향 조절할 수 있다. 유세포 분석을 위한 전략은 **도 31A 내지 도 31B**에서 도시되어 있다.

[0538] **실시예 13: ScFV-HC-IgG 구조 중 상이한 PD-1 항체의 치환**

[0539] 두 가지 시판 중인 항 PD-1 단클론 항체인 토리팔리맙 및 펨브로리주맙을 선택하고, 이들의 서열에 근거하여, 이들의 가변 영역으로 ScFV-HC-IgG1-LALA 이중특이성 항체의 항 PD-1 가변 영역을 치환한다. 얻어진 항체를 각각 토리팔리맙-6A7-HC-IgG1-LALA(중쇄 서열은 SEQ ID NO: 162에 제시된 바와 같음, 경쇄 서열은 SEQ ID NO: 163에 제시된 바와 같음) 및 펨브로리주맙-6A7-HC-IgG1-LALA(중쇄 서열은 SEQ ID NO: 164에 제시된 바와 같음, 경쇄 서열은 SEQ ID NO: 165에 제시된 바와 같음)라고 명명한다.

[0540] 앞에서 수행한 체내 약효 실험과 유사하게, 결장암 마우스 모델에서, 이중특이성 항체 토리팔리맙-6A7-HC-IgG1-LALA 및 펨브로리주맙-6A7-HC-IgG1-LALA의 체내 종양 성장에 대한 작용을 테스트한다. 인간 PD-L1을 발현하는 MC-38 종양 세포(결장선암 세포)(MC38-hPD-L1)를 이중 인간화 CD40/PD-1 마우스(B-hPD-1/hCD40 마우스)에 피하 주사한다. 마우스의 종양 부피가 약 400mm^3에 이르게 되면, 마우스를 종양 부피에 따라 무작위로 상이한 그룹으로 나눈다(그룹당 6마리).

[0541] 각 그룹에서, B-hPD-1/hCD40 마우스에 인산염 완충 식염수(PBS, G1), 1mg/kg 항 CD40 단클론 항체 6A7-H4K2-IgG2(G2), 1mg/kg 항 PD1 단클론 항체 토리팔리맙(G3), 1mg/kg 항 PD1 단클론 항체 펨브로리주맙(G4), 1.35mg/kg(유사 몰량 기준) 토리팔리맙-6A7-HC-IgG1-LALA(G5), 1.35mg/kg 펨브로리주맙-6A7-HC-IgG1-LALA(G6), 1mg/kg 항 PD1 단클론 항체 토리팔리맙과 1mg/kg 항 CD40 단클론 항체 6A7-H4K2-IgG2의 조합(G7) 또는 1mg/kg 항 PD1 단클론 항체 토리팔리맙과 1mg/kg 항 CD40 단클론 항체 6A7-H4K2-IgG2의 조합(G8)을 복강내 주사(i.p.)한다. 투약 빈도는 주 2회(총 5회 투약)이다. 자세한 정보는 이하 표에 나타난 바와 같다.

표 22

[0542]

그룹 별	항체	투여량(mg/kg)	경로	투약 빈도	투약 총 횟수
G1	PBS	-	i.p.	BIW	5
G2	6A7-H4K2-IgG2	1mg/kg	i.p.	BIW	5
G3	토리팔리맙(IgG4)	1mg/kg	i.p.	BIW	5
G4	펨브로리주맙(IgG4)	1mg/kg	i.p.	BIW	5
G5	토리팔리맙-6A7-HC-IgG1-LALA	1.35mg/kg	i.p.	BIW	5
G6	펨브로리주맙-6A7-HC-IgG1-LALA	1.35mg/kg	i.p.	BIW	5
G7	토리팔리맙+6A7-H4K2-IgG2	1+1mg/kg	i.p.	BIW	5

G8	펨브로리주맙+6A7-H4K2-IgG2	1+1mg/kg	i.p.	BIW	5

[0543] 전체 처리 기간 내내 마우스의 체중을 모니터링한다. 상이한 그룹에 있는 마우스의 평균 체중은 모두 상이한 정도로 증가되었다(**도 32** 및 **도 33**). 처리 기간 종료 시, 상이한 그룹의 마우스의 체중은 모두 증가하였다.

[0544] 항체로 처리된 그룹의 종양 부피는 **도 34**에 도시되어 있다. 17일째 및 21일째(그룹 나눈 후 17일째 및 21일째)의 TGI_{TV}%도 계산하여 이하 표에 나타난 바와 같다. 대조군 중 대량의 마우스가 종양 부피가 표준크기를 초과한 것으로 인해 안락사 받았으므로, 21일째의 P값을 획득할 수 없다, 이하 표의 P값은 17일째의 데이터에 근거하여 계산한 것이다.

표 23

[0545]

		종양 부피(mm^3)				17일째의 생존율	21일째의 생존율	17일째의 TGI_{TV}%	21일째의 TGI_{TV}%	17일째의 P값	
		0일째	14일째	17일째	21일째					체중	종양 부피
대조군	G1	389 ±36	2443 ±81	3152 ±163	2628	6/6	1/6	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
치료군	G2	389 ±7	1662 ±156	2578 ±362	3006 ±354	6/6	4/6	20.8%	-16.9%	0.780	0.179
	G3	389 ±9	1225 ±300	1534 ±376	1728 ±113	6/6	5/6	58.6%	40.2%	0.396	0.003
	G4	389±7	926 ±154	1304 ±321	2409 ±386	6/6	6/6	66.9%	25.9%	0.723	4.46E-04
	G5	389±9	282 ±77	320 ±105	406 ±133	6/6	6/6	102.5%	99.3%	0.011	4.52E-08
	G6	389±8	788 ±334	1003 ±495	630 ±377	6/6	5/6	77.8%	89.2%	0.288	0.02
	G7	389 ±11	986 ±210	1160 ±309	1720 ±486	6/6	6/6	72.1%	40.6%	0.502	1.97E-04
	G8	389±8	1208 ±253	1778 ±414	2005 ±540	6/6	4/6	49.7%	27.8%	0.787	0.011

[0546] 결과는, 토리팔리맙-6A7-HC-IgG1-LALA(G5) 및 펨브로리주맙-6A7-HC-IgG1-LALA(G6) 모두가 종양 성장을 억제하며, 그 TGI_{TV}%(예: 21일째)는 단클론 항체(G2, G3 및 G4) 및 항체 조합(G7 및 G8)보다 높다는 것을 보여준다. 특히, G5 그룹의 마우스는 모두 생존했고, 그 중 한 마리는 종양이 완전히 사라졌다. 결과는, 보다 나은 약효를 획득하기 위해 상이한 항 PD-1 항원 결합 프래그먼트를 ScFV-HC-IgG 구조의 항 CD40 scFv와 함께 사용할 수 있다는 것을 보여준다.

[0547] **실시예 14: ScFV-HC-IgG 구조 중 상이한 CD40 scFv의 치환**

[0548] CD40은 면역계에서 항원제시세포(APC)의 표면에 존재하는 관건적인 면역 공동 자극 경로 수용체인 것으로, 선천적 및 적응적 면역계 메커니즘을 활성화함에 있어서 관건적인 역할을 한다. 현재 연구개발 중인 항 CD40 항체는 예를 들어, Apexigen에서 연구개발한 APX005M(VH SEQ ID NO: 191; VL SEQ ID NO: 192), 로슈(Roche)에서 연구개발한 RG7876(셀리크렐루맙), 벵엘라 바이오(Viela Bio)에서 연구개발한 VIB4920 및 앨리게이터 바이오사이언스(Alligator Biosciences)에서 연구개발한 ADC-1013을 포함한다. 이 실험에서, 항 CD40 단클론 항체 중 두 가지 항체, 즉, 셀리크렐루맙 및 APX005M을 선택하여 펨브로리주맙과 연합 사용하는 이중특이성 항체를 생성한다. 얻어진 항체는 **도 1B**에 도시된 바와 같이 ScFV-HC-IgG의 구조를 가지고, 이러한 항체를 각각 펨브로리주맙-Seli-FVHC-IgG4(중쇄 서열은 SEQ ID NO: 175에 제시된 바와 같음, 경쇄 서열은 SEQ ID NO: 176에 제시된 바와 같음) 및 펨브로리주맙-APX005M-FVHC-IgG4(중쇄 서열은 SEQ ID NO: 177에 제시된 바와 같음, 경쇄 서열은 SEQ ID NO: 178에 제시된 바와 같음)라고 명명한다. 또한, 1A7-셀리크렐루맙-FVHC-IgG4 중 PD-1 항원 결합 부위와 CD40 항원 결합 부위를 교환시켜, 셀리크렐루맙-1A7-FVHC-IgG4(중쇄 서열은 SEQ ID NO: 201에 제시된 바와 같음, 경쇄 서열은 SEQ ID NO: 202에 제시된 바와 같음)를 생성한다.

[0549] 결장암 마우스 모델에서, 이중특이성 항체 펨브로리주맙-Seli-FVHC-IgG4 및 펨브로리주맙-APX005M-FVHC-IgG4의 체내 종양 성장에 대한 작용을 테스트한다. 구체적으로, 인간 PD-L1을 발현하는 MC-38 종양 세포(결장선암

세포)(MC38-hPD-L1)를 이중 인간화 CD40/PD-1 마우스(B-hPD-1/hCD40 마우스)에 피하 주사한다. 마우스의 종양 부피가 약 400mm^{3}에 이르게 되면, 마우스를 종양 부피에 따라 무작위로 상이한 그룹으로 나눈다(그룹당 6마리).

[0550] 앞에서 수행한 체내 약효 실험과 유사하게, 결장암 마우스 모델에서, 이중특이성 항체 펨브로리주맙-Seli-FVHC-IgG4 및 펨브로리주맙-APX005M-FVHC-IgG4 및 셀리크렐루맙-1A7-FVHC-IgG4의 체내 종양 성장에 대한 작용을 테스트한다. 인간 PD-L1을 발현하는 MC-38 종양 세포(결장선암 세포)(MC38-hPD-L1)를 이중 인간화 CD40/PD-1 마우스(B-hPD-1/hCD40 마우스)에 피하 주사한다. 마우스의 종양 부피가 약 400mm^{3}에 이르게 되면, 마우스를 종양 부피에 따라 무작위로 상이한 그룹으로 나눈다(그룹당 6마리).

[0551] 각 그룹에서 B-hPD-1/hCD40 마우스에 식염수(PS, G1), 1mg/kg 항 PD1 단클론 항체 펨브로리주맙(G2), 1mg/kg 항 CD40 단클론 항체 APX005M(IgG1-S267E)(G3), 셀리크렐루맙-IgG2(G4), 1.35mg/kg 펨브로리주맙-Seli-FVHC-IgG4(G5), 1.35mg/kg 펨브로리주맙-APX005M-FVHC-IgG4(G6), 1.35mg/kg 셀리크렐루맙-1A7-FVHC-IgG4(G7), 1mg/kg 항 PD1 단클론 항체 펨브로리주맙과 1mg/kg 항 CD40 단클론 항체 APX005M의 조합(G8) 또는 1mg/kg 항 PD1 조합 단클론 항체 펨브로리주맙과 1mg/kg 항 CD40 단클론 항체 셀리크렐루맙의 조합(G8)을 복강내 주사(i.p.)한다. 투약 빈도는 주 2회(총 6회 투약)이다. 자세한 정보는 이하 표에 나타난 바와 같다.

표 24

[0552]

그룹 별	항체	투여량(mg/kg)	경로	투약 빈도	투약 총 횟수
G1	PS	-	i.p.	BIW	6
G2	펨브로리주맙-IgG4	1mg/kg	i.p.	BIW	6
G3	APX005M-IgG1-S267E	1mg/kg	i.p.	BIW	6
G4	셀리크렐루맙-IgG2	1mg/kg	i.p.	BIW	6
G5	펨브로리주맙-Seli-FVHC-IgG4	1.35mg/kg	i.p.	BIW	6
G6	펨브로리주맙-APX005M-FVHC-IgG4	1.35mg/kg	i.p.	BIW	6
G7	셀리크렐루맙-1A7-FVHC-IgG4	1.35mg/kg	i.p.	BIW	6
G8	펨브로리주맙-IgG4+APX005M-IgG1-S267E	1+1mg/kg	i.p.	BIW	6
G9	펨브로리주맙-IgG4+셀리크렐루맙-IgG2	1+1mg/kg	i.p.	BIW	6

[0553] 그룹 나눈 후 14일째 각 그룹의 평균 체중은 유의한 차이를 보이지 않았다(**도 44A** 및 **도 44B**). 상이한 그룹 중 마우스 체중은 모두 증가하였다. 각 그룹의 종양 부피는 **도 44C**에 도시되어 있다. 결과는 펨브로리주맙-APX005M-FVHC-IgG4(G6)이 단클론 항체 (G2) 및 (G3) 또는 연합 치료(G8)보다 더 나은 약효를 갖는다는 것을 보여준다.

[0554] **실시예 15: 상이한 구조의 이중특이성 항체의 체내 독성 테스트**

[0555] PD-1/CD40 이중특이성 항체의 다양한 구조적 형태를 구축하였다. 구체적으로, 셀리크렐루맙의 scFv와 항 PD-1 단클론항체 1A7의 서열을 사용하여, 구조가 다른 네 가지 이중특이성 항체를 생성하고 이들의 독성을 테스트한다. 획득된 항체는 다음과 같이 명명하였다: 1A7-셀리크렐루맙-FVKH-IgG4(구조는 **도 1A**에 도시된 바와 같이, 중쇄 서열은 SEQ ID NO: 166 또는 SEQ ID NO: 173에 제시된 바와 같음, 경쇄 서열은 SEQ ID NO: 167에 제시된 바와 같음); 1A7-셀리크렐루맙-FV3A-IgG4(구조는 **도 18A**에 도시된 바와 같이, 중쇄 서열은 SEQ ID NO 168에 제시된 바와 같음, 경쇄 서열은 SEQ ID NO: 169에 제시된 바와 같음), 이는 셀리크렐루맙의 상응 서열로 항 CD40 항체 6A7 서열을 대체하는 것을 포함; 1A7-셀리크렐루맙-DART-IgG4(구조는 **도 37**에 도시된 바와 같이, 중쇄 서열은 SEQ ID NO: 170에 제시된 바와 같음, 경쇄 서열은 SEQ ID NO:171에 제시된 바와 같음); 1A7-셀리크렐루맙-FVHC-IgG4(구조는 **도 1B**에 도시된 바와 같이, 중쇄 서열은 SEQ ID NO: 172에 제시된 바와 같음, 경쇄 서열은 SEQ ID NO: 174에 제시된 바와 같음).

[0556] 셀리크렐루맙의 독성이 상대적으로 크다는 것은 당업계에 알려져 있다. PD-1/CD40 이중특이성 항체의 다양한 구조적 형태를 마우스에서 테스트하였다. 이중 인간화 CD40/PD-1 마우스(약 7주령)를 체중에 따라 무작위로 8개 그룹으로 나눈다(각 그룹당 3마리). 항 CD40 단클론 항체 셀리크렐루맙(G2), 항 PD-1 단클론 항체 1A7-H2K3-IgG4(G3), 1A7-셀리크렐루맙 -FVHC-IgG4(G4), 1A7-셀리크렐루맙-FV3A-IgG4(G5), 1A7-셀리크렐루맙-DART-IgG4(G6), 1A7-셀리크렐루맙-FVKH-IgG4(G7) 및 이중특이성 항체 ScFV-HC-IgG1-LALA (G8) 중 하나를 무작위로 선택하여, 그룹 나눈 당일 및 그 후 3일마다 투약한다. 대조군(G1)의 경우 PBS를 주사한다.

표 25

[0557]

그룹 별	항체	투여량(mg/kg)	경로	투약 빈도	투약 총 횟수
G1	PBS(대조)	-	i.p.	0일째, 3일째, 6일째	3
G2	셀리크렐루맙	10mg/kg	i.p.	0일째, 3일째, 6일째	3
G3	1A7-H2K3-IgG4	10mg/kg	i.p.	0일째, 3일째, 6일째	3
G4	1A7-셀리크렐루맙-FVHC-IgG4	13mg/kg	i.p.	0일째, 3일째, 6일째	3
G5	1A7-셀리크렐루맙-FV3A-IgG4	13mg/kg	i.p.	0일째, 3일째, 6일째	3
G6	1A7-셀리크렐루맙-DART-IgG4	13mg/kg	i.p.	0일째, 3일째, 6일째	3
G7	1A7-셀리크렐루맙-FVKH-IgG4	10mg/kg	i.p.	0일째, 3일째, 6일째	3
G8	ScFV-HC-IgG1-LALA	13mg/kg	i.p.	0일째, 3일째, 6일째	3

[0558] **도 35 내지 도 36**에 도시된 바와 같이, 실험 결과는, 대조군 마우스에 비해 G2 그룹 마우스만 유의한 체중 감소를 보였고, 기타 치료군 마우스 체중의 유의한 차이를 보이지 않았다는 것을 보여준다.

[0559] 그룹 나눈 후 7일째에, 말초혈액을 채취하여 아스파라긴아미노전달효소(AST)와 알라닌아미노전달효소(ALT)의 농도를 검출한다. **도 38A 내지 도 38B**에 도시된 바와 같이, ALT 및 AST 검출 결과는 G2 그룹 마우스(항 CD40 단클론항체 셀리크렐루맙 투약)의 ALT 및 AST 트랜스아미나제의 농도가 가장 높다는 것을 보여준다. 이중특이성 항체 그룹(G4-G8)의 트랜스아미나제 농도는 G2 그룹의 트랜스아미나제 농도보다 낮다. 구체적으로, G4 및 G6 그룹 마우스만 트랜스아미나제 농도가 증가하는 추세를 보였다. 기타 그룹의 마우스의 트랜스아미나제 농도는 G1 그룹 마우스와 유사하다.

[0560] 그룹 나눈 후 10일째 마우스의 간을 분리하여 현미경으로 검사한다. 결과는 이하 표에 나타난 바와 같이, 이중특이성 항체 ScFV-HC-IgG1-LALA(G8)가 단클론 항체(G2-G3) 및 기타 이중특이성 항체(G4-G7)에 비해 독성이 낮다는 것을 보여준다. 사실상, 이중특이성 항체 ScFV-HC-IgG1-LALA는 어떠한 독성 효과도 보여주지 않았다.

[0561] 결과는, 다양한 형태를 갖는 PD-1/CD40 이중특이성 항체가 항 CD40 항체의 독성을 유의하게 감소시킬 수 있다는 것을 보여준다.

표 26

[0562]

그룹 별	마우스 ID	결과
G1	110643	NVL*
	110660	NVL
	110656	NVL
G2	110650	만성염증(+++)
	110658	만성염증(++)
	110645	만성염증(+++)
G3	110661	NVL
	110641	염증성 세포 침윤(+)
	110663	NVL
G4	110651	만성염증(++)
	110647	만성염증(++)
	110657	염증성 세포 침윤(+)
G5	110659	염증성 세포 침윤(+)
	110642	NVL
	110653	염증성 세포 침윤(+)
G6	110649	만성염증(++)
	110644	염증성 세포 침윤(+)
	110648	만성염증(++)
G7	110654	염증성 세포 침윤(+)
	110662	NVL
	110652	염증성 세포 침윤(+)
G8	110655	NVL
	110664	NVL
	110646	NVL

[0563] *: 비가시적 손상

[0564] **실시예 16: BsAb 항결장암의 체내 결과**

[0565] 앞에서 수행한 체내 약효 실험과 유사하게, 결장암 마우스 모델에서, 위에 기재된 항체의 체내 종양 성장에 대한 작용을 테스트한다. 인간 PD-L1을 발현하는 MC-38 종양 세포(결장선암 세포)(MC38-hPD-L1)를 이중 인간화 CD40/PD-1 마우스(B-hPD-1/hCD40 마우스)에 피하 주사한다. 마우스의 종양 부피가 약 400mm^3에 이르게 되면, 마우스를 종양 부피에 따라 무작위로 상이한 그룹으로 나눈다(그룹당 8마리).

[0566] 각 그룹에서, B-hPD-1/hCD40 마우스에 인산염 완충 식염수(PBS, G1), 1mg/kg 항 CD40 단클론 항체 셀리크렐루맙(셀리크렐루맙-IgG2, G2), 1mg/kg 항 PD-1 단클론 항체 1A7-H2K3-IgG4(G3), 1mg/kg 셀리크렐루맙과 1mg/kg 1A7-H2K3-IgG4의 조합(G4), 1.35mg/kg 1A7-셀리크렐루맙-FV3A-IgG4(G5) 또는 1.35mg/kg 1A7-셀리크렐루맙-FVHC-IgG4(G6)를 복강 내 주사(i.p.)한다. 투약 빈도는 주 2회(총 6회 투약)이다. 자세한 정보는 이하 표에 나타난 바와 같다.

