



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0021859  
(43) 공개일자 2024년02월19일

- |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/>C07K 16/24 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)<br/>A61P 35/00 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/>C07K 16/24 (2013.01)<br/>A61P 35/00 (2018.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2024-7000669</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2022년06월15일<br/>심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2024년01월08일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2022/066289</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2022/263501<br/>국제공개일자 2022년12월22일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>21180204.6 2021년06월18일<br/>유럽특허청(EPO)(EP)</p> | <p>(71) 출원인<br/>에프. 호프만-라 로슈 아게<br/>스위스 체하-4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124</p> <p>(72) 발명자<br/>조지스 가이<br/>독일 82377 펜츠베르크 논넨발트 2 로슈 디아그노스틱스 게엠베하<br/>피셔 옌스<br/>독일 82377 펜츠베르크 논넨발트 2 로슈 디아그노스틱스 게엠베하<br/>(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인<br/>제일특허법인(유)</p> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

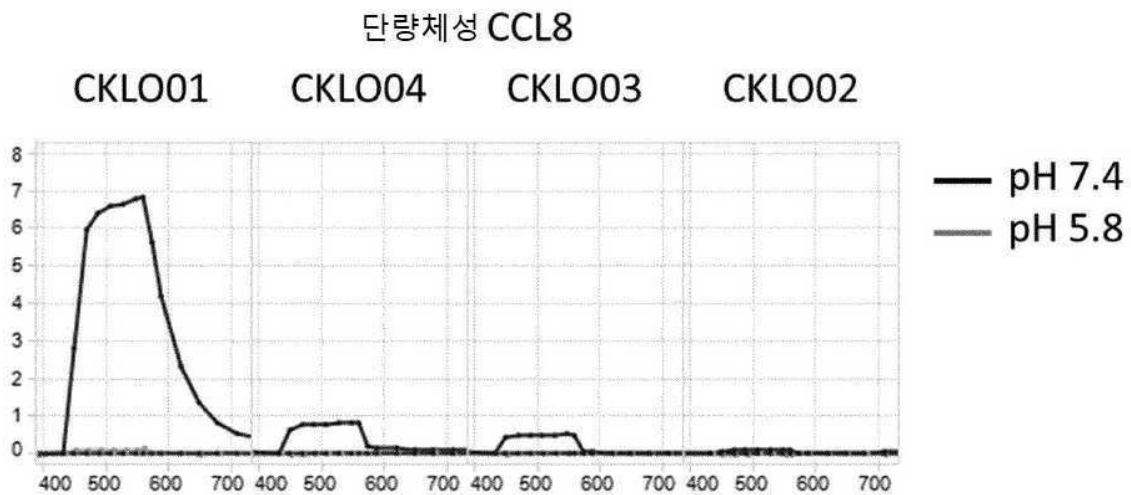
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 이중특이적 항-CCL2 항체

(57) 요약

본원 발명은 인간 CCL2 상에서 2개의 상이한 에피토프에 결합하는 이중특이적 항-CCL2 항체, 이들의 약학 조성물, 이들의 제조, 그리고 암, 염증, 자가면역 및 안과 질환의 치료를 위한 약제로서 용도에 관계한다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

**A61P 37/00** (2018.01)  
*A61K 2039/505* (2013.01)  
*C07K 2317/31* (2013.01)  
*C07K 2317/33* (2013.01)  
*C07K 2317/524* (2013.01)  
*C07K 2317/526* (2013.01)  
*C07K 2317/76* (2013.01)  
*C07K 2317/92* (2013.01)

(72) 발명자

**카프르지크 루카스**

독일 82377 펜츠베르크 논넨발트 2 로슈 디아그노스틱스 게엠베하

**룬자 발레리아**

독일 82377 펜츠베르크 논넨발트 2 로슈 디아그노스틱스 게엠베하

**시도우-안데르센 자스민**

독일 82377 펜츠베르크 논넨발트 2 로슈 디아그노스틱스 게엠베하

**베르티네티-라파르티 크리스티나**

스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게

**게르츠 미하엘**

스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게

**평 슈**

싱가포르 싱가포르 138623 바이오폴리스 드라이브 3 추가이 콰마바디 리서치 피티이 리미티드 내

**간 시욱 완**

싱가포르 싱가포르 138623 바이오폴리스 드라이브 3 추가이 콰마바디 리서치 피티이 리미티드 내

**호 웨이 시웅 아드리안**

싱가포르 싱가포르 138623 바이오폴리스 드라이브 3 추가이 콰마바디 리서치 피티이 리미티드 내

**람 룬이 아델린**

싱가포르 싱가포르 138623 바이오폴리스 드라이브 3 추가이 콰마바디 리서치 피티이 리미티드 내

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

인간 CCL2 상에서 첫 번째 에피토프에 (특이적으로) 결합하는 첫 번째 항원 결합 부위 및 인간 CCL2 상에서 두 번째 상이한 에피토프에 (특이적으로) 결합하는 두 번째 상이한 항원 결합 부위를 포함하는 이중특이적 항체로서,

여기서 이중특이적 항체는

a) (N 말단에서 C 말단 방향으로) VH1-CH1-L1-힌지-CH2-CH3-L2-VL1-CL을 포함하는 첫 번째 폴리펩티드 사슬로서, 여기서

VH1은 첫 번째 중쇄 가변 도메인이고 VL1은 첫 번째 가변 경쇄 도메인이며 (둘 모두 함께(함께 연결되어) 첫 번째 항원 결합 부위를 형성함),

CH1은 불변 중쇄 도메인 1이고,

L1은 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 청구항에서 5개 내지 10개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,

힌지는 중쇄 힌지 영역이고,

CH2는 불변 중쇄 도메인 2이고,

CH3은 불변 중쇄 도메인 3이고,

L2는 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 청구항에서 10개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,

CL은 불변 경쇄 도메인인 첫 번째 폴리펩티드 사슬,

그리고

b) (N 말단에서 C 말단 방향으로) VH2-CH1-L1-힌지-CH2-CH3-L2-VL2-CL을 포함하는 두 번째 폴리펩티드 사슬로서, 여기서

VH2는 두 번째 중쇄 가변 도메인이고 VL2는 두 번째 가변 경쇄 도메인이며(둘 모두 함께(함께 연결되어) 두 번째 항원 결합 부위를 형성함),

CH1은 불변 중쇄 도메인 1이고,

L1은 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 청구항에서 5개 내지 10개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,

힌지는 중쇄 힌지 영역이고,

CH2는 불변 중쇄 도메인 2이고,

CH3은 불변 중쇄 도메인 3이고,

L2는 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 청구항에서 10개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,

CL은 불변 경쇄 도메인인 두 번째 폴리펩티드 사슬을 포함하고,

여기서,

A) i) VH1 도메인은 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하고;

VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고

ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;

VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;

또는

B) i) VH1 도메인은 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하고;

VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고

ii) VH2 도메인은 서열 번호: 91의 아미노산 서열을 포함하고;

VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;

또는

C) i) VH1 도메인은 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하고;

VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고

ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;

VL2 도메인은 서열 번호: 94의 아미노산 서열을 포함하거나;

또는

D) i) VH1 도메인은 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 포함하고;

VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고

ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;

VL2 도메인은 서열 번호: 94의 아미노산 서열을 포함하거나;

또는

E) i) VH1 도메인은 서열 번호: 73의 아미노산 서열을 포함하고;

VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고

ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;

VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;

또는

F) i) VH1 도메인은 서열 번호: 73의 아미노산 서열을 포함하고;

VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고

ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;

VL2 도메인은 서열 번호: 94의 아미노산 서열을 포함하거나;

또는

G) i) VH1 도메인은 서열 번호: 73의 아미노산 서열을 포함하고;

VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고

ii) VH2 도메인은 서열 번호: 92의 아미노산 서열을 포함하고;

VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;

또는

H) i) VH1 도메인은 서열 번호: 73의 아미노산 서열을 포함하고;

VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고

ii) VH2 도메인은 서열 번호: 91의 아미노산 서열을 포함하고;

VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;  
또는

I) i) VH1 도메인은 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 포함하고;  
VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고  
ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;  
VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;  
또는

J) i) VH1 도메인은 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 포함하고;  
VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고  
ii) VH2 도메인은 서열 번호: 92의 아미노산 서열을 포함하고;  
VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;  
또는

K) i) VH1 도메인은 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 포함하고;  
VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고  
ii) VH2 도메인은 서열 번호: 91의 아미노산 서열을 포함하고;  
VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;  
또는

L) i) VH1 도메인은 서열 번호: 74의 아미노산 서열을 포함하고;  
VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고  
ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;  
VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;  
또는

M) i) VH1 도메인은 서열 번호: 74의 아미노산 서열을 포함하고;  
VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고  
ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;  
VL2 도메인은 서열 번호: 94의 아미노산 서열을 포함하거나;  
또는

N) i) VH1 도메인은 서열 번호: 74의 아미노산 서열을 포함하고;  
VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고  
ii) VH2 도메인은 서열 번호: 92의 아미노산 서열을 포함하고;  
VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;  
또는

O) i) VH1 도메인은 서열 번호: 74의 아미노산 서열을 포함하고;  
VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고  
ii) VH2 도메인은 서열 번호: 91의 아미노산 서열을 포함하고;  
VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;

또는

P) i) VH1 도메인은 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하고;

VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고

ii) VH2 도메인은 서열 번호: 92의 아미노산 서열을 포함하고;

VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하는, 이중특이적 항체.

## 청구항 2

제1항에 있어서,

i) VH1 도메인은 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하고;

VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고

ii) VH2 도메인은 서열 번호: 91의 아미노산 서열을 포함하고;

VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하는, 이중특이적 항체.

## 청구항 3

제1항에 있어서,

i) VH1 도메인은 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하고;

VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고

ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;

VL2 도메인은 서열 번호: 94의 아미노산 서열을 포함하는, 이중특이적 항체.

## 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

L1은 9개 내지 11개 아미노산의 길이를 갖는 폴리펩티드 링커이고,

L2는 9개 내지 11개 아미노산의 길이를 갖는 폴리펩티드 링커인, 이중특이적 항체.

## 청구항 5

제4항에 있어서,

L1 및 L2는 아래의 군에서 선택되는 폴리펩티드 링커인, 이중특이적 항체: GSGGSGGSGG(서열 번호: 183), GSGGGSGGGG(서열 번호: 184), GSGGGSGGG(서열 번호: 185); GSGGSGGGG(서열 번호: 186), GSGGGSGGG(서열 번호: 187), GSGGGSGGG(서열 번호: 188), GGGSGGSGGG(서열 번호: 189), GGGSGGSGG(서열 번호: 190), 및 GGGSGGSGG(서열 번호: 191).

## 청구항 6

제4항에 있어서,

L1은 GSGGGSGGG(서열 번호: 188)의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 링커이고,

L2는 GSGGGSGGG(서열 번호: 188)의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 링커인, 이중특이적 항체.

## 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 불변 중쇄 도메인 CH1, 힌지, CH2 및 CH3은 인간 IgG 아이소타입, 바람직하게는 인간 IgG1 아이소타입인, 이중특이적 항체.

## 청구항 8

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이적 항체는

- i) 시험관내에서 CCL2와 이의 수용체 CCR2의 결합을 차단(리포터 분석,  $IC_{50}=0.5nM$ )하고/하거나;
- ii) 시험관내에서 골수 세포의 CCL2 매개 화학주성을 억제( $IC_{50}=1.5nM$ )하고/하거나;
- iii) cyno 및 인간 CCL2에 교차반응성인, 이중특이적 항체.

#### 청구항 9

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이적 항체는 CCL2에 결합과 비교하여, CCL8, CCL7 및 CCL13의 군에서 선택되는 다른 CCL 동족체에 교차반응성이 아닌, 이중특이적 항체.

#### 청구항 10

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이적 항체는 인간 CCL2에 pH 의존성 방식으로 결합하고, 그리고 첫 번째 항원 결합 부위 및 두 번째 항원 결합 부위 둘 모두 산성 pH에서보다 중성 pH에서 더 높은 친화성으로 CCL2에 결합하는, 이중특이적 항체.

#### 청구항 11

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이적 항체는 pH 5.8에서보다 pH 7.4에서 10배 더 높은 친화성으로 인간 CCL2에 결합하는, 이중특이적 항체.

#### 청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 불변 중쇄 도메인 CH1, 힌지, CH2 및 CH3은 인간 IgG1 아이소타입이고 아래의 돌연변이(Kabat EU 넘버링) 중 하나 이상을 포함하는, 이중특이적 항체:

- i) Q311R 및/또는 P343R; 및/또는
- ii) L234Y, L235W, G236N, P238D, T250V, V264I, H268D, Q295L, T307P, K326T 및/또는 A330K; 및/또는
- iii) M428L, N434A 및/또는 Y436T; 및/또는
- iv) Q438R 및/또는 S440E.

#### 청구항 13

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 불변 중쇄 도메인 CH1, 힌지, CH2 및 CH3은 인간 IgG1 아이소타입이고 아래의 돌연변이(Kabat EU 넘버링) 중 하나 이상을 포함하는, 이중특이적 항체:

- i) Q311R, 및/또는 P343R; 및/또는
- ii) L235W, G236N, H268D, Q295L, K326T 및/또는 A330K; 및/또는
- iii) N434A; 및/또는
- iv) Q438R 및/또는 S440E.

#### 청구항 14

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 불변 중쇄 도메인 CH1, 힌지, CH2 및 CH3은 인간 IgG1 아이소타입이고 아래의 돌연변이(Kabat EU 넘버링) 중 하나 이상을 포함하는, 이중특이적 항체:

- i) Q311R 및 P343R;
- ii) L234Y, P238D, T250V, V264I, T307V 및 A330K;
- iii) M428L, N434A 및 Y436T; 그리고
- iv) Q438R 및 S440E.

#### 청구항 15

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 불변 중쇄 도메인 CH3은 아래의 돌연변이(Kabat EU 넘버링)를 포함하는, 이중특이적 항체:

K447G.

#### 청구항 16

전술한 청구항 중 어느 한 항에 따른 항체를 인코딩하는 핵산.

#### 청구항 17

제16항의 핵산을 포함하는 숙주 세포.

#### 청구항 18

항체를 생산하는 방법으로서, 항체가 생산되도록 제17항의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 19

제18항에 있어서, 항체를 숙주 세포로부터 회수하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

#### 청구항 20

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체 및 약학적으로 허용되는 운반체를 포함하는 약학 제제.

#### 청구항 21

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 약제로서 이용하기 위한, 이중특이적 항체.

#### 청구항 22

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 암, 또는 염증 질환 또는 자가면역 질환을 치료하는 데 이용하기 위한, 이중특이적 항체.

#### 청구항 23

약제의 제조에서 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체의 용도.

#### 청구항 24

제23항에 있어서, 약제는 암의 치료를 위한 것인, 용도.

#### 청구항 25

제24항에 있어서, 약제는 염증 질환 또는 자가면역 질환의 치료를 위한 것인, 용도.

#### 청구항 26

암을 겪는 개체를 치료하는 방법으로서, 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체의 효과량을 상기 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 27

염증 질환 또는 자가면역 질환을 겪는 개체를 치료하는 방법으로서, 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체의 효과량을 상기 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

### 발명의 설명

### 기술 분야

본원 발명은 인간 CCL2 상에서 2개의 상이한 에피토프에 결합하는 이중특이적 항-CCL2 항체, 이들의 약학 조성

[0001]

물, 이들의 제조, 그리고 암, 염증, 자가면역 및 안과 질환의 치료를 위한 약제로서 용도에 관계한다.

## 배경 기술

[0002]

### 배경

[0003]

CCL2/CCR2 축은 종양 내로 미성숙 골수 세포 모집의 주요 매개체이다. CCL2는 악성 세포에 의해 과발현되고, 화학유인물질 구배를 구축하는 세포외 기질 (ECM)에 결합한다. 일단 이들이 종양에 도달하면, 골수 유래 억제 세포 (MDSC)가 항염증성 사이토킨/수용체를 분비/상향조절함으로써 친종양형성 환경에 기여하며, 이들은 차례로 항종양 T 세포 반응의 개시를 억제한다. 이러한 방식으로, MDSC는 임의의 T 세포 활성화 요법의 효능을 감소시키거나 심지어 손상시킬 수 있다 (Meyer et al, 2014). 이런 이유로, 이들 미성숙 골수 세포의 모집의 특이적 억제는 관문 억제제, T 세포 이중특이적 항체 (TCB) 또는 기타 암 면역요법 (CIT)의 효능을 부양할 것이다. 이에 더하여, CCL2는 혈관형성, 전이 및 종양 성장의 증진에도 연루되었는데, 이는 CCL2를 중화하는 것이 항종양 개입의 여러 라인에 기여할 수도 있다는 것을 암시하였다.

[0004]

CCL2 (이의 수용체와는 대조적으로)를 표적화하는 것은 바람직하지 않은 CCL2 매개 효과를 특이적으로 억제하여, 동일한 수용체 (CCR2), 그러나 Th1 및 NK 세포와 같은 다른 면역 세포 모집단의 모집에 관련되는 상이한 리간드 (예를 들면 CCL7, CCL8, CCL13)를 통해 신호할 수 있는 것들을 남겨둘 것이다.

[0005]

임상적으로, CCL2는 상이한 염증성 질환, 예컨대 류마티스 관절염 (Haringman et al, Arthritis Rheum. 2006 Aug;54(8): 2387-92), 특발성 폐섬유증 (Raghu et al, Eur Respir J. 2015 Dec;46(6): 1740-50), 당뇨병성 신장병증 (Menne et al, Nephrol Dial Transplant (2017) 32: 307-315) 및 암 (Sandhu et al, Cancer Chemother Pharmacol. 2013 Apr;71(4): 1041-50)에 의해 유발된 이의 상승된 수준을 중화하는 것을 목적으로 하는 여러 연구에서 바람직한 항체-표적이었다. 그러나, 관찰된 높은 생체내 항체-항원 해리 상수 (KD)와 함께 이의 높은 합성율은 임상적으로 실행 가능한 용량에서 전통적인 항체에 의한 자유 CCL2의 억제를 방해하는 주된 걸림돌인 것으로 입증되었다 (Fetterly et al, J Clin Pharmacol. 2013 Oct;53(10): 1020-7).

[0006]

CCL2 중화는 유방암 (BC), 난소암 (OvCa), 대장암 (CRC), 췌장암 및 전립선암과 같은 여러 유형의 암에서 관찰된 상승된 CCL2 혈청 수준을 갖는 환자에서 더 명백히 관련이 있는 것으로 보인다. 그러나, 이러한 혈청학을 나타내지 않지만 종양이 골수 계통의 면역 세포로 고도로 침윤된 이러한 적응증 내의 환자라도 위에서 언급한 바와 같이 CCL2가 종양 상황에서 수행하는 많은 역할로 인해 이 새로운 요법으로 큰 이익을 얻을 수 있다.

[0007]

Igawa et al, Immunological Reviews 270 (2016) 132-151에서는 생성된 항체가 허용 가능한 약동학 프로필을 유지하기 위해, pH 의존성 CDR (항원 분해를 유도하는, 산성 엔도솜 내에서 항체-항원 해리를 위한), 그리고 최적화된 등전점 (pI), FcγRIIb에 대한 향상된 결합 (면역 복합체의 세포 흡수에 유리함) 및 신생아 Fc 수용체에 대한 중간 정도의 친화성을 갖는 조작된 Fc 부분을 보유하는 스위핑 기술을 설명한다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0008]

### 발명의 요약

[0009]

본원 발명은 인간 CCL2 상에서 2개의 상이한 에피토프에 결합하는 일정한 이중특이적 항-CCL2 항체, 이들의 약학 조성물, 이들의 제조, 그리고 암, 염증, 자가면역 및 안과 질환의 치료를 위한 약제로서 용도에 관계한다.

[0010]

본원 발명은 인간 CCL2 상에서 첫 번째 에피토프에 (특이적으로) 결합하는 첫 번째 항원 결합 부위 및 인간 CCL2 상에서 두 번째 상이한 에피토프에 (특이적으로) 결합하는 두 번째 상이한 항원 결합 부위를 포함하는 이중특이적 항체를 제공하는데,

[0011]

여기서 이중특이적 항체는

[0012]

a) (N 말단에서 C 말단 방향으로) VH1-CH1-L1-힌지-CH2-CH3-L2-VL1-CL을 포함하는 첫 번째 폴리펩티드 사슬로서, 여기서

[0013]

VH1은 첫 번째 중쇄 가변 도메인이고 VL1은 첫 번째 가변 경쇄 도메인이며 (둘 모두 함께 (함께 연결되어) 첫 번째 항원 결합 부위를 형성함),

[0014]

CH1은 불변 중쇄 도메인 1이고,

- [0015] L1은 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 실시형태에서 5개 내지 10개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,
- [0016] 힌지는 중쇄 힌지 영역이고,
- [0017] CH2는 불변 중쇄 도메인 2이고,
- [0018] CH3은 불변 중쇄 도메인 3이고,
- [0019] L2는 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 실시형태에서 10개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,
- [0020] CL은 불변 경쇄 도메인인 첫 번째 폴리펩티드 사슬,
- [0021] 그리고
- [0022] b) (N 말단에서 C 말단 방향으로) VH2-CH1-L1-힌지-CH2-CH3-L2-VL2-CL을 포함하는 두 번째 폴리펩티드 사슬로서, 여기서
- [0023] VH2는 두 번째 중쇄 가변 도메인이고 VL2는 두 번째 가변 경쇄 도메인이며 (둘 모두 함께 (함께 연결되어) 두 번째 항원 결합 부위를 형성함),
- [0024] CH1은 불변 중쇄 도메인 1이고,
- [0025] L1은 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 실시형태에서 5개 내지 10개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,
- [0026] 힌지는 중쇄 힌지 영역이고,
- [0027] CH2는 불변 중쇄 도메인 2이고,
- [0028] CH3은 불변 중쇄 도메인 3이고,
- [0029] L2는 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 실시형태에서 10개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,
- [0030] CL은 불변 경쇄 도메인인 두 번째 폴리펩티드 사슬을 포함하고,
- [0031] 여기서,
- [0032] A) i) VH1 도메인은 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0033] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0034] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0035] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0036] 또는
- [0037] B) i) VH1 도메인은 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0038] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0039] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 91의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0040] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0041] 또는
- [0042] C) i) VH1 도메인은 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0043] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0044] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0045] VL2 도메인은 서열 번호: 94의 아미노산 서열을 포함하거나;

- [0046] 또는
- [0047] D) i) VH1 도메인은 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0048] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0049] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0050] VL2 도메인은 서열 번호: 94의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0051] 또는
- [0052] E) i) VH1 도메인은 서열 번호: 73의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0053] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0054] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0055] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0056] 또는
- [0057] F) i) VH1 도메인은 서열 번호: 73의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0058] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0059] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0060] VL2 도메인은 서열 번호: 94의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0061] 또는
- [0062] G) i) VH1 도메인은 서열 번호: 73의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0063] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0064] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 92의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0065] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0066] 또는
- [0067] H) i) VH1 도메인은 서열 번호: 73의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0068] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0069] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 91의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0070] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0071] 또는
- [0072] I) i) VH1 도메인은 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0073] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0074] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0075] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0076] 또는
- [0077] J) i) VH1 도메인은 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0078] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0079] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 92의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0080] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0081] 또는

- [0082] K) i) VH1 도메인은 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0083] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0084] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 91의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0085] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0086] 또는
- [0087] L) i) VH1 도메인은 서열 번호: 74의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0088] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0089] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0090] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0091] 또는
- [0092] M) i) VH1 도메인은 서열 번호: 74의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0093] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0094] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0095] VL2 도메인은 서열 번호: 94의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0096] 또는
- [0097] N) i) VH1 도메인은 서열 번호: 74의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0098] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0099] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 92의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0100] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0101] 또는
- [0102] O) i) VH1 도메인은 서열 번호: 74의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0103] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0104] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 91의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0105] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0106] 또는
- [0107] P) i) VH1 도메인은 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0108] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0109] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 92의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0110] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0111] 본원 발명의 실시형태는 전술된 이중특이적 항체이고, 여기서
- [0112] i) VH1 도메인은 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0113] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0114] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 91의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0115] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0116] 본원 발명의 실시형태는 전술된 이중특이적 항체이고, 여기서
- [0117] i) VH1 도메인은 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하고;

- [0118] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0119] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0120] VL2 도메인은 서열 번호: 94의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0121] 본원 발명의 실시형태에서 불변 중쇄 도메인 CH1, 힌지, CH2 및 CH3은 인간 IgG 아이소타입, 바람직하게는 인간 IgG1 아이소타입이다.
- [0122] 본원 발명의 실시형태에서 이중특이적 항체는
- [0123] i) 시험관내에서 CCL2와 이의 수용체 CCR2의 결합을 차단(리포터 분석,  $IC_{50}=0.5nM$ )하고/하거나;
- [0124] ii) 시험관내에서 골수 세포의 CCL2 매개 화학주성을 억제( $IC_{50}=1.5nM$ )하고/하거나;
- [0125] iii) cyno 및 인간 CCL2에 교차반응성이다.
- [0126] 본원 발명의 실시형태에서 이중특이적 항체는
- [0127] 이중특이적 항체는 다른 CCL 동족체에 교차반응성이 아니다 (CCL2에 결합과 비교하여 다른 CCL 동족체 (CCL8, CCL7 및 CCL13의 군에서 선택됨)에 100 배 더 적은 결합을 보여준다).
- [0128] 본원 발명의 실시형태에서 이중특이적 항체는
- [0129] 이중특이적 항체는 인간 CCL2 상에서 첫 번째와 두 번째 에피토프에 이온 의존성 방식으로 결합한다.
- [0130] 본원 발명의 실시형태에서 이중특이적 항체는
- [0131] 이중특이적 항체는 인간 CCL2에 pH 의존성 방식으로 결합하고, 그리고 첫 번째 항원 결합 부위 및 두 번째 항원 결합 부위 둘 모두 산성 pH에서보다 중성 pH에서 더 높은 친화성으로 CCL2에 결합한다.
- [0132] 본원 발명의 실시형태에서 이중특이적 항체는
- [0133] 이중특이적 항체는 pH 5.8에서보다 pH 7.4에서 10배 더 높은 친화성으로 인간 CCL2에 결합한다.
- [0134] 본원 발명의 실시형태에서 불변 중쇄 도메인 CH1, 힌지, CH2 및 CH3은 인간 IgG1 아이소타입이고 아래의 돌연변이 (Kabat EU 넘버링) 중 하나 이상을 포함한다:
- [0135] i) Q311R, 및/또는 P343R (항원의 흡수를 향상시키기 위해 pI를 증가시키는 데 적합함); 및/또는
- [0136] ii) L235W, G236N, H268D, Q295L, K326T 및/또는 A330K (인간 FcγRIIb에 대한 친화성을 증가시키고 다른 인간 FcγR에 대한 친화성을 감소시키는 데 적합함); 및/또는
- [0137] iii) N434A (더 긴 혈장 반감기를 위해 FcRn에 대한 친화성을 증가시키는 데 적합함); 및/또는
- [0138] iv) Q438R 및/또는 S440E (류마티스 인자 결합을 억제하는 데 적합함).
- [0139] 본원 발명의 실시형태에서 불변 중쇄 도메인 CH1, 힌지, CH2 및 CH3은 인간 IgG1 아이소타입이고 아래의 돌연변이 (Kabat EU 넘버링) 중 하나 이상을 포함한다:
- [0140] i) Q311R 및/ P343R (항원의 흡수를 향상시키기 위해 pI를 증가시키는 데 적합함);
- [0141] ii) L234Y, P238D, T250V, V264I, T307V 및 A330K (인간 FcγRIIb에 대한 친화성을 증가시키고 다른 인간 FcγR에 대한 친화성을 감소시키는 데 적합함);
- [0142] iii) M428L, N434A 및 Y436T (더 긴 혈장 반감기를 위해 FcRn에 대한 친화성을 증가시키는 데 적합함); 그리고
- [0143] iv) Q438R 및 S440E (류마티스 인자 결합을 억제하는 데 적합함).
- [0144] 본원 발명은 본원에 설명된 바와 같은 발명에 따른 이중특이적 항체를 인코딩하는 단리된 핵산을 추가로 제공한다.
- [0145] 본원 발명은 이런 핵산을 포함하는 숙주 세포를 추가로 제공한다.
- [0146] 본원 발명은 이중특이적 항체를 생산하는 방법을 추가로 제공하는데, 상기 방법은 이중특이적 항체가 생산되도록 이런 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

- [0147] 본원 발명은 본원에 설명된 바와 같은 발명에 따른 이중특이적 항체 및 약학적으로 허용되는 운반체를 포함하는 약학 제제를 추가로 제공한다.
- [0148] 본원 발명은 약제로서 이용하기 위한 본원에 설명된 바와 같은 발명에 따른 이중특이적 항체를 추가로 제공한다.
- [0149] 본원 발명은 암을 치료하는 데 이용하기 위한 본원에 설명된 바와 같은 발명에 따른 이중특이적 항체를 추가로 제공한다.
- [0150] 본원 발명은 염증 질환 또는 자가면역 질환을 치료하는 데 이용하기 위한 본원에 설명된 바와 같은 발명에 따른 이중특이적 항체를 추가로 제공한다.
- [0151] 본원 발명은 약제의 제조에서 본원에 설명된 바와 같은 발명에 따른 이중특이적 항체의 용도를 추가로 제공한다.
- [0152] 한 가지 양상에서, 본원 발명은 본원에 설명된 바와 같은 이중특이적 항체가 상이한 항-CCL2 항원 결합 부위를 첫 번째와 두 번째 항원 결합 부위/모이어티로서 이용한다는 조사 결과에 부분적으로 기초한다. 이들 이중특이적 항-CCL2 항체는 CCL2의 일정한 에피토프에 높은 특이성으로 결합하고, CCL2와 이의 수용체 CCR2의 결합을 특이적으로 억제하는 능력을 갖는다. 이들은 단일특이적 항체와 비교하여 개선된 면역 복합체 형성 및 개선된 생체내 CCL2 제거를 보여준다. 본원에 설명된 콘토르스바디 (contorsbody) 형식의 특정한 이중특이적 항-CCL2 항체는 낮은 점도 (이것은 예를 들면 피하 투여에 적합한 높은 농도 용액을 가능하게 한다)와 같은 귀중한 특성을 추가로 나타낸다.

## 도면의 간단한 설명

### [0153] 도면에 관한 설명

도 1: 제조항 CCL2 및 CCL2 동족체에 대한 단일특이적 항-CCL2 항체 (CNT0888 (= CNT0), 1A5, 1G9 및 인간화 11K2 (=11k2)의 결합을 보여주는 표면 플라즈몬 공명 (Biacore®) 센서그램.

도 2a: a) 실선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 20mg/kg 단일특이적 항-CCL2 항체 CNT0888-SG1 (야생형 IgG1) 또는 b) 점선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 20mg/kg 단일특이적 항-CCL2 항체 CNT0888-SG105 (Fc 수용체 결합 침묵된 IgG1)로 구성되는 미리 형성된 면역 복합체의 FcRn 유전자도입 생쥐 내로 i.v. 주사 후 시간의 추이에서 hCCL2의 혈청 농도.

도 2b: a) 실선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 20mg/kg 단일특이적 항-CCL2 항체 11K2-SG1 (야생형 IgG1) 또는 b) 점선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 20mg/kg 단일특이적 항-CCL2 항체 11K2-SG105 (Fc 수용체 결합 침묵된 IgG1)로 구성되는 미리 형성된 면역 복합체의 FcRn 유전자도입 생쥐 내로 i.v. 주사 후 시간의 추이에서 hCCL2의 혈청 농도.

도 2c: a) 실선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 20mg/kg 단일특이적 항-CCL2 항체 ABN912-SG1 (야생형 IgG1) 또는 b) 점선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 20mg/kg 단일특이적 항-CCL2 항체 ABN912-SG105 (Fc 수용체 결합 침묵된 IgG1)로 구성되는 미리 형성된 면역 복합체의 FcRn 유전자도입 생쥐 내로 i.v. 주사 후 시간의 추이에서 hCCL2의 혈청 농도.

도 2d: a) 실선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 20mg/kg 단일특이적 항-CCL2 항체 1A4-SG1 (야생형 IgG1) 또는 b) 점선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 20mg/kg 단일특이적 항-CCL2 항체 1A4-SG105 (Fc 수용체 결합 침묵된 IgG1)로 구성되는 미리 형성된 면역 복합체의 FcRn 유전자도입 생쥐 내로 i.v. 주사 후 시간의 추이에서 hCCL2의 혈청 농도.

도 2e: a) 실선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 20mg/kg 단일특이적 항-CCL2 항체 1A5-SG1 (야생형 IgG1) 또는 b) 점선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 20mg/kg 단일특이적 항-CCL2 항체 1A5-SG105 (Fc 수용체 결합 침묵된 IgG1)로 구성되는 미리 형성된 면역 복합체의 FcRn 유전자도입 생쥐 내로 i.v. 주사 후 시간의 추이에서 hCCL2의 혈청 농도.

도 2f: a) 실선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 20mg/kg 단일특이적 항-CCL2 항체 1G9-SG1 (야생형 IgG1) 또는 b) 점선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 20mg/kg 단일특이적 항-CCL2 항체 1G9-SG105 (Fc 수용체 결합 침묵된 IgG1)로 구성되는 미리 형성된 면역 복합체의 FcRn 유전자도입 생쥐 내로 i.v. 주사 후 시간의 추이에서

hCCL2의 혈청 농도.

도 2g: a) 실선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 20mg/kg 단일특이적 항-CCL2 항체 2F6-SG1 (야생형 IgG1) 또는 b) 점선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 단일특이적 항-CCL2 항체 20mg/kg 2F6-SG105 (Fc 수용체 결합 침묵된 IgG1)로 구성되는 미리 형성된 면역 복합체의 FcRn 유전자도입 생쥐 내로 i.v. 주사 후 시간의 추이에서 hCCL2의 혈청 농도.

도 3: a) 실선: 20 mg/kg 단일특이적 항-CCL2 항체 11K2-SG1 (야생형 IgG1) 및 b) 점선: 20 mg/kg 단일특이적 항-CCL2 항체 11K2-SG105 (Fc 수용체 결합 침묵된 IgG1)의 생쥐에 i.v. 주사 후 혈청 총 생쥐 CCL2 농도 (도 3a) 및 항체-시간 프로파일 (도 3b)의 시간 경과를 보여준다.

도 4a: a) 실선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 20mg/kg 이중특이적 항-CCL2 항체 11K2//1G9-WT IgG1 (무손상 Fc 수용체 결합을 갖는 야생형 IgG1) 또는 b) 점선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 20mg/kg 이중특이적 항-CCL2 항체 11K2//1G9-PGLALA (Fc 수용체 결합 침묵된 IgG1)로 구성되는 미리 형성된 면역 복합체의 Balb/c 생쥐 내로 i.v. 주사 후 시간의 추이에서 hCCL2의 혈청 농도.

도 4b: a) 실선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 20mg/kg 이중특이적 항-CCL2 항체 CNT0888//11K2-WT IgG1 (무손상 Fc 수용체 결합을 갖는 야생형 IgG1) 또는 b) 점선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 20mg/kg 이중특이적 항-CCL2 항체 CNT0888//11K2-PGLALA (Fc 수용체 결합 침묵된 IgG1)로 구성되는 미리 형성된 면역 복합체의 Balb/c 생쥐 내로 i.v. 주사 후 시간의 추이에서 hCCL2의 혈청 농도.

도 4c: a) 실선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 20mg/kg 이중특이적 항-CCL2 항체 CNT0888//1G9-WT IgG1 (무손상 Fc 수용체 결합을 갖는 야생형 IgG1) 또는 b) 점선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 20mg/kg 이중특이적 항-CCL2 항체 11K2//1G9-PGLALA (Fc 수용체 결합 침묵된 IgG1)로 구성되는 미리 형성된 면역 복합체의 Balb/c 생쥐 내로 i.v. 주사 후 시간의 추이에서 hCCL2의 혈청 농도.

도 4d: a) 실선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 20mg/kg 이중특이적 항-CCL2 항체 CNT0888//1A5-WT IgG1 (무손상 Fc 수용체 결합을 갖는 야생형 IgG1) 또는 b) 점선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 20mg/kg 이중특이적 항-CCL2 항체 CNT0888//1A5-PGLALA (Fc 수용체 결합 침묵된 IgG1)로 구성되는 미리 형성된 면역 복합체의 Balb/c 생쥐 내로 i.v. 주사 후 시간의 추이에서 hCCL2의 혈청 농도.

도 4e: a) 실선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 20mg/kg 이중특이적 항-CCL2 항체 1A5//1G9-WT IgG1 (무손상 Fc 수용체 결합을 갖는 야생형 IgG1) 또는 b) 점선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 20mg/kg 이중특이적 항-CCL2 항체 1A5//1G9-PGLALA (Fc 수용체 결합 침묵된 IgG1)로 구성되는 미리 형성된 면역 복합체의 Balb/c 생쥐 내로 i.v. 주사 후 시간의 추이에서 hCCL2의 혈청 농도.

도 4f: a) 실선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 20mg/kg 이중특이적 항-CCL2 항체 11K2//2F6-WT IgG1 (무손상 Fc 수용체 결합을 갖는 야생형 IgG1) 또는 b) 점선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 20mg/kg 이중특이적 항-CCL2 항체 11K2//2F6-PGLALA (Fc 수용체 결합 침묵된 IgG1)로 구성되는 미리 형성된 면역 복합체의 Balb/c 생쥐 내로 i.v. 주사 후 시간의 추이에서 hCCL2의 혈청 농도.

도 4g: a) 실선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 20mg/kg 이중특이적 항-CCL2 항체 ABN912//11K2-WT IgG1 (무손상 Fc 수용체 결합을 갖는 야생형 IgG1) 또는 b) 점선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 20mg/kg 이중특이적 항-CCL2 항체 ABN912//11K2-PGLALA (Fc 수용체 결합 침묵된 IgG1)로 구성되는 미리 형성된 면역 복합체의 Balb/c 생쥐 내로 i.v. 주사 후 시간의 추이에서 hCCL2의 혈청 농도.

도 4h: a) 실선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 20mg/kg 이중특이적 항-CCL2 항체 1A4//2F6-WT IgG1 (무손상 Fc 수용체 결합을 갖는 야생형 IgG1) 또는 b) 점선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 20mg/kg 이중특이적 항-CCL2 항체 1A4//2F6-PGLALA (Fc 수용체 결합 침묵된 IgG1)로 구성되는 미리 형성된 면역 복합체의 Balb/c 생쥐 내로 i.v. 주사 후 시간의 추이에서 hCCL2의 혈청 농도.

도 4i: a) 실선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 20mg/kg 이중특이적 항-CCL2 항체 1A5//2F6-WT IgG1 (무손상 Fc 수용체 결합을 갖는 야생형 IgG1) 또는 b) 점선: 0.1mg/kg 인간 CCL2 (hCCL2) 및 20mg/kg 이중특이적 항-CCL2 항체 1A5//2F6-PGLALA (Fc 수용체 결합 침묵된 IgG1)로 구성되는 미리 형성된 면역 복합체의 Balb/c 생쥐 내로 i.v. 주사 후 시간의 추이에서 hCCL2의 혈청 농도.

도 5a: 4개의 변형된 11K2 및 4개의 CNT0888 변이체, 그리고 4개의 변형된 11K2 및 4개의 CNT0888 변이체의 개별 조합 항원 결합 모이어티의 생성된 16개의 이중특이적 항-CCL2 항체 CKL001 내지 CKL016의 pH7.4 (검은색

선) 및 pH5.8 (회색 선)에서 단량체성 CCL2에 대한 결합 프로필을 보여주는 Biacore® 센서그램.

도 5b: 4개의 변형된 11K2 및 4개의 CNT0888 변이체, 그리고 4개의 변형된 11K2 및 4개의 CNT0888 변이체의 개별 조합 항원 결합 모이어티의 생성된 16개의 이중특이적 항-CCL2 항체 CKL001 내지 CKL016의 단량체성 CCL2에 대한 결합 프로필을 보여주는 Biacore® 센서그램. pH 7.4에서 해리 단계 직후에 pH5.8에서 추가의 해리 단계가 BIACORE® 분석에 통합되었다.

도 6: pH7.4 (검은색 선) 및 pH5.8 (회색 선)에서 단량체성 CCL2에 대한 이중특이적 항-CCL2 항체 CKL001, CKL002, CKL003 및 CKL004의 결합 프로필을 보여주는 Biacore® 센서그램.

도 7a: hCCL2 및 이중특이적 항-CCL2 항체 (부모 CNT0//11K2 및 pH 의존성 변이체 CKL001, CKL002, CKL003 및 CKL004)로 구성되는 미리 형성된 면역 복합체의 SCID 생쥐 내로 주사 후 시간의 추이에서 hCCL2의 혈청 농도.

도 7b: hCCL2 및 CKL003 (IgG1 야생형 Fc가 있음) 또는 CKL003-SG1099 (향상된 pI Fc가 있는 CKL003)으로 구성되는 미리 형성된 면역 복합체의 SCID 생쥐 내로 주사 후 시간의 추이에서 hCCL2의 혈청 농도.

도 8: 화학주성 분석: 동일한 CDR 및 가변 영역 VH/VL, 다시 말하면 CKL02-IgG1 야생형 및 CKL02-SG1095, 그러나 상이한 Fc 모이어티를 갖는 이중특이적 항-CCL2 항체는 동일한 효능으로 THP-1 세포의 이동을 억제할 수 있다 ( $IC_{50} = 0.2 \mu g/ml$ ; 도 8, 왼쪽 패널).

유사하게, pH 의존성이 아닌, CKL02의 변형되지 않은 부모 이중특이적 항체 CNT0888/11k2k2 IgG1인 CCL2-0048 또한  $0.2 \mu g/ml$ 의  $IC_{50}$ 을 보여주는데, 그 이유는 pH 의존성이 이러한 분석에서 일어나지 않는 현상인 항원 스위핑에 결정적이기 때문이다.

상응하는 단일특이적 항체 CNT0888 IgG1 및 인간화 11k2 IgG1은 각각,  $0.3$  및  $0.7 \mu g/ml$ 의  $IC_{50}$  값을 나타내고, 반면 huIgG1 아이소타입 대조는 억제를 나타내지 않는다 (도 8, 오른쪽 패널).

도 9: 유전적으로 변형된 생쥐 모형에서 생체내 항종양 활성. Mab CKL02-IgG1 (Fc 야생형 IgG1) 및 CKL02-SG1099 (= CKL02 pI-향상됨)로 생쥐 종양 모형의 치료. 연구 종료 시점에 종양 용적 (왼쪽), 종양 무게 (중간) 및 M-MDSC 침윤물 (오른쪽). (검은색 막대에서 운반제, 회색 막대에서 CKL02 야생형 IgG1, 그리고 흰색 막대/점선에서 CKL02pI 향상된 Fc (CKL02-SG1099))

도 10: 이중특이적 항-CCL2 항체로 치료 하에 생체내 항종양 활성 연구 (참조: 도 9에서 효능) 동안 혈청 총 (왼쪽) 및 자유 (오른쪽) CCL2 수준 (검은색 막대에서 운반제, 회색 막대에서 CKL02 야생형 IgG1, 그리고 흰색 막대/점선에서 pI 향상된 Fc (CKL02-SG1099)).

도 11: 시노물구스 원숭이에서 CCL2 스위핑 효율의 개념 증명 연구. 시노물구스 원숭이의 혈청에서 총 항체 농도 시간 프로필; 왼쪽 패널: 4가지 항체의 평균 농도 시간 프로필이 7 일에 걸쳐 제시된다; 군 1: 최대 총 CCL2 축적의 대조로서 단일특이적 CNT0888-SG1 (= IgG1 야생형) 항-CCL2 항체 ( $n=3$ 마리 동물); 군 2: pH 의존성 표적 결합이 있지만 Fc 변형이 없는 이중파라토프 항-CCL2 항체 CKL02-SG1 (IgG1 야생형) ( $n=3$ ); 군 3: pH 의존성 표적 결합 및 Fc-pI 및 추가 변형이 있는 이중파라토프 항-CCL2 항체 CKL02-SG1100 ( $n=4$ ), 그리고 군 4: pH 의존성 표적 결합, Fc-pI와 Fc  $\gamma$ RIIb 친화성 향상 및 추가 변형이 있는 이중파라토프 항-CCL2 항체 CKL02-SG1095 ( $n=4$ ); 오른쪽 패널: 개체 4 (군 2)의 개별 농도 시간 프로필이 PK 연구 기간 (70 일)에 걸쳐 제시된다.

도 12: 시노물구스 원숭이에서 CCL2 스위핑 효율의 개념 증명 연구. 시노물구스 원숭이의 혈청에서 총 CCL2 농도 시간 프로필; 왼쪽 패널: 4가지 항체의 평균 총 CCL2 농도 시간 프로필이 7 일에 걸쳐 제시된다; 오른쪽 패널: 개체 4 (군 2)의 개별 총 CCL2 농도 시간 프로필이 PK 연구 기간 (70 일)에 걸쳐 제시된다.

도 13: 시노물구스 원숭이의 혈청에서 자유 CCL2 농도 시간 프로필; 왼쪽 패널: 4가지 항체의 평균 자유 CCL2 농도 시간 프로필이 7 일에 걸쳐 제시된다; 오른쪽 패널: 개체 4 (군 2)의 개별 자유 CCL2 농도 시간 프로필이 PK 연구 기간 (70 일)에 걸쳐 제시된다; 검출 한계 미만인 샘플의 경우에는  $0.01 \text{ ng/mL}$  (최저 정량 한계)의 값을 이용하여 평균 프로필이 계산되었다.

도 14: 시노물구스 원숭이에서 CCL2 스위핑 효율의 PK/PD 연구. 시노물구스 원숭이 (다양한 농도의 CKL02-SG1095 치료 (군 1-3))의 혈청에서 총 CKL02-SG1095 농도 시간 프로필; 왼쪽 패널: 3가지 용량 수준에 대한 평균 농도 시간 프로필 ( $n=4$ )이 7 일에 걸쳐 제시된다; 오른쪽 패널: 2마리 ADA 음성 개별 동물 (25 mg/kg 용량군)의 개별 농도 시간 프로필이 연구 기간 (98 일)에 걸쳐 제시된다.

도 15: 시노물구스 원숭이에서 CCL2 스위핑 효율의 PK/PD 연구. 다양한 농도의 CKL02-SG1095 치료 (군 1-3) 하에 및 CNT0888-SG1 치료 (군 4)와 비교하여 시노물구스 원숭이의 혈청에서 총 CCL2 농도 시간 프로파일; 왼쪽 패널: 4개의 연구 군의 평균 총 CCL2 농도 시간 프로파일 (오차 막대는 SD를 표시한다)이 7 일에 걸쳐 제시된다; 오른쪽 패널: 군 3 (n=2, 오차 막대는 범위를 표시한다) 및 4 (n=3, 오차 막대는 SD를 표시한다)로부터의 ADA 음성 동물의 개별 총 CCL2 농도 시간 프로파일이 PK 연구 기간 (98 일)에 걸쳐 제시된다.

도 16: 시노물구스 원숭이에서 CCL2 스위핑 효율의 PK/PD 연구. 시노물구스 원숭이의 혈청에서 자유 CCL2 농도 시간 프로파일; 왼쪽 패널: 4개의 연구 군 (다양한 농도의 CKL02-SG1095 치료 (군 1-3) 하에 및 CNT0888-SG1 치료 (군 4)와 비교하여)의 평균 자유 CCL2 농도 시간 프로파일 (오차 막대는 SD를 표시한다)이 7 일에 걸쳐 제시된다; 오른쪽 패널: 군 3 (n=2, 오차 막대는 범위를 표시한다) 및 4 (n=3, 오차 막대는 SD를 표시한다)로부터의 ADA 음성 동물의 평균 자유 CCL2 농도 시간 프로파일이 PK 연구 기간 (70 일)에 걸쳐 제시된다; 검출 한계 미만인 샘플의 경우에는 0.01 ng/mL (최저 정량 한계)의 값을 이용하여 평균 프로파일이 계산되었다.

도 17: 본원 발명의 이중특이적 항-CCL2 항체의 예시적인 구성 (이른바 콘토르스바디 (CB) 형식).

도 18: SEC 복합체: 이중파라토프 항체 P1AF8139 (39로 약칭됨) 및 P1AF8143 (43으로 약칭됨)과의 CCL2 복합체의 SEC

도 19a-19c: Fc감마-IIa- Fc  $\gamma$ RIIa를 통한 CCL2의 세포 흡수. 도 19a: 참조 항체 P1AD8325와 함께 Y자형 이중파라토프 항체, 도 19b: 참조 항체 P1AD8325와 함께 콘토르스바디 P1AF8142 및 P1AF8143, 그리고 도 19c: 항체 P1AD8325, CNT0888-IgG1, CKL02 (= CKL02 -SG1 (= IgG1 wt) 및 참조 세트로서의 항체 없음.

도 20a-20c: Fc감마-IIb- Fc  $\gamma$ RIIb를 통한 CCL2의 세포 흡수. 도 20a: 참조 항체 P1AD8325와 함께 Y자형 이중파라토프 항체, 도 20b: 참조 항체 P1AD8325와 함께 콘토르스바디 P1AF8142 및 P1AF8143, 그리고 도 20c: 항체 P1AD8325, CNT0888-IgG1, CKL02 (= CKL02 -SG1 (= IgG1 wt) 및 참조 세트로서의 항체 없음.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

#### [0154] 발명의 상세한 설명

[0155] 본원 발명은 인간 CCL2 상에서 2개의 상이한 에피토프에 결합하는 이중특이적 항-CCL2 항체, 이들의 약학 조성물, 이들의 제조, 그리고 암, 염증, 자가면역 및 안과 질환의 치료를 위한 약제로서 용도에 관계한다.

[0156] 본원 발명의 한 가지 양상에서 이중특이적 항-CCL2 항체는 인간 CC2 상에서 첫 번째 에피토프에 (특이적으로) 결합하는 첫 번째 항원 결합 부위 및 상이한 두 번째 에피토프에 (특이적으로) 결합하는 두 번째 상이한 항원 결합 부위를 포함하고, 여기서 이중특이적 항-CCL2 항체는 다음을 포함한다:

[0157] a) (N 말단에서 C 말단 방향으로) VH1-CH1-L1-힌지-CH2-CH3-L2-VL1-CL을 포함하는 첫 번째 폴리펩티드 사슬로서, 여기서

[0158] VH1은 첫 번째 중쇄 가변 도메인이고 VL1은 첫 번째 가변 경쇄 도메인이며 (둘 모두 함께 (함께 연결되어) 첫 번째 항원 결합 부위를 형성함),

[0159] CH1은 불변 중쇄 도메인 1이고,

[0160] L1은 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 실시형태에서 5개 내지 10개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,

[0161] 힌지는 중쇄 힌지 영역이고,

[0162] CH2는 불변 중쇄 도메인 2이고,

[0163] CH3은 불변 중쇄 도메인 3이고,

[0164] L2는 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 실시형태에서 10개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,

[0165] CL은 불변 경쇄 도메인인 첫 번째 폴리펩티드 사슬,

[0166] 그리고

[0167] b) (N 말단에서 C 말단 방향으로) VH2-CH1-L1-힌지-CH2-CH3-L2-VL2-CL을 포함하는 두 번째 폴리펩티드 사슬로

서, 여기서

- [0168] VH2는 두 번째 중쇄 가변 도메인이고 VL2는 두 번째 가변 경쇄 도메인이며 (둘 모두 함께 (함께 연결되어) 두 번째 항원 결합 부위를 형성함),
- [0169] CH1은 불변 중쇄 도메인 1이고,
- [0170] L1은 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 실시형태에서 5개 내지 10개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,
- [0171] 힌지는 중쇄 힌지 영역이고,
- [0172] CH2는 불변 중쇄 도메인 2이고,
- [0173] CH3은 불변 중쇄 도메인 3이고,
- [0174] L2는 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 실시형태에서 10개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,
- [0175] CL은 불변 경쇄 도메인인 두 번째 폴리펩티드 사슬.
- [0176] 본원에서 이용될 때, "MCP-1"로도 불리는 용어 "CCL2", "인간 CCL2"는 NCBI 기록 수탁 번호 NP\_002973에 언급된 76개의 아미노산 서열인 것으로 의의되고 CCL2, MCP-1 (단핵구 화학주성 단백질 1), SMC-CF (평활근 세포 화학주성 인자), LDCF (림프구 유래된 화학주성 인자), GDCF (신경교종 유래된 단핵구 화학주성 인자), TDCF (종양 유래된 화학주성 인자), HC11 (인간 사이토킨 11), MCAF (단핵구 화학주성 및 활성화 인자)로 다양하게 알려져 있다. 유전자 기호는 SCYA2, 인간 염색체 17 상에서 JE 유전자이고, 그리고 새로운 명칭은 CCL2이다 (Zlotnik, Yoshie 2000. Immunity 12: 121-127). JE는 인간 MCP- 1/CCL2의 생쥐 동족체이다.
- [0177] Handel 등 (Biochemistry. 1996; 35: 6569-6584)은 CCL2 이량체의 용액 구조를 결정하였다. 이들 연구는 CCL2의 이차 구조가 4개의  $\beta$ -시트로 구성됨을 시사하였다. 추가적으로, CCL2의 이량체화 인터페이스를 책임지는 잔기가 Zhang 및 Rollins (Mol Cell Biol. 1995; 15: 4851-4855)에 의해 설명되었다. 단백질 복합체는 두 개의 단량체가 큰 주머니를 형성하는 방향으로 길게 늘어진 것처럼 보였다. 2가지 결정 형태, 이른바 *I* 및 *P* 형태의 단량체성 및 이량체성 CCL2의 구조 또한 결정되었다 (Lubkowski et al., Nat Struct Biol. 1997; 4: 64-69). Paolini 등 (J Immunol. 1994 Sep 15;153(6): 2704-17)은 MCP1/CCL2가 생리학적으로 유관한 농도에서 단량체로서 존재한다는 것을 설명하였다: rec. CCL2 단백질 (Peprotech로부터 구입됨)을 크기 배제 HPLC, 침강 평형 초원심분리 및 화학적 교차연결로 분석함으로써, 이들은 MCP-1의 단량체성 및 이량체성 형태의 중량 분율이 시험관내 농도에 의존한다는 것을 입증할 수 있었다. 최종적으로, Seo 등 (J Am Chem Soc. 2013 Mar 20;135(11): 4325-32)은 생리학적 상태하에 단량체성 및 이량체성 형태 둘 모두에서 주입된 CCL2의 존재를 이온 이동성 질량 분석에 의해 입증할 수 있었다.
- [0178] 따라서 "야생형 CCL-2" (wt CCL2)는 단량체로서 존재할 수 있지만 생리학적 농도에서 이량체를 또한 실질적으로 형성할 수 있다. 이러한 단량체-이량체 평형은 명백히 상이하고, 상이한 농도가 이용될 수 있을지도 모르는 설명된 모든 시험관내 실험에 대해 신중하게 고려되어야 한다. 임의의 불확실성을 방지하기 위해, 우리는 점 돌연변이된 CCL2 변이체를 생성하였다: CCL2의 "P8A" 변이체는 정의된, 순수한 CCL2 단량체로 이어지는 이량체를 형성할 수 없게 하는 이량체화 인터페이스에 돌연변이를 보유한다. 대조적으로, CCL2의 "T10C" 변이체는 CCL2의 고정된 이량체를 야기한다 (J Am Chem Soc. 2013 Mar 20;135(11): 4325-32).
- [0179] CCL2/CCR2 축은 종양 내로 미성숙 골수 세포 모집의 주요 매개체이다. CCL2는 악성 세포에 의해 과발현되고, 화학유인물질 구배를 구축하는 세포외 기질 (ECM)에 결합한다. 일단 이들이 종양에 도달하면, 골수 유래 억제 세포 (MDSC)가 항염증성 사이토킨/수용체를 분비/상향조절함으로써 친종양형성 환경에 기여하며, 이들은 차례로 항종양 T 세포 반응의 개시를 억제한다. 이러한 방식으로, MDSC는 임의의 T 세포 활성화 요법의 효능을 감소시키거나 심지어 손상시킬 수 있다 (Meyer et al, 2014). 이런 이유로, 이들 미성숙 골수 세포의 모집의 특이적 억제는 관문 억제제, T 세포 이중특이적 및 암 면역 요법의 효능을 부양할 것이다. 이에 더하여, CCL2는 혈관형성, 전이 및 종양 성장의 증진에도 연루되었는데, 이는 CCL2를 중화하는 것이 항종양 개입의 여러 라인에 기여할 수도 있다는 것을 암시하였다.
- [0180] CCL2 (이의 수용체와는 대조적으로)를 표적화하는 것은 바람직하지 않은 CCL2 매개 효과를 특이적으로 억제하여, 동일한 수용체 (CCR2), 그러나 Th1 및 NK 세포와 같은 다른 면역 세포 모집단의 모집에 관련되는 상

이한 리간드 (예를 들면 CCL7, CCL8, CCL13)를 통해 신호할 수 있는 것들을 남겨둘 것이다.

- [0181] 임상적으로, CCL2는 상이한 염증성 질환, 예컨대 류마티스 관절염 (Haringman et al, 2006), 특발성 폐섬유증 (Raghu et al, 2015), 당뇨병성 신장병증 (Menne et al, 2016) 및 암 (Sandhu et al, 2013)에 의해 유발된 이의 상승된 수준을 중화하는 것을 목적으로 하는 여러 연구에서 바람직한 항체-표적이었다. 그러나, 관찰된 높은 생체내 항체-항원 해리 상수 (KD)와 함께 이의 높은 합성율은 임상적으로 실행 가능한 용량에서 전통적인 항체에 의한 자유 CCL2의 억제를 방해하는 주된 걸림돌인 것으로 입증되었다 (Fetterly et al, 2013).
- [0182] CCL2 중화는 유방암 (BC), 난소암 (OvCa), 대장암 (CRC), 췌장암 및 전립선암과 같은 여러 유형의 암에서 관찰된 상승된 CCL2 혈청 수준을 갖는 환자에서 더 명백히 관련이 있는 것으로 보인다. 그러나, 이러한 혈청학을 나타내지 않지만 종양이 골수 계통의 면역 세포로 고도로 침윤된 이러한 적응증 내의 환자라도 위에서 언급한 바와 같이 CCL2가 종양 상황에서 수행하는 많은 역할로 인해 이 새로운 요법으로 큰 이익을 얻을 수 있다.
- [0183] 본원에서 이용된 바와 같이, "인간 CCL2에 결합하는" 항체, "인간 CCL2에 특이적으로 결합하는" 항체, "인간 CCL2에 결합하는" 항체 또는 "항-CCL2 항체"는  $5.0 \times 10^{-8}$  mol/l 이하의  $K_D$ -값, 한 실시형태에서  $1.0 \times 10^{-9}$  mol/l 이하의  $K_D$ -값, 한 실시형태에서  $5.0 \times 10^{-8}$  mol/l 내지  $1.0 \times 10^{-13}$  mol/l의  $K_D$ -값의 결합 친화성으로 인간 CCL2 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 지칭한다.
- [0184] 결합 친화성은 표준 결합 측정, 예컨대 예를 들면 CCL2 세포의 도메인 (예를 들면 이의 자연 발생 3 차원 구조에서)을 포함하는 작체물을 이용한 표면 플라즈몬 공명 기술 (BIAcore®, GE-Healthcare Uppsala, Sweden)로 결정된다. 한 실시형태에서 결합 친화성은 예시적인 가용성 CCL2를 이용한 표준 결합 측정으로 결정된다.
- [0185] 항체 특이성은 항원의 특정 에피토프에 대한 항체의 선택적 인식을 지칭한다. 자연 항체는 예를 들면, 단일특이적이다.
- [0186] 본원에서 이용된 용어 "단일특이적" 항체는 하나 이상의 결합 부위를 갖고, 이들 각각이 동일한 항원의 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 표시한다.
- [0187] 본원에서 이용된 용어 "(인간) CCL2에 결합하는 이중특이적 항체", "(인간) CCL2에 결합하는 이중과라토프 항체", "이중특이적 항-CCL2 항체", "이중과라토프 항-CCL2 항체"는 항체가 (인간) CCL2 상에서 적어도 2개의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있음을 의미한다. 전형적으로, 이런 이중특이적 항체는 2개의 상이한 항원 결합 부위 (두 가지 상이한 과라토프)를 포함하며, 이들은 각각, (인간) CCL2의 상이한 에피토프에 대해 특이적이다. 일정한 실시형태에서 이중특이적 항체는 CCL2 상에서 2개의 상이한 비중복 에피토프에 결합할 수 있는데, 이는 이들 2개의 상이한 항원 결합 부위가 CCL2에 결합에 대해 경쟁하지 않는다는 것을 의미한다.
- [0188] 본원에서 목적으로 "수용자 인간 프레임워크"는 아래에 정의된 바와 같이, 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 공통 프레임워크로부터 유래된 경쇄 가변 도메인 (VL) 프레임워크 또는 중쇄 가변 도메인 (VH) 프레임워크의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크이다. 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 공통 프레임워크"로부터 유래된" 수용자 인간 프레임워크는 이의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 또는 이것은 아미노산 서열 변화를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 아미노산 변화의 개수는 10 이하, 9 이하, 8 이하, 7 이하, 6 이하, 5 이하, 4 이하, 3 이하, 또는 2 이하이다. 일부 실시형태에서, VL 수용자 인간 프레임워크는 VL 인간 면역글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 공통 프레임워크 서열과 서열에서 동일하다.
- [0189] 본원에서 용어 "항체"는 가장 넓은 의미에서 이용되고, 그리고 단일클론 항체, 다중클론 항체, 다중특이적 항체 (예를 들면, 이중특이적 항체), 그리고 항체 단편 (이들이 원하는 항원 결합 활성을 나타내기만 하면)을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 다양한 항체 구조를 포괄한다.
- [0190] "항체 단편"은 무손상 항체가 결합하는 항원에 결합하는 무손상 항체의 부분을 포함하는, 무손상 항체 이외의 분자를 지칭한다. 항체 단편의 실례에는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>; 디아바디; 선형 항체; 단일 사슬 항체 분자 (예를 들면, scFv); 그리고 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체가 포함되지만 이들에 한정되지 않는다.
- [0191] 본원에서 이용된 용어 "가 (valent)"는 항체 내에 특정된 숫자의 항원 결합 부위의 존재를 표시한다. 따라서, 용어 "항원에 일가 결합"은 항체 내에 항원에 대해 특이적인 하나 (및 하나보다 많지 않은) 항원 결합 부위의 존재를 표시한다.