표 27

[0567]

그룹 별	항체	투여량(mg/kg)	경로	투약 빈도	투약 총 횟수
G1	PBS	-	i.p.	BIW	6
G2	셀리크렐루맙	1mg/kg	i.p.	BIW	6
G3	1A7-H2K3-IgG4	1mg/kg	i.p.	BIW	6
G4	셀리크렐루맙+1A7-H2K3-IgG4	1+1mg/kg	i.p.	BIW	6
G5	1A7-셀리크렐루맙-FV3A-IgG4	1.35mg/kg	i.p.	BIW	6
G6	1A7-셀리크렐루맙-FVHC-IgG4	1.35mg/kg	i.p.	BIW	6

[0568] 전체 처리 기간 내내 마우스의 체중을 모니터링한다. 상이한 그룹에 있는 마우스의 평균 체중은 모두 상이한 정도로 증가되었다(**도 39** 및 **도 40**). 처리 기간 종료 시, 상이한 그룹의 마우스의 체중은 모두 증가하였다.

[0569] 항체로 처리된 그룹의 종양 부피는 **도 41**에 도시되어 있다. 17일째(그룹 나눈 후 17일째)의 TGI_{TV}%를 계산하여 이하 표에 나타난 바와 같다. 이하 표의 P값은 17일째의 데이터에 근거하여 계산한 것이다.

표 28

[0570]

		종양 부피(mm^3)			17일째의 생존율	17일째의 TGI_{TV}%	17일째의 P값	
		0일째	14일째	17일째			체중	종양 부피
대조군	G1	402 ±14	2464 ±444	2849 ±183	5/6	n.a.	n.a.	n.a.
치료군	G2	402 ±14	1647 ±495	1907 ±701	6/6	38.5%	0.573	0.018
	G3	402 ±18	845 ±545	1051 ±689	6/6	73.5%	0.007	3.25E-04
	G4	402±19	822 ±578	939 ±826	6/6	78.1%	0.106	0.001
	G5	402±25	485 ±396	519 ±438	6/6	95.2%	0.088	1.56E-06
	G6	402±18	394 ±363	288 ±320	6/6	104.7%	0.002	7.22E-08

[0571] 결과는, 1A7-셀리크렐루맙-FV3A-IgG4(G5) 및 1A7-셀리크렐루맙-FVHC-IgG4(G6) 모두가 종양 성장을 억제하며, 그 TGI_{TV}%(예를 들어, 17일 째)는 단클론 항체(G2 및 G3) 및 항체 조합(G4)보다 높다는 것을 보여준다. 결과는, 상이한 구조 형태의 PD-1/CD40 이중특이성 항체는 우수한 치료 효과로 종양 성장을 유의하게 억제할 수 있다는 것을 보여준다.

[0572] **실시예 17: 이중특이성 항체의 T세포/APC 세포 브리징 효과**

[0573] PD1/CD40 BsAb에 의해 유도된 CD40 활성화가 PD-1 발현 세포의 존재에 의존하는지 여부를 테스트하기 위해 실험

을 수행한다. 다음과 같이 두 가지 PD-1/CD40 이중특이성 항체를 생성한다.

[0574] 펨브로리주맙-APX005M-FVHC-IgG4: APX005M의 scFv 서열을 항 PD-1 단일클론 항체 펨브로리주맙의 중쇄 C말단에 연결시켜, 이중특이성 항체 펨브로리주맙-APX005M-FVHC-IgG4를 얻는다.

[0575] SdAb-6A7-FVHC-IgG1-LALA: SdAb는 항 PD-1 나노항체(또는 낙타류 단일 도메인 항체)(단일 가변 도메인(VHH) 서열은 정보를 보여주는 SEQ ID NO: 204에 제시된 바와 같음)이다. 항 CD40 단클론 항체 6A7-H4K2-IgG2의 scFv 서열을 SdAb의 C말단에 연결시켜, 이중특이성 항체 SdAb-6A7-FVHC-IgG1-LALA를 얻는다.

[0576] 이펙터 세포 Jurkat-Luc-hCD40 및 기저 세포 Jurkat-hPD1을 96웰 플레이트(세포 밀도: 5×10^4개 세포/웰)에 접종하고 37℃에서 인큐베이션한다. BsAb 펨브로리주맙-6A7-HC-IgG1-LALA, 펨브로리주맙-Seli-FVHC-IgG4, SdAb-6A7-FVHC-IgG1-LALA, 1A7-셀리크렐루맙-FV3A-IgG4, 1A7-셀리크렐루맙-FVHC-IgG4, 1A7-셀리크렐루맙-FVKH-IgG4, 1A7-셀리크렐루맙-DART-IgG4, 펨브로리주맙-APX005M-FVHC-IgG4; 및 항 CD40 항체 APX005M(IgG1-S267E), 셀리크렐루맙-IgG2 및 6A7-H4K2-IgG2를 연속 희석(3배)하여, 최대 농도가 3μg/mL로 한다. 각 웰에 25μL의 항체를 첨가하고, 37℃ 인큐베이터에서 6시간 동안 인큐베이션한다. 인큐베이션 완료 후, 플레이트를 꺼내 Bio-lite 루시페라아제 검출시약(Novazyme Biotechnology Co., Ltd., 카탈로그 번호: DD1201-02-AB) 75μL를 첨가하고, 실온에서 5-10분 동안 인큐베이션한다. 그 다음, 플레이트를 발광 검출기에 넣어 형광 신호를 검출한다. 대조 실험은 유사한 단계로 수행하되, 기저 세포 Jurkat-luc-hPD1은 존재하지 않는다.

[0577] **도 42A 내지 도 42B**에 도시된 바와 같이, 기저 세포 Jurkat-luc-hPD1이 존재하는 경우, BsAb(즉, 펨브로리주맙-6A7-HC-IgG1-LALA, 펨브로리주맙-Seli-FVHC-IgG4, SdAb-6A7-FVHC-IgG1- LALA, 1A7-셀리크렐루맙-FV3A-IgG4, 1A7-셀리크렐루맙-FVHC-IgG4, 1A7-셀리크렐루맙-FVKH-IgG4, 1A7-셀리크렐루맙-DART-IgG4 및 펨브로리주맙-APX005M-FVHC-IgG4)만 리포터 세포를 트랜스활성화시킨다. 반면에, 셀리크렐루맙-IgG2 이외에, 단클론 항 CD40 항체는 리포터 세포를 활성화시키지 않는다. **도 42C 내지 도 42D**에 도시된 바와 같이, 기저 세포 Jurkat-luc-hPD1이 존재하지 않는 경우, BsAb 및 단클론 항체(셀리크렐루맙-IgG2 제외)는 모두 리포터 세포를 활성화시키지 않는다.

[0578] 결과는, 본원에 기재된 이중특이성 항체의 CD40 통로에 대한 활성화는 CD40의 군집화에 의해 결정되는 것으로, 이는 PD-1 발현 세포에 있는 PD-1과의 가교에 의해 달성될 수 있다는 것을 보여준다. 셀리크렐루맙-IgG2의 경우, 해당 항 CD40 항체는 가교 활성 없는 경우(예: FCγRIIB와 가교하지 않음)에 CD40을 활성화시킬 수 있다.

[0579] **실시예 18: 여러 가지 항 PD-1항체와 항 CD40 항체의 가변 도메인의 치환**

[0580] 다양한 항 PD-1 항체에서의 VH 및 VL 또는 대안적으로 VHH가, ScFV-HC-IgG1 이중특이성 항체에서의 항 PD-1 가변 영역을 대체하기 위해 사용될 수 있는지 여부를 테스트하기 위해 실험을 한층 더 수행한다. 또한, 다양한 항 CD40 단클론 항체의 VH 및 VL도 테스트한다. 이러한 항체와 그 서열은 다음과 같이 나열되어 있다.

표 29

[0581]

구조	항 PD-1		항 CD40	
	VH SEQ ID NO:	VL SEQ ID NO:	VH SEQ ID NO:	VL SEQ ID NO:
ScFV-HC-IgG1	179	180	191	192
ScFV-HC-IgG1	181	182	191	192
ScFV-HC-IgG1	183	184	191	192
ScFV-HC-IgG1	185	186	191	192
ScFV-HC-IgG1	187	188	191	192
ScFV-HC-IgG1	189	190	191	192
ScFV-HC-IgG1	207	208	191	192
ScFV-HC-IgG1	209	210	191	192
ScFV-HC-IgG1	207	208	191	192
ScFV-HC-IgG1	209	210	191	192
ScFV-HC-IgG1	179	180	193	194
ScFV-HC-IgG1	181	182	193	194
ScFV-HC-IgG1	183	184	193	194
ScFV-HC-IgG1	185	186	193	194
ScFV-HC-IgG1	187	188	193	194
ScFV-HC-IgG1	189	190	193	194

ScFV-HC-IgG1	207	208	193	194
ScFV-HC-IgG1	209	210	193	194
ScFV-HC-IgG1	207	208	193	194
ScFV-HC-IgG1	209	210	193	194
ScFV-HC-IgG1	179	180	195	196
ScFV-HC-IgG1	181	182	195	196
ScFV-HC-IgG1	183	184	195	196
ScFV-HC-IgG1	185	186	195	196
ScFV-HC-IgG1	187	188	195	196
ScFV-HC-IgG1	189	190	195	196
ScFV-HC-IgG1	207	208	195	196
ScFV-HC-IgG1	209	210	195	196
ScFV-HC-IgG1	207	208	195	196
ScFV-HC-IgG1	209	210	195	196
ScFV-HC-IgG1	179	180	197	198
ScFV-HC-IgG1	181	182	197	198
ScFV-HC-IgG1	183	184	197	198
ScFV-HC-IgG1	185	186	197	198
ScFV-HC-IgG1	187	188	197	198
ScFV-HC-IgG1	189	190	197	198
ScFV-HC-IgG1	207	208	197	198
ScFV-HC-IgG1	209	210	197	198
ScFV-HC-IgG1	207	208	197	198
ScFV-HC-IgG1	209	210	197	198
ScFV-HC-IgG1	179	180	199	200
ScFV-HC-IgG1	181	182	199	200
ScFV-HC-IgG1	183	184	199	200
ScFV-HC-IgG1	185	186	199	200
ScFV-HC-IgG1	187	188	199	200
ScFV-HC-IgG1	189	190	199	200
ScFV-HC-IgG1	207	208	199	200
ScFV-HC-IgG1	209	210	199	200
ScFV-HC-IgG1	204(VHH)	n.a.	191	192
ScFV-HC-IgG1	204(VHH)	n.a.	193	194
ScFV-HC-IgG1	204(VHH)	n.a.	195	196
ScFV-HC-IgG1	204(VHH)	n.a.	197	198
ScFV-HC-IgG1	204(VHH)	n.a.	199	200

[0582] 앞에서 수행한 체내 약효 실험과 유사하게, 마우스 모델에서, 이러한 이중특이성 항체의 체내 종양 성장에 대한 작용을 테스트한다. 인간 PD-L1을 발현하는 암세포(예를 들어, MC38-hPD-L1)를 이중 인간화 CD40/PD-1 마우스(B-hPD-1/hCD40 마우스)에 피하 주사한다. 마우스의 종양 부피가 약 300mm^3-500mm^{3}에 이르게 되면, 마우스를 종양 부피에 따라 무작위로 상이한 그룹으로 나눈다(그룹당 6마리).

[0583] 각 그룹에서, B-hPD-1/hCD40 마우스에 인산염 완충 식염수(PBS, G1), 1mg/kg 항 CD40 단클론 항체(G2), 1mg/kg 항 PD1 단클론 항체(G3), 1.35mg/kg ScFV-HC-IgG1-LALA(G4)와 1mg/kg 항 PD1 단클론 항체와 1mg/kg 항 CD40 단클론 항체의 조합(G5)을 복강내 주사(i.p.)한다. 투약 빈도는 주 2회이며, 투약 횟수는 적당하게 투약(예를 들어, 총 5회 투약)한다. 전체 처리 기간 내내 각 마우스의 체중 및 종양 부피를 모니터링한다. ScFV-HC-IgG1-LALA 형식(예를 들어: 도 1B)을 갖는 항 PD1/CD40 이중특이성 항체는 암 치료 방면에서 우수한 **약효**와 낮은 수준의 독성을 가질 것으로 예상된다.

[0584] 또한, 이러한 FV3A 형식(예를 들어: 도 18A)의 항체의 **약효**를 테스트하기 위해 실험을 수행한다. 그 구조 하에서, 항 CD40 항원 결합 부위는 항 PD-1 항체의 3A 부위에 삽입된다.

표 30

[0585]

구조	항 PD-1		항 CD40	
	VH SEQ ID NO:	VL SEQ ID NO:	VH SEQ ID NO:	VL SEQ ID NO:
PD1-C40-FV3A	179	180	191	192
PD1-C40-FV3A	181	182	191	192
PD1-C40-FV3A	183	184	191	192
PD1-C40-FV3A	185	186	191	192
PD1-C40-FV3A	187	188	191	192
PD1-C40-FV3A	189	190	191	192
PD1-C40-FV3A	207	208	191	192
PD1-C40-FV3A	209	210	191	192
PD1-C40-FV3A	179	180	193	194
PD1-C40-FV3A	181	182	193	194
PD1-C40-FV3A	183	184	193	194
PD1-C40-FV3A	185	186	193	194
PD1-C40-FV3A	187	188	193	194
PD1-C40-FV3A	189	190	193	194
PD1-C40-FV3A	207	208	193	194
PD1-C40-FV3A	209	210	193	194
PD1-C40-FV3A	179	180	195	196
PD1-C40-FV3A	181	182	195	196
PD1-C40-FV3A	183	184	195	196
PD1-C40-FV3A	185	186	195	196
PD1-C40-FV3A	187	188	195	196
PD1-C40-FV3A	189	190	195	196
PD1-C40-FV3A	207	208	195	196
PD1-C40-FV3A	209	210	195	196
PD1-C40-FV3A	179	180	197	198
PD1-C40-FV3A	181	182	197	198
PD1-C40-FV3A	183	184	197	198
PD1-C40-FV3A	185	186	197	198
PD1-C40-FV3A	187	188	197	198
PD1-C40-FV3A	189	190	197	198
PD1-C40-FV3A	207	208	197	198
PD1-C40-FV3A	209	210	197	198
PD1-C40-FV3A	179	180	199	200
PD1-C40-FV3A	181	182	199	200
PD1-C40-FV3A	183	184	199	200
PD1-C40-FV3A	185	186	199	200
PD1-C40-FV3A	187	188	199	200
PD1-C40-FV3A	189	190	199	200
PD1-C40-FV3A	207	208	199	200
PD1-C40-FV3A	209	210	199	200
PD1-C40-FV3A	204(VHH)	n.a.	191	192
PD1-C40-FV3A	204(VHH)	n.a.	193	194
PD1-C40-FV3A	204(VHH)	n.a.	195	196
PD1-C40-FV3A	204(VHH)	n.a.	197	198
PD1-C40-FV3A	204(VHH)	n.a.	199	200

[0586] 마우스 모델에서, 이러한 이중특이성 항체의 체내 종양 성장에 대한 작용을 테스트한다. 인간 PD-L1을 발현하는 암세포(예를 들어, MC38-hPD-L1)를 이중 인간화 CD40/PD-1 마우스(B-hPD-1/hCD40 마우스)에 피하 주사한다. 마우스의 종양 부피가 약 300mm^3-500mm^{3}에 이르게 되면, 마우스를 종양 부피에 따라 무작위로 상이한 그룹으로 나눈다(그룹당 6마리).

[0587] 각 그룹에서, B-hPD-1/hCD40 마우스에 인산염 완충 식염수(PBS, G1), 1mg/kg 항 CD40 단클론 항체(G2), 1mg/kg

항 PD1 단클론 항체(G3), 1.35mg/kg PD1-C40-FV3A(G4)와 1mg/kg 항 PD1 단클론 항체와 1mg/kg 항 CD40 단클론 항체의 조합(G5)을 복강내 주사(i.p.)한다. 투약 빈도는 주 2회이며, 투약 횟수는 적당하게 투약(예를 들어, 총 5회 투약)한다. 전체 처리 기간 내내 체중 및 종양 부피를 모니터링한다. PD1-C40-FV3A 형식(예를 들어: 도 18A)을 갖는 항 PD1/CD40 이중특이성 항체는 암 치료 방면에서 우수한 **약효**와 낮은 수준의 독성을 가질 것으로 예상된다.

[0588] 또한, 이러한 Fab-ScFV-IgG4 형식(예를 들어: 도 1A)의 항체의 **약효**를 테스트하기 위해 실험을 수행한다. 그 구조 하에서, 항 PD-1 아암은 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 항 CD40 아암은 IgG4의 CH2 및 CH3 도메인에 연결되는 단쇄 가변 프래그먼트(scFv)를 포함한다. 또는, 항 PD-1 아암은 하나의 중쇄만 가지며, VHH는 선택적으로 CH1, CH2 및 CH3에 연결된다.

표 31

[0589]

구조	항 PD-1		항 CD40	
	VH SEQ ID NO:	VL SEQ ID NO:	VH SEQ ID NO:	VL SEQ ID NO:
Fab-ScFV-IgG4	179	180	191	192
Fab-ScFV-IgG4	181	182	191	192
Fab-ScFV-IgG4	183	184	191	192
Fab-ScFV-IgG4	185	186	191	192
Fab-ScFV-IgG4	187	188	191	192
Fab-ScFV-IgG4	189	190	191	192
Fab-ScFV-IgG4	207	208	191	192
Fab-ScFV-IgG4	209	210	191	192
Fab-ScFV-IgG4	179	180	193	194
Fab-ScFV-IgG4	181	182	193	194
Fab-ScFV-IgG4	183	184	193	194
Fab-ScFV-IgG4	185	186	193	194
Fab-ScFV-IgG4	187	188	193	194
Fab-ScFV-IgG4	189	190	193	194
Fab-ScFV-IgG4	207	208	193	194
Fab-ScFV-IgG4	209	210	193	194
Fab-ScFV-IgG4	179	180	195	196
Fab-ScFV-IgG4	181	182	195	196
Fab-ScFV-IgG4	183	184	195	196
Fab-ScFV-IgG4	185	186	195	196
Fab-ScFV-IgG4	187	188	195	196
Fab-ScFV-IgG4	189	190	195	196
Fab-ScFV-IgG4	207	208	195	196
Fab-ScFV-IgG4	209	210	195	196
Fab-ScFV-IgG4	179	180	197	198
Fab-ScFV-IgG4	181	182	197	198
Fab-ScFV-IgG4	183	184	197	198
Fab-ScFV-IgG4	185	186	197	198
Fab-ScFV-IgG4	187	188	197	198
Fab-ScFV-IgG4	189	190	197	198
Fab-ScFV-IgG4	207	208	197	198
Fab-ScFV-IgG4	209	210	197	198
Fab-ScFV-IgG4	179	180	199	200
Fab-ScFV-IgG4	181	182	199	200
Fab-ScFV-IgG4	183	184	199	200
Fab-ScFV-IgG4	185	186	199	200
Fab-ScFV-IgG4	187	188	199	200
Fab-ScFV-IgG4	189	190	199	200
Fab-ScFV-IgG4	207	208	199	200
Fab-ScFV-IgG4	209	210	199	200
Fab-ScFV-IgG4	204(VHH)	n.a.	191	192
Fab-ScFV-IgG4	204(VHH)	n.a.	193	194

Fab-ScFV-IgG4	204(VHH)	n.a.	195	196
Fab-ScFV-IgG4	204(VHH)	n.a.	197	198
Fab-ScFV-IgG4	204(VHH)	n.a.	199	200

[0590] 또한, 이러한 Fc를 함유하는 DART 형식(도 37)의 항체의 표31에 나열된 VH, VL 및 VHH에 대한 **약효**를 테스트하기 위해 실험을 수행한다. 이러한 항 PD1/CD40 이중특이성 항체는 암 치료 방면에서 우수한 **약효**와 낮은 수준의 독성을 가질 것으로 예상된다.

[0591] **실시예 19: 이중특이성 항체 항결장암의 체내 결과**

[0592] 아테졸리주맙은 제넨텍(Genentech)에서 연구개발한 인간화 항 PD-L1 단클론 항체(VH SEQ ID NO: 211; VL SEQ ID NO: 212)이다. 아벨루맙은 머크(Merck)/화이자(Pfizer)에서 연구개발한 인간 항 PD-L1 단클론 항체(VH SEQ ID NO: 213; VL SEQ ID NO: 214)이다. 이 실험에서, 본원에 기재된 이중특이성 항체의 항 PD-1 아암의 VH 및 VL 서열(예를 들어, **도 1B**에 도시된 바와 같음)을 항 PD-L1 항체의 VH 및 VL 서열로 대체한다. 또한, 획득한 PD-L1/CD40 이중특이성 항체의 **약효**를 본원에 개시된 상응 PD-1/CD40 이중특이성 항체의 **약효**와 비교한다.

[0593] 앞에서 수행한 체내 약효 실험과 유사하게, 결장암 마우스 모델에서 항체 ScFV-HC-IgG1-LALA, 아테졸리주맙-6A7-FVHC-IgG1-LALA(중쇄 서열은 SEQ ID NO: 215에 제시된 바와 같음, 경쇄 서열은 SEQ ID NO: 216에 제시된 바와 같음) 및 아벨루맙-6A7-FVHC-IgG1-LALA(중쇄 서열 SEQ ID NO: 217에 제시된 바와 같음, 경쇄 서열은 SEQ ID NO: 218에 제시된 바와 같음)의 체내 종양 성장에 대한 작용을 테스트한다. 인간 PD-L1을 발현하는 MC-38 종양 세포(결장선암 세포)(MC38-hPD-L1)를 이중 인간화 PD1/PD-L1/CD40 마우스(B-hPD-1/hPD-L1/hCD40 마우스)에 피하 주사한다. 마우스의 종양 부피가 약 100mm^3-150mm^3에 이르게 되면, 마우스를 종양 부피에 따라 무작위로 상이한 그룹으로 나눈다(그룹당 6마리). 인간화 PD-L1 마우스에 대한 자세한 정보는, 예를 들어 PCT 출원 번호 PCT/CN2017/099574 및 US10945418B2를 참조할 수 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 통합된다.

[0594] 각 그룹에서, B-hPD-1/hPD-L1/hCD40 마우스(인간화 PD-1, 인간화 PD-L1 및 인간화 CD40 유전자를 가진 마우스)에 인산염 완충 식염수(PBS, G1), 1mg/kg 항 PD-1/CD40 항체 ScFV-HC-IgG1-LALA(G2), 1mg/kg 항 PD-L1/CD40 이중특이성 항체 아테졸리주맙-6A7-FVHC-IgG1-LALA(G3), 1mg/kg 항 PD-L1/CD40 이중특이성 항체 아벨루맙-6A7-FVHC-IgG1-LALA(G4), 3mg/kg ScFV-HC-IgG1-LALA(G5), 3mg/kg 아테졸리주맙-6A7-FVHC-IgG1 -LALA(G6) 또는 3mg/kg 아벨루맙-6A7-FVHC-IgG1-LALA(G7)를 복강내(i.p.) 주사한다. 투약 빈도는 주 2회(총 4회 투약)이다. 자세한 정보는 이하 표에 나타난 바와 같다.

표 32

[0595]

그룹 별	**항체**	**투여량(mg/kg)**	**경로**	**투약 빈도**	**투약 총 횟수**
G1	PBS	-	i.p.	BIW	4
G2	ScFV-HC-IgG1-LALA	1mg/kg	i.p.	BIW	4
G3	아테졸리주맙-6A7-FVHC-IgG1-LALA	1mg/kg	i.p.	BIW	4
G4	아벨루맙-6A7-FVHC-IgG1-LALA	1mg/kg	i.p.	BIW	4
G5	ScFV-HC-IgG1-LALA	3mg/kg	i.p.	BIW	4
G6	아테졸리주맙-6A7-FVHC-IgG1-LALA	3mg/kg	i.p.	BIW	4
G7	아벨루맙-6A7-FVHC-IgG1-LALA	3mg/kg	i.p.	BIW	4

[0596] 전체 처리 기간 내내 마우스의 체중을 모니터링한다. 상이한 그룹에 있는 마우스의 평균 체중은 모두 상이한 정도로 증가되었다(**도 45** 및 **도 46**). 처리 기간 종료 시, 상이한 그룹의 마우스의 체중은 모두 증가하였다.

[0597] 항체로 처리된 그룹의 종양 부피는 **도 47**에 도시되어 있다. 21일째(그룹 나눈 후 21일째)의 TGI_{TV}%를 계산하여 이하 표에 나타난 바와 같다. 이하 표의 P값은 21일째의 데이터에 근거하여 계산한 것이다.

표 33

[0598]

		종양 부피(mm^3)			21일째의 생존율	21일째의 TGI_{TV}%	21일째의 P값	
		0일째	14일째	21일째			체중	종양 부피
대조군	G1	131 ±3	1354 ±137	2328 ±328	6/6	n.a.	n.a.	n.a.

치료군	G2	131 ±3	450 ±125	799 ±257	6/6	69.6%	0.036	0.004
	G3	131 ±4	1300 ±166	2536 ±306	6/6	-9.5%	0.419	0.635
	G4	131±4	1359 ±133	2747 ±326	6/6	-19.1%	1.000	0.386
	G5	131±4	237 ±66	296 ±77	6/6	92.5%	0.005	1.28E-04
	G6	131±5	745 ±119	1676 ±245	6/6	29.7%	0.033	0.142
	G7	131±6	1135 ±64	2569 ±115	6/6	-11.0%	0.663	0.504

[0599] 결과는, 동일한 용량 수준 하에서 ScFV-HC-IgG1-LALA 항체가 아테졸리주맙-6A7-FVHC-IgG1-LALA 또는 아벨루맙-6A7-FVHC-IgG1-LALA보다 유의하게 더 나은 체내 약효를 나타낸다는 것을 보여준다. 투여량 수준이 높을수록 치료는 더 효과적이다.

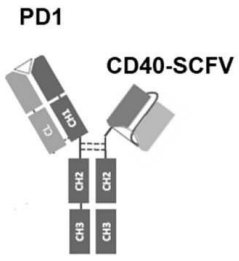
[0600] 보다 구체적으로, 결과는 상이한 용량 수준 하에서, ScFV-HC-IgG1(G2, G5)이 아테졸리주맙-6A7-FVHC-IgG1-LALA(G3, G6) 또는 아벨루맙-6A7-FVHC-IgG1-LALA(G4, G7)보다 높은 TGI_{TV}%(69.6%, 92.5%)로 종양 성장을 억제하고, 또한 투여량이 높을수록 그 치료 효과가 더 낫다는 것을 보여준다. 따라서, 데이터는 ScFV-HC-IgG1의 형태를 갖는 상이한 분자가 B-hPD-1/hPD-L1/hCD40 마우스에서 상이한 치료 효과를 갖는다는 것을 증명한다.

[0601] **기타 실시예**

[0602] 본 발명의 구체적인 실시예를 결합하여 본 발명에 대해 설명하나, 앞의 설명 내용은 설명을 위한 것일뿐, 본 발명의 범위를 제한하기 위한 것은 아니며, 본 발명의 범위는 첨부된 청구범위에 의해 한정되는 것으로 이해해야 할 것이다. 기타 방면, 장점 및 수정은 이하 청구범위의 범위 내에 있다.

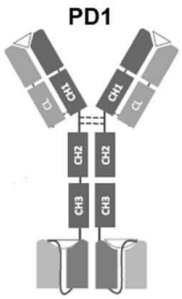
도면

도면1



Fab-ScFV-IgG

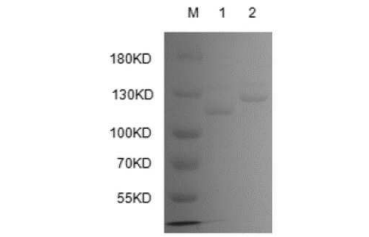
도 1A



ScFV-HC-IgG

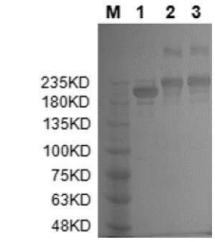
도 1B

도면2



ID	샘플
2	Fab-SCFV-IgG4

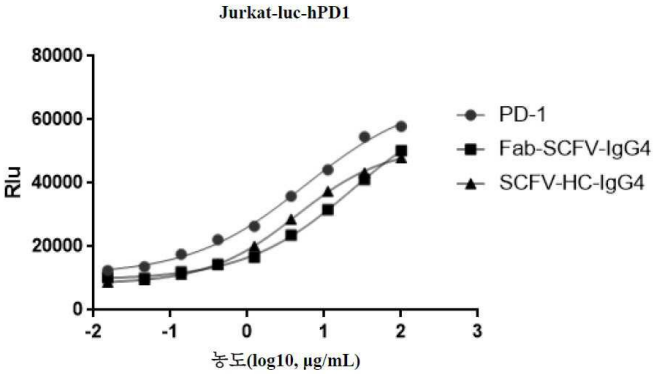
도 2A



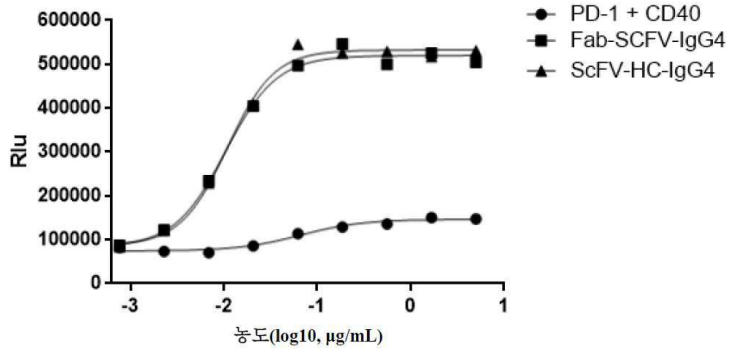
ID	샘플
3	SCFV-HC-IgG4

도 2B

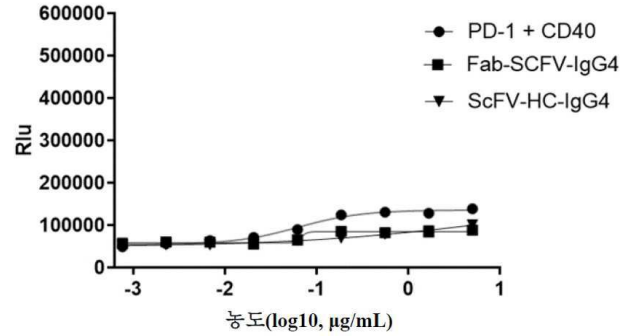
도면3



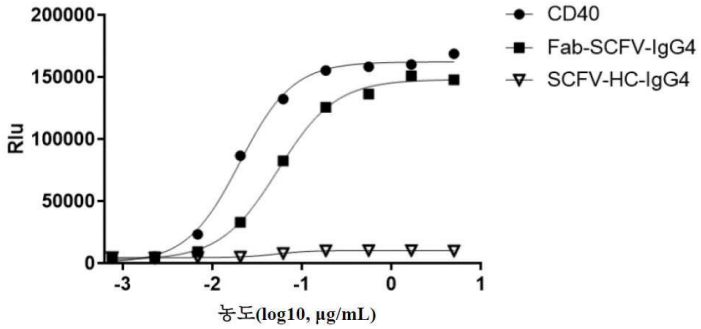
도면4a



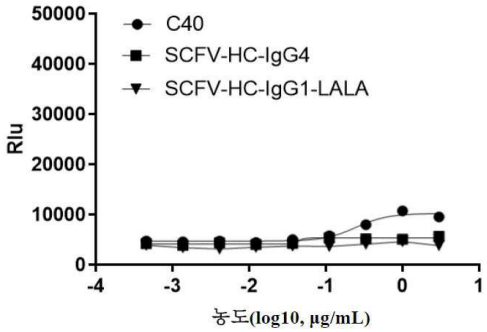
도면4b



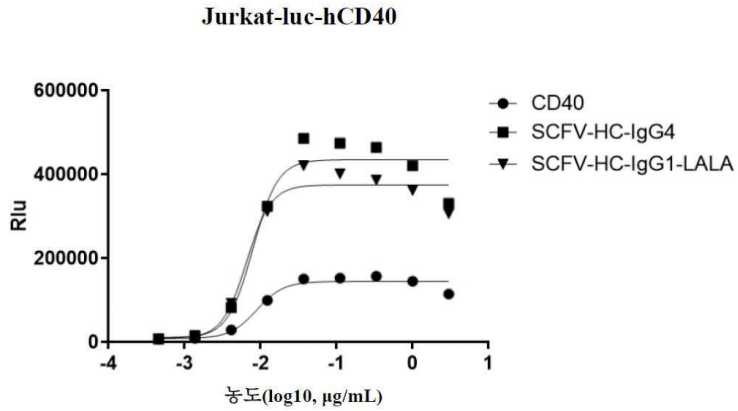
도면5



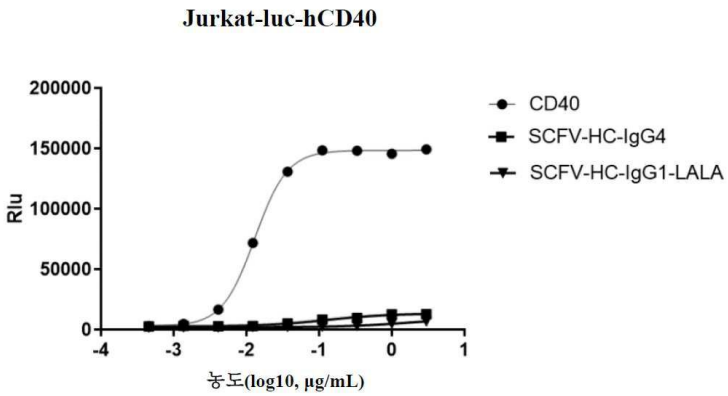
도면6a



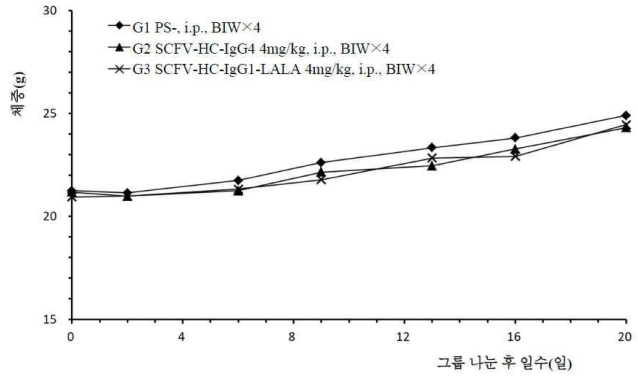
도면6b



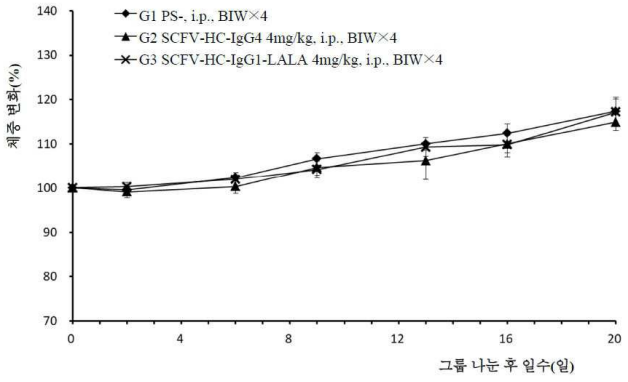
도면6c


Jurkat-luc-hCD40
200000
150000
100000
50000
0
Rlu
-4
-3
-2
-1
0
1
농도(log10, μg/mL)
CD40
SCFV-HC-IgG4
SCFV-HC-IgG1-LALA

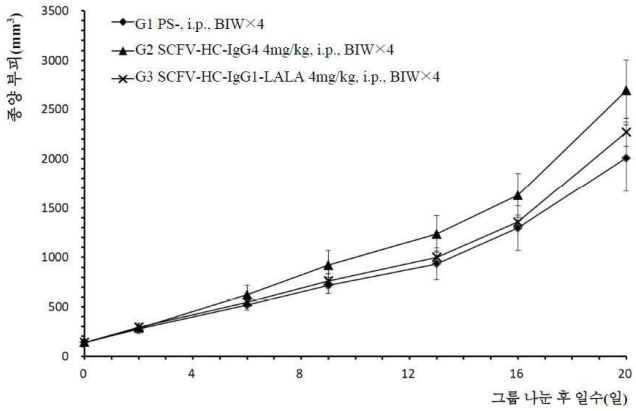
도면7


G1 PS-, i.p., BIW×4
G2 SCFV-HC-IgG4 4mg/kg, i.p., BIW×4
G3 SCFV-HC-IgG1-LALA 4mg/kg, i.p., BIW×4
체중(g)
30
25
20
15
0
4
8
12
16
20
그룹 나눈 후 일수(일)

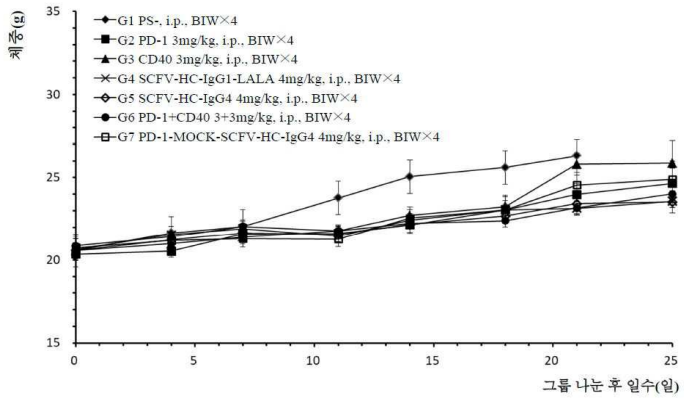
도면8


G1 PS-, i.p., BIW×4
G2 SCFV-HC-IgG4 4mg/kg, i.p., BIW×4
G3 SCFV-HC-IgG1-LALA 4mg/kg, i.p., BIW×4
체중 변화(%)
140
130
120
110
100
90
80
70
0
4
8
12
16
20
그룹 나눈 후 일수(일)