- [0192] 용어 "항원 결합 부위"는 항원과의 상호작용을 제공하는 항체의 부위 또는 영역, 다시 말하면 하나 또는 여러 아미노산 잔기를 지칭한다. 예를 들면, 항체의 항원 결합 부위는 상보성 결정 영역 (CDR)으로부터 아미노산 잔기를 포함한다. 한 실시형태에서 항체의 항원 결합 부위는 VH와 VL로부터의 아미노산 잔기를 포함한다. 선천적 면역글로불린 분자는 전형적으로 2개의 항원 결합 부위를 갖고; Fab 분자는 전형적으로 단일 항원 결합 부위를 갖는다. "항원 결합 모이어티"는 항원 결정인자에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 폴리펩티드 분자를 지칭한다. 항원 결합 모이어티는 본원에서 추가로 정의된 바와 같은 항체 및 이들의 단편을 포함한다. 특정 항원 결합 모이어티는 항체 중쇄 가변 영역 및 항체 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체의 항원 결합 도메인을 포함한다. 일정한 실시형태에서, 항원 결합 모이어티는 본원에서 추가로 정의되고 당해 분야에 공지된 바와 같은 항체 불변 영역을 포함할 수 있다. 유용한 중쇄 불변 영역은 5가지 아이소타입:  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , 또는  $\mu$  중 어느 것을 포함한다. 유용한 경쇄 불변 영역은 두 가지 아이소타입:  $\kappa$  및  $\lambda$  중 어느 것을 포함한다.
- [0193] 본원에서 이용된 용어 "항원 결정인자" 및 "항원"은 항원 결합 모이어티/위치가 결합하여 항원 결합 모이어티-항원 복합체가 형성되는, 폴리펩티드 거대분자 상의 부위를 지칭한다. 유용한 항원 결정인자는 예를 들면 종양 세포의 표면 상에서, 바이러스-감염된 세포의 표면 상에서, 다른 병든 세포의 표면 상에서, 면역 세포의 표면 상에서, 혈청에서 자유롭게 및/또는 세포의 기질 (ECM)에서 발견될 수 있다.
- [0194] 용어 "키메라" 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부분이 특정 공급원 또는 종으로부터 유래되고, 반면 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지 부분이 상이한 공급원 또는 종으로부터 유래되는 항체를 지칭한다.
- [0195] 항체의 "부류"는 이의 중쇄에 의해 소유된 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을 지칭한다. 항체의 5가지 주요 부류: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 있고, 그리고 이들 중 몇몇은 하위부류 (아이소타입), 예를 들면, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> 및 IgA<sub>2</sub>로 더 세분화될 수 있다. 면역글로불린의 상이한 부류에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  및  $\mu$ 로 불린다. 바람직하게는 본원 발명의 이중특이적 항체는 인간 IgG 아이소타입, 더 바람직하게는 인간 IgG1 아이소타입이다. 본원에서 이용된 용어 IgG 아이소타입 및 IgG1 아이소타입은 인간 IgG 아이소타입 및 인간 IgG1 아이소타입을 의미한다. 전형적으로 상이한 IgG 아이소타입은 IgG 하위부류 사이에 대립유전자 변동에 기반하여 약간 상이한 알로타입의 형태로 존재한다 (참조: Vidarsson et al.; Front Immunol 5 (2014) Article 520, 1-17). 작용제, 예를 들면, 약학 제제의 "효과량"은 원하는 치료적 또는 예방적 결과를 달성하는 데 필요한 용량에서 및 기간 동안 효과적인 양을 지칭한다.
- [0196] 본원에서 용어 "Fc 도메인" 또는 "Fc 영역"은 불변 영역의 적어도 일부를 포함하는, 면역글로불린 중쇄의 C 말단 영역을 정의하는 데 이용된다. 상기 용어에는 선천적 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역이 포함된다. 비록 IgG 중쇄의 Fc 영역의 경계가 약간 변할 수도 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 통상적으로, Cys226부터, 또는 Pro230부터 중쇄의 카르복실 말단까지 걸쳐있는 것으로 정의된다. 하지만, 숙주 세포에 의해 생산되는 항체는 중쇄의 C 말단으로부터 하나 이상, 특히 1개 또는 2개의 아미노산의 번역후 개열을 겪을 수 있다. 이런 이유로, 전장 중쇄를 인코딩하는 특이적 핵산 분자의 발현에 의해 숙주 세포에 의해 생산되는 항체는 전장 중쇄를 포함할 수 있거나, 또는 이것은 전장 중쇄의 개열된 변이체 (본원에서 "개열된 변이체 중쇄"로도 지칭됨)를 포함할 수 있다. 이것은 중쇄의 최종 2개의 C 말단 아미노산이 글리신 (G446) 및 리신 (K447, Kabat EU 색인에 따른 넘버링)인 경우에 그러할 수 있다. 이런 이유로, Fc 영역의 C 말단 리신 (Lys447), 또는 C 말단 글리신 (Gly446) 및 리신 (K447)은 존재하거나 존재하지 않을 수 있다. Fc 도메인 (또는 본원에 정의된 바와 같은 Fc 도메인의 아단위)을 포함하는 중쇄의 아미노산 서열은 달리 표시되지 않으면, C 말단 글리신-리신 디펩티드 없이 표시된다. 본원 발명의 실시형태에서, 본원 발명에 따른 항체 또는 이중특이적 항체 내에 포함된, 본원에서 특정된 바와 같은 Fc 도메인의 아단위를 포함하는 중쇄는 추가의 C 말단 글리신-리신 디펩티드 (G446 및 K447, Kabat의 EU 색인에 따른 넘버링)를 포함한다. 본원 발명의 실시형태에서, 본원 발명에 따른 항체 또는 이중특이적 항체 내에 포함된, 본원에서 특정된 바와 같은 Fc 도메인의 아단위를 포함하는 중쇄는 추가의 C 말단 글리신 잔기 (G446, Kabat의 EU 색인에 따른 넘버링)를 포함한다. 본원 발명의 조성물, 예컨대 본원에 설명된 약학 조성물은 본원 발명의 항체 또는 이중특이적 항체의 모집단을 포함한다. 항체 또는 이중특이적 항체의 모집단은 전장 중쇄를 갖는 분자 및 개열된 변이체 중쇄를 갖는 분자를 포함할 수 있다. 항체 또는 이중특이적 항체의 모집단은 전장 중쇄를 갖는 분자 및 개열된 변이체 중쇄를 갖는 분자의 혼합물로 구성될 수 있고, 여기서 이들 항체 또는 이중특이적 항체 중 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80% 또는 적어도 90%가 개열된 변이체 중쇄를 갖는다. 본원 발명의 실시형태에서, 본원 발명의 항체 또는 이중특이적 항체의 모집단을 포함하는 조성물은 추가의 C 말단 글리신-리신 디펩티드 (G446 및 K447, Kabat의 EU 색인에 따른 넘버링)를 갖는 본원에서 특정된 바와 같은 Fc 도메인의 아단위를 포함하는 중쇄를 포함하는 항체 또는 이중특이적 항체를 포함한다. 본원 발명의

실시형태에서, 본원 발명의 항체 또는 이중특이적 항체의 모집단을 포함하는 조성물은 추가의 C 말단 글리신 잔기 (G446, Kabat의 EU 색인에 따른 넘버링)를 갖는 본원에서 특정된 바와 같은 Fc 도메인의 아단위를 포함하는 중쇄를 포함하는 항체 또는 이중특이적 항체를 포함한다. 본원 발명의 실시형태에서, 이런 조성물은 본원에서 특정된 바와 같은 Fc 도메인의 아단위를 포함하는 중쇄를 포함하는 분자; 추가의 C 말단 글리신 잔기 (G446, Kabat의 EU 색인에 따른 넘버링)를 갖는 본원에서 특정된 바와 같은 Fc 도메인의 아단위를 포함하는 중쇄를 포함하는 분자; 및 추가의 C 말단 글리신-리신 디펩티드 (G446 및 K447, Kabat의 EU 색인에 따른 넘버링)를 갖는 본원에서 특정된 바와 같은 Fc 도메인의 아단위를 포함하는 중쇄를 포함하는 분자로 구성되는 항체 또는 이중특이적 항체의 모집단을 포함한다. 일정한 실시형태에서 위치 447 (Kabat의 EU 색인에 따른 넘버링)에서 리신이 글리신 (K447G) 돌연변이에 의해 대체되었고, 그리고 이들 분자는 추가의 C 말단 글리신-글리신 디펩티드 (G446 및 G447, Kabat의 EU 색인에 따른 넘버링)를 포함한다. 본원에서 달리 명시되지 않으면, Fc 영역 또는 불변 영역에서 아미노산 잔기의 넘버링은 Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991에 설명된 바와 같이, "Kabat의 EU 색인에 따른 넘버링" 또는 "Kabat EU 넘버링"으로도 불리는 EU 넘버링 시스템에 따른다 (또한 상기 참조). 본원에서 이용된 바와 같이, Fc 도메인의 "아단위"는 이량체성 Fc 도메인을 형성하는 2개의 폴리펩티드 중 하나, 다시 말하면, 안정적으로 자가 결합할 수 있는, 면역글로불린 중쇄의 C 말단 불변 영역을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 예를 들면, IgG Fc 도메인의 아단위는 IgG CH2 및 IgG CH3 불변 도메인을 포함한다.

[0197] "프레임워크" 또는 "FR"은 초가변 영역 (HVR) 잔기 이외의 가변 도메인 잔기를 지칭한다. 가변 도메인의 FR은 일반적으로 4개의 FR 도메인: FR1, FR2, FR3 및 FR4로 구성된다. 따라서, CDR과 FR 서열은 일반적으로 VH (또는 VL)에서 아래의 순서로 나타난다: FR-H1(L1)-CDR-H1(L1)-FR-H2(L2)-CDR-H2(L2)-FR-H3(L3)-CDR-H3(L3)-FR-H4(L4).

[0198] 용어 "전장 항체", "무손상 항체" 및 "전체 항체"는 선천적 항체 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖는 또는 본원에 정의된 바와 같은 Fc 영역을 포함하는 중쇄를 갖는 항체를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 이용된다.

[0199] "인간 항체"는 인간 또는 인간 세포에 의해 생산되거나, 또는 인간 항체 레퍼토리 또는 다른 인간 항체-인코딩 서열을 활용하는 비인간 공급원으로부터 유래된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 소유하는 것이다. 인간 항체의 이러한 정의는 비인간 항원 결합 잔기를 포함하는 인간화 항체를 특정적으로 배제한다.

[0200] "인간 공통 프레임워크"는 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선택에서 가장 흔히 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크이다. 일반적으로, 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 서열은 가변 도메인 서열의 하위군으로부터 유래된다. 일반적으로, 서열의 하위군은 Kabat, E.A. et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Bethesda MD (1991), NIH Publication 91-3242, Vols. 1-3의 경우에서와 같은 하위군이다. 한 실시형태에서, VL의 경우에, 하위군은 Kabat et al., *위와 같음*의 경우에서와 같은 하위군 카파 I이다. 한 실시형태에서, VH의 경우에, 하위군은 Kabat et al., *위와 같음*의 경우에서와 같은 하위군 III이다.

[0201] "인간화" 항체는 비인간 CDR로부터 아미노산 잔기 및 인간 FR로부터 아미노산 잔기를 포함하는 키메라 항체를 지칭한다. 일정한 실시형태에서, 인간화 항체는 적어도 1개, 그리고 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것인데, 여기서 CDR의 전부 또는 실질적으로 전부가 비인간 항체의 것들에 상응하고, 그리고 FR의 전부 또는 실질적으로 전부가 인간 항체의 것들에 상응한다. 인간화 항체는 선택적으로, 인간 항체로부터 유래된 항체 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 항체, 예를 들면, 비인간 항체의 "인간화 형태"는 인간화를 겪은 항체를 지칭한다.

[0202] 본원에서 이용된 용어 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"은 서열에서 초가변성이고/이거나 구조적으로 정의된 루프 ("초가변 루프")를 형성하고/형성하거나 항원 접촉 잔기 ("항원 접촉")를 포함하는 항체 가변 도메인의 각 영역을 지칭한다. 일반적으로, 항체는 6개의 CDR을 포함한다: VH에서 3개 (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3), 그리고 VL에서 3개 (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). 본원에서 예시적인 CDR은 다음을 포함한다:

[0203] (a) 아미노산 잔기 26-32 (CDR-L1), 50-52 (CDR-L2), 91-96 (CDR-L3), 26-32 (CDR-H1), 53-55 (CDR-H2) 및 96-101 (CDR-H3)에서 발생하는 초가변 루프 (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987));

[0204] (b) 아미노산 잔기 24-34 (CDR-L1), 50-56 (CDR-L2), 89-97 (CDR-L3), 31-35b (CDR-H1), 50-65 (CDR-H2) 및 95-102 (CDR-H3)에서 발생하는 CDR (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th

Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

- [0205] (c) 아미노산 잔기 27c-36 (CDR-L1), 46-55 (CDR-L2), 89-96 (CDR-L3), 30-35b (CDR-H1), 47-58 (CDR-H2) 및 93-101 (CDR-H3)에서 발생하는 항원 접촉 (MacCallum et al. *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)); 그리고
- [0206] (d) CDR 아미노산 잔기 24-34 (CDR-L1), 50-56 (CDR-L2), 89-97 (vL3), 31-35 (CDR-H1), 50-63 (CDR-H2) 및 95-102 (CDR-H3)를 포함하는, (a), (b) 및/또는 (c)의 조합.
- [0207] 달리 표시되지 않는 경우, CDR-잔기 및 가변 도메인 내에 기타 잔기 (예: FR 잔기)는 본원에서 Kabat et al., Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)에 따라서 넘버링된다.
- [0208] "개체" 또는 "피험자"는 포유동물이다. 포유동물에는 순치된 동물 (예를 들면, 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류 (예를 들면, 인간 및 비인간 영장류 예컨대 원숭이), 토끼, 그리고 설치류 (예를 들면, 생쥐와 쥐)가 포함되지만 이들에 한정되지 않는다. 일정한 실시형태에서, 개체 또는 피험자는 인간이다.
- [0209] "단리된" 항체는 자연 환경의 구성요소로부터 분리된 것이다. 일부 실시형태에서, 항체는 예를 들면, 전기영동 (예를 들면, SDS-PAGE, 등전위 초점 (IEF), 모세관 전기영동) 또는 크로마토그래피 (예를 들면, 이온 교환 또는 역상 HPLC)에 의해 결정될 때, 95% 또는 99%보다 높은 순도로 정제된다. 항체 순도의 평가를 위한 방법에 관한 검토를 위해, 예를 들면, Flatman, S. et al., *J. Chromatogr. B* 848 (2007) 79-87을 참조한다.
- [0210] "단리된" 핵산은 이의 자연 환경의 성분으로부터 분리된 핵산 분자를 지칭한다. 단리된 핵산에는 핵산 분자를 통상적으로 함유하는 세포에 함유된 핵산 분자가 포함되지만, 상기 핵산 분자는 염색체외에 또는 자연 염색체 위치와 상이한 염색체 위치에 존재한다.
- [0211] "단일특이적 또는 이중특이적 항-CCL2 항체를 인코딩하는 단리된 핵산"은 항체 중쇄와 경쇄 (또는 이들의 단편)를 인코딩하는 하나 이상의 핵산 분자, 단일 벡터 또는 별개의 벡터에서 이런 핵산 분자(들), 그리고 숙주 세포 내에 하나 이상의 위치에서 존재하는 이런 핵산 분자(들)를 지칭한다.
- [0212] 본원에서 이용된 용어 "단일클론 항체"는 실질적으로 동질성 항체의 모집단으로부터 획득된 항체를 지칭한다. 다시 말하면, 상기 모집단을 구성하는 개별 항체는 예를 들면, 자연 발생 돌연변이를 포함하거나 단일클론 항체 제조물의 생산 동안 발생하는 가능한 변이체 항체 (이런 변이체는 일반적으로 미량으로 존재한다)를 제외하고, 동일하고 및/또는 동일한 에피토프에 결합한다. 상이한 결정인자 (에피토프)에 대해 지향된 상이한 항체를 전형적으로 포함하는 다중클론 항체 제조물과 대조적으로, 단일클론 항체 제조물의 각 단일클론 항체는 항원 상에서 단일 결정인자에 대해 지향된다. 따라서, 수식어 "단일클론"은 항체의 실질적으로 동질성 모집단으로부터 획득되는 것으로서 항체의 특징을 표시하고, 그리고 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생산을 필요로 하는 것으로 해석되지 않는다. 예를 들어, 본원 발명에 따라서 이용되는 단일클론 항체는 하이브리도마 방법, 재조합 DNA 방법, 파지 전사 방법, 그리고 인간 면역글로불린 좌위 중 전부 또는 일부를 포함하는 유전자도입 동물을 활용하는 방법이 포함되지만 이들에 한정되지 않는 다양한 기술에 의해 만들어질 수 있는데, 이런 방법 및 단일클론 항체를 만들기 위한 다른 예시적인 방법은 본원에 설명된다.
- [0213] "선천적 항체"는 변화하는 구조를 갖는 자연 발생 면역글로불린 분자를 지칭한다. 예를 들어, 선천적 IgG 항체는 디설피드 결합되는 2개의 동일한 경쇄 및 2개의 동일한 중쇄로 구성되는, 약 150,000 달톤의 이종사량체성 당단백질이다. N 말단으로부터 C 말단으로, 각 중쇄는 가변 중쇄 도메인 또는 중쇄 가변 도메인으로도 불리는 가변 영역 (VH), 그 이후에 3개의 불변 도메인 (CH1, CH2 및 CH3)을 갖는다. 유사하게, N 말단으로부터 C 말단으로, 각 경쇄는 가변 경쇄 도메인 또는 경쇄 가변 도메인으로도 불리는 가변 영역 (VL), 그 이후에 불변 경쇄 (CL) 도메인을 갖는다. 항체의 경쇄는 이의 불변 도메인의 아미노산 서열에 근거하여, 카파 ( $\kappa$ ) 및 람다 ( $\lambda$ )로 불리는 두 가지 유형 중 한 가지에 배정될 수 있다.
- [0214] 용어 "포장 삽입물"은 치료 제품의 상업적인 패키지 내에 관례적으로 포함되는 사용설명서를 지칭하는 데 이용되는데, 이것은 이런 치료 제품의 이용에 관련된 징후, 용법, 용량, 투여, 병용 요법, 금기 및/또는 주의사항에 관한 정보를 포함한다.
- [0215] 참조 폴리펩티드 서열에 대하여 "퍼센트 (%) 아미노산 서열 동일성"은 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해 서열을 정렬하고 필요하면, 갭을 도입한 후에, 그리고 임의의 보존성 치환을 서열 동일성의 일부로서 고려하지 않고, 참조 폴리펩티드 서열 내에 아미노산 잔기와 동일한, 후보 서열 내에 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 퍼센트 아미노산 서열 동일성을 결정하는 목적을 위한 정렬은 당해 분야의 기술 범위 안에 있는 다양한

방식으로, 예를 들면, 공개적으로 가용한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어를 이용하여 달성될 수 있다. 당업자는 비교되는 서열의 전장에 걸쳐 최대 정렬을 달성하기 위해 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여, 서열을 정렬하기 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다. 하지만, 본원에서 목적을 위해, % 아미노산 서열 동일성 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 이용하여 생성된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 Genentech, Inc.에 의해 저술되었고, 그리고 소스 코드가 사용자 문서로 미국 Copyright Office, Washington D.C., 20559에 제출되었는데, 여기서 이것은 미국 Copyright 등록 번호 TXU510087하에 등록된다. ALIGN-2 프로그램은 Genentech, Inc., South San Francisco, California로부터 공개적으로 가용하거나, 또는 소스 코드로부터 편집될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 디지털 UNIX V4.0D를 포함한 UNIX 운영 체제에 이용하기 위해 편집되어야 한다. 모든 서열 비교 매개변수는 ALIGN-2 프로그램에 의해 세팅되고 변하지 않는다.

[0216] ALIGN-2가 아미노산 서열 비교에 이용되는 상황에서, 소정의 아미노산 서열 B에 대한 소정의 아미노산 서열 A의 % 아미노산 서열 동일성 (이것은 대안적으로, 소정의 아미노산 서열 B에 대해 일정한 % 아미노산 서열 동일성을 갖거나 포함하는 소정의 아미노산 서열 A로서 표현될 수 있다)은 아래와 같이 계산된다:

[0217] 100 곱하기 분율 X/Y

[0218] 여기서 X는 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의해, 상기 프로그램의 A와 B의 정렬에서 동일한 정합으로서 채점된 아미노산 잔기의 숫자이고, 그리고 여기서 Y는 B에서 아미노산 잔기의 총수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동등하지 않은 경우에, B에 대한 A의 % 아미노산 서열 동일성은 A에 대한 B의 % 아미노산 서열 동일성과 동등하지 않을 것으로 인지될 것이다. 달리 명시되지 않으면, 본원에서 이용된 모든 % 아미노산 서열 동일성 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 이용하여 직전 단락에 설명된 바와 같이 획득된다.

[0219] 용어 "약학 제제"는 그 안에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적하도록 허용하는 그런 형태이고, 그리고 이러한 제제가 투여될 개체에게 받아들이기 어려울 정도로 독성인 추가 성분을 함유하지 않는 제조물을 지칭한다.

[0220] "약학적으로 허용되는 운반체"는 개체에게 비독성인, 약학 제제에서 활성 성분 이외의 성분을 지칭한다. 약학적으로 허용되는 운반체에는 완충액, 부형제, 안정제 또는 보존제가 포함되지만 이들에 한정되지 않는다.

[0221] 본원에서 이용된 바와 같이, "치료" (및 이의 문법적 변이, 예컨대 "치료하다" 또는 "치료하는")는 치료를 받는 개체의 자연 경과를 변경하려는 시도에서 임상적 개입을 지칭하고, 그리고 임상 병리의 예방을 위해 또는 임상 병리의 경과 동안 수행될 수 있다. 바람직한 치료 효과에는 질병의 발생 또는 재발의 예방, 증상의 경감, 질병의 임의의 직접적인 또는 간접적인 병리학적 결과의 축소, 전이 예방, 질병 진행의 속도 감소, 질병 상태의 개선 또는 완화, 그리고 관해 또는 개선된 예후가 포함되지만 이들에 한정되지 않는다. 일부 실시형태에서, 본원 발명의 항체는 질병의 발달을 지연시키거나 질병의 진행을 늦추는 데 이용된다.

[0222] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체를 항원에 결합시키는 데 관련되는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 선천적 항체의 중쇄와 경쇄의 가변 도메인 (각각, VH와 VL)은 일반적으로 유사한 구조를 갖는데, 각 도메인이 4개의 보존된 프레임워크 영역 (FR) 및 3개의 초가변 영역 (CDR)을 포함한다. (참조: 예를 들면, Kindt, T.J. et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), page 91). 단일 VH 또는 VL 도메인이 항원 결합 특이성을 부여하는 데 충분할 수 있다. 게다가, 특정 항원에 결합하는 항체는 각각, 상보성 VL 또는 VH 도메인의 라이브러리를 스크리닝하기 위해, 항원에 결합하는 항체로부터 VH 또는 VL 도메인을 이용하여 분리될 수 있다. 참조: 예를 들면, Portolano, S. et al., J. Immunol. 150 (1993) 880-887; Clackson, T. et al., Nature 352 (1991) 624-628).

[0223] 본원에서 이용된 용어 "백터"는 자신이 연관되는 다른 핵산을 증식할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 상기 용어는 자기 복제 핵산 구조로서 백터뿐만 아니라 이것이 도입된 숙주 세포의 유전체 내로 통합된 백터를 포함한다. 일정한 백터는 그들이 작동가능하게 연결되는 핵산의 발현을 주도할 수 있다. 이런 백터는 본원에서 "발현 백터"로 지칭된다.

## [0224] I. 조성물과 방법

[0225] 한 가지 양상에서, 본원 발명은 본원에 설명된 바와 같은 이중특이적 항체가 상이한 항-CCL2 항원 결합 부위를 첫 번째와 두 번째 항원 결합 부위/모이어티로서 이용한다는 조사 결과에 부분적으로 기초한다. 이들 이중특이적 항-CCL2 항체는 CCL2의 일정한 에피토프에 높은 특이성으로 결합하고, CCL2와 이의 수용체 CCR2의 결합을 특이적으로 억제하는 능력을 갖는다. 이들은 단일특이적 항체와 비교하여 개선된 면역 복합체 형성 및 개선된 생

체내 CCL2 제거를 보여준다. 본원에 설명된 콘토르스바디 (contorsbody) 형식의 특정한 이중특이적 항-CCL2 항체는 낮은 점도 (이것은 예를 들면 피하 투여에 적합한 높은 농도 용액을 가능하게 한다)와 같은 귀중한 특성을 추가로 나타낸다.

[0226] **이중특이적-항-CCL2 항체**

[0227] 이중특이적 항체

[0228] 본원에 설명된 바와 같은 이중특이적 항체는 CCL2 상에서 적어도 2개의 상이한 에피토프에 대한 상이한 결합 특이성을 갖는 단일클론 항체이다.

[0229] 다중특이적 및 이중특이적 항체를 만들기 위한 기술은 상이한 특이성을 갖는 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 제조합 공동발현 (참조: Milstein and Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)) 및 "노브-인-홀" 조작 (참조: 예를 들면, 미국 특허 번호 5,731,168 및 Atwell et al., *J. Mol. Biol.* 270: 26 (1997))을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 다중특이적 항체는 또한, 항체 Fc-이종이량체성 분자를 만들기 위해 정전 스티어링 효과를 조작함으로써 (참조: 예를 들면, WO 2009/089004); 두 개 이상의 항체 또는 단편을 교차연결함으로써 (참조: 예를 들면, US 특허 번호 4,676,980 및 Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)); 류신 지퍼를 이용하여 이중특이적 항체를 생성함으로써 (참조: 예를 들면, Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992) 및 WO 2011/034605); 경쇄 오대합 문제를 회피하기 위해 공통 경쇄 기술을 이용함으로써 (참조: 예를 들면, WO 98/50431); 이중특이적 항체 단편을 만들기 위해 "디아바디" 기술을 이용함으로써 (참조: 예를 들면, Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993)); 그리고 단일 사슬 Fv (sFv) 이량체를 이용함으로써 (참조: 예를 들면, Gruber et al., *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994)); 그리고 예를 들면, Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991)에 설명된 바와 같이 삼중특이적 항체를 제조함으로써 만들어질 수 있다.

[0230] 예를 들어, "문어 항체", 또는 DVD-Ig를 포함한, 3개 이상의 항원 결합 부위를 갖는 조작된 항체 또한 본원에 포함된다 (참조: 예를 들면, WO 2001/77342 및 WO 2008/024715). 3개 이상의 항원 결합 부위를 갖는 다중특이적 항체의 다른 실례는 WO 2010/115589, WO 2010/112193, WO 2010/136172, WO2010/145792 및 WO 2013/026831에서 찾아볼 수 있다. 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 또한, CCL2뿐만 아니라 다른 상이한 항원, 또는 CCL2의 2개의 상이한 에피토프에 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 "이중 작용 Fab" 또는 "DAF"를 포함한다 (참조: 예를 들면, US 2008/0069820 및 WO 2015/095539).

[0231] 다중특이적 항체는 또한, CrossMab으로도 불리는, 동일한 항원 특이성의 하나 이상의 결합 팔에서 도메인 교차로, 다시 말하면, VH/VL 도메인 (참조: 예를 들면, WO 2009/080252 및 WO 2015/150447), CH1/CL 도메인 (참조: 예를 들면, WO 2009/080253) 또는 완전한 Fab 팔 (참조: 예를 들면, WO 2009/080251, WO 2016/016299, 또한 Schaefer et al., *PNAS*, 108 (2011) 1187-1191 및 Klein et al., *Mabs* 8 (2016) 1010-20 참조)을 교환함으로써 비대칭적 형태로 제공될 수 있다. 비대칭적 결합 팔은 또한, 정확한 Fab 대합을 주도하기 위해 하전된 또는 비하전된 아미노산 돌연변이를 도메인 인터페이스 내로 도입함으로써 조작될 수 있다. 참조: 예를 들면, WO 2016/172485.

[0232] 다중특이적 항체에 대한 다양한 추가의 분자 형식은 당해 분야에 공지되고 본원에 포함된다 (참조: 예를 들면, Spiess et al., *Mol Immunol* 67 (2015) 95-106).

[0233] 본원 발명의 이중특이적 항체 형식:

[0234] 본원 발명의 바람직한 이중특이적 항체는 아래의 형식을 갖는다:

[0235] 이중특이적 항체는

[0236] a) (N 말단에서 C 말단 방향으로) VH1-CH1-L1-힌지-CH2-CH3-L2-VL1-CL을 포함하는 첫 번째 폴리펩티드 사슬로서, 여기서

[0237] VH1은 첫 번째 중쇄 가변 도메인이고 VL1은 첫 번째 가변 경쇄 도메인이며 (둘 모두 함께 (함께 연결되어) 첫 번째 항원 결합 부위를 형성함),

[0238] CH1은 불변 중쇄 도메인 1이고,

[0239] L1은 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 실시형태에서 5개 내지 10개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,

- [0240] 힌지는 중쇄 힌지 영역이고,
- [0241] CH2는 불변 중쇄 도메인 2이고,
- [0242] CH3은 불변 중쇄 도메인 3이고,
- [0243] L2는 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 실시형태에서 10개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,
- [0244] CL은 불변 경쇄 도메인인 첫 번째 폴리펩티드 사슬,
- [0245] 그리고
- [0246] b) (N 말단에서 C 말단 방향으로) VH2-CH1-L1-힌지-CH2-CH3-L2-VL2-CL을 포함하는 두 번째 폴리펩티드 사슬로서, 여기서
- [0247] VH2는 두 번째 중쇄 가변 도메인이고 VL2는 두 번째 가변 경쇄 도메인이며 (둘 모두 함께 (함께 연결되어) 두 번째 항원 결합 부위를 형성함),
- [0248] CH1은 불변 중쇄 도메인 1이고,
- [0249] L1은 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 실시형태에서 5개 내지 10개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,
- [0250] 힌지는 중쇄 힌지 영역이고,
- [0251] CH2는 불변 중쇄 도메인 2이고,
- [0252] CH3은 불변 중쇄 도메인 3이고,
- [0253] L2는 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 실시형태에서 10개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,
- [0254] CL은 불변 경쇄 도메인인 두 번째 폴리펩티드 사슬을 포함한다.
- [0255] 이러한 기본 항체 Fc 도메인 포함 형식인 "콘토르스바디" (contorsbody, CB)는 예를 들면 Guy J.Georges et al, Computational and Structural Biotechnology Journal Volume 18, 2020, Pages 1210-1220에 설명된다. 도 17의 구성을 또한 참조하는데, 여기서 이중특이적 콘토르스바디 형식의 실례가 상이한 영역 및 구성요소와 함께 도시된다. CH3 도메인 사이에 채워진 원은 CH3 도메인의 변형/돌연변이를 증진하는 선택적 이중이량체화 (예를 들면 노브 인투 홀, 추가 상쇄는 FC 변형을 증진하는 이중이량체화를 참조하는 아래의 섹션에 설명됨)이다.
- [0256] 용어 "폴리펩티드 링커"는 자연 및/또는 합성 기원의 링커를 표시한다. 폴리펩티드 링커는 아미노산의 선형 사슬로 구성되며, 여기서 20가지의 자연 발생 아미노산이, 펩티드 결합에 의해 연결되는 단량체성 빌딩 블록이다. 사슬은 1개 내지 15개 아미노산 잔기의 길이를 갖는다. 폴리펩티드 링커는 반복성 아미노산 서열 또는 자연 발생 폴리펩티드 서열을 포함할 수 있다. 폴리펩티드 링커는 이중특이적 콘토르스바디의 항체 도메인이 정확하게 접히고 적절하게 제시되도록 함으로써 그들의 생물학적 활성을 수행할 수 있게 담보하는 기능을 갖는다. 바람직하게는 폴리펩티드 링커는 글리신 및/또는 세린 잔기가 풍부한 것으로 지정된 "합성 펩티드성 링커"이다. 이들 잔기는 예를 들면 5개까지의 아미노산의 작은 반복 단위로 배열된다.
- [0257] 링커 L1 및 L2는 바람직하게는 글리신-세린 링커이다; 세린 잔기는 일부 극성을 사슬에 가져와 링커에 용해도를 제공한다. W02019233842에 설명된 바와 같이, 링커 분절 및 융합된 단백질 단편 사이의 전이는 GS 모티프를 수반하지 않는 것이 바람직한데, 그 이유는 번역후 변형, 다시 말하면 O-당화반응의 가능성이 있기 때문이다. 본 출원에 설명된 콘토르스바디는 이후 말단 글리신으로 구성된다. 길이 / 조성의 변동이 검사되었다. L1 및 L2의 임의의 조합이 고려될 수 있다. 반복성 글리신은 최대 4개의 연속 글리신으로 한정된다. 링커를 거쳐 다른 도메인에 융합되는 도메인의 C 말단 분절이 예를 들면 하나 또는 두 개의 글리신으로 만들어지면 (예를 들면 CH3 도메인의 C 말단이 하나의 글리신으로 끝나거나 두 개의 글리신으로 끝나도록 변형되면), 이들 하나 또는 두 개의 글리신은 최대 4개의 연속 글리신의 한계를 고려해야 한다. 다량체 단위의 아미노 및/또는 카르복시 말단 단부에 6개까지의 추가의 임의적인, 자연 발생 아미노산이 추가될 수 있다. 10개 아미노산의 길이를 갖는 예시적인 링커는 예를 들면 아래의 군에서 선택된다: GSGGSGGSGG (서열 번호: 183), GSGGSGGGG (서열 번호: 184), GSGGSGGGG (서열 번호: 185); GSGGSGGGG (서열 번호: 186), GSGGSGGGG (서열 번호: 187), GSGGSGGGG (서열

번호: 188), GGGSGGSGGG (서열 번호: 189), GGGSGGSGGG (서열 번호: 190), GGGSGGSGGG (서열 번호: 191), 바람직하게는 GGGSGGSGGG (서열 번호: 188). 유사하게는 5개 내지 9개 아미노산의 길이 또는 11개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는 추가의 링커가 작제될 수 있다.

[0258] **Fc 도메인 및 변형**

[0259] 특정한 실시형태에서, 본원 발명의 이중특이적 항체는 첫 번째와 두 번째 아단위로 구성되는 Fc 도메인을 포함한다. 이중특이적 항체와 관련하여 본원에 설명된 Fc 도메인의 특징은 본원 발명의 항체 내에 포함된 Fc 도메인에 동등하게 적용될 수 있다는 것으로 이해된다.

[0260] 이중특이적 항체의 Fc 도메인은 면역글로불린 분자의 중쇄 도메인을 포함하는 한 쌍의 폴리펩티드 사슬로 구성된다. 예를 들면, 면역글로불린 G (IgG) 분자의 Fc 도메인은 이량체이며, 이것의 각 아단위는 CH2 및 CH3 IgG 중쇄 불변 도메인을 포함한다. Fc 도메인의 2개의 아단위는 서로 안정적으로 연결될 수 있다. 한 실시형태에서, 본원 발명의 이중특이적 항체는 하나 이하의 Fc 도메인을 포함한다.

[0261] 한 실시형태에서, 이중특이적 항체의 Fc 도메인은 IgG Fc 도메인이다. 특정한 실시형태에서, Fc 도메인은 IgG<sub>1</sub> Fc 도메인이다. 다른 실시형태에서, Fc 도메인은 IgG<sub>4</sub> Fc 도메인이다. 더 특정한 실시형태에서, Fc 도메인은 위치 S228 (Kabat EU 넘버링)에서 아미노산 치환, 특히 아미노산 치환 S228P를 포함하는 IgG<sub>4</sub> Fc 도메인이다. 이러한 아미노산 치환은 IgG<sub>4</sub> 항체의 생체내 Fab 팔 교환을 감소시킨다 (참조: Stubenrauch et al., Drug Metabolism and Disposition 38, 84-91 (2010)). 더 특정한 실시형태에서, Fc 도메인은 인간 Fc 도메인이다. 훨씬 특정한 실시형태에서, Fc 도메인은 인간 IgG<sub>1</sub> Fc 도메인이다.

[0262] IgG 아이소타입의 Fc 도메인은 예를 들면 Fc 감마 수용체 또는 신생아 Fc 수용체 (FcRn)와의 상호작용에 기반한 다양한 특성에 의해 특징화된다 (참조: 예를 들면 Vidarsson et al.; Front Immunol 5 (2014) Article 520, 1-17).

[0263] **이종이량체화를 증진하는 Fc 도메인 변형**

[0264] 본원 발명에 따른 이중특이적 항체는 Fc 도메인의 2개의 아단위 중 하나 또는 다른 하나에 융합될 수 있는 상이한 항원 결합 모이어티를 포함하고, 따라서 Fc 도메인의 이들 2개의 아단위는 전형적으로 2개의 비동일한 폴리펩티드 사슬 내에 포함된다. 이들 폴리펩티드의 재조합 공동발현 및 차후 이량체화는 이들 2개의 폴리펩티드의 여러 가능한 조합을 야기한다. 재조합 생산에서 이중특이적 항체의 수율과 순도를 개선하기 위해, 원하는 폴리펩티드의 연결을 증진하는 변형을 이중특이적 항체의 Fc 도메인에 도입하는 것이 유리할 것이다.

[0265] 따라서, 특정한 실시형태에서, 본원 발명에 따른 이중특이적 항체의 Fc 도메인은 Fc 도메인의 첫 번째와 두 번째 아단위의 연결을 증진하는 변형을 포함한다. 인간 IgG Fc 도메인의 2개의 아단위 사이에서 가장 광범위한 단백질-단백질 상호작용의 부위는 Fc 도메인의 CH3 도메인 내에 있다. 따라서, 한 실시형태에서 상기 변형은 Fc 도메인의 CH3 도메인 내에 있다.

[0266] 이종이량체화를 시행하기 위한 Fc 도메인의 CH3 도메인에서 변형을 위한 여러 접근방식이 존재하는데, 이들은 예를 들면 WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012058768, WO 2013157954, WO 2013096291에서 충분히 설명된다. 전형적으로, 이와 같은 모든 접근방식에서 Fc 도메인의 첫 번째 아단위의 CH3 도메인 및 Fc 도메인의 두 번째 아단위의 CH3 도메인은 각 CH3 도메인 (또는 이것을 포함하는 중쇄)이 그 자체로는 더 이상 동종이량체를 형성할 수 없지만, 상보적으로 조작된 다른 CH3 도메인과 이종이량체를 형성하도록 강제되도록 (첫 번째와 두 번째 CH3 도메인이 이종이량체를 형성하고, 그리고 2개의 첫 번째 또는 2개의 두 번째 CH3 도메인 사이에 어떤 동종이량체도 형성되지 않도록), 둘 모두 상보적인 방식으로 조작된다. 개선된 중쇄 이종이량체화를 위한 이들 상이한 접근방식은 중쇄/경쇄 오대합 및 Bence Jones-유형 부산물을 감소시키는, 이중특이적 항체에서 중쇄-경쇄 변형 (예를 들면, 하나의 결합 팔에서 VH와 VL 교환/대체 및 CH1/CL 인터페이스에서 반대 전하를 갖는 하전된 아미노산의 치환의 도입)과 조합으로 상이한 대안으로서 예기된다.

[0267] 특정한 실시형태에서, Fc 도메인의 첫 번째와 두 번째 아단위의 연결을 증진하는 상기 변형은 Fc 도메인의 2개의 아단위 중 하나에서 "노브" 변형 및 Fc 도메인의 2개의 아단위 중 다른 하나에서 "홀" 변형을 포함하는, 이른바 "노브 인투 홀" 변형이다.

[0268] 노브 인투 홀 기술은 예를 들면 US 5,731,168; US 7,695,936; Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996) 및

Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001)에 설명된다. 일반적으로, 상기 방법은 이중이량체 형성을 증진하고 동종이량체 형성을 방해하기 위해 용기가 공동 내에 배치될 수 있도록, 용기 ("노브")를 첫 번째 폴리펩티드의 인터페이스에서, 그리고 상응하는 공동 ("홀")을 두 번째 폴리펩티드의 인터페이스 내에 도입하는 것을 수반한다. 용기는 첫 번째 폴리펩티드의 인터페이스로부터 작은 아미노산 측쇄를 더 큰 측쇄 (예를 들면 티로신 또는 트립토판)로 대체함으로써 작제된다. 용기와 동일한 또는 유사한 크기의 보상성 공동은 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 아미노산 측쇄 (예를 들면, 알라닌 또는 트레오닌)로 대체함으로써 두 번째 폴리펩티드의 인터페이스 내에 창출된다.

- [0269] 따라서, 특정한 실시형태에서, 이중특이적 항체의 Fc 도메인의 첫 번째 아단위의 CH3 도메인 내에 아미노산 잔기가 더 큰 측쇄 용적을 갖는 아미노산 잔기로 대체되어, 두 번째 아단위의 CH3 도메인 내에 공동에서 위치 가능한 첫 번째 아단위의 CH3 도메인 내에 용기가 생성되고, 그리고 Fc 도메인의 두 번째 아단위의 CH3 도메인 내에 아미노산 잔기가 더 작은 측쇄 용적을 갖는 아미노산 잔기로 대체되어, 첫 번째 아단위의 CH3 도메인 내에 용기가 위치 가능한 두 번째 아단위의 CH3 도메인 내에 공동이 생성된다.
- [0270] 바람직하게는 더 큰 측쇄 용적을 갖는 상기 아미노산 잔기는 아르기닌 (R), 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y) 및 트립토판 (W)으로 구성된 군에서 선택된다.
- [0271] 바람직하게는 더 작은 측쇄 용적을 갖는 상기 아미노산 잔기는 알라닌 (A), 세린 (S), 트레오닌 (T) 및 발린 (V)으로 구성된 군에서 선택된다.
- [0272] 용기 및 공동은 이들 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을, 예를 들면 부위 특이적 돌연변이유발에 의해, 또는 펩티드 합성에 의해 변형함으로써 만들어질 수 있다.
- [0273] 특정한 실시형태에서, Fc 도메인의 첫 번째 아단위 ("노브" 아단위) (의 CH3 도메인) 내에 위치 366에서 트레오닌 잔기가 트립토판 잔기 (T366W)로 대체되고, 그리고 Fc 도메인의 두 번째 아단위 ("홀" 아단위) (의 CH3 도메인) 내에 위치 407에서 티로신 잔기가 발린 잔기 (Y407V)로 대체된다. 한 실시형태에서, Fc 도메인의 두 번째 아단위 내에 추가적으로 위치 366에서 트레오닌 잔기가 세린 잔기 (T366S)로 대체되고 위치 368에서 류신 잔기가 알라닌 잔기 (L368A)로 대체된다 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링).
- [0274] 다른 추가의 실시형태에서, Fc 도메인의 첫 번째 아단위 내에 추가적으로 위치 354에서 세린 잔기가 시스테인 잔기 (S354C)로 대체되거나 위치 356에서 글루타민산 잔기가 시스테인 잔기 (E356C)로 대체되고 (특히 위치 354에서 세린 잔기가 시스테인 잔기로 대체되고), 그리고 Fc 도메인의 두 번째 아단위 내에 추가적으로 위치 349에서 티로신 잔기가 시스테인 잔기 (Y349C)에 의해 대체된다 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링). 이들 2개의 시스테인 잔기의 도입은 Fc 도메인의 2개의 아단위 사이에 이황화 다리의 형성을 야기하여, 이량체를 더욱 안정시킨다 (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).
- [0275] 특정한 실시형태에서, Fc 도메인의 첫 번째 아단위는 아미노산 치환 S354C 및 T366W를 포함하고, 그리고 Fc 도메인의 두 번째 아단위는 아미노산 치환 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V를 포함한다 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링).
- [0276] 특정한 실시형태에서 두 번째 항원에 결합하는 항원 결합 모이어티는 Fc 도메인 ("노브" 변형을 포함)의 첫 번째 아단위에 융합된다 (선택적으로, CCL2에 결합하는 첫 번째 항원 결합 모이어티, 및/또는 펩티드 링커를 통해). 이론에 얽매이지 않고, Fc 도메인의 노브 함유 아단위에, 두 번째 항원, 예컨대 활성화 T 세포 항원에 결합하는 항원 결합 모이어티의 융합은 활성화 T 세포 항원에 결합하는 2개의 항원 결합 도메인을 포함하는 항체의 생성 (2개의 노브 함유 폴리펩티드의 입체 충돌)을 (더욱) 최소화 것이다.
- [0277] 이중이량체화를 시행하기 위한 CH3-변형의 다른 기술이 본원 발명에 따른 대안으로서 예기되고, 그리고 예를 들면 WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954, WO 2013/096291에 설명된다.
- [0278] 한 실시형태에서, EP 1870459에 설명된 이중이량체화 접근방식이 대안적으로 이용된다. 이러한 접근방식은 Fc 도메인의 2개의 아단위 사이에서 CH3/CH3 도메인 인터페이스 내에 특정한 아미노산 위치에서 반대 전하를 갖는 하전된 아미노산의 도입에 기초된다. 본원 발명의 이중특이적 항체에 대한 한 가지 바람직한 실시형태는 아미노산 돌연변이 R409D; 2개의 CH3 도메인 (Fc 도메인의) 중 하나에서 K370E 및 아미노산 돌연변이 D399K; Fc 도메인의 CH3 도메인 중 다른 하나에서 E357K이다 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링).
- [0279] 다른 실시형태에서, 본원 발명의 이중특이적 항체는 Fc 도메인의 첫 번째 아단위의 CH3 도메인에서 아미노산 돌

연변이 T366W 및 Fc 도메인의 두 번째 아단위의 CH3 도메인에서 아미노산 돌연변이 T366S, L368A, Y407V, 그리고 부가적으로 아미노산 돌연변이 R409D; Fc 도메인의 첫 번째 아단위의 CH3 도메인에서 K370E 및 아미노산 돌연변이 D399K; Fc 도메인의 두 번째 아단위의 CH3 도메인에서 E357K를 포함한다 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링).

[0280] 다른 실시형태에서, 본원 발명의 이중특이적 항체는 Fc 도메인의 첫 번째 아단위의 CH3 도메인에서 아미노산 돌연변이 S354C, T366W 및 Fc 도메인의 두 번째 아단위의 CH3 도메인에서 아미노산 돌연변이 Y349C, T366S, L368A, Y407V를 포함하거나, 또는 상기 이중특이적 항체는 Fc 도메인의 첫 번째 아단위의 CH3 도메인에서 아미노산 돌연변이 Y349C, T366W 및 Fc 도메인의 두 번째 아단위의 CH3 도메인에서 아미노산 돌연변이 S354C, T366S, L368A, Y407V, 그리고 부가적으로 아미노산 돌연변이 R409D; Fc 도메인의 첫 번째 아단위의 CH3 도메인에서 K370E 및 아미노산 돌연변이 D399K; Fc 도메인의 두 번째 아단위의 CH3 도메인에서 E357K를 포함한다 (이들 모두 Kabat EU 색인에 따른 넘버링).

[0281] 한 실시형태에서, WO 2013/157953에 설명된 이중이량체화 접근방식이 대안적으로 이용된다. 한 실시형태에서, 첫 번째 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 T366K를 포함하고, 그리고 두 번째 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 L351D를 포함한다 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링). 추가의 실시형태에서, 첫 번째 CH3 도메인은 추가 아미노산 돌연변이 L351K를 포함한다. 추가의 실시형태에서, 두 번째 CH3 도메인은 Y349E, Y349D 및 L368E에서 선택되는 아미노산 돌연변이 (바람직하게는 L368E)를 추가로 포함한다 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링).

[0282] 한 실시형태에서, WO 2012/058768에 설명된 이중이량체화 접근방식이 대안적으로 이용된다. 한 실시형태에서, 첫 번째 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 L351Y, Y407A를 포함하고, 그리고 두 번째 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 T366A, K409F를 포함한다. 추가의 실시형태에서, 두 번째 CH3 도메인은 위치 T411, D399, S400, F405, N390 또는 K392에서, 예를 들면, a) T411N, T411R, T411Q, T411K, T411D, T411E 또는 T411W, b) D399R, D399W, D399Y 또는 D399K, c) S400E, S400D, S400R 또는 S400K, d) F405I, F405M, F405T, F405S, F405V 또는 F405W, e) N390R, N390K 또는 N390D, f) K392V, K392M, K392R, K392L, K392F 또는 K392E에서 선택되는 추가 아미노산 돌연변이를 포함한다 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링). 추가의 실시형태에서, 첫 번째 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 L351Y, Y407A를 포함하고, 그리고 두 번째 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 T366V, K409F를 포함한다. 추가의 실시형태에서, 첫 번째 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 Y407A를 포함하고, 그리고 두 번째 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 T366A, K409F를 포함한다. 추가의 실시형태에서, 두 번째 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 K392E, T411E, D399R 및 S400R을 추가로 포함한다 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링).

[0283] 한 실시형태에서, WO 2011/143545에 설명된 이중이량체화 접근방식이 예를 들면, 368 및 409 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)로 구성된 군에서 선택되는 위치에서 아미노산 변형으로, 대안적으로 이용된다.

[0284] 한 실시형태에서, 전술된 노브 인투 홀 기술을 또한 이용하는, WO 2011/090762에 설명된 이중이량체화 접근방식이 대안적으로 이용된다. 한 실시형태에서, 첫 번째 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 T366W를 포함하고, 그리고 두 번째 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 Y407A를 포함한다. 한 실시형태에서, 첫 번째 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 T366Y를 포함하고, 그리고 두 번째 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 Y407T를 포함한다 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링).

[0285] 한 실시형태에서, 이중특이적 항체 또는 이의 Fc 도메인은 IgG<sub>2</sub> 하위부류의 것이고, 그리고 WO 2010/129304에 설명된 이중이량체화 접근방식이 대안적으로 이용된다.

[0286] 대안적 실시형태에서, Fc 도메인의 첫 번째와 두 번째 아단위의 연결을 증진하는 변형은 예를 들면 PCT 공개 WO 2009/089004에 설명된 바와 같이, 정전 스티어링 효과를 매개하는 변형을 포함한다. 일반적으로, 이러한 방법은 동종이량체 형성이 정전적으로 불리하지만 이중이량체화가 정전적으로 유리하게 되도록, 하전된 아미노산 잔기에 의한 2개의 Fc 도메인 아단위의 인터페이스에서 하나 이상의 아미노산 잔기의 대체를 수반한다. 이와 같은 한 가지 실시형태에서, 첫 번째 CH3 도메인은 음으로 하전된 아미노산 (예를 들면 글루타민산 (E) 또는 아스파르트산 (D), 바람직하게는 K392D 또는 N392D)으로 K392 또는 N392의 아미노산 치환을 포함하고, 그리고 두 번째 CH3 도메인은 양으로 하전된 아미노산 (예를 들면 리신 (K) 또는 아르기닌 (R), 바람직하게는 D399K, E356K, D356K 또는 E357K, 더 바람직하게는 D399K 및 E356K)으로 D399, E356, D356 또는 E357의 아미노산 치환을 포함한다. 추가의 실시형태에서, 첫 번째 CH3 도메인은 음으로 하전된 아미노산 (예를 들면, 글루타민산 (E) 또는 아스파르트산 (D), 바람직하게는 K409D 또는 R409D)으로 K409 또는 R409의 아미노산 치환을 추가로 포함한다. 추가의 실시형태에서, 첫 번째 CH3 도메인은 음으로 하전된 아미노산 (예를 들면, 글루타민산 (E) 또는 아스파르트산 (D))으로 K439 및/또는 K370 (이들 모두 Kabat EU 색인에 따른 넘버링)의 아미노산 치환을 추가로 또는

대안적으로 포함한다.

- [0287] 다른 추가의 실시형태에서, WO 2007/147901에 설명된 이중이량체화 접근방식이 대안적으로 이용된다. 한 실시형태에서, 첫 번째 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 K253E, D282K 및 K322D를 포함하고, 그리고 두 번째 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 D239K, E240K 및 K292D를 포함한다 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링).
- [0288] 또 다른 실시형태에서, WO 2007/110205에 설명된 이중이량체화 접근방식이 대안적으로 이용될 수 있다.
- [0289] 한 실시형태에서, Fc 도메인의 첫 번째 아단위는 아미노산 치환 K392D 및 K409D를 포함하고, 그리고 Fc 도메인의 두 번째 아단위는 아미노산 치환 D356K 및 D399K를 포함한다 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링).
- [0290] 이중특이적 항-CCL2 항체에 대해 본원에서 이용된 용어 "야생형 (WT) IgG 또는 IgG1"은 이중이량체화를 증진하는 전술된 변형/돌연변이를 포함할 수 있지만 아래에 설명된 바와 같은 Fc 수용체 결합 및/또는 이펙터 기능을 증가시키거나 감소시키는 추가의 Fc 도메인 변형/돌연변이를 포함하지 않는 IgG 또는 IgG1 불변 중쇄를 포함하는 이중특이적 항체를 지칭한다.
- [0291] **Fc 수용체 결합 및/또는 이펙터 기능을 증가시키거나 감소시키는 Fc 도메인 변형/돌연변이:**
- [0292] 스위핑 기술을 통한 이중특이적 항-CCL2 항체의 변형
- [0293] 이중특이적 항-CCL2 항체는, 이들 이중특이적 항-CCL2 항체가 더 긴 기간에 걸쳐 자유 CC12를 제거할 수 있게 하고 생체내 항암 효과와 같은 생물학적 효과를 지속적으로 촉진하기 위해 스위핑 기술을 이용하여 변형되었다.
- [0294] 스위핑 개념은 예를 들면, 본원에 참조로서 포함되는 Igawa et al, Immunological Reviews 270 (2016) 132-151, WO2012/122011, WO2016/098357 및 WO2013/081143에 설명된다.
- [0295] 본원 발명은 전술된 항체의 산성 pH 범위에서 항원 결합 활성 (결합 능력)을 중성 pH 범위에서 이의 항원 결합 활성 미만으로 감소시킴으로써, 세포 내로의 항체 매개 항원 흡수를 촉진하기 위한 방법을 제공하며; 이것은 세포 내로의 항원 흡수를 촉진한다. 본원 발명은 또한, 세포 내로의 항원 흡수를 촉진하는, 전술된 항체의 항원 결합 도메인에서 적어도 하나의 아미노산을 변형하는 것을 기초로 하는, 세포 내로의 항체 매개 항원 흡수를 촉진하기 위한 방법을 제공한다. 본원 발명은 또한, 세포 내로의 항원 흡수를 촉진하는, 적어도 하나의 아미노산을 히스티딘으로 치환하거나, 또는 적어도 하나의 히스티딘을 전술된 항체의 항원 결합 도메인 내로 삽입하는 것을 기초로 하는, 세포 내로의 항체 매개 항원 흡수를 촉진하기 위한 방법을 제공한다.
- [0296] 본원에서, 항체에 의해 매개된 "세포 내로의 항원 흡수"는 항원이 세포내이입에 의해 세포 내로 흡수된다는 것을 의미한다. 한편, 본원에서, "세포 내로의 흡수를 촉진한다"는 혈장에서 항원에 결합된 항체의 세포내 흡수 속도가 향상되고/되거나 흡수된 항원이 혈장으로 재순환되는 양이 감소된다는 것을 의미한다. 이는 세포 내로의 흡수 속도가, 중성 pH 범위에서 항체의 인간 FcRn 결합 활성을 증가시키기 전, 또는 인간 FcRn 결합 활성을 증가시키고 산성 pH 범위에서 항체의 항원 결합 활성 (결합 능력)을 중성 pH 범위에서 이의 항원 결합 활성 미만으로 감소시키기 전 항체와 비교하여 촉진된다는 것을 의미한다. 흡수 속도는 바람직하게는 무손상 인간 IgG와 비교하여, 더 바람직하게는 무손상 인간 IgG와 비교하여 개선된다. 따라서, 본원 발명에서, 세포 내로의 항원 흡수가 항체에 의해 촉진되는지 여부가 세포 내로의 항원 흡수 속도의 증가에 근거하여 평가될 수 있다. 세포 내로의 항원 흡수 속도는 예를 들면, 인간 FcRn-발현 세포를 함유하는 배양 배지에 항원 및 항체를 첨가한 후 상기 배지에서 항원 농도의 감소를 시간의 추이에서 모니터링함으로써, 또는 인간 FcRn-발현 세포 내로의 항원 흡수의 양을 시간의 추이에서 모니터링함으로써 계산될 수 있다. 세포 내로의 항체 매개 항원 흡수 속도를 촉진하기 위한 본원 발명의 방법을 이용하여, 예를 들면, 혈장으로부터 항원 제거의 속도가 항체를 투여함으로써 향상될 수 있다. 따라서, 세포 내로의 항체 매개 항원 흡수가 촉진되는지 여부는 또한, 예를 들면, 혈장으로부터 항원 제거의 속도가 가속화되는지 또는 혈장 내 총 항원 농도가 항체를 투여함으로써 감소되는지 여부를 조사함으로써 평가될 수 있다.
- [0297] 본원에서, "혈장 내 총 항원 농도"는 항체 결합된 항원 및 비-결합된 항원 농도의 합계, 또는 항체 비-결합된 항원 농도인 "혈장 내 자유 항원 농도"를 의미한다. "혈장 내 총 항원 농도" 또는 "혈장 내 자유 항원 농도"를 측정하기 위한 다양한 방법이 아래에 설명된 바와 같이 당해 분야에 널리 알려져 있다.
- [0298] 본원에서 이용된 바와 같이, "무손상 인간 IgG" (또는 "야생형 (WT) 인간 IgG)는 변형되지 않은 (상기 이중이량체화를 위한 잠재적 변형에 대해서는 제외하고) 인간 IgG인 것으로 의미되고 IgG의 특정한 부류로 한정되지 않는다. 이는 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4가 산성 pH 범위에서 인간 FcRn에 결합할 수 있는 한, "무손상 인

간 IgG"로서 이용될 수 있다는 것을 의미한다. 바람직하게는, "무손상 인간 IgG"는 인간 IgG1일 수 있다.