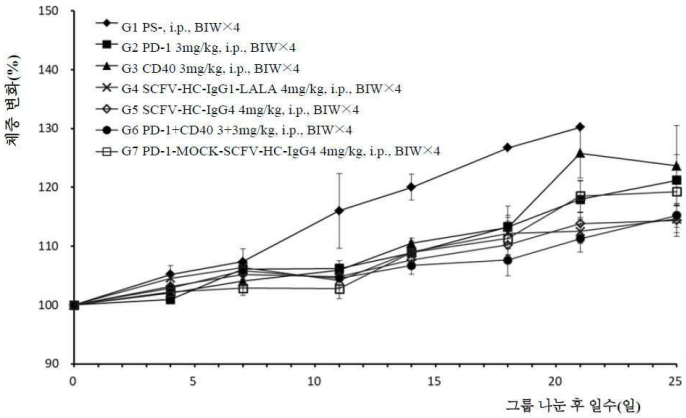
도면9



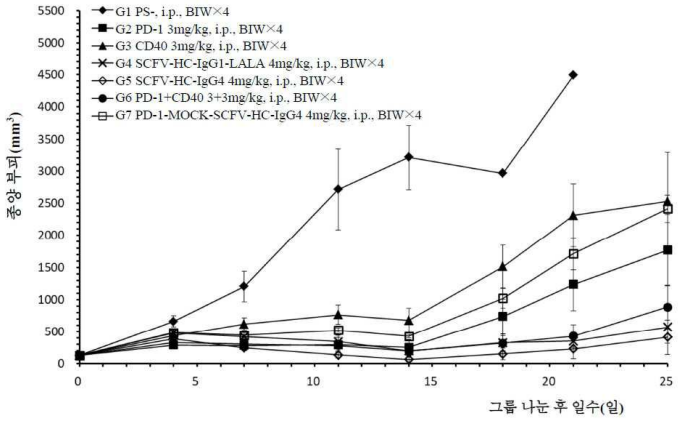
도면10



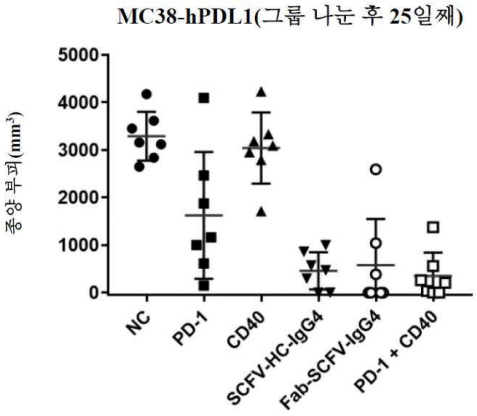
도면11



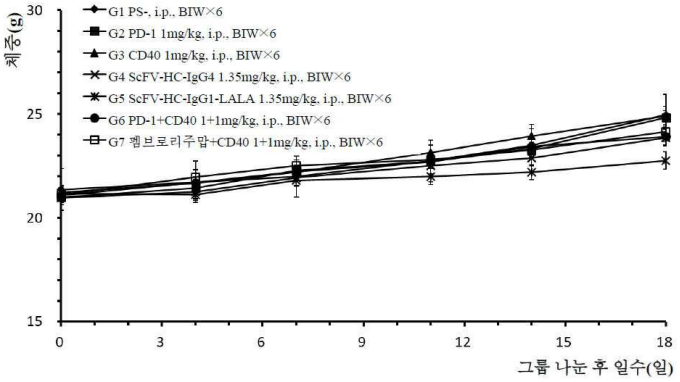
도면12



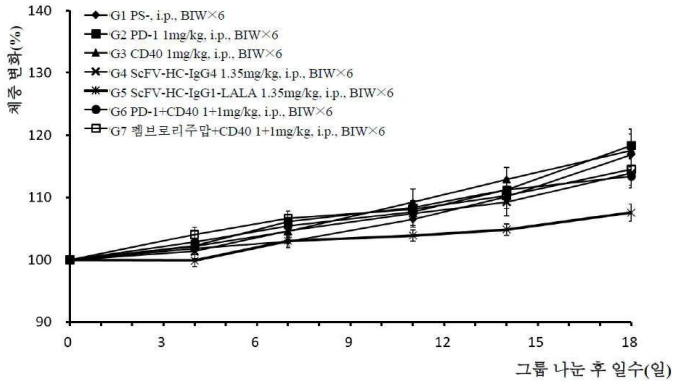
도면13



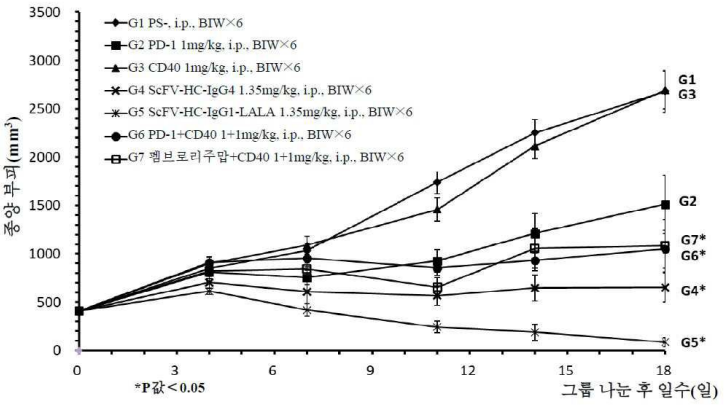
도면14



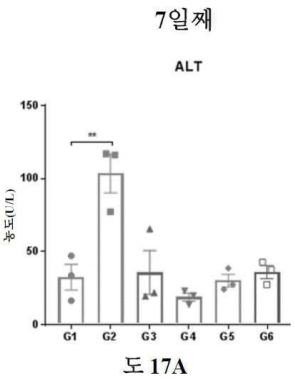
도면15



도면16

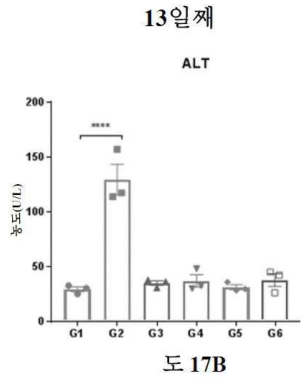


도면17a



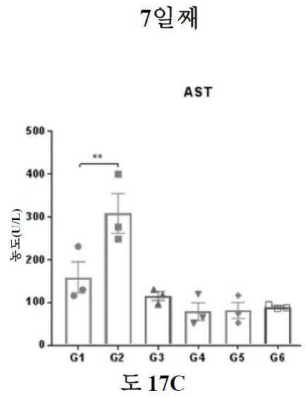
도 17A

도면17b



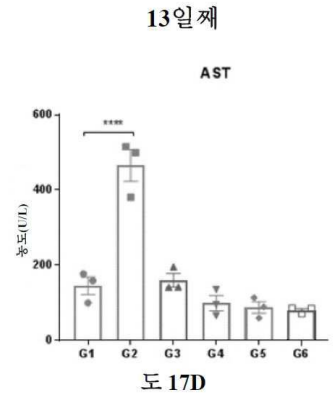
도 17B

도면17c



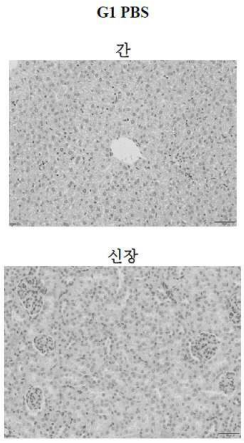
도 17C

도면17d



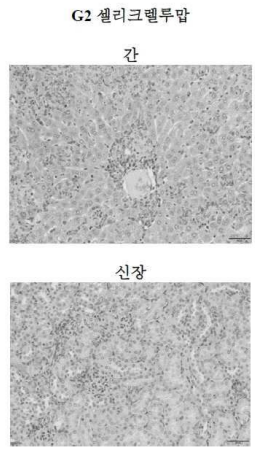
도 17D

도면17e



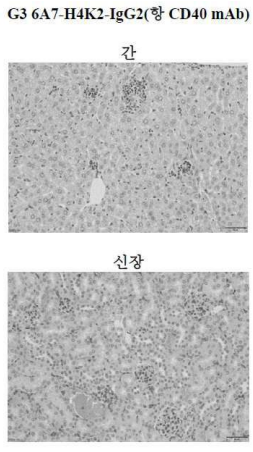
도 17E

도면17f



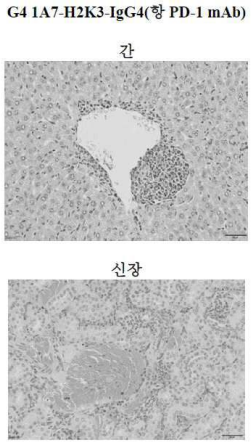
도 17F

도면17g



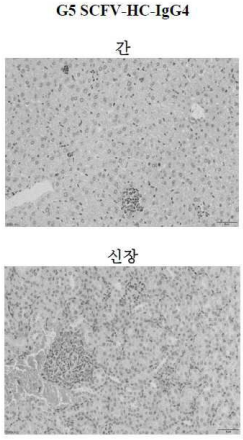
도 17G

도면17h



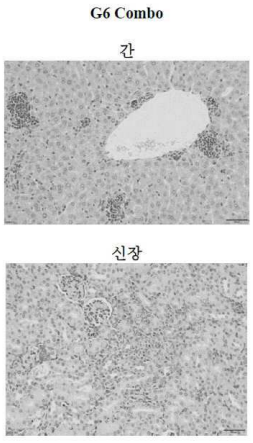
도 17H

도면17i



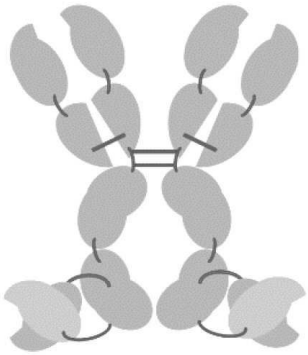
도 17I

도면17j



도 17J

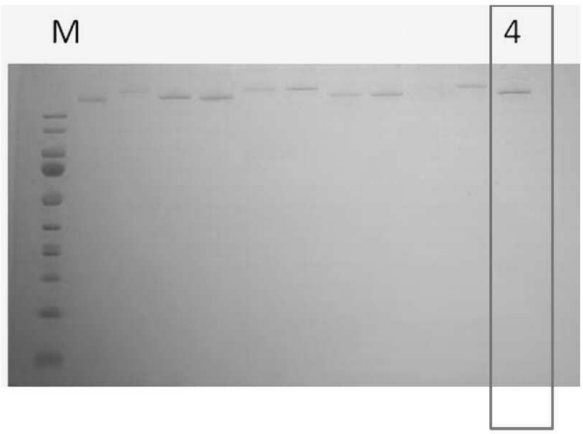
도면18a



PD1-C40-6A7-FV3A

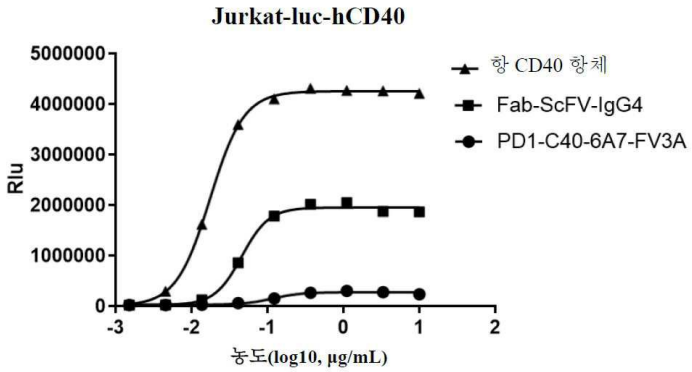
도 18A

도면18b



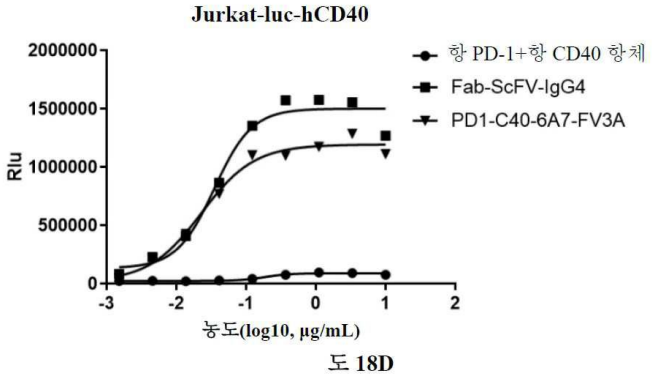
도 18B

도면18c



도 18C

도면18d



도 18D

도면19

항 PD1 항체의 Kabat CDR

Ab	VH CDR1	SEQ ID :	VH CDR2	SEQ ID :	VH CDR3	SEQ ID :	VL CDR1	SEQ ID :	VL CDR2	SEQ ID :	VL CDR3	SEQ ID :
마우스 항 PD-1 항체 25-1A7 및 인간화 25-1A7	SYSMS	1	HISSGGSSTYY PDTVKG	2	QFYYGSSF WYFDV	3	KASQSVDFD GDSYMN	4	AASNLES	5	QQSNED PPT	6
마우스 항 PD-1 항체 18-3F1 및 인간화 18-3F1	SYWM H	7	YINPSTGYTEY NQKFKD	8	GVRYYFD Y	9	KSSQSLLNSR TRKNYLA	10	WASTRES	11	KQSYNL LT	12
마우스 항 PD-1 항체 3-6G1 및 인간화 3-6G1	SYWM H	13	YINPNTGYTEY NQKFKD	14	GTAYYFDY	15	KSSQSLLNSR TRKNYLA	16	WASTRES	17	KQSYNL QT	18

도면20

항 PD1 항체의 Chothia CDR

Ab	VH CDR1	SEQ ID :	VH CDR2	SEQ ID :	VH CDR3	SEQ ID :	VL CDR1	SEQ ID :	VL CDR2	SEQ ID :	VL CDR3	SEQ ID :
마우스 항 PD-1 항체 25-1A7 및 인간화 25-1A7	GFTFS SYSMS	19	SSGGSS	20	QFYYGSSF WYFDV	21	KASQSVDFD GDSYMN	22	AASNLES	23	QQSNED PPT	24
마우스 항 PD-1 항체 18-3F1 및 인간화 18-3F1	GYTFT SYWM H	25	NPSTGY	26	GVRYYFD Y	27	KSSQSLLNSR TRKNYLA	28	WASTRES	29	KQSYNL LT	30
마우스 항 PD-1 항체 3-6G1 및 인간화 3-6G1	GYTLT SYWM H	31	NPNTGY	32	GTAYYFDY	33	KSSQSLLNSR TRKNYLA	34	WASTRES	35	KQSYNL QT	36

도면21

단백질	아미노산 서열	SEQ ID NO
인간 PD-1 (hPD-1) NP_005009.2	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSN QTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRA EVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYG ELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL	37
마우스 PD-1 (mPD-1) NP_032824.1	MWVRQVPWSFTWAVLQLSWQSGWLLEVPNGPWRSLTFYPAWLTVSEGANATFTCSLSNWSEDLMLNWNRLSP SNQTEKQAAFCNGLSQPVQDARFQIIQLPNRHDFHMNILDTRRNDSGIYLCGAISLHPKAKIEESPGAELVVTERIL ETSTRYPSPSPKPEGRFQGMVIGIMSALVGIPVLLLLAWALAVFCSTSMSEARGAGSKDDTLKEEPSAAPVPSVAY EELDFQGREKTPELPTACVHTEYATIVFTEGLGASAMGRRGSADGLQGPRPPPRHEDGHCSWPL	38
키메라 PD-1(chiPD-1)	MWVRQVPWSFTWAVLQLSWQSGWLLEVPNGPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPS NQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELVVTERI LETSTRYPSPSPKPEGRFQGMVIGIMSALVGIPVLLLLAWALAVFCSTSMSEARGAGSKDDTLKEEPSAAPVPSVA YEELDFQGREKTPELPTACVHTEYATIVFTEGLGASAMGRRGSADGLQGPRPPPRHEDGHCSWPL	39

도면22a

인간화 항체 가변 도메인	설명	아미노산 서열	SEQ ID NO:
25-1A7에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인 H1	HuVHv1: 인간화 백분율 89.8%; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMSWVRQAPG KRLEWVAHISSGGSSTYYPDTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAMYYCTRQFYYGSSFWYFDVWGQGTTVTVSS	40
25-1A7에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인 H2	HuVHv2: 인간화 백분율 **88.8%**; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMSWVRQAPG KRLEWVAHISSGGSSTYYPDTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAMYYCTRQFYYGSSFWYFDVWGAGTTVTVSS	41
25-1A7에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인 H3	HuVHv3: 인간화 백분율 **87.8%**; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬 아님	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMSWVRQAPG KRLEWVAHISSGGSSTYYPDTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAMYYCTRQFYYGSSFWYFDVWGAGTTVTVSS	42
25-1A7에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인 K1	HuVLv1: 인간화 백분율 **84.8%**; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬	DNVLTQSPATLSLSPGERATLSCKASQSVDFDGDSYMNWYQ QKPGQPPRLLIYAASNLESGIPARFSGSGPGTDFTLTISSLEPED FATYYCQQSNEDPPTFGGGTKVEIK	43
25-1A7에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인 K2	HuVLv2: 인간화 백분율 **83.7%**; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬 아님	DNVLTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVDFDGDSYMNWYQ QKPGQPPRLLIYAASNLESGIPARFSGSGPGTDFTLTISSLEPED FATYYCQQSNEDPPTFGGGTKVEIK	44
25-1A7에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인 K3	HuVLv3: 인간화 백분율 **81.5%**; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬 아님	DNVLTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVDFDGDSYMNWYQ QKPGQPPRLLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPED FATYYCQQSNEDPPTFGGGTKVEIK	45
3F1에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인 H1	HuVHv1: 인간화 백분율 **84.7%**; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬 아님	QVQLQQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVRQ APGQGLEWIGYINPSTGYTEYNQKFKDRATLTADTSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARGVRYYFDYWGQGTLVTVSS	46
3F1에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인 H2	HuVHv2: 인간화 백분율 **81.6%**; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬 아님	QVQLQQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVKQ RPGQGLEWIGYINPSTGYTEYNQKFKDRATLTADKSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARGVRYYFDYWGQGTLVTVSS	47

도면22b

3F1에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인 H3	HuVHv3: 인간화 백분율 **81.6%**; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬 아님	QVQLQQSGAEVAKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVKQ RPGQGLEWIGYINPSTGYTEYNQKFKDRATLTADTSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARGVRYYFDYWGQGTLLTVSS	48
3F1에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인 H4	HuVHv3: 인간화 백분율 **79.6%**; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬 아님	QVQLQQSGAEVAKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVKQ RPGQGLEWIGYINPSTGYTEYNQKFKDRATLTADKSTSTAYM ELSSLTSEDTAVYYCARGVRYYFDYWGQGTLLTVSS	49
3F1에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인 K1	HuVLv1: 인간화 백분율 **88.9%**; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬 아님	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLNSRTRKNYLAWY QQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQ AEDVAVYYCKQSYNLLTFGQGTKLELK	50
3F1에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인 K2	HuVLv2: 인간화 백분율 **87.9%**; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬 아님	DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSSQSLLNSRTRKNYLAWY QQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQ AEDVAVYYCKQSYNLLTFGQGTKLELK	51
3F1에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인 K3	HuVLv3: 인간화 백분율 **84.8%**; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬 아님	DIVMTQSPSSLAVSAGERVTMSCKSSQSLLNSRTRKNYLAWY QQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQ AEDVAVYYCKQSYNLLTFGQGTKLELK	52
25-1A7("1A7")	마우스 중쇄 가변 영역	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYSMSWVRQTPE KRLEWVAHISSGGSSTYYPDTVKGRFTISRDNARNTLYLQMS SLKSEDTAMYYCTRQFYYGSSFWYFDVWGAGTTVTVSS	53
25-1A7("1A7")	마우스 경쇄 가변 영역	DNVLTQSPVSLAVSLGQRATISCKASQSVDFDGDSYMNWYQ QKPGQPPKLLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEE DAATYYCQQSNEDPPTFGGGTKLEIK	54
18-3F1("3F1")	마우스 중쇄 가변 영역	QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVKQ RPGQGLEWIGYINPSTGYTEYNQKFKDKATLTADKSSSTAYM QLSSLTSEDSAVYYCARGVRYYFDYWGQGTTLTVSS	55
18-3F1("3F1")	마우스 경쇄 가변 영역	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKNYLAWY QQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQ AEDLAVYYCKQSYNLLTFGAGTKLELK	56
3-6G1("6G1")	마우스 중쇄 가변 영역	QVQLQQSGAELAKPGASLKMSCKASGYTLTSYWMHWVKQR PGQGLEWIGYINPNTGYTEYNQKFKDKATLTADKSSSTAYM QLSSLTSEDSAVYYCARGTAYYFDYWGQGTTLTVSS	57

도면22c

3-6G1("6G1")	마우스 경쇄 가변 영역	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKNYLAWY QQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQ AEDLAVYYCKQSYNLQTFGGGTKLEIK	58

도면23

항 CD40 항체의 Kabat CDR

Ab	VH CDR1	SEQ ID :	VH CDR2	SEQ ID :	VH CDR3	SEQ ID :	VL CDR1	SEQ ID :	VL CDR2	SEQ ID :	VL CDR3	SEQ ID :
03-7F10 또는 인간화 03-7F10	DYYM Y	59	YISYGGDSTFY PDTVRG	60	PAPSAHSY YLDY	61	RASQDISNYL N	62	YYTSRLH S	63	QQGKTL PFT	64
06-6A7 또는 인간화 06-6A7	SYYIY	65	GINPRNGGTNF NEKFKS	66	HGNGVY	67	RSSQSLLHSN GNTYLH	68	QVSNRFS	69	SQTTHV PWT	70
07-4H6 또는 인간화 07-4H6	SGYW N	71	FISYSGSTYYTP SLKS	72	FRRYDDGV DY	73	RASHEISGYL S	74	AASTLAS	75	LQYSSYP WT	76

도면24

항 CD40 항체의 Chothia CDR

Ab	VH CDR1	SEQ ID :	VH CDR2	SEQ ID :	VH CDR3	SEQ ID :	VL CDR1	SEQ ID :	VL CDR2	SEQ ID :	VL CDR3	SEQ ID :
03-7F10 또는 인간화 03-7F10	GFTFSD YYMY	77	SYGGDS	78	PAPSAHSY YLDY	79	RASQDISNYL N	80	YTSRLHS	81	QQGKTL PFT	82
06-6A7 또는 인간화 06-6A7	GYTFIS YYIY	83	NPRNGG	84	HGNGVY	85	RSSQSLLHSN GNTYLH	86	QVSNRFS	87	SQTTHV PWT	88
07-4H6 또는 인간화 07-4H6	GDSVSS GYWN	89	SYSGS	90	FRRYDDGV DY	91	RASHEISGYL S	92	AASTLAS	93	LQYSSYP WT	94

도면25

단백질	아미노산 서열	SEQ ID NO:
인간 CD40(hCD40) NP_001241.1	MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPC GESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGWHCTSEACESCVLHR SCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVV CGPQDRLRALVVIPIIFGILFAILLVLVFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAP VQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ	95
마우스 CD40(mCD40) NP_035741.2	MVSLPRLCALWGCLLTAVHLGQCVTCSDKQYLHDGQCCDLCQPGSRLTSHCTALEKTQCH PCDSGEFSAQWNREIRCHQHRHCEPNQGLRVKKEGTAESDTVCTCKEGQHCTSKDCEACAQ HTPCIPGFGVMEMATETTDTVCHPCPVGFFSNQSSLFEKCYPWTSCEDKNLEVLQKGTSQTN VICGLKSRMRALLVIPVVMGILITIFGVFLYIKKVVKKPKDNEILPPAARRQDPQEMEDYPGH NTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQVTDSIALRPLV	96
키메라 CD40(chiCD40) (인간화 CD40)	MVSLPRLCALWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPC GESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGWHCTSEACESCVLHR SCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVV CGPQDRLRALLVIPVVMGILITIFGVFLYIKKVVKKPKDNEILPPAARRQDPQEMEDYPGHNT AAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQVTDSIALRPLV	97

도면26a

인간화 항체 가변 도메인	설명	아미노산 서열	SEQ ID NO:
7F10에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인(H1)	HuVHv1: 인간화 백분율 84.7%; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬 아님	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDYYMYWVRQAP GKRLEWVAYISYGGDSTFYPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARPAPSAHSYYLDYWGQGTLLTVSS	98
7F10에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인(H2)	HuVHv2: 인간화 백분율 82.7%; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬 아님	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDYYMYWVRQAP GKRLEWVAYISYGGDSTFYPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQ MSSLKAEDTAVYYCARPAPSAHSYYLDYWGQGTLLTVSS	99
7F10에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인(H3)	HuVHv3: 인간화 백분율 78.6%; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬 아님	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDYYMYWVRQAP EKRLEWVAYISYGGDSTFYPDTVRGRFTISRDNAKNALYLQ MSRLKAEDTAVYYCARPAPSAHSYYLDYWGQGTTLTVSS	100
7F10에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인 K1	HuVLv1: 인간화 백분율 85.3%; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGG AVKLLIYYTSRLHSGLPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATY YCQQGKTLPFTFASGTKLEIK	101
7F10에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인 K2	HuVLv2: 인간화 백분율 84.2%; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬 아님	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGG AVKLLIYYTSRLHSGLPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATY YCQQGKTLPFTFASGTKLEIK	102
7F10에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인(K3)	HuVLv3: 인간화 백분율 82.1%; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬 아님	DIQMTQSTSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGG AVKLLIYYTSRLHSGLPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQQEDIATY YCQQGKTLPFTFASGTKLEIK	103
7F10에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인(K4)	HuVLv4: 인간화 백분율 80%; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬 아님	DIQMTQSTSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPDG TVKLLIYYTSRLHSGLPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQQEDIATY YCQQGKTLPFTFASGTKLEIK	104
6A7에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인(H1)	HuVHv1: 인간화 백분율 84.7%; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYYIYWVRQAP GQGLEWMGGINPRNGGTNFNEKFKSRVTLTVDTSISTAYME LSRLRSEDTAVYYCARHGNGVYWGQGTTVTVSS	105
6A7에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인(H2)	HuVHv2: 인간화 백분율 82.7%;	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYYIYWVRQAP GQGLEWIGGINPRNGGTNFNEKFKSRATLTVDTSISTAYMEL SRLRSEDTAVYYCARHGNGVYWGQGTTVTVSS	106

도면26b

	최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬		
6A7에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인(H3)	HuVHv3: 인간화 백분율 81.6%; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYYIYWVRQAP GQGLEWIGGINPRNGGTNFNEKFKSRATLTVDTSISTAYMEL SRLRSEDTAVYYCTRHGNGVYWGQGTTVTVSS	107
6A7에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인(H4)	HuVHv4: 인간화 백분율 79.6%; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFISYYIYWVKQAP GQGLEWIGGINPRNGGTNFNEKFKSRATLTVDTSISTAYMEL SRLRSEDTAVYYCTRHGNGVYWGQGTTLTVSS	108
6A7에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인(K1)	HuVLv1: 인간화 백분율 91%; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬	DVVMTQsPLSLPVtLGqpASISCRSSQSLLHSNGNTYLHWfqQr PGQSPrHLIYQVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDv GVYyCSQTTHVPWTFGGGTKvEIK	109
6A7에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인(K2)	HuVLv2: 인간화 백분율 88%; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬 아님	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLHSNGNTYLHWYQ QRPGQSPNHLIYQVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYFCSQTTHVPWTFGGGTKVEIK	110
6A7에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인(K3)	HuVLv3: 인간화 백분율 87%; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬 아님	DVVMTQSPLSLPVTLGDPASISCRSSQSLLHSNGNTYLHWYQ QRPGQSPNHLIYQVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYFCSQTTHVPWTFGGGTKLEIK	111
4H6에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인(H1)	HuVHv1: 인간화 백분율 88.9%; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGDSVSSGYWNWIRKHP GKKLEWIGFISYSGSTYYTPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCARFRRYDDGVDYWGQGTLVTVSS	112
4H6에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인(H2)	HuVHv2: 인간화 백분율 87.9%; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬	EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGDSVSSGYWNWIRKHP GKKLEWIGFISYSGSTYYTPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCARFRRYDDGVDYWGQGTLVTVSS	113
4H6에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인(H3)	HuVHv3: 인간화 백분율 83.8%; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬	EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGDSVSSGYWNWIRKHP GKKLEYMGFISYSGSTYYTPSLKSRITISRDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYFCARFRRYDDGVDYWGQGTLVTVSS	114
4H6에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인(H4)	HuVHv4: 인간화 백분율 82.8%; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬	EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGDSVSSGYWNWIRKFPG KKLEYMGFISYSGSTYYTPSLKSRITISRDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYFCARFRRYDDGVDYWGQGTLVTVSS	115
4H6에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인(K1)	HuVLv1: 인간화 백분율 87.4%;	DIQMTQSPSamSASvGdRVtiTCRASHEISGYLSWfQQKPgGvIK RLINAASTLASGVPsRFSGSRSGtEftLTIsSLqpEDFAtYYCLQYS SYPWTFGGGTKLEIK	116

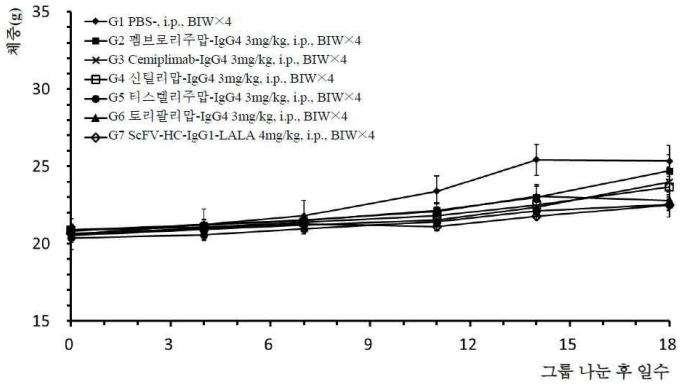
도면26c

	최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬		
4H6에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인(K2)	HuVLv2: 인간화 백분율 84.2%; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬	DIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRASHEISGYLSWIQQKPGG TIKRLINAASTLASGVPSRFSGSRSGTEFTLTISSLQPEDFADY YCLQYSSYPWTFGGGTKLEIK	117
4H6에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인(K3)	HuVLv3: 인간화 백분율 83.2%; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬	DIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRASHEISGYLSWIQQKPGG TIKRLINAASTLASGVPSRFSGSRSGTEYTLTISSLQPEDFADY YCLQYSSYPWTFGGGTKLEIK	118
4H6에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인(K4)	HuVLv4: 인간화 백분율 82.1%; 최적 정렬이 인간 및 시노몰구스 원숭이와의 정렬 아님	DIQMTQSPSAMSASVGDRVTLTCRASHEISGYLSWIQQKPGG TIKRLINAASTLASGVPSRFSGSRSGTEYTLTISSLQPEDFADY YCLQYSSYPWTFGGGTKLEIK	119
03-7F10("7F10")	마우스 중쇄 가변 영역	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCATSGFTFSDYYMYWVRQTP EKRLEWVAYISYGGDSTFYPDTVRGRFTISRDNAKNALYLQ MSRLKSEDTAVYYCARPAPSAHSYYLDYWGQGTTLTVSS	120
03-7F10("7F10")	마우스 경쇄 가변 영역	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDG TVKLLIYYTSRLHSGLPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATY YCQQGKTLPFTFASGTKLEIK	121
06-6A7("6A7")	마우스 중쇄 가변 영역	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFISYYIYWVKQRP GQGLEWIGGINPRNGGTNFNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQ LSSLTSEDSAVYYCTRHGNGVYWGQGTTLTVSS	122
06-6A7("6A7")	마우스 경쇄 가변 영역	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLLHSNGNTYLHWYL QKPGQSPNHLIYQVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDLGVYFCSQTTHVPWTFGGGTKLEIK	123
07-4H6("4H6")	마우스 중쇄 가변 영역	EVKLQESGPSLVKPSQTLSLTCSVTGDSVSSGYWNWIRKFPG NKLEYMGFISYSGSTYYTPSLKSRISITRDTSKNQFYLQLNSV TTEDTATYFCARFRRYDDGVDYWGQGTTLTVSS	124
07-4H6("4H6")	마우스 경쇄 가변 영역	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASHEISGYLSWIQQKPDGT IKRLINAASTLASGVPKRFSGSRSGSEYSLTINSLESEDFADYY CLQYSSYPWTFGGGTKLEIK	125
6A7 돌연변이체에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인(H4)	인간화 중쇄 가변 영역 H4 돌연변이체	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFISYYIYWVKQAP GQCLEWIGGINPRNGGTNFNEKFKSRATLTVDTSISTAYMEL SRLRSEDTAVYYCTRHGNGVYWGQGTTLTVSS	126

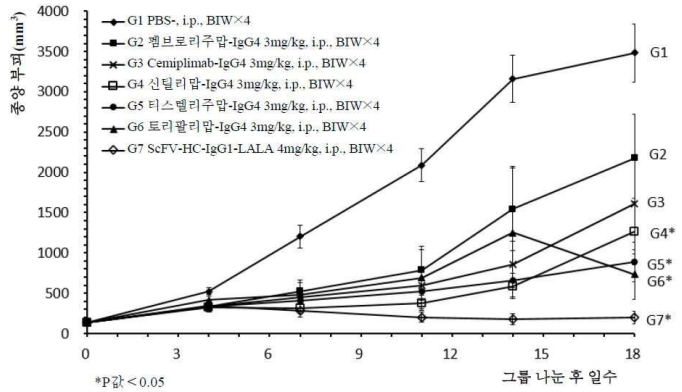
도면26d

6A7 돌연변이체에 기반한 인간화 중쇄 가변 도메인(K2)	인간화 경쇄 가변 영역 K2 돌연변이체	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLHSNGNTYLHWYQ QRPGQSPNHLIYQVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYFCSQTTHVPWTFGCGTKVEIK	127
06-6A7("6A7") 돌연변이체	마우스 중쇄 가변 영역 돌연변이체	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFISYYIYWVKQRP GQCLEWIGGINPRNGGTNFNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQ LSSLTSEDSAVYYCTRHGNGVYWGQGTTLTVSS	128
06-6A7("6A7") 돌연변이체	마우스 경쇄 가변 영역 돌연변이체	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLLHSNGNTYLHWYL QKPGQSPNHLIYQVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDLGVYFCSQTTHVPWTFGCGTKLEIK	129