- [0299] 본원 발명은 또한, 단일 항체가 결합할 수 있는 항원 수를 증가시키기 위한 방법을 제공한다. 더 특이적으로, 본원 발명은 중성 pH 범위에서 항체의 인간 FcRn 결합 활성을 증가시킴으로써, 산성 pH 범위에서 인간 FcRn 결합 활성을 갖는 단일 항체가 결합할 수 있는 항원 수를 증가시키기 위한 방법을 제공한다. 본원 발명은 또한, 항체의 인간 FcRn 결합 도메인에서 적어도 하나의 아미노산을 변형함으로써, 산성 pH 범위에서 인간 FcRn 결합 활성을 갖는 단일 항체가 결합할 수 있는 항원 수를 증가시키기 위한 방법을 제공한다.
- [0300] 본원 발명은 세포 내로의 항체 매개 항원 흡수를 촉진하기 위한 방법을 제공한다. 더 특이적으로, 본원 발명은 중성 pH 범위에서 항체의 인간 FcRn 결합 활성을 증가시키는 것을 기초로 하는, 산성 pH 범위에서 인간 FcRn 결합 활성을 갖는 항체에 의한 세포 내로의 항원 흡수를 촉진하기 위한 방법을 제공한다. 본원 발명은 또한, 항체의 인간 FcRn 결합 도메인에서 적어도 하나의 아미노산을 변형하는 것을 기초로 하는, 산성 pH 범위에서 인간 FcRn 결합 활성을 갖는 항체에 의한 세포 내로의 항원 흡수를 개선하기 위한 방법을 제공한다.
- [0301] 본원 발명은 또한, 부모 IgG의 Fc 도메인을 포함하는 인간 FcRn 결합 도메인의 부모 IgG Fc 도메인 내에 위치 237, 238, 239, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 270, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 325, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434 및 436 (EU 넘버링)의 것들에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산에 대한 상이한 아미노산의 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 인간 FcRn 결합 도메인을 이용하는 것을 기초로 하는, 산성 pH 범위에서 인간 FcRn 결합 활성을 갖는 항체에 의한 세포 내로의 항원 흡수를 촉진하기 위한 방법을 제공한다.
- [0302] 본원 발명은 또한, 전술된 항체의 산성 pH 범위에서 항원 결합 활성 (결합 능력)을 중성 pH 범위에서 이의 항원 결합 활성 미만으로 감소시킴으로써, 세포 내로의 항체 매개 항원 흡수를 촉진하기 위한 방법을 제공하며; 이것은 세포 내로의 항원 흡수를 촉진한다. 본원 발명은 또한, 세포 내로의 항원 흡수를 촉진하는, 전술된 항체의 항원 결합 도메인에서 적어도 하나의 아미노산을 변형하는 것을 기초로 하는, 세포 내로의 항체 매개 항원 흡수를 촉진하기 위한 방법을 제공한다. 본원 발명은 또한, 세포 내로의 항원 흡수를 촉진하는, 적어도 하나의 아미노산을 히스티딘으로 치환하거나, 또는 적어도 하나의 히스티딘을 전술된 항체의 항원 결합 도메인 내로 삽입하는 것을 기초로 하는, 세포 내로의 항체 매개 항원 흡수를 촉진하기 위한 방법을 제공한다.
- [0303] 본원에서, 항체에 의해 매개된 "세포 내로의 항원 흡수"는 항원이 세포내이입에 의해 세포 내로 흡수된다는 것을 의미한다. 한편, 본원에서, "세포 내로의 흡수를 촉진한다"는 혈장에서 항원에 결합된 항체의 세포내 흡수 속도가 향상되고/되거나 흡수된 항원이 혈장으로 재순환되는 양이 감소된다는 것을 의미한다. 이는 세포 내로의 흡수 속도가, 중성 pH 범위에서 항체의 인간 FcRn 결합 활성을 증가시키기 전, 또는 인간 FcRn 결합 활성을 증가시키고 산성 pH 범위에서 항체의 항원 결합 활성 (결합 능력)을 중성 pH 범위에서 이의 항원 결합 활성 미만으로 감소시키기 전 항체와 비교하여 촉진된다는 것을 의미한다. 흡수 속도는 바람직하게는 무손상 인간 IgG와 비교하여, 더 바람직하게는 무손상 인간 IgG와 비교하여 개선된다. 따라서, 본원 발명에서, 세포 내로의 항원 흡수가 항체에 의해 촉진되는지 여부가 세포 내로의 항원 흡수 속도의 증가에 근거하여 평가될 수 있다. 세포 내로의 항원 흡수 속도는 예를 들면, 인간 FcRn-발현 세포를 함유하는 배양 배지에 항원 및 항체를 첨가한 후 상기 배지에서 항원 농도의 감소를 시간의 추이에서 모니터링함으로써, 또는 인간 FcRn-발현 세포 내로의 항원 흡수의 양을 시간의 추이에서 모니터링함으로써 계산될 수 있다. 세포 내로의 항체 매개 항원 흡수 속도를 촉진하기 위한 본원 발명의 방법을 이용하여, 예를 들면, 혈장으로부터 항원 제거의 속도가 항체를 투여함으로써 향상될 수 있다. 따라서, 세포 내로의 항체 매개 항원 흡수가 촉진되는지 여부는 또한, 예를 들면, 혈장으로부터 항원 제거의 속도가 가속화되는지 또는 혈장 내 총 항원 농도가 항체를 투여함으로써 감소되는지 여부를 조사함으로써 평가될 수 있다.
- [0304] 본원에서, "혈장 내 총 항원 농도"는 항체 결합된 항원 및 비-결합된 항원 농도의 합계, 또는 항체 비-결합된 항원 농도인 "혈장 내 자유 항원 농도"를 의미한다. "혈장 내 총 항원 농도" 또는 "혈장 내 자유 항원 농도"를 측정하기 위한 다양한 방법이 아래에 설명된 바와 같이 당해 분야에 널리 알려져 있다.
- [0305] 본원에서 이용된 바와 같이, "무손상 인간 IgG" (또는 "야생형 IgG")는 변형되지 않은 인간 IgG (상기 이종이량체화를 위한 잠재적 변형에 대해서는 제외하고)인 것으로 의미되고 IgG의 특정한 부류로 한정되지 않는다. 이는 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4가 산성 pH 범위에서 인간 FcRn에 결합할 수 있는 한, "무손상 인간 IgG"로서 이용될 수 있다는 것을 의미한다. 바람직하게는, "무손상 인간 IgG"는 인간 IgG1일 수 있다.
- [0306] 본원에서 이용된 바와 같이, "부모 IgG"는 부모 IgG의 변형된 변이체가 산성 pH 범위에서 인간 FcRn에 결합할

수 있는 한 (이런 이유로, 부모 IgG가 산성 조건에서 인간 FcRn에 대한 결합 활성을 반드시 필요로 하지는 않는 한), 변이체를 생성하도록 차후에 변형되는 변형되지 않은 IgG를 의미한다. 부모 IgG는 자연 발생 IgG, 또는 자연 발생 IgG의 변이체 또는 조작된 이형일 수 있다. 부모 IgG는 폴리펩티드 그 자체, 부모 IgG를 포함하는 조성물, 또는 이것을 인코딩하는 아미노산 서열을 지칭할 수 있다. 유의할 점은 "부모 IgG"에는 아래에 개시된 바와 같은 공지된 상업적인, 재조합적으로 생산된 IgG가 포함된다는 것이다. "부모 IgG"의 기원은 한정되지 않으며, 비인간 동물의 임의의 생물체 또는 인간으로부터 획득될 수 있다. 바람직하게는, 생물체는 생쥐, 쥐, 기니 피그, 햄스터, 게르빌루스쥐, 고양이, 토끼, 개, 염소, 양, 소, 말, 낙타 및 비인간 영장류에서 선택된다. 다른 실시형태에서, "부모 IgG"는 또한, 시노물구스, 마모셋, 붉은 털 원숭이, 침팬지 또는 인간으로부터 획득될 수 있다. 바람직하게는, "부모 IgG"는 인간 IgG1로부터 획득되지만 IgG의 특정한 부류로 한정되지 않는다. 이는 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4가 "부모 IgG"로서 적절하게 이용될 수 있다는 것을 의미한다. 유사한 방식으로, 상기 임의의 생물체로부터 획득된 임의의 부류 또는 하위부류의 IgG가 바람직하게는 "부모 IgG"로서 이용될 수 있다. 자연 발생 IgG의 변이체 또는 조작된 이형의 실례는 Curr Opin Biotechnol. 2009 Dec; 20(6): 685-91, Curr Opin Immunol. 2008 Aug; 20(4): 460-70, Protein Eng Des Sel. 2010 Apr; 23(4): 195-202, WO 2009/086320, WO 2008/092117, WO 2007/041635 및 WO 2006/105338에 설명되지만, 거기에 한정되지 않는다.

[0307] 본원 발명은 또한, 항체를 투여함으로써 혈장 항원을 제거하는 능력을 증가시키기 위한 방법을 제공한다. 본원 발명에서, "혈장 항원을 제거하는 능력을 증가시키기 위한 방법"은 "혈장으로부터 항원을 제거하는 항체의 능력을 증강하기 위한 방법"과 동의어이다. 더 특이적으로, 본원 발명은 중성 pH 범위에서 항체의 인간 FcRn 결합 활성을 증가시킴으로써, 산성 pH 범위에서 인간 FcRn 결합 활성을 갖는 항체에 의한 혈장 항원을 제거하는 능력을 증가시키기 위한 방법을 제공한다. 본원 발명은 또한, 항체의 인간 FcRn 결합 도메인에서 적어도 하나의 아미노산을 변형하는 것을 기초로 하는, 산성 pH 범위에서 인간 FcRn 결합 활성을 갖는 항체에 의한 혈장 항원을 제거하는 능력을 증가시키기 위한 방법을 제공한다.

[0308] 본원 발명은 또한, 상이한 아미노산을 갖는 부모 IgG의 Fc 도메인을 포함하는 인간 FcRn 결합 도메인의 부모 IgG Fc 도메인 내에 위치 237, 238, 239, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 270, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 325, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434 및 436 (EU 넘버링)의 것들에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산의 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 인간 FcRn 결합 도메인을 이용함으로써, 산성 pH 범위에서 인간 FcRn 결합 활성을 갖는 항체에 의한 혈장 항원을 제거하는 능력을 증가시키기 위한 방법을 제공한다.

[0309] 본원 발명은 또한, 중성 pH 범위에서 항원 결합 활성과 비교하여, 혈장 항원을 제거하는 개선된 능력을 갖는 전술된 항체의 산성 pH 범위에서 항원 결합 활성을 감소시킴으로써, 항체에 의한 혈장 항원을 제거하는 능력을 증가시키기 위한 방법을 제공한다. 본원 발명은 또한, 혈장 항원을 제거하는 개선된 능력을 갖는 전술된 항체의 항원 결합 도메인에서 적어도 하나의 아미노산을 변형함으로써, 항체에 의한 혈장 항원을 제거하는 능력을 증가시키기 위한 방법을 제공한다. 본원 발명은 또한, 항체를 투여함으로써, 적어도 하나의 아미노산을 히스티딘으로 치환함으로써, 또는 혈장 항원을 제거하는 개선된 능력을 갖는 전술된 항체의 항원 결합 도메인 내로 적어도 하나의 히스티딘을 삽입함으로써 혈장 항원을 제거하는 능력을 증가시키기 위한 방법을 제공한다.

[0310] 본원에서, "혈장 항원을 제거하는 능력"은 항체가 투여되거나 생체내에서 분비될 때, 혈장으로부터 항원을 제거하는 능력을 의미한다. 따라서, 본원에서 "혈장 항원을 제거하는 항체의 능력 증가"는 중성 pH 범위에서 항체의 인간 FcRn 결합 활성을 증가시키기 전, 또는 인간 FcRn 결합 활성을 증가시키는 것과 동시에 산성 pH 범위에서 이의 항원 결합 활성을 중성 pH 범위에서 항원 결합 활성 미만으로 감소시키기 전과 비교하여, 혈장으로부터 항원 제거의 속도가 항체의 투여 시에 가속화된다는 것을 의미한다. 혈장으로부터 항원을 제거하는 항체의 활성 증가는 예를 들면, 가용성 항원 및 항체를 생체내 투여하고, 투여 후 혈장 내 가용성 항원의 농도를 측정함으로써 평가될 수 있다. 가용성 항원 및 항체의 투여 후 혈장 내 가용성 항원의 농도가 중성 pH 범위에서 항체의 인간 FcRn 결합 활성을 증가시킴으로써, 또는 이의 인간 FcRn 결합 활성을 증가시키는 것과 동시에 산성 pH 범위에서 이의 항원 결합 활성을 중성 pH 범위에서 항원 결합 활성 미만으로 감소시킴으로써 감소되는 경우, 혈장 항원을 제거하는 항체의 능력은 증가되는 것으로 판단될 수 있다. 가용성 항원의 형태는 항체 결합된 항원 또는 항체 비-결합된 항원일 수 있는데, 이의 농도는 각각, "혈장 내 항체 결합된 항원 농도" 및 "혈장 내 항체 비-결합된 항원 농도"로 결정될 수 있다 (후자는 "혈장 내 자유 항원 농도"와 동의어이다. "혈장 내 총 항원 농도"가 항체 결합된 항원 및 비-결합된 항원 농도의 합계, 또는 항체 비-결합된 항원 농도인 "혈장 내 자유 항원 농도"를 의미하기 때문에, 가용성 항원의 농도는 "혈장 내 총 항원 농도"로 결정될 수 있다. "혈장 내 총 항원 농도" 또는 "혈장 내 자유 항원 농도"를 측정하기 위한 다양한 방법이 아래에 설명된 바와 같이 당해 분야에 널

리 알려져 있다.

- [0311] 본원 발명은 또한, 항체의 약동학을 개선하기 위한 방법을 제공한다. 더 특이적으로, 본원 발명은 중성 pH 범위에서 항체의 인간 FcRn 결합 활성을 증가시킴으로써, 산성 pH 범위에서 인간 FcRn 결합 활성을 갖는 항체의 약동학을 개선하기 위한 방법을 제공한다. 게다가, 본원 발명은 항체의 인간 FcRn 결합 도메인에서 적어도 하나의 아미노산을 변형함으로써, 산성 pH 범위에서 인간 FcRn 결합 활성을 갖는 항체의 약동학을 개선하기 위한 방법을 제공한다.
- [0312] 본원 발명은 또한, IgG의 Fc 도메인을 포함하는 인간 FcRn 결합 도메인의 부모 IgG Fc 도메인 내에 위치 237, 238, 239, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 270, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 325, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434 및 436 (EU 넘버링)의 것들에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산에 대해 상이한 아미노산의 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 인간 FcRn 결합 도메인을 이용함으로써, 산성 pH 범위에서 인간 FcRn 결합 활성을 갖는 항체의 약동학을 개선하기 위한 방법을 제공한다.
- [0313] 항체에 결합되지 않은 자유 항원의 혈장 농도 또는 자유 항원 농도 대 총 농도의 비율은 당업자에게 공지된 방법에 의해, 예를 들면, Pharm Res. 2006 Jan; 23 (1): 95-103에 기술된 방법에 의해 결정될 수 있다. 대안적으로, 항원이 생체내에서 특정 기능을 나타내는 경우, 항원이 항원 기능을 중화하는 항체 (길항성 분자)에 결합되는지 여부는 항원 기능이 중화되는지 여부를 검사함으로써 평가될 수 있다. 항원 기능이 중화되는지 여부는 항원 기능을 반영하는 생체내 마커를 검정함으로써 평가될 수 있다. 항원이 항원 기능을 활성화하는 항체 (효원성 분자)에 결합되는지 여부는 항원 기능을 반영하는 생체내 마커를 검정함으로써 평가될 수 있다.
- [0314] 자유 항원의 혈장 농도 및 혈장 내 자유 항원의 양 대 혈장 내 총 항원의 양의 비율의 결정, 생체내 마커 분석, 그리고 이런 측정은 특별히 제한되지는 않는다; 그러나, 상기 분석은 바람직하게는 항체의 투여 후 일정한 기간이 경과한 이후에 실행된다. 본원 발명에서, 항체의 투여 후 기간은 특별히 제한되지는 않는다; 당업자는 투여된 항체의 특성 등에 따라서 적절한 기간을 결정할 수 있다. 이런 기간에는 예를 들면, 항체 투여 다음날, 항체 투여 3일 후, 항체 투여 7일 후, 항체 투여 14일 후, 그리고 항체 투여 28일 후가 포함한다. 본원에서, "혈장 항원 농도"는 항체 결합된 항원 및 비-결합된 항원 농도의 합계인 "혈장 내 총 항원 농도", 또는 항체 비-결합된 항원 농도인 "혈장 내 자유 항원 농도" 중 어느 한 가지를 의미한다.
- [0315] 혈장 내 총 항원 농도는 무손상 인간 IgG Fc 도메인을 인간 FcRn 결합 도메인으로서 포함하는 참조 항체의 투여와 비교하여 또는 분자 본원 발명의 항원 결합 도메인이 투여되지 않을 때와 비교하여, 본원 발명의 항체의 투여에 의해 2배, 5배, 10배, 20배, 50배, 100배, 200배, 500배, 1,000배, 또는 심지어 그 초과로 낮아질 수 있다.
- [0316] 다른 양상에서, 본원 발명은 pH 의존성 결합 특성을 나타내는 이중특이적 항-CCL2 항체를 제공한다. 본원에서 이용된 표현 "pH 의존성 결합"은 항체가 "중성 pH에서 결합과 비교하여 산성 pH에서 CCL2에 대한 감소된 결합"을 나타낸다는 것을 의미한다 (본원 발명의 목적으로, 양쪽 표현은 상호교환적으로 이용될 수 있다). 예를 들어, "pH 의존성 결합 특성"을 갖는 항체에는 산성 pH에서보다 중성 pH에서 더 높은 친화성으로 CCL2에 결합하는 항체가 포함된다. 일정한 실시형태에서, 본원 발명의 이중특이적 항체는 산성 pH에서보다 중성 pH에서 적어도 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000배, 또는 그 초과로 높은 친화성으로 CCL2에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항체는 pH5.8에서보다 pH7.4에서 더 높은 친화성으로 CCL2에 결합한다. 추가의 실시형태에서, 항체는 pH5.8에서보다 pH7.4에서 적어도 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000배, 또는 그 초과로 높은 친화성으로 CCL2에 결합한다.
- [0317] 항원이 가용성 단백질인 경우, 항원에 대한 항체의 결합은 혈장 내 항원의 연장된 반감기 (즉, 혈장으로부터 항원의 감소된 청소)을 야기할 수 있는데, 그 이유는 항체가 혈장 내에서 항원 그 자체보다 더 긴 반감기를 가질 수 있고 항원에 대한 운반체로서 역할을 할 수 있기 때문이다. 이것은 세포 내 엔도솜 경로를 통한 FcRn에 의한 항원 항체 복합체의 재순환에 기인한다 (Roopenian, Nat. Rev. Immunol. 7(9): 715-725 (2007)). 그러나, 중성 세포외 환경에서는 항원에 결합하지만 세포 내로 유입 이후에는 항원을 산성 엔도솜 구획 내로 방출하는, pH 의존성 결합 특성을 갖는 항체는 pH 독립성 방식으로 결합하는 대응물에 비하여 항원 중화 및 청소의 관점에서 우수한 특성을 가질 것으로 예상된다 (Igawa et al., Nature Biotechnol. 28(11): 1203-1207 (2010); Devanaboyina et al., mAbs 5(6): 851-859 (2013); WO 2009/125825).

- [0318] 본원 발명의 목적으로, CCL2에 대한 항체의 "친화성"은 항체의 KD로 표현된다. 항체의 KD는 항체-항원 상호작용의 평형 해리 상수를 지칭한다. 항원에 대한 항체 결합의 KD 값이 더 클수록, 특정 항원에 대한 결합 친화성이 더 약하다. 따라서, 본원에서 이용된 표현 "산성 pH에서보다 중성 pH에서 더 높은 친화성" (또는 동등한 표현 "pH 의존성 결합")은 산성 pH에서 CCL2에 대한 항체 결합의 KD가 중성 pH에서 CCL2에 대한 항체 결합의 KD보다 크다는 것을 의미한다. 예를 들어, 본원 발명의 맥락에서, 항체는 산성 pH에서 CCL2에 대한 항체 결합의 KD가 중성 pH에서 CCL2에 대한 항체 결합의 KD보다 적어도 2배 크면, 산성 pH에서보다 중성 pH에서 더 높은 친화성으로 CCL2에 결합하는 것으로 간주된다. 따라서, 본원 발명은 중성 pH에서 CCL2에 대한 항체 결합의 KD보다 적어도 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000배, 또는 그 초과로 큰 KD로, 산성 pH에서 CCL2에 결합하는 항체를 포함한다. 다른 실시형태에서, 중성 pH에서 항체의 KD 값은 10<sup>-7</sup> M, 10<sup>-8</sup> M, 10<sup>-9</sup> M, 10<sup>-10</sup> M, 10<sup>-11</sup> M, 10<sup>-12</sup> M, 또는 그 미만일 수 있다. 다른 실시형태에서, 산성 pH에서 항체의 KD 값은 10<sup>-9</sup> M, 10<sup>-8</sup> M, 10<sup>-7</sup> M, 10<sup>-6</sup> M, 또는 그 초과일 수 있다.
- [0319] 추가의 실시형태에서 항체는 pH5.8에서 CCL2에 대한 항체 결합의 KD가 pH7.4에서 CCL2에 대한 항체 결합의 KD보다 적어도 2배 크면, 산성 pH에서보다 중성 pH에서 더 높은 친화성으로 결합하는 것으로 간주된다. 일부 실시형태에서 소정의 항체는 pH7.4에서 CCL2에 대한 항체 결합의 KD보다 적어도 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000배, 또는 그 초과로 큰 KD로, pH5.8에서 CCL2에 결합한다. 다른 실시형태에서, pH7.4에서 항체의 KD 값은 10<sup>-7</sup> M, 10<sup>-8</sup> M, 10<sup>-9</sup> M, 10<sup>-10</sup> M, 10<sup>-11</sup> M, 10<sup>-12</sup> M, 또는 그 미만일 수 있다. 다른 실시형태에서, pH5.8에서 항체의 KD 값은 10<sup>-9</sup> M, 10<sup>-8</sup> M, 10<sup>-7</sup> M, 10<sup>-6</sup> M, 또는 그 초과일 수 있다.
- [0320] 특정 항원에 대한 항체의 결합 특성은 또한, 항체의 kd로 표현될 수 있다. 항체의 kd는 특정 항원에 대한 항체의 해리 속도 상수를 지칭하고 역초 (즉, 초<sup>-1</sup>)로 표현된다. kd 값의 증가는 항원에 대한 항체의 더 약한 결합을 의미한다. 본원 발명은 이런 이유로, 중성 pH에서보다 산성 pH에서 더 높은 kd 값으로 CCL2에 결합하는 항체를 포함한다. 본원 발명은 중성 pH에서 CCL2에 대한 항체 결합의 Kd보다 적어도 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000배, 또는 그 초과로 큰 kd로, 산성 pH에서 CCL2에 결합하는 항체를 포함한다. 다른 실시형태에서, 중성 pH에서 항체의 kd 값은 10<sup>-2</sup> 1/s, 10<sup>-3</sup> 1/s, 10<sup>-4</sup> 1/s, 10<sup>-5</sup> 1/s, 10<sup>-6</sup> 1/s, 또는 그 미만일 수 있다. 다른 실시형태에서, 산성 pH에서 항체의 kd 값은 10<sup>-3</sup> 1/s, 10<sup>-2</sup> 1/s, 10<sup>-1</sup> 1/s, 또는 그 초과일 수 있다. 본원 발명은 또한, pH7.4에서보다 pH5.8에서 더 높은 kd 값으로 CCL2에 결합하는 항체를 포함한다. 본원 발명은 pH7.4에서 CCL2에 대한 항체 결합의 Kd보다 적어도 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000배, 또는 그 초과로 큰 kd로, pH5.8에서 CCL2에 결합하는 항체를 포함한다. 다른 실시형태에서, pH7.4에서 항체의 kd 값은 10<sup>-2</sup> 1/s, 10<sup>-3</sup> 1/s, 10<sup>-4</sup> 1/s, 10<sup>-5</sup> 1/s, 10<sup>-6</sup> 1/s, 또는 그 미만일 수 있다. 다른 실시형태에서, pH5.8에서 항체의 kd 값은 10<sup>-3</sup> 1/s, 10<sup>-2</sup> 1/s, 10<sup>-1</sup> 1/s, 또는 그 초과일 수 있다.
- [0321] 일정한 경우에, "중성 pH에서 결합과 비교하여 산성 pH에서 CCL2에 대한 감소된 결합"은 산성 pH에서 CCL2에 대한 항체 결합의 KD 값 대 중성 pH에서 CCL2에 대한 항체 결합의 KD 값의 비율 (또는 그 반대로)로 표현된다. 예를 들어, 본원 발명의 목적으로, 항체는 항체가 2 이상의 산성/중성 KD 비율을 나타내면, "중성 pH에서 결합과 비교하여 산성 pH에서 CCL2에 대한 감소된 결합"을 나타내는 것으로 간주될 수 있다. 일정한 실시형태에서, 본원 발명의 항-CCL2 항체에 대한 pH5.8/pH7.4 KD 비율은 2 이상이다. 일정한 예시적인 실시형태에서, 본원 발명의 항체에 대한 산성/중성 KD 비율은 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000, 또는 그 초과일 수 있다. 다른 실시형태에서, 중성 pH에서 항체의 KD 값은 10<sup>-7</sup> M, 10<sup>-8</sup> M, 10<sup>-9</sup> M, 10<sup>-10</sup> M, 10<sup>-11</sup> M, 10<sup>-12</sup> M, 또는 그 미만일 수 있다. 다른 실시형태에서, 산성 pH에서 항체의 KD 값은 10<sup>-9</sup> M, 10<sup>-8</sup> M, 10<sup>-7</sup> M, 10<sup>-6</sup> M, 또는 그 초과일 수 있다. 추가의 경우에 항체는 항체가 2 이상의 pH5.8/pH7.4 KD 비율을 나타내면, "중성 pH에서 결합과 비교하여 산성 pH에서 CCL2에 대한 감소된 결합"을 나타내는 것으로 간주될 수 있다. 일정한 예시적인 실시형태에서, 항체에 대한 pH5.8/pH7.4 KD 비율은 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000, 또는 그 초과일 수 있다. 다른 실시형태에서, pH7.4에서 항체의 KD 값은 10<sup>-7</sup> M, 10<sup>-8</sup> M, 10<sup>-9</sup> M, 10<sup>-10</sup> M, 10<sup>-11</sup> M, 10<sup>-12</sup> M, 또는 그 미만일 수 있다. 다른 실시형태에서, pH5.8에서 항체의 KD 값은 10<sup>-9</sup> M, 10<sup>-8</sup> M, 10<sup>-7</sup> M, 10<sup>-6</sup> M, 또는 그 초과일 수 있다.
- [0322] 일정한 경우에, "중성 pH에서 결합과 비교하여 산성 pH에서 CCL2에 감소된 결합"은 산성 pH에서 CCL2에 대한 항체 결합의 kd 값 대 중성 pH에서 CCL2에 대한 항체 결합의 kd 값의 비율 (또는 그 반대로)로 표현된다. 예를 들어, 본원 발명의 목적으로, 항체는 항체가 2 이상의 산성/중성 kd 비율을 나타내면, "중성 pH에서 결합과 비교

하여 산성 pH에서 CCL2에 감소된 결합"을 나타내는 것으로 간주될 수 있다. 일정한 예시적인 실시형태에서, 본원 발명의 항체에 대한 pH5.8/pH7.4 kd 비율은 2 이상이다. 일정한 예시적인 실시형태에서, 본원 발명의 항체에 대한 산성/중성 kd 비율은 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000, 또는 그 초과일 수 있다. 다른 실시형태에서, 중성 pH에서 항체의 kd 값은  $10^{-2}$  1/s,  $10^{-3}$  1/s,  $10^{-4}$  1/s,  $10^{-5}$  1/s,  $10^{-6}$  1/s, 또는 그 미만일 수 있다. 다른 실시형태에서, 산성 pH에서 항체의 kd 값은  $10^{-3}$  1/s,  $10^{-2}$  1/s,  $10^{-1}$  1/s, 또는 그 초과일 수 있다. 일정한 예시적인 실시형태에서, 본원 발명의 항체에 대한 pH5.8/pH7.4 kd 비율은 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000, 또는 그 초과일 수 있다. 다른 실시형태에서, pH7.4에서 항체의 kd 값은  $10^{-2}$  1/s,  $10^{-3}$  1/s,  $10^{-4}$  1/s,  $10^{-5}$  1/s,  $10^{-6}$  1/s, 또는 그 미만일 수 있다. 다른 실시형태에서, pH5.8에서 항체의 kd 값은  $10^{-3}$  1/s,  $10^{-2}$  1/s,  $10^{-1}$  1/s, 또는 그 초과일 수 있다.

[0323] 본원에서 이용된 표현 "산성 pH"는 4.0 내지 6.5의 pH를 의미한다. 표현 "산성 pH"는 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4 및 6.5 중 하나의 pH 값을 포함한다. 특정한 양상에서, "산성 pH"는 5.8이다.

[0324] 본원에서 이용된 표현 "중성 pH"는 6.7 내지 약 10.0의 pH를 의미한다. 표현 "중성 pH"는 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9.0, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9 및 10.0 중 하나의 pH 값을 포함한다. 특정한 양상에서, "중성 pH"는 7.4이다.

[0325] 본원에서 표시된 바와 같이, KD 값 및 kd 값은 항체-항원 상호작용을 특성화하기 위해 표면 플라즈몬 공명 기반 바이오센서를 이용하여 결정될 수 있다. KD 값 및 kd 값은 섭씨 25도 또는 섭씨 37도에서 결정될 수 있다.

[0326] 추가의 양상에서, 본원 발명은 CCL2와 면역 복합체 (즉, 항원 항체 복합체)를 형성하는 이중특이적 항-CCL2 항체를 제공한다. 일정한 실시형태에서, 2개 이상의 이중특이적 항-CCL2 항체가 2개 이상의 CCL2 분자에 결합하여 면역 복합체를 형성한다. 이것은, CCL2는 2개의 CCL2 분자를 포함하는 동중량체로서 존재하는 반면 항체는 2개의 항원 결합 부위를 갖기 때문에 가능하다.

[0327] 일반적으로 말하면, 2개 이상의 항체가 2개 이상 항원과의 면역 복합체를 형성하는 경우, 그 결과로 생성된 면역 복합체는 복합체 내에 항체의 Fc 영역을 통한 결합능 효과로 인해 세포 표면 상에 존재하는 Fc 수용체에 강하게 결합할 수 있고, 이후 높은 효율로 세포 내로 흡수될 수 있다. 따라서, 2개 이상의 항-CCL2 항체 및 2개 이상의 CCL2 분자를 포함하는 면역 복합체를 형성할 수 있는 진술된 항-CCL2 항체는 결합능 효과에 기인한 Fc 수용체에 대한 강한 결합을 통해, 생체 내 혈장으로부터 CCL2의 신속한 청소를 야기할 수 있다.

[0328] 게다가, pH 의존성 결합 특성을 갖는 항체는 pH 독립성 방식으로 결합하는 대응물에 비하여 항원 중화 및 청소의 관점에서 우수한 특성을 갖는 것으로 생각된다 (Igawa et al., Nature Biotech. 28(11): 1203-1207 (2010); Devanaboyina et al. mAbs 5(6): 851-859 (2013); WO 2009/125825). 이런 이유로, 상기 특성 둘 모두를 갖는 항체, 다시 말하면, pH 의존성 결합 특성을 갖고 2개 이상의 항체 및 2개 이상의 항원을 포함하는 면역 복합체를 형성하는 항체는 혈장으로부터 항원의 매우 가속화된 제거에 대한 훨씬 우수한 특성을 가질 것으로 예상된다 (WO 2013/081143).

[0329] 한 가지 양상에서, 본원 발명은 EU 넘버링에 따른, (a) 위치 236에서 하나의 아미노산 변형, 그리고 (b) 231, 232, 233, 234, 235, 237, 238, 239, 264, 266, 267, 268, 271, 295, 298, 325, 326, 327, 328, 330, 331, 332, 334 및 396으로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나의 위치의 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하는 적어도 2개의 아미노산 변형을 포함하는, 향상된 Fc감마RIIb 결합 활성을 갖는 변이체 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다.

[0330] 한 가지 양상에서, 본원 발명은 EU 넘버링에 따른 위치 236에서 아미노산 변형을 포함하는 향상된 Fc감마RIIb 결합 활성을 갖는 변이체 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다.

[0331] 한 가지 양상에서, 본원 발명은 EU 넘버링에 따른 (a) 위치 236에서 하나의 아미노산 변형, 그리고 (b) 231, 232, 235, 239, 268, 295, 298, 326, 330 및 396으로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나의 위치의 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하는 적어도 2개의 아미노산 변형을 포함하는, 향상된 Fc감마RIIb 결합 활성을 갖는 변이체 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다. 추가의 실시형태에서, 변이체 Fc 영역은 EU 넘버링에 따른 231, 232, 235, 239, 268, 295, 298, 326, 330 및 396으로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나의 위치의 아미노산 변형을 포함한다. 추가의 실시형태에서, 변이체 Fc 영역은 EU 넘버링에 따른 268, 295, 326 및 330으로 구

성된 군에서 선택되는 적어도 하나의 위치의 아미노산 변형을 포함한다.

[0332] 다른 양상에서, 본원 발명은 아래의 (1)-(37) 중 어느 하나의 아미노산 변형을 포함하는, 향상된 Fc감마RIIb 결합 활성을 갖는 변이체 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다: EU 넘버링에 따른 (1) 위치 231, 236, 239, 268 및 330; (2) 위치 231, 236, 239, 268, 295 및 330; (3) 위치 231, 236, 268 및 330; (4) 위치 231, 236, 268, 295 및 330; (5) 위치 232, 236, 239, 268, 295 및 330; (6) 위치 232, 236, 268, 295 및 330; (7) 위치 232, 236, 268 및 330; (8) 위치 235, 236, 268, 295, 326 및 330; (9) 위치 235, 236, 268, 295 및 330; (10) 위치 235, 236, 268 및 330; (11) 위치 235, 236, 268, 330 및 396; (12) 위치 235, 236, 268 및 396; (13) 위치 236, 239, 268, 295, 298 및 330; (14) 위치 236, 239, 268, 295, 326 및 330; (15) 위치 236, 239, 268, 295 및 330; (16) 위치 236, 239, 268, 298 및 330; (17) 위치 236, 239, 268, 326 및 330; (18) 위치 236, 239, 268 및 330; (19) 위치 236, 239, 268, 330 및 396; (20) 위치 236, 239, 268 및 396; (21) 위치 236 및 268; (22) 위치 236, 268 및 295; (23) 위치 236, 268, 295, 298 및 330; (24) 위치 236, 268, 295, 326 및 330; (25) 위치 236, 268, 295, 326, 330 및 396; (26) 위치 236, 268, 295 및 330; (27) 위치 236, 268, 295, 330 및 396; (28) 위치 236, 268, 298 및 330; (29) 위치 236, 268, 298 및 396; (30) 위치 236, 268, 326 및 330; (31) 위치 236, 268, 326, 330 및 396; (32) 위치 236, 268 및 330; (33) 위치 236, 268, 330 및 396; (34) 위치 236, 268 및 396; (35) 위치 236 및 295; (36) 위치 236, 330 및 396; 그리고 (37) 위치 236 및 396.

[0333] 추가의 실시형태에서, 향상된 Fc감마RIIb 결합 활성을 갖는 변이체 Fc 영역은 EU 넘버링에 따른 (a) 위치 231에서 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr; (b) 위치 232에서 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr; (c) 위치 233에서 Asp; (d) 위치 234에서 Trp, Tyr; (e) 위치 235에서 Trp; (f) 위치 236에서 Ala, Asp, Glu, His, Ile, Leu, Met, Asn, Gln, Ser, Thr, Val; (g) 위치 237에서 Asp, Tyr; (h) 위치 238에서 Glu, Ile, Met, Gln, Tyr; (i) 위치 239에서 Ile, Leu, Asn, Pro, Val; (j) 위치 264에서 Ile; (k) 위치 266에서 Phe; (l) 위치 267에서 Ala, His, Leu; (m) 위치 268에서 Asp, Glu; (n) 위치 271에서 Asp, Glu, Gly; (o) 위치 295에서 Leu; (p) 위치 298에서 Leu; (q) 위치 325에서 Glu, Phe, Ile, Leu; (r) 위치 326에서 Thr; (s) 위치 327에서 Ile, Asn; (t) 위치 328에서 Thr; (u) 위치 330에서 Lys, Arg; (v) 위치 331에서 Glu; (w) 위치 332에서 Asp; (x) 위치 334에서 Asp, Ile, Met, Val, Tyr; 그리고 (y) 위치 396에서 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산을 포함한다.

[0334] 추가의 실시형태에서, 향상된 Fc감마RIIb 결합 활성을 갖는 변이체 Fc 영역은 EU 넘버링에 따른 (a) 위치 231에서 Gly, Thr; (b) 위치 232에서 Asp; (c) 위치 235에서 Trp; (d) 위치 236에서 Asn, Thr; (e) 위치 239에서 Val; (f) 위치 268에서 Asp, Glu; (g) 위치 295에서 Leu; (h) 위치 298에서 Leu; (i) 위치 326에서 Thr; (j) 위치 330에서 Lys, Arg; 그리고 (k) 위치 396에서 Lys, Met로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 변형 (예를 들면, 치환)을 포함한다. 추가의 실시형태에서, 향상된 Fc감마RIIb 결합 활성을 갖는 변이체 Fc 영역은 EU 넘버링에 따른 위치 236에서 Asn, 위치 268에서 Glu, 위치 330에서 Lys 및 위치 396에서 Met의 아미노산 변형 (예를 들면, 치환)을 포함한다. 추가의 실시형태에서, 향상된 Fc감마RIIb 결합 활성을 갖는 변이체 Fc 영역은 EU 넘버링에 따른 위치 236에서 Asn, 위치 268에서 Asp 및 위치 330에서 Lys의 아미노산 변형 (예를 들면, 치환)을 포함한다. 추가의 실시형태에서, 향상된 Fc감마RIIb 결합 활성을 갖는 변이체 Fc 영역은 EU 넘버링에 따른 위치 236에서 Asn, 위치 268에서 Asp, 위치 295에서 Leu 및 위치 330에서 Lys의 아미노산 변형 (예를 들면, 치환)을 포함한다. 추가의 실시형태에서, 향상된 Fc감마RIIb 결합 활성을 갖는 변이체 Fc 영역은 EU 넘버링에 따른 위치 236에서 Thr, 위치 268에서 Asp 및 위치 330에서 Lys의 아미노산 변형 (예를 들면, 치환)을 포함한다. 추가의 실시형태에서, 향상된 Fc감마RIIb 결합 활성을 갖는 변이체 Fc 영역은 EU 넘버링에 따른 위치 235에서 Trp, 위치 236에서 Asn, 위치 268에서 Asp, 위치 295에서 Leu, 위치 326에서 Thr 및 위치 330에서 Lys의 아미노산 변형 (예를 들면, 치환)을 포함한다.

[0335] 다른 양상에서, 본원 발명은 증가된 등전점 (pI)을 갖는 변이체 Fc 영역을 포함하는 단리된 폴리펩티드를 제공한다. 일정한 실시형태에서, 본원에 설명된 변이체 Fc 영역은 부모 Fc 영역에 적어도 2개의 아미노산 변형을 포함한다. 일정한 실시형태에서, 각각의 아미노산 변형은 변이체 Fc 영역의 등전점 (pI)을 부모 Fc 영역의 것과 비교하여 증가시킨다. 이들은, 혈장으로부터 항원 제거가 예를 들면, 항체가 생체내 투여될 때 pI가 적어도 2개

의 아미노산 잔기의 변형에 의해 증가된 항체로 증진될 수 있다는 조사 결과에 근거된다.

- [0336] 본원 발명에서, pI는 이론적 또는 실험적으로 결정된 pI 중 어느 한 가지일 수 있다. pI의 값은 예를 들면, 당업자에게 공지된 등전위 초점에 의해 결정될 수 있다. 이론적 pI의 값은 예를 들면, 유전자 및 아미노산 서열 분석 소프트웨어 (Genetyx 등)를 이용하여 계산될 수 있다.
- [0337] 한 실시형태에서, pI 값은 변형 전과 비교하여, 예를 들면 적어도 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 또는 그 초과, 적어도 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 또는 그 초과, 적어도 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 또는 그 초과, 또는 적어도 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 3.0 또는 그 초과로 증가될 수 있다.
- [0338] 일정한 실시형태에서, 증가된 pI를 위한 아미노산은 변이체 Fc 영역의 표면 상에 노출될 수 있다. 본원 발명에서, 표면 상에 노출될 수 있는 아미노산은 일반적으로, 변이체 Fc 영역을 구성하는 폴리펩티드의 표면 상에 위치한 아미노산 잔기를 지칭한다. 폴리펩티드의 표면 상에 위치한 아미노산 잔기는 측쇄가 용매 분자 (일반적으로 주로 물 분자)와 접촉할 수 있는 아미노산 잔기를 지칭한다. 그러나, 측쇄가 반드시 용매 분자와 전체적으로 접촉해야 하는 것은 아니며, 측쇄의 일부가 용매 분자와 접촉하는 경우에도 아미노산은 "표면 상에 위치한 아미노산 잔기"로 정의된다. 폴리펩티드의 표면 상에 위치한 아미노산 잔기는 표면 가까이에 위치한 아미노산 잔기도 포함하므로, 측쇄가 용매 분자와 부분적으로 접촉하는 다른 아미노산 잔기로부터 전하 영향을 받을 수 있다. 당업자는 예를 들면, 상업적으로 가용한 소프트웨어를 이용하여 폴리펩티드의 상동성 모형을 제조할 수 있다. 대안적으로, 당업자에게 공지된 방법, 예컨대 엑스선 결정학을 이용하는 것이 가능하다. 표면 상에 노출될 수 있는 아미노산 잔기는 예를 들면, InsightII 프로그램 (Accelrys)과 같은 컴퓨터 프로그램을 이용하여 3차원 모형으로부터의 좌표를 이용하여 결정된다. 표면 노출가능 부위는 기술 분야에 공지된 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다 (예를 들면, Lee and Richards (J. Mol. Biol. 55: 379-400 (1971)); Connolly (J. Appl. Cryst. 16: 548-558 (1983)). 표면 노출가능 부위는 단백질 모형화 및 3차원 구조 정보에 적합한 소프트웨어를 이용하여 결정될 수 있다. 이런 목적으로 이용 가능한 소프트웨어에는 예를 들면, SYBYL 바이오폴리머 모듈 소프트웨어 (Tripos Associates)가 포함된다. 알고리즘이 사용자 입력 크기 매개변수를 필요로 하는 경우, 계산에 이용되는 프로브의 "크기"는 반경 약 1.4 앙스트롬 이하로 설정될 수 있다. 게다가, 개인용 컴퓨터용 소프트웨어를 이용하여 표면 노출가능 영역을 결정하기 위한 방법이 Pacios (Comput. Chem. 18(4): 377-386 (1994); J. Mol. Model. 1: 46-53 (1995))에 의해 설명되었다. 전술된 바와 같은 이런 정보를 기초로 하여, 변이체 Fc 영역을 구성하는 폴리펩티드의 표면 상에 위치한 적절한 아미노산 잔기가 선택될 수 있다.
- [0339] 일정한 실시형태에서, 폴리펩티드는 변이체 Fc 영역 및 항원 결합 도메인 둘 모두를 포함한다. 추가의 실시형태에서, 항원은 가용성 항원이다. 한 실시형태에서, 항원은 개체의 생물학적 유체 (예를 들면, 혈장, 간질액, 림프액, 복수 및 흉수) 내에 존재한다. 항원은 또한 막 항원일 수 있다.
- [0340] 추가의 실시형태에서, 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성화는 이온 농도 조건에 따라서 변한다. 한 실시형태에서, 이온 농도는 특별히 제한되지는 않으며, 수소 이온 농도 (pH) 또는 금속 이온 농도를 지칭한다. 본원에서, 금속 이온은 수소를 제외한 I족 원소의 이온, 예컨대 알칼리 금속 및 구리 족 원소, II족 원소 예컨대 알칼리성 토류 금속 및 아연 족 원소, 붕소를 제외한 III족 원소, 탄소 및 실리콘을 제외한 IV족 원소, VIII족 원소 예컨대 철 족 및 백금 족 원소, V, VI 및 VII족의 하위족 A에 속하는 원소, 그리고 안티몬, 비스무트 및 폴로늄과 같은 금속 원소를 지칭한다. 본원 발명에서, 금속 이온에는 예를 들면, WO 2012/073992 및 WO 2013/125667에 설명된 바와 같은 칼슘 이온이 포함된다. 한 실시형태에서, "이온 농도 조건"은 낮은 이온 농도 및 높은 이온 농도 사이에 항원 결합 도메인의 생물학적 행동에서 차이를 중심으로 하는 조건일 수 있다. 게다가, "항원 결합 도메인의 항원 결합 활성화는 이온 농도 조건에 따라서 변한다"는 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성화가 낮은 이온 농도 및 높은 이온 농도 사이에 변한다는 것을 의미한다 (이런 항원 결합 도메인은 본원에서 "이온 농도 의존성 항원 결합 도메인"으로 지칭된다). 높은 이온 농도 조건 하에 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성화는 낮은 이온 농도 조건 하에서보다 더 높을 수 있거나 (더 강할 수 있거나) 더 낮을 수 있다 (더 약할 수 있다). 한 실시형태에서, 이온 농도 의존성 항원 결합 도메인 (예컨대 pH 의존성 항원 결합 도메인 또는 칼슘 이온 농도 의존성 항원 결합 도메인)은 예를 들면, WO 2009/125825, WO 2012/073992 및 WO 2013/046722에 설명된 공지된 방법에 의해 획득될 수 있다.
- [0341] 본원 발명에서, 높은 칼슘 이온 농도 조건 하에 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성화는 낮은 칼슘 이온 농도 조건 하에 더 높을 수 있다. 높은 칼슘 이온 농도는 특별히 제한되지는 않지만 100 마이크로 M 및 10 mM 사이에, 200 마이크로 M 및 5 mM 사이에, 400 마이크로 M 및 3 mM 사이에, 200 마이크로 M 및 2 mM 사이에, 400 마이크로

로 M 및 1 mM 사이에, 또는 500 마이크로 M 및 2.5 mM 사이에서 선택된 농도일 수 있으며, 생체내 칼슘 이온의 혈장 (혈중) 농도에 가까운 것이 바람직하다. 한편, 낮은 칼슘 이온 농도는 특별히 제한되지는 않지만 0.1 마이크로 M 및 30 마이크로 M 사이에, 0.2 마이크로 M 및 20 마이크로 M 사이에, 0.5 마이크로 M 및 10 마이크로 M 사이에, 1 마이크로 M 및 5 마이크로 M 사이에, 또는 2 마이크로 M 및 4 마이크로 M 사이에서 선택된 농도일 수 있으며, 생체내 초기 엔도솜에서 칼슘 이온의 농도에 가까운 것이 바람직하다.

[0342] 한 실시형태에서, 낮은 칼슘 이온 농도 조건 및 높은 칼슘 이온 농도 조건 하에 항원 결합 활성 사이의 비율은 제한되지 않지만, 낮은 칼슘 이온 농도 조건 하에 해리 상수 (KD) 대 높은 칼슘 이온 농도 조건 하에 KD의 비율, 다시 말하면, KD (낮은 칼슘 이온 농도 조건)/KD (높은 칼슘 이온 농도 조건)는 2 이상, 10 이상, 또는 40 이상이다. 상기 비율의 상한은 이런 항원 결합 도메인이 당업자에게 공지된 기술에 의해 생성될 수 있는 한, 400, 1000, 또는 10000일 수 있다. 대안적으로, 예를 들면, 해리 속도 상수 (kd)가 KD 대신에 이용될 수 있다. 이 경우에 있어서, 낮은 칼슘 이온 농도 조건 하에 kd 대 높은 칼슘 이온 농도 조건 하에 kd의 비율, 다시 말하면, kd (낮은 칼슘 이온 농도 조건)/kd (높은 칼슘 이온 농도 조건)는 2 이상, 5 이상, 10 이상, 또는 30 이상이다. 상기 비율의 상한은 이런 항원 결합 도메인이 당업자의 통상적인 기술 지식에 기초하여 생성될 수 있는 한, 50, 100, 또는 200일 수 있다.

[0343] 본원 발명에서, 낮은 수소 이온 농도 (중성 pH) 하에 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성은 높은 수소 이온 농도 (산성 pH)하에서보다 더 높을 수 있다. 산성 pH는 예를 들면, pH4.0 내지 pH6.5에서 선택되는, pH4.5 내지 pH6.5에서 선택되는, pH5.0 내지 pH6.5에서 선택되는, 또는 pH5.5 내지 pH6.5에서 선택되는 pH일 수 있으며, 초기 엔도솜에서 생체내 pH에 가까운 것이 선호된다. 산성 pH는 또한, 예를 들면, pH5.8 또는 pH6.0일 수 있다. 특정한 실시형태에서, 산성 pH는 pH5.8이다. 한편, 중성 pH는 예를 들면, pH6.7 내지 pH10.0에서 선택되는, pH6.7 내지 pH9.5에서 선택되는, pH7.0 내지 pH9.0에서 선택되는, 또는 pH7.0 내지 pH8.0에서 선택되는 pH일 수 있으며, 혈장 (혈액) 내 생체내 pH에 가까운 것이 선호된다. 중성 pH는 또한, 예를 들면, pH7.4 또는 pH7.0 일 수 있다. 특정한 실시형태에서, 중성 pH는 pH7.4이다.

[0344] 한 실시형태에서, 산성 pH 조건 및 중성 pH 조건 하에 항원 결합 활성 사이의 비율은 제한되지 않지만, 산성 pH 조건 하에 해리 상수 (KD) 대 중성 pH 조건 하에 KD의 비율, 다시 말하면, KD (산성 pH 조건)/KD (중성 pH 조건)는 2 이상, 10 이상, 또는 40 이상이다. 상기 비율의 상한은 이런 항원 결합 도메인이 당업자에게 공지된 기술에 의해 생성될 수 있는 한, 400, 1000, 또는 10000일 수 있다. 대안적으로, 예를 들면, 해리 속도 상수 (kd)가 KD 대신에 이용될 수 있다. 이 경우에 있어서, 산성 pH 조건 하에 kd 대 중성 pH 조건 하에 kd의 비율, 다시 말하면, kd (산성 pH 조건)/kd (중성 pH 조건)는 2 이상, 5 이상, 10 이상, 또는 30 이상이다. 상기 비율의 상한은 이런 항원 결합 도메인이 당업자의 통상적인 기술 지식에 기초하여 생성될 수 있는 한, 50, 100, 또는 200일 수 있다.

[0345] 한 실시형태에서, 예를 들면, 적어도 하나의 아미노산 잔기가 4.0-8.0의 측쇄 pKa를 갖는 아미노산 잔기로 치환되고/되거나, 4.0-8.0의 측쇄 pKa를 갖는 적어도 하나의 아미노산이 WO 2009/125825에 설명된 바와 같이, 항원 결합 도메인에 삽입된다. 아미노산은 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성이 치환 또는 삽입 전과 비교하여 중성 pH 조건 하에서보다 산성 pH 조건 하에서 더 약해지는 한, 치환될 수 있고/있거나 임의의 부위에 삽입될 수 있다. 항원 결합 도메인이 가변 영역 또는 CDR을 가질 때, 부위는 가변 영역 또는 CDR 내에 있을 수 있다. 치환되거나 삽입되는 아미노산의 수는 당업자에 의해 적절하게 결정될 수 있고; 그리고 상기 수는 1 이상일 수 있다. 4.0-8.0의 측쇄 pKa를 갖는 아미노산은 수소 이온 농도 조건에 따라서 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성을 변화시키는 데 이용될 수 있다. 이런 아미노산에는 예를 들면, His (H) 및 Glu (E)와 같은 천연 아미노산, 그리고 히스티딘 유사체 (US2009/0035836), m-N02-Tyr (pKa 7.45), 3,5-Br2-Tyr (pKa 7.21) 및 3,5-I2-Tyr (pKa 7.38) (Heyl et al., Bioorg. Med. Chem. 11(17): 3761-3768 (2003))과 같은 비천연 아미노산이 포함된다. 예를 들어, His (H)가 포함되는, 6.0-7.0의 측쇄 pKa를 갖는 아미노산이 또한 이용될 수 있다.

[0346] 다른 실시형태에서, 증가된 pI를 갖는 변이체 Fc 영역에 대한 바람직한 항원 결합 도메인은 WO2016/125495 및 WO2017/046994에 설명되고, 이들 문헌에 설명된 방법에 의해 획득될 수 있다.

[0347] 일정한 실시형태에서, 증가된 pI를 갖는 변이체 Fc 영역은 EU 넘버링에 따른 285, 311, 312, 315, 318, 333, 335, 337, 341, 342, 343, 384, 385, 388, 390, 399, 400, 401, 402, 413, 420, 422 및 431로 구성된 군에서 선택되는 적어도 2개의 위치의 적어도 2개의 아미노산 변형을 포함한다.

[0348] 추가의 실시형태에서, 증가된 pI를 갖는 변이체 Fc 영역은 EU 넘버링에 따른 311, 341, 343, 384, 399, 400, 401, 402 및 413으로 구성된 군에서 선택되는 적어도 2개의 위치의 적어도 2개의 아미노산 변형을 포함한다.

- [0349] 다른 양상에서, 본원 발명은 아래의 (1)-(10) 중 어느 하나의 아미노산 변형을 포함하는, 증가된 pI를 갖는 변이체 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다: EU 넘버링에 따른 (1) 위치 311 및 341; (2) 위치 311 및 343; (3) 위치 311, 343 및 413; (4) 위치 311, 384 및 413; (5) 위치 311 및 399; (6) 위치 311 및 401; (7) 위치 311 및 413; (8) 위치 400 및 413; (9) 위치 401 및 413; 그리고 (10) 위치 402 및 413.
- [0350] 한 가지 양상에서, 본원 발명은 (a) EU 넘버링에 따른 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 264, 266, 267, 268, 271, 295, 298, 325, 326, 327, 328, 330, 331, 332, 334 및 396으로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나의 위치의 적어도 하나의 아미노산 변형, 그리고 (b) EU 넘버링에 따른 285, 311, 312, 315, 318, 333, 335, 337, 341, 342, 343, 384, 385, 388, 390, 399, 400, 401, 402, 413, 420, 422 및 431로 구성된 군에서 선택되는 적어도 2개의 위치의 적어도 2개의 아미노산 변형을 포함하는 적어도 3개의 아미노산 변형을 포함하는, 향상된 Fc감마RIIb 결합 활성 및 증가된 pI를 갖는 변이체 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다.
- [0351] 한 가지 양상에서, 본원 발명은 (a) EU 넘버링에 따른 231, 232, 235, 236, 239, 268, 295, 298, 326, 330 및 396으로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나의 위치의 적어도 하나의 아미노산 변형, 그리고 (b) EU 넘버링에 따른 311, 341, 343, 384, 399, 400, 401, 402 및 413으로 구성된 군에서 선택되는 적어도 2개의 위치의 적어도 2개의 아미노산 변형을 포함하는 적어도 3개의 아미노산 변형을 포함하는, 향상된 Fc감마RIIb 결합 활성 및 증가된 pI를 갖는 변이체 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다.
- [0352] 다른 양상에서, 본원 발명은 아래의 (1)-(9) 중 어느 하나의 아미노산 변형을 포함하는, 향상된 Fc감마RIIb 결합 활성 및 증가된 pI를 갖는 변이체 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다: EU 넘버링에 따른 (1) 위치 235, 236, 268, 295, 311, 326, 330 및 343; (2) 위치 236, 268, 295, 311, 326, 330 및 343; (3) 위치 236, 268, 295, 311, 330 및 413; (4) 위치 236, 268, 311, 330, 396 및 399; (5) 위치 236, 268, 311, 330 및 343; (6) 위치 236, 268, 311, 330, 343 및 413; (7) 위치 236, 268, 311, 330, 384 및 413; (8) 위치 236, 268, 311, 330 및 413; 그리고 (9) 위치 236, 268, 330, 396, 400 및 413.
- [0353] 한 가지 양상에서, 본원 발명은 (a) 234, 238, 250, 264, 267, 307 및 330으로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나의 위치의 적어도 하나의 아미노산 변형, 그리고 (b) EU 넘버링에 따른 285, 311, 312, 315, 318, 333, 335, 337, 341, 342, 343, 384, 385, 388, 390, 399, 400, 401, 402, 413, 420, 422 및 431로 구성된 군에서 선택되는 적어도 2개의 위치의 적어도 2개의 아미노산 변형을 포함하는 적어도 3개의 아미노산 변형을 포함하는, 향상된 Fc감마RIIb 결합 활성 및 증가된 pI를 갖는 변이체 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다. 추가의 실시형태에서, 폴리펩티드는 EU 넘버링에 따른 311, 341, 343, 384, 399, 400, 401, 402 및 413으로 구성된 군에서 선택되는 적어도 2개의 위치의 적어도 2개의 아미노산 변형을 포함한다.
- [0354] 다른 양상에서, 본원 발명은 아래의 (1)-(16) 중 어느 하나의 아미노산 변형을 포함하는, 향상된 Fc감마RIIb 결합 활성 및 증가된 pI를 갖는 변이체 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다: EU 넘버링에 따른 (1) 위치 234, 238, 250, 264, 307, 311, 330 및 343; (2) 위치 234, 238, 250, 264, 307, 311, 330 및 413; (3) 위치 234, 238, 250, 264, 267, 307, 311, 330 및 343; (4) 위치 234, 238, 250, 264, 267, 307, 311, 330 및 413; (5) 위치 234, 238, 250, 267, 307, 311, 330 및 343; (6) 위치 234, 238, 250, 267, 307, 311, 330 및 413; (7) 위치 234, 238, 250, 307, 311, 330 및 343; (8) 위치 234, 238, 250, 307, 311, 330 및 413; (9) 위치 238, 250, 264, 267, 307, 311, 330 및 343; (10) 위치 238, 250, 264, 267, 307, 311, 330 및 413; (11) 위치 238, 250, 264, 307, 311, 330 및 343; (12) 위치 238, 250, 264, 307, 311, 330 및 413; (13) 위치 238, 250, 267, 307, 311, 330 및 343; (14) 위치 238, 250, 267, 307, 311, 330 및 413; (15) 위치 238, 250, 307, 311, 330 및 343; 그리고 (16) 위치 238, 250, 307, 311, 330 및 413.
- [0355] 이에 더하여, 다른 목적(들)을 위해 수행된 아미노산 변형이 본원에 설명된 변이체 Fc 영역에 조합될 수 있다. 예를 들어, FcRn 결합 활성을 개선하는 아미노산 치환 (Hinton et al., J. Immunol. 176(1): 346-356 (2006); Dall'Acqua et al., J. Biol. Chem. 281(33): 23514-23524 (2006); Petkova et al., Intl. Immunol. 18(12): 1759-1769 (2006); Zalevsky et al., Nat. Biotechnol. 28(2): 157-159 (2010); WO 2006/019447; WO 2006/053301; 및 WO 2009/086320), 그리고 항체 이질성 또는 안정성을 개선하기 위한 아미노산 치환 (WO 2009/041613)이 추가될 수 있다. 대안적으로, WO 2011/122011, WO 2012/132067, WO 2013/046704 또는 WO 2013/180201에 설명된 항원 청소를 증진하는 특성을 갖는 폴리펩티드, WO 2013/180200에 설명된 표적 조직에 특이적 결합의 특성을 갖는 폴리펩티드, WO 2009/125825, WO 2012/073992 또는 WO 2013/047752에 설명된 복수의 항원 분자에 반복 결합에 대한 특성을 갖는 폴리펩티드가 본원에 설명된 변이체 Fc 영역과 조합될 수 있다. 대안적으로, 다른 항원에 대한 결합 능력을 부여하는 목적으로, EP1752471 및 EP1772465에 개시된 아미노산 변형

이 본원에 설명된 변이체 Fc 영역의 CH3에 조합될 수 있다. 대안적으로, 혈장 체류를 증가시키는 목적으로, 불변 영역의 pI를 감소시키는 아미노산 변형 (WO 2012/016227)이 본원에 설명된 변이체 Fc 영역에 조합될 수 있다. 대안적으로, 세포 내로의 흡수를 증진하는 목적으로, 불변 영역의 pI를 증가시키는 아미노산 변형 (WO 2014/145159)이 본원에 설명된 변이체 Fc 영역에 조합될 수 있다. 대안적으로, 혈장으로부터 표적 분자의 제거를 증진하는 목적으로, 불변 영역의 pI를 증가시키는 아미노산 변형 (WO2016/125495)이 본원에 설명된 변이체 Fc 영역에 조합될 수 있다. 한 실시형태에서, 이런 변형에는 예를 들면, EU 넘버링에 따른 311, 343, 384, 399, 400 및 413으로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나의 위치에서 치환이 포함될 수 있다. 추가의 실시형태에서, 이런 치환은 각 위치에서 Lys 또는 Arg로 아미노산의 대체일 수 있다.