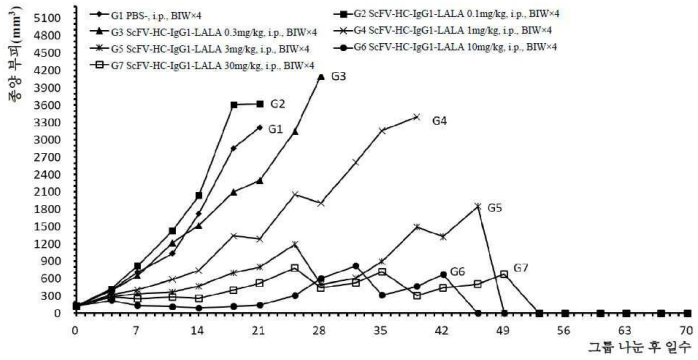
도면27



도면28

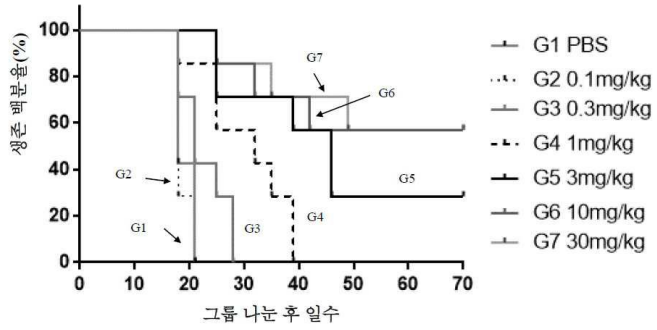


도면29a



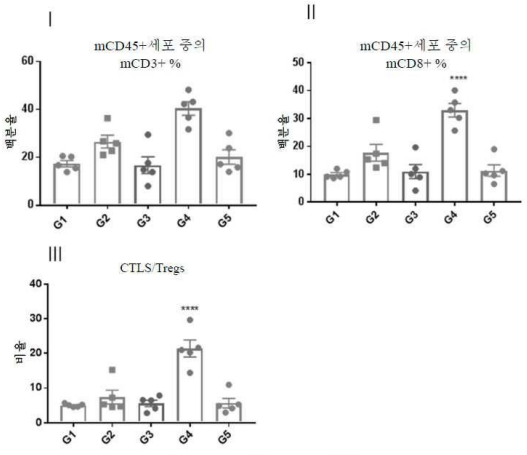
도 29A

도면29b



도 29B

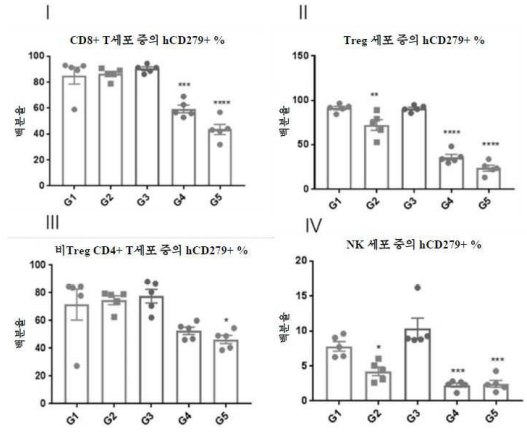
도면30a



*, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001; ****, P<0.0001

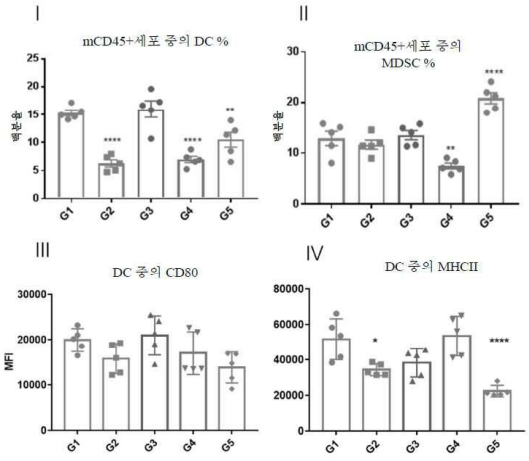
도 30A

도면30b



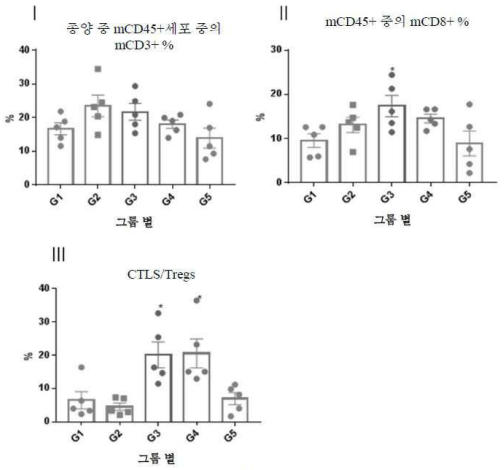
도 30B

도면30c



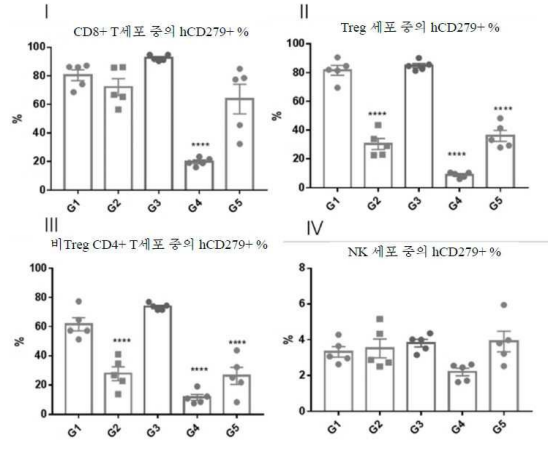
도 30C

도면30d



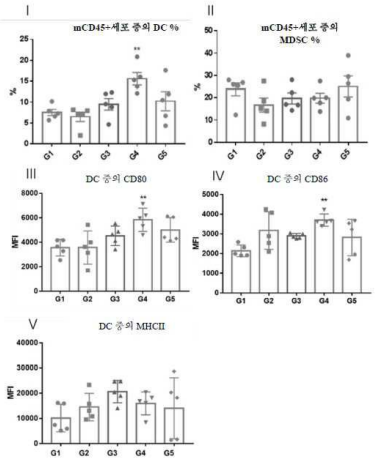
도 30D

도면30e



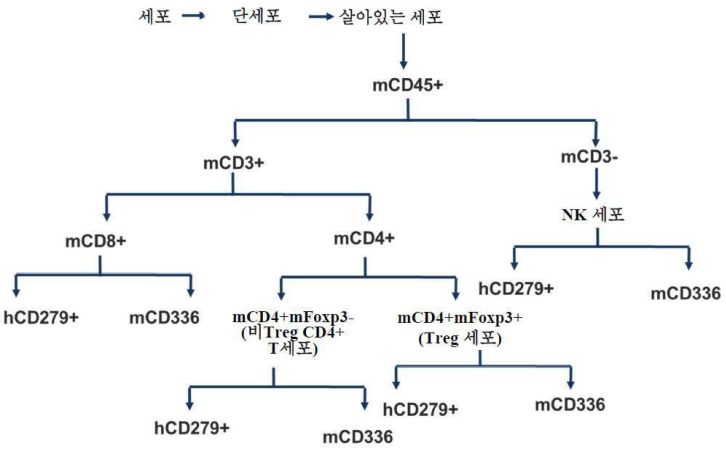
도 30E

도면30f



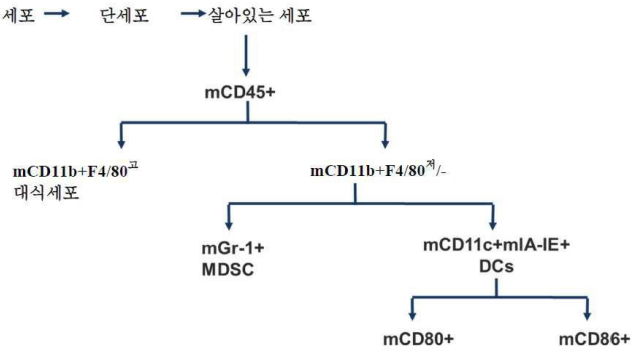
도 30F

도면31a



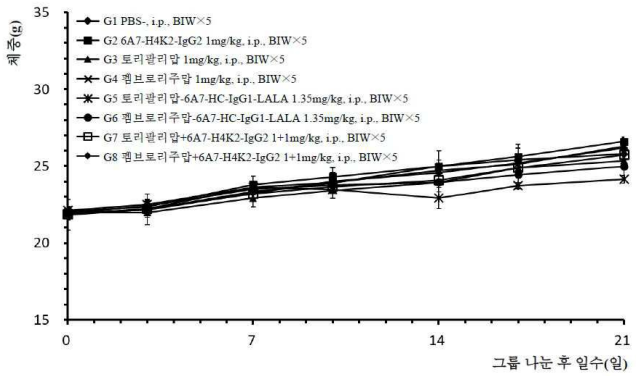
도 31A

도면31b

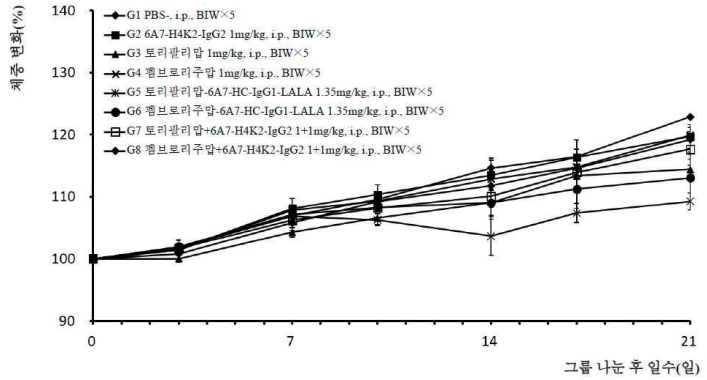


도 31B

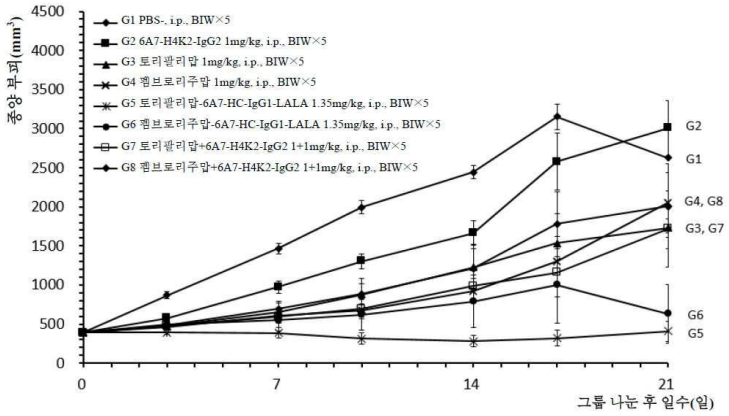
도면32



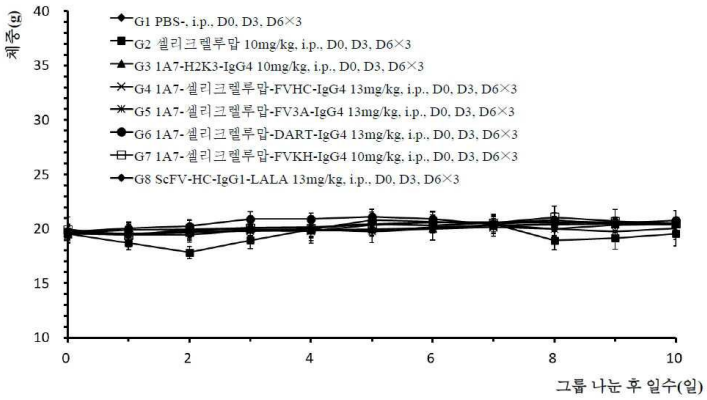
도면33



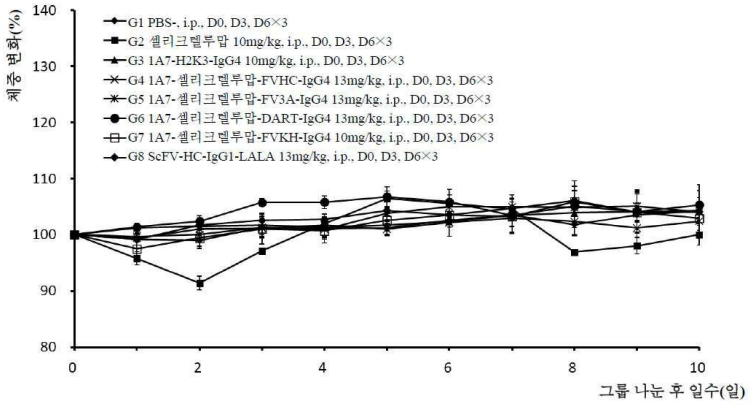
도면34



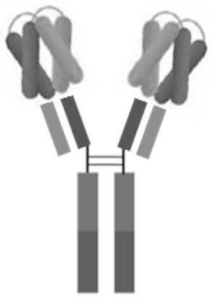
도면35



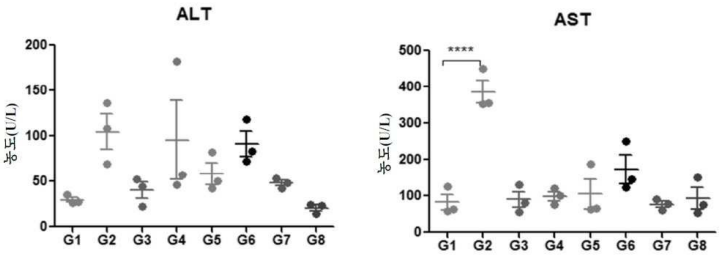
도면36



도면37

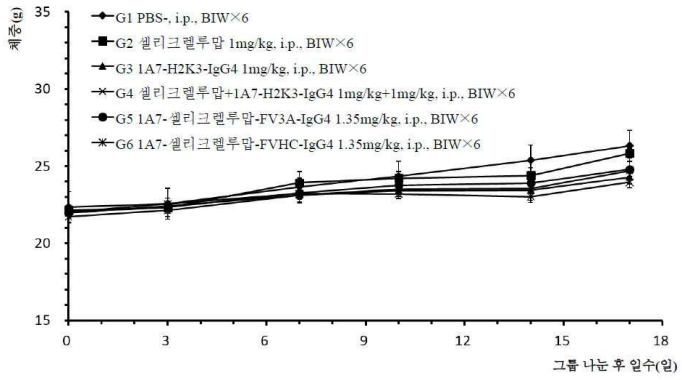


도면38

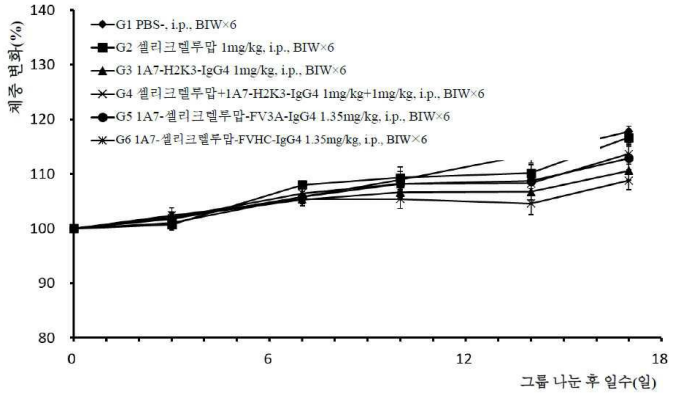


도 38A 도 38B

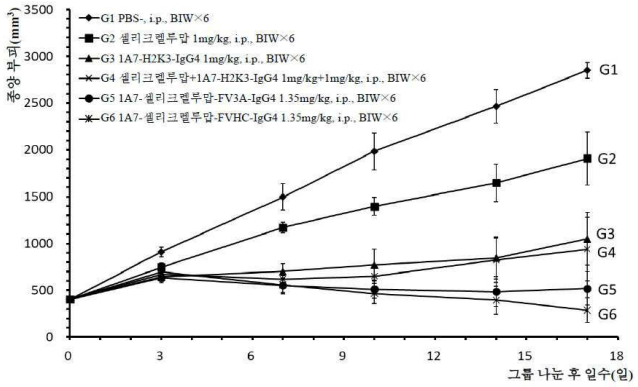
도면39



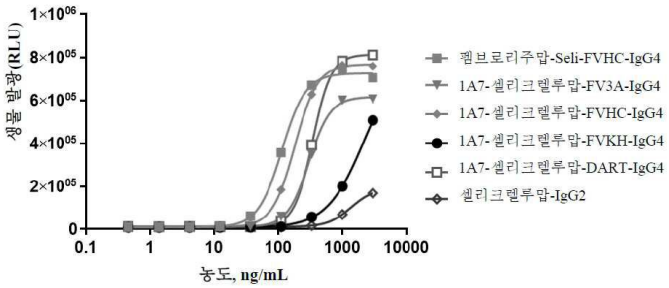
도면40



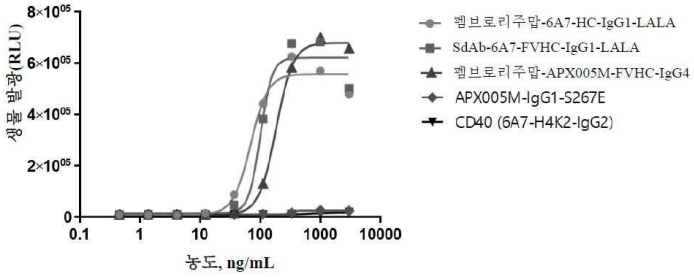
도면41



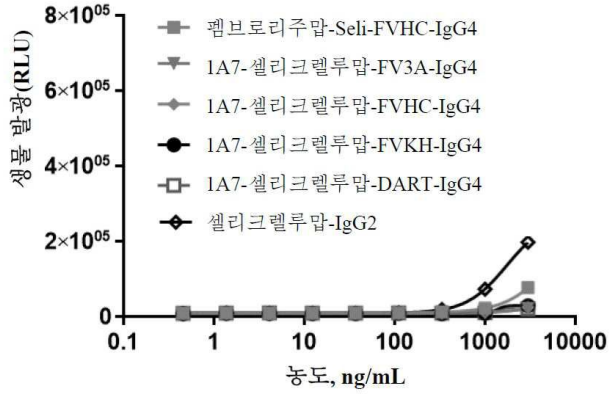
도면42a



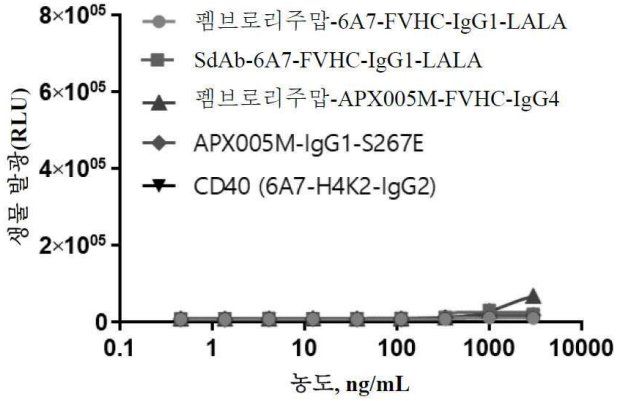
도면42b



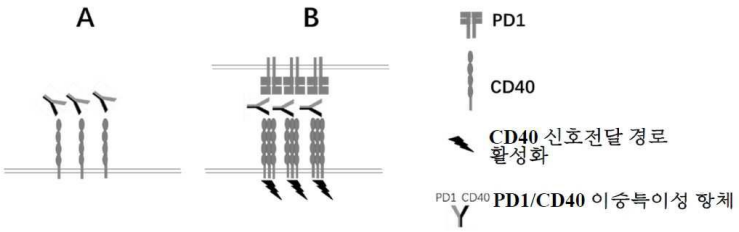
도면42c



도면42d

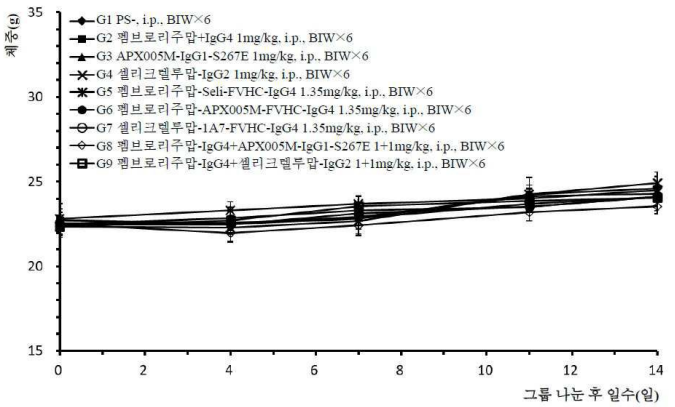


도면43

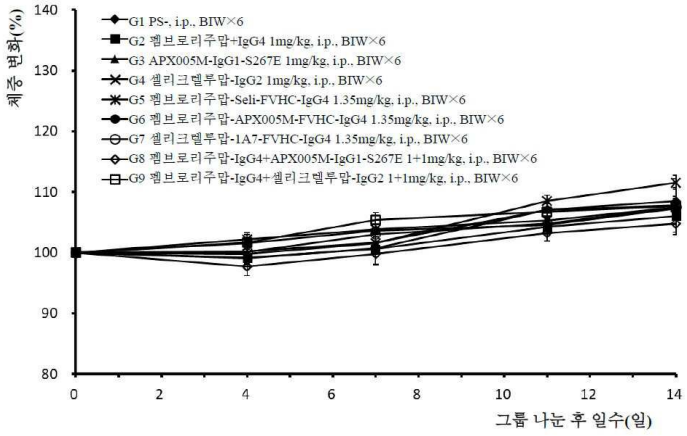


도 43A-도 43B

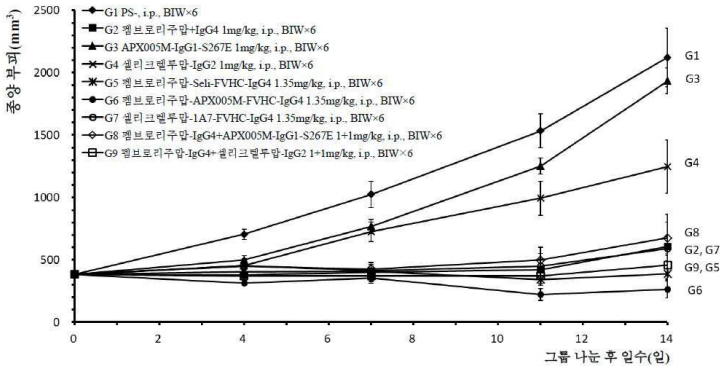
도면44a



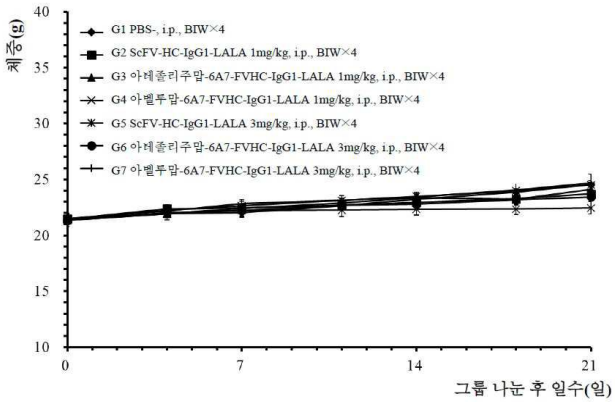
도면44b



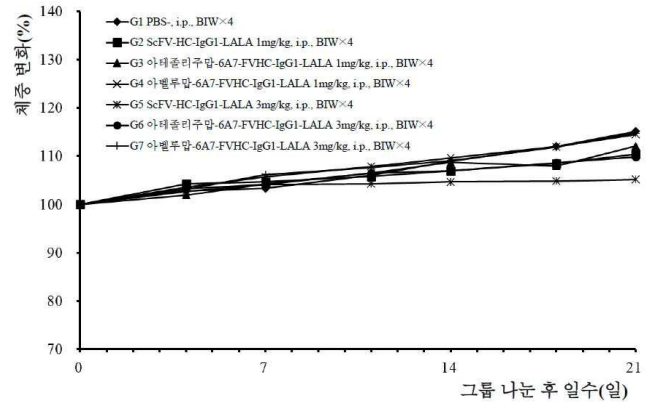
도면44c



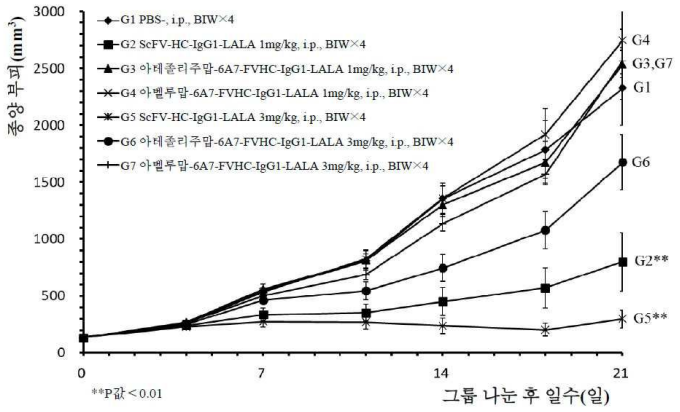
도면45



도면46



도면47



도면48a

Fab-SCFV-IgG4의 전장 PD-1 중쇄(SEQ ID NO: 130)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMSWVRQAPGKRLEWVAHISSGGSSTYYPDTVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRAEDTAMYYCTRQFYYGSSFWYFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

Fab-SCFV-IgG4의 전장 PD-1 경쇄(SEQ ID NO: 131)
DNVLTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVDFDGDSYMNWYQQKPGQPPRLLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEP
EDFATYYCQQSNEDPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Fab-SCFV-IgG4의 전장 CD40 아암(버전2)(SEQ ID NO: 132)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFISYYIYWVKQAPGQCLEWIGGINPRNGGTNFNEKFKSRATLTVDTSISTAYME
LSRLRSEDTAVYYCTRHGNGVYWGQGTTLTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRS
SQSLLHSNGNTYLHWYQQRPGQSPNHLIYQVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQTTHVPWTFGCGT
KVEIKDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

Fab-SCFV-IgG4의 전장 CD40 아암(버전1)(SEQ ID NO: 133)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFISYYIYWVKQAPGQGLEWIGGINPRNGGTNFNEKFKSRATLTVDTSISTAYME
LSRLRSEDTAVYYCTRHGNGVYWGQGTTLTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRS
SQSLLHSNGNTYLHWYQQRPGQSPNHLIYQVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQTTHVPWTFGGGT
KVEIKDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

도면48b

ScFv-HC-IgG4의 전장 수식 중쇄(버전2)(SEQ ID NO: 134)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMSWVRQAPGKRLEWVAHISSGGSSTYYPDTVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRAEDTAMYYCTRQFYYGSSFWYFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSR
LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSL
LHSNGNTYLHWYQQRPGQSPNHLIYQVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQTTHVPWTFGGGTKVEI
KGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFISYYIYWVKQAPGQCLEWIGGINPRNGGTN
FNEKFKSRATLTVDTSISTAYMELSRLRSEDTAVYYCTRHGNGVYWGQGTTLTVSS

ScFv-HC-IgG4의 전장 수식 중쇄(버전1)(SEQ ID NO: 135)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMSWVRQAPGKRLEWVAHISSGGSSTYYPDTVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRAEDTAMYYCTRQFYYGSSFWYFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSR
LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSL
LHSNGNTYLHWYQQRPGQSPNHLIYQVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQTTHVPWTFGGGTKVEI
KGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFISYYIYWVKQAPGQGLEWIGGINPRNGGTN
FNEKFKSRATLTVDTSISTAYMELSRLRSEDTAVYYCTRHGNGVYWGQGTTLTVSS

ScFv-HC-IgG4의 전장 경쇄(SEQ ID NO: 136)
DNVLTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVDFDGDSYMNWYQQKPGQPPRLLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEP
EDFATYYCQQSNEDPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ScFv-HC-IgG1-LALA의 전장 수식 중쇄(버전2)(SEQ ID NO: 137)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMSWVRQAPGKRLEWVAHISSGGSSTYYPDTVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRAEDTAMYYCTRQFYYGSSFWYFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF

도면48c

FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCR
SSQSLLHSNGNTYLHWYQQRPGQSPNHLIYQVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQTTHVPWTFGCG
TKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFISYYIYWVKQAPGQCLEWIGGINPRN
GGTNFNEKFKSRATLTVDTSISTAYMELSRLRSEDTAVYYCTRHGNGVYWGQGTTLTVSS

ScFv-HC-IgG1-LALA의 전장 수식 중쇄(버전1)(SEQ ID NO: 138)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMSWVRQAPGKRLEWVAHISSGGSSTYYPDTVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRAEDTAMYYCTRQFYYGSSFWYFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCR
SSQSLLHSNGNTYLHWYQQRPGQSPNHLIYQVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQTTHVPWTFGGG
TKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFISYYIYWVKQAPGQGLEWIGGINPRN
GGTNFNEKFKSRATLTVDTSISTAYMELSRLRSEDTAVYYCTRHGNGVYWGQGTTLTVSS

ScFv-HC-IgG1-LALA의 전장 경쇄(SEQ ID NO: 139)
DNVLTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVDFDGDSYMNWYQQKPGQPPRLLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEP
EDFATYYCQQSNEDPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

IgG4, IgG2 및 IgG1 경쇄 고정 영역(CL)(SEQ ID NO: 146)
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

IgG1 중쇄 고정 영역(SEQ ID NO: 147)
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

LALA 돌연변이를 갖는 IgG1 중쇄 고정 영역(SEQ ID NO: 148)

도면48d

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

IgG4 중쇄 고정 영역(SEQ ID NO: 149)
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSN
TKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

KIH 돌연변이를 갖는 IgG4 고정 영역(SEQ ID NO: 150)
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCN
VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

KIH 돌연변이를 갖는 IgG4 Fc 영역(CH1 영역 결실)(SEQ ID NO: 151)
DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

아테졸리주맙 VH(SEQ ID NO: 211)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYL
QMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSS

아테졸리주맙 VL(SEQ ID NO: 212)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA
TYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIK

아벨루맙 VH(SEQ ID NO: 213)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGQGTLVTVSS

도면48e

아벨루맙 VL(SEQ ID NO: 214)
QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAE
DEADYYCSSYTSSSTRVFGTGTKVTVL

아테졸리주맙-6A7-FVHC-IgG1-LALA(중쇄)(SEQ ID NO: 215)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYL
QMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS
QSLLHSNGNTYLHWYQQRPGQSPNHLIYQVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQTTHVPWTFGCGTK
VEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFISYYIYWVKQAPGQCLEWIGGINPRNGG
TNFNEKFKSRATLTVDTSISTAYMELSRLRSEDTAVYYCTRHGNGVYWGQGTTLTVSS

아테졸리주맙-6A7-FVHC-IgG1-LALA(경쇄)(SEQ ID NO: 216)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA
TYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

아벨루맙-6A7-FVHC-IgG1-LALA(중쇄)(SEQ ID NO: 217)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS
QSLLHSNGNTYLHWYQQRPGQSPNHLIYQVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQTTHVPWTFGCGTK
VEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFISYYIYWVKQAPGQCLEWIGGINPRNGG
TNFNEKFKSRATLTVDTSISTAYMELSRLRSEDTAVYYCTRHGNGVYWGQGTTLTVSS

아벨루맙-6A7-FVHC-IgG1-LALA(경쇄)(SEQ ID NO: 218)

도면48f

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAE
DEADYYCSSYTSSSTRVFGTGTKVTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVET
TKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> EUCURE (BEIJING) BIOPHARMA CO., LTD.