[0356] 산성 pH 하에 인간 FcRn 결합 활성을 향상시키는 아미노산 변형 역시 본원에 설명된 변이체 Fc 영역에 조합될 수 있다. 구체적으로, 이런 변형에는 예를 들면, EU 넘버링에 따른 위치 428에서 Met의 Leu으로의 치환 및 위치 434에서 Asn의 Ser으로의 치환 (Zalevsky et al., Nat. Biotechnol. 28: 157-159 (2010)); 위치 434에서 Asn의 Ala로의 치환 (Deng et al., Metab. Dispos. 38(4): 600-605 (2010)); 위치 252에서 Met의 Tyr로의 치환, 위치 254에서 Ser의 Thr로의 치환 및 위치 256에서 Thr의 Glu로의 치환 (Dall'Acqua et al., J. Biol. Chem. 281: 23514-23524 (2006)); 위치 250에서 Thr의 Gln으로의 치환 및 위치 428에서 Met의 Leu으로의 치환 (Hinton et al., J. Immunol. 176(1): 346-356 (2006)); 위치 434에서 Asn의 His으로의 치환 (Zheng et al., Clin. Pharmacol. Ther. 89(2): 283-290 (2011), 그리고 WO 2010/106180, WO 2010/045193, WO 2009/058492, WO 2008/022152, WO 2006/050166, WO 2006/053301, WO 2006/031370, WO 2005/123780, WO 2005/047327, WO 2005/037867, WO 2004/035752, 또는 WO 2002/060919에 설명된 변형이 포함될 수 있다. 이런 변형에는 예를 들면, 위치 428에서 Met의 Leu으로의 치환, 위치 434에서 Asn의 Ala으로의 치환 및 위치 436에서 Tyr의 Thr로의 치환으로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나의 변형이 포함될 수 있다. 이들 변형에는 위치 438에서 Gln의 Arg으로의 치환 및/또는 위치 440에서 Ser의 Glu로의 치환 (WO2016/125495)이 추가로 포함될 수 있다.

#### [0357] 예시적인 이중특이적-항-CCL2 항체

[0358] 본원 발명의 실시형태는 인간 CCL2 상에서 첫 번째 에피토프에 (특이적으로) 결합하는 첫 번째 항원 결합 부위 및 인간 CCL2 상에서 두 번째 상이한 에피토프에 (특이적으로) 결합하는 두 번째 상이한 항원 결합 부위를 포함하는 이중특이적 항체이며,

[0359] 여기서 이중특이적 항체는

[0360] a) (N 말단에서 C 말단 방향으로) VH1-CH1-L1-힌지-CH2-CH3-L2-VL1-CL을 포함하는 첫 번째 폴리펩티드 사슬로서, 여기서

[0361] VH1은 첫 번째 중쇄 가변 도메인이고 VL1은 첫 번째 가변 경쇄 도메인이며 (둘 모두 함께 (함께 연결되어) 첫 번째 항원 결합 부위를 형성함),

[0362] CH1은 불변 중쇄 도메인 1이고,

[0363] L1은 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 실시형태에서 5개 내지 10개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,

[0364] 힌지는 중쇄 힌지 영역이고,

[0365] CH2는 불변 중쇄 도메인 2이고,

[0366] CH3은 불변 중쇄 도메인 3이고,

[0367] L2는 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 실시형태에서 10개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,

[0368] CL은 불변 경쇄 도메인인 첫 번째 폴리펩티드 사슬,

[0369] 그리고

[0370] b) (N 말단에서 C 말단 방향으로) VH2-CH1-L1-힌지-CH2-CH3-L2-VL2-CL을 포함하는 두 번째 폴리펩티드 사슬로서, 여기서

[0371] VH2는 두 번째 중쇄 가변 도메인이고 VL2는 두 번째 가변 경쇄 도메인이며 (둘 모두 함께 (함께 연결되어) 두 번째 항원 결합 부위를 형성함),

- [0372] CH1은 불변 중쇄 도메인 1이고,
- [0373] L1은 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 실시형태에서 5개 내지 10개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,
- [0374] 힌지는 중쇄 힌지 영역이고,
- [0375] CH2는 불변 중쇄 도메인 2이고,
- [0376] CH3은 불변 중쇄 도메인 3이고,
- [0377] L2는 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 실시형태에서 10개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,
- [0378] CL은 불변 경쇄 도메인인 두 번째 폴리펩티드 사슬을 포함하고,
- [0379] 여기서,
- [0380] A) i) VH1 도메인은 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0381] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0382] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0383] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0384] 또는
- [0385] B) i) VH1 도메인은 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0386] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0387] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 91의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0388] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0389] 또는
- [0390] C) i) VH1 도메인은 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0391] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0392] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0393] VL2 도메인은 서열 번호: 94의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0394] 또는
- [0395] D) i) VH1 도메인은 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0396] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0397] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0398] VL2 도메인은 서열 번호: 94의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0399] 또는
- [0400] E) i) VH1 도메인은 서열 번호: 73의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0401] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0402] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0403] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0404] 또는
- [0405] F) i) VH1 도메인은 서열 번호: 73의 아미노산 서열을 포함하고;

- [0406] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0407] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0408] VL2 도메인은 서열 번호: 94의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0409] 또는
- [0410] G) i) VH1 도메인은 서열 번호: 73의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0411] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0412] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 92의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0413] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0414] 또는
- [0415] H) i) VH1 도메인은 서열 번호: 73의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0416] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0417] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 91의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0418] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0419] 또는
- [0420] I) i) VH1 도메인은 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0421] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0422] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0423] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0424] 또는
- [0425] J) i) VH1 도메인은 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0426] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0427] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 92의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0428] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0429] 또는
- [0430] K) i) VH1 도메인은 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0431] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0432] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 91의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0433] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0434] 또는
- [0435] L) i) VH1 도메인은 서열 번호: 74의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0436] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0437] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0438] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0439] 또는
- [0440] M) i) VH1 도메인은 서열 번호: 74의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0441] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고

- [0442] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0443] VL2 도메인은 서열 번호: 94의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0444] 또는
- [0445] N) i) VH1 도메인은 서열 번호: 74의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0446] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0447] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 92의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0448] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0449] 또는
- [0450] O) i) VH1 도메인은 서열 번호: 74의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0451] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0452] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 91의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0453] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0454] 또는
- [0455] P) i) VH1 도메인은 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0456] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0457] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 92의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0458] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0459] 본원 발명의 실시형태는 인간 CCL2 상에서 첫 번째 에피토프에 (특이적으로) 결합하는 첫 번째 항원 결합 부위 및 인간 CCL2 상에서 두 번째 상이한 에피토프에 (특이적으로) 결합하는 두 번째 상이한 항원 결합 부위를 포함하는 이중특이적 항체이며,
- [0460] 여기서 이중특이적 항체는
- [0461] a) (N 말단에서 C 말단 방향으로) VH1-CH1-L1-힌지-CH2-CH3-L2-VL1-CL을 포함하는 첫 번째 폴리펩티드 사슬로서, 여기서
- [0462] VH1은 첫 번째 중쇄 가변 도메인이고 VL1은 첫 번째 가변 경쇄 도메인이며 (둘 모두 함께 (함께 연결되어) 첫 번째 항원 결합 부위를 형성함),
- [0463] CH1은 불변 중쇄 도메인 1이고,
- [0464] L1은 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 실시형태에서 5개 내지 10개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,
- [0465] 힌지는 중쇄 힌지 영역이고,
- [0466] CH2는 불변 중쇄 도메인 2이고,
- [0467] CH3은 불변 중쇄 도메인 3이고,
- [0468] L2는 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 실시형태에서 10개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,
- [0469] CL은 불변 경쇄 도메인인 첫 번째 폴리펩티드 사슬,
- [0470] 그리고
- [0471] b) (N 말단에서 C 말단 방향으로) VH2-CH1-L1-힌지-CH2-CH3-L2-VL2-CL을 포함하는 두 번째 폴리펩티드 사슬로서, 여기서
- [0472] VH2는 두 번째 중쇄 가변 도메인이고 VL2는 두 번째 가변 경쇄 도메인이며 (둘 모두 함께 (함께 연결되어) 두

번째 항원 결합 부위를 형성함),

[0473] CH1은 불변 중쇄 도메인 1이고,

[0474] L1은 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 실시형태에서 5개 내지 10개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,

[0475] 힌지는 중쇄 힌지 영역이고,

[0476] CH2는 불변 중쇄 도메인 2이고,

[0477] CH3은 불변 중쇄 도메인 3이고,

[0478] L2는 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 실시형태에서 10개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,

[0479] CL은 불변 경쇄 도메인인 두 번째 폴리펩티드 사슬을 포함하고,

[0480] 여기서,

[0481] i) 상기 첫 번째 항원 결합 부위는

[0482] (a) 서열 번호: 57의 아미노산 서열 SHYGXS (여기서 X는 I이다)를 포함하는 CDR-H1, (b) 서열 번호: 58의 아미노산 서열  $GX^1IX^2IFX^3TANYAQKFQG$  (여기서  $X^1$ 은 V이고,  $X^2$ 는 P이고,  $X^3$ 은 H이다)를 포함하는 CDR-H2, 그리고 (c) 서열 번호: 59의 아미노산 서열 YDAHYGELDF를 포함하는 CDR-H3을 포함하는 VH 도메인;

[0483] 그리고

[0484] (d) 서열 번호: 60의 아미노산 서열 RASQHVSDAYLA를 포함하는 CDR-L1; (e) 서열 번호: 61의 아미노산 서열 DASDRAE를 포함하는 CDR-L2, 그리고 (f) 서열 번호: 62의 아미노산 서열 HQYIHLHSFT를 포함하는 CDR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함하고;

[0485] 그리고

[0486] ii) 상기 두 번째 항원 결합 부위는

[0487] (a) 서열 번호: 76의 아미노산 서열 HTYMH를 포함하는 CDR-H1, (b) 서열 번호: 77의 아미노산 서열 RIDPXNHNTKFDPKFQG (여기서 X는 D이다)를 포함하는 CDR-H2, 그리고 (c) 서열 번호: 78의 아미노산 서열 GVFGFFXH (여기서 X는 E이다)를 포함하는 CDR-H3을 포함하는 VH 도메인;

[0488] 그리고

[0489] (d) 서열 번호: 79의 아미노산 서열  $KAX^1EDIYNRX^2A$  (여기서  $X^1$ 은 F이고  $X^2$ 는 R이다)를 포함하는 CDR-L1, (e) 서열 번호: 80의 아미노산 서열 GATSLEH를 포함하는 CDR-L2, 그리고 (f) 서열 번호: 81의 아미노산 서열 QQFXSAPYT (여기서 X는 R이다)를 포함하는 CDR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0490] 본원 발명의 실시형태는 인간 CCL2 상에서 첫 번째 에피토프에 (특이적으로) 결합하는 첫 번째 항원 결합 부위 및 인간 CCL2 상에서 두 번째 상이한 에피토프에 (특이적으로) 결합하는 두 번째 상이한 항원 결합 부위를 포함하는 이중특이적 항체이며,

[0491] 여기서 이중특이적 항체는

[0492] a) (N 말단에서 C 말단 방향으로) VH1-CH1-L1-힌지-CH2-CH3-L2-VL1-CL을 포함하는 첫 번째 폴리펩티드 사슬로서, 여기서

[0493] VH1은 첫 번째 중쇄 가변 도메인이고 VL1은 첫 번째 가변 경쇄 도메인이며 (둘 모두 함께 (함께 연결되어) 첫 번째 항원 결합 부위를 형성함),

[0494] CH1은 불변 중쇄 도메인 1이고,

[0495] L1은 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 실시형태에서 5개 내지 10개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,

[0496] 힌지는 중쇄 힌지 영역이고,

- [0497] CH2는 불변 중쇄 도메인 2이고,
- [0498] CH3은 불변 중쇄 도메인 3이고,
- [0499] L2는 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 실시형태에서 10개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,
- [0500] CL은 불변 경쇄 도메인인 첫 번째 폴리펩티드 사슬,
- [0501] 그리고
- [0502] b) (N 말단에서 C 말단 방향으로) VH2-CH1-L1-힌지-CH2-CH3-L2-VL2-CL을 포함하는 두 번째 폴리펩티드 사슬로서, 여기서
- [0503] VH2는 두 번째 중쇄 가변 도메인이고 VL2는 두 번째 가변 경쇄 도메인이며 (둘 모두 함께 (함께 연결되어) 두 번째 항원 결합 부위를 형성함),
- [0504] CH1은 불변 중쇄 도메인 1이고,
- [0505] L1은 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 실시형태에서 5개 내지 10개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,
- [0506] 힌지는 중쇄 힌지 영역이고,
- [0507] CH2는 불변 중쇄 도메인 2이고,
- [0508] CH3은 불변 중쇄 도메인 3이고,
- [0509] L2는 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 실시형태에서 10개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,
- [0510] CL은 불변 경쇄 도메인인 두 번째 폴리펩티드 사슬을 포함하고,
- [0511] 여기서,
- [0512] i) VH1 도메인은 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0513] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0514] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 91의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0515] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0516] 한 실시형태에서 L1 및 L2는 아미노산 글리신 및 세린을 포함하는 폴리펩티드 링커이며, 여기서 반복성 글리신은 최대 4개의 연속 글리신으로 한정되고 어떤 세린도 다른 세린에 직접적으로 연결되지 않는다.
- [0517] 한 실시형태에서 L1은 9개 내지 11개 아미노산의 길이를 갖는 폴리펩티드 링커이고, L2는 9개 내지 11개 아미노산의 길이를 갖는 폴리펩티드 링커이다.
- [0518] 한 실시형태에서 L1 및 L2는 아래의 군에서 선택되는 폴리펩티드 링커이다 : GSGGSGGSGG (서열 번호: 183), GSGGGSGGGG (서열 번호: 184), GSGGGGSGGG (서열 번호: 185);GGSGGSGGGG (서열 번호: 186), GSGGGGSGGG (서열 번호: 187), GSGGGGSGGG (서열 번호: 188), GGGSGGSGGG (서열 번호: 189), GGGSGGSGGG (서열 번호: 190), 및 GGGGSGGSGG (서열 번호: 191).
- [0519] 한 실시형태에서 L1은 GSGGGGSGGG (서열 번호: 188)의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 링커이고, L2는 GSGGGGSGGG (서열 번호: 188)의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 링커이다.
- [0520] 한 실시형태에서 불변 중쇄 도메인 CH1, 힌지, CH2 및 CH3은 인간 IgG 아이소타입, 바람직하게는 인간 IgG1 아이소타입이다.
- [0521] 한 실시형태에서 본원에 설명된 이종특이적 항체는 다른 CCL 동족체에 교차반응성이 아니다, 특히 이것은 CCL2에 결합과 비교하여 다른 CCL 동족체 (CCL8, CCL7 및 CCL13의 군에서 선택됨)에 100 배 더 적은 결합을 보여준다.
- [0522] 한 실시형태에서 본원에 설명된 이종특이적 항체는 인간 CCL2 상에서 첫 번째와 두 번째 에피토프에 이온 의존

성 방식으로 결합한다.

- [0523] 한 실시형태에서 본원에 설명된 이중특이적 항체는 인간 CCL2에 pH 의존성 방식으로 결합하고, 그리고 여기서 첫 번째 항원 결합 부위 및 두 번째 항원 결합 부위 둘 모두 산성 pH에서보다 중성 pH에서 더 높은 친화성으로 CCL2에 결합한다.
- [0524] 한 실시형태에서 본원에 설명된 이중특이적 항체는 pH 5.8에서보다 pH 7.4에서 10배 더 높은 친화성으로 인간 CCL2에 결합한다.
- [0525] 한 실시형태에서 20mg/kg의 각 이중특이적 항체 및 0.1mg/kg 인간 CCL2로 구성되는 미리 형성된 면역 복합체가 FcRn 유전자도입 생쥐에게 10 ml/kg의 단위 용량으로 투여될 때, 인간 야생형 IgG1 아이소타입의 불변 중쇄 도메인 (또는 이의 Fc 도메인)을 포함하는 이중특이적 항체의 투여 후 인간 CCL2에 대한 생체내 청소율 (ml/일/kg)은 돌연변이 L234A, L235A, P329G (Kabat EU 넘버링)를 포함하는 인간 IgG1 아이소타입의 Fc 감마 수용체 침묵된 불변 중쇄 도메인 (또는 이의 Fc 도메인)을 포함하는 이중특이적 항체의 투여 후 인간 CCL2에 대한 생체내 청소율 (ml/일/kg)과 비교하여 적어도 15 배 높다, 특히 적어도 20 배 높다.
- [0526] 한 실시형태에서 20mg/kg의 각 이중특이적 항체 및 0.1mg/kg 인간 CCL2로 구성되는 미리 형성된 면역 복합체가 FcRn 유전자도입 생쥐에게 10 ml/kg의 단위 용량으로 투여될 때, 인간 야생형 IgG1 아이소타입의 불변 중쇄 도메인 (또는 이의 Fc 도메인)을 포함하는 이중특이적 항체의 투여 후 인간 CCL2에 대한 생체내 청소율 (ml/일/kg)은 돌연변이 L234A, L235A, P329G (Kabat EU 넘버링)를 포함하는 인간 IgG1 아이소타입의 Fc 감마 수용체 침묵된 불변 중쇄 도메인 (또는 이의 Fc 도메인)을 포함하는 이중특이적 항체의 투여 후 인간 CCL2에 대한 생체내 청소율 (ml/일/kg)과 비교하여 적어도 2배 높다 (한 실시형태에서 적어도 5배, 한 실시형태에서 적어도 10배, 한 실시형태에서 적어도 20 배 높다).
- [0527] 한 실시형태에서 불변 중쇄 도메인 CH1, 힌지, CH2 및 CH3은 인간 IgG1 아이소타입이고 아래의 돌연변이 (Kabat EU 넘버링) 중 하나 이상을 포함한다:
- [0528] i) Q311R 및/또는 P343R (항원의 흡수를 향상시키기 위해 pI를 증가시키는 데 적합함); 및/또는
- [0529] ii) L234Y, L235W, G236N, P238D, T250V, V264I, H268D, Q295L, T307P, K326T 및/또는 A330K (인간 FcγRIIb에 대한 친화성을 증가시키고 다른 인간 FcγR에 대한 친화성을 감소시키는 데 적합함); 및/또는
- [0530] iii) M428L, N434A 및/또는 Y436T (더 긴 혈장 반감기를 위해 FcRn에 대한 친화성을 증가시키는 데 적합함); 및/또는
- [0531] iv) Q438R 및/또는 S440E (류마티스 인자 결합을 억제하는 데 적합함).
- [0532] 한 실시형태에서 불변 중쇄 도메인 CH1, 힌지, CH2 및 CH3은 인간 IgG1 아이소타입이고 아래의 돌연변이 (Kabat EU 넘버링) 중 하나 이상을 포함한다:
- [0533] i) Q311R, 및/또는 P343R (항원의 흡수를 향상시키기 위해 pI를 증가시키는 데 적합함); 및/또는
- [0534] ii) L235W, G236N, H268D, Q295L, K326T 및/또는 A330K (인간 FcγRIIb에 대한 친화성을 증가시키고 다른 인간 FcγR에 대한 친화성을 감소시키는 데 적합함); 및/또는
- [0535] iii) N434A (더 긴 혈장 반감기를 위해 FcRn에 대한 친화성을 증가시키는 데 적합함); 및/또는
- [0536] iv) Q438R 및/또는 S440E (류마티스 인자 결합을 억제하는 데 적합함).
- [0537] 한 실시형태에서 불변 중쇄 도메인 CH1, 힌지, CH2 및 CH3은 인간 IgG1 아이소타입이고 아래의 돌연변이 (Kabat EU 넘버링) 중 하나 이상을 포함한다:
- [0538] i) Q311R 및 P343R (항원의 흡수를 향상시키기 위해 pI를 증가시키는 데 적합함);
- [0539] ii) L235W, G236N, H268D, Q295L, K326T 및 A330K (인간 FcγRIIb에 대한 친화성을 증가시키고 다른 인간 FcγR에 대한 친화성을 감소시키는 데 적합함);
- [0540] iii) N434A (더 긴 혈장 반감기를 위해 FcRn에 대한 친화성을 증가시키는 데 적합함); 그리고
- [0541] iv) Q438R 및 S440E (류마티스 인자 결합을 억제하는 데 적합함).
- [0542] 한 실시형태에서 불변 중쇄 도메인 CH1, 힌지, CH2 및 CH3은 인간 IgG1 아이소타입이고 아래의 돌연변이 (Kabat

EU 넘버링) 중 하나 이상을 포함한다:

- [0543] i) Q311R 및 P343R (항원의 흡수를 향상시키기 위해 pI를 증가시키는 데 적합함);
- [0544] ii) N434A (더 긴 혈장 반감기를 위해 FcRn에 대한 친화성을 증가시키는 데 적합함); 그리고
- [0545] iii) Q438R 및 S440E (류마티스 인자 결합을 억제하는 데 적합함).
- [0546] 한 실시형태에서 불변 중쇄 도메인 CH1, 힌지, CH2 및 CH3은 인간 IgG1 아이소타입이고 아래의 돌연변이 (Kabat EU 넘버링) 중 하나 이상을 포함한다:
- [0547] Q311R 및 P343R (항원의 흡수를 향상시키기 위해 pI를 증가시키는 데 적합함).
- [0548] 한 실시형태에서 불변 중쇄 도메인 CH1, 힌지, CH2 및 CH3은 인간 IgG1 아이소타입이고 아래의 돌연변이 (Kabat EU 넘버링) 중 하나 이상을 포함한다:
- [0549] i) Q311R 및/또는 P343R (항원의 흡수를 향상시키기 위해 pI를 증가시키는 데 적합함); 및/또는
- [0550] ii) L234Y, P238D, T250V, V264I, T307P 및/또는 A330K (인간 FcγRIIb에 대한 친화성을 증가시키고 다른 인간 FcγR에 대한 친화성을 감소시키는 데 적합함); 및/또는
- [0551] iii) M428L, N434A 및/또는 Y436T (더 긴 혈장 반감기를 위해 FcRn에 대한 친화성을 증가시키는 데 적합함); 및/또는
- [0552] iv) Q438R 및/또는 S440E (류마티스 인자 결합을 억제하는 데 적합함).
- [0553] 한 실시형태에서 불변 중쇄 도메인 CH1, 힌지, CH2 및 CH3은 인간 IgG1 아이소타입이고 아래의 돌연변이 (Kabat EU 넘버링) 중 하나 이상을 포함한다:
- [0554] i) Q311R 및 P343R (항원의 흡수를 향상시키기 위해 pI를 증가시키는 데 적합함);
- [0555] ii) L234Y, P238D, T250V, V264I, T307P 및 A330K (인간 FcγRIIb에 대한 친화성을 증가시키고 다른 인간 FcγR에 대한 친화성을 감소시키는 데 적합함);
- [0556] iii) M428L, N434A 및 Y436T (더 긴 혈장 반감기를 위해 FcRn에 대한 친화성을 증가시키는 데 적합함); 그리고
- [0557] iv) Q438R 및 S440E (류마티스 인자 결합을 억제하는 데 적합함).
- [0558] 한 실시형태에서 불변 중쇄 도메인 CH1, 힌지, CH2 및 CH3은 인간 IgG1 아이소타입이고 아래의 돌연변이 (Kabat EU 넘버링) 중 하나 이상을 포함한다:
- [0559] i) Q311R 및 P343R (항원의 흡수를 향상시키기 위해 pI를 증가시키는 데 적합함);
- [0560] ii) L234Y, P238D, T250V, V264I, T307P 및 A330K (인간 FcγRIIb에 대한 친화성을 증가시키고 다른 인간 FcγR에 대한 친화성을 감소시키는 데 적합함);
- [0561] iii) N434A 및 (더 긴 혈장 반감기를 위해 FcRn에 대한 친화성을 증가시키는 데 적합함); 그리고
- [0562] iv) Q438R 및 S440E (류마티스 인자 결합을 억제하는 데 적합함)
- [0563] 한 실시형태에서 이런 이중특이적 항체는 아래의 돌연변이 (Kabat EU 넘버링)를 포함한다 (전술된 돌연변이와는 독립적으로 또는 이들에 더하여):
- [0564] i) 중쇄 불변 CH3 도메인 중 하나에서 S354C 및 T366W
- [0565] ii) 중쇄 불변 CH3 도메인 중 다른 것에서 Y349C, T366S, L368A, Y407V.
- [0566] 한 실시형태에서 이중이량체화를 증진하는 Fc 도메인 변형의 섹션에 전술된 바와 같은 다른 이중이량체화 증진 돌연변이가 상기 예시적인 노브 인투 홀 변형 대신에 이용될 수 있다.
- [0567] 본원 발명의 특정한 실시형태는 a) 인간 CCL2 상에서 첫 번째 에피토프에 (특이적으로) 결합하는 첫 번째 항원 결합 부위 및 b) 인간 CCL2 상에서 두 번째 (상이한) 에피토프에 (특이적으로) 결합하는 두 번째 (상이한) 항원 결합 부위를 포함하는 (단리된) 이중특이적 항체이며, 여기서 이중특이적 항체는 서열 번호: 175의 서열과 적어도 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 서열 번호: 176의 서열과 적어도 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.

- [0568] 본원 발명의 특정한 실시형태는 a) 인간 CCL2 상에서 첫 번째 에피토프에 (특이적으로) 결합하는 첫 번째 항원 결합 부위 및 b) 인간 CCL2 상에서 두 번째 (상이한) 에피토프에 (특이적으로) 결합하는 두 번째 (상이한) 항원 결합 부위를 포함하는 (단리된) 이중특이적 항체이며, 여기서 이중특이적 항체는 서열 번호: 175의 서열의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 서열 번호: 176의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.
- [0569] 본원 발명의 특정한 실시형태는 a) 인간 CCL2 상에서 첫 번째 에피토프에 (특이적으로) 결합하는 첫 번째 항원 결합 부위 및 b) 인간 CCL2 상에서 두 번째 (상이한) 에피토프에 (특이적으로) 결합하는 두 번째 (상이한) 항원 결합 부위를 포함하는 (단리된) 이중특이적 항체이며, 여기서 이중특이적 항체는 서열 번호: 177의 서열과 적어도 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 서열 번호: 178의 서열과 적어도 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.
- [0570] 본원 발명의 특정한 실시형태는 a) 인간 CCL2 상에서 첫 번째 에피토프에 (특이적으로) 결합하는 첫 번째 항원 결합 부위 및 b) 인간 CCL2 상에서 두 번째 (상이한) 에피토프에 (특이적으로) 결합하는 두 번째 (상이한) 항원 결합 부위를 포함하는 (단리된) 이중특이적 항체이며, 여기서 이중특이적 항체는 서열 번호: 177의 서열의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 서열 번호: 178의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.
- [0571] 본원 발명의 특정한 실시형태는 a) 인간 CCL2 상에서 첫 번째 에피토프에 (특이적으로) 결합하는 첫 번째 항원 결합 부위 및 b) 인간 CCL2 상에서 두 번째 (상이한) 에피토프에 (특이적으로) 결합하는 두 번째 (상이한) 항원 결합 부위를 포함하는 (단리된) 이중특이적 항체이며, 여기서 이중특이적 항체는 서열 번호: 179의 서열과 적어도 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 서열 번호: 180의 서열과 적어도 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.
- [0572] 본원 발명의 특정한 실시형태는 a) 인간 CCL2 상에서 첫 번째 에피토프에 (특이적으로) 결합하는 첫 번째 항원 결합 부위 및 b) 인간 CCL2 상에서 두 번째 (상이한) 에피토프에 (특이적으로) 결합하는 두 번째 (상이한) 항원 결합 부위를 포함하는 (단리된) 이중특이적 항체이며, 여기서 이중특이적 항체는 서열 번호: 179의 서열의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 서열 번호: 180의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.
- [0573] 본원 발명의 특정한 실시형태는 a) 인간 CCL2 상에서 첫 번째 에피토프에 (특이적으로) 결합하는 첫 번째 항원 결합 부위 및 b) 인간 CCL2 상에서 두 번째 (상이한) 에피토프에 (특이적으로) 결합하는 두 번째 (상이한) 항원 결합 부위를 포함하는 (단리된) 이중특이적 항체이며, 여기서 이중특이적 항체는 서열 번호: 181의 서열과 적어도 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 서열 번호: 182의 서열과 적어도 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.
- [0574] 본원 발명의 특정한 실시형태는 a) 인간 CCL2 상에서 첫 번째 에피토프에 (특이적으로) 결합하는 첫 번째 항원 결합 부위 및 b) 인간 CCL2 상에서 두 번째 (상이한) 에피토프에 (특이적으로) 결합하는 두 번째 (상이한) 항원 결합 부위를 포함하는 (단리된) 이중특이적 항체이며, 여기서 이중특이적 항체는 서열 번호: 181의 서열의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 서열 번호: 182의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.
- [0575] **제조합 방법과 조성물**
- [0576] 항체는 예를 들면, 미국 특허 번호 4,816,567에 설명된 바와 같은 제조합 방법과 조성물을 이용하여 생성될 수 있다. 한 실시형태에서, 본원에 설명된 항-CCL2 항체 (이중특이적 또는 단일특이적 중 어느 하나)를 인코딩하는 단리된 핵산이 제공된다. 이런 핵산은 단일특이적 또는 이중특이적 항체 (예를 들면, 항체의 경쇄 및/또는 중쇄)의 하나 또는 모든 VL을 포함하는 아미노산 서열 및/또는 하나 또는 모든 VH를 포함하는 아미노산 서열을 인코딩할 수 있다. 추가의 실시형태에서, 이런 핵산을 포함하는 하나 이상의 벡터 (예를 들면, 발현 벡터)가 제공된다. 추가의 실시형태에서, 이런 핵산을 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 이와 같은 한 가지 실시형태에서, 숙주 세포는 (1) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산을 포함하는 벡터, 또는 (2) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산을 포함하는 첫 번째 벡터 및 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산을 포함하는 두 번째 벡터를 포함한다 (예를 들면, 이것으로 형질전환되었다). 한 실시형태에서, 숙주 세포는 진핵, 예를 들면, 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포, HEK293 세포 또는 림프구양 세포 (예: YO, NS0, Sp20 세포)이다. 한 실시형태에서, 항-CCL2 항체를 만드는 방법이 제공되는데, 여기서 상기 방법은 상기 제시된 바와 같은 항체의 발현에 적합한 조건하에, 상기 항체를 인코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계, 그리고 선택적으로, 상기 항체를 숙주 세포 (또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 회수하는 단계를 포함한다.
- [0577] 항-CCL2 세포의 제조합 생산을 위해, 이런 핵산은 전통적인 절차를 이용하여 (예를 들면, 항체의 중쇄와 경쇄를

인코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 이용함으로써) 쉽게 분리되고 염기서열분석될 수 있다.

[0578] 항체-인코딩 벡터의 클로닝 또는 발현을 위한 적합한 숙주 세포에는 본원에 설명된 원핵 또는 진핵 세포가 포함된다. 예를 들면, 항체는 특히 글리코실화 및 Fc 이펙터 기능이 필요하지 않을 때 세균에서 생산될 수 있다. 세균에서 항체 단편 및 폴리펩티드의 발현에 대해, 예를 들면, US 5,648,237, US 5,789,199 및 US 5,840,523을 참조한다. (대장균 (*E. coli*)에서 항체 단편의 발현을 설명하는, Charlton, K.A., In: Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254를 또한 참조한다). 발현 후, 항체는 가용성 분획물에서 세균 세포 페이스트로부터 분리될 수 있고 더욱 정제될 수 있다.

[0579] 원핵생물에 더하여, 진핵 미생물, 예컨대 글리코실화 경로가 "인간화"되어, 부분적으로 또는 완전 인간 글리코실화 패턴을 갖는 항체의 생산을 야기하는 균류 및 효모 균주를 포함한, 실모양 균류 또는 효모가 항체-인코딩 벡터에 대한 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 참조: Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22 (2004) 1409-1414; 및 Li, H. et al., Nat. Biotech. 24 (2006) 210-215.

[0580] 글리코실화된 항체의 발현을 위한 적합한 숙주 세포는 또한, 다세포 생물체 (무척추동물 및 척추동물)로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 실례는 식물과 곤충 세포를 포함한다. 특히, 스포도프테라 프루기페르다 (*Spodoptera frugiperda*) 세포의 형질감염을 위해, 곤충 세포와 함께 이용될 수 있는 다양한 바쿨로바이러스 계통이 확인되었다.

[0581] 식물 세포 배양물 또한, 숙주로서 활용될 수 있다. 참조: 예를 들면, US 특허 번호 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978 및 6,417,429 (유전자도입 식물에서 항체를 생산하기 위한 PLANTIBODIES™ 기술을 설명).

[0582] 척추동물 세포 또한, 숙주로서 이용될 수 있다. 예를 들어, 현탁 상태에서 성장하도록 적응되는 포유류 세포주가 유용할 수 있다. 유용한 포유류 숙주 세포주의 다른 실례는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7); 인간 배아 신장 세포주 (예를 들면, Graham, F.L. et al., J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74에 설명된 바와 같은 293 또는 293 세포); 아기 햄스터 신장 세포 (BHK); 생쥐 세르톨리 세포 (예를 들면, Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252에 설명된 바와 같은 TM4 세포); 원숭이 신장 세포 (CV1); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76); 인간 경부 암종 세포 (HELA); 개 신장 세포 (MDCK); 버팔로 쥐 간 세포 (BRL 3A); 인간 폐 세포 (W138); 인간 간 세포 (Hep G2); 생쥐 유방 종양 (MMT 060562); 예를 들면, Mather, J.P. et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68에 설명된 바와 같은 TRI 세포; MRC 5 세포; 그리고 FS4 세포이다. 다른 유용한 포유류 숙주 세포주에는 DHFR<sup>-</sup> CHO 세포를 포함한, 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포 (Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220); 그리고 골수종 세포주 예컨대 Y0, NS0 및 Sp2/0이 포함된다. 항체 생산에 적합한 일정한 포유류 숙주 세포주에 관한 검토를 위해, 예를 들면, Yazaki, P. and Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268을 참조한다.

[0583] 다른 양상에서, 본원 발명은 본원에 설명된 바와 같은 변형된 단일특이적 항체가 개선된 pH 의존성 결합 특성을 보여주고, 이런 이유로 본원 발명의 이중특이적 항체의 생성에 특히 유용하다는 조사 결과에 부분적으로 근거한다.

#### [0584] 진단과 검출을 위한 방법과 조성물

[0585] 일정한 실시형태에서, 본원에 제시된 임의의 이중특이적 항-CCL2 항체는 생물학적 샘플에서 CCL2의 존재를 검출하는 데 유용하다. 본원에서 이용된 용어 "검출하는"은 정량적 또는 정성적 검출을 포괄한다. 일정한 실시형태에서, 생물학적 샘플에는 세포 또는 조직, 예컨대 면역 세포 또는 T 세포 침윤물 및 또는 종양 세포가 포함된다.

[0586] 한 실시형태에서, 진단 또는 검출의 방법에 이용하기 위한 이중특이적 항-CCL2 항체가 제공된다. 추가의 양상에서, 생물학적 샘플에서 CCL2의 존재를 검출하는 방법이 제공된다. 일정한 실시형태에서, 상기 방법은 CCL2에 이중특이적 항-CCL2 항체의 결합을 허용하는 조건하에 생물학적 샘플을 본원에 설명된 바와 같은 이중특이적 항-CCL2 항체와 접촉시키는 단계, 그리고 이중특이적 항-CCL2 항체 및 CCL2 사이에 복합체가 형성되는지 여부를 검출하는 단계를 포함한다. 이런 방법은 시험관내 또는 생체내 방법일 수 있다. 한 실시형태에서, 이중특이적 항-CCL2 항체는 예를 들면, CCL2가 환자의 선택을 위한 바이오마커인 경우에, 이중특이적 항-CCL2 항체를 이용한 요법에 적격인 개체를 선택하는 데 이용된다.

[0587] 일정한 실시형태에서, 표지화된 이중특이적 항-CCL2 항체가 제공된다. 표지에는 직접적으로 검출되는 표지 또는 모이어티 (예컨대 형광, 색소생산, 전자 밀도, 화학발광 및 방사성 표지)뿐만 아니라 예를 들면, 효소 반응 또는 분자 상호작용을 통해 간접적으로 검출되는 모이어티, 예컨대 효소 또는 리간드가 포함되지만 이들에 한정되지 않는다. 예시적인 표지에는 염료 전구체를 산화시키는 과산화수소를 이용하는 효소, 예컨대 HRP, 락토펙시다아제 또는 마이크로펙록시다아제, 비오틴/아비딘, 스핀 표지, 박테리오파지 표지, 안정된 유리 라디칼 등과 커플링된 방사성 동위원소  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  및  $^{131}\text{I}$ , 형광단, 예컨대 희토류 킬레이트 또는 플루오레세인 및 이의 유도체, 로다민 및 이의 유도체, 단실, 움벨리페론, 루시페라아제, 예를 들면, 반딧불이 루시페라아제 및 세균 루시페라아제 (U.S. 특허 번호 4,737,456), 루시페린, 2,3-디히드로프타라진디온, 양고추냉이 과산화효소 (HRP), 알칼리 인산분해효소,  $\beta$ -갈락토시다아제, 글루코아밀라아제, 라이소자임, 사카라이드 옥시다아제, 예를 들면, 글루코오스 옥시다아제, 갈락토오스 옥시다아제 및 글루코오스-6-인산염 탈수소효소, 헤테로환상 옥시다아제, 예컨대 요산분해효소 및 크산틴 옥시다아제가 포함되지만 이들에 한정되지 않는다.

## [0588] 약학 제제

[0589] 본원에 설명된 바와 같은 이중특이적 항-CCL2 항체의 약학 제제는 동결 건조된 제제 또는 수성 용액의 형태에서, 원하는 정도의 순도를 갖는 이런 항체를 한 가지 이상의 선택적인 약학적으로 허용되는 운반체와 혼합함으로써 제조된다 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980)). 약학적으로 허용되는 운반체는 일반적으로, 이용된 용량과 농도에서 수용자에게 비독성이고, 그리고 다음을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다: 완충액, 예컨대 인산염, 구연산염, 그리고 다른 유기 산; 아스코르빈산 및 메티오닌을 포함한 항산화제; 보존제 (예컨대 옥타데실디메틸벤질 염화암모늄; 염화헥사메토늄; 염화벤잘코늄; 염화벤제토늄; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리(비닐피롤리돈); 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 글루코오스, 만노오스 또는 텍스트린을 포함한 당당류, 이당류 및 다른 탄수화물; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로오스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대 이온, 예컨대 나트륨; 금속 착물 (예를 들면, Zn-단백질 복합체); 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG). 본원에서 예시적인 약학적으로 허용되는 운반체에는 틸새 약물 분산 작용제, 예컨대 가용성 중성 활성 히알루론산분해효소 당단백질 (sHASEGP), 예를 들면, 인간 가용성 PH-20 히알루론산분해효소 당단백질, 예컨대 rhuPH20 (HYLENEX<sup>®</sup>, Baxter International, Inc.)이 추가로 포함된다. rhuPH20을 포함하는 일정한 예시적인 sHASEGP 및 이용 방법은 US 특허 공개 번호 2005/0260186 및 2006/0104968에 설명된다. 한 가지 양상에서, sHASEGP는 한 가지 이상의 추가 글리코사미노글리카나아제, 예컨대 콘드로이티나아제와 병용된다.

[0590] 예시적인 동결 건조된 항체 제제는 US 특허 번호 6,267,958에 설명된다. 수성 항체 제제에는 US 특허 번호 6,171,586 및 WO 2006/044908에 설명된 것들이 포함되는데, 후자 제제는 히스티딘-아세트산염 완충액을 포함한다.

[0591] 본원에서 제제는 또한, 치료되는 특정 적응증에 대해 필요에 따라 한 가지 초과 활성 성분, 바람직하게는 서로에 부정적으로 영향을 주지 않는 상보적 활성을 갖는 것들을 함유할 수 있다. 예를 들어, 추가로 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 이런 활성 성분은 적절하게는, 의도된 목적에 효과적인 양에서 조합으로 존재한다.

[0592] 활성 성분은 예를 들면, 액적형성 기술에 의해 또는 계면 중합화에 의해 제조된 마이크로캡슐 내에, 예를 들면 각각, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예: 리포솜, 알부민 마이크로스피어, 마이크로유체, 나노입자 및 나노캡슐)에서 또는 마크로유체에서 히드록시메틸셀룰로오스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에 포획될 수 있다. 이런 기술은 Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980)에 개시된다.

[0593] 지속된 방출 제조물이 제조될 수 있다. 지속된 방출 제조물의 적합한 실례에는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투성 매트릭스가 포함되는데, 이들 매트릭스는 성형된 물품, 예를 들면, 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다.

[0594] 생체내 투여에 이용되는 제제는 일반적으로 멸균이다. 멸균은 예를 들면, 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 쉽게 달성될 수 있다.

[0595] **치료 방법 및 조성물**

[0596] 본원에 제시된 임의의 이중특이적 항-CCL2 항체가 치료 방법에서 이용될 수 있다.

[0597] 한 가지 양상에서, 약제로서 이용하기 위한 이중특이적 항-CCL2 항체가 제공된다. 추가의 양상에서, 암 치료에서 이중특이적 항-CCL2 항체 또는 용도가 제공된다. 일정한 실시형태에서, 치료 방법에 이용하기 위한 이중특이적 항-CCL2 항체가 제공된다. 일정한 실시형태에서, 본원 발명은 암을 겪는 개체를 치료하는 방법에 이용하기 위한 이중특이적 항-CCL2 항체를 제공하며, 상기 방법은 이중특이적 항-CCL2 항체의 효과량을 상기 개체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0598] 추가의 실시형태에서, 본원 발명은 종양에서 면역억제를 저해하여 종양이 항-PD1, 항-PDL-1 길항제 등과 같은 면역자극제에 취약하도록 만드는 이중특이적 항-CCL2 항체를 제공한다.

[0599] 이런 이유로 한 가지 양상은 본원에 설명된 이중특이적 항-CCL2 항체 및 암 면역요법 예컨대 항-PD1, 항-PDL-1 길항제 등의 조합이다.

[0600] 본원에서 이용된 용어 "암"은 예를 들면 폐암, 비소세포 폐 (NSCL) 암, 세기관지 세포 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 머리 또는 목의 암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 항문 영역의 암, 위암, 위암, 결장암, 유방암, 자궁암, 난관의 암종, 자궁내막의 암종, 자궁경부의 암종, 질의 암종, 외음부의 암종, 호지킨병, 식도의 암, 소장암, 내분비계의 암, 갑상선의 암, 부갑상선의 암, 부신의 암, 연조직의 육종, 요도의 암, 음경의 암, 전립선암, 방광의 암, 신장 또는 요관의 암, 신장 세포 암종, 신우의 암종, 중피종, 간세포암, 담도암, 중추신경계 (CNS)의 신 생물, 척추 축 종양, 뇌간 신경교종, 다형성 아교모세포종, 성상세포종, 슈반세포종, 상피세포종, 수모세포종, 수막종, 편평세포암종, 뇌하수체 선종, 림프종, 림프성 백혈병, 그리고 상기 암 중 어느 것의 불응성 이형, 또는 상기 암 중 하나 이상의 조합일 수 있다.

[0601] 임의의 상기 실시형태에 따른 "개체"는 바람직하게는 인간이다. 추가의 양상에서, 본원 발명은 약제의 제조 또는 준비에서 이중특이적 항-CCL2 항체의 용도를 제공한다. 한 실시형태에서, 약제는 암의 치료를 위한 것이다. 추가의 실시형태에서, 약제는 암을 치료하는 방법에 이용하기 위한 것이고, 상기 방법은 상기 약제의 효과량을 암을 겪는 개체에게 투여하는 단계를 포함한다. 추가의 실시형태에서, 약제는 암 세포의 세포 매개된 용해를 유도하기 위한 것이다. 추가의 실시형태에서, 약제는 암을 겪는 개체에서 암 세포의 세포 매개된 용해를 유도하는 방법에 이용하기 위한 것이며, 상기 방법은 암 세포의 아포토시스를 유도하고/유도하거나 암 세포 증식을 억제하기 위한 약제의 효과량을 상기 개체에게 투여하는 단계를 포함한다. 임의의 상기 실시형태에 따른 "개체"는 인간일 수 있다.

[0602] 추가의 양상에서, 본원 발명은 암을 치료하기 위한 방법을 제공한다. 한 실시형태에서, 상기 방법은 이중특이적 항-CCL2 항체의 효과량을 암을 겪는 개체에게 투여하는 단계를 포함한다. 임의의 상기 실시형태에 따른 "개체"는 인간일 수 있다.

[0603] 추가의 양상에서, 본원 발명은 암을 겪는 개체에서 암 세포의 세포 매개된 용해를 유도하기 위한 방법을 제공한다. 한 실시형태에서, 상기 방법은 암을 겪는 개체에서 암 세포의 세포 매개된 용해를 유도하기 위한 이중특이적 항-CCL2 항체의 효과량을 상기 개체에게 투여하는 단계를 포함한다. 한 실시형태에서, "개체"는 인간이다.

[0604] 본원 발명의 다른 양상에서, 염증성 질환 또는 자가면역 질환을 치료하는 데 이용하기 위한 이중특이적 항-CCL2 항체가 제공된다. 일정한 실시형태에서, 본원 발명은 염증성 질환 또는 자가면역 질환을 겪는 개체를 치료하는 방법에 이용하기 위한 이중특이적 항-CCL2 항체를 제공하며, 상기 방법은 이중특이적 항-CCL2 항체의 효과량을 상기 개체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0605] 일부 실시형태에서, 염증성 질환 또는 자가면역 질환은 자가면역 장애, 염증성 장애, 섬유증 장애, 과립구성 (호중구성 또는 호산성) 장애, 단핵구성 장애, 또는 림프성 장애, 또는 정상적인 또는 일탈적 조직 상주 세포 (예컨대 비만 세포, 대식세포, 또는 림프구) 또는 간질 세포 (예컨대 섬유모세포, 근섬유모세포, 평활근 세포, 상피, 또는 내피)의 증가된 수 또는 분포와 연관된 장애이다. 일부 실시형태에서, 장애는 폐질환이다. 일부 실시형태에서 폐질환은 과립구성 (호산성 및/또는 호중구성) 폐 염증, 감염 유발 폐질환 (바이러스 (예를 들면, 인플루엔자, 파라인플루엔자, 리노바이러스, 인간 메타뉴모바이러스 및 호흡기 합포체 바이러스)와 연관된 것들 포함), 세균, 또는 진균 (예를 들면, 아스페르길루스 (Aspergillus)) 유발요인과 연관된다. 일부 실시형태에서, 장애는 알레르기 유발 폐질환, 독성 환경 오염물 유발 폐질환 (예를 들면, 석면증, 규폐증, 또는 베릴륨증), 위 흡인 유발 폐질환이거나, 또는 면역 조절장애 또는 유전적 소인이 있는 염증성 상태 예컨대 낭포성 섬유증과 연

관된다. 일부 실시형태에서, 장애는 신체적 외상 유발 폐질환 (예를 들면, 인공호흡기 손상), 기종, 담배 유발 기종, 기관지염, 사르코이드증, 조직구증, 림프관근증증, 급성 폐 손상, 급성 호흡 곤란 증후군, 만성 폐질환, 기관지폐 형성이상, 폐렴 (예를 들면, 지역사회 획득 폐렴, 병원내 폐렴, 인공호흡기 연관 폐렴, 바이러스성 폐렴, 세균성 폐렴 및 중증 폐렴), 기도 악화, 그리고 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS))이다. 일부 실시형태에서, 염증성 폐질환은 COPD이다.

[0606] 일부 실시형태에서, 염증성 폐질환은 천식이다. 일부 실시형태에서, 천식은 치명적일 수 있는 악화되는 증상 (악화 또는 발작)의 급성 사건을 동반하는 지속적인 만성 중증 천식이다. 일부 실시형태에서, 천식은 아토피 (알레르기에도 알려져 있음) 천식, 비알레르기성 천식 (예를 들면, 종종 호흡기 바이러스 (예: 인플루엔자, 파라인플루엔자, 리노바이러스, 인간 메타뉴모바이러스 및 호흡기 합포체 바이러스)로 감염, 또는 흡입된 자극제 (대기 오염 물질, 스모그, 디젤 입자, 실내에서 또는 야외에서 휘발성 화학물질과 가스, 또는 심지어 차가운 건조 공기에 의한)에 의해 촉발됨)이다.

[0607] 일부 실시형태에서, 천식은 간헐적 또는 운동 유발 천식, "연기" (전형적으로 담배, 여송연, 파이프), 흡입 또는 "베이핑" (담배, 마리화나 또는 다른 이런 물질)에 급성 또는 만성 일차적인 또는 간접적인 노출에 기인한 천식, 또는 아스피린 또는 관련된 NSAIDS의 최근 섭취에 의해 촉발된 천식이다. 일부 실시형태에서, 천식은 경등도 천식, 또는 코르티코스테로이드 미경험 천식, 새로이 진단되고 치료되지 않은 천식, 또는 증상 (기침, 천명, 숨가쁨/헐떡임, 또는 흉통)을 제어하기 위해 흡입된 국소 또는 전신 스테로이드의 장기적인 이용을 이전에 필요로 하지 않은 천식이다. 일부 실시형태에서, 천식은 만성 천식, 코르티코스테로이드 저항성 천식, 코르티코스테로이드 난치성 천식, 코르티코스테로이드 또는 다른 만성 천식 조절제 복용 중 통제되지 않는 천식이다. 일부 실시형태에서, 자가면역 장애, 염증성 장애, 섬유증 장애, 호중구성 장애, 또는 호산성 장애는 폐섬유증이다. 일부 실시형태에서, 폐섬유증은 특발성 폐섬유증 (IPF)이다. 일부 실시형태에서, 자가면역 장애, 염증성 장애, 섬유증 장애, 과립구성 (호중구성 또는 호산성) 장애, 단핵구성 장애, 또는 림프성 장애는 식도염, 알레르기성 비염, 비알레르기성 비염, 용종을 동반한 비부비동염, 코 용종증, 기관지염, 만성 폐렴, 알레르기 기관지폐 아스페르길루스증, 기도 염증, 알레르기성 비염, 기관지확장증, 및/또는 만성 기관지염이다.

[0608] 일부 실시형태에서, 자가면역 장애, 염증성 장애, 섬유증 장애, 과립구성 (호중구성 또는 호산성) 장애, 단핵구성 장애, 또는 림프성 장애는 관절염이다. 일부 실시형태에서, 관절염은 류마티스 관절염이다. 일부 실시형태에서, 관절염은 골관절염, 류마티스 관절염, 연소성 관절염, 연소성 류마티스 관절염, 초기 관절염, 다관절 류마티스 관절염, 전신 발병 류마티스 관절염, 장병성 관절염, 반응성 관절염, 건선성 관절염, 및/또는 부상으로 인한 관절염이다.

[0609] 일부 실시형태에서, 자가면역 장애, 염증성 장애, 섬유증 장애, 과립구성 (호중구성 또는 호산성) 장애, 단핵구성 장애, 또는 림프성 장애는 위장관 염증성 상태이다. 일부 실시형태에서, 위장관 염증성 상태는 IBD (염증성 장 질환), 궤양성 대장염 (UC), 크론병 (CD), 대장염 (예를 들면, 환경적 손상에 의해 유발된 (예를 들면, 화학 요법, 방사선요법 등과 같은 치료 요법에 의해 유발되거나 이와 연관된) 대장염, 감염성 대장염, 허혈성 대장염, 콜라겐성 또는 림프성 대장염, 괴사성 소장결장염, 만성 육아종성 질환 또는 소아 지방변증과 같은 질환에서 대장염, 음식 알레르기, 위염, 위소장염, 감염성 위염 또는 소장결장염 (예를 들면, 헬리코박터 파일로리 (*Helicobacter pylori*)-감염된 만성 활성 위염), 그리고 감염원에 의해 유발된 위장관 염증의 기타 형태, 또는 불확정 대장염이다.

[0610] 일부 실시형태에서, 자가면역 장애, 염증성 장애, 섬유증 장애, 과립구성 (호중구성 또는 호산성) 장애, 단핵구성 장애, 또는 림프성 장애, 또는 정상적인 또는 일탈적 조직 상주 세포 (예컨대 비만 세포, 대식세포, 또는 림프구) 또는 간질 세포 (예컨대 섬유모세포, 근섬유모세포, 평활근 세포, 상피, 또는 내피)의 증가된 수 또는 분포와 연관된 장애는 루푸스 또는 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 또는 루푸스의 한 가지 이상의 장기 특이적 발현 (예를 들면, 신장에 영향을 주는 루푸스 신장염 (LN), 또는 혈액 및/또는 림프 기관 (림프절, 비장, 흉선 및 연관된 림프관), 및/또는 관절 및/또는 다른 장기에 영향을 주지만 신장에는 영향을 주지 않는 신장외 루푸스 (ERL))이다. 일부 실시형태에서, 자가면역 장애, 염증성 장애, 또는 섬유증 장애는 패혈증 및/또는 외상, HIV 감염, 또는 특발성 (미지의 병인의) 예컨대 ANCA 관련 혈관염 (AAV), 다발혈관염을 동반한 육아종증 (이전에 베게너 육아종증으로 알려짐), 베르체트병, 심혈관 질환, 호산성 기관지염, 라이터 증후군, SEA 증후군 (혈청 음성 반응, 부착부병증, 관절병증 증후군), 강직성 척추염, 피부근염, 경피증, 예를 들면, 전신 경화증으로도 불리는 전신성 경피증, 혈관염 (예를 들면, 측두 동맥염으로도 불리는 거대 세포 동맥염 (GCA), 두개 동맥염 또는 호튼병), 근염, 다발근육염, 피부근염, 결절성 다발동맥염, 동맥염, 류마티스성 다발근육통증, 사르코이드증, 원발성 담도 경화증, 경화 담관염, 쇼그렌 증후군, 건선, 판상 건선, 방울 건선, 역위 건선, 농포성 건선, 홍색

피부성 건선, 피부염, 아토피성 피부염, 천포창, 예를 들면, 심상성 천포창, 죽상경화증, 루푸스, 스틸병, 중증 근무력증, 소아 지방변증, 재발 이완성 (RRMS) 또는 원발성 진행형 (PPMS) 또는 속발성 진행형 (SPMS) 아형의 다발성 경화증 (MS), 길랭 바레병, I형 당뇨병 (T1DM) 또는 인슐린 의존성 (IDDM) 또는 연소성 발병 DM 유형, 갑상선염 (예를 들면, 그레이브스병), 만성 소화 장애증, 척 스트라우스 증후군, 근육통 증후군, 파다호산구 증후군, 삽화적 혈관부종을 포함하는 부종성 반응, 기생충 감염, 사상충성 피부염 호산성 식도염, 호산성 장염, 호산성 대장염, 폐쇄성 수면 무호흡, 심내막심근 섬유증, 애디슨병, 레이노병 또는 현상, 자가면역 간염, 이식 편 대 숙주 질환 (GVHD), 또는 장기 이식 거부와 관련된다.

[0611] 추가의 양상에서, 본원 발명은 예를 들면, 임의의 상기 치료 방법에 이용하기 위한 본원에 제시된 임의의 이중 특이적 항-CCL2 항체를 포함하는 약학 제제를 제공한다. 한 실시형태에서, 약학 제제는 본원에 제시된 임의의 이중특이적 항-CCL2 항체 및 약학적으로 허용되는 운반체를 포함한다.

[0612] 본원 발명의 항체는 비경구, 폐내 및 비강내를 포함한 임의의 적절한 수단에 의해, 그리고 국소 치료를 위해 원하는 경우에, 병변내 투여에 의해 투여될 수 있다. 비경구 주입에는 근육내, 정맥내, 동맥내, 복막내, 또는 피하 투여가 포함된다. 투약은 임의의 적합한 루트에 의해 할 수 있다, 예를 들면, 부분적으로 투여가 단기 또는 장기인지에 따라서, 주사, 예컨대 정맥내 또는 피하 주사에 의해 할 수 있다. 단회 투여 또는 다양한 시점에 걸쳐 복수 투여, 일시 투여, 그리고 펄스 주입을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 다양한 투약 일정이 본원에서 예기된다.

[0613] 본원 발명의 항체는 모범 의료행위 지침과 일치하는 방식으로 제제화되고, 투약되고, 투여될 것이다. 이러한 문맥에서 고려되는 인자는 치료되는 특정 장애, 치료되는 특정 포유동물, 개별 환자의 임상 상태, 장애의 원인, 작용제의 전달 부위, 투여 방법, 투여의 일정, 그리고 개업 의사에게 공지된 다른 인자를 포함한다. 항체는 반드시 그러할 필요는 없지만, 문제되는 장애를 예방하거나 치료하는 데 현재 이용되는 한 가지 이상의 작용제와 함께 선택적으로 제제화된다. 이런 다른 작용제의 효과량은 제제 내에 존재하는 항체의 양, 장애 또는 치료의 유형, 그리고 상기 논의된 다른 인자에 의존한다. 이들은 일반적으로, 본원에 설명된 바와 동일한 용량에서 및 투여 루트로, 또는 본원에 설명된 용량의 약 1 내지 99%에서, 또는 경험적으로/임상적으로 적합한 것으로 결정되는 임의의 용량에서 및 임의의 루트에 의해 이용된다.

[0614] 질병의 예방 또는 치료를 위한, 본원 발명의 항체의 적절한 용량 (단독으로 이용되거나 한 가지 이상의 다른 추가 치료제와 병용될 때)은 치료되는 질병의 유형, 항체의 유형, 질병의 심각도와 경과, 항체가 예방적 또는 치료적 목적으로 투여되는지 여부, 선행 요법, 환자의 임상 병력 및 항체에 대한 반응, 그리고 주치의의 재량에 의존할 것이다. 상기 항체는 적합하게는, 한꺼번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 투여된다. 질병의 유형과 심각도에 따라서, 약 1  $\mu\text{g/kg}$  내지 15  $\text{mg/kg}$  (예를 들면, 0.5  $\text{mg/kg}$  - 10  $\text{mg/kg}$ )의 항체가 예를 들면, 1회 이상의 별개 투여에 의한, 또는 연속 주입에 의한 것인지에 상관없이, 환자에게 투여를 위한 초기 후보 용량일 수 있다. 한 가지 전형적인 일일량은 전술된 인자에 따라서, 약 1  $\mu\text{g/kg}$  내지 100  $\text{mg/kg}$  이상의 범위일 수도 있다. 수 일 이상에 걸쳐 반복된 투여의 경우에, 상태에 따라서, 치료는 일반적으로, 질병 증상의 원하는 억제가 발생할 때까지 지속될 것이다. 항체의 한 가지 예시적인 용량은 약 0.05  $\text{mg/kg}$  내지 약 10  $\text{mg/kg}$ 의 범위 안에 있을 것이다. 따라서, 약 0.5  $\text{mg/kg}$ , 2.0  $\text{mg/kg}$ , 4.0  $\text{mg/kg}$  또는 10  $\text{mg/kg}$  (또는 이들의 임의의 조합) 중 한 가지 이상의 용량이 환자에게 투여될 수 있다. 이런 용량은 간헐적으로, 예를 들면 매주 또는 3 주마다 (예를 들면 환자가 약 2 내지 약 20회, 또는 예를 들면, 약 6회 용량의 상기 항체를 제공받도록) 투여될 수 있다. 초기 더 높은 부하 용량, 그 이후에 1회 이상의 더 낮은 용량이 투여될 수 있다. 예시적인 투약 요법은 약 4  $\text{mg/kg}$ 의 초기 부하 용량, 그 이후에 약 2  $\text{mg/kg}$ 의 주 1회 유지 용량의 항체를 투여하는 단계를 포함한다. 하지만, 다른 투약 요법이 유용할 수도 있다. 이러한 요법의 진행은 전통적인 기술과 시험법에 의해 쉽게 모니터링된다.

[0615] **II. 제조 물품**

[0616] 본원 발명의 다른 양상에서, 전술된 장애의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용한 물질을 함유하는 제조 물품이 제공된다. 제조 물품은 용기 및 용기 상에 또는 용기와 결합된 표지 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적합한 용기에는 예를 들면, 병, 바이알, 주사기, IV 용액 백 등이 포함된다. 상기 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 재료로부터 형성될 수 있다. 용기는 단독으로, 또는 질환을 치료하는, 예방하는 및/또는 진단하는 데 효과적인 다른 조성물과 조합으로 조성물을 보유하고, 그리고 멸균 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들면, 용기는 정맥내 용액 백, 또는 피하 주사 바늘에 의해 관통 가능한 마개를 갖는 바이알일 수 있다). 조성물에서 적어도 한 가지 활성제는 본원 발명의 항체이다. 표지 또는 포장 삽입물은 조성물이 선택 질환을 치료하는 데 이용된다는 것을

지시한다. 게다가, 제조 물품은 (a) 조성물이 그 안에 함유된 첫 번째 용기 (여기서 상기 조성물은 본원 발명의 항체를 포함한다); 및 (b) 조성물이 그 안에 함유된 두 번째 용기 (여기서 상기 조성물은 추가 세포독성제 또는 만약 그렇지 않으면 치료제를 포함한다)를 포함할 수 있다. 본원 발명의 이러한 실시형태에서 제조 물품은 조성물이 특정 질환을 치료하는 데 이용될 수 있다는 것을 표시하는 포장 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 제조 물품은 약학적으로 허용되는 완충액, 예컨대 정균성 주사용수 (BWF1), 인산염 완충 식염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 두 번째 (또는 세 번째) 용기를 추가로 포함할 수도 있다. 이것은 다른 완충액, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기를 포함하여, 상업적 관점 및 이용자 관점으로부터 바람직한 다른 물질을 추가로 포함할 수도 있다.