<120> ANTI-PD-1/CD40 BISPECIFIC ANTIBODIES AND USES THEREOF

<130> 1

<150> PCT/CN2020/120918

<151> 2020-10-14

<150> PCT/CN2021/085335

<151> 2021-04-02

<160> 218

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 1

Ser Tyr Ser Met Ser

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 2

His Ile Ser Ser Gly Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 3

Gln Phe Tyr Tyr Gly Ser Ser Phe Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 4

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn

1 5 10 15

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 5

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 6

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr

1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 7

Ser Tyr Trp Met His

1 5

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 8

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

1 5 10 15

Asp

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 9

Gly Val Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> CDR sequence

<400> 10

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 11

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 12

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Leu Thr

1 5

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 13

Ser Tyr Trp Met His

1 5

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 14

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

1 5 10 15

Asp

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 15

Gly Thr Ala Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 16

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 17

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 18

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Gln Thr

1 5

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 19

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Ser

1 5 10

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 20

Ser Ser Gly Gly Ser Ser

1 5

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 21

Gln Phe Tyr Tyr Gly Ser Ser Phe Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 22

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn

1 5 10 15

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 23

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 24

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr

1 5

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 25

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His

1 5 10

<210> 26

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 26

Asn Pro Ser Thr Gly Tyr

1 5

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 27

Gly Val Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 28

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 29

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 30

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Leu Thr

1 5

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 31

Gly Tyr Thr Leu Thr Ser Tyr Trp Met His

1 5 10

<210> 32

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 32

Asn Pro Asn Thr Gly Tyr

1 5

<210> 33

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 33

Gly Thr Ala Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 34

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 35

<211> 7

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 35

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 36

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 36

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Gln Thr

1 5

<210> 37

<211> 288

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln

1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp

20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp

35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val

50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala

65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg

85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg

100 105 110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu

115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val

130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro

145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly

165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys

180 185 190

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

195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly

210 215 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro

225 230 235 240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly

245 250 255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg

260 265 270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu

275 280 285

<210> 38

<211> 288

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 38

Met Trp Val Arg Gln Val Pro Trp Ser Phe Thr Trp Ala Val Leu Gln

1 5 10 15

Leu Ser Trp Gln Ser Gly Trp Leu Leu Glu Val Pro Asn Gly Pro Trp

20 25 30

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

35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Leu Ser Asn Trp Ser Glu Asp Leu Met

50 55 60

Leu Asn Trp Asn Arg Leu Ser Pro Ser Asn Gln Thr Glu Lys Gln Ala

65 70 75 80

Ala Phe Cys Asn Gly Leu Ser Gln Pro Val Gln Asp Ala Arg Phe Gln

85 90 95

Ile Ile Gln Leu Pro Asn Arg His Asp Phe His Met Asn Ile Leu Asp

100 105 110

Thr Arg Arg Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu

115 120 125

His Pro Lys Ala Lys Ile Glu Glu Ser Pro Gly Ala Glu Leu Val Val

130 135 140

Thr Glu Arg Ile Leu Glu Thr Ser Thr Arg Tyr Pro Ser Pro Ser Pro

145 150 155 160

Lys Pro Glu Gly Arg Phe Gln Gly Met Val Ile Gly Ile Met Ser Ala

165 170 175

Leu Val Gly Ile Pro Val Leu Leu Leu Leu Ala Trp Ala Leu Ala Val

180 185 190

Phe Cys Ser Thr Ser Met Ser Glu Ala Arg Gly Ala Gly Ser Lys Asp

195 200 205

Asp Thr Leu Lys Glu Glu Pro Ser Ala Ala Pro Val Pro Ser Val Ala

210 215 220

Tyr Glu Glu Leu Asp Phe Gln Gly Arg Glu Lys Thr Pro Glu Leu Pro

225 230 235 240

Thr Ala Cys Val His Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Thr Glu Gly

245 250 255

Leu Gly Ala Ser Ala Met Gly Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Leu Gln

260 265 270

Gly Pro Arg Pro Pro Arg His Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu

275 280 285

<210> 39

<211> 288

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric PD-1

<400> 39

Met Trp Val Arg Gln Val Pro Trp Ser Phe Thr Trp Ala Val Leu Gln
1 5 10 15

Leu Ser Trp Gln Ser Gly Trp Leu Leu Glu Val Pro Asn Gly Pro Trp
20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
100 105 110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Val Val
130 135 140

Thr Glu Arg Ile Leu Glu Thr Ser Thr Arg Tyr Pro Ser Pro Ser Pro
145 150 155 160

Lys Pro Glu Gly Arg Phe Gln Gly Met Val Ile Gly Ile Met Ser Ala
165 170 175

Leu Val Gly Ile Pro Val Leu Leu Leu Leu Ala Trp Ala Leu Ala Val
180 185 190

Phe Cys Ser Thr Ser Met Ser Glu Ala Arg Gly Ala Gly Ser Lys Asp
195 200 205

Asp Thr Leu Lys Glu Glu Pro Ser Ala Ala Pro Val Pro Ser Val Ala
210 215 220

Tyr Glu Glu Leu Asp Phe Gln Gly Arg Glu Lys Thr Pro Glu Leu Pro
225 230 235 240

Thr Ala Cys Val His Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Thr Glu Gly
245 250 255

Leu Gly Ala Ser Ala Met Gly Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Leu Gln
260 265 270

Gly Pro Arg Pro Pro Arg His Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
275 280 285

<210> 40

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain

<400> 40

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

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

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

Ala His Ile Ser Ser Gly Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

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

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

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

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 41

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain

<400> 41

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ile Ser Ser Gly Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 42

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain

<400> 42

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

1 5 10 15

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

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

<210> 43
<211> 111
<212
> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> light chain variable domain
<400> 43
Asp Asn 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 Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30
Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

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

Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 44

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain

<400> 44

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 45

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain

<400> 45

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Val Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn

85 90 95

Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 46

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210

> 47

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain

<400> 47

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 48

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain

<400> 48

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

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

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

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

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 49
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> heavy chain variable domain
<400> 49
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 50
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> light chain variable domain
<400> 50

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 Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30
Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

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

<210> 51
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> light chain variable domain
<400> 51

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln

85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105 110

<210> 52

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain

<400> 52

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln

85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105 110

<210> 53

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain

<400> 53

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

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

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala His Ile Ser Ser Gly Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

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

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

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

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 54

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain

<400> 54

Asp Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Val 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 Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn

85 90 95

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

100 105 110

<210> 55

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain

<400> 55

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 56

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain

<400> 56

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

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

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

35 40 45

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

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

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

Ser Tyr Asn Leu Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105 110

<210> 57

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain

<400> 57

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

Ser Leu Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 58

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain

<400> 58

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 59

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 59

Asp Tyr Tyr Met Tyr

1 5

<210> 60

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 60

Tyr Ile Ser Tyr Gly Gly Asp Ser Thr Phe Tyr Pro Asp Thr Val Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 61

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 61

Pro Ala Pro Ser Ala His Ser Tyr Tyr Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 62

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 62

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 63

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 63

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser

1 5

<210

> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 64

Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Phe Thr

1 5

<210> 65

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 65

Ser Tyr Tyr Ile Tyr

1 5

<210> 66

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 66

Gly Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Ser

<210> 67

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 67

His Gly Asn Gly Val Tyr

1 5

<210> 68

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 68

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

1 5 10 15

<210> 69

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 69

Gln Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 70

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 70

Ser Gln Thr Thr His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 71

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 71

Ser Gly Tyr Trp Asn

1 5

<210> 72

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 72

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

1 5 10 15

<210> 73

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 73

Phe Arg Arg Tyr Asp Asp Gly Val Asp Tyr

1 5 10

<210> 74

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 74

Arg Ala Ser His Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Ser

1 5 10

<210> 75

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 75

Ala Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 76

Leu Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp Thr

1 5

<210> 77

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 77

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Tyr

1 5 10

<210> 78

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 78

Ser Tyr Gly Gly Asp Ser

1 5

<210> 79

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 79

Pro Ala Pro Ser Ala His Ser Tyr Tyr Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 80

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 80

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 81

<211>

7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 81

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser

1 5

<210> 82

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 82

Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Phe Thr

1 5

<210> 83

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 83

Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Tyr Tyr Ile Tyr

1 5 10

<210> 84

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 84

Asn Pro Arg Asn Gly Gly

1 5

<210> 85

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 85

His Gly Asn Gly Val Tyr

1 5

<210> 86

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 86

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

1 5 10 15

<210> 87

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 87

Gln Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 88

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 88

Ser Gln Thr Thr His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 89

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 89

Gly Asp Ser Val Ser Ser Gly Tyr Trp Asn

1 5 10

<210> 90

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 90

Ser Tyr Ser Gly Ser

1 5

<210> 91

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 91

Phe Arg Arg Tyr Asp Asp Gly Val Asp Tyr

1 5 10

<210> 92

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 92

Arg Ala Ser His Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Ser

1 5 10

<210> 93

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 93

Ala Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR sequence

<400> 94

Leu Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp Thr

1 5

<210> 95

<211> 277

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr

1 5 10 15

Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu

20 25 30

Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val

35 40 45

Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu

50 55 60

Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His

65 70 75 80

Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr

85 90 95

Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr

100 105 110

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

115 120 125

Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu

130 135 140

Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys

145 150 155 160

Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln

165 170 175

Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu

180 185 190

Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile

195 200 205

Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn

210 215 220

Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp

225 230 235 240

Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His

245 250 255

Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser

260 265 270

Val Gln Glu Arg Gln

275

<210> 96

<211> 289

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 96

Met Val Ser Leu Pro Arg Leu Cys Ala Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
1 5 10 15

Ala Val His Leu Gly Gln Cys Val Thr Cys Ser Asp Lys Gln Tyr Leu
20 25 30

His Asp Gly Gln Cys Cys Asp Leu Cys Gln Pro Gly Ser Arg Leu Thr
35 40 45

Ser His Cys Thr Ala Leu Glu Lys Thr Gln Cys His Pro Cys Asp Ser
50 55 60

Gly Glu Phe Ser Ala Gln Trp Asn Arg Glu Ile Arg Cys His Gln His
65 70 75 80

Arg His Cys Glu Pro Asn Gln Gly Leu Arg Val Lys Lys Glu Gly Thr
85 90 95

Ala Glu Ser Asp Thr Val Cys Thr Cys Lys Glu Gly Gln His Cys Thr
100 105 110

Ser Lys Asp Cys Glu Ala Cys Ala Gln His Thr Pro Cys Ile Pro Gly
115 120 125

Phe Gly Val Met Glu Met Ala Thr Glu Thr Thr Asp Thr Val Cys His
130 135 140

Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Gln Ser Ser Leu Phe Glu Lys
145 150 155 160

Cys Tyr Pro Trp Thr Ser Cys Glu Asp Lys Asn Leu Glu Val Leu Gln
165 170 175

Lys Gly Thr Ser Gln Thr Asn Val Ile Cys Gly Leu Lys Ser Arg Met
180 185 190

Arg Ala Leu Leu Val Ile Pro Val Val Met Gly Ile Leu Ile Thr Ile
195 200 205

Phe Gly Val Phe Leu Tyr Ile Lys Lys Val Val Lys Lys Pro Lys Asp

210 215 220

Asn Glu Ile Leu Pro Pro Ala Ala Arg Arg Gln Asp Pro Gln Glu Met
225 230 235 240

Glu Asp Tyr Pro Gly His Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu
245 250 255

His Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile
260 265 270

Ser Val Gln Glu Arg Gln Val Thr Asp Ser Ile Ala Leu Arg Pro Leu
275 280 285

Val

<210> 97

<211> 289

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric CD40

<400> 97

Met Val Ser Leu Pro Arg Leu Cys Ala Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
1 5 10 15

Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu
20 25 30

Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val
35 40 45

Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu
50 55 60

Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His
65 70 75 80

Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr
85 90 95

Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr
100 105 110

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

115 120 125

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

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

His Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile
260 265 270
Ser Val Gln Glu Arg Gln Val Thr Asp Ser Ile Ala Leu Arg Pro Leu
275 280 285
Val

<210> 98
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> heavy chain variable domain
<400> 98
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Pro Ala Pro Ser Ala His Ser Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 99
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> heavy chain variable domain
<400> 99
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

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

65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Pro Ala Pro Ser Ala His Ser Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 100
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> heavy chain variable domain

<400> 100
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Tyr Ile Ser Tyr Gly Gly Asp Ser Thr Phe Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

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

<210> 101
<211> 107
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><223> light chain variable domain
<400> 101

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

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

<210> 102
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> light chain variable domain

<400> 102
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gly Ala Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Leu Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Ala Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 103

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain

<400> 103

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gly Ala Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Leu Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Gln

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Ala Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 104

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain

<400> 104

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Leu Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Ala Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 105
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> heavy chain variable domain
<400> 105
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 Ile Ser Tyr

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

85 90 95
Ala Arg His Gly Asn Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 106

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain

<400> 106

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 Ile Ser Tyr

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

85 90 95
Ala Arg His Gly Asn Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 107

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain

<400> 107

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 Ile Ser Tyr

20 25 30

Tyr Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Arg His Gly Asn Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 108

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain

<400> 108

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Arg His Gly Asn Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 109

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain

<400> 109

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 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

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

85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 110

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain

<400> 110

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 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Asn His Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Phe 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 Phe Cys Ser Gln Thr

85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 111

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain

<400> 111

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

1 5 10 15

Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Asn His Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Phe 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 Phe Cys Ser Gln Thr

85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 112

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain

<400> 112

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Gly

20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Lys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Thr Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

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

85 90 95

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 113

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain

<400> 113

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Gly

20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Lys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

85 90 95
Arg Phe Arg Arg Tyr Asp Asp Gly Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 114
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> heavy chain variable domain
<400> 114
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Gly

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

85 90 95
Arg Phe Arg Arg Tyr Asp Asp Gly Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 115

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain

<400> 115

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

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

85 90 95
Arg Phe Arg Arg Tyr Asp Asp Gly Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 116

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain

<400> 116

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

20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gly Val Ile Lys Arg Leu Ile
35 40 45
Asn Ala Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Arg 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 Ser Ser Tyr Pro Trp

85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 117
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> light chain variable domain
<400> 117
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser His Glu Ile Ser Gly Tyr
20 25 30

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

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

<210> 118
<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain

<400> 118

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser His Glu Ile Ser Gly Tyr
20 25 30

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

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

Ser Arg Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp
85 90 95

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

<210> 119

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain

<400> 119

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

Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser His Glu Ile Ser Gly Tyr
20 25 30

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

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

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

<210> 120
<211> 121

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> heavy chain variable domain
<400> 120
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Tyr Ile Ser Tyr Gly Gly Asp Ser Thr Phe Tyr Pro Asp Thr Val

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

<210> 121
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain

<400> 121

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Leu Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Phe
85 90 95

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

<210> 122

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain

<400> 122

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

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

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

Gly Gly Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

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

85 90 95

Thr Arg His Gly Asn Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 123

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain

<400> 123

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

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 124

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain

<400> 124

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

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

<210> 125
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> light chain variable domain
<400> 125
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 His Glu Ile Ser Gly Tyr
20 25 30
Leu Ser Trp Ile Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
35 40 45

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

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 126

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain

<400> 126

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Arg His Gly Asn Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 127

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain

<400> 127

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 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Asn His Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Phe 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 Phe Cys Ser Gln Thr

85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 128

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain

<400> 128

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Arg His Gly Asn Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 129

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain

<400> 129

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

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 130

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Full-length PD-1 heavy chain of Fab-ScFV-IgG4

<400> 130

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ile Ser Ser Gly Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp

195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr

210 215 220

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro

225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp

260 265 270

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

275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val

290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Leu Pro Pro Cys Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp

355 360 365

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

370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

385 390 395 400

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

405 410 415

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly

435 440 445

Lys

<210> 131

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Full-length PD-1 light chain of Fab-ScFV-IgG4

<400> 131

Asp Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp

20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Val Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn

85 90 95

Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

165 170 175

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

180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 132

<211> 483

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Full-length CD40 arm (version 2) of Fab-ScFV-IgG4

<400> 132

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

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

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

Gln Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
195 200 205
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
210 215 220
Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Thr Thr His Val Pro Trp Thr

225 230 235 240

Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Asp Lys Arg Val Glu Ser

245 250 255

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

Leu Gly Lys

<210> 133

<211> 483

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Full-length CD40 arm (version 1) of Fab-ScFV-IgG4

<400> 133

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

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

Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Thr Arg His Gly Asn Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

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

Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser
145 150 155 160

Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu
165 170 175

His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Asn His Leu Ile Tyr
180 185 190

Gln Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
195 200 205

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

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

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

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

Leu Gly Lys

<210> 134

<211> 710

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Full-length modified heavy chain (version 2) of ScFv-HC-IgG4

<400> 134

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ile Ser Ser Gly Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp

195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr

210 215 220

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro

225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp

260 265 270

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

275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val

290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

355 360 365

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

370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

385 390 395 400

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

405 410 415

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp

450 455 460

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

465 470 475 480

Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn

485 490 495

Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro

500 505 510

Asn His Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp

515 520 525

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

530 535 540

Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Thr Thr

545 550 555 560

His Val Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

Ile Ser Tyr Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu

625 630 635 640

Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn

645 650 655

Glu Lys Phe Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser

660 665 670

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

675 680 685

Tyr Tyr Cys Thr Arg His Gly Asn Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

690 695 700

Thr Leu Thr Val Ser Ser

705 710

<210> 135

<211> 710

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Full-length modified heavy chain (version 1) of ScFv-HC-IgG4

<400> 135

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ile Ser Ser Gly Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

115 120 125

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

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

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

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

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
450 455 460
Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly Gln
465 470 475 480
Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn
485 490 495
Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro
500 505 510

Asn His Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp
515 520 525
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser
530 535 540
Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Thr Thr
545 550 555 560
His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
565 570 575

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
580 585 590
Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
595 600 605
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

610 615 620

Ile Ser Tyr Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
625 630 635 640

Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn
645 650 655

Glu Lys Phe Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser
660 665 670

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
675 680 685

Tyr Tyr Cys Thr Arg His Gly Asn Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
690 695 700

Thr Leu Thr Val Ser Ser
705 710

<210> 136

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Full-length light chain of ScFv-HC-IgG4