**본원 발명의 특정한 실시형태가 아래에 나열된다.**

1. 인간 CCL2 상에서 첫 번째 에피토프에 (특이적으로) 결합하는 첫 번째 항원 결합 부위 및 인간 CCL2 상에서 두 번째 상이한 에피토프에 (특이적으로) 결합하는 두 번째 상이한 항원 결합 부위를 포함하는 이중특이적 항체로서,

여기서 이중특이적 항체는

a) (N 말단에서 C 말단 방향으로) VH1-CH1-L1-힌지-CH2-CH3-L2-VL1-CL을 포함하는 첫 번째 폴리펩티드 사슬로서, 여기서

VH1은 첫 번째 중쇄 가변 도메인이고 VL1은 첫 번째 가변 경쇄 도메인이며 (둘 모두 함께 (함께 연결되어) 첫 번째 항원 결합 부위를 형성함),

CH1은 불변 중쇄 도메인 1이고,

L1은 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 실시형태에서 5개 내지 10개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,

힌지는 중쇄 힌지 영역이고,

CH2는 불변 중쇄 도메인 2이고,

CH3은 불변 중쇄 도메인 3이고,

L2는 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 실시형태에서 10개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,

CL은 불변 경쇄 도메인인 첫 번째 폴리펩티드 사슬,

그리고

b) (N 말단에서 C 말단 방향으로) VH2-CH1-L1-힌지-CH2-CH3-L2-VL2-CL을 포함하는 두 번째 폴리펩티드 사슬로서, 여기서

VH2는 두 번째 중쇄 가변 도메인이고 VL2는 두 번째 가변 경쇄 도메인이며 (둘 모두 함께 (함께 연결되어) 두 번째 항원 결합 부위를 형성함),

CH1은 불변 중쇄 도메인 1이고,

L1은 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 실시형태에서 5개 내지 10개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,

힌지는 중쇄 힌지 영역이고,

CH2는 불변 중쇄 도메인 2이고,

CH3은 불변 중쇄 도메인 3이고,

L2는 5개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는(한 실시형태에서 10개 내지 15개 아미노산의 길이를 갖는) 폴리펩티드 링커이고,

CL은 불변 경쇄 도메인인 두 번째 폴리펩티드 사슬을 포함하고,

여기서,

- [0640] A) i) VH1 도메인은 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0641] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0642] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0643] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0644] 또는
- [0645] B) i) VH1 도메인은 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0646] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0647] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 91의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0648] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0649] 또는
- [0650] C) i) VH1 도메인은 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0651] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0652] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0653] VL2 도메인은 서열 번호: 94의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0654] 또는
- [0655] D) i) VH1 도메인은 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0656] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0657] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0658] VL2 도메인은 서열 번호: 94의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0659] 또는
- [0660] E) i) VH1 도메인은 서열 번호: 73의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0661] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0662] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0663] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0664] 또는
- [0665] F) i) VH1 도메인은 서열 번호: 73의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0666] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0667] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0668] VL2 도메인은 서열 번호: 94의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0669] 또는
- [0670] G) i) VH1 도메인은 서열 번호: 73의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0671] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0672] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 92의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0673] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0674] 또는
- [0675] H) i) VH1 도메인은 서열 번호: 73의 아미노산 서열을 포함하고;

- [0676] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0677] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 91의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0678] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0679] 또는
- [0680] I) i) VH1 도메인은 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0681] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0682] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0683] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0684] 또는
- [0685] J) i) VH1 도메인은 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0686] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0687] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 92의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0688] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0689] 또는
- [0690] K) i) VH1 도메인은 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0691] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0692] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 91의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0693] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0694] 또는
- [0695] L) i) VH1 도메인은 서열 번호: 74의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0696] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0697] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0698] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0699] 또는
- [0700] M) i) VH1 도메인은 서열 번호: 74의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0701] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0702] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0703] VL2 도메인은 서열 번호: 94의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0704] 또는
- [0705] N) i) VH1 도메인은 서열 번호: 74의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0706] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0707] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 92의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0708] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0709] 또는
- [0710] O) i) VH1 도메인은 서열 번호: 74의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0711] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고

- [0712] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 91의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0713] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0714] 또는
- [0715] P) i) VH1 도메인은 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0716] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0717] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 92의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0718] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0719] 2. 실시형태 1에 따른 이중특이적 항체로서, 여기서
- [0720] i) VH1 도메인은 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0721] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0722] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 91의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0723] VL2 도메인은 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0724] 3. 실시형태 1에 따른 이중특이적 항체로서, 여기서
- [0725] i) VH1 도메인은 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0726] VL1 도메인은 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하며; 그리고
- [0727] ii) VH2 도메인은 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 포함하고;
- [0728] VL2 도메인은 서열 번호: 94의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0729] 4. 실시형태 1 내지 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체로서, 여기서
- [0730] L1은 9개 내지 11개 아미노산의 길이를 갖는 폴리펩티드 링커이고,
- [0731] L2는 9개 내지 11개 아미노산의 길이를 갖는 폴리펩티드 링커이다.
- [0732] 5. 실시형태 4에 따른 이중특이적 항체로서, 여기서
- [0733] L1 및 L2는 아래의 군에서 선택되는 폴리펩티드 링커이다: GSGGSGGSGG (서열 번호: 183), GSGGSGGGG (서열 번호: 184), GSGGGSGGGG (서열 번호: 185); GSGGSGGGG (서열 번호: 186), GSGGGSGGGG (서열 번호: 187), GSGGGSGGGG (서열 번호: 188), GSGGGSGGGG (서열 번호: 189), GSGGGSGGGG (서열 번호: 190), 및 GSGGGSGGGG (서열 번호: 191).
- [0734] 6. 실시형태 4에 따른 이중특이적 항체로서, 여기서
- [0735] L1은 GSGGGSGGGG (서열 번호: 188)의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 링커이고,
- [0736] L2는 GSGGGSGGGG (서열 번호: 188)의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 링커이다.
- [0737] 7. 실시형태 1 내지 6 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체로서, 여기서 불변 중쇄 도메인 CH1, 힌지, CH2 및 CH3은 인간 IgG 아이소타입, 바람직하게는 인간 IgG1 아이소타입이다.
- [0738] 8. 선행하는 실시형태 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체로서, 상기 이중특이적 항체는
- [0739] i) 시험관내에서 CCL2와 이의 수용체 CCR2의 결합을 차단(리포터 분석,  $IC_{50}=0.5nM$ )하고/하거나;
- [0740] ii) 시험관내에서 골수 세포의 CCL2 매개 화학주성을 억제( $IC_{50}=1.5nM$ )하고/하거나;
- [0741] iii) cyno 및 인간 CCL2에 교차반응성이다.
- [0742] 9. 선행하는 실시형태 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체로서, 상기 이중특이적 항체는 다른 CCL 동족체에 교차반응성이 아니다 (CCL2에 결합과 비교하여 다른 CCL 동족체 (CCL8, CCL7 및 CCL13의 군에서 선택됨)에 100 배 더 적은 결합을 보여준다).

- [0743] 10. 선행하는 실시형태 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체로서, 상기 이중특이적 항체는 인간 CCL2 상에서 첫 번째와 두 번째 에피토프에 이온 의존성 방식으로 결합한다.
- [0744] 11. 선행하는 실시형태 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체로서, 상기 이중특이적 항체는 인간 CCL2에 pH 의존성 방식으로 결합하고, 그리고 첫 번째 항원 결합 부위 및 두 번째 항원 결합 부위 둘 모두 산성 pH에서보다 중성 pH에서 더 높은 친화성으로 CCL2에 결합한다.
- [0745] 12. 선행하는 실시형태 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체로서, 상기 이중특이적 항체는 pH 5.8에서보다 pH 7.4에서 10배 더 높은 친화성으로 인간 CCL2에 결합한다.
- [0746] 13. 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체로서, 여기서 불변 중쇄 도메인 CH1, 힌지, CH2 및 CH3은 인간 IgG1 아이소타입이고 아래의 돌연변이 (Kabat EU 넘버링) 중 하나 이상을 포함한다:
- [0747] i) Q311R 및/또는 P343R (항원의 흡수를 향상시키기 위해 pI를 증가시키는 데 적합함); 및/또는
- [0748] ii) L234Y, L235W, G236N, P238D, T250V, V264I, H268D, Q295L, T307P, K326T 및/또는 A330K (인간 FcγRIIb에 대한 친화성을 증가시키고 다른 인간 FcγR에 대한 친화성을 감소시키는 데 적합함); 및/또는
- [0749] iii) M428L, N434A 및/또는 Y436T (더 긴 혈장 반감기를 위해 FcRn에 대한 친화성을 증가시키는 데 적합함); 및/또는
- [0750] iv) Q438R 및/또는 S440E (류마티스 인자 결합을 억제하는 데 적합함).
- [0751] 14. 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체로서, 여기서 불변 중쇄 도메인 CH1, 힌지, CH2 및 CH3은 인간 IgG1 아이소타입이고 아래의 돌연변이 (Kabat EU 넘버링) 중 하나 이상을 포함한다:
- [0752] i) Q311R, 및/또는 P343R (항원의 흡수를 향상시키기 위해 pI를 증가시키는 데 적합함); 및/또는
- [0753] ii) L235W, G236N, H268D, Q295L, K326T 및/또는 A330K (인간 FcγRIIb에 대한 친화성을 증가시키고 다른 인간 FcγR에 대한 친화성을 감소시키는 데 적합함); 및/또는
- [0754] iii) N434A (더 긴 혈장 반감기를 위해 FcRn에 대한 친화성을 증가시키는 데 적합함); 및/또는
- [0755] iv) Q438R 및/또는 S440E (류마티스 인자 결합을 억제하는 데 적합함).
- [0756] 15. 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체로서, 여기서 불변 중쇄 도메인 CH1, 힌지, CH2 및 CH3은 인간 IgG1 아이소타입이고 아래의 돌연변이 (Kabat EU 넘버링) 중 하나 이상을 포함한다:
- [0757] i) Q311R 및 P343R (항원의 흡수를 향상시키기 위해 pI를 증가시키는 데 적합함);
- [0758] ii) L235W, G236N, H268D, Q295L, K326T 및 A330K (인간 FcγRIIb에 대한 친화성을 증가시키고 다른 인간 FcγR에 대한 친화성을 감소시키는 데 적합함);
- [0759] iii) N434A (더 긴 혈장 반감기를 위해 FcRn에 대한 친화성을 증가시키는 데 적합함); 그리고
- [0760] iv) Q438R 및 S440E (류마티스 인자 결합을 억제하는 데 적합함).
- [0761] 16. 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체로서, 여기서 불변 중쇄 도메인 CH1, 힌지, CH2 및 CH3은 인간 IgG1 아이소타입이고 아래의 돌연변이 (Kabat EU 넘버링) 중 하나 이상을 포함한다:
- [0762] i) Q311R 및/또는 P343R (항원의 흡수를 향상시키기 위해 pI를 증가시키는 데 적합함); 및/또는
- [0763] ii) L234Y, P238D, T250V, V264I, T307V 및/또는 A330K (인간 FcγRIIb에 대한 친화성을 증가시키고 다른 인간 FcγR에 대한 친화성을 감소시키는 데 적합함); 및/또는
- [0764] iii) M428L, N434A 및/또는 Y436T (더 긴 혈장 반감기를 위해 FcRn에 대한 친화성을 증가시키는 데 적합함); 및/또는
- [0765] iv) Q438R 및/또는 S440E (류마티스 인자 결합을 억제하는 데 적합함).
- [0766] 17. 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체로서, 여기서 불변 중쇄 도메인 CH1, 힌지, CH2 및 CH3은 인간 IgG1 아이소타입이고 아래의 돌연변이 (Kabat EU 넘버링) 중 하나 이상을 포함한다:
- [0767] i) Q311R 및/ P343R (항원의 흡수를 향상시키기 위해 pI를 증가시키는 데 적합함);

- [0768] ii) L234Y, P238D, T250V, V264I, T307V 및 A330K (인간 FcγRIIb에 대한 친화성을 증가시키고 다른 인간 FcγR에 대한 친화성을 감소시키는 데 적합함);
- [0769] iii) M428L, N434A 및 Y436T (더 긴 혈장 반감기를 위해 FcRn에 대한 친화성을 증가시키는 데 적합함); 그리고
- [0770] iv) Q438R 및 S440E (류마티스 인자 결합을 억제하는 데 적합함).
- [0771] 18. 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 이종특이적 항체로서, 여기서 불변 중쇄 도메인 CH1, 힌지, CH2 및 CH3은 인간 IgG1 아이소타입이고 아래의 돌연변이 (Kabat EU 넘버링) 중 하나 이상을 포함한다:
- [0772] i) Q311R 및/ P343R (항원의 흡수를 향상시키기 위해 pI를 증가시키는 데 적합함);
- [0773] ii) L234Y, P238D, T250V, V264I, T307V 및 A330K (인간 FcγRIIb에 대한 친화성을 증가시키고 다른 인간 FcγR에 대한 친화성을 감소시키는 데 적합함);
- [0774] iii) N434A (더 긴 혈장 반감기를 위해 FcRn에 대한 친화성을 증가시키는 데 적합함); 그리고
- [0775] iv) Q438R 및 S440E (류마티스 인자 결합을 억제하는 데 적합함).
- [0776] 19. 제13항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따른 이종특이적 항체로서, 여기서 불변 중쇄 도메인 CH3은 아래의 돌연변이(Kabat EU 넘버링)를 포함한다:
- [0777] i) 중쇄 불변 도메인 CH3 중 하나에서 S354C 및 T366W; 그리고
- [0778] ii) 중쇄 불변 도메인 CH3 중 다른 것에서 Y349C, T366S, L368A, Y407V.
- [0779] 20. 제13항 내지 제19항 중 어느 한 항에 따른 이종특이적 항체로서, 여기서 불변 중쇄 도메인 CH3은 아래의 돌연변이(Kabat EU 넘버링)를 포함한다:
- [0780] K447G.
- [0781] 21. 실시형태 1 내지 2 및 4 내지 7 중 어느 하나에 따른 이종특이적 항체로서, 상기 이종특이적 항체는 서열 번호: 175의 서열과 적어도 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 서열 번호: 176의 서열과 적어도 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.
- [0782] 22. 실시형태 1 내지 2 및 4 내지 7 중 어느 하나에 따른 이종특이적 항체로서, 상기 이종특이적 항체는 서열 번호: 175의 서열의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 서열 번호: 176의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.
- [0783] 23. 실시형태 1 내지 7, 실시형태 1 내지 2 및 4 내지 7 중 어느 하나에 따른 이종특이적 항체로서, 상기 이종특이적 항체는 서열 번호: 177의 서열과 적어도 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 서열 번호: 178의 서열과 적어도 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.
- [0784] 24. 실시형태 1 내지 2 및 4 내지 7 중 어느 하나에 따른 이종특이적 항체로서, 상기 이종특이적 항체는 서열 번호: 177의 서열의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 서열 번호: 178의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.
- [0785] 25. 실시형태 1 내지 2 및 4 내지 7 중 어느 하나에 따른 이종특이적 항체로서, 상기 이종특이적 항체는 서열 번호: 179의 서열과 적어도 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 서열 번호: 180의 서열과 적어도 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.
- [0786] 26. 실시형태 1 내지 2 및 4 내지 7 중 어느 하나에 따른 이종특이적 항체로서, 상기 이종특이적 항체는 서열 번호: 179의 서열의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 서열 번호: 180의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.
- [0787] 27. 실시형태 1 내지 2 및 4 내지 7 중 어느 하나에 따른 이종특이적 항체로서, 상기 이종특이적 항체는 서열 번호: 179의 서열과 적어도 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 서열 번호: 180의 서열과 적어도 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.
- [0788] 28. 실시형태 1 내지 2 및 4 내지 7 중 어느 하나에 따른 이종특이적 항체로서, 상기 이종특이적 항체는 서열 번호: 181의 서열의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 서열 번호: 182의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.

- [0789] 29. 선행하는 실시형태 중 어느 하나에 따른 항체를 인코딩하는 단리된 핵산.
- [0790] 30. 실시형태 29의 핵산을 포함하는 숙주 세포.
- [0791] 31. 항체를 생산하는 방법으로서, 상기 방법은 항체가 생산되도록 실시형태 30의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함한다.
- [0792] 32. 실시형태 32의 방법으로서, 상기 방법은 항체를 숙주 세포로부터 회수하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0793] 33. 실시형태 1 내지 28 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체 및 약학적으로 허용되는 운반체를 포함하는 약학 제제.
- [0794] 34. 약제로서 이용하기 위한, 실시형태 1 내지 28 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체.
- [0795] 35. 암을 치료하는 데 이용하기 위한, 실시형태 1 내지 28 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체.
- [0796] 36. 염증 질환 또는 자가면역 질환을 치료하는 데 이용하기 위한, 실시형태 1 내지 28 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체.
- [0797] 37. 약제의 제조에서 실시형태 1 내지 28 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체의 용도.
- [0798] 38. 실시형태 37의 용도로서, 여기서 약제는 암의 치료를 위한 것이다.
- [0799] 39. 실시형태 37의 용도로서, 여기서 약제는 염증 질환 또는 자가면역 질환의 치료를 위한 것이다.
- [0800] 40. 암을 겪는 개체를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 실시형태 1 내지 28 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체의 효과량을 상기 개체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0801] 41. 염증 질환 또는 자가면역 질환을 겪는 개체를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 실시형태 1 내지 28 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체의 효과량을 상기 개체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0802] 하기의 실시예 및 도면은 본원 발명에 관한 이해를 보조하기 위해 제공되고, 이의 진정한 범위는 첨부된 청구항에 진술된다. 발명의 사상으로부터 벗어나지 않으면서, 진술된 절차에서 변형이 만들어질 수 있는 것으로 이해된다.
- [0803] 아미노산 서열에 관한 설명

[0804] 상이한 에피토프에 결합하는 항-CCL2 항원 결합 모이어티 (가변 영역 및 초가변 영역 (CDR)):

|        |    |              |                           |                                                                                                                              |
|--------|----|--------------|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 서열 번호: | 33 | 중쇄 CDR-H1    | CNT0888                   | SYGIS                                                                                                                        |
| 서열 번호: | 34 | 중쇄 CDR-H2    | CNT0888                   | GIIPFGTANYAQKFGG                                                                                                             |
| 서열 번호: | 35 | 중쇄 CDR-H3    | CNT0888                   | YDGIYGELDF                                                                                                                   |
| 서열 번호: | 36 | 경쇄 CDR-L1    | CNT0888                   | RASQSVSDAYLA                                                                                                                 |
| 서열 번호: | 37 | 경쇄 CDR-L2    | CNT0888                   | DASSRAT                                                                                                                      |
| 서열 번호: | 38 | 경쇄 CDR-L3    | CNT0888                   | HQYIQLHSFT                                                                                                                   |
| 서열 번호: | 39 | 중쇄 가변 도메인 VH | CNT0888                   | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYGISWVRQAPGQ<br>GLEWMGGIIPIFGTANYAQKFGGRVTITADESTSTAYMELSSL<br>RSEDTAVVYCARYDGIYGELDFWGQGLTVSS |
| 서열 번호: | 40 | 경쇄 가변 도메인 VL | CNT0888                   | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSDAYLAWYQKPGQ<br>APRLLIYDASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAV<br>YYCHQYIQLHSFTFGQGTKEIK          |
| 서열 번호: | 41 | 중쇄 CDR-H1    | 인 간 화<br>11K2<br>(= 11K2) | DTYMH                                                                                                                        |
| 서열 번호: | 42 | 중쇄 CDR-H2    | 인 간 화<br>11K2<br>(= 11K2) | RIDPANGNTKFDPKFGG                                                                                                            |
| 서열 번호: | 43 | 중쇄 CDR-H3    | 인 간 화<br>11K2<br>(= 11K2) | GVFGFFDY                                                                                                                     |
| 서열 번호: | 44 | 경쇄 CDR-L1    | 인 간 화<br>11K2<br>(= 11K2) | KATEDIYNRLA                                                                                                                  |
| 서열 번호: | 45 | 경쇄 CDR-L2    | 인 간 화<br>11K2<br>(= 11K2) | GATSLET                                                                                                                      |
| 서열 번호: | 46 | 경쇄 CDR-L3    | 인 간 화<br>11K2<br>(= 11K2) | QQFWSAPYT                                                                                                                    |
| 서열 번호: | 47 | 중쇄 가변 도메인 VH | 인 간 화<br>11K2<br>(= 11K2) | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGLTISDTYMHWRQAPGQ<br>GLEWMGRIDPANGNTKFDPKFGGRVTITADTSTSTAYMELSSL<br>RSEDTAVVYCARGVFGFFDYWGQGTITVSS   |
| 서열 번호: | 48 | 경쇄 가변 도메인 VL | 인 간 화<br>11K2<br>(= 11K2) | DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKATEDIYNRLAWYQKPGKA<br>PKLLISGATSLETGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATY<br>YQQQFWSAPYTRGGGTKEIK              |

[0805]

[0806] CDR 변형된 항-CCL2 항원 결합 모이어티 (가변 영역 및 초가변 영역 (CDR)):

[0807] 변형된 CNT0888

|        |    |              |                         |                                                                                                                                                       |
|--------|----|--------------|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 서열 번호: | 57 | 중쇄 CDR-H1    | 돌연변이된 변이체 CNT0888       | SHYGXS (여기서 X는 I 또는 T이다)                                                                                                                              |
| 서열 번호: | 58 | 중쇄 CDR-H2    | 돌연변이된 변이체 CNT0888       | GX <sup>1</sup> IX <sup>2</sup> IFX <sup>3</sup> TANYAQKFQG (여기서 X <sup>1</sup> 은 V, I, 또는 H이고, X <sup>2</sup> 는 P 또는 H이고, X <sup>3</sup> 은 H 또는 G이다) |
| 서열 번호: | 59 | 중쇄 CDR-H3    | 돌연변이된 변이체 CNT0888       | YDAHYGELDF                                                                                                                                            |
| 서열 번호: | 60 | 경쇄 CDR-L1    | 돌연변이된 변이체 CNT0888       | RASQHVSDAYLA                                                                                                                                          |
| 서열 번호: | 61 | 경쇄 CDR-L2    | 돌연변이된 변이체 CNT0888       | DASDRAE                                                                                                                                               |
| 서열 번호: | 62 | 경쇄 CDR-L3    | 돌연변이된 변이체 CNT0888       | HQV1HLHSFT                                                                                                                                            |
| 서열 번호: | 63 | 중쇄 FR-H1     | 돌연변이된 변이체 CNT0888       | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTF                                                                                                                          |
| 서열 번호: | 64 | 중쇄 FR-H2     | 돌연변이된 변이체 CNT0888       | WVRQAPGQGLEWMG                                                                                                                                        |
| 서열 번호: | 65 | 중쇄 FR-H3     | 돌연변이된 변이체 CNT0888       | RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR                                                                                                                      |
| 서열 번호: | 66 | 중쇄 FR-H4     | 돌연변이된 변이체 CNT0888       | WGQGTLLTVSS                                                                                                                                           |
| 서열 번호: | 67 | 경쇄 FR-L1     | 돌연변이된 변이체 CNT0888       | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC                                                                                                                               |
| 서열 번호: | 68 | 경쇄 FR-L2     | 돌연변이된 변이체 CNT0888       | WYQQKPGQAPRLIY                                                                                                                                        |
| 서열 번호: | 69 | 경쇄 FR-L3     | 돌연변이된 변이체 CNT0888       | GVPARFSGSGGTDFLTLTSSLEPEDFAVYYC                                                                                                                       |
| 서열 번호: | 70 | 경쇄 FR-L4     | 돌연변이된 변이체 CNT0888       | QGQTKVEIK                                                                                                                                             |
| 서열 번호: | 71 | 중쇄 가변 도메인 VH | 돌연변이된 변이체 CNT0888 H0695 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSHYGISWVRQA PGQGLEWMGGV I P I PHTANYAQKFQGRVT I TADESTSTAY MELSSLRSEDVAVYYCARYDAHYGELDFWGQGTLLTVSS                        |
| 서열 번호: | 72 | 중쇄 가변 도메인 VH | 돌연변이된 변이체 CNT0888 H0625 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSHYGISWVRQA PGQGLEWMGG I I H I PHTANYAQKFQGRVT I TADESTSTAY MELSSLRSEDVAVYYCARYDAHYGELDFWGQGTLLTVSS                       |
| 서열 번호: | 73 | 중쇄 가변 도메인 VH | 돌연변이된 변이체 CNT0888 H0634 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSHYGTSWVRQA PGQGLEWMGG I I H I PGTANYAQKFQGRVT I TADESTSTAY MELSSLRSEDVAVYYCARYDAHYGELDFWGQGTLLTVSS                       |
| 서열 번호: | 74 | 중쇄 가변 도메인 VH | 돌연변이된 변이체 CNT0888 H0635 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSHYGISWVRQA PGQGLEWMGGH I H I PGTANYAQKFQGRVT I TADESTSTAY MELSSLRSEDVAVYYCARYDAHYGELDFWGQGTLLTVSS                        |
| 서열 번호: | 75 | 경쇄 가변 도메인 VL | 돌연변이된 변이체 CNT0888 L0616 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQHVSDAYLAWYQQK PGQAPRLIYDASDRAGVGPARGSGSGGTDFLTLTSSLE PEDFAVYYCHQV I H LHSFTFGQGTKEIK                                       |

[0808]

[0809] 변형된 인간화 11K2

|        |    |                  |                                |                                                                                                                            |
|--------|----|------------------|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 서열 번호: | 76 | 중쇄 CDR-H1        | 돌연변이된 변<br>종 인간화 11K2          | HTVMH                                                                                                                      |
| 서열 번호: | 77 | 중쇄 CDR-H2        | 돌연변이된 변<br>종 인간화 11K2          | RIDPXNHNTKFDPKFQG (여기서 X는 D 또는 E이다)                                                                                        |
| 서열 번호: | 78 | 중쇄 CDR-H3        | 돌연변이된 변<br>종 인간화 11K2          | GVGFQFXH (여기서 X는 D 또는 E이다)                                                                                                 |
| 서열 번호: | 79 | 경쇄 CDR-L1        | 돌연변이된 변<br>종 인간화 11K2          | KAX <sup>1</sup> EDIYNRX <sup>2</sup> A (여기서 X <sup>1</sup> 은 F 또는 T이고, X <sup>2</sup> 는 R 또는 L이다)                         |
| 서열 번호: | 80 | 경쇄 CDR-L2        | 돌연변이된 변<br>종 인간화 11K2          | GATSLRH                                                                                                                    |
| 서열 번호: | 81 | 경쇄 CDR-L3        | 돌연변이된 변<br>종 인간화 11K2          | QQFXSAPYT (여기서 X는 W 또는 R이다)                                                                                                |
| 서열 번호: | 82 | 중쇄 FR-H1         | 돌연변이된 변<br>종 인간화 11K2          | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGLTIS                                                                                              |
| 서열 번호: | 83 | 중쇄 FR-H2         | 돌연변이된 변<br>종 인간화 11K2          | WVRQAPGQGLEWMG                                                                                                             |
| 서열 번호: | 84 | 중쇄 FR-H3         | 돌연변이된 변<br>종 인간화 11K2          | RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDAVYYCAR                                                                                            |
| 서열 번호: | 85 | 중쇄 FR-H4         | 돌연변이된 변<br>종 인간화 11K2          | WGQGTITVYSS                                                                                                                |
| 서열 번호: | 86 | 경쇄 FR-L1         | 돌연변이된 변<br>종 11K2              | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC                                                                                                     |
| 서열 번호: | 87 | 경쇄 FR-L2         | 돌연변이된 변<br>종 인간화 11K2          | WYQQKPGKAPKLLIH                                                                                                            |
| 서열 번호: | 88 | 경쇄 FR-L3         | 돌연변이된 변<br>종 인간화 11K2          | GVPSRFGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYC                                                                                             |
| 서열 번호: | 89 | 경쇄 FR-L4         | 돌연변이된 변<br>종 인간화 11K2          | FGGGTKVEIK                                                                                                                 |
| 서열 번호: | 90 | 중쇄 가변 도메<br>인 VH | 돌연변이된 변<br>종 인간화 11K2<br>H1503 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGLTISHTYMHVVRQA<br>PGQGLEWMGRIDPDHNTKFDPKFQGRVTITADTSTSTAY<br>MELSSLRSEDAVYYCARGVGFGRFDHWGGGTTVYSS |
| 서열 번호: | 91 | 중쇄 가변 도메<br>인 VH | 돌연변이된 변<br>종 인간화 11K2<br>H1510 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGLTISHTYMHVVRQA<br>PGQGLEWMGRIDPDHNTKFDPKFQGRVTITADTSTSTAY<br>MELSSLRSEDAVYYCARGVGFGRFDHWGGGTTVYSS |
| 서열 번호: | 92 | 중쇄 가변 도메<br>인 VH | 돌연변이된 변<br>종 인간화 11K2<br>H1514 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGLTISHTYMHVVRQA<br>PGQGLEWMGRIDPDHNTKFDPKFQGRVTITADTSTSTAY<br>MELSSLRSEDAVYYCARGVGFGRFDHWGGGTTVYSS |
| 서열 번호: | 93 | 경쇄 가변 도메<br>인 VL | 돌연변이된 변<br>종 인간화 11K2<br>L1338 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKAFEDIYNRRWYQQKP<br>GKAPKLLIHGATSLRHGVPSRFGSGSGTDYTLTISLQ<br>EDFATYYCQQFWAPYTFGGGTKEIK               |
| 서열 번호: | 94 | 경쇄 가변 도메<br>인 VL | 돌연변이된 변<br>종 인간화 11K2<br>L1201 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKATEDIYNRLAWYQQKP<br>GKAPKLLIHGATSLRHGVPSRFGSGSGTDYTLTISLQ<br>EDFATYYCQQFRSAPYTFGGGTKEIK             |

[0810]

[0811] 예시적인 불변 경쇄 영역:

[0812] 서열 번호: 95 예시적인 인간 카파 경쇄 불변 영역

[0813] 서열 번호: 96 예시적인 인간 람다 경쇄 불변 영역

[0814] 예시적인 불변 중쇄 영역:

[0815] 서열 번호: 97 IgG1로부터 유래된 예시적인 인간 중쇄 불변 영역

[0816] 서열 번호: 98 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G를 갖는 IgG1로부터 유래된 예시적인 인간 중쇄 불변 영역 (Fc감  
마 수용체 침묵됨)

[0817] 서열 번호: 99 IgG1로부터 유래된 예시적인 인간 중쇄 불변 영역 (SG1 -IgG1 알로타입)

[0818] 서열 번호: 100 돌연변이를 갖는 IgG1로부터 유래된 예시적인 인간 중쇄 불변 영역 (SG105-IgG1 알로타입 - Fc  
감마 수용체 침묵됨)

[0819] 서열 번호: 101 SG1095 - 아래의 돌연변이 (Kabat EU 넘버링)를 포함하는 IgG1로부터 유래된 예시적인 인간 중  
쇄 불변 영역:

[0820] -L235W/G236N/H268D/Q295L/A330K/K326T (인간 FcγRIIb에 대한 친화성을 증가시키고 다른 인간 FcγR에 대한 친  
화성을 감소시키는 데 적합함);

[0821] -Q311R/P343R (항원의 흡수를 향상시키기 위해 등전점 (pI)을 증가시키는 데 적합함;

[0822] -N434A (항체의 더 긴 혈장 반감기를 위해 FcRn에 대한 친화성을 증가시키는 데 적합함; 그리고

- [0823] -Q438R/S440E (류마티스 인자 결합을 억제하는 데 적합함)
- [0824] 서열 번호: 102 SG1099 - 아래의 돌연변이 (Kabat EU 넘버링)를 포함하는 IgG1로부터 유래된 예시적인 인간 중쇄 불변 영역:
- [0825] Q311R/P343R (항원의 흡수를 향상시키기 위해 pI를 증가시키는 데 적합함)
- [0826] 서열 번호: 103 SG1100 - 아래의 돌연변이 (Kabat EU 넘버링)를 포함하는 IgG1로부터 유래된 예시적인 인간 중쇄 불변 영역:
- [0827] -Q311R/P343R (항원의 흡수를 향상시키기 위해 pI를 증가시키는 데 적합함);
- [0828] -N434A (항체의 더 긴 혈장 반감기를 위해 FcRn에 대한 친화성을 증가시키는 데 적합함); 그리고
- [0829] -Q438R/S440E (류마티스 인자 결합을 억제하는 데 적합함)
- [0830] CNT0888//11K2-WT IgG1 (예시적인 이중특이적 CNT0888//11K2-WT IgG1 Crossmab)
- [0831] 서열 번호: 104 중쇄 1- CNT0888//11K2-WT IgG1
- [0832] 서열 번호: 105 중쇄 2- CNT0888//11K2-WT IgG1
- [0833] 서열 번호: 106 경쇄 1- CNT0888//11K2-WT IgG1
- [0834] 서열 번호: 107 경쇄 2- CNT0888//11K2-WT IgG1
- [0835] CKL02 - IgG1 (예시적인 이중특이적 CKL02 IgG1 Crossmab)
- [0836] 서열 번호: 108 중쇄 1- CKL02 IgG1
- [0837] 서열 번호: 109 중쇄 2- CKL02 IgG1
- [0838] 서열 번호: 110 경쇄 1- CKL02 IgG1
- [0839] 서열 번호: 111 경쇄 2- CKL02 IgG1
- [0840] CKL02 - SG1095 (= **P1AD8325**) (SG1095 Fc 돌연변이를 포함하는 예시적인 이중특이적 CLOK2 Crossmab)
- [0841] 서열 번호: 112 중쇄 1- CKL02 - SG1095
- [0842] 서열 번호: 113 중쇄 2- CKL02 - SG1095
- [0843] 서열 번호: 114 경쇄 1- CKL02 - SG1095
- [0844] 서열 번호: 115 경쇄 2- CKL02 - SG1095
- [0845] CKL02 - SG1099 (SG1099 Fc 돌연변이를 포함하는 예시적인 이중특이적 CKL02 Crossmab)
- [0846] 서열 번호: 116 중쇄 1- CKL02 - SG1099
- [0847] 서열 번호: 117 중쇄 2- CKL02 - SG1099
- [0848] 서열 번호: 118 경쇄 1- CKL02 - SG1099
- [0849] 서열 번호: 119 경쇄 2- CKL02 - SG1099
- [0850] CKL02 - SG1100 (SG1100 Fc 돌연변이를 포함하는 예시적인 이중특이적 CKL02 Crossmab)
- [0851] 서열 번호: 120 중쇄 1- CKL02 - SG1100
- [0852] 서열 번호: 121 중쇄 2- CKL02 - SG1100
- [0853] 서열 번호: 122 경쇄 1- CKL02 - SG1100
- [0854] 서열 번호: 123 경쇄 2- CKL02 - SG1100
- [0855] CKL03 - SG1095 (SG1095 Fc 돌연변이를 포함하는 예시적인 이중특이적 CLOK3 Crossmab)
- [0856] 서열 번호: 124 중쇄 1- CKL03 - SG1095

- [0857] 서열 번호: 125 중쇄 2- CKL03 - SG1095
- [0858] 서열 번호: 126 경쇄 1- CKL03 - SG1095
- [0859] 서열 번호: 127 경쇄 2- CKL03 - SG1095
- [0860] CKL03 - SG1099 (SG1099 Fc 돌연변이를 포함하는 예시적인 이중특이적 CKL03 Crossmab)
- [0861] 서열 번호: 128 중쇄 1- CKL03 - SG1099
- [0862] 서열 번호: 129 중쇄 2- CKL03 - SG1099
- [0863] 서열 번호: 130 경쇄 1- CKL03 - SG1099
- [0864] 서열 번호: 131 경쇄 2- CKL03 - SG1099
- [0865] CKL03 - SG1100 (SG1100 Fc 돌연변이를 포함하는 예시적인 이중특이적 CKL03 Crossmab)
- [0866] 서열 번호: 132 중쇄 1- CKL03 - SG1100
- [0867] 서열 번호: 133 중쇄 2- CKL03 - SG1100
- [0868] 서열 번호: 134 경쇄 1- CKL03- SG1100
- [0869] 서열 번호: 135 경쇄 2- CKL03 - SG1100
- [0870] 추가항-CCL2 항원 결합 모이어티:
- [0871] 서열 번호: 136 중쇄 가변 도메인 VH 2F2
- [0872] 서열 번호: 137 경쇄 가변 도메인 VL 2F2
- [0873] 서열 번호: 138 중쇄 가변 도메인 VH 무린 11K2 (=11K2m)
- [0874] 서열 번호: 139 경쇄 가변 도메인 VL 무린 11K2 (=11K2m)
- [0875] 서열 번호: 140 중쇄 가변 도메인 VH 1H11
- [0876] 서열 번호: 141 경쇄 가변 도메인 VL 1H11
- [0877] 예시적인 CCL2 및 동족체 (신호 펩티드가 없음):
- [0878] 서열 번호: 142 예시적인 인간 CCL2 (MCP1) - 야생형 (wt)
- [0879] 서열 번호: 143 예시적인 인간 CCL2 (MCP1) - P8A 변이체
- [0880] 서열 번호: 144 예시적인 인간 CCL2 (MCP1) - T10C 변이체
- [0881] 서열 번호: 145 예시적인 인간 CCL8 (MCP2) - 야생형 (wt)
- [0882] 서열 번호: 146 예시적인 인간 CCL8 (MCP2) - P8A 변이체
- [0883] 서열 번호: 147 예시적인 인간 CCL7 (MCP3) - 야생형 (wt)
- [0884] 서열 번호: 148 예시적인 인간 CCL13 (MCP4)- 야생형 (wt)
- [0885] 서열 번호: 149 예시적인 시노물구스 CCL2 - 야생형 (wt)
- [0886] 서열 번호: 150 예시적인 생쥐 CCL2- 야생형 (wt)
- [0887] 다른 예시적인 불변 중쇄 영역:
- [0888] 서열 번호: 151 GG01 - 아래의 돌연변이 (Kabat EU 넘버링)를 포함하는 IgG1로부터 유래된 예시적인 인간 중쇄 불변 영역:
- [0889] -L234Y/P238D/ T250V/V264I/T307P/A330K (인간 FcγRIIb에 대한 친화성을 증가시키고 다른 인간 FcγR에 대한 친화성을 감소시키는 데 적합함);
- [0890] -Q311R/P343R (항원의 흡수를 향상시키기 위해 등전점 (pI)을 증가시키는 데 적합함);

- [0891] -N434A (항체의 더 긴 혈장 반감기를 위해 FcRn에 대한 친화성을 증가시키는 데 적합함); 그리고
- [0892] -Q438R/S440E (류마티스 인자 결합을 억제하는 데 적합함)
- [0893] 서열 번호: 152 GG02 - 아래의 돌연변이 (Kabat EU 넘버링)를 포함하는 IgG1로부터 유래된 예시적인 인간 중쇄 불변 영역:
- [0894] -L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K (인간 FcγRIIb에 대한 친화성을 증가시키고 다른 인간 FcγR에 대한 친화성을 감소시키는 데 적합함);
- [0895] -Q311R/P343R (항원의 흡수를 향상시키기 위해 등전점 (pI)을 증가시키는 데 적합함);
- [0896] -M428L/N434A/Y436T (항체의 더 긴 혈장 반감기를 위해 FcRn에 대한 친화성을 증가시키는 데 적합함); 그리고
- [0897] -Q438R/S440E (류마티스 인자 결합을 억제하는 데 적합함)
- [0898] 서열 번호: 153 GG03 - 아래의 돌연변이 (Kabat EU 넘버링)를 포함하는 IgG1 (IgG1 알로타입 서열 포함)로부터 유래된 예시적인 인간 중쇄 불변 영역:
- [0899] -L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K (인간 FcγRIIb에 대한 친화성을 증가시키고 다른 인간 FcγR에 대한 친화성을 감소시키는 데 적합함);
- [0900] -Q311R/P343R (항원의 흡수를 향상시키기 위해 등전점 (pI)을 증가시키는 데 적합함);
- [0901] -N434A (항체의 더 긴 혈장 반감기를 위해 FcRn에 대한 친화성을 증가시키는 데 적합함); 그리고
- [0902] -Q438R/S440E (류마티스 인자 결합을 억제하는 데 적합함)
- [0903] 서열 번호: 154 GG04 -아래의 돌연변이 (Kabat EU 넘버링)를 포함하는 IgG1 (IgG1 알로타입 서열 포함)로부터 유래된 예시적인 인간 중쇄 불변 영역:
- [0904] -L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K (인간 FcγRIIb에 대한 친화성을 증가시키고 다른 인간 FcγR에 대한 친화성을 감소시키는 데 적합함);
- [0905] -Q311R/P343R (항원의 흡수를 향상시키기 위해 등전점 (pI)을 증가시키는 데 적합함);
- [0906] -M428L/N434A/Y436T (항체의 더 긴 혈장 반감기를 위해 FcRn에 대한 친화성을 증가시키는 데 적합함); 그리고
- [0907] -Q438R/S440E (류마티스 인자 결합을 억제하는 데 적합함)
- [0908] CKL02 - GG01 (= **P1AF8137**) (GG01 Fc 돌연변이를 포함하는 예시적인 이중특이적 CLOK2 Crossmab)
- [0909] 서열 번호: 155 중쇄 1- CKL02 - GG01
- [0910] 서열 번호: 156 중쇄 2- CKL02 - GG01
- [0911] 서열 번호: 157 경쇄 1- CKL02 - GG01
- [0912] 서열 번호: 158 경쇄 2- CKL02 - GG01
- [0913] CKL02 - GG02 (= **P1AF8139**) (GG02 Fc 돌연변이를 포함하는 예시적인 이중특이적 CLOK2 Crossmab)
- [0914] 서열 번호: 159 중쇄 1- CKL02 GG02
- [0915] 서열 번호: 160 중쇄 2- CKL02 GG02
- [0916] 서열 번호: 161 경쇄 1- CKL02 GG02
- [0917] 서열 번호: 162 경쇄 2- CKL02 GG02
- [0918] CKL02 - GG03 (GG03 Fc 돌연변이를 포함하는 예시적인 이중특이적 CLOK2 Crossmab)
- [0919] 서열 번호: 163 중쇄 1- CKL02 - GG03
- [0920] 서열 번호: 164 중쇄 2- CKL02 - GG03
- [0921] 서열 번호: 165 경쇄 1- CKL02 - GG03

- [0922] 서열 번호: 166 경쇄 2- CKL02 - GG03
- [0923] CKL02 - GG04 (GG04 Fc 돌연변이를 포함하는 예시적인 이중특이적 CKL02 Crossmab)
- [0924] 서열 번호: 167 중쇄 1- CKL02 - GG04
- [0925] 서열 번호: 168 중쇄 2- CKL02 - GG04
- [0926] 서열 번호: 169 경쇄 1- CKL02 - GG04
- [0927] 서열 번호: 170 경쇄 2- CKL02 - GG04
- [0928] CKL02 - GG03/GG04 (= **P1AF8140**) (노브 사슬에 GG03 Fc 돌연변이를 포함하고 홀 사슬에 GG04 Fc 돌연변이를 포함하는 예시적인 이중특이적 CKL02 Crossmab)
- [0929] 서열 번호: 171 중쇄 1- CKL02 - GG03/GG04
- [0930] 서열 번호: 172 중쇄 2- CKL02 - GG03/GG04
- [0931] 서열 번호: 173 경쇄 1- CKL02 - GG03/GG04
- [0932] 서열 번호: 174 경쇄 2- CKL02 - GG03/GG04
- [0933] **P1AF8142** (CKL02 - CB- SG1095) - (SG1095 Fc 돌연변이를 포함하는 단지 2개의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 예시적인 이중특이적 CKL02 콘토르스바디 (CB))
- [0934] 서열 번호: 175 폴리펩티드 사슬 1- CKL02 - CB- SG1095
- [0935] 서열 번호: 176 폴리펩티드 사슬 2- CKL02 - CB- SG1095
- [0936] **P1AF8143** (CKL02 - CB- GG02) - (GG02 Fc 돌연변이를 포함하는 단지 2개의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 예시적인 이중특이적 CKL02 콘토르스바디 (CB))
- [0937] 서열 번호: 177 폴리펩티드 사슬 1- CKL02 - CB- GG02
- [0938] 서열 번호: 178 폴리펩티드 사슬 2- CKL02 - CB- GG02
- [0939] **P1AG5853** (CKL02 - CB- GG02-K447G) - (GG02 Fc 돌연변이 및 돌연변이 K447G를 포함하는 단지 2개의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 예시적인 이중특이적 CKL02 콘토르스바디 (CB))
- [0940] 서열 번호: 179 폴리펩티드 사슬 1- CKL02 - CB- GG02-KG
- [0941] 서열 번호: 180 폴리펩티드 사슬 2- CKL02 - CB- GG02-KG
- [0942] **P1AG8317** (CKL02 - CB- SG1095-K447G) - (SG1095 Fc 돌연변이 및 돌연변이 K447G를 포함하는 단지 2개의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 예시적인 이중특이적 CKL02 콘토르스바디 (CB))
- [0943] 서열 번호: 181 폴리펩티드 사슬 1- CKL02 - CB- SG1095-KG
- [0944] 서열 번호: 182 폴리펩티드 사슬 2- CKL02 - CB- SG1095-KG
- [0945] 10개 아미노산의 길이를 갖는 예시적인 글리신-세린 폴리펩티드 링커:
- [0946] 서열 번호: 183 폴리펩티드 링커 GSGGSGGSGG
- [0947] 서열 번호: 184 폴리펩티드 링커 GSGGSGGGG
- [0948] 서열 번호: 185 폴리펩티드 링커 GSGGGSGGG
- [0949] 서열 번호: 186 폴리펩티드 링커 GSGGSGGGG
- [0950] 서열 번호: 187 폴리펩티드 링커 GSGGGSGGG
- [0951] 서열 번호: 188 폴리펩티드 링커 GSGGGSGGG
- [0952] 서열 번호: 189 폴리펩티드 링커 GGGSGGSGGG
- [0953] 서열 번호: 190 폴리펩티드 링커 GGGSGGSGG

[0954] 서열 번호: 191 폴리펩티드 링커 GGGGSGGSGG

[0955] 본원에 설명된 항-CCL2 이중특이적 항체에 이용된 지정 단일특이적 변형되지 않은 항-CCL2 항체/항원 결합 모이 어티

| 항체/항원 결합 부위      | 별명        | VH/VL                |
|------------------|-----------|----------------------|
| 1A4              | CCL2-0008 | 서열 번호: 8/ 서열 번호: 9   |
| 1A5              | CCL2-0009 | 서열 번호: 15/ 서열 번호: 16 |
| 1G9              | CCL2-0010 | 서열 번호: 23/ 서열 번호: 24 |
| 2F6              | CCL2-0014 | 서열 번호: 31/ 서열 번호: 32 |
| CNT0888          | CCL2-0004 | 서열 번호: 39/ 서열 번호: 40 |
| 인간화 11K2 (=11K2) | CCL2-0002 | 서열 번호: 47/ 서열 번호: 48 |
| ABN912           | CCL2-0003 | 서열 번호: 55/ 서열 번호: 56 |

[0956]

[0957] IgG1, 또는 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G (PGLALA)를 포함하는 IgG1 중 어느 하나와의 Crossmab (참조: WO 2016/016299)로서, 변형되지 않은 VH/VL을 갖는 지정 이중특이적 항-CCL2

| 이중특이적 항-CCL2 항체       | 별명        |
|-----------------------|-----------|
| 11K2//1G9-WT IgG1     | CCL2-0049 |
| 11K2//1G9-PGLALA      | CCL2-0043 |
| CNT0888//11K2-WT IgG1 | CCL2-0048 |
| CNT0888//11K2-PGLALA  | CCL2-0042 |
| CNT0888//1G9-WT IgG1  | CCL2-0051 |
| CNT0888//1G9-PGLALA   | CCL2-0045 |
| CNT0888//1A5-WT IgG1  | CCL2-0050 |
| CNT0888//1A5-PGLALA   | CCL2-0044 |
| 1A5//1G9-WT IgG1      | CCL2-0052 |
| 1A5//1G9-PGLALA       | CCL2-0046 |
| 11K2//2F6-WT IgG1     | CCL2-0056 |
| 11K2//2F6-PGLALA      | CCL2-0053 |
| ABN912//11K2-WT IgG1  | CCL2-0047 |
| ABN912//11K2-PGLALA   | CCL2-0041 |
| 1A4//2F6-WT IgG1      | CCL2-0057 |
| 1A4//2F6-PGLALA       | CCL2-0054 |
| 1A5//2F6-WT IgG1      | CCL2-0058 |
| 1A5//2F6-PGLALA       | CCL2-0055 |

[0958]

[0959] Crossmab (참조: WO 2016/016299)로서, 변형된 VH/VL을 갖는 지정 이중특이적 항체, 이용된 중쇄 불변 도메인 (예를 들면 IgG1 야생형, PGLALA, SG1095, SG1099, SG1100, GG01, GG02, GG03, GG04, GG02-KG)에 따라서, 접미 사 IgG1 야생형, PGLALA, SG1095, SG1099, 1100, GG01, GG02, GG03, GG04, GG02-KG)가 추가된다

| 이중특이적 CCL2 항체 (및 부모 단일특이적) | 가변 영역 (VH/VL)의 명칭                              | VH (서열 번호) | VL (서열 번호) | VH (서열 번호) | VL (서열 번호) |
|----------------------------|------------------------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| 인간화 11K2 부모                | 11K2 VH/11K2 VL                                | 47         | 48         | -          | -          |
| CNT0888 부모                 | CNT0888 VH /CNT0888VL                          |            |            | 39         | 40         |
| CKL001                     | 11K2H1503/11K2L1338//CNT0888H0695/CNT0888L0616 | 90         | 93         | 71         | 75         |
| CKL002                     | 11K2H1510/11K2L1338//CNT0888H0695/CNT0888L0616 | 91         | 93         | 71         | 75         |
| CKL003                     | 11K2H1503/11K2L1201//CNT0888H0695/CNT0888L0616 | 90         | 94         | 71         | 75         |
| CKL004                     | 11K2H1503/11K2L1201//CNT0888H0625/CNT0888L0616 | 90         | 94         | 72         | 75         |
| CKL005                     | 11K2H1503/11K2L1338//CNT0888H0634/CNT0888L0616 | 90         | 93         | 73         | 75         |
| CKL006                     | 11K2H1503/11K2L1201//CNT0888H0634/CNT0888L0616 | 90         | 94         | 73         | 75         |
| CKL007                     | 11K2H1514/11K2L1338//CNT0888H0634/CNT0888L0616 | 92         | 93         | 73         | 75         |
| CKL008                     | 11K2H1510/11K2L1338//CNT0888H0634/CNT0888L0616 | 91         | 93         | 73         | 75         |
| CKL009                     | 11K2H1503/11K2L1338//CNT0888H0625/CNT0888L0616 | 90         | 93         | 72         | 75         |
| CKL010                     | 11K2H1514/11K2L1338//CNT0888H0625/CNT0888L0616 | 92         | 93         | 72         | 75         |
| CKL011                     | 11K2H1510/11K2L1338//CNT0888H0625/CNT0888L0616 | 91         | 93         | 72         | 75         |
| CKL012                     | 11K2H1503/11K2L1338//CNT0888H0635/CNT0888L0616 | 90         | 93         | 74         | 75         |
| CKL013                     | 11K2H1503/11K2L1201//CNT0888H0635/CNT0888L0616 | 90         | 94         | 74         | 75         |
| CKL014                     | 11K2H1514/11K2L1338//CNT0888H0635/CNT0888L0616 | 92         | 93         | 74         | 75         |
| CKL015                     | 11K2H1510/11K2L1338//CNT0888H0635/CNT0888L0616 | 91         | 93         | 74         | 75         |
| CKL016                     | 11K2H1514/11K2L1338//CNT0888H0695/CNT0888L0616 | 92         | 93         | 71         | 75         |

[0960]

[0961]

**실시예:**

[0962]

**실시예 A-1 단일특이적 항-CCL2 항체**

[0963]

단일특이적 항-CCL2 항체 및 CCL2 항원의 생성

[0964]

재조합 DNA 기술

[0965]

Sambrook, J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989에 설명된 바와 같은 표준 방법이 DNA를 조작하는 데 이용되었다. 분자 생물학적 시약은 제조업체의 지침에 따라서 이용되었다.

[0966]

유전자 및 올리고뉴클레오타이드 합성

[0967]

원하는 유전자 분절이 Geneart GmbH (Regensburg, Germany)에서 화학적 합성에 의해 제조되었다. 합성된 유전자 단편이 증식/증폭을 위해 대장균 (E. coli) 플라스미드 내로 클로닝되었다. 하위클로닝된 유전자 단편의 DNA 서열이 DNA 염기서열분석에 의해 확인되었다. 대안적으로, 짧은 합성 DNA 단편이 화학적으로 합성된 올리고뉴클레오타이드를 어닐링함으로써 또는 PCR을 통해 조립되었다. 이들 개별 올리고뉴클레오타이드는 metabion GmbH (Planegg-Martinsried, Germany)에 의해 제조되었다.

[0968]

기본/표준 포유류 발현 플라스미드에 관한 설명

[0969]

원하는 유전자/단백질 (예를 들면 전장 항체 중쇄, 전장 항체 경쇄, 또는 CCL-2 분자의 발현을 위해, 아래의 기능적 요소를 포함하는 전사 단위가 이용된다:

[0970]

- 인트론 A를 포함하는 인간 거대세포바이러스 (P-CMV)로부터의 극초기 인핸서 및 프로모터,

- [0971] - 인간 중쇄 면역글로불린 5'-비번역 영역 (5'UTR),
- [0972] - 뮤린 면역글로불린 중쇄 신호 서열,
- [0973] - 발현되는 유전자/단백질 (예를 들면 전장 항체 중쇄 또는 항체 경쇄 또는 CCL-2 분자), 그리고
- [0974] - 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 서열 (BGH pA).
- [0975] 발현되는 원하는 유전자를 포함하는 발현 단위/카세트 이외에, 기본/표준 포유류 발현 플라스미드는
- [0976] 대장균 (E. coli)에서 이러한 플라스미드의 복제를 가능하게 하는, 벡터 pUC18로부터의 복제 기점, 그리고
- [0977] 대장균 (E. coli)에서 암피실린 내성을 부여하는 베타 락타마아제 유전자를 포함한다.
- [0978] **제조합 단일클론 항체 및 CCL-2 분자에 대한 발현 플라스미드의 생성**
- [0979] 단일클론 항체 및 CCL-2 항원의 일시적인 발현을 위한 발현 플라스미드는 개별 발현 카세트 이외에, 대장균 (E. coli)에서 이러한 플라스미드의 복제를 가능하게 하는, 벡터 pUC18로부터 유래된 복제 기점, 그리고 대장균 (E. coli)에서 암피실린 내성을 부여하는 베타 락타마아제 유전자를 포함하였다.
- [0980] 개별 면역글로불린 HC 또는 LC 또는 CCL-2 분자의 전사 단위는 아래의 기능적 요소를 포함하였다:
- [0981] - 인트론 A를 포함하는 인간 거대세포바이러스 (P-CMV)로부터의 극초기 인핸서 및 프로모터,
- [0982] - 인간 중쇄 면역글로불린 5'-비번역 영역 (5'UTR),
- [0983] - 뮤린 면역글로불린 중쇄 신호 서열, 그리고
- [0984] - 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 서열 (BGH pA).
- [0985] **VH와 VL을 기반으로 하는 개별 항체 1A4, 1A5, 1G9, 2F6, CNT0888, 뮤린 및 인간화 11K2, ABN912가 IgG1 야생형으로 및 카파 경쇄가 있는 IgG1 PGLALA/이펙터 침묵 Fc로 생성되었다**
- [0986] **일시적인 발현과 정제**
- [0987] 제조합 생산이, F17 배지 (Invitrogen Corp.)에서 배양된 HEK293 세포 (인간 배아 신장 세포주 293 유래됨)의 일시적인 형질감염에 의해 수행되었다. 단일클론 항체의 생산을 위해, 세포가 개별 면역글로불린 중쇄와 경쇄를 포함하는 플라스미드로 동시형질감염되었다. 형질감염을 위해 "293-펙틴" 형질감염 시약 (Invitrogen)이 이용되었다. 형질감염이 제조업체의 지침에서 특정된 바와 같이 수행되었다. 세포 배양 상층액이 형질감염 후 3 내지 7 (3-7) 일째에 수확되었다. 상층액이 감소된 온도 (예를 들면 -80°C)에서 보관되었다.
- [0988] 예를 들어, HEK293 세포에서 인간 면역글로불린의 제조합 발현에 관한 일반적인 정보는 Meissner, P. et al., Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 197-203에서 제공된다.
- [0989] 항체가 MabSelectSure-Sepharose™ (GE Healthcare, Sweden) 및 Superdex 200 크기 배제 (GE Healthcare, Sweden) 크로마토그래피를 이용한 친화성 크로마토그래피에 의해 세포 배양 상층액으로부터 정제되었다. 간단히 말하면, 멸균 여과된 세포 배양 상층액이 PBS 완충액 (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl 및 2.7 mM KCl, pH 7.4)으로 평형화된 MabSelect SuRe 수지에서 포획되고, 평형 완충액으로 세척되며, pH 3.0에서 25 mM 구연산나트륨으로 용리되었다. 용리된 단백질 분획물이 한 데 모아지고, 2M Tris, pH 9.0으로 중화되며, 20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl, pH 6.0으로 평형화된 Superdex 200 26/60 GL (GE Healthcare, Sweden) 칼럼을 이용한 크기 배제 크로마토그래피에 의해 더욱 정제되었다. 크기 배제 크로마토그래피 분획물이 CE-SDS (Caliper Life Science, USA)에 의해 분석되었고, 그리고 항체 함유 분획물이 한 데 모아지고 -80°C에서 보관되었다.
- [0990] **제조합 CCL2의 생성**
- [0991] 야생형 CCL2는 단량체로 존재할 수 있지만 실제로는 생리학적 농도에서 이합체를 형성할 수도 있다. 이러한 단량체-이량체 평형은 상이할 수 있으며, 상이한 농도가 이용될 수 있을지도 모르는 설명된 모든 시험관내 실험에 대해 신중하게 고려되어야 한다. 임의의 불확실성을 방지하기 위해, 우리는 점 돌연변이된 CCL2 변이체를 생성하였다: CCL2의 P8A 변이체는 정의된, 순수한 CCL2 단량체로 이어지는 이량체를 형성할 수 없게 하는 이량체화 인터페이스에 돌연변이를 보유한다. 대조적으로, CCL2의 T10C 변이체는 CCL2의 고정된 이량체를 야기한다 (J Am Chem Soc. 2013 Mar 20;135(11):4325-32).
- [0992] 개별 가용성 CCL2 단백질 (야생형, P8A 또는 T10C 변이체)은 SP-세파로오스 HP (GE Healthcare, Sweden) 및

Superdex 200 크기 배제 (GE Healthcare, Sweden) 크로마토그래피를 이용하는 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 세포 배양 상층액으로부터 정제되었다. 간단히 말하면, 멸균 여과된 세포 배양 상층액을 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5.0으로 희석하여 전도도 < 4 mS/cm를 조정하였다. 희석된 상층액을 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5.0으로 평형화된 SP-세파로스 수지에 로딩하고, 평형 완충액으로 세척한 후, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1M NaCl, pH 5.0으로의 구배를 이용하여 용리하였다. 용리된 단백질 분획물을 모으고, 20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl, pH 6.0으로 평형화된 Superdex 200 16/60 GL (GE Healthcare, Sweden) 칼럼을 이용하여 크기 배제 크로마토그래피로 추가로 정제하였다. 크기 배제 크로마토그래피 분획물을 SDS-PAGE 및 분석용 고성능 크기 배제 크로마토그래피로 분석하였다. CCL2 함유 분획물을 모아서 -80℃에서 보관하였다.

#### [0993] 기능적 특성화 (결합)

[0994] T200 기기에는 Biacore 시리즈 S 센서 칩 CM5가 장착되었다. 시스템 완충액은 HBS-ET (10 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05% (w/v) P20)이었다. 시스템은 37℃로 설정되었다. 각 측정에 대해 샘플 완충액은 1 mg/ml CMD (카르복시메틸텍스트란, Fluka)가 추가로 보충된 시스템 완충액이었다.

[0995] 항체 포획 시스템이 확립되었다. 14000 GARFc $\gamma$  (염소 항토키 Fc $\gamma$ ), 111-005-046, Jackson ImmunoResearch)를 제조업체에서 설명한 대로 EDC/NHS 커플링을 통해 10 mM 아세트산나트륨 완충액 pH 5.0에 25  $\mu$ g/ml로 25℃에서 고정하였다. 포획 시스템은 HBS 완충액 (100 mM HEPES pH 7.4, 1.5M NaCl, 0.05% (w/v) Tween 20)을 15초 동안 주입하고, 10 mM 글리신 완충액 pH 2.0을 1분 동안 주입한 후, 10 mM 글리신 완충액 pH 2.25를 1분 동안 2회 주입하여 20  $\mu$ l/분으로 재생되었다. 다른 실시형태에서, 12700 RU 다중클론 토키 항생쥐 (RAMIgG, GE Healthcare) 항체를 위에서 설명한 것과 같은 Biacore 시리즈 CM5 센서에 고정함으로써 무린 단일클론 항체를 바이오센서에 포획하였다. 센서는 10 mM 글리신 완충액 pH 1.7을 3분 동안 주입하여 재생되었다.

[0996] 항체 클론 상층액을 시스템 완충액에서 1:2 희석하고 5  $\mu$ l/분으로 1분 동안 포획하였다. 항체 포획 후 시스템을 2.5배 농축 시스템 완충액으로 80  $\mu$ l/분으로 30초 동안 세척한 후 2분 동안 기준선 안정화를 수행하였다. 분석물 동역학은 30  $\mu$ l/분으로 수행되었다. wt 인간 CCL2 또는 단량체성 CCL2 P8A 변이체 CCL2가 용해 상태의 분석물로 이용되었다. 분석물은 90 nM 최고 농도로 주입되었다. 분석물 접촉 시간은 3분이었고, 해리 시간은 10분이었다. Biaevaluation 소프트웨어 V.3.0은 제조업체 GEHC의 지침에 따라 이용되었다. RMAX 로컬을 이용한 1:1 결합 모델을 적용하여 운동 속도를 추정하였다.

#### [0997] 야생형 (wt) 인간 CCL2 및 인간 CCL2 P8A 변이체 (단량체)에 대한 항체의 결합

| 항체                  | 별명        | KD [nM]<br>wt 인간 CCL2 | T1/2 [분] | KD [nM] 단량체<br>성 인간 CCL2 | T1/2 [분] |
|---------------------|-----------|-----------------------|----------|--------------------------|----------|
| 1A4                 | CCL2-0008 | 0.073                 | 100      | 0.059                    | 174      |
| 1A5                 | CCL2-0009 | 0.024                 | 160      | 0.046                    | 137      |
| 1G9                 | CCL2-0010 | 0.062                 | 177      | 0.051                    | 218      |
| 2F6                 | CCL2-0014 | 0.059                 | 52       | 0.091                    | 47       |
| 무린 11K2             | X-0048    | 0.35                  | 19       | 0.011                    | 518      |
| 인간화 11K2<br>(=11K2) | CCL2-0002 | 0.028                 | 118      | 0.035                    | 116      |
| AB912               | CCL2-0003 | 0.036                 | 33       | 0.046                    | 25       |
| CNT0888             | CCL2-0004 | 0.026                 | 94       | 0.054                    | 44       |

#### [0998] SPR 분석 I에서 얻은 pH 의존성 CCL2 결합 동역학 요약

[0999] T200 기기에는 Biacore 시리즈 S 센서 칩 CM5가 장착되었다. 시스템 완충액은 HBS-ET (10 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05% (w/v) P20)이었다. 다른 실시형태에서, 시스템 완충액의 pH는 pH 8.3, pH 7.9,

pH 7.4, pH 7.1, pH 6.7, pH 6.3, pH 5.9, pH 5.5로 설정 되었다. 시스템은 25℃로 설정되었다. 각 측정에 대해 샘플 완충액은 1 mg/ml CMD (카르복시메틸텍스트란, Fluka)가 추가로 보충된 시스템 완충액이었다.

[1001] 항체 포획 시스템이 확립되었다. 13000 MAb<h-Fc-pan>M-R10Z8E9-IgG (Roche)를 제조업체에서 설명한 대로 EDC/NHS 커플링을 통해 10 mM 아세트산나트륨 완충액 pH 5.0에 18 µg/ml로 25℃에서 고정하였다. HBS 완충액 (100 mM HEPES pH 7.4, 1.5M NaCl, 0.05% (w/v) Tween 20)을 20 µl/분으로 주입한 후, 10 mM NaOH를 1분 15초 동안 주입하고 10 mM 글리신 완충액 pH 2.5를 1분 동안 2회 주입하여 포획 시스템을 재생하였다. 포획된 항체를 개별 시스템 완충액에 희석된 80 nM 농도로 10 µl/분으로 30초 동안 주입하였다. 항체 포획 후 시스템을 2.5배 농축 시스템 완충액으로 50 µl/분으로 30초 동안 세척한 후 2분 동안 기준선 안정화를 수행하였다. 농도 의존성 분석물 시리즈는 0 nM (완충액 대조)에서 0.4 nM, 1.1 nM, 3.3 nM, 30 nM에서 2회 주입까지 1:3 희석 단계로 주입되었다. 분석물 접촉 시간은 3분이었고, 해리 시간은 10분이었다. 분석물 동역학은 50 µl/분으로 수행되었다.

[1002] 인간 항체는 센서 표면 상에서 리간드로 포획되었다.

[1003] · 양성 대조로서 인간 정상 IgG (H-N-IgG, Id.: 11717570, Roche),

[1004] · 항인간 CCL2 mAb (인간화 11k2: CCL2-0002),

[1005] · 항인간 CCL2 mAb (AB912, CCL2-0003) 및

[1006] · 항인간 CCL2 mAb (CNT0888, CCL2-0004);

[1007] · 음성 대조로서 시스템 완충액.

[1008] Biaevaluation 소프트웨어 V.3.0은 제조업체 GEHC의 지침에 따라 이용되었다. R<sub>MAX</sub> 로컬을 이용한 1:1 결합 모형을 적용하여 운동 속도를 결정하였다.

|     | 인간화 11K2<br>CCL2-0002 |            | ABN912<br>CCL2-0003 |            | CNT0888<br>CCL2-0004 |            |
|-----|-----------------------|------------|---------------------|------------|----------------------|------------|
| pH  | KD [nM]               | t ½-해리 [분] | KD [nM]             | t ½-해리 [분] | KD [nM]              | t ½-해리 [분] |
| 8.3 | 0.003                 | 1155       | 0.004               | 35         | 0.01                 | 135        |
| 7.9 | 0.02                  | 165        | 0.004               | 25         | 0.01                 | 138        |
| 7.4 | 0.02                  | 163        | 0.01                | 33         | 0.02                 | 130        |
| 7.1 | 0.01                  | 215        | 0.02                | 20         | 0.02                 | 124        |
| 6.7 | 0.01                  | 292        | 0.2                 | 8          | 0.03                 | 103        |
| 6.3 | 0.003                 | 1155       | 1                   | 3          | 0.02                 | 128        |
| 5.9 | 0.01                  | 287        | 13                  | 1          | 0.04                 | 61         |
| 5.5 | 0.01                  | 118        | 2000                | 0.03       | 0.06                 | 31         |

[1009]

[1010] 교차반응성 CCL 동족체

[1011] CCL2 (MCP-1)가 CCL7 (MCP-3), CCL8 (MCP-2), CCL13 (MCP-4)과 높은 상동성을 갖고 이들 CCL 케모킨이 CCR2에 결합할 수 있으므로, 이들 동족체에 대한 항-CCL2 항체의 결합이 평가되었다. 결과는 도 1에 나타나 있다. CCL2에 대해 선택성을 갖는 것으로 기술된 CNT0888 (Mol Immunol. 2012 Jun;51(2):227-33)을 제외하고, 검사된 다른 항체는 CCL7 또는 CCL8 중 어느 하나에 결합하였다 (CCL7 또는 CCL8 중 어느 하나에 교차반응성을 나타냈

다).

[1012] Biacore 분석 방법: CCL 동족체, 예를 들면 CCL2 (MCP-1), CCL8 (MCP-2), CCL7 (MCP-3) 및 CCL13 (MCP-4))에 대한 항-CCL2 항체의 결합을 Biacore T200 기기 (GE Healthcare)를 이용하여 25℃에서 평가하였다. 제조업체가 권장하는 설정에 따라 아민 커플링 키트 (GE Healthcare)를 이용하여 생쥐 항인간 IgG (Fc) (GE Healthcare)를 CM4 센서 칩의 각 흐름 셀에 고정하였다. 항체 및 분석물을 ACES pH 7.4 완충액 (20 mM ACES, 150 mM NaCl, 1 mg/ml BSA, 0.05% Tween 20, 0.005% NaN<sub>3</sub>)으로 희석하였다. 항체를 항-Fc 센서 표면에 포획한 다음, 재조합 인간 CCL 동족체 단백질을 흐름 셀 위로 5 nM 및 20 nM로 주입하였다. 야생형 CCL2 (MCP-1), CCL8 (MCP-2), CCL7 (MCP-3) 및 CCL13 (MCP-4)은 R&D Systems에서 시판되는 반면, 단량체 CCL2 (P8A 변이체)는 사내 생성 항원이었다. 센서 표면은 각 주기마다 3M MgCl<sub>2</sub>로 재생되었다. 결합 센서그램은 Biacore T200 평가 소프트웨어 버전 2.0 (GE Healthcare)을 이용하여 처리되었다.

[1013] **기능적 특성화 (생물학적)**

[1014] **CCR2 신호전달 I - 칼슘 플럭스 분석**

[1015] THP-1 (인간 급성 단핵구 백혈병 세포주; ATCC TIB-202) 세포를 RPMI 1640, 10% FBS, 1 mM 피루브산나트륨, 10 mM HEPES, 50 μM β-메르캅토에탄올 (공급업체 Thermo Fisher Scientific)에서 배양하였다. 분석 당일에 세포 밀도를 25.8 ml 분석 배지 (FBS가 없는 RPMI 1640)에서  $8.33 \times 10^5$  개 세포/ml로 조정하였다. FLIPR® Calcium Calcium 4 Assay Kit, Cat# R8142,

[1016] 제조업체 Molecular Devices의 지침에 따라 성분 A의 두 바이알을 성분 B (HBSS 완충액 + 20 mM HEPES, pH 7.4) 20 ml와 혼합하여 염료 로딩 용액을 제조하였다. 516 μl 1M Hepes (최종 분석 농도: 10 mM)를 첨가한 다음 516 μl 250 mM 프로베네시드 (최종 분석 농도: 2.5 mM)를 첨가한다. 스톱 용액의 경우 65.4 mg 프로베네시드 (Sigma P8761)를 465 μl 1 N NaOH에 용해시키고 465 μl 1x HBSS (Thermo Fisher Scientific)를 첨가한다. 25.8 ml 로딩 완충액을 예를 들면 4개의 마이크로영가 평판 (52.6 ml 용적이 필요함;  $10^6$  THP-1/ml)에 충분한 세포를 갖는 25.8 ml 분석 배지와 혼합하였다. 로딩 완충액 중 120 μl 세포 현탁액을 검은색 F 바닥 96-웰 세포 배양 평판의 각 웰로 이전하였다. 평판을 실온에서 3 - 4시간 동안 인큐베이션하였다.

[1017] 그 사이에 항체 및 리간드 용액을 준비하였다. 30 μg/ml에서 0.025 μg/ml (연속 희석 없음, 웰의 최종 농도) 까지 각 항체의 8가지 농도가 검사되었다. 각 농도는 두 개의 평판에서 검사되었다. 모든 희석액은 분석 배지에서 10배 농축 용액으로 제조되었다. 참조 항체로서 인간 CCL2/JE/MCP-1 항체 (R&D Systems Cat# MAB279)를 이용하였다. 리간드 CCL2 (R&D Systems Cat#279-MC-10)는 50 μg CCL2 동결건조물을 500 μl RPMI 1640 (100 μg/ml)에 용해시키고 400 μl를 10ml 분석 배지 (4 μg/ml 스톱 용액)에 이전하여 준비하였다. 자극 대조로서 이오노마이신 (Sigma Cat# I-0634)을 이용하였다 (1 mg 이오노마이신을 1340 μl DMSO (Sigma Cat# D-8779)에 용해, 1 mM). 1 mM 스톱 용액 10 μl를 1990 μl 분석 배지 (5 μM, 최종 분석 농도 500 nM)에 희석하였다. 100 μl를 폴리프로필렌 MTP의 해당 대조 웰에 피펫팅하였다.

[1018] 항체 희석액 및 CCL2를 두 개의 V자형 폴리프로필렌 96 웰 평판에서 사전 인큐베이션하였다. 4 μg/ml 스톱 용액 CCL2 (최종 400 ng/ml CCL2) 50 μl 및 10배 농축 항체 희석액 50 μl를 웰에 피펫팅하였다. 평판을 실온에서 30 - 60분 동안 인큐베이션하였다.

[1019] 인큐베이션 후, 세포 평판 및 화합물 평판을 FlexStation® 3 (Molecular Devices) 판독 위치로 직접 옮기고 칼슘 분석을 시스템 매뉴얼에 설명된 대로 수행하였다 (여기 485 nm, 방출 525 nm). 판독은 몇 초 간격으로 수행되었다.

[1020] **결과:**

[1021] 표 1: 40 ng/ml PMA와 4 μM 이오노마이신을 양성 대조로서 이용하였다. 표에는 n=2의 EC<sub>50</sub> 평균이 포함된다.

표 1

| 항-CCL2 항체       |           | CCR2 신호전달 억제       |           |
|-----------------|-----------|--------------------|-----------|
| 항체              | 별명        | EC50 [ $\mu$ g/ml] | EC50 [nM] |
| 1A4             | CCL2-0008 | 4.2                | 28.0      |
| 1A5             | CCL2-0009 | 2.2                | 14.6      |
| 1G9             | CCL2-0010 | 2.4                | 16        |
| 2F6             | CCL2-0014 | 8.7                | 3.9       |
| Mab279 (R&D)    | 상업적 참조    | 2.6                | 17.4      |
| 뮤린 11K2 (11K2m) | X-0048    | 4.5                | 30.0      |
| 인간화 11K2 (11K2) | CCL2-0002 | 2.1                | 14.0      |
| AB912           | CCL2-0003 | 1.9                | 12.7      |
| CNT0688         | CCL2-0004 | 2.7                | 18        |

[1022]

[1023]

단핵구에서 발현되는 CCR2 수용체의 CCL2 유발 내재화를 억제하는 항-CCL2 항체의 효능

[1024]

골수 세포에서 리간드 유발 CCR2 내재화를 방지하기 위해 우리는 시험관내 분석을 설정하고 항-CCL2 항체를 특성화하였다. 상용 키트 (Stemcell, 카탈로그 번호 #15068)를 이용하여 자기 분리를 통해 건강한 공여자의 말초 혈액에서 단핵구를 분리하였다. Fc $\gamma$ R의 차단을 위해, 단핵구를 FACS 완충액 (PBS + 0.2%BSA)에서 50분 동안 얼음 위에서 최종 농도 500  $\mu$ g/ml의 정상 인간 IgG (Privigen, CSL Behring)와 함께 사전 인큐베이션하였다. 그런 다음 세포를 10분 동안 원심분리하고 (300xg, 4°C), FACS 완충액으로 한 번 더 세척한 후 얼음 위에 보관하였다. 항-CCL2 항체 희석액 (각각 50  $\mu$ l)을 96 U-바닥 웰 (BD)에서 준비하였다 (4°C 및 37°C에서 병행 접근 방식으로). 단핵구를 분할하고, 배지 (RPMI 1640; 10% FCS; 2 mM L-글루타민)에 재현탁하고, 추가 이용 시까지 각각 4°C 및 37°C에서 인큐베이션하였다. 제조합 CCL2 (50  $\mu$ l; 최종 농도 100 ng/ml)를 4°C와 37°C 둘 모두에서 준비된 항체 희석액 (가변 농도)에 첨가하였다. 100  $\mu$ l 단핵구 현탁액 ( $2 \times 10^5$  개 세포/웰)을 CCL2/항-CCL2 혼합물에 총 용적 200  $\mu$ l로 첨가하고 세포를 4°C 및 37°C에서 1시간 30분 동안 인큐베이션한 후 300xg, 4°C에서 원심분리하였다. 이제부터 모든 단계는 사전 냉각된 완충액을 이용하여 수행되었다: 세포는 250  $\mu$ l FACS 완충액으로 세척되었으며 추가로 세포는 CCR2 수용체에 대해 염색되었다 (표준 FACS 프로토콜에 따라 상업용 CCR2-APC 접합체 또는 적절한 아이소타입 ctrl-APC를 이용함): 분취량이 CD192 (CCR2) APC (BioLegend, #357208, 클론 K036C2/ mIgG2a  $\kappa$ ) 및 적절한 아이소타입 ctrl 항체가 포함된 5  $\mu$ l/ $10^6$  개 세포로 염색되었다: 20  $\mu$ l/ $10^6$  개 세포 mIgG2a  $\kappa$  APC BD Biosciences, #400222, 클론 MOPC-173).

[1025]

그런 다음 FACS Canto II에서 수용체 발현을 분석하고 CCR2 내재화를 다음과 같이 계산하였다.

[1026]

• 내재화 없음: 리간드 (rec. CCL2) 인큐베이션 없이 분석된 세포.

[1027] · 100% 내재화: 이전에 rec. CCL2와 함께 인큐베이션된 세포에서 최대로 감소된 CCR2 발현 수준.

| 항-CCL2 항체    |           | CCR2 내재화 억제        |           |
|--------------|-----------|--------------------|-----------|
| 항체           | 별명        | EC50 [ $\mu$ g/ml] | EC50 [nM] |
| 1A4          | CCL2-0008 | 2.52               | 16.81     |
| 1A5          | CCL2-0009 | 2.37               | 15.77     |
| 1G9          | CCL2-0010 | 2.16               | 14.42     |
| 2F6          | CCL2-0014 | 2.41               | 1.09      |
| 11K2 (뮤린)    | X-0048    | 1.98               | 13.19     |
| AB912        | CCL2-0003 | 1.99               | 13.25     |
| CNT0888      | CCL2-0004 | 2.00               | 13.36     |
| Mab279 (R&D) | 상업적 참조    | 1.98               | 13.22     |

[1028]

[1029] **인간 THP-1 세포에 대한 CCL2 매개 화학주성의 억제**

[1030] CCL2 구배를 향한 CCR2<sup>+</sup> THP1 세포의 이동은 다음과 같이 검사되었다. 단핵구 THP1 세포 (ATCC® TIB-202™)를 FCS 및 L-글루타민으로 보충된 RPMI 1640 배지 (PAN, 카탈로그 번호 #P04-17500)에서 배양하였다. 세포는 일반적으로 이동 분석에 이용하기 전에 2-3회 계대 배양한 후 FSC 함량이 감소된 배지 (10% FCS 대신 1.5%)에서 하룻밤 동안 기아 배양하였다. 세포를 계수하고 10  $\mu$ g/ml 정상 인간 IgG (Invitrogen, 카탈로그 번호 # 12000; Fc $\gamma$ R 차단)와 함께 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다.

[1031] 그 사이에 항-CCL2 항체 (및/또는 대조)를 25 ng/ml rhCCL-2 (R&D Systems, 카탈로그 번호 #279-MC)가 있는 무혈청 배지가 포함된 HTS Transwell 96well 평판 시스템 (Corning, 카탈로그 번호 #3386, 3  $\mu$ m 기공 크기)의 하부 챔버에 첨가하였다. 그런 다음 삼입물 평판을 하부 챔버 평판에 고정하고 위에서 언급한 세포 현탁액 (IgG 블록 포함) 75  $\mu$ l (1.5x10<sup>5</sup> 개 세포)를 5  $\mu$ g/ml 항체/아이스타입과 함께 또는 이것 없이 각 삼입물 내로 첨가하였다. 평판을 덮고 CO2 인큐베이터 (5% CO2)에서 37°C에서 하룻밤 동안 인큐베이션하였다.

[1032] 삼입물 평판을 제거하고 Cell-titer-glo 기질 (Promega, 카탈로그 번호 # G758)을 하부 챔버 평판의 각 웰에 첨가하여 이동된 세포의 생존력을 측정하였다. 300rpm의 진탕기 (커버 평판 밀봉)에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 각 웰 200  $\mu$ l를 Microfluor 블랙 96-웰 평판 (VWR, 카탈로그 번호 # 735-0527)으로 옮기고 발광성을 측정하였다 (발광-판독기 예를 들면 Bio-Tek, Tecan). 배수 변화는 IgG 대조 항체와 항-CCL2 항체를 이용하여 이동된 세포 (Cell Titer Glo, RLU) 수 사이의 비율로 계산되었다. 아래의 표 2에는 조건당 5-10회 반복의 결과가 나타나 있다.

[1033] 표 2

표 2

| 항체              | 별명        | THP1 화학주성<br>[IgG 대조 대비 배수 변화] |
|-----------------|-----------|--------------------------------|
| 1A4             | CCL2-0008 | 4.5                            |
| 1A5             | CCL2-0009 | 3.6                            |
| 1G9             | CCL2-0010 | 0.9                            |
| 2F6             | CCL2-0014 | 6.7                            |
| Mab279 (R&D)    | -         | 3.7                            |
| 뮤린 11K2 (11K2m) | X-0048    | 6.9                            |
| 인간화 11K2 (11K2) | CCL2-0002 | 7.2                            |
| ABN912          | CCL2-0003 | 6.5                            |
| CNT0888         | CCL2-0004 | 4.9                            |

[1034]

[1035]

생쥐에서 단일특이적 (단일파라토프) 항-CCL2 항체를 이용한 인간 CCL2 면역 복합체 스위핑의 평가

[1036]

야생형 인간 CCL2와 면역 복합체를 형성하는 단일파라토프 항체의 능력을 평가하기 위해, 항-CCL2 단일파라토프 항체 (20mg/kg) 및 야생형 인간 CCL2 (0.1mg/kg)로 구성되는 미리 형성된 면역 복합체를 인간 FcRn 유전자도입 생쥐 (B6.Cg-Fcgrt<sup>tm1Dcr</sup>Tg(FCGRT)32Dcr/DcrJ, Jackson Laboratory)의 꼬리 정맥에 10 ml/kg의 단위 용량으로 투여하였다. 투여 5분, 7시간, 1일, 2일, 3일 및 7일 후에 혈액을 채취하였다. 혈액을 즉시 4℃에서 14,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 혈청을 준비하였다. 혈청은 측정 때까지 -80℃ 이하에서 보관하였다. 검사된 단일파라토프 항체는 아래의 표 3에 나열되어 있다. SG1 Fc를 갖는 항체는 야생형과 유사한 Fc 감마 수용체 결합을 갖는 반면, SG105 Fc를 갖는 항체는 Fc 감마 수용체 결합 침묵을 나타낸다.

[1037]

생체내 hCCL2 청소에 대한 각 항-CCL2 단일파라토프 항체의 면역 복합체 스위핑 효과는 도 2에 나타나 있는 바와 같이, 항-CCL2 항체를 Fc 감마 수용체 결합 (SG1, = 무손상 Fc 감마 수용체 결합을 갖는 IgG1 야생형; 실선) 및 Fc 감마 수용체 결합 침묵 항-CCL2 항체 (SG105, = Fc 감마 수용체 결합이 없는 IgG1, 점선)를 비교함으로써 평가되었다. 도 2a 내지 2g는 각각, hCCL2 및 개별 항-CCL2 항체 (2개의 서로 다른 Fc 부분 포함: SG1 = 무손상 Fc 감마 수용체 결합을 갖는 IgG1 야생형 및 SG105 = Fc 감마 수용체 결합이 없는 IgG1)로 구성되는 미리 형성된 면역 복합체를 FcRn 유전자도입 생쥐에 주입한 후 시간의 추이에서 hCCL2의 혈청 농도를 보여준다. 항체 프로파일은 Phoenix 64 (Pharsight/Certara)를 이용하여 비구획 분석으로 분석되었다. AUCinf는 무한대로 외삽된 선형 로그 사다리꼴 규칙에 의해 추정되었다. 청소율 값은 용량/AUCinf로 정의된다. 이러한 청소율 차이는 Fc 감마 수용체 결합을 갖는 항체 (SG1)의 hCCL2 청소율을 Fc 감마 수용체 결합 침묵을 갖는 항체 (SG105)의 hCCL2 청소율로 나누어 계산되는 배수 변화로도 표시된다 (아래의 표 3). 아래 표 3의 데이터는 검사된 모든 단일파라토프 항체에 대해 Fc 감마 수용체 결합 항체 (SG1 = 무손상 Fc 감마 수용체 결합을 갖는 IgG1 야생형)에 의한 인간 CCL2의 청소율이 Fc 감마 수용체 결합 침묵 항체 (SG105, Fc 감마 수용체 결합이 없음)에 의한 청소율과 유사했음을 나타낸다. 이는 검사된 단일파라토프 항체에 의한 CCL2의 면역 복합체 매개 스위핑이 효율적이지 않았음을 시사한다.

[1038]

표 3: 항-CCL2 단일특이적 항체 (20mg/kg) 및 야생형 인간 CCL2 (0.1mg/kg) (IgG1 야생형 (SG1) 또는 IgG1 Fc 수용체 침묵 (SG105) 중 어느 하나)의 미리 형성된 면역 복합체를 투여한 후 야생형 CCL2의 청소율 값

표 3

|               | 청소율<br>(ml/일/kg) | 배수 변화<br>(야생형 IgG1 (SG1) 대<br>Fc 수용체 침묵 IgG1<br>(SG105)) |
|---------------|------------------|----------------------------------------------------------|
| CNT0888-SG1   | 14.05            | 1.60                                                     |
| CNT0888-SG105 | 8.80             |                                                          |
| 11K2-SG1      | 80.60            | 1.69                                                     |
| 11K2-SG105    | 47.83            |                                                          |
| ABN912-SG1    | 67.06            | 0.99                                                     |
| ABN912-SG105  | 67.84            |                                                          |
| 1A4-SG1       | 38.93            | 1.66                                                     |
| 1A4-SG105     | 23.39            |                                                          |
| 1A5-SG1       | 20.08            | 0.95                                                     |
| 1A5-SG105     | 21.14            |                                                          |
| 1G9-SG1       | 14.02            | 0.87                                                     |
| 1G9-SG105     | 16.07            |                                                          |
| 2F6-SG1       | 21.49            | 1.03                                                     |
| 2F6-SG105     | 20.94            |                                                          |

[1039]

[1040] 전기화학발광 (ECL)에 의한 혈청 내 총 인간 CCL2 농도 측정

[1041]

생쥐 혈청 내 총 인간 CCL2의 농도를 ECL로 측정하였다. 3ug/mL 의 항-CCL2 항체 (F7 (Biolegend) 또는 클론 MAB679 (R&D Systems))를 MULTI-ARRAY 96-웰 평판 (Meso Scale Discovery)에 하룻밤 동안 고정한 후 차단 완충액에서 30℃에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 항-CCL2 MAB679는 인간화 11K2, 1A4 또는 1A5 항체를 포함하는 샘플에 대한 포획 항체로 이용되었다. 항-CCL2 클론 5D3-F7은 ABN912, CNT0888, 1G9, 2F6H 항체를 포함하는 샘플에 이용되었다. 인간 CCL2 교정 곡선 샘플, 품질 관리 샘플 및 생쥐 혈청 샘플은 희석 완충액에 희석하고 과량의 약물과 함께 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하여 준비하였다. 그 후 샘플을 항-CCL2 고정 평판에 첨가하고, 세척 전 30℃에서 1시간 동안 결합하도록 허용하였다. 다음으로 SULFO TAG NHS-에스테르 (Meso Scale Discovery) 표지 항인간 Fc (클론: JDC-10, SouthernBiotech)를 첨가하고, 세척 전 평판을 30℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 판독 완충액 T (x4) (Meso Scale Discovery)를 즉시 평판에 첨가하였고, SECTOR Imager 2400 (Meso Scale Discovery)에 의해 신호를 검출하였다. 인간 CCL2 농도는 분석 소프트웨어 SOFTmax PRO (Molecular Devices)를 이용하여 교정 곡선의 반응에 기초하여 계산되었다.

[1042]

효소 결합 면역흡착 분석 (ELISA)을 통한 혈청 내 항-CCL2 항체 농도 측정

[1043]

생쥐 혈청 내 항-CCL2 항체의 농도를 ELISA로 측정하였다. 항인간 IgG 카파-사슬 (Antibody Solutions)을 Nunc MaxiSorp 평판 (Thermofisher)에 분주하고 4℃에서 하룻밤 동안 방치하여 항인간 IgG 고정 평판을 제작하였다. 교정 곡선 및 샘플은 1% 폴링된 생쥐 혈청을 이용하여 준비되었다. 그런 다음, 항인간 IgG 고정 평판에 샘플을 분주하고, 30℃에서 1시간 방치하였다. 이어서, HRP 접합체 (Southern Biotech)를 포함하는 염소 항인간 IgG

(감마-사슬 특이적)를 첨가하여 30℃에서 1시간 동안 반응시켰다. TMB 기질 (Life Technologies)을 기질로 이용하여 발색 반응을 수행하였다. 1N 황산 (Wako)으로 반응을 정지시킨 후, 450 nm에서의 흡광도를 마이크로평판 판독기로 측정하였다. 생쥐 혈장 내 농도는 분석 소프트웨어 SOFTmax PRO (Molecular Devices)를 이용하여 교정 곡선의 흡광도로부터 계산되었다.

[1044] 생쥐에서 단일파라토프 항체를 이용한 내인성 생쥐 CCL2 면역 복합체 스위핑의 평가

[1045] 상기 결과 (검사된 단일파라토프 항체에 의한 CCL2의 면역 복합체 매개 스위핑이 효율적이지 않음을 시사함) 이외에, 추가 평가가 수행되었다.

[1046] 내인성 생쥐 CCL2와 면역 복합체를 형성하고 청소하는 단일파라토프 항체의 능력을 평가하기 위해, 생쥐 교차반응성 11K2 항-CCL2 단일파라토프 항체를 생쥐에 투여하였다. 인간화 11K2H2-SG1 (IgG1 야생형 = Fc 감마 수용체 결합) 또는 인간화 11K2-SG105 (Fc 감마 수용체 결합 침묵) 항체를 20 mg/kg의 단위 용량으로 10 ml/kg의 단위 용량으로 Balb/c 생쥐의 꼬리 정맥에 정맥내 투여하였다. 투여 전, 투여 후 5분, 7시간, 1일, 2일, 3일 및 7일째에 혈액을 수집하였다. 혈액을 즉시 4℃에서 14,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 혈청을 준비하였다. 혈청은 측정 때까지 -80℃ 이하에서 보관하였다.

[1047] 도 3은 생쥐에서 인간화 11K2-SG1 및 11K2-SG105에 대한 혈청 총 생쥐 CCL2 농도의 시간 경과 및 항체-시간 프로필을 보여준다.

[1048] 도 3에서 볼 수 있듯이, 측정된 생쥐 CCL2의 수준은 11K2-SG105 (Fc 감마 수용체 결합 침묵 Fc) 및 11K2-SG1 (IgG1 야생형 =Fc 감마 수용체 결합 Fc) 사이에 차이가 없었다. 이는 주입된 항체에 의한 내인성 생쥐 CCL2의 Fc 감마 수용체 매개 청소가 없거나 거의 없음을 시사한다. 면역 복합체의 항원이 Fc 감마 수용체의 다량체 결합을 통해 비복합체 항원보다 더 빠르게 청소되므로, 이는 11K2 항체가 내인성 생쥐 CCL2와 면역 복합체를 형성할 수 없음을 시사한다.

[1049] 효소 결합 면역흡착 분석 (ELISA)을 통한 생쥐 혈청 내 생쥐 CCL2 농도 측정

[1050] 생쥐 혈청 내 생쥐 CCL2의 농도는 시판되는 생쥐 CCL2 ELISA 키트 (R&D Systems)의 시약을 적용하여 측정되었다. 교정 곡선 샘플의 준비를 제외하고, 제조업체의 프로토콜을 따랐다. 제조업체의 단백질 대신에 정제된 재조합 생쥐 CCL2를 표준품으로 대체하였다. 항체를 주입한 후 채취한 샘플의 경우 교정 곡선 샘플 및 샘플을 주입 항체가 40 마이크로그램/ml의 농도로 스파이킹된 2.5% 생쥐 혈청으로 준비하고 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서 샘플을 항인간 CCL2 고정 평판에 분주하고 30℃에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 생쥐 MCP-1 접합체를 첨가하고 30℃에서 2시간 동안 인큐베이션한 후 기질 및 정지 용액을 첨가하여 검출한다.

[1051] 항체 주입 전 채취한 샘플의 경우 제조업체의 지침에 따라 Mouse MCP-1 Ultra-Sensitive 키트 (Meso Scale Discovery)를 이용하였다. 평판에 첨가하기 전에는 샘플에 항체를 스파이킹하지 않았다.

[1052] 효소 결합 면역흡착 분석 (ELISA)을 통한 혈청 내 항-CCL2 항체 농도 측정

[1053] 생쥐 혈청 내 항-CCL2 항체의 농도를 ELISA로 측정하였다. 항인간 IgG 카파-사슬 (Antibody Solutions)을 Nunc MaxiSorp 평판 (ThermoFisher)에 분주하고 4℃에서 하룻밤 동안 방치하여 항인간 IgG 고정 평판을 제작하였다. 교정 곡선 및 샘플은 1% 폴링된 생쥐 혈청을 이용하여 준비되었다. 그 후, 항인간 IgG 고정 평판에 샘플을 분주하고, 실온에서 1시간 방치하였다. 이어서, 생쥐 항인간 IgG HRP (클론 JDC-10, Southern Biotech)를 첨가하여 실온에서 30분 동안 반응시켰다. ABTS 기질 (KPL)을 기질로 이용하여 발색 반응을 수행하였고, 405 nm에서의 흡광도를 마이크로평판 판독기로 측정하였다. 생쥐 혈장 내 농도는 분석 소프트웨어 SOFTmax PRO (Molecular Devices)를 이용하여 교정 곡선의 흡광도로부터 계산되었다.

[1054] 단일특이적 (단일파라토프) 항-CCL2 항체를 이용한 다양한 생쥐 PK 연구의 결론

[1055] 생쥐 PK 연구 결과를 요약하면, 검사된 단일파라토프 항체 중 어느 것도 순환계에서 CCL2를 효과적으로 청소하지 못하였다. 이러한 데이터는 단일파라토프 항체가 CCL2와 면역 복합체를 형성하여 이를 순환계에서 효율적으로 청소할 수 없음을 시사한다.

[1056] 대조적으로, 아래에 기술된 바와 같이, 2개의 상이한 항원 결합 모이어티/부위를 갖는 이중특이적 항-CCL2 항체 (이중파라토프 항-CCL2 항체)는 CCL2와 면역 복합체를 효율적으로 형성하고 이를 순환계에서 청소할 수 있었다.

[1057] 실시예 B-1

[1058]

**이중특이적 (이중파라토프) 항-CCL2 항체**

[1059]

**인간 CCL2 상에서 2개의 상이한 특정 에피토프에 결합하는 2개의 상이한 항원 결합 모이어티 (파라토프)을 갖는 여러 이중특이적 항-CCL2 항체가 생성되었다**

[1060]

**도입**

[1061]

항원의 단일 결합 또는 교차 연결이 생체내 CCL2 청소에 유의한 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위해, 우리는 이중특이적 CrossMab 기술을 이용하여 CCL2 상에서 2개의 서로 다른 에피토프에 결합하는 2개의 서로 다른 항원 결합 모이어티/부위를 갖는 이중특이적 항-CCL2 항체를 생성하였다 (참조: 예를 들면, WO 2009/080252, WO 2015/150447), WO 2009/080253, WO 2009/080251, WO 2016/016299, Schaefer et al, PNAS, 108 (2011) 1187-1191 및 Klein et al., MAbs 8 (2016) 1010-20) (이중특이적(=이중파라토프) CrossMab). 이들 분자는 먼저 생화학적 및 기능적 특성에 대해 시험관내에서 특성화되었지만 생쥐 동시 주입 연구에서 생체내 CCL2 청소 평가를 위한 도구로도 이용되었다. Fc감마 수용체 (FcγR) 결합 매개 스위핑 (예: Igawa et al, Immunological Reviews 270 (2016) 132-151, WO2012/122011 및 WO2016/098357 및 WO2013/081143에서)을 기반으로 청소 가능성을 평가하기 위해, 우리는 모든 Crossmab을, FcγR에 결합하고 FcγR 이펙터 침묵 분자 (예를 들면 돌연변이 L234A, L235A, P329G (Kabat EU 넘버링)를 갖는 IgG1에 대한 감소된/전폐된 결합을 갖는 변형된 인간 IgG1 불변 사슬을 갖는 야생형 huIgG1로 생성하였다.

[1062]

**적합한 항-CCL2 항체 쌍의 확인- 샌드위치 ELISA에 의한 이중파라토프 항체 팔 선택.**

[1063]

인간 CCL2에 대한 결합에 대해 경쟁하지 않는 항체 쌍을 확인하기 위해 샌드위치 ELISA를 수행하였다. 384-웰 MAXISORP (NUNC) 평판을 7개의 표시된 포획 항체 (팔 1) 1 μg/mL로 코팅하고 2% BSA로 차단하였다. 비오티닐화 (NHS-PEO<sub>4</sub>-비오티민, Pierce) WT 인간 CCL2 (20ng/mL)를 1 μg/mL의 과량의 동일한 7개 항체 (팔 2) 또는 차단 완충액과 함께 섞서 37도에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 혼합물을 차단된 ELISA 평판에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 평판 결합된 CCL2의 검출은 스트렙타비딘 HRP에 이어 TMB One Component 기질 (Lifetech)을 이용하여 수행되었다. 신호 발생은 1N HCl 산 (Wako)에 의해 중지되었다. 경쟁 항체가 없는 웰의 OD는 각 포획 항체에 대한 100% 신호로 설정되었다. CCL2가 첨가되지 않은 블랭크 웰의 OD는 0% 신호로 설정되었다. 양방향에서 CCL2 결합에 대한 강한 경쟁을 나타내지 않은 9개의 항체 쌍을 이중특이적 Crossmab 항체 생성을 위한 후보로 선택하였다.

|        |         | 항체 팔 2 |         |      |     |     |     |     |
|--------|---------|--------|---------|------|-----|-----|-----|-----|
|        |         | ABN912 | CNT0888 | 11K2 | 1A4 | 1A5 | 1G9 | 2F6 |
| 항체 팔 1 | ABN912  |        |         | 선택됨  |     | 선택됨 |     |     |
|        | CNT0888 |        |         | 선택됨  |     |     | 선택됨 |     |
|        | 11K2    |        |         |      |     |     | 선택됨 | 선택됨 |
|        | 1A4     |        |         |      |     |     |     | 선택됨 |
|        | 1A5     |        |         |      |     |     | 선택됨 | 선택됨 |
|        | 1G9     |        |         |      |     |     |     |     |
|        | 2F6     |        |         |      |     |     |     |     |

[1064]

**이중파라토프 항-CCL2 항체 및 면역 복합체의 생성 및 특성화**

[1065]

**이중특이적 CrossMab 형식 재조합 DNA 기술로 이중파라토프 항-CCL2 항체 생성**

[1066]

Sambrook, J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989에 설명된 바와 같은 표준 방법이 DNA를 조작하는 데 이용되었다. 분자 생물학적 시약은 제조업체의 지침에 따라서 이용되었다.

[1067]

[1068] **유전자 및 올리고뉴클레오타이드 합성**

[1069] 원하는 유전자 분절이 Geneart GmbH (Regensburg, Germany)에서 화학적 합성에 의해 제조되었다. 합성된 유전자 단편이 증식/증폭을 위해 대장균 (*E. coli*) 플라스미드 내로 클로닝되었다. 하위클로닝된 유전자 단편의 DNA 서열이 DNA 염기서열분석에 의해 확인되었다. 대안적으로, 짧은 합성 DNA 단편이 화학적으로 합성된 올리고뉴클레오타이드를 어닐링함으로써 또는 PCR을 통해 조립되었다. 이들 개별 올리고뉴클레오타이드는 metabion GmbH (Planegg-Martinsried, Germany)에 의해 제조되었다.

[1070] **기본/표준 포유류 발현 플라스미드에 대한 설명**

[1071] 원하는 유전자/단백질 (예: 항체 중쇄 또는 항체 경쇄)의 발현을 위해 아래의 기능 요소를 포함하는 전사 단위가 이용된다.

- [1072] · 인트론 A를 포함하는 인간 거대세포바이러스 (P-CMV)로부터의 극초기 인핸서 및 프로모터,
- [1073] · 인간 중쇄 면역글로불린 5'-비번역 영역 (5'UTR),
- [1074] · 뮤린 면역글로불린 중쇄 신호 서열,
- [1075] · 발현되는 유전자/단백질 (예: 전장 항체 중쇄 또는 MHC 클래스 I 분자), 그리고
- [1076] · 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 서열 (BGH pA).
- [1077] · 발현되는 원하는 유전자를 포함하는 발현 단위/카세트 이외에, 기본/표준 포유류 발현 플라스미드는
- [1078] · 대장균 (*E. coli*)에서 이러한 플라스미드의 복제를 가능하게 하는, 벡터 pUC18로부터의 복제 기점, 그리고
- [1079] · 대장균 (*E. coli*)에서 암피실린 내성을 부여하는 베타 락타마아제 유전자를 포함한다.

[1080] **제조합 단일클론 항체용 발현 플라스미드 생성**

[1081] 제조합 단일클론 항체 유전자는 개별 면역글로불린 중쇄와 경쇄를 인코딩한다.

[1082] 일시적 발현 단일클론 항체 분자를 위한 발현 플라스미드는 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄 발현 카세트 이외에, 대장균 (*E. coli*)에서 이 플라스미드의 복제를 가능하게 하는 벡터 pUC18로부터의 복제 기점 및 대장균 (*E. coli*)에 암피실린 내성을 부여하는 베타 락타마아제 유전자를 포함한다.

[1083] 개별 항체 중쇄 또는 경쇄의 전사 단위는 아래의 기능적 요소를 포함하였다:

- [1084] · 인트론 A를 포함하는 인간 거대세포바이러스 (P-CMV)로부터의 극초기 인핸서 및 프로모터,
- [1085] · 인간 중쇄 면역글로불린 5'-비번역 영역 (5'UTR),
- [1086] · 뮤린 면역글로불린 중쇄 신호 서열,
- [1087] · 개별 항체 중쇄 또는 경쇄 cDNA 서열 및
- [1088] · 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 서열 (BGH pA).

[1089] **일시적인 발현 및 분석적 특성화**

[1090] 제조합 생산은 F17 배지 (Invitrogen Corp.)에서 배양한 HEK293 세포 (인간 배아 신장 세포주 293 유래)를 일시적으로 형질감염시켜 수행하였다. 단일클론 항체의 생산을 위해, 세포가 개별 면역글로불린 중쇄와 경쇄를 포함하는 플라스미드로 동시형질감염되었다. 형질감염을 위해 "293-팩틴" 형질감염 시약 (Invitrogen)이 이용되었다. 형질감염은 제조업체의 지침에 명시된 대로 수행되었다. 세포 배양 상층액이 형질감염 후 3 내지 7 (3-7) 일째에 수확되었다. 상층액이 감소된 온도 (예를 들면 -80°C)에서 보관되었다.

[1091] 예를 들어, HEK293 세포에서 인간 면역글로불린의 제조합 발현에 관한 일반적인 정보는 Meissner, P. et al., Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 197-203에서 제공된다. 아래의 이중특이적 항체를 생성하기 위해 WO 2016/016299에 설명된 CrossMab 기술이 이용되었는데, 여기서 VH/VL이 하나의 항체 팔에서 교환되었고 다른 항체 팔의 CH1/CL 인터페이스가 이중이량체화를 촉진하기 위한 CH3/CH3 인터페이스에서 노브 인투 홀 기술과 조합으로 전하 변경에 의해 변형되었다. 이 기술이 적용된 4개의 항체 사슬 모두에 대한 예시적인 서열은 CNT0888//11K2-WT IgG1에 대해 제공된다 (서열 번호: 104 내지 서열 번호: 107 참조).

[1092] 야생형 IgG1 (WT IgG1)을 포함하는 생성된 이중특이적 (이중파라토프) 항-CCL2 Crossmab 항체 목록 (야생형

IgG1은 Fc 수용체 결합에 영향을 미치는 변형/돌연변이가 없음을 의미하지만 노브 인투 홀과 같은 이중이량체화 기술이 포함된다)

| 이중특이적 항체              | 별명 1      | 별명 2     | 첫 번째 항원 결합 부위<br>VH/VL 교차 | 두 번째 항원 결합 부위<br>VH/VL 정상 구조 (비교차) |
|-----------------------|-----------|----------|---------------------------|------------------------------------|
| <u>IgG1</u>           |           |          |                           |                                    |
| ABN912//11K2-WT IgG1  | CCL2-0047 | P1AA3447 | 인간화 11K2                  | ABN912                             |
| CNT0888//11K2-WT IgG1 | CCL2-0048 | P1AA3429 | 인간화 11K2                  | CNT0888                            |
| 11K2//1G9-WT IgG1     | CCL2-0049 | P1AA3461 | 인간화 11K2                  | 1G9                                |
| 11K2//2F6-WT IgG1     | CCL2-0056 | P1AA3392 | 인간화 11K2                  | 2F6                                |
| CNT0888//1A5-WT IgG1  | CCL2-0050 | P1AA3419 | CNT0888                   | 1A5                                |
| CNT0888//1G9-WT IgG1  | CCL2-0051 | P1AA3439 | CNT0888                   | 1G9                                |
| 1A4//2F6-WT IgG1      | CCL2-0057 | P1AA3400 | 1A4                       | 2F6                                |
| 1A5//2F6-WT IgG1      | CCL2-0058 | P1AA3427 | 1A5                       | 2F6                                |
| 1A5//1G9-WT IgG1      | CCL2-0052 | P1AA3446 | 1A5                       | 1G9                                |

[1093]

[1094]

Fc 감마 수용체 침묵 돌연변이 L234A, L235A, P329G (Kabat EU 넘버링) (IgG1-PGLALA)을 포함하는 IgG1을 갖는 이중특이적 (이중파라토프) 항-CCL2 Crossmab 항체 목록

| 이중특이적 항체             | 별명 1      | 별명 2     | 첫 번째 항원 결합 부위<br>VH/VL 교차 | 두 번째 항원 결합 부위<br>VH/VL 일반 구조 (비교차) |
|----------------------|-----------|----------|---------------------------|------------------------------------|
| <u>IgG1 PGLALA</u>   |           |          |                           |                                    |
| ABN912//11K2-PGLALA  | CCL2-0041 | P1AA3411 | 인간화 11K2                  | ABN912                             |
| CNT0888//11K2-PGLALA | CCL2-0042 | P1AA3452 | 인간화 11K2                  | CNT0888                            |
| 11K2//1G9-PGLALA     | CCL2-0043 | P1AA3463 | 인간화 11K2                  | 1G9                                |
| 11K2//2F6-PGLALA     | CCL2-0053 | P1AA3450 | 인간화 11K2                  | 2F6                                |
| CNT0888//1A5-PGLALA  | CCL2-0044 | P1AA3448 | CNT0888                   | 1A5                                |
| CNT0888//1G9-PGLALA  | CCL2-0045 | P1AA3455 | CNT0888                   | 1G9                                |
| 1A4//2F6-PGLALA      | CCL2-0054 | P1AA3459 | 1A4                       | 2F6                                |
| 1A5//2F6-PGLALA      | CCL2-0055 | P1AA3402 | 1A5                       | 2F6                                |
| 1A5//1G9-PGLALA      | CCL2-0046 | P1AA3444 | 1A5                       | 1G9                                |

[1095]

- [1096] 이중파라토프 항-CCL2 항체의 정제
- [1097] 이중파라토프 항-CCL2 항체 함유 세포 배양 상층액을 최대 3번의 크로마토그래피 단계를 통해 여과하고 정제하였다. 포획 단계 용출물의 순도에 따라 이온 교환 크로마토그래피 단계가 선택적으로 포획 단계와 연마 단계 사이에 구현되었다.
- [1098] 이중파라토프 항-CCL2 항체는 MabSelectSure-세파로오스™ (GE Healthcare, Sweden), POROS 50 HS (ThermoFisher Scientific) 및 Superdex 200 크기 배제 (GE Healthcare, Sweden) 크로마토그래피를 이용하는 친화성 크로마토그래피에 의해 세포 배양 상층액으로부터 정제되었다. 간단히 말하면, 멸균 여과된 세포 배양 상층액을 PBS 완충액 (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl 및 2.7 mM KCl, pH 7.4)으로 평형화된 MabSelect SuRe 수지에 포획하고, 평형 완충액으로 세척하며, pH 3.0에서 25 mM 시트르산나트륨으로 용리하였다. 용리된 단백질 분획물을 모으고 2M Tris, pH 9.0으로 중화하였다. 선택적인 두 번째 정제 단계인 이온 교환 크로마토그래피는 POROS 50 HS (ThermoFisher Scientific)를 이용하여 수행되었고, 평형화 및 20 mM 히스티딘 (pH 5.6)으로 세척이 수행되었으며, 희석된 포획 단계 용리액의 로딩과 구배 크로마토그래피가 pH 5.6에서 20 mM 히스티딘, 0.5M NaCl을 이용하여 수행되었다. 이온 교환 크로마토그래피 분획물을 CE-SDS LabChip GX II (PerkinElmer)로 분석하고 Crossmab 함유 분획물을 모았다.
- [1099] Superdex 200 (GE Healthcare)에서 크기 배제 크로마토그래피가 두 번째 또는 세 번째 정제 단계로서 이용되었다. 크기 배제 크로마토그래피는 20 mM 히스티딘 완충액, 0.14 M NaCl, pH 6.0에서 수행되었다. 크기 배제 크로마토그래피 분획물을 CE-SDS LabChip GX II (PerkinElmer)로 분석하고 Crossmab 함유 분획물을 모아서 -80℃에서 보관하였다.
- [1100] Superdex 200 (GE Healthcare)에서 POROS 50 HS (ThermoFisher Scientific) 크기 배제 크로마토그래피를 20 mM 히스티딘 완충액, 0.14M NaCl, pH 6.0 중 HiPrep 26/10 Desalting (GE Healthcare)에서 탈염 크로마토그래피로 대체한 후 만족스러운 제품 품질을 얻은 경우.
- [1101] 항체 제조물의 단백질 농도는 아미노산 서열을 기초로 계산된 몰 흡광 계수를 이용하여 280 nm에서 흡광도 (OD)를 측정하여 결정하였다.
- [1102] 항체의 순도 및 무결성은 Protein Express Chip 및 HT Protein Express Reagents Kit가 포함된 LabChip GX II (PerkinElmer)를 이용하여 CE-SDS로 분석되었다. 항체 제조물의 응집체 함량은 200 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 250 mM KCl, pH 7.0을 실행 완충액으로 이용하는 Biosuite High Resolution SEC, 250Å, 5µm 분석 크기 배제 칼럼 (Waters GmbH)을 이용하여 고성능 SEC에 의해 결정되었다. CE-SDS로 분석한 결과 평균 순도는 94-100%이었으며 단량체 함량은 >95% (SEC)이었다.
- [1103] **이중특이적 (이중파라토프) 항-CCL2 항체의 기능적 특성화**
- [1104] **친화성 측정 (결합)**
- [1105] 포획 시스템 (20 µg/ml 염소 항인간 IgG Fc; 주문 코드: 109-005-098, Jackson Immuno Research)의 약 1200 공명 단위 (RU)가 GE Healthcare에서 제공하는 아민 커플링 키트를 이용하여 pH 5.0에서 C1 칩 (GE Healthcare BR-1005-35)에 커플링되었다. 샘플 및 시스템 완충액은 PBS-T (0.05% Tween20을 포함하는 10 mM 인산염 완충액, pH 7.4)이었다. 흐름 셀은 25℃로 설정되었고 - 샘플 블록은 12℃로 설정되었으며 실행 완충액으로 2회 프레이밍되었다. 2 µg/ml 용액을 10 µl/분의 유속으로 60초 동안 주입하여 이중특이적 항체를 포획하였다. 연관은 1:10 희석도에서 30 nM로 시작하여 30 µl/분의 유속으로 용해 상태에서 다양한 농도의 인간 CCL2 (wt)를 150초 동안 주입하여 측정되었다. 해리 단계는 최대 1200초 동안 모니터링되었고 샘플 용액에서 실행 완충액으로 전환함으로써 촉발되었다. 0.85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 용액을 10 µl/분의 유속으로 60초 동안 세척하여 표면을 재생하였다. 염소 항인간 IgG Fc 표면으로부터 얻은 반응을 차감하여 벌크 굴절률 차이를 보정하였다. 블랭크 주입 또한 차감된다 (= 이중 참조). 동역학 매개변수 계산을 위해, Langmuir 1:1 모형이 이용되었다.

| 단일 및 이중특이적 항-CCL2 항체  | 별명        | t 1/2* (분) | 리간드 수준 (RU) | Rmax (RU) |
|-----------------------|-----------|------------|-------------|-----------|
| 인간화 11K2 (=11K2)      | CCL2-0002 | 해리 없음      | 293.5       | 39.3      |
| ABN912                | CCL2-0003 | 27         | 307.0       | 33.6      |
| CNT0888               | CCL2-0004 | 해리 없음      | 272.6       | 31.9      |
| ABN912//11K2-PGLALA   | CCL2-0041 | 해리 없음      | 212.2       | 21.1      |
| CNT0888//11K2-PGLALA  | CCL2-0042 | 해리 없음      | 211.8       | 22.0      |
| 11K2//1G9-PGLALA      | CCL2-0043 | 해리 없음      | 204.9       | 21.2      |
| CNT0888//1A5-PGLALA   | CCL2-0044 | 해리 없음      | 207.3       | 20.0      |
| CNT0888//1G9-PGLALA   | CCL2-0045 | 해리 없음      | 213.0       | 19.0      |
| 1A5//1G9-PGLALA       | CCL2-0046 | 해리 없음      | 203.1       | 20.0      |
| ABN912//11K2-WT IgG1  | CCL2-0047 | 해리 없음      | 209.3       | 20.2      |
| CNT0888//11K2-WT IgG1 | CCL2-0048 | 해리 없음      | 226.1       | 22.9      |
| 11K2//1G9-WT IgG1     | CCL2-0049 | 해리 없음      | 206.1       | 21.1      |
| CNT0888//1A5-WT IgG1  | CCL2-0050 | 해리 없음      | 214.4       | 20.3      |
| CNT0888//1G9-WT IgG1  | CCL2-0051 | 해리 없음      | 215.8       | 20.7      |
| 1A5//1G9-WT IgG1      | CCL2-0052 | 해리 없음      | 211.7       | 21.0      |
| 11K2//2F6-PGLALA      | CCL2-0053 | 해리 없음      | 201.9       | 19.8      |
| 1A4//2F6-PGLALA       | CCL2-0054 | 해리 없음      | 194.7       | 18.6      |
| 1A5//2F6-PGLALA       | CCL2-0055 | 해리 없음      | 203.5       | 20.1      |
| 11K2//2F6-WT IgG1     | CCL2-0056 | 해리 없음      | 205.3       | 20.2      |
| 1A4//2F6-WT IgG1      | CCL2-0057 | 해리 없음      | 199.0       | 19.5      |
| 1A5//2F6-WT IgG1      | CCL2-0058 | 해리 없음      | 202.8       | 19.8      |

[1106]

[1107]

# 야생형 항원 존재 시 자연 면역 복합체 형성.

[1108]

모든 단백질 샘플 (이중특이적 항-CCL2 CrossMab 항체 및 항원)을 투석 또는 원심분리 한외여과 장치를 이용하여 1x PBS, pH 7.4에서 다시 완충하였다.

[1109]

2.0에서 0.1 mg/mL까지 일련의 CrossMab 샘플 희석액을 준비하였다. 마찬가지로, PBS 중 항원 용액을 0.012 내지 0.23 mg/mL 범위의 농도로 제조하였다. 농도는 1:1의 일정한 물 비율 (항체:CCL2 복합체)을 달성하기 위해 등가 용적을 혼합할 수 있도록 선택되었다. 본 연구에서는 다음의 항원을 이용하였다: 야생형 CCL2.

[1110]

등가 용적의 사전 희석된 CrossMab 및 CCL2 제조물을 혼합하고 37℃에서 1시간 동안 배양한 후 샘플을 Superose6 (GE Healthcare #2039) 칼럼에 적용하고, PBS로 전평형화하며, 0.5 mL/분의 유속으로 용리하였다. 총 100 µg 또는 최대 가능한 용적 250 µL를 적용하고 이들 항체와 항원 단독을 대조로서 이용하였다.

[1111]

SEC-MALLS 데이터는 OptiLab rEX 굴절률 검출기 및 miniDAWN Treos MALLS 검출기 (둘 모두 Wyatt Inc. 제품)를 이용하여 기록되었다. SEC-MALLS 신호는 Astra V5 소프트웨어 (Wyatt)를 이용하여 처리되었다.

| 이중특이적 항-CCL2 항체       | 별명        | CCL2 <sup>wt</sup> 와의 상호작용<br>(낮은 농도) |
|-----------------------|-----------|---------------------------------------|
| ABN912//11K2-WT IgG1  | CCL2-0047 | +                                     |
| CNT0888//11K2-WT IgG1 | CCL2-0048 | +++                                   |
| 11K2//1G9-WT IgG1     | CCL2-0049 | ++                                    |
| CNT0888//1A5-WT IgG1  | CCL2-0050 | +                                     |
| CNT0888//1G9-WT IgG1  | CCL2-0051 | +                                     |
| 1A5//1G9-WT IgG1      | CCL2-0052 | ++                                    |
| 11K2//2F6-WT IgG1     | CCL2-0056 | ++                                    |
| 1A4//2F6-WT IgG1      | CCL2-0057 | +                                     |
| 1A5//2F6-WT IgG1      | CCL2-0058 | +                                     |

[1112]

[1113]

[1114]

[1115]

[1116]

[1117]

[1118]

[1119]

[1120]

[1121]

[1122]

[1123]

범례

+++ 대량의 다량체/소중합체

++ 중간 양의 다량체/소중합체

+ 소량의 다량체/소중합체

0 이량체 이하

# 항-CCL2 항체의 중화 특성을 연구하기 위한 CCR2 리포터 분석

CCL2 중화 항체 작제물의 영향을 연구하기 위해 Tango™ CCR2-bla U2OS 세포를 독일 Invitrogen에서 구입하였다. 이러한 리포터 세포는 TEV 프로테아제 부위에 연결된 인간 케모킨 (CC motifs) 수용체 2 (CCR2) 및 Tango™ GPCR-bla U2OS 부모 세포주에 안정적으로 통합된 Gal4-VP16 전사 인자를 포함한다. 이러한 부모 세포주는 UAS 반응 요소의 제어 하에 베타-아레스틴/TEV 프로테아제 융합 단백질 및 베타 락타마아제 (bla) 리포터 유전자를 안정적으로 발현한다. 자연 리간드 MCP1 = CCL2를 추가하면, FRET 가능 기질의 개열에 의해 측정될 수 있는 리포터 유전자의 활성이 표시된다.

원칙적으로 분석 및 세포 취급 절차는 공급자 매뉴얼을 따랐다. 간단히 말하면, CCR2-U2OS 세포를 50 µl 분석 배지 (Freestyle 293 발현 배지, 카탈로그 번호 #12338-018, Invitrogen)에서 2x10<sup>4</sup> 개 세포/웰 (96er 검은색 투명 바닥 평판, 카탈로그 번호 # 655090, Greiner Bio-one)의 밀도로 파종하였다. 동시에, CCL2-항원 용액뿐만 아니라 다양한 검사 항체의 연속 희석액을 c = 4x 최종 농도로 제조하였다. 그런 다음, CCL2-항원/항체 혼합물을 제조하고 실온에서 2 내지 3시간 동안 사전 인큐베이션하였다. 표시된 CCL2/항체 용액 50 µl를 CCR2 발현 U2OS 세포로 옮기고 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 가습 인큐베이터에서 18시간 동안 인큐베이션하였다. 대조로서 분석 배지 단독이 이용되었다.

다음날, CCF4 기질 (카탈로그 번호 #K1089, Invitrogen)을 β-락타마아제 로딩 용액 (카탈로그 번호 #K1085, Invitrogen)으로 준비하고 이를 20 µl/웰로 세포에 첨가하였다. 기질 용액을 어둠하에 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다.

마지막으로 Spectra Max (M4) 판독기 (Molecular devices)를 이용하여 다음 파장 (Ex/Em = 409nm/460nm = 청색\*; Ex/Em = 409nm/530nm = 녹색\*\*)에서 형광 파장을 결정하였고, 분석 배지 대조를 차감한 후 청색/녹색 형광의 비율을 다음 방정식에 따라 계산하였다: 비율 = (샘플-청색\* - 대조-청색\*) / (샘플-녹색\*\* - 대조-녹색\*\*).

pH 조작 후, 우리는 CCL2 유발 CCR2 신호전달을 억제하는 능력에 대해 최종 LO 후보 (CKL01-4)를 특성화하였다. 이 경우 중화 특성은 rec. CCL2 단백질의 단량체성 변이체에 의해서만 평가되었는데, 이는 대략 15 ng/ml의 최종 농도로 이용되었다.

| 이중특이적 항체              | 별명        | IC50 [ng/ml] |      |             |
|-----------------------|-----------|--------------|------|-------------|
|                       |           | 실례 1         | 실례 2 | 실례 3        |
| ABN912//11K2-PGLALA   | CCL2-0041 |              | 80.2 |             |
| CNT0888//11K2-PGLALA  | CCL2-0042 |              | 84   |             |
| 11K2//1G9-PGLALA      | CCL2-0043 |              | 57   |             |
| CNT0888//1A5-PGLALA   | CCL2-0044 |              | 77.7 | 88          |
| CNT0888//1G9-PGLALA   | CCL2-0045 |              | 86.4 | 81.3        |
| 1A5//1G9-PGLALA       | CCL2-0046 |              | 75.8 |             |
| ABN912//11K2-WT IgG1  | CCL2-0047 | 84.4         |      |             |
| CNT0888//11K2-WT IgG1 | CCL2-0048 | 92.9         |      |             |
| 11K2//1G9-WT IgG1     | CCL2-0049 | 82.2         |      |             |
| CNT0888//1A5-WT IgG1  | CCL2-0050 | 89.2         |      |             |
| CNT0888//1G9-WT IgG1  | CCL2-0051 |              | 89.6 | 52.7 / 67.9 |
| 1A5//1G9-WT IgG1      | CCL2-0052 | 86.2         |      |             |
| 11K2//2F6-PGLALA      | CCL2-0053 |              | 26.3 | 49.6 / 70   |
| 1A4//2F6-PGLALA       | CCL2-0054 |              | 78.2 |             |
| 1A5//2F6-PGLALA       | CCL2-0055 |              | 48.7 |             |
| 11K2//2F6-WT IgG1     | CCL2-0056 | 93.9         |      |             |
| 1A4//2F6-WT IgG1      | CCL2-0057 |              | 58.2 |             |
| 1A5//2F6-WT IgG1      | CCL2-0058 | 93           |      |             |
| 단일특이적 대조              | CCL2-0002 | 76.1         | 79.1 | 56.9 / 58   |

[1124]

[1125]

#### 생쥐에서 이중파라토프 항체를 이용한 인간 CCL2 면역 복합체 스위핑의 평가

[1126]

야생형 인간 CCL2와 면역 복합체를 형성하는 이중파라토프 항체의 능력을 평가하기 위해, 항-CCL2 이중파라토프 항체 (20mg/kg) 및 야생형 인간 CCL2 (0.1mg/kg)로 구성되는 미리 형성된 면역 복합체를 Balb/c 생쥐의 꼬리 정맥에 10 ml/kg의 단위 용량으로 투여하였다. 투여 5분, 7시간, 1일, 3일 및 7일 후에 혈액을 채취하였다. 혈액을 즉시 4℃에서 14,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 혈청을 준비하였다. 혈청은 측정 때까지 -80℃ 이하에서 보관하였다. 검사된 이중파라토프 항체는 아래의 표 4에 나열되어 있다. WT IgG1 Fc를 갖는 항체는 야생형과 유사한 Fc 감마 수용체 결합을 갖는 반면, PGLALA Fc를 갖는 항체는 Fc 감마 수용체 결합 침묵이다. 결과는 도 4a 내지 4i에 도시된다.

[1127]

생체내 hCCL2 청소에 대한 각각의 항-CCL2 이중파라토프 항체의 면역 복합체 스위핑의 효과는 도 4a-4i에 도시된 바와 같이, Fc 감마 수용체 결합을 갖는 항-CCL2 항체 (실선) 및 Fc 감마 수용체 결합 침묵을 갖는 항-CCL2 항체 (PGLALA, 점선)를 비교함으로써 평가하였다. 항체 프로파일은 Phoenix 64 (Pharsight/Certara)를 이용하여 비구획 분석으로 분석되었다. AUCinf는 무한대로 외삽된 선형 로그 사다리꼴 규칙에 의해 추정되었다. 청소율 값은 용량/AUCinf로 정의된다. 이러한 청소율 차이는 Fc 감마 수용체 결합을 갖는 항체 (SG1)의 hCCL2 청소율을 Fc 감마 수용체 결합 침묵을 갖는 항체 (PGLALA)의 hCCL2 청소율로 나누어 계산되는 배수 변화로도 표시된다 (아래의 표 4). 아래 표 4의 데이터는 Fc 감마 수용체 (FcγR) 결합 항체 (WT IgG1)에 의한 인간 CCL2의 청소율이 검사된 모든 이중파라토프 항체에 대해 돌연변이 L234A, L235A, P329G 돌연변이 (Kabat EU 넘버링)를 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 갖는 Fc 감마 수용체 결합 침묵 항체 (PGLALA)에 의한 청소율보다 보다 우수하였음을 표시한다. 이는 검사된 이중파라토프 항체에 의해 달성된 CCL2의 면역 복합체 매개 스위핑이 더 효율적임을 시사한다.

다. 더욱이, 몇몇 이중파라토프 항체 예를 들면, CNTO//인간화 11K2 (CNTO//11K2)는 청소율 값에서 큰 배수 변화를 보여주었다.

[1128] 배수 변화는 WT FcγR (FcγR) 결합을 갖는 항체의 hCCL2 청소율을 PGLALA를 갖는 항체의 hCCL2 청소율로 나누어 계산한다. 도 4a-4i 및 아래의 표 4에 나타나 있는 바와 같이, CNTO//11k2는 FcγR 결합을 갖는 IgG1 야생형 항체 (WT) 및 FcγR 결합 침묵 항체 (PGLALA) 사이에서 21.5의 가장 큰 배수 변화를 나타낸다. 이는 CNTO//11k2-WT IgG1에 의한 면역 복합체 매개 스위핑이 모든 변이체 중에서 가장 효율적임을 시사한다.

[1129] 표 4: 항-CCL2 이중파라토프 항체 (20mg/kg) 및 야생형 인간 CCL2 (0.1mg/kg)의 미리 형성된 면역 복합체 투여 후 야생형 CCL2의 청소율 값

표 4

| 항체                    | 별명        | 청소율 (ml/일/kg) | 배수 변화 |
|-----------------------|-----------|---------------|-------|
| 11K2//1G9-WT IgG1     | CCL2-0049 | 101.761       | 6.1   |
| 11K2//1G9-PGLALA      | CCL2-0043 | 16.713        |       |
| CNT0888//11K2-WT IgG1 | CCL2-0048 | 244.705       | 21.5  |
| CNT0888//11K2-PGLALA  | CCL2-0042 | 11.374        |       |
| CNT0888//1G9-WT IgG1  | CCL2-0051 | 31.085        | 7.8   |
| CNT0888//1G9-PGLALA   | CCL2-0045 | 3.999         |       |
| CNT0888//1A5-WT IgG1  | CCL2-0050 | 7.098         | 3.8   |
| CNT0888//1A5-PGLALA   | CCL2-0044 | 1.892         |       |
| 1A5//1G9-WT IgG1      | CCL2-0052 | 194.481       | 11.4  |
| 1A5//1G9-PGLALA       | CCL2-0046 | 17.073        |       |
| 11K2//2F6-WT IgG1     | CCL2-0056 | 14.442        | 4.9   |
| 11K2//2F6-PGLALA      | CCL2-0053 | 2.964         |       |
| ABN912//11K2-WT IgG1  | CCL2-0047 | 20.935        | 4.2   |
| ABN912//11K2-PGLALA   | CCL2-0041 | 4.988         |       |
| 1A4//2F6-WT IgG1      | CCL2-0057 | 19.606        | 3.3   |
| 1A4//2F6-PGLALA       | CCL2-0054 | 5.933         |       |
| 1A5//2F6-WT IgG1      | CCL2-0058 | 10.254        | 2.7   |
| 1A5//2F6-PGLALA       | CCL2-0055 | 3.825         |       |

[1130]

[1131] 전기화학발광 (ECL)에 의한 혈청 내 총 인간 CCL2 농도 측정

[1132] 생쥐 혈청 내 총 인간 CCL2의 농도를 ECL로 측정하였다. 3μg/mL의 항-CCL2 항체 2F2-SG1을 MULTI-ARRAY 96-웰 평판 (Meso Scale Discovery)에 하룻밤 동안 고정된 후 차단 완충액에서 30℃에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 인간 CCL2 고정 곡선 샘플, 품질 관리 샘플 및 희석된 생쥐 혈청 샘플을 9% SDS로 구성된 변성 완충액과 함께 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하거나 pH2.0-2.5 글리신 HCl 완충액과 함께 37℃에서 10분간 인큐베이션하였다. 변성 완충액의 목적은 이중파라토프 항체로부터 인간 CCL2를 해리하는 것이다. 그 후, 샘플을 10배 희석하고 항-CCL2 고정 평판에 첨가하고 30℃에서 1시간 동안 결합시킨 후 세척하였다. 다음으로, SULFO TAG 표지 MCP-1 항체를 첨가하고, 세척 전 평판을 30℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 판독 완충액 T (x4) (Meso Scale Discovery)를 즉시 평판에 첨가하였고, SECTOR Imager 2400 (Meso Scale Discovery)에 의해 신호를 검출하였다. 인간 CCL2 농도는 분석 소프트웨어 SOFTmax PRO (Molecular Devices)를 이용하여 고정 곡

선의 반응에 기초하여 계산되었다.

[1133] 효소 결합 면역흡착 분석 (ELISA)을 통한 혈청 내 항-CCL2 항체 농도 측정

[1134] 생쥐 혈청 내 항-CCL2 항체의 농도를 ELISA로 측정하였다. 항인간 IgG 카파-사슬 (Antibody Solutions)을 Nunc MaxiSorp 평판 (Thermofisher)에 분주하고, 4℃에서 하룻밤 동안 방치하여 항인간 IgG 고정 평판을 제작하였다. 교정 곡선 및 샘플은 1% 폴링된 생쥐 혈청을 이용하여 준비되었다. 그런 다음, 항인간 IgG 고정 평판에 샘플을 분주하고, 30℃에서 1시간 동안 방치하였다. 이어서, HRP 접합체 (Southern Biotech)를 포함하는 염소 항인간 IgG (감마-사슬 특이적)를 첨가하여 30℃에서 1시간 동안 반응시켰다. ABTS 기질 (KPL)을 기질로 이용하여 발색 반응을 수행하였고, 450 nm에서의 흡광도를 마이크로평판 판독기로 측정하였다. 생쥐 혈장 내 농도는 분석 소프트웨어 SOFTmax PRO (Molecular Devices)를 이용하여 교정 곡선의 흡광도로부터 계산되었다.

[1135] 연구 요약

[1136] 생쥐 PK 연구 데이터를 요약하면, 검사된 이중파라토프 항체에 의한 인간 CCL2의 스위핑은 동일한 용량의 단일 파라토프 항체에 비해 더 효율적이었다. 단일파라토프 항체의 경우, WT FcγR 결합을 갖는 항체 및 FcγR 결합 침묵을 갖는 항체 사이에 항원 청소의 최소한의 차이가 있었다 (표 3). 대조적으로, WT FcγR 결합을 갖는 이중파라토프 항체 및 FcγR 결합 침묵을 갖는 이중파라토프 항체 사이에 항원 청소의 큰 차이가 획득되었는데 (표 4), 이는 검사된 이중파라토프 항체가 인간 CCL2를 효율적으로 스위핑할 수 있음을 시사한다. CNT0888//11K2의 조합은 청소율에서 가장 큰 배수 기회를 입증했기 때문에 추가 항체 조합을 위해 선택되었다.

[1137] 실시에 B-2 변형된 가변 도메인 및 CDR을 갖는 항-CCL2 항체 (이온 의존성/pH 의존성 결합)

[1138] 이온 의존성/pH 의존성 결합으로 이어지는 변형

[1139] pH 의존성 항-CCL2 항체를 생성하기 위해, mAb CNT0888 및 인간화 11K2의 모든 CDR에 대해 히스티딘 스캐닝 돌연변이유발을 수행하였다. 제조업체의 지침에 따라 In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech Inc. 또는 Takara Bio company)를 이용하여 CDR의 각 아미노산을 개별적으로 히스티딘으로 돌연변이시켰다. 각 변이체가 정확하게 돌연변이되었는지 염기서열분석을 확인한 후, 변이체를 일시적으로 발현시키고 다음과 같은 방법으로 정제하였다: 제조항체는 Freestyle FS293-F 세포와 293Fectin (Life Technologies)을 제조업체의 지침에 따라 이용하여 일시적으로 발현시켰다. 제조항체를 단백질 A (GE Healthcare)로 정제하고 D-PBS 또는 His 완충액 (20 mM 히스티딘, 150 mM NaCl, pH6.0)에서 용리하였다. 단백질 A로 정제하기 어려운 항체의 경우, 예를 들면 kappaSelect 또는 LambdaFABselect (GE Healthcare) 또는 CaptureSelect IgG-CH1 Affinity Matrix (Thermofisher Scientific)를 이용할 수 있다. 필요하다면 고분자량 및/또는 저분자량 성분을 제거하기 위해 크기 배제 크로마토그래피를 추가로 수행하였다. 모든 히스티딘-치환 변이체는 위에서 설명한 것과 비교하여 변형된 BIACORE® 분석으로 평가되었다. 간단히 말하면, pH 5.8에서의 추가 해리 단계는 pH 7.4에서의 해리 단계 직후에 BIACORE® 분석에 통합되었다. 이는 pH5.8에서의 상응하는 해리와는 대조적으로 pH7.4에서 형성된 복합체로부터 항체 (Ab)와 항원 (Ag) 사이의 pH 의존성 해리를 평가하기 위한 것이다. pH5.8 완충액에서의 해리 속도는 Scrubber 2.0 (BioLogic Software) 곡선 적합 소프트웨어를 이용하여 데이터를 처리하고 적합시켜 결정되었다.

[1140] pH7.4 해리 단계와 비교하여 pH5.8에서 결합 반응의 감소를 야기하는 단일 히스티딘 치환을 선택하고 조합하였다. pH7.4에서 친화성을 향상시키는 돌연변이를 확인하기 위해, 히스티딘 치환 단계 동안 생성된 적어도 하나의 변이체를 이용하여 중쇄 및 경쇄 각각에 대해 500개 초과 변이체를 생성하였다. 이들 변이체는 CDR의 각 아미노산이 본래 아미노산과 시스테인을 제외한 18개의 다른 아미노산으로 치환되었다. 인간 CCL2에 대한 변이체의 결합 능력은 BIACORE® 4000 기기 (GE Healthcare)를 이용하여 pH7.4 하에서 37℃에서 평가되었다. 이전과 마찬가지로, pH 7.4의 해리 단계 직후에 pH 5.8의 추가 해리 단계가 BIACORE® 분석에 통합되었다. pH5.8 완충액에서의 해리 속도는 Scrubber 2.0 (BioLogic Software) 곡선 적합 소프트웨어를 이용하여 데이터를 처리하고 적합시켜 결정되었다.

[1141] pH7.4에서 친화성이 향상되고 pH 의존성이 향상된 변이체를 선택하고 이들 돌연변이를 조합하였다. 이는 아래의 표에 4개의 11K2 변이체 및 4개의 CNT0888 변이체에 예시되어 있다.

[1142] 표: pH 의존성 결합을 위해 조작된 4개의 변형된 11K2 및 4개의 CNT0888 변이체

| 변형된 11K2 변이체 (VH/VL) | 변형된 CNT0888 변이체 (VH/VL)   |
|----------------------|---------------------------|
| 11K2H1503/11K2L1338  | CNT0888H0625/CNT0888L0616 |
| 11K2H1510/11K2L1338  | CNT0888H0634/CNT0888L0616 |
| 11K2H1503/11K2L1201  | CNT0888H0635/CNT0888L0616 |
| 11K2H1514/11K2L1338  | CNT0888H0695/CNT0888L0616 |

[1143]

[1144] 변형된 11K2 및 CNT0888 변이체의 병용 효과를 평가하기 위해, 각각의 11K2 변이체를 4개의 변형된 CNT0888 변이체와 조합하고 CrossMab 형식에서 이중과라토프 CCL2 항체로 발현시켰다. 이는 아래의 표에 예시되어 있는데, 여기서 4 x 4 조합으로 인해 CKL001 내지 CKL016으로 지정된 16개의 이중과라토프 항체가 생성된다.

[1145] 표: 16개의 이중특이적 (이중과라토프) 항체를 생성하기 위한, 4개의 변형된 11K2 및 4개의 변형된 CNT0888 변이체의 조합.

| 이중특이적 항-CCL2 항체 | 다음의 가변 도메인에 기반                                 |
|-----------------|------------------------------------------------|
| CKL001          | 11K2H1503/11K2L1338//CNT0888H0695/CNT0888L0616 |
| CKL002          | 11K2H1510/11K2L1338//CNT0888H0695/CNT0888L0616 |
| CKL003          | 11K2H1503/11K2L1201//CNT0888H0695/CNT0888L0616 |
| CKL004          | 11K2H1503/11K2L1201//CNT0888H0625/CNT0888L0616 |
| CKL005          | 11K2H1503/11K2L1338//CNT0888H0634/CNT0888L0616 |
| CKL006          | 11K2H1503/11K2L1201//CNT0888H0634/CNT0888L0616 |
| CKL007          | 11K2H1514/11K2L1338//CNT0888H0634/CNT0888L0616 |
| CKL008          | 11K2H1510/11K2L1338//CNT0888H0634/CNT0888L0616 |
| CKL009          | 11K2H1503/11K2L1338//CNT0888H0625/CNT0888L0616 |
| CKL010          | 11K2H1514/11K2L1338//CNT0888H0625/CNT0888L0616 |
| CKL011          | 11K2H1510/11K2L1338//CNT0888H0625/CNT0888L0616 |
| CKL012          | 11K2H1503/11K2L1338//CNT0888H0635/CNT0888L0616 |
| CKL013          | 11K2H1503/11K2L1201//CNT0888H0635/CNT0888L0616 |
| CKL014          | 11K2H1514/11K2L1338//CNT0888H0635/CNT0888L0616 |
| CKL015          | 11K2H1510/11K2L1338//CNT0888H0635/CNT0888L0616 |
| CKL016          | 11K2H1514/11K2L1338//CNT0888H0695/CNT0888L0616 |

[1146]

[1147] 이중특이적 항체를 생성하기 위해, WO 2016/016299에 설명된 CrossMab 기술이 이용되었는데, 여기서 VH/VL이 하나의 항체 팔에서 교환되었고 다른 항체 팔의 CH1/CL 인터페이스가 이중이량체화를 촉진하기 위한 CH3/CH3 인터페이스에서 노브 인투 홀 기술과 조합으로 전하 변경에 의해 변형되었다. 이 기술이 적용된 4개의 항체 사슬 모두에 대한 예시적인 서열은 CKL02 IgG1에 대해 제공된다 (서열 번호: 108 내지 서열 번호: 111 참조). 이용된 중쇄 불변 도메인 (예를 들면 IgG1 야생형 (Fc 수용체 결합 침묵 돌연변이 없음), PGLALA, SG1095, SG1099, 1100 (SG1095, SG1099, 1100의 경우 아래 설명 또는 서열 설명 참조)에 따라 접미사 IgG1, PGLALA, SG1095, SG1099, 1100이 추가된다.

- [1148] 변형된 가변 도메인 및 CDR (이온 의존성/pH 의존성 결합)을 갖는 이중파라토프 항-CCL2 항체의 기능적 특성화
- [1149] 친화성 측정 (상기 방법 참조)
- [1150] IgG1 야생형으로서 생성된 16개의 이중특이적 항-CCL2 항체 모두에 대해 이들의 pH 의존성 결합 인간 CCL2를 결정하였다.
- [1151] 도 5a는 4개의 변형된 11K2 및 4개의 CNT0888 변이체, 그리고 조합 후 16개의 Crossmab의 pH7.4 (검은색 선) 및 pH5.8 (회색 선)에서 단량체성 CCL2에 대한 결합 프로필을 보여주는 Biacore® 센서그램을 보여준다.
- [1152] 도 5b는 4개의 변형된 11K2 및 4개의 CNT0888 변이체, 그리고 단량체성 CCL2에 조합 후 16개의 Crossmab의 결합 프로필을 보여주는 Biacore® 센서그램을 보여주는데, 여기서 pH 5.8에서의 추가 해리 단계는 pH7.4에서의 해리 단계 직후 BIACORE® 분석에 통합되었다.
- [1153] CCL8에 대한 교차반응성 결합
- [1154] 재조합 단량체성 인간 CCL2 및 재조합 단량체성 인간 CCL8에 대한 pH 의존성 결합을 Biacore T200 기기 (GE Healthcare)를 이용하여 37°C에서 평가하였다. 항인간 Fc (GE Healthcare)를 제조업체가 권장하는 설정에 따라 아민 커플링 키트 (GE Healthcare)를 이용하여 CM4 센서 칩의 각 흐름 셀에 고정하였다. 항체 및 분석물을 ACES pH 7.4 또는 pH 5.8 완충액 (20 mM ACES, 150 mM NaCl, 1 mg/ml BSA, 0.05% Tween 20, 0.005% NaN<sub>3</sub>)으로 희석하였다. 항체를 항-Fc 센서 표면에 포획한 다음, 재조합 단량체성 인간 CCL2를 흐름 셀 위에 8 nM 농도로 주입하였다. 항체에 대한 분석물의 연관 단계는 120s 동안 모니터링되었고, 이어서 180s 해리 단계가 뒤따랐다. 센서 표면은 각 주기마다 3M MgCl<sub>2</sub>로 재생되었다. 결합 센서그램은 포획 수준에 대한 결합 반응의 정규화를 통해 TIBCO Spofire에서 처리되었다.
- [1155] pH 7.4에서 형성된 항체/항원 복합체에 대한 pH 의존성 해리의 평가는 변형된 Biacore 분석으로 확인되었다. 간단히 말하면, pH 5.8에서의 추가 해리 단계는 pH 7.4에서의 해리 단계 직후에 Biacore 분석에 통합되었다. 결합 센서그램은 포획 수준에 대한 결합 반응의 정규화를 통해 TIBCO Spofire에서 처리되었다.
- [1156] 재조합 인간 CCL8 P8A 단량체의 발현 및 정제: 야생형 인간 CCL8에 대한 서열은 Genbank (NCBI: NP\_005614.2)에서 얻었다. 단량체성 CCL8을 만들기 위해, 성숙 CCL8 단백질의 위치 8에서 프롤린을 알라닌으로 돌연변이시켰다. Expi 293 세포 (Lifetech)를 제조업체의 지침에 따라 형질감염시켰다. CCL8 야생형 및 P8A 단량체 단백질은 SP-세파로오스 HP (GE Healthcare) 및 Superose 200 크기 배제 (GE Healthcare) 크로마토그래피를 이용하는 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 세포 배양 상층액으로부터 동일한 방법을 이용하여 정제되었다. 간단히 말하면, 세포 배양 상층액을 MilliQ water (Millipore)로 2.5배 희석하고, PBS로 평형화된 Hi-Trap SP-HP 칼럼에 로딩하고, 평형 완충액으로 세척하고, 0-2M NaCl 구배를 이용하여 용리하였다. 용리된 단백질 분획물을 모으고, 20 mM 히스티딘, 150 mM NaCl, pH 6.0으로 평형화된 HiLoad 16/600 Superose 200 (GE Healthcare) 칼럼을 이용하여 크기 배제 크로마토그래피로 추가로 정제하였다. 분획물을 크기 배제 크로마토그래피 및 SDS-PAGE로 분석하였다. CCL8 단백질을 포함하는 분획물을 모아서 농축하고 -80°C에서 보관하였다.
- [1157] 인간 CCL8은 CCL2와 높은 수준의 상동성을 공유하며 CCR2에도 결합할 수 있다. 11K2 팔이 CCL8에 결합할 수 있기 때문에 (도 1 참조), CCL8을 중화시키는 가능한 비표적 효과를 피하기 위해 이 결합을 줄이기 위한 돌연변이를 식별하는 것이 필요하였다. 또한, 11K2 팔에서 CCL8 결합을 제거하는 것은 CCL2와의 면역 복합체를 효율적으로 형성하는 데 중요하다. CNT0 팔이 CCL8에 결합하지 않기 때문에, CCL8이 11K2 팔에 결합하면 CCL2와의 면역 복합체 형성을 방해하여 혈장으로부터 CCL2의 청소율을 감소시킬 수 있다.
- [1158] 인간 CCL8에 대한 11K2의 결합을 감소시키고 인간 CCL2에 대한 선택성을 부여하는 돌연변이를 식별하기 위해, 일부 CDR 위치 예를 들면 CKL002의 11K2 VH의 D101E 또는 CKL003의 11K2 VL의 W92R을 치환하여 huCCL8에 대한 교차반응성을 제거하였다. 도 6에서 볼 수 있듯이, 이중파라토프 Crossmab의 CCL8 결합은 11K2를 조합함으로써 현저하게 감소될 수 있었다. CKL001 변이체는 CCL8 결합을 감소시키도록 최적화되지 않은 반면, CKL004, CKL003 및 CKL002는 CCL8 결합을 감소시키는 돌연변이를 포함한다. 4개의 Crossmab 모두 CCL8에 대한 pH 의존성 결합을 갖는다.
- [1159] pH 7.4 및 pH 5.8에서 재조합 CCL2 및 CCL8에 대한 항-CCL2 항체의 결합 친화성
- [1160] 인간 CCL2 및 CCL8에 대한 부모 CNT0888H/11K2H2, CKL01, CKL02 및 CKL03의 친화성 및 pH 의존성 결합을 결정하기 위해 Biacore T200 기기 (GE Healthcare)를 이용하여 37°C에서 평가하였다. 항인간 Fc (GE Healthcare)를

제조업체가 권장하는 설정에 따라 아민 커플링 키트 (GE Healthcare)를 이용하여 CM4 센서 칩의 각 흐름 셀에 고정하였다. 항체 및 분석물을 ACES pH 7.4 또는 pH 5.8 완충액 (20 mM ACES, 150 mM NaCl, 1 mg/ml BSA, 0.05% Tween 20, 0.005% NaN<sub>3</sub>)으로 희석하였다. 항체를 항-Fc 센서 표면에 포획한 후, 재조합 인간 CCL2 P8A 변이체 (단량체) 또는 CCL8 P8A 변이체 (단량체)를 2배 연속 희석에 의해 제조된 1.25 nM 내지 20 nM로 흐름 셀 위에 주입하였다. 센서 표면은 각 주기마다 3M MgCl<sub>2</sub>로 재생되었다. Biacore T200 평가 소프트웨어 버전 2.0 (GE Healthcare)을 이용하여 데이터를 처리하고 1:1 결합 모형에 적합시켜 결합 친화성을 결정하였다. pH 7.4 & pH 5.8에서 재조합 CCL2 및 CCL8에 대한 항-CCL2 항체의 결합 친화성은 아래 표 5에 나타나 있다.

[1161] 표 5: pH 7.4 및 pH 5.8에서 재조합 CCL2 및 CCL8에 대한 항-CCL2 항체의 결합 친화성

표 5

| 이중특이적<br>-CCL2 항체 | 인간 CCL2에 대한 KD |          | 인간 CCL8에 대한 KD |          |
|-------------------|----------------|----------|----------------|----------|
|                   | pH 7.4         | pH 5.8   | pH 7.4         | pH 5.8   |
| CNT0888/11k2      | 1.28E-11       | 2.35E-13 | 1.47E-09       | 1.75E-09 |
| CKL01             | 7.39E-12       | 9.32E-09 | 2.33E-08       | n.d.     |
| CKL02             | 4.32E-12       | n.d.     | n.d.           | n.d.     |
| CKL03             | 6.65E-12       | 2.17E-08 | n.d.           | n.d.     |

[1162]

[1163] 주의: n.d. KD는 낮은 결합 반응으로 인해 결정될 수 없다.

[1164] 표 5의 데이터는 pH 7.4에서 CCL8에 대한 결합이 CKL02 및 CKL03에 대해 전폐되는 반면, pH 7.4에서는 강한 친화성을 유지하고 CCL2에 대해서는 pH 의존성 결합을 유지한다는 것을 보여준다. 이들 결과는 CNT0888 및 11K2에 기초한 부모 이중특이적 항체의 가변 영역 및 CDR에 도입된 다양한 변형이 pH 7.4에서 부모 Ab와 비교하여 CCL2에 대한 향상된 결합 친화성을 갖는 친화성 성숙 변이체, CKL01, CKL02, CKL03을 성공적으로 생성했음을 입증한다. 동시에 CKL01, CKL02, CKL03은 CCL2에 대한 강한 pH 의존성 결합을 보여주었다. CCL2에 대한 결합 친화성의 KD는 pH 7.4에서의 KD 값과 비교하여 pH 5.8에서 1000배 초과로 약한 것으로 관찰되었다.

[1165] 야생형 인간 CCL2의 청소

[1166] 야생형 인간 CCL2의 청소를 향상시키는 pH 의존성 이중특이적 항체의 능력을 평가하기 위해, 항-CCL2 단일파라토프 항체 (20mg/kg) 및 야생형 인간 CCL2 (0.1mg/kg)로 구성되는 미리 형성된 면역 복합체를 SCID 생쥐의 꼬리 정맥에 10 ml/kg의 단위 용량으로 투여하였다. 투여 5분, 1시간, 4시간, 7시간, 1일, 7일 후에 혈액을 채취하였다. 혈청은 측정 때까지 -80°C 이하에서 보관하였다. 검사된 Crossmab 항체는 부모 CNT0//11K2 및 4개의 pH 조작 변이체인 CKL001, CKL002, CKL003 및 CKL004이었다. 모든 항체는 IgG1 야생형 Fc 부분 (Fc (감마) 수용체 결합을 침묵시키는/전폐하는 돌연변이 없음)을 가졌다. 생쥐 혈청 내 총 인간 CCL2 및 항-CCL2 항체 농도의 측정을 상기 기재된 바와 같이 수행하였다 (표 4 다음의 "생쥐에서 이중파라토프 항체를 이용한 인간 CCL2 면역 복합체 스위핑의 평가" 하에).

[1167] 결과는 도 7a에 나타나 있다: hCCL2 및 이중특이적 항-CCL2 항체 (부모 CNT0//11K2 및 pH 의존성 변이체 CKL001, CKL002, CKL003 및 CKL004)로 구성되는 미리 형성된 면역 복합체를 SCID 생쥐에 주입한 후 시간의 추이에서 hCCL2의 혈청 농도. 4개의 pH 조작 변이체 모두 인간 CCL2의 빠른 청소를 보여주었다. CKL002, CKL003의 경우 인간 CCL2는 1일차까지 검출 한계 미만이었다. 부모 CNT0//11K2의 경우 처음에는 1일차까지 인간 CCL2의 빠른 청소가 관찰되었으나 그 이후에는 인간 CCL2의 청소가 느렸다.

[1168] 실시예 B-3 변형된 가변 도메인 및 CDR (이온 의존성/pH 의존성 결합) 및 Fc 매개 스위핑을 갖는 항-CCL2 항체

[1169] 스위핑 기술을 통한 이중특이적 항-CCL2 항체의 변형

[1170] 이중특이적 항-CCL2 항체는 이중특이적 항-CCL2 항체가 장기간에 걸쳐 자유 CCL2를 제거하여 생체내에서 항암

효능 또는 항염증 효능과 같은 생물학적 효과를 지속시킬 수 있도록 스위핑 기술을 이용하여 변형되었다.

[1171] 스위핑 개념은 예를 들면 본원에 참고로 포함된 Igawa et al, Immunological Reviews 270 (2016) 132-151, WO2012/122011, WO2016/098357 및 WO2013/081143에 설명되어 있다.

[1172] **pI Fc 매개 스위핑**

[1173] pH 조작 이중파라토프 항체가 생체내에서 CCL2 청소를 가속화할 수 있음을 입증한 후, 우리는 야생형 인간 CCL2의 청소를 향상시키기 위한 pI 증가 치환을 갖는 항체의 능력을 평가하였다. 항-CCL2 단일파라토프 항체 (20mg/kg) 및 야생형 인간 CCL2 (0.1mg/kg)로 구성되는 미리 형성된 면역 복합체를 SCID 생쥐의 꼬리 정맥에 10 ml/kg의 단위 용량으로 투여하였다. 투여 5분, 30분, 1시간, 2시간, 4시간 및 7일 후에 혈액을 채취하였다. 혈청은 측정 때까지 -80℃ 이하에서 보관하였다. 검사된 Crossmab 항체는 IgG1이 포함된 부모 CKL003 및 pI 향상된 Fc가 포함된 CKL003-SG1099이었다. 생쥐 혈청 내 총 인간 CCL2 및 항-CCL2 항체 농도의 측정을 상기 기재된 바와 같이 수행하였다 (표 4 다음의 "생쥐에서 이중파라토프 항체를 이용한 인간 CCL2 면역 복합체 스위핑의 평가" 하에).

[1174] 결과는 도 7b에 나타나 있다: hCCL2 및 CKL003 (IgG1 야생형 Fc 포함) 또는 CKL003-SG1099 (향상된 pI Fc 포함 CKL003)로 구성되는 미리 형성된 면역 복합체를 SCID 생쥐에 주입한 후 시간의 추이에서 hCCL2의 혈청 농도. Fc 치환 Q311R/P343R (EU Kabat 넘버링)을 포함하는 CKL003-SG1099는 IgG1을 포함하는 CKL003에 비해 인간 CCL2의 더 빠른 청소/감소를 보여주었다. 이는 pI 증가 돌연변이를 갖는 pH 의존성 이중파라토프 항체가 CCL2의 청소를 가속화할 수 있음을 입증한다.

[1175] **Fc감마RIIb 향상된 Fc 변이체 및 추가 Fc 변형을 갖는 이중파라토프 항-CCL2 항체의 생성**

[1176] 본 실시예에서는 CCL2 청소를 향상시키기 위한 Fc 조작이 설명된다.

[1177] Fc감마RIIb에 대해 증가된 친화성을 나타내는 Fc 도메인을 포함하는 항원 결합 분자 (예를 들면 항체)의 투여에 의해 가용성 항원의 청소가 향상될 수 있다는 것이 WO 2013/125667에서 입증되었다. 또한, 인간 Fc감마RIIb에 대한 향상된 결합을 나타낼 수 있는 Fc 변이체는 WO 2012/115241 및 WO 2014/030728에 예시되어 있다. 이들 Fc 변이체는 인간 Fc감마RIIb에 대한 선택적으로 향상된 결합 및 다른 활성 Fc 감마 수용체 (Fc 감마 R)에 대한 감소된 결합을 나타낼 수 있다는 것도 설명되었다. Fc감마RIIb 결합의 이러한 선택적 향상은 가용성 항원의 청소 뿐만 아니라 바람직하지 않은 이펙터 기능 및 면역 반응의 위험을 감소시키는 데에도 유리할 수 있다.

[1178] 항체 약물을 개발하려면 해당 약물이 약리학적으로 활성을 나타내는 비인간 동물을 대상으로 유효성, 약동학, 안전성을 평가해야 한다. 인간에게만 활성이 있는 경우에는 대리 항체의 이용과 같은 대체 접근법을 고려해야 한다 (Int. J. Tox. 28: 230-253 (2009)). 그러나 대리 항체를 이용하여 인간에서 Fc 영역과 Fc 감마 R 사이의 상호작용 효과를 정확하게 예측하는 것은 쉽지 않을 것인데, 그 이유는 비인간 동물에서 Fc 감마 R의 발현 패턴 및/또는 기능이 인간에서와 항상 동일한 것은 아니기 때문이다. 비인간 동물에서 얻은 결과가 인간에게 외삽될 수 있도록, 항체 약물의 Fc 영역은 비인간 동물, 특히 Fc 감마 R의 발현 패턴과 기능이 인간과 유사한 시노물구스 원숭이에 대해 교차반응성을 갖는 것이 바람직할 것이다.

[1179] 이중특이적 항-CCL2 항체의 다음 IgG1 불변 도메인/Fc 변이체는 Fc 부분 (EU Kabat 넘버링)의 위치에서 돌연변이를 이용하여 생성되었다 (Crossmab로서).

[1180] SG1095 - 아래의 돌연변이 (Kabat EU 넘버링)를 포함하는 IgG1에서 유래됨:

[1181] -L235W/G236N/H268D/Q295L/A330K/K326T (인간 FcγRIIb에 대한 친화성을 증가시키고 다른 인간 FcγR에 대한 친화성을 감소시키는 데 적합함);

[1182] -Q311R/P343R (항원의 흡수를 향상시키기 위해 등전점 (pI)을 증가시키는 데 적합함);

[1183] -N434A (항체의 더 긴 혈장 반감기를 위해 FcRn에 대한 친화성을 증가시키는 데 적합함); 그리고

[1184] -Q438R/S440E (류마티스 인자 결합을 억제하는 데 적합함)

[1185] SG1099 - 아래의 돌연변이 (Kabat EU 넘버링)를 포함하는 IgG1로부터 유래됨:

[1186] Q311R/P343R (항원의 흡수를 향상시키기 위해 pI를 증가시키는 데 적합함)

[1187] SG1100 - 아래의 돌연변이 (Kabat EU 넘버링)를 포함하는 IgG1로부터 유래됨:

- [1188] -Q311R/ P343R (항원의 흡수를 향상시키기 위해 pI를 증가시키는 데 적합함);
- [1189] -N434A (항체의 더 긴 혈장 반감기를 위해 FcRn에 대한 친화성을 증가시키는 데 적합함); 그리고
- [1190] -Q438R/S440E (류마티스 인자 결합을 억제하는 데 적합함)
- [1191] GG01 - 아래의 돌연변이 (Kabat EU 넘버링)를 포함하는 IgG1로부터 유래됨:
- [1192] -L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K (인간 FcγRIIb에 대한 친화성을 증가시키고 다른 인간 FcγR에 대한 친화성을 감소시키는 데 적합함);
- [1193] -Q311R/P343R (항원의 흡수를 향상시키기 위해 등전점 (pI)을 증가시키는 데 적합함);
- [1194] -N434A (항체의 더 긴 혈장 반감기를 위해 FcRn에 대한 친화성을 증가시키는 데 적합함); 그리고
- [1195] -Q438R/S440E (류마티스 인자 결합을 억제하는 데 적합함)
- [1196] GG02 - 아래의 돌연변이 (Kabat EU 넘버링)를 포함하는 IgG1로부터 유래됨:
- [1197] -L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K (인간 FcγRIIb에 대한 친화성을 증가시키고 다른 인간 FcγR에 대한 친화성을 감소시키는 데 적합함);
- [1198] -Q311R/P343R (항원의 흡수를 향상시키기 위해 등전점 (pI)을 증가시키는 데 적합함);
- [1199] -M428L/N434A/Y436T (항체의 더 긴 혈장 반감기를 위해 FcRn에 대한 친화성을 증가시키는 데 적합함); 그리고
- [1200] -Q438R/S440E (류마티스 인자 결합을 억제하는 데 적합함)
- [1201] GG03 - 아래의 돌연변이 (Kabat EU 넘버링)를 포함하는 IgG1 (SG1 -IgG1 알로타입)로부터 유래됨:
- [1202] -L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K (인간 FcγRIIb에 대한 친화성을 증가시키고 다른 인간 FcγR에 대한 친화성을 감소시키는 데 적합함);
- [1203] -Q311R/P343R (항원의 흡수를 향상시키기 위해 등전점 (pI)을 증가시키는 데 적합함);
- [1204] -N434A (항체의 더 긴 혈장 반감기를 위해 FcRn에 대한 친화성을 증가시키는 데 적합함); 그리고
- [1205] -Q438R/S440E (류마티스 인자 결합을 억제하는 데 적합함)
- [1206] GG04 - 아래의 돌연변이 (Kabat EU 넘버링)를 포함하는 IgG1 (SG1 -IgG1 알로타입)로부터 유래됨:
- [1207] -L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K (인간 FcγRIIb에 대한 친화성을 증가시키고 다른 인간 FcγR에 대한 친화성을 감소시키는 데 적합함);
- [1208] -Q311R/P343R (항원의 흡수를 향상시키기 위해 등전점 (pI)을 증가시키는 데 적합함);
- [1209] -M428L/N434A/Y436T (항체의 더 긴 혈장 반감기를 위해 FcRn에 대한 친화성을 증가시키는 데 적합함); 그리고
- [1210] -Q438R/S440E (류마티스 인자 결합을 억제하는 데 적합함)
- [1211] 변형된 가변 도메인 및 CDR (이온 의존성/pH 의존성 결합)을 갖고 Fc 매개 스위핑이 있거나 없는 이중특이적 항-CCL2 항체의 기능적 특성화
- [1212] Crossmab 형식의 CKL02의 Fc 변이체 SG1095, GG01, GG02, GG03 /04의 SPR 결합
- [1213] Biacore 8K 기기의 SPR 분석에서 4개의 서로 다른 항체 P1AD8325 (CKL02-SG1095), P1AF8137 (CKL02-GG01), P1AF8139 (CKL02-GG02) 및 P1AF8140 (CKL02-GG03/04)에 대한 단량체성 인간과 cyno CCL2의 결합이 pH 7.4와 5.8에서 조사되었다.
- [1214] 이 설정에서는 CaptureSelect™ 인간 Fab-카파 (ThermoFisher Scientific)를 아민 커플링 방법을 이용하여 CM3 센서 칩에 고정하고, 다양한 항체를 리간드로서 포획하고, 두 가지 다른 pH 값에서 0, 10, 100 및 1000 nM 단량체성 인간 또는 cyno CCL2를 분석물로 이용하여 측정을 수행하였다.
- [1215] CKL02-SG1095, CKL02-GG01, CKL02-GG02, CKL02-GG03/04는 10, 100 및 1000 nM에서 결합하고 pH 7.4에서 동일하게 빠르게 해리하는 단량체성 인간과 cyno CCL2에 대해 거의 동일한 결합 프로필을 보여주는 반면, pH 5.8에서는 안정적인 결합이 관찰되지 않았다. 결과는 아래 표에 나타나 있다.

[1216] 표: CKL02-SG1095, CKL02-GG01, CKL02-GG02, CKL02-GG03/04의 단량체성 인간과 cyno CCL2에 대한 결합은 단량체성 인간과 cyno CCL2에 대한 거의 동일한 결합 프로필을 보여준다.

| 항체            | 항원             | R <sub>max</sub> (RU) @ pH 7.4 | t 1/2 (s) @ pH 7.4 | R <sub>max</sub> (RU) @ pH 5.8 | t 1/2 (s) @ pH 5.8 |
|---------------|----------------|--------------------------------|--------------------|--------------------------------|--------------------|
| CKL02-GG01    | 단량체성 인간 CCL2   | 15.9                           | 6.18               | 29.8                           | 3.29               |
| CKL02-GG02    | 단량체성 인간 CCL2   | 16.8                           | 4.04               | 28.8                           | 3.29               |
| CKL02-GG03/04 | 단량체성 인간 CCL2   | 17.6                           | 5.90               | 29.6                           | 3.24               |
| CKL02-SG1095  | 단량체성 인간 CCL2   | 19.0                           | 5.49               | 35.3                           | 3.51               |
| CKL02-GG01,   | 단량체성 cyno CCL2 | 16.5                           | 7.10               | 30.7                           | 3.22               |
| CKL02-GG02,   | 단량체성 cyno CCL2 | 17.2                           | 5.97               | 29.5                           | 3.14               |
| CKL02-GG03/04 | 단량체성 cyno CCL2 | 17.9                           | 6.48               | 30.4                           | 3.12               |
| CKL02-SG1095  | 단량체성 cyno CCL2 | 19.5                           | 6.07               | 36.0                           | 3.41               |

[1217]

#### [1218] 화학주성 분석

##### [1219] 방법 설명

[1220] THP-1 세포를 최대 8x10E5개 세포/ml까지 3일 동안 배양하였다. 5000개 세포/웰의 총 세포 수를 마이크로역가 평판의 상부 챔버에 과중하고 37℃에서 정치시켰다. 제조합 huCCL2는 항-CCL2 항체 존재 여부에 관계없이 50 ng/ml의 최종 농도로 하부 챔버에 피펫팅되었다 (대리 항체를 검사하기 위해 분석을 수행한 경우, 제조합 muCCL2 100 ng/ml이 대신 이용됨). 기포의 형성을 피하면서 상부 및 하부 챔버를 모은 다음 평판을 37℃에서 24 시간 동안 인큐베이션하였다. 이동된 세포는 제조업체의 권장 사항에 따라 Cell Titer Glo 방법으로 정량화하고 Tecan Infinite 200 판독기를 이용하여 발광성을 측정하였다.

[1221] 결과는 도 8에 나타나 있다: 화학주성 분석: 동일한 CDR 및 가변 영역 VH/VL, 즉 CKL02-IgG1 야생형 및 CKL02-SG1095를 갖지만 Fc 모이어티는 상이한 이중특이적 항-CCL2 항체는 동일한 효능으로 THP-1 세포의 이동을 억제 할 수 있다 (IC<sub>50</sub> = 0.2 µg/ml; 도 8, 왼쪽 패널).

[1222] 유사하게, pH 의존성이 아닌 CKL02의 부모 VH/VL-비변형 이중특이적 항체 CNT0888/11k2인 CCL2-0048도 0.2 µg/ml의 IC<sub>50</sub>을 나타내는데, 그 이유는 pH 의존성이, 이 분석에서는 발생하지 않는 현상인 항원 스위핑에 중요하기 때문이다.

[1223] 해당 단일파라토프 항체 CNT0888 IgG1 및 인간화 11k2 IgG1은 각각 0.3 및 0.7 µg/ml의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내는 반면, huIgG1 아이소타입 대조는 억제를 나타내지 않는다 (도 8, 오른쪽 패널).

[1224] 추가적인 유사한 실험에서 CKL02-GG01 (0.2 µg/ml), CKL02-GG02 (0.2 µg/ml) 및 GG03/GG04 (0.3 µg/ml)의 IC<sub>50</sub> 값이 결정되었다.

#### [1225] 유전자 변형 생쥐 모형에서 생체내 생물학적 활성

##### [1226] 재료 및 방법

##### [1227] B16-huCCL2/CCL2-널 모형

[1228] 본 모형은 면역 적격성 종양 보유 생쥐에서 생쥐 CCL2의 간접 없이 항인간 CCL2 항체를 검사할 목적으로 생성되었다. 이를 위해 mCCL2를 분비하지 않고 CCL2 녹아웃 생쥐의 유전적 배경인 C57/B16 계통의 생쥐에서 생체내에서 성장하는 것으로 알려진 생쥐 종양 세포주 B16-F10이 선택되었다.

[1229] huCCL2를 발현하는 B16F10 종양 세포의 안정된 풀을 생성하기 위해, 이들을 huCCL2를 인코딩하는 플라스미드

DNA 및 히그로마이신-B 선택 카세트로 형질감염시켰다. 따라서 세포를 성장 배지 (DMEM + 10% FCS + 2 mM L-글루타민)에 2.0E+05개 세포/웰로 6-웰 평판에 파종하였다. 24 시간 후 Opti-MEM 배지 내 리포팩타인 2000 및 웰당 1 µg DNA로 구성된 형질감염 혼합물을 세포에 첨가하였다. 이어서, 세포를 히그로마이신-B (0.5 mg/ml)를 함유하는 배지를 이용하여 선택하였다. 20일 동안 배양한 후 살아있는 단일 세포를 BD FACS Aria III을 이용하여 FSC/SSC-산란을 기준으로 하여 분류하였다. 12일 후, 야생형 B16F10 세포와 비교하여 ebioscience로부터의 ELISA Ready-SET-Go (Cat# 88-7399-86)를 이용하여 인간 CCL2의 발현에 대해 단일 세포 클론으로부터의 세포 배양 상층액을 스크리닝하였다 (데이터는 표시되지 않음).

[1230] 선택된 B16-F10\_HOMSA\_CCL2 종양 세포 클론 1A5, 2A3 및 2B2를 5% CO<sub>2</sub>의 물 포화 분위기에서 37°C에서 10% FCS 및 2 mM L-글루타민 (PAN Biotech GmbH, Germany)을 함유하는 DMEM에서 일과적으로 배양하였다. 배양 계대는 트립신/EDTA 1x (PAN Biotech GmbH, Germany)를 주 2회 분할하여 수행하였다.

[1231] 도착 시 7-10주령의 암컷 B6.129S4-Ccl2tm1Rol/J 생쥐 (Jackson Laboratories)에 B16-F10\_HOMSA\_CCL2 종양 세포 클론을 접종하였다. 당일 (연구 0일차)에, 종양 세포를 배양 플라스크로부터 수확하고 배양 배지로 옮기고 1회 세척한 후 PBS에 재현탁하였다. 세포 수는 세포 계수기 및 분석기 시스템 (Vi-CELL, Beckman Coulter)을 이용하여 결정되었다. s.c. 주사의 경우 세포 역가를 1×10E7개 세포/ml로 조정하고, 100 µl를 냉각된 1.0ml 투베르쿨린 주사기 (Dispomed, Germany) 및 작은 바늘 (0.45x12mm)을 이용하여 생쥐의 오른쪽 옆구리에 피하 주사하였다. 세포 접종은 소형 동물용 흡입 장치에서 이소플루란 (CP Pharma, Germany)에 의한 전신 마취 하에 수행되었다.

[1232] 종양 성장을 매일 모니터링하고 B16-F10\_HOMSA\_CCL2 종양 세포 클론 1A5 및 2A3에 대해 종양이 약 1000 mm<sup>3</sup>에 도달했을 때인 연구 15일차에 생쥐를 희생시켰다 (이 시점에서 2B2 종양은 더 느린 성장 속도로 인해 약 600 mm<sup>3</sup>이었다). 종결점에서, CCL2 측정을 위해 혈액 샘플을 채취하였고, 위에서 설명한 대로 종양을 적출하고 유세포 분석법으로 분석하였다.

[1233] 생쥐 면역 세포가 모든 종양에 침투하는 것으로 밝혀졌으며, 인간 CCL2가 생쥐 CCR2+ 세포를 유인할 수 있다는 개념이 확인되었다. B16-F10\_HOMSA\_CCL2 종양 세포 클론 1A5는 가장 높은 상대 mMDSC (단핵구 골수 유래 억제 세포) 조성을 갖는 가장 높은 CD45+ 총 침윤을 나타냈다 (도 2). 2A3 세포는 1A5 세포와 유사한 수준의 혈청 총 CCL2를 유도하는 반면, 2B2 클론은 훨씬 낮은 CCL2 혈청 농도를 나타내긴 하지만, 클론 2A3 및 2B2는 종양에서 면역 세포의 빈도가 더 낮았다 (데이터는 표시되지 않음).

[1234] 위에서 설명한 대로 암컷 B6.129S4-Ccl2tm1Rol/J 생쥐에 B16-F10\_HOMSA\_CCL2 종양 세포 클론 1A5를 접종하였다.

[1235] 연구 군의 치료는 세포 접종 5일 후에 시작되었다. 군 1은 인간 IgG 운반제 대조 치료를 받은 반면, 군 2 및 3은 Mab CKL02-IgG1 (Fc 야생형 IgG1) 및 CKL02-SG1099 (돌연변이 Q311R/P343R (Kabat EU 넘버링)을 갖는 IgG1 기반의 CKL02 pI 향상된 Fc)로 i.p. 치료되었다 (각각 9일 동안 매일 3.7 mg/kg으로). 연구 14일차에 생쥐를 죽이고 종양을 적출하였다. 효소 소화 및 세포 스트레이너를 이용하여 각 종양 덩어리로부터 단일 세포 현탁액을 생성하고 유세포 분석법에 의해 풀링되지 않은 상태로 분석하였다. 관심 있는 면역 세포 모집단의 검출을 위해 다음 마커 및 형광색소가 이용되었다: CD45-BUV395, CD11b-BUV737, F4/80-BV421, CD11c-BV605, Ly6C-AF488, Ly6G-PerCP-Cy5.5, CD206-BV711, CD4-BV510, CD8a-APC-H7, NK1.1-PE-Cy7, CD279-APC 및 CD274-PE. 샘플은 BD LSR-Fortessa 유세포 분석기로 획득하고 BD Diva 소프트웨어를 이용하여 분석하였다.

[1236] 총 및 자유 huCCL2를 측정하기 위해 연구 6일, 8일, 11일 및 14일차에 혈청 샘플을 채취하였다.

[1237] 자유 CCL2를 검출하는 방법은 아래의 "시노물구스 원숭이에서 CCL2 스위핑 효율에 대한 개념 증명 연구" 하에 자세히 설명되어 있다. 본 연구에서 자유 인간 CCL2의 분석을 위해 재조합 시노물구스 CCL2를 재조합 인간 CCL2로 대체하여 교정물질과 QC를 준비하였다.

[1238] 총 CCL2 혈청 샘플은, 검증되지 않았지만 적격한 특정 샌드위치 ELISA로 분석되었다. 간단히 말하면, 비오티닐화된 항-CCL2 포획 항체 (CNT0888 CCL2-0004), 차단 완충액, 전처리된 검사 샘플 및 검출 시약 (디곡시제닌화된 항-CCL2 항체 (M-1H11-IgG))을 384-웰 스트렙타비딘 코팅된 마이크로역가 평판에 단계적으로 첨가하고 각 단계마다 1시간 동안 비강력 진탕기에서 인큐베이션하였다. 전처리 단계 샘플에서 CCL2-약물 복합체를 해리하기 위해 교정물질 또는 QC를 pH 5.5, 37°C에서 10분 동안 산성화하였다. 산성화된 샘플을 SA-MTP에 첨가하였다. 고정된 면역 복합체의 검출을 위해, 다중클론 항-디곡시제닌-POD 접합체를 첨가하고 평판을 60분 동안 인큐베이션하였다. 결합되지 않은 물질을 제거하기 위해 각 단계 후에 평판을 3회 세척하였다.

- [1239] ABTS를 평판에 첨가하고 진탕하면서 실온에서 인큐베이션하였다. 흡수는 405/490 nm 파장에서 측정되었다. 인간 CCL2 농도는 분석 소프트웨어 XLFit (IDBS)를 이용하여 교정 곡선의 반응에 기초하여 계산되었다.
- [1240] 통계적으로 분석되는 데이터 세트에 따라 다중 비교를 위해 Tukey 검정과 함께 t 검정 또는 일원 분산 분석이 적용되었다.
- [1241] 결과
- [1242] 연구 종료 시점에, CKL02-SG1099 (CKL02 pI 향상된 Fc)를 제공받은 생쥐에서 종양 용적과 종양 무게가 크게 감소하였다 (도 9). 종양 침윤을 자세히 살펴보면 CCL2 차단 시 예상된 바와 같이 단핵구 골수 유래 억제 세포 (M-MDSC)의 종양 침윤이 감소한 것으로 나타났다 (도 9).
- [1243] 또한, 혈청 분석을 통해 치료법의 효능이 확인되었다: pI 최적화는 실제로 IgG1 야생형 Fc CKL02 분자와 비교하여 총 CCL2의 축적을 감소시키는 반면, 자유 CCL2 (항체에 결합되지 않음)는 검출 한계 내에서 완전히 억제된다 (도 10). 따라서, 본 모형은 항-huCCL2 이중파라토프 스위핑 항체 CKL02-SG1099 (CKL02 pI 향상된 Fc)를 이용하여 종양 상황에서 CCL2 차단 효과의 효과를 조사하는 데 적합화된다. 후속 연구에서 CKL02-SG1099 (CKL02 pI 향상된 Fc)가 저용량으로 주 1회 또는 2회 투여되고 자유 CCL2 억제의 확장이 몇 주에 걸쳐 모니터링되는 최적 투약 요법이 조사된다. 또한, T 세포 활성화 요법 (즉, T 세포 이중특이적, PD-L1 차단)과의 조합도 이 모형에서 탐구된다.
- [1244] 추가적인 유사한 실험에서는 CKL02-SG1095, CKL02-GG01, GG02 및 GG03/GG04와 같은 다른 변이체를 분석한다.
- [1245] 시노물구스 원숭이에서 CCL2 스위핑 효율에 대한 개념 증명 (POC) 연구
- [1246] **방법.** 본 연구의 주요 목적은 시노물구스 원숭이에서 4개의 항-CCL2 (MCP-1) 항체의 CCL2 억제와 스위핑 효율의 연장을 평가하는 것이었다. 이차 목적은 이들 항체의 약동학적 (PK) 특성을 평가하는 것이었다. 모든 항체는 3-4세 수컷 동물에게 30분에 걸쳐 25 mg/kg의 단위 IV 주입으로 투여되었고, 총 CCL2 및 항체 농도는 70일에 걸쳐 혈청에서 측정되었다. 연구된 항-CCL2 항체는 대조 항체 (군 1 및 2)뿐만 아니라 CCL2-약물 복합체의 향상된 제거를 제공하도록 특별히 조작된 항체로 구성되었다 (이하 항원 스위핑 또는 간단히 스위핑으로 지칭됨). 군 1: 최대 총 CCL2 축적의 대조로서 CNT0888-SG1 (= IgG1 야생형) 항-CCL2 항체 (n=3마리 동물); 군 2: pH 의존성 표적 결합은 있지만 Fc 변형은 없는 이중파라토프 항-CCL2 항체 CKL02-SG1 (IgG1 야생형) (n=3); 군 3: pH 의존성 표적 결합, Fc-pI 및 추가 변형을 갖는 이중파라토프 항-CCL2 항체 CKL02-SG1100 (n=4) 및 군 4: pH 의존성 표적 결합, Fc-pI 및 Fc $\gamma$ R II 및 추가 변형을 갖는 이중파라토프 항-CCL2 항체 CKL02-SG1095 (n=4).
- [1247] 본 연구에서는 항체의 총 혈청 농도, 총 (자유 및 항체 결합 CCL2) 및 자유 표적을 정량화하였다. 또한, 항약물 항체 (ADA)의 존재를 평가하였다. 항체, 총 및 자유 CCL2 프로파일은 Phoenix 64 (Pharsight/Certara)를 이용하여 비구획 분석으로 분석하였다; 데이터는 GraphPad Prism v. 6.07 (GraphPad Software)을 이용하여 설명되었다.
- [1248] 이들 항체에 대해 일반적인 인간 샌드위치 ELISA 방법을 이용하여 혈청 샘플을 분석하였다. 원숭이 혈청 내 총 항체 농도를 ELISA로 측정하였다. 2  $\mu$ g/mL의 항인간 카파 사슬 항체를 하룻밤 동안 maxisorp 96-웰 평판에 고정한 후 차단 완충액에서 30°C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 항체 교정 곡선 샘플, 품질 관리 샘플 및 원숭이 혈청 샘플을 세척 전 평판에서 30°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 다음으로, 항인간 IgG-HRP를 첨가하고, 세척 전 30°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. ABTS 기질은 405 nm에서 마이크로평판 판독기로 검출하기 전에 10, 20 및 30분 동안 인큐베이션되었다. 항체 농도는 분석 소프트웨어 SOFTmax PRO (Molecular Devices)를 이용하여 교정 곡선의 반응에 기초하여 계산되었다.
- [1249] 총 CCL2 혈청 샘플은, 검증되지 않았지만 적격한 특정 샌드위치 ECL 방법 분석으로 분석되었다. 3  $\mu$ g/mL의 항-CCL2 항체 (r2F2-SG1)를 MULTI-ARRAY 96-웰 평판 (Meso Scale Discovery)에 하룻밤 동안 고정한 후 차단 완충액에서 30°C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 시노물구스 원숭이 CCL2 교정 곡선 샘플, 품질 관리 샘플 및 희석된 시노물구스 원숭이 혈청 샘플을 pH5.5 산 완충액과 함께 37°C에서 10분 동안 배양하였다. 그 후, 샘플을 세척 전 30°C에서 1시간 동안 항-CCL2 고정 평판에서 인큐베이션하였다. 다음으로, SULFO TAG 표지 MCP-1 항체를 첨가하고 세척 전 30°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 판독 완충액 T (x4) (Meso Scale Discovery)를 즉시 평판에 첨가하였고, SECTOR Imager 2400 (Meso Scale Discovery)에 의해 신호를 검출하였다. 시노물구스 원숭이 CCL2 농도는 분석 소프트웨어 SOFTmax PRO (Molecular Devices)를 이용하여 교정 곡선의 반응에 기초하여 계산되었다.

- [1250] 자유 CCL2 혈청 샘플은, Gyrolab Xplore에서 실행되는 검증되지 않았지만 적절한 Gyrolab™ 면역분석법을 이용하여 분석되었다. 비오티닐화된 항-CCL2 항체 (M-2F6-IgG)를 포획 시약으로 이용하였고, 검출을 위해 Alexa647 표지 항-CCL2 항체 (M-1H11-IgG)를 선택하였다. 두 시약 모두 PBS, 0.1% Tween, 1%BSA에서 1 µg/mL로 희석하고 96-웰 PCR 평판 (Fisher Scientific)로 이전하였다. 시노물구스 원숭이 CCL2 교정 곡선 샘플, QC 및 희석되지 않은 혈청 샘플 역시 96-웰 PCR 평판으로 이전하였다. 두 평판 모두 Gyrolab Bioaffy 200 nl 디스크 (Gyros Protein Technologies AB)와 함께 기기에 로딩되었다. 3단계 분석 프로토콜 (200-3W-001)이 선택되었다. 간단히 말하면, 이 프로토콜은 Gyrolab Bio Affy 200 디스크의 지정된 스트렙타비딘 칼럼에 포획 시약, 샘플 및 검출 시약의 순차적인 첨가를 설명한다. 디스크에 짧은 회전 단계가 적용된 후 각 시약이 동시에 칼럼에 도달한다. 각 단계 후에 칼럼을 PBS 0.05% Tween으로 세척하고 마지막으로 레이저 유도된 형광 값을 기기 내에서 기록하였다. 자유 시노물구스 원숭이 CCL2 농도는 XL Fit 소프트웨어 (IDBS)를 이용하여 교정 곡선의 반응에 기초하여 계산되었다.
- [1251] ADA는 다른 곳에서 설명된 방법을 이용하여 분석되었다 (Stubenrauch et al., 2010). 요약하면, 비오티닐화된 mAb 항인간 Fcγ-범 R10Z8E9를 스트렙타비딘 코팅된 높은 결합 평판에 0.5 µg/mL의 농도로 결합시키고 1시간 동안 인큐베이션하였다. 샘플 및 표준을 5% 시노물구스 원숭이 혈청에 대한 분석 완충액으로 희석하고 세척 후 코팅된 평판의 각 웰에 첨가하고 진탕하면서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 0.1 µg/mL의 디곡시제닌화된 항-시노물구스(cyno) IgG를 첨가하고 진탕하면서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 25 mU/mL의 다중클론 항-디곡시제닌-HRP 접합체를 첨가하고 진탕하면서 1시간 동안 인큐베이션하였다. ABTS를 평판에 첨가하고 진탕하면서 실온에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 흡수는 405/490 nm 파장에서 마이크로평판 판독기로 측정되었다. ADA 농도는 분석 소프트웨어 SOFTmax PRO (Molecular Devices)를 이용하여 교정 곡선의 반응에 기초하여 계산되었다.
- [1252] **결과.** PK 행동은 동물에서 ADA가 없는 기간 동안 (즉, 14일차 이전) 평가되었다. 이 기간 동안 모든 항-CCL2 항체의 혈청 농도 시간 프로파일은 유사하였고 (도 11 왼쪽 패널 참조), 부분 평균 AUC 값 ( $AUC_{0-7d}$ )은 군 1, 2, 3, 4에 대해 각각 1490, 1810, 1210 및 1320일. µg/mL로 서로 다른 군 간에 유사하였다. 유사하게, 평균  $C_{max}$  값은 군 1, 2, 4 및 4에 대해 각각 620, 764, 616 및 664 µg/mL의 값으로 유사하였다. ADA 발달의 정도는 동물 및 군 사이에 매우 가변적이었고 7일차 이후에도 매우 가변적인 PK 프로파일 나타났다 (데이터는 표시되지 않음). 군 2의 동물 한 마리는 70일의 전체 관찰 기간 내내 ADA 음성이었다 (도 11 오른쪽 패널 참조). 이 동물에서 항-CCL2 항체의 청소율, 분포 용적 및 종말 반감기는 비구획 분석에 의해 각각, 7.34 mL/(일.kg), 76.2 mL/kg 및 10.9일로 추정되었다.
- [1253] 항체 치료가 시작되기 전에 각 동물에 대해 혈청 내 CCL2의 기준 수준을 평가하였다. 기초 CCL2 수준은 0.126 내지 0.357 ng/mL (기하 평균 (%CV): 0.199 ng/mL (32.2%, N=14))의 범위 안에 있었다. 자유 형태의 CCL2가 항체 결합 형태의 CCL2보다 제거율이 높기 때문에, 항체 치료 후 총 CCL2 혈청 농도의 증가가 예상되었다. 이는 실제로 모든 군에서 관찰되었는데 (도 12 왼쪽 패널), 이는 모든 항체에 의한 표적 참여를 입증한다. 치료 중 총 CCL2의  $C_{max}$  값은 군 1, 2, 3 및 4에 대해 각각 824, 575, 106, 32.7 ng/mL로 증가하였다.  $AUC_{0-7d}$  값은 군 1, 2, 3 및 4에 대해 각각 3060, 2970, 522 및 181 일.ng/mL이었다. 동물이 ADA 음성인 기간 동안, 몰 약물 농도는 총 CCL2 농도를 초과하여 유지되었다. 2개의 스위핑 항-CCL2 항체 (군 3 및 4)는 기준 항체 (군 1)에 비해 총 CCL2 혈청 농도가 각각, 혈청  $C_{max}$  값을 기준으로 대략 8배 및 25배, 그리고 총 CCL2의  $AUC_{0-7d}$  값을 기준으로 대략 6배 내지 17배 감소한 것으로 나타났다. 군 2의 ADA 음성 동물은 총 CCL2 농도의 지속적인 표적 참여 (안정기에 의해 명백함)를 나타냈다 (도 12 오른쪽 패널).
- [1254] 모든 항체를 이용한 치료는 혈청 내 자유 CCL2 수준의 실질적인 감소를 야기하지만 (도 13 왼쪽 패널), 감소는 처음에는 단지 부분적으로만 이루어졌다. 군 1에서 모든 개체는 1일 후에 다시 정량화 가능한 수준의 자유 CCL2를 가졌다. 군 2에서 모든 개체는 2일 후에 다시 정량화 가능한 수준의 자유 CCL2를 가졌다. 군 3과 4에서는 각 군의 두 개체가 7일 동안 자유 CCL2의 억제를 나타냈다. 군 3에서는 충분한 항체 농도를 유지하면서 중간 정도의 ADA 반응을 보인 두 마리의 동물이 21일 동안 검출 한계 미만의 자유 CCL2 억제를 나타냈다. ADA 양성 동물에서는 항체 제거가 상당히 증가하였으며 표적 참여 상실의 결과로 CCL2 수준이 그들의 원래 기준선으로 빠르게 회복되었다 (여기에는 표시되지 않음).
- [1255] 추가적인 유사한 실험에서는 CKL02-SG1099, CKL02-GG01, GG02 및 GG03/GG04와 같은 다른 변이체를 분석한다.
- [1256] 시노물구스 원숭이에서 CCL2 스위핑 효율에 대한 PK/PD 연구

- [1257] **연구 개요와 목적.** PK/PD 연구는 항-CCL2 항체 CKL02-SG1095를 이용한 POC 연구 결과를 기반으로 설계되었다. POC 연구에서 높은 수준의 항약물 항체 (ADA) 형성이 입증되었으므로, Gazyva® (오비니투주맙) 치료제가 ADA 반응을 감소시키기 위한 의도로 PK/PD 연구에 포함되었다. 이를 위해 연구 기간 동안 4회 (-14일, -7일, 8일 및 36일차에) 가지바 30 mg/kg 용량을 정맥내 주입으로 투여하였다. CKL02-SG1095는 1일차에 30분에 걸쳐 IV 주입으로 용량군마다 4마리의 동물 (수컷과 암컷 2/2)에게 2.5, 10 및 25 mg/kg 용량 수준으로 투여하였다 (군 1-3). 비교를 위해 기존의 항-CCL2 항체 (CNT0888-IgG1)를 1일차에 30분에 걸쳐 IV 주입으로 25 mg/kg으로 투여하였다 (군 4; 위에서 설명한 POC 연구의 군 1과 동일한 대조). 총 PK (CKL02-SG1095), 총 및 자유 CCL2 농도를 99일차 (즉, 투여 후 14주)까지 평가하였다.
- [1258] PK/PD 연구의 목적은 비인간 영장류에서 기존의 항-CCL2 항체 (야생형 IgG1 Fc 부분이 있는 CNT0888)와 비교하여 CKL02-SG1095의 자유 CCL2 억제 기간이 연장되었음을 입증하는 것이었다.
- [1259] **방법.** 본 연구에서는 총 PK뿐만 아니라 총 및 자유 CCL2를 정량화하였다. 그러나 혈청 샘플에 가지바가 존재하기 때문에, 여기에 설명된 POC 연구와 비교하여 총 PK 분석, 총 CCL2 분석 및 ADA 분석에 일부 수정이 이루어졌다. CNT0888 IgG1의 경우에는 PK 분석이 개발되지 않았다.
- [1260] 원숭이 혈청 내 총 항체 CKL02-SG1095의 농도를 ELISA로 측정하였다. ELISA 비오틴화된 재조합 인간 CCL2 (항원)의 경우, 전처리된 검사 샘플, 양성 대조 표준 (교정물질) 또는 QC (품질 관리) 및 디곡시제닌화된 항인간 IgG (M-1.19.31-IgG)를 384 웰 스트랩타비딘 코팅된 마이크로역가 평판 (SA-MTP)에 연속적으로 첨가하였다. CCL2-약물 복합체를 해리하기 위해 검사 샘플의 전처리를 pH 5.5에서 20분 동안 수행하였다. SA-MTP에 첨가하기 전, 산성화된 샘플을 중화시켰다. 고정된 면역 복합체는 다중클론 항-디곡시제닌-POD 접합체를 이용하여 검출되었다. 결합되지 않은 물질을 제거하기 위해 각 단계 후에 평판을 3회 세척하였다. ABTS를 기질로 평판에 첨가하고 실온에서 인큐베이션하였다. 흡수는 405/490 nm 파장에서 측정되었다. 항체 농도는 분석 소프트웨어 XLFit (IDBS)를 이용하여 교정 곡선의 반응에 기초하여 계산되었다.
- [1261] 총 CCL2 혈청 샘플은, 검증되지 않았지만 적절한 특정 샌드위치 ELISA로 분석되었다. 간단히 말하면, 비오틴화된 항-CCL2 포획 항체\*, 전처리된 검사 샘플 및 검출 시약 (디곡시제닌화된 항-CCL2 항체 (1H11-IgG1))을 384-웰 스트랩타비딘 코팅된 마이크로역가 평판에 단계적으로 첨가하고, 포획 및 샘플 단계의 경우 1시간 및 검출 시약의 경우 50분 동안 비강력 진탕기에서 인큐베이션되었다. 전처리 단계 샘플에서 CCL2-약물 복합체를 해리하기 위해 교정물질 또는 QC를 pH 5.5에서 20분간 산성화하였다. 산성화된 샘플을 SA-MTP에 첨가하였다. 고정된 면역 복합체의 검출을 위해, 다중클론 항-디곡시제닌-POD 접합체를 첨가하고 평판을 50분 동안 인큐베이션하였다. 결합되지 않은 물질을 제거하기 위해 각 단계 후에 평판을 3회 세척하였다.
- [1262] ABTS를 평판에 첨가하고 진탕하면서 실온에서 인큐베이션하였다. 흡수는 405/490 nm 파장에서 측정되었다. 시노물구스 원숭이 CCL2 농도는 분석 소프트웨어 XLFit (IDBS)를 이용하여 교정 곡선의 반응에 기초하여 계산되었다. \*군 1-군 3의 분석용 포획 항체: 항-CCL2 CNT0888 IgG1, 군 4의 분석용 포획 항체: 항-CCL2 2F2 IgG1.
- [1263] ADA는 384-웰 평판에서 브리징 샌드위치 ELISA로 스크리닝되었다. 군 1, 2 및 3 동물의 검사 샘플, 품질 관리 샘플 및 양성 대조를 비오틴화 포획 항체 CKL02-SG1095 및 디곡시제닌화 검출 항체 CKL02-SG1095와 함께 2개의 추가 항 CCL2 항체 (2F6-IgG1 및 1H11-IgG1)와 함께 실온에서, MTP 진탕기에서 500rpm으로 하룻밤 동안 인큐베이션하였다; 이들 항체는 CCL2를 중화하기 위해 첨가되었다. 군 4 동물의 샘플에는 비오틴 표지화된 CNT0888-SG1 및 디곡시제닌화된 CNT0888-SG1이 각각 이용되었다. 형성된 면역 복합체를 스트랩타비딘 (SA) 코팅된 MTP로 이전하여 비오틴 표지 (Bi) 포획 항체를 통해 면역 복합체를 고정시켰다. 상층액을 흡입한 후 반복 세척을 통해 결합되지 않은 물질을 제거하였다. 항디곡시제닌 POD (p) 접합 항체 및 ABTS 기질 용액을 첨가하여 검출을 수행하였다. 반응의 색상 강도는 광도계로 결정되었다 (405 nm - 490 nm 기준 파장에서의 흡수). 신호가 평판 특정 차단점 위에 있는 것으로 밝혀지면 샘플은 ADA 양성으로 정의되었다. 이 차단점은 분석 적격성 평가 중에 정의되었다.
- [1264] **결과.** Gazyva® (오비니투주맙) 전처리에도 불구하고 CKL02-SG1095 치료 동물 12마리 중 10마리 및 CNT0888 치료 동물 4마리 중 1마리에서 약물 및 바이오마커 농도에 영향을 미치는 ADA가 발생하였다. 그러나 CKL02-SG1095에 대한 2마리의 ADA 음성 동물은 25 mg/kg 용량군에 속해 있어 CNT0888 군의 ADA 음성 동물과 직접 비교할 수 있었다. PK 행동은 동물에서 ADA가 없는 기간 동안 (즉, 10일차 전에) 평가되었다. CKL02-SG1095에 대한 3가지 다른 용량군의 PK 프로파일도 14의 왼쪽 패널에 나타나 있다. 부분 평균 AUC 값 ( $AUC_{0-7d}$ )은 용량 수준 2.5, 10

및 25 mg/kg에서 각각 229/191 (수컷/암컷), 696/813 및 1492/1346일.  $\mu\text{g/mL}$ 이었다.  $C_{\text{max}}$  값은 용량 수준 2.5, 10 및 25 mg/kg에 대해 각각 115/122 (수컷/암컷), 369/491 및 869/941  $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 최고 용량 수준에서 이러한 조사 결과는 POC 연구와 일치한다. 2마리의 ADA 음성 동물에 대해 CKL02-SG1095의 청소율, 분포 용적 및 종말 반감기는 비구획 분석에 의해 각각 10.5-17.4 mL/(일.kg), 116-118 mL/kg 및 5.8-11.6일로 추정되었다 (도 14 오른쪽 패널 참조).

[1265] 위에서 설명한 POC 연구의 경우, 항-CCL2 항체 치료 시 총 CCL2의 축적이 관찰되었다 (도 15 왼쪽 패널 참조). CCL2의 기준 수준은 약물 투여 전 5회 (Gazyva® (오비니투주맵) 치료 전 1회 포함) 평가되었다. 평균 CCL2 기준선 값은 0.742 ng/mL이었으며 Gazyva® (오비니투주맵) 치료는 기초 CCL2 수준에 영향을 미치지 않았다. 총 CCL2 축적 정도 (괄호 안의 값은 개별 기준선으로부터의 중간 배수 변화를 나타냄)는 용량 및 작제물에 따라 달라졌다. CKL02-SG1095의 경우 총 CCL2 수준은 2.5, 10 및 25 mg/kg 용량 수준에서 22.4 (22), 67.2 (105) 및 54.9 (76) ng/mL (4마리 동물의 중앙값)로 증가하였다. CNT0888 IgG1의 경우 총 CCL2 수준은 1490 (3160) ng/mL (4마리 동물의 중앙값)로 증가하였다. 군 3 및 4의 ADA 음성 동물 비교에서는 CNT0888에 비해 CKL02-SG1095에 대한 축적 수준이 훨씬 낮은 것으로 나타났다 (도 15 오른쪽 패널).

[1266] 모든 연구 군의 치료는 혈청 내 자유 CCL2 수준의 실질적이고 일시적인 감소로 이어졌다 (도 16 왼쪽 패널 참조; 전형적으로 검출 한계 (0.01 ng/mL) 미만). 모든 ADA 양성 동물의 경우 자유 CCL2 수준이 ADA 발병 후 빠르게 기준선 값으로 회복되었다 (약물 노출 손실 및 빠른 표적 전환과 일치). ADA 음성 동물 (군 3의 2/4) 및 (군 4의 3/4)의 경우 자유 CCL2 억제 기간이 연구 기간 내내 평가될 수 있었다. 기존 항체 CNT0888 (군 4)의 경우 CCL2 억제 기간이 짧았는데, 이는 전체 표적이 광범위하게 축적되었기 때문으로 추정된다 (도 15). 약물 농도가 정상화된 것 같지만 (CNT0888에 대해 이용 가능한 특정 분석이 없음), POC 연구는 CNT0888과 CKL02-SG1095 사이의 유사한 PK 특성을 시사한다. 반면에 군 3의 2마리 ADA 음성 동물의 경우 오래 지속되는 자유 CCL2 억제가 관찰되었다. 한 동물의 경우 자유 CCL2 수준은 29일 동안 검출 한계 미만으로 유지되었다 (도 16 오른쪽 패널).

[1267] 추가적인 유사한 실험에서는 CKL02-SG1099, CKL02-GG01, GG02 및 GG03/GG04와 같은 다른 변이체를 분석한다.

#### [1268] 다양한 종양 유형에서 CCL2의 유병률 연구

[1269] CD163/CD68 및 CD14를 이용한 대식세포 분석을 포함하여 CCL2 및 이의 수용체 CCR2에 대한 다음 IHC 유병률 연구는 6가지 다른 적응증의 121명의 인간 일치 종양 및 혈청 샘플에 대해 수행되었다.

[1270] 췌장암 (PaC)

[1271] 대장암 (CRC)

[1272] 유방암 (BC)

[1273] 전립선암 (PrC)

[1274] 난소암 (OvC)

[1275] 위암 (GC)

[1276] 다음 질문이 다뤄졌다:

[1277] · 이들 종양은 CCL2를 (과다)발현하는가?

[1278] · 이들 종양 환자의 혈액 CCL2 수준이 상승하는가?

[1279] · 혈액과 종양 CCL2 수준 사이에 상관관계가 있는가?

[1280] · 종양 CCL2와 침윤성 CCR2<sup>+</sup> 면역 세포 사이에 상관관계가 있는가?

[1281] · 종양 CCL2와 침윤성 골수 세포 사이에 상관관계가 있는가?

#### [1282] 재료 및 방법

[1283] 조직병리학적 채점은 반정량적으로 수행되었다. 또한 자동 다중 이미지 분석이 CD163/CD68 IHC에 이용되었으며, 면역 세포 정량화뿐만 아니라 CCL2 정량화를 위해 CD14 및 CCR2에 대해 검사되었다.

- [1284] 면역조직학적 조사는 Indivumed (Hamburg) 및 Asterand (Royston/Herts, UK)에서 제공하는, 6가지 다른 적응증의 121개 인간 종양의 절제 검체 세트: 췌장암 (PaC) 31개, 대장암 (CRC) 30개, 유방암 (BC) 30개, 전립선암 (PrC) 20개, 난소암 (OvC) 20개 및 위암 (GC) 10개에 대해 수행되었다. 종양을 4% 완충 포르말데히드에 고정하고 파라핀 포매하고 2.5 μm 두께로 절단하고 Superfrost Plus 슬라이드에 적재하였다. CCL2에 대한 생쥐 단일클론 항체 (클론 2D8, Novusbio NBP2-22115)는 표준 염색 프로토콜 (32'에 대한 CC1, VBX에서 1 μg/mL 농도, Optiview DAB 검출 시스템)에 따라 Ventana BXT에서 이용되었다. CCR2 (E68, Abcam ab32144)에 대한 토끼 단일클론 항체는 표준 염색 프로토콜 (32'에 대한 CC1, DS2에서 0.8 ug/ml 농도, Omni-UltraMap HRP DAB 검출 시스템)에 따라 Ventana Discovery XT에서 이용되었다. 단핵구 마커 CD14 (Cell Marque EPR3653, RTU)에 대한 생쥐 단일클론 항체는 표준 염색 프로토콜 (64'에 대한 CC1, Omni-UltraMap HRP DAB 검출 시스템)에 따라 Ventana Discovery Ultra에서 이용되었다. 대식세포 및 M2 유사 TAM (종양 관련 대식세포) CD163/CD68 (DAB CD163 생쥐 MRQ-26 Cell Marque RTU // red CD68 생쥐 PG-M1 Dako)에 대한 이중 염색은 표준 염색 프로토콜 (32'에 대한 CC1, DS2에서 CD163 RTU//CD68 농도 0.6 μg/ml, Detection with DAB and Red 검출 시스템)에 따라 Ventana BXT에서 이용되었다. 모든 이미지는 Ventana iScan HT®를 이용하여 스캔되었다. 조직 절편은 반정량적으로 분석되었다.
- [1285] 1. 결과
- [1286] CCL2 및 CCR2 유병률
- [1287] 분석된 모든 종양 적응증은 다양한 수준에서 CCL2의 상향 조절 및 다양한 양의 TAM에서 CCR2의 존재를 갖는 일부 종양을 보여주었다 (아래 표 6). CCL2와 CCR2 둘 모두, 난소 암종에서 가장 높은 발현이 관찰되었고, PDAC와 GC가 그 뒤를 이었다.
- [1288] 종양 유형별 특성
- [1289] 높은 MDSC 유인 및 M2 분극화의 종양 성장 강화 면역학적 상태와 관련된 CCL2-CCR2의 높은 활성을 갖는 종양은 CCL2 차단 요법에 선호되는 종양을 나타낸다. CCR2 IHC는 MDSC 및 M2 유사 대식세포와의 좋은 상관관계를 보여 생물학적 역할을 확인하였으며 CCL2 IHC 측정보다 이 경로에 대한 바이오마커로서 더 높은 관련성을 입증하였다. 본 연구로부터 결론적으로, CCL2 치료에 대한 다음 권장 사항이 요약될 수 있다:
- [1290] • OvC는 가장 높은 CCL2과 CCR2 유병률 및 M2 분극화로 인해 CCL2 표적 치료에 권장될 수 있다.
- [1291] • PDAC는 분석된 다른 종양 유형에 비해 MDSC의 양이 가장 많고 CCR2와 M2가 상당히 높은 수준과 양으로 존재하기 때문에 CCL2 표적 치료에 권장될 수 있다. CCL2는 PDAC에서도 높았으며 다른 종양 유형과 달리 종양 세포에서보다 면역 세포에서 훨씬 높은 존재를 보여주었다. PaC는 CCL2/CCR2 및 MDSC 유인/M2-분극화 사이에 매우 좋은 상관관계를 보여주었다. 이러한 결과는 분석된 PDAC에서 CCL2-CCR2의 역할이 면역 세포 유인에 매우 집중되어 있음을 뒷받침한다.
- [1292] • BC, 특히 TNBC는 CCL2 표적 치료에 권장될 수 있다. BC에서는 CCL2, CCR2, MDSC 및 M2가 상당히 높은 수준과 양으로 나타났다. 특히 TNBC 사례는 비-TNBC보다 더 많은 양의 M2 및 MDSC를 특징으로 하지만, 비-TNBC는 다른 종양 적응증에 비해 종양 세포에서 가장 높은 CCL2 생산을 보여주었다.
- [1293] 다음 종양 적응증은 CCL2-CCR2 축에 덜 의존적인 것으로 보이므로 CCL2 표적 치료에 덜 권장될 수 있다.
- [1294] • CRC: CCL2가 다른 종양 유형, 특히 PaC와 비교할 때 낮았다. 또한 여기에서는 다른 종양 유형에 비해 M2 유사 대식세포의 양이 가장 적게 측정되었다. CCR2와 MDSC는 다양한 양으로 존재하였다. 흥미롭게도, 이 적응증에서만 CCL2와 CCR2 사이의 양의 상관관계 경향이 감지되었다. 그러나 전반적인 조사 결과는 CRC에서 CCL2-CCR2의 역할이 면역 세포 유인이 아닌 종양 세포 생존에 집중되어 있음을 뒷받침한다.
- [1295] • GC는 CCL2의 경우에는 높지만 CCR2의 경우에는 낮은 것으로 관찰되었으며 MDSC의 양이 가장 낮았다. M2 유사 대식세포는 다양한 양으로 존재하였다.
- [1296] 표 6: 본 연구에서 분석된 다양한 종양 유형의 종양 세포 (TC) 및 면역 세포 (IC)에서의 CCL2 및 CCR2 양성 발현.

표 6

| 종양<br>유형 | CCL2               |                              |                                         |                        |                                         | CCR2           |                              |                                         |
|----------|--------------------|------------------------------|-----------------------------------------|------------------------|-----------------------------------------|----------------|------------------------------|-----------------------------------------|
|          | 종양 세포(TC)에서(수동 점수) |                              |                                         | 면역 세포(IC)에서<br>(수동 점수) |                                         | 면역 세포에서(수동 점수) |                              |                                         |
|          | 양성 사<br>례의 %       | 중간 내<br>지 높은<br>양성 사<br>례의 % | 평균 점<br>수                               | 양성 사<br>례의 %           | 평균 점<br>수                               | 양성 사<br>례의 %   | 중간 내<br>지 높은<br>양성 사<br>례의 % | 평균 점<br>수                               |
| OvC      | 100%               | 42%                          | 1.3                                     | 100%                   | 0.9                                     | 100%           | 63                           | 1.7                                     |
| PaC      | 90%                | 9%                           | 0.8(PDAC<br>0.8 및<br>P N E T<br>0.9)    | 97%                    | 2.0(PDAC<br>2.2 및<br>P N E T<br>0.6)    | 90%            | 55                           | 1.5(PDAC<br>1.7 및<br>P N E T<br>0.3)    |
| GC       | 91%                | 45%                          | 1.3                                     | 91%                    | 1.9                                     | 91%            | 18                           | 0.8                                     |
| BC       | 78%                | 46%                          | 1.1(TNBC<br>0.9, 비<br>- T N B C<br>1.6) | 61%                    | 0.6(TNBC<br>0.5, 비<br>- T N B C<br>0.9) | 96%            | 38                           | 1.3(TNBC<br>1.2, 비<br>- T N B C<br>1.5) |
| CRC      | 76%                | 24%                          | 0.8                                     | 72%                    | 0.7                                     | 96%            | 39                           | 1.2                                     |
| PrC      | 72%                | 10%                          | 0.7                                     | 79%                    | 0.5                                     | 72%            | 10                           | 0.6                                     |

[1297]

[1298]

[1299]

[1300]

[1301]

[1302]

[1303]

[1304]

[1305]

[1306]

[1307]

[1308]

[1309]

[1310]

[1311]

· PrC에서는 CCR2가 다양한 수준으로 존재하였다. (M2와 MDSC는 측정되지 않았다)

#### 상관 분석

연구 결과는 다음과 같이 요약될 수 있다:

· 종양 CCL2와 CCR2 (IHC) 사이에는 CRC에만 양의 상관관계가 존재하였다.

· 혈청 CCL2 (ELISA)는 CCL2, CCR2, 대식세포 및 MDSC를 포함하여, 종양에서 측정된 어떤 매개변수와도 상관관계가 없었다. 종양 CCL2에 대한 양의 상관관계 경향은 PrC에서만 발견되었으며, 두 방법 모두 매우 낮은 값을 나타낸다.

· CCR2 발현은 M2 유사 대식세포 및 CD14<sup>+</sup> 세포의 존재와 양의 상관관계가 있고 M1/M2 비율과는 음의 상관관계가 있으며 CCR2의 생물학적 역할을 확인한다. CCR2의 수준은 MDSC 유인보다 M2 분극화와 더 잘 연관된다.

· CCL2는 MDSC 유인 및 M2 분극화와 양의 상관관계 경향을 보였다. 따라서 CCL2 수준만으로는 MDSC 및 M2 유사 분극화의 존재에 대한 주요 요인이 아닌 것으로 보인다.

실시예 C-1 변형된 가변 도메인 및 CDR (이온 의존성/pH 의존성 결합) 및 Fc 매개 스위칭을 갖는 이중특이적 콘토르스바디

**Fc감마RIIb 향상된 Fc 변이체 및 추가 Fc 변형을 갖는 콘토르스바디 형식 (이중특이적 항-CCL2 콘토르스바디)의 이중파라토프 항-CCL2 항체 생성**

이중특이적 항-CCL2 항체의 다음 IgG1 불변 도메인/Fc 변이체는 콘토르스바디 (CB) 형식으로 Fc 부분 (EU Kabat 넘버링) 위치에 돌연변이로 생성되었다. 이러한 Fc 도메인 포함 형식인 "콘토르스바디" (CB)는 예를 들면 Guy J.Georges et al, Computational and Structural Biotechnology Journal Volume 18, 2020, Pages 1210-1220에 기재되어 있다.

따라서, 예를 들어 실시예 B-1에 기재된 방법을 이용하되, 서열 번호 175 - 서열 번호 182의 서열을 이용하여 다음 이중특이적 항체 (콘토르스바디)가 생성되었다:

**PIAF8142** (CKL02 - CB- SG1095) - (SG1095 Fc 돌연변이를 포함하는 단지 2개의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 예시적인 이중특이적 CKL02 콘토르스바디 (CB))

서열 번호: 175 중쇄 1- CKL02 - CB- SG1095

서열 번호: 176 중쇄 2- CKL02 - CB- SG1095

- [1312] **P1AF8143** (CKL02 - CB- GG02 ) - (GG02 Fc 돌연변이를 포함하는 단지 2개의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 예시적인 이중특이적 CKL02 콘토르스바디 (CB))
- [1313] 서열 번호: 177 중쇄 1- CKL02 - CB- GG02
- [1314] 서열 번호: 178 중쇄 2- CKL02 - CB- GG02
- [1315] **P1AG5853** (CKL02 - CB- GG02-K447G) - (GG02 Fc 돌연변이 및 돌연변이 K447G를 포함하는 단지 2개의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 예시적인 이중특이적 CKL02 콘토르스바디 (CB))
- [1316] 서열 번호: 179 중쇄 1- CKL02 - CB- GG02-KG
- [1317] 서열 번호: 180 중쇄 2- CKL02 - CB- GG02-KG
- [1318] **P1AG8317** (CKL02 - CB- SG1095-K447G) - (SG1095 Fc 돌연변이 및 돌연변이 K447G를 포함하는 단지 2개의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 예시적인 이중특이적 CKL02 콘토르스바디 (CB))
- [1319] 서열 번호: 181 중쇄 1- CKL02 - CB- SG1095
- [1320] 서열 번호: 182 중쇄 2- CKL02 - CB- SG1095
- [1321] 유사하게 변이체 CKL01 및 CKL03 - CKL016의 콘토르스바디는 야생형 (wt) Fc (예를 들면 노브 인투 홀과 같은 이중이량체화 조성 돌연변이 포함) 또는 본원에 기술된 다른 Fc 변이체를 이용하여 생성된다.
- [1322] 이중과라토프 항-CCL2 항체의 정제
- [1323] 이중과라토프 항-CCL2 항체 함유 세포 배양 상층액을 최대 3번의 크로마토그래피 단계를 통해 여과하고 정제하였다. 포획 단계 용출물의 순도에 따라 이온 교환 크로마토그래피 단계가 선택적으로 포획 단계와 연마 단계 사이에 구현되었다.
- [1324] CaptureSelect IgG-CH1 Affinity Matrix (Thermofisher Scientific), POROS XS (Thermofisher Scientific) 및 Superdex 200 크기 배제 (GE Healthcare, Sweden) 크로마토그래피를 이용하여 친화성 크로마토그래피를 통해 이중과라토프 항-CCL2 항체를 세포 배양 상층액으로부터 정제하였다. 간단히 말하면, 멸균 여과된 세포 배양 상층액을 PBS 완충액 (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl 및 2.7 mM KCl, pH 7.4)으로 평형화된 IgG-CH1 수지에 포획하고 평형 완충제로 세척하고 pH 3.0의 25 mM 구연산나트륨으로 용리하였다. 용리된 단백질을 분획물을 모아서 2M Tris, pH 9.0으로 중화하였다.
- [1325] 선택적인 두 번째 정제 단계인 이온 교환 크로마토그래피는 POROS XS (Thermofisher Scientific)를 이용하여 수행되었고, 평형화 및 40 mM 아세트산나트륨 (pH 5.5)으로 세척이 수행되었으며, 희석된 포획 단계 용출물의 로딩과 구매 크로마토그래피가 pH 5.5에서 1M 아세트산나트륨을 이용하여 수행되었다. 이온 교환 크로마토그래피 분획물을 CE-SDS LabChip GX II (PerkinElmer)로 분석하고 Crossmab 함유 분획물을 모았다.
- [1326] Superdex 200 (GE Healthcare)에서 크기 배제 크로마토그래피를 두 번째 또는 세 번째 정제 단계로 이용하였다. 크기 배제 크로마토그래피는 20 mM 히스티딘 완충액, 0.14 M NaCl, pH 6.0에서 수행되었다. 크기 배제 크로마토그래피 분획물을 CE-SDS LabChip GX II (PerkinElmer)로 분석하고 Crossmab 함유 분획물을 모아서 -80°C에서 보관하였다.
- [1327] Superdex 200 (GE Healthcare)에서 POROS XS (ThermoFisher Scientific) 크기 배제 크로마토그래피를 20 mM 히스티딘 완충액, 0.14M NaCl, pH 6.0 중 HiPrep 26/10 Desalting (GE Healthcare)에서 탈염 크로마토그래피로 대체한 후 만족스러운 제품 품질을 얻은 경우.
- [1328] 항체 제조물의 단백질 농도는 아미노산 서열을 기초로 계산된 몰 흡광 계수를 이용하여 280 nm에서 흡광도 (OD)를 측정하여 결정하였다.
- [1329] 항체의 순도 및 무결성은 Protein Express Chip 및 HT Protein Express Reagents Kit가 포함된 LabChip GX II (PerkinElmer)를 이용하여 CE-SDS로 분석되었다. 항체 제조물의 응집체 함량은 200 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 250 mM KCl, pH 7.0을 실행 완충액으로 이용하는 Biosuite High Resolution SEC, 250Å, 5µm 분석 크기 배제 칼럼 (Waters GmbH)을 이용하여 고성능 SEC에 의해 결정되었다. CE-SDS로 분석한 결과 평균 순도는 94-100%이었으며 단량체 함량은 >95% (SEC)이었다.
- [1330] 변형된 가변 도메인 및 CDR (이온 의존성/pH 의존성 결합) 및 변형된 Fc 도메인을 갖는 이중특이적 항-CCL2 콘

# 토르스바디의 기능적 특성화

**표면 플라즈몬 공명 (SPR) - 콘토르스바디 P1AF8142 (CKL02 - CB-SG1095), P1AF8143 (CKL02 - CB-GG02), P1AG5853 (CKL02 - CB-GG02-K447G)의 CCL2 결합 (crossmab과 비교)**

**표면 플라즈몬 공명 (SPR)으로 평가한 CCL2 항원에 대한 결합**

이중특이적 항체의 전반적인 구조는 Fab 모이어티의 결합에 큰 영향을 미치지 않는다.

**재료 및 방법 (Mat & Meth) -SPR**

SPR 측정은 Biacore 8K 기기 (GE Healthcare/Cytiva)에서 수행되었다. 첫 번째 단계에서, CM3 칩 (시리즈 S 센서 칩 CM3, GE Healthcare/Cytiva)을 준비하고 포획 분자로서 항-카파 항체 (anti kappa select, Thermo Fischer)를 고정하였다 (10 µg/ml, 280s, 유속 10 µl/분, pH 4.5).

이어서, 항체 작제물을 5 nM의 농도 및 120s의 연관 시간에서 5 µl/분의 유속으로 고정된 항-카파 항체에 결합시켰다 (고정 완충액 HBS-N: 0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, pH7.4, GE Healthcare/cytiva BR-1006-70). 다음 단계에서 CCL2 항원을 50 µl/분의 유속으로 일련의 농도 (0-100 nM)로 분석물로서 주입하였다. 연관 시간은 120s 이었고, 해리 시간은 600s이었다. 재생 용액으로 10 mM 글리신 pH 1.5를 30 µl/분의 유속으로 60s 동안 주입하였다.

주요 실험은 2번 수행되었다: 한 번은 pH 7.4의 실험 완충액 PBS-P+ (0.02M 인산염 완충액, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, 0.05% (v/v) 계면활성제 P20; GE Healthcare/Cytiva 28995084)로 수행되었고, 두 번째는 pH 5.8의 PBS-P+로 수행되었다. 모든 측정은 25℃에서 수행되었다.

평가를 위해,  $t_{1/2}$  (= 항체에 결합된 항원 해리의 반감기) 및  $R_{max}$ 를 계산하였다.

단량체성 인간 CCL2 및 cyno CCL2에 대한 다양한 작제물 (Crossmab 및 콘토르스바디)의 결합을 측정하였다. 결과는 아래 표에 나타나 있다. 유사하게 추가 실험에서 P1AG5853 및 P1AG8317이 분석되고 결과가 표시된다.

**표: 결합 단량체성 인간 CCL2 및 cyno CCL2**

| 항체           | 항원             | $R_{max}$ (RU) @ pH 7.4 | $t_{1/2}$ (s) @ pH 7.4 | $R_{max}$ (RU) @ pH 5.8 | $t_{1/2}$ (s) @ pH 5.8 |
|--------------|----------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| P1AD6325     | 단량체성 인간 CCL2   | 6.0                     | 106.8                  | 9.1                     | 4.6                    |
| CNT0688-IgG1 | 단량체성 인간 CCL2   | 4.4                     | 2125.8                 | 5.1                     | 366.5                  |
| P1AF8137     | 단량체성 인간 CCL2   | 5.9                     | 96.7                   | 8.5                     | 4.8                    |
| P1AF8139     | 단량체성 인간 CCL2   | 5.1                     | 271.9                  | 7.4                     | 5.2                    |
| P1AF8140     | 단량체성 인간 CCL2   | 5.4                     | 84.1                   | 8.6                     | 4.9                    |
| P1AF8142     | 단량체성 인간 CCL2   | 4.3                     | 130.1                  | 4.2                     | 5.7                    |
| P1AF8143     | 단량체성 인간 CCL2   | 3.7                     | 257.5                  | 4.6                     | 4.6                    |
| P1AD6325     | 단량체성 cyno CCL2 | 5.5                     | 269.6                  | 6.9                     | 2.8                    |
| CNT0688-IgG1 | 단량체성 cyno CCL2 | 4.8                     | 2627.9                 | 5.7                     | 421.8                  |
| P1AF8137     | 단량체성 cyno CCL2 | 5.4                     | 296.0                  | 5.8                     | 3.1                    |
| P1AF8139     | 단량체성 cyno CCL2 | 4.9                     | 345.1                  | 7.2                     | 2.6                    |
| P1AF8140     | 단량체성 cyno CCL2 | 4.9                     | 294.3                  | 5.1                     | 3.4                    |
| P1AF8142     | 단량체성 cyno CCL2 | 3.9                     | 284.1                  | 1.9                     | 0.0                    |
| P1AF8143     | 단량체성 cyno CCL2 | 3.5                     | 276.3                  | 2.5                     | 3.1                    |

pH 5.8에서의 결합을 평가하면 모든 이중특이적 항체에 대한 결합이 손실된다.

[1343] **표면 플라즈몬 공명 (SPR)에 의한 FcRn에 대한 결합**

[1344] 모든 이중특이적 분자는 낮은 pH에서는 FcRn 수용체에 대한 우수한 결합 친화성을 나타내고 생리학적 pH 7.4에서는 훨씬 감소된 결합 친화성을 나타낸다. 모든 이중특이적 항체는 엔도솜 내 산성 pH에서 FcRn에 결합한 다음 세포 밖으로 다시 섞인다.

[1345] SPR 측정은 Biacore 8K 기기 (GE Healthcare/Cytiva)에서 수행되었다. 첫 번째 단계에서, SA 칩 (GE Healthcare/Cytiva)을 준비하고 비오틴화된 리간드 인간 단일 사슬 FcRn (sc huFcRn)을 스트렙타비딘에 대한 비공유 포획 결합 (90s, 유속 10  $\mu$ l/분, HBS-EP+ 완충액: 0.01M HEPES, 0.15M NaCl, 0.003M EDTA, 0.05% (v/v) 계면활성제 P20)에 의해 고정하여 500RU의 sc huFcRn 수준에 도달하였다. 이어서, 항체 작제물을 3가지 상이한 pH 값 5, 6 및 7.4에서 1 x PBS (PBS-P+: 0.02M 인산염 완충액, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, 0.05% (v/v) 계면활성제 P20)에서 30  $\mu$ l/분의 유속으로 50 nM의 농도, 90s의 연관 시간 및 240s의 해리 시간으로 고정된 sc huFcRn-Bi에 결합시켰다. 모든 측정은 25°C에서 수행되었다.

[1346] 연관 단계의 마지막에 위치한 보고 포인트 "바인딩"은 판독값이다. 칩 상의 1 RU sc huFcRn당 결합된 항체 작제물 [RU]의 양을 평가하였다. 유사하게 추가 실험에서 P1AG5853 및 P1AG8317이 분석되고 결과가 표시된다.

[1347] **SPR-FcRn 결합 표**

| 항체 (포획 수준: 500RU) | 1RU의 FcRn-표면당 Ab (RU)의 결합량 |        |          |
|-------------------|----------------------------|--------|----------|
|                   | @ pH 5                     | @ pH 6 | @ pH 7.4 |
| P1AD8325          | 1.16                       | 0.90   | 0.13     |
| P1AF8137          | 1.18                       | 0.85   | 0.09     |
| P1AF8139          | 1.27                       | 1.07   | 0.34     |
| P1AF8140          | 1.20                       | 0.92   | 0.15     |
| P1AF8142          | 1.16                       | 0.82   | 0.08     |
| P1AF8143          | 1.18                       | 0.89   | 0.18     |
| CNT0888-IgG1      | 0.90                       | 0.35   | 0.00     |
| CKL02-SG1         | 1.02                       | 0.56   | 0.00     |
| CKL02-SG1100      | 1.18                       | 0.97   | 0.15     |

[1348]

[1349] **SPR에 의한 Fc감마 수용체에 결합**

[1350] 모든 이중특이적 항체는 다른 모든 Fc감마 수용체와 달리 억제 신호를 생성하는 수용체인 Fc감마RIIb에 대한 결합을 향상시키도록 조작된다. 따라서 이중특이적 항체는 활성화 신호를 생성하지 않으면서 세포 내로 잘 흡수되도록 의도된다.

[1351] SPR 측정은 Biacore T200 (GE Healthcare/Cytiva)에서 수행되었다. EDC/NHS 커플링 화학 (아민 커플링 키트, GE Healthcare/Cytiva)을 이용하여 단백질 L (Pierce #21189)을 CM5 바이오센서 칩 (GE Healthcare/Cytiva) 상에 고정하였다. 이를 위해 10 mM 아세트산나트륨 완충액, pH 4.0에 희석하고 10  $\mu$ l/분의 유속으로 600s 동안 양쪽 흐름 셀에 주입하였다. 고정화 및 아래의 포획 결합 분석은 25°C의 온도에서 측정되었다. 실행 및 희석 완충액으로 PBS-P (0.02M 인산염 완충액, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl pH 7.4, 0.05% v/v 계면활성제 P20)를 이용하였다.

[1352] 첫 번째 단계에서, 1000 RU 포획 수준을 달성하기 위한 목적으로 항체 샘플을 10  $\mu$ l/분의 유속으로 120s 동안 주입한다. 두 번째 단계에서, 단량체성 Fc $\gamma$  수용체 (Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIb 또는 Fc $\gamma$ RIIIa)를 5  $\mu$ g/ml의 농도로 90s 동안 10  $\mu$ l/분의 유속으로 주입하였다.

[1353] 연관 단계의 마지막에 위치한 보고 포인트 "바인딩"이 판독된다. 1RU 항체당 Fc $\gamma$  수용체의 결합량 (RU)을 계산

하였다.

[1354] **SPR-Fc감마R 표**

| 항체 (포획 수준: 1000RU) | Fc $\gamma$ 수용체   | 결합량<br>1 RU Ab 당 hFc $\gamma$ R (RU) |
|--------------------|-------------------|--------------------------------------|
| P1AD8325           | Fc $\gamma$ RIIa  | 0.042                                |
|                    | Fc $\gamma$ RIIb  | 0.049                                |
|                    | Fc $\gamma$ RIIIa | -0.001                               |
| P1AF8137           | Fc $\gamma$ RIIa  | 0.002                                |
|                    | Fc $\gamma$ RIIb  | 0.051                                |
|                    | Fc $\gamma$ RIIIa | 0.000                                |
| P1AF8139           | Fc $\gamma$ RIIa  | 0.002                                |
|                    | Fc $\gamma$ RIIb  | 0.056                                |
|                    | Fc $\gamma$ RIIIa | 0.000                                |
| P1AF8140           | Fc $\gamma$ RIIa  | 0.003                                |
|                    | Fc $\gamma$ RIIb  | 0.059                                |
|                    | Fc $\gamma$ RIIIa | 0.000                                |
| P1AF8142           | Fc $\gamma$ RIIa  | 0.070                                |
|                    | Fc $\gamma$ RIIb  | 0.074                                |
|                    | Fc $\gamma$ RIIIa | 0.002                                |
| P1AF8143           | Fc $\gamma$ RIIa  | 0.003                                |
|                    | Fc $\gamma$ RIIb  | 0.033                                |
|                    | Fc $\gamma$ RIIIa | 0.001                                |
| CKL02-SG1          | Fc $\gamma$ RIIa  | 0.028                                |
|                    | Fc $\gamma$ RIIb  | 0.007                                |
|                    | Fc $\gamma$ RIIIa | 0.017                                |
| CKL02-SG1100       | Fc $\gamma$ RIIa  | 0.038                                |
|                    | Fc $\gamma$ RIIb  | 0.010                                |
|                    | Fc $\gamma$ RIIIa | 0.020                                |
| CNT0888-IgG1       | Fc $\gamma$ RIIa  | 0.003                                |
|                    | Fc $\gamma$ RIIb  | 0.000                                |
|                    | Fc $\gamma$ RIIIa | 0.001                                |

[1355]

[1356] <CCL2> 항체는 Fc $\gamma$ RIIa와 같은 활성화 수용체를 인식하지 못하지만 Fc $\gamma$ RIIb에 대한 친화성이 향상되었다. 추가로, 분자 P1AF8137, P1AF8139, P1AF8140 및 P1AF8143은 Fc $\gamma$ RIIb 대 Fc $\gamma$ RIIa에 대한 선택성을 나타내는 반면, 분자 P1AD8325 및 P1AF8142는 그렇지 않다. 이들 두 그룹의 분자는 Fc 모이어티의 두 가지 별개 유형의 조합에 속한다.

[1357] Y자형 이중특이적 항체 및 콘토르스바디 사이에서 힌지 영역 주변의 기하학적 구조가 다를 수 있다. Fc $\gamma$ R에 대한 결합은 이러한 구조적 변형에 의해 크게 영향을 받지 않는 것 같다.

[1358] 유사하게 추가 실험에서 P1AG5853 및 P1AG8317이 분석되었고, 결과가 다양한 Fc $\gamma$ R에 대해 표시된다.

[1359] **화학구성 분석**

[1360] B-3에 기술된 추가적인 유사한 실험에서, P1AF8142 (CKL02 - CB-SG1095), P1AF8143 (CKL02 - CB-GG02), P1AG5853 (CKL02 - CB-GG02-K447G)의 IC<sub>50</sub> 값은 다음과 같이 결정되었다 (결정된다).

[1361] P1AF8142 (0.2  $\mu$ g/ml), P1AF8143 (0.6  $\mu$ g/ml), P1AG5853 (미정).

[1362] 또한 유전적으로 변형된 생쥐 모형에서의 생체내 생물학적 활성 및/또는 시노물구스 원숭이에서의 CCL2 스위핑

효율은 실시예 B-3에 기술된 바와 유사하게 결정된다.

#### [1363] 농도 및 점도

[1364] 분자의 점도와 농도는 약물을 피하로 적용하려는 경우 및/또는 표적을 중화하기 위해 높은 농도가 필요한 경우 중요한 인자이다. 이중특이적 항체에 대해 높은 농도가 조사되었다. 200 mg/L보다 높은 농도에서 단백질은 응집체를 형성하고 결국 침전되는 경향이 더 높아질 수 있다. 주사제로 이용하기 위해서는 점도 측정이 더 관련성이 높은 매개변수이다. 점도는 허용 가능한 최대 농도 (<15 cP)가 도출될 수 있도록 농도 범위와 대비하여 플로팅된다; 아래 표는 값을 보여준다. 콘토르스바디 P1AF8142는 crossmab P1AD8325에 비해 최대 농도가 38% 증가한 것으로 나타난다; 두 화합물 모두 동일한 Fab와 Fc 모이어티를 가지고 있지만 콘토르스바디 형식이 더 조밀하고 동일한 점도에 대해 더 높은 농도로 이어진다.

#### [1365] 점도 15cP (20℃)에서의 최대 농도 표

| 화합물      | 최대 농도<br>15cP (20℃) |
|----------|---------------------|
| P1AD8325 | 81 mg/ml            |
| P1AF8142 | 112 mg/ml           |
| P1AF8139 | 115 mg/ml           |
| P1AF8143 | 183 mg/ml           |

[1366]

[1367] 화합물 P1AF8143은 상응하는 crossmab인 분자 P1AF8139와 비교하여 15cP에서 약 60%의 최대 농도 증가를 나타낸다. 따라서, 콘토르스바디 구조는 생물물리학적 특성을 크게 향상시킨다.

#### [1368] Mat&Meth 점도 측정

[1369] 샘플을 Amicon 원심분리 필터 장치 (10K)에서 20 mM 히스티딘 완충액, pH 6.0으로 완충액 교환하고 14000 x g에서 농축하였다. UV 측정 (NanoDrop 8000 UV-Vis 분광광도계에서 3회 측정)으로 농도를 결정하기 위해 고농축 스톱 용액을 화학 천칭을 이용하여 희석하였다.

[1370] DLS 측정 (Wyatt DLS DynaPro 평판 판독기)을 위해 샘플은 15 µl의 용적에서 0.02%의 최종 Tween20 농도와 0.03%의 최종 비드 농도를 포함하는 완충액에서 준비되었다. 1% 비드 스톱 용액 (Nanosphere Size Standards, Thermo Scientific, 노멀 직경: 300 nm, 평균 직경 (NIST Traceable): 296±6nm, 크기 분포: 5.3 nm - 표준 편차: 1.8%CV, 함량: 물 속 중합체 마이크로스피어, (1% 고형물, 6.77\*10<sup>8</sup> 비드/µL)을 희석에 이용하였다.

[1371] 역피펫팅 (Greiner bio-one Microplate/Sensoplate, 384 Well, Black, Glassbottom, 작은 용적, Lid, gen 2)을 통해 샘플을 광학 384-웰 평판으로 옮기고 실리콘 오일 (Alfa Aesar)로 덮었다. 라텍스 비드의 겔보기 직경은 20℃에서 동적 광산란에 의해 결정되었다. 용액의 점도는  $\eta = \eta_0 (rh/rh,0)$ 으로 계산될 수 있다 ( $\eta$ : 점도;  $\eta_0$ : 물의 점도; rh: 라텍스 비드의 겔보기 유체역학적 반경; rh,0: 물속에서 라텍스 비드의 유체역학적 반경).

[1372] 동일한 농도에서 다양한 샘플을 비교할 수 있도록 하기 위해, 다음 방정식을 이용하여 지수 적합 모형 501로 XLfit 내에 데이터를 적합시켰다:

$$\eta = C + (A * \exp(B * c))$$

[1374] ( $\eta$ : 점도; c: 농도; A, B, C: 지수 적합 변수).

[1375] 이들 적합에서 파생된, 15cP의 점도 역치에 대해 20℃에서 최대 실현 가능한 농도를 추정할 수 있다.

[1376] 유사하게 추가 실험에서 P1AG5853 및 P1AG8317이 분석되고 결과가 표시된다.

#### [1377] CCL2 복합체 형성

#### [1378] 방법 SEC

[1379] 복합체 형성:

- [1380] 복합체 형성을 위해, 1 x PBS (sigma-Aldrich 1166678900)에 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 P1AD8325, P1AF8139 또는 P1AF8143을 개별 동물 농도의 wtCCL2와 함께 스파이킹하였다. 용액을 혼합하고 주위 온도에서 하룻밤 동안 인큐베이션하였다.
- [1381] SEC-MALLS 측정:
- [1382] SEC-MALLS 측정을 위해 1 mg/ml 농도의 100  $\mu\text{g}$  샘플을 UV280 검출기와 Wyatt MALS 검출기 (RI Optilab rEX, LSminiDAWN Treos)가 장착된 ThermoUltimate 3000 기기의 GE Superose6 칼럼 (10/300 GL 증가)에 적용하였다. 1x PBS, pH7.4를 0.5mL/분의 유속으로 용리액으로 이용하였다.
- [1383] crossmab과 같은 Y자형 IgG 유사 형식과 비교하여 조밀한 콘토르스바디 형식은 이중파라토프 분자에 의해 촉발된 다량체 어셈블리의 형성과 관련하여 다르게 동작한다. 도 SEC 복합체는 SEC-MALLS 크로마토그래피 실험에서 CCL2가 없는 경우 및 있는 경우에 이중파라토프 분자의 행동을 보여준다. 모든 이중파라토프 분자는 145 내지 148kDa 범위의 비슷한 분자량을 갖지만, 콘토르스바디 형식이 더 조밀하기 때문에 콘토르스바디의 행동은 Crossmab의 행동과 상이하다. 이러한 조밀함은 CCL2에 결합 시 긴 데이지 체인 연결도 허용하지 않는다. 실제로, 콘토르스바디 P1AF8143 (도 18에서 43으로 약칭)은 wtCCL2와 함께 인큐베이션한 후 대부분 약 85% 사량체를 형성하는 반면, 상응하는 Crossmab P1AF8139 (도 18에서 39로 약칭)는 매우 큰 정도로 훨씬 더 큰 다량체를 형성한다.
- [1384] P1AF8139 (39로 약칭)의 SEC-MALLS 측정에 따르면 대부분의 복합체 (>80%)는 최대 10 MDa의 다량체인 반면, P1AF8143 (43으로 약칭)은 대부분 (>85%) wtCCL2와 조합으로 약 600 kDa의 사량체를 형성한다.
- [1385] 유사하게 추가 실험에서 P1AG5853 및 P1AG8317이 분석되고 결과가 표시된다.
- [1386] **세포 흡수를 통한 CCL2 고갈**
- [1387] Fc $\gamma$ RIIb 수용체와의 상호작용을 통해 세포에 침투하는 이중특이적 항체의 능력을 측정하기 위해, CHO-K1 세포주에 인간 Fc $\gamma$ RIIb 수용체 (클론 223)를 형질감염시켰다. 활성화된 Fc $\gamma$ R과의 원하지 않는 상호작용의 대조로서 CHO-K1 세포주를 인간 Fc $\gamma$ RIIa (클론 138)로 또한 형질감염시켰다. 본원의 이중특이적 항체는 Fc $\gamma$ RIIa와의 상호작용을 가능한 한 낮게 유지하면서 Fc $\gamma$ RIIb에 대한 결합을 향상시키도록 조작되었다.
- [1388] 시험관내에서 <CCL2> 항체는 서로 다른 농도로 혼합되어 CCL2와 복합체를 형성한다; 복합체는 과중된 세포에 첨가된다. 24시간 후, 상층액을 분석하여 남은 CCL2 (내재화되지 않고 분해되지 않은 부분)를 검출한다.
- [1389] 재료 및 방법 CHO 흡수 분석
- [1390] 세포주 및 배양 조건:
- [1391] CHO 세포, CHO-K1-W-TDZ5\_HOMSA\_FCGR2B\_Clone\_223 (Roche) 또는 CHO-K1-W-TDZ5\_HOMSA\_FCGR2A\_Clone\_138\_HR (Roche)을 사내 생산하였다. CHO 세포를, 10% FCS 및 400  $\mu\text{g/mL}$  제네티신 (Thermo Fisher)으로 보충되고 200 mM L-글루타민, 4.5g/L 글루코오스, 10 mM HEPES, 1 mM Na-피루브산염을 포함하는 RPMI160 Medium ATCC Modification에서 배양하였다.
- [1392] 모든 세포는 조직 배양 접시 (Greiner)에서 단층으로 성장시키고 5% CO<sub>2</sub>의 가습된 인큐베이터에서 37°C에서 배양하였다. 세포를 아쿠타아제 (Thermo Fisher)로 분리하고, 10% FCS 및 50  $\mu\text{g/mL}$  젠타마이신 (Thermo Fisher)으로 보충되고 200 mM L-글루타민, 4.5g/L 글루코오스, 10 mM HEPES, 1 mM Na-피루브산염을 포함하는 RPMI160 Medium ATCC Modification에서 추가로 처리하였다.
- [1393] 세포 흡수 연구에서, 2 ng/mL 비오틴닐화 CCL2 (Roche)를 다양한 희석도의 <CCL2>Mab와 함께 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 96-웰 조직 배양 평판에서 1시간 동안 사전 인큐베이션하여 CCL2/<CCL2>Mab 면역 복합체를 형성하였다. 이후, 웰당  $2.5 \times 10^4$  개 세포의 개별 세포주를 면역 복합체에 첨가하였고, 평판을 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 23-24시간 동안 인큐베이션하였다.
- [1394] 다음 ELISA에서, 세포 배양 상층액 (10  $\mu\text{L}$ )을, 면역 복합체를 분해하고 변성된 비오틴닐화 CCL2를 포획하기 위해 주위 온도에서 1시간 동안 인큐베이션된, 160 mM 글리신-HCl (Sigma Aldrich)로 pH 2.5로 조정된 PBST (Thermo Fisher) 중 분석 희석제 (90  $\mu\text{L}$ ) 1% BSA (Sigma Aldrich)가 포함된 96웰 스트렙타비딘 코팅된 평판 (Microcoat)으로 이전하였다.

[1395] 변성된 비오틴화 CCL2는 분석 희석제 중 0.3 µg/mL DIG-항 CCL2 검출 항체 및 40 mU/ml POD 표지 항-DIG Fab (둘 모두 Roche, Penzberg 제품)와 함께 실온에서 순차적으로 1시간 동안 인큐베이션하여 검출되었다. 각 단계 사이에 웰을 PBST로 3회 세척하였다. 판독에는 ABTS 용액 (Roche, Penzberg) 및 ABTS 정지액 (KPL)이 이용되었다. OD405/490은 i3x (Molecular Devices)에서 정량화되었다.

[1396] 40 µg/mL에서 0.512 ng/mL로 정제된 <CCL2>Mab의 연속 희석액을 분석에서 검사하였다. 유효 농도를 결정하기 위해 다음 4-매개변수 방정식을 이용하여 비선형 회귀를 통해 <CCL2>Mab 농도의 함수인 OD405/490 신호를 적합시켰다.

$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B}$$

여기서:

A = 더 높은 점근선  
 B = 힐 슬로프  
 C = EC<sub>50</sub> 값  
 D = 하한 점근선  
 X = <CCL2>Mab 농도 ( ng/ml)  
 Y = OD 값

[1397]

[1398] 결과는 도 19a-1과 20a-c 및 아래 표에 나타나 있다.

[1399] 도 19a-19c 및 20a-20c Fc감마-IIa는 상층액 중 CCL2의 농도가 검사된 대부분의 화합물에 대해 안정적으로 유지된다는 것을 보여준다. 하지만 화합물 P1AF8142를 이용하면, 상층액에서 CCL2의 농도 의존성 손실이 관찰된다; 동일한 Fc 서열을 공유하는 crossmab P1AD8325와 비교하여, 콘토르스바디 P1AF8142에 대해 형식 의존성 흡수가 관찰된다. FcγRIIa 및 FcγRIIb에 대한 결합은 두 화합물에 대해 각각 동일한 수준으로 관찰되었으나, crossmab P1AD8325에 비해 콘토르스바디 P1AF8142에 대한 결합 수준이 현저히 높았다. 따라서, 콘토르스바디 형식은 FcγRIIa에 대한 결합에 영향을 미치고, 형식의 더 작은 크기와 함께, 콘토르스바디 P1AF8142의 경우 FcγRIIa를 통한 일부 흡수가 관찰된다.

[1400] **Fc감마-IIb 표: CHO 세포 클론 223에서 FcγRIIb를 통한 고갈**

| 화합물      | 고갈 수준 최대 (%) | EC50 [nM] | EC90 [nM] |
|----------|--------------|-----------|-----------|
| P