<400> 136

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

Ser Val Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

165 170 175

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

180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 137

<211> 713

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Full-length modified heavy chain (version 2) of ScFv-HC-IgG1-LALA

<400> 137

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ile Ser Ser Gly Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

180 185 190

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

195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
450 455 460
Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr
465 470 475 480
Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu
485 490 495
His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly
500 505 510

Gln Ser Pro Asn His Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly
515 520 525
Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
530 535 540
Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser
545 550 555 560
Gln Thr Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu

565 570 575

Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
580 585 590
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
595 600 605
Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly
610 615 620
Tyr Thr Phe Ile Ser Tyr Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly
625 630 635 640

Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr
645 650 655
Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr
660 665 670
Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Glu Asp
675 680 685
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg His Gly Asn Gly Val Tyr Trp Gly
690 695 700

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
705 710

<210> 138
<211> 713
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Full-length modified heavy chain (version 1) of ScFv-HC-IgG1-LALA
<400> 138
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

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

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

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

450 455 460

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

465 470 475 480

Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu

485 490 495

His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly

500 505 510

Gln Ser Pro Asn His Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly

515 520 525

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

530 535 540

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser

545 550 555 560

Gln Thr Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu

565 570 575

Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

580 585 590

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu

595 600 605

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

610 615 620

Tyr Thr Phe Ile Ser Tyr Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly

625 630 635 640

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr

645 650 655

Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr

660 665 670

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

675 680 685

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg His Gly Asn Gly Val Tyr Trp Gly

690 695 700

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

705 710

<210> 139

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Full-length light chain of ScFv-HC-IgG1-LALA

<400> 139

Asp Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp

20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Val Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn

85 90 95

Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

165 170 175

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

180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 140

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Full length of PD1-1A7-H2K3-IgG4 heavy chain

<400> 140

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ile Ser Ser Gly Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp

195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr

210 215 220

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro

225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

245 250 255

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

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

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

420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445
Lys

<210> 141
<211> 218
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Full length of PD1-1A7-H2K3-IgG4 light chain
<400> 141

Asp Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp

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

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

145 150 155 160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 142
<211> 441
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Full length of CD40-6A7-H4K2-IgG2 heavy chain

<400> 142

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

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

Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Thr Arg His Gly Asn Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
100 105 110

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

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

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

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

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly
180 185 190

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

Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys
210 215 220

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

225 230 235 240

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
245 250 255

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
260 265 270

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
275 280 285

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
290 295 300

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
305 310 315 320

Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
325 330 335

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
340 345 350

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
355 360 365

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
370 375 380

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
385 390 395 400

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
405 410 415

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 143

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Full length of CD40-6A7-H4K2-IgG2 light chain

<400> 143

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 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Asn His Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Phe 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 Phe Cys Ser Gln Thr
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

165 170 175

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 144

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Full length of Selicrelumab heavy chain

<400> 144

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 Gly Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr
100 105 110

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
130 135 140

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr
195 200 205

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

210 215 220

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
225 230 235 240

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
290 295 300

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

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

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 145

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Full length of Selicrelumab light chain

<400> 145

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Tyr Ser Trp
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ile Phe Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 146

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG4, IgG2 and IgG1 light chain constant region (CL)

<400> 146

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 147

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG1 heavy chain constant region

<400> 147

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

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

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

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

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

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 148

<211> 330

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG1 heavy chain constant region with LALA mutations

<400> 148

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

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

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

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

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 149

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG4 heavy chain constant region

<400> 149

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

<210> 150

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG4 constant region with KIH mutations

<400> 150

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 151

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG4 Fc (CH1 region deleted) region with KIH mutations

<400> 151

Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15
Ala Pro Glu Phe 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 Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln 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 Phe 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
Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
115 120 125
Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
130 135 140
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala 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
Val Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu 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 Leu Gly Lys
225 230

<210> 152

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker peptide sequence-1

<400> 152

Ala Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20

<210> 153

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker peptide sequence-2

<400> 153

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 154

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker peptide sequence-3

<400> 154

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 155

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD40 ScFV-1 (VH-VL) version 1

<400> 155

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

1 5 10 15

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

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

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

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

<210> 156

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD40 ScFV-2 (VH-VL) version 2

<400> 156

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Arg His Gly Asn Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr

100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu

165 170 175

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

180 185 190

Gln Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

195 200 205

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

210 215 220

Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Thr Thr His Val Pro Trp Thr

225 230 235 240

Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

245 250

<210> 157

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD40 ScFV-3 (VL-VH) version 2

<400> 157

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 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Asn His Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Phe 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 Phe Cys Ser Gln Thr

85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Phe Ile Ser Tyr Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Cys

165 170 175

Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Phe

180 185 190

Asn Glu Lys Phe Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile

195 200 205

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala

210 215 220

Val Tyr Tyr Cys Thr Arg His Gly Asn Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly

225 230 235 240

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

245

<210> 158

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD40 ScFV-4 (VL-VH) version 1

<400> 158

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 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Asn His Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Phe 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 Phe Cys Ser Gln Thr

85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Phe Ile Ser Tyr Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly

165 170 175

Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Phe

180 185 190

Asn Glu Lys Phe Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile

195 200 205

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala

210 215 220

Val Tyr Tyr Cys Thr Arg His Gly Asn Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly

225 230 235 240

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

245

<210> 159

<211> 290

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> PD-L1

<400> 159

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu

1 5 10 15

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr

20 25 30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu

35 40 45

Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile

50 55 60

Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
65 70 75 80

Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
100 105 110

Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val

115 120 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
130 135 140

Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
145 150 155 160

Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
165 170 175

Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn

180 185 190

Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
195 200 205

Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
210 215 220

Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
225 230 235 240

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr

245 250 255

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys

260 265 270

Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
275 280 285

Glu Thr

290

<210> 160

<211> 261

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> CD40 Ligand

<400> 160

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu

20 25 30

Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg

35 40 45

Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val

50 55 60

Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser

65 70 75 80

Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys

85 90 95

Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu

100 105 110

Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser

115 120 125

Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly

130 135 140

Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln

145 150 155 160

Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr

165 170 175

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser

180 185 190

Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala

195 200 205

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His

210 215 220

Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn

225 230 235 240

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe

245 250 255

Gly Leu Leu Lys Leu

260

<210

> 161

<211> 711

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PD1-C40-6A7-FV3A (heavy chain)

<400> 161

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ile Ser Ser Gly Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp

195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr

210 215 220

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro

225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp

260 265 270

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

275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val

290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

355 360 365

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

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
435 440 445
Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln
450 455 460
Thr Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile
465 470 475 480
Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
485 490 495

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val
500 505 510
Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
515 520 525
Thr Phe Ile Ser Tyr Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln
530 535 540
Cys Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn
545 550 555 560

Phe Asn Glu Lys Phe Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser
565 570 575
Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Glu Asp Thr
580 585 590
Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg His Gly Asn Gly Val Tyr Trp Gly Gln
595 600 605
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

610 615 620

Gly Ser Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
625 630 635 640
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
645 650 655
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
660 665 670
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
675 680 685

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
690 695 700
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
705 710

<210> 162
<211> 716
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Toripalimab-6A7-HC-IgG1-LALA (heavy chain)
<400> 162
Gln Gly 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 Asp Tyr

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

85 90 95

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

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

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

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

450 455 460

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

465 470 475 480

Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln

485 490 495

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

500 505 510

Arg Pro Gly Gln Ser Pro Asn His Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg

515 520 525

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

530 535 540

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr

545 550 555 560

Phe Cys Ser Gln Thr Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr

565 570 575

Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Arg Asn

645 650 655

Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr

660 665 670

Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg

675 680 685

Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg His Gly Asn Gly Val

690 695 700

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

705 710 715

<210> 163

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Toripalimab-6A7-HC-IgG1-LALA (light chain)

<400> 163

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 Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe 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 Phe Gln Gly

85 90 95

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

100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 164

<211> 711

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pembrolizumab-6A7-HC-IgG1-LALA (heavy chain)

<400> 164

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val 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

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

260 265 270

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

275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

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

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

465 470 475 480
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
485 490 495
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
500 505 510
Pro Asn His Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
515 520 525
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

530 535 540
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Thr

545 550 555 560

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

Phe Ile Ser Tyr Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Cys

625 630 635 640

Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Phe

645 650 655

Asn Glu Lys Phe Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile

660 665 670

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala

675 680 685

Val Tyr Tyr Cys Thr Arg His Gly Asn Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly

690 695 700

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

705 710

<210> 165

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pembrolizumab-6A7-HC-IgG1-LALA (light chain)

<400> 165

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

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 Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg

85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

165 170 175

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

180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 166

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1A7-selicrelumab-FVKH-IgG4 PD-1 arm (heavy chain)

<400> 166

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ile Ser Ser Gly Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp

195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr

210 215 220

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro

225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp

260 265 270

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

275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val

290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Leu Pro Pro Cys Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp

355 360 365

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

370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

385 390 395 400

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

405 410 415

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly

435 440 445

Lys

<210> 167

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1A7-selicrelumab-FVKH-IgG4 (light chain)

<400> 167

Asp Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp

20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Val Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn

85 90 95

Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

165 170 175

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

180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 168

<211> 717

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1A7-selicrelumab-FV3A-IgG4 (heavy chain)

<400> 168

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

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

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

Ala His Ile Ser Ser Gly Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

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

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

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

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
130 135 140

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

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

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

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
210 215 220

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

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

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

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

465 470 475 480

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
485 490 495
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
500 505 510
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
515 520 525
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
530 535 540

Gly Trp Ile Asn Pro Asp Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
545 550 555 560
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
565 570 575
Met Glu Leu Asn Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
580 585 590
Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr
595 600 605

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
610 615 620
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
625 630 635 640
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
645 650 655
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
660 665 670

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
675 680 685
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
690 695 700
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
705 710 715

<210> 169

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1A7-selicrelumab-FV3A-IgG4 (light chain)

<400> 169

Asp Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp

20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Val Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn

85 90 95

Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

165 170 175

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

180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 170

<211> 564

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1A7-selicrelumab-DART-IgG4 (heavy chain)

<400> 170

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Tyr Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ile Phe 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 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

115 120 125

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

130 135 140

Ser Ser Tyr Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu

145 150 155 160

Glu Trp Val Ala His Ile Ser Ser Gly Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Pro

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Tyr Tyr Cys Thr Arg Gln Phe Tyr Tyr Gly Ser Ser Phe Trp Tyr Phe

210 215 220

Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys

305 310 315 320

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu

325 330 335

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr

405 410 415

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

420 425 430

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
435 440 445
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
450 455 460
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
465 470 475 480

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
485 490 495
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
500 505 510
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
515 520 525
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
530 535 540

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
545 550 555 560
Ser Pro Gly Lys

<210> 171
<211> 352
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 1A7-selicrelumab-DART-IgG4 (light chain)
<400> 171
Asp Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

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

Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val 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 Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160

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

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

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
290 295 300
Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser

305 310 315 320

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His

325 330 335

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

340 345 350

<210> 172

<211> 716

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1A7-selicrelumab-FVHC-IgG4 (heavy chain)

<400> 172

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ile Ser Ser Gly Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

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

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

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

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
450 455 460

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp
465 470 475 480

Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Tyr Ser Trp Leu
485 490 495

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile Tyr
500 505 510

Thr Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
515 520 525

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
530 535 540

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ile Phe Pro Leu Thr
545 550 555 560

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly
565 570 575

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val
580 585 590

Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val
595 600 605

Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met
610 615 620

His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp
625 630 635 640

Ile Asn Pro Asp Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly
645 650 655

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu

660 665 670

Leu Asn Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

675 680 685

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

690 695 700

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

705 710 715

<210> 173

<211> 486

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1A7-selicrelumab-FVKH-IgG4 CD40 arm (heavy chain)

<400> 173

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Tyr Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ile Phe Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser

100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met

195 200 205

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

210 215 220

Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr Phe

225 230 235 240

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Asp Lys Arg

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

Ser Leu Ser Leu Gly Lys

485

<210> 174

<211> 352

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1A7-selicrelumab-FVHC-IgG4(light chain)

<400> 174

Asp Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp

20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Val Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn

85 90 95

Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val 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 Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asp Ser Gly Gly
165 170 175

Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp
180 185 190

Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Asn Arg Leu Arg Ser Asp
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys
210 215 220

Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
225 230 235 240

Val Thr Val Ser Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
245 250 255

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
260 265 270

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
275 280 285

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
290 295 300

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

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
325 330 335

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

340 345 350

<210> 175

<211> 714

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pembrolizumab-Seli-FVHC-IgG4(heavy chain)

<400> 175

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val 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

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

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140

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

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

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

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly

435 440 445

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln

450 455 460

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val

465 470 475 480

Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Tyr Ser Trp Leu Ala Trp

485 490 495

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

500 505 510

Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser

515 520 525

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

530 535 540

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ile Phe Pro Leu Thr Phe Gly

545 550 555 560

Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Asn

660 665 670

Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gln

675 680 685

Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp

690 695 700

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

705 710

<210> 176

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pembrolizumab-Seli-FVHC-IgG4(light chain)

<400> 176

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

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 Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg

85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

165 170 175

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

<210> 177
<211> 710
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Pembrolizumab-APX005M-FVHC-IgG4(heavy chain)
<400> 177
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val 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
Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

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

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

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

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

405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly

435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile

450 455 460

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

465 470 475 480

Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Arg Leu Ala

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Cys Thr Gly Tyr Gly Ile Ser Trp Pro

545 550 555 560

Ile Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

Ile Tyr Thr Gly Asp Gly Thr Asn Tyr Ser Ala Ser Trp Ala Lys Gly

645 650 655

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
660 665 670
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
675 680 685

Pro Asp Ile Thr Tyr Gly Phe Ala Ile Asn Phe Trp Gly Pro Gly Thr
690 695 700
Leu Val Thr Val Ser Ser
705 710

<210> 178
<211> 218
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Pembrolizumab-APX005M-FVHC-IgG4(light chain)
<400> 178
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser

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

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

165 170 175

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

180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 179

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cemiplimab VH

<400> 179

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Thr Tyr Phe Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Lys Trp Gly Asn Ile Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210

> 180

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cemiplimab VL

<400> 180

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu His Gly Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Thr Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Val Val Asp Phe Arg

100 105

<210> 181

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Toripalimab VH

<400> 181

Gln Gly 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 Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Glu Ser Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

<210> 182

<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Toripalimab VL
<400> 182
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 Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe 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 Phe Gln Gly
85 90 95
Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 183
<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sintilimab VH

<400> 183

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

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

<210> 184

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sintilimab VL

<400> 184

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

Ser Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

<210> 185
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Camrelizumab VH
<400> 185
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

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

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

<210> 186
<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camrelizumab VL

<400> 186

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 Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Tyr Ser Ile Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 187

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tislelizumab VH

<400> 187

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Tyr Ala Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 188
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Tislelizumab VL
<400> 188
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 Glu Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Asn Tyr Ala Phe His Arg Phe Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Ala Tyr Ser Ser Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 189
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> RMP14 VH

<400> 189

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

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

85 90 95
Ala Arg Ser Asp Asn Met Gly Thr Thr Pro Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 190

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RMP14 VL

<400> 190

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

20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45
Leu Ala Ser His Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Ala Asp
65 70 75 80
Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Trp Asn Asp Pro Trp Thr

85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 191
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> APX005M VH
<400> 191
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Thr
20 25 30

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

Ala Arg Pro Asp Ile Thr Tyr Gly Phe Ala Ile Asn Phe Trp Gly Pro
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 192
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> APX005M VL

<400> 192

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 Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Arg
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Cys Thr Gly Tyr Gly Ile Ser
85 90 95

Trp Pro Ile Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 193

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FGK4.5 VH (mouse)

<400> 193

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

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

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Thr Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Ser Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95
Gly Arg His Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val

100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 194
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> FGK4.5 VL
<400> 194
Asp Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Ala Val Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Asp Ser Val Ser Thr Leu Met
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

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

<210> 195
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Anti-mCD40 VH
<400> 195

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

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

<210> 196

<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Anti-mCD40 VL
<400> 196
Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Pro Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Ser
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Arg Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Thr Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Ser Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ala Thr Tyr Pro His
85 90 95

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

<210> 197

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Mitazalimab VH

<400> 197

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Gly Gly Ser Ser Tyr Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Ile Leu Arg Gly Gly Ser Gly Met Asp Leu Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 198

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mitazalimab VL

<400> 198

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

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly

20 25 30

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

35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Ile Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu

65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Lys Ser

85 90 95

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

100 105 110

<210> 199

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> selicrelumab VH

<400> 199

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 Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr

100 105 110

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

115 120 125

<210> 200

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> selicrelumab VL

<400> 200

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Tyr Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ile Phe Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 201

<211> 721

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Selicrelumab-1A7-FVHC-IgG4 (heavy chain)

<400> 201

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 Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

450 455 460

Gly Gly Gly Ser Asp Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser

465 470 475 480

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

485 490 495

Val Asp Phe Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

500 505 510

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

515 520 525

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

530 535 540

Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

545 550 555 560

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val

565 570 575

Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro

625 630 635 640

Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala His Ile Ser Ser Gly Gly Ser Ser

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Thr Arg Gln Phe Tyr Tyr Gly Ser Ser

690 695 700

Phe Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

705 710 715 720

Ser

<210> 202

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Selicrelumab-1A7-FVHC-IgG4 (light chain)

<400> 202

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Tyr Ser Trp
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ile Phe Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 203

<211> 615

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SdAb-6A7-FVHC-IgG1-LALA (heavy chain)

<400> 203

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

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

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
195 200 205

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

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

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
385 390 395 400
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
405 410 415
Pro Asn His Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
420 425 430
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
435 440 445

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Thr

450 455 460

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
465 470 475 480

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
485 490 495

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
500 505 510

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
515 520 525

Phe Ile Ser Tyr Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Cys
530 535 540

Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Phe
545 550 555 560

Asn Glu Lys Phe Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile
565 570 575

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
580 585 590

Val Tyr Tyr Cys Thr Arg His Gly Asn Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly
595 600 605

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
610 615

<210> 204

<211> 352

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SdAb VHH

<400> 204

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

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

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ala Val

```
        35                  40                  45
Ser Cys Ile Ser Ser Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

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

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
        275                 280                 285
```

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
290 295 300

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
305 310 315 320

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
325 330 335

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
340 345 350

<210> 205

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker peptide sequence-4

<400> 205

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 206

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> selicrelumab ScFV

<400> 206

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Tyr Ser Trp
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

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

<210> 207
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Pembrolizumab VH
<400> 207
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val 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

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 208

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pembrolizumab VL

<400> 208

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

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 Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg

85 90 95

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

100 105 110

<210> 209

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> nivolumab VH

<400> 209

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser

<210> 210

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> nivolumab VL

<400> 210

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

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

<210> 211
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Atezolizumab VH
<400> 211
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 212

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Atezolizumab VL

<400> 212

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 213

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Avelumab VH

<400> 213

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

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

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

35 40 45

Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 214

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Avelumab VL

<400> 214

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

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr

20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser

85 90 95

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

100 105 110

<210> 215

<211> 709

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Atezolizumab-6A7-FVHC-IgG1-LALA (heavy chain)

<400> 215

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser

20 25 30

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

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

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

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

85 90 95

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

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

210 215 220

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

275 280 285

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

340 345 350

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

405 410 415

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

```
    450                 455                 460
Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro

465                 470                 475                 480
Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly
                485                 490                 495
Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Asn
            500                 505                 510
His Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg
        515                 520                 525
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg

    530                 535                 540
Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Thr Thr His
545                 550                 555                 560
Val Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly
                565                 570                 575
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
            580                 585                 590
Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro

        595                 600                 605
Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile
    610                 615                 620
Ser Tyr Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu
625                 630                 635                 640
Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu
                645                 650                 655
Lys Phe Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr

            660                 665                 670
Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
        675                 680                 685
Tyr Cys Thr Arg His Gly Asn Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
    690                 695                 700
```

Leu Thr Val Ser Ser

705

<210> 216

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Atezolizumab-6A7-FVHC-IgG1-LALA (light chain)

<400> 216

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

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

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

180 185 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 217

<211> 711

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Avelumab-6A7-FVHC-IgG1-LALA (heavy chain)

<400> 217

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

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

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

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

85 90 95

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

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

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

145 150 155 160

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

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

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

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

405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

485 490 495

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser

500 505 510

Pro Asn His Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

515 520 525

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

530 535 540

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Thr

545 550 555 560

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

Phe Ile Ser Tyr Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Cys

625 630 635 640

Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Phe

645 650 655

Asn Glu Lys Phe Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile

660 665 670

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala

675 680 685

Val Tyr Tyr Cys Thr Arg His Gly Asn Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly

690 695 700

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

705 710

<210> 218

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Avelumab-6A7-FVHC-IgG1-LALA (light chain)

<400> 218

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

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr

20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser

85 90 95

Ser Thr Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln

100 105 110

Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu

115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr

130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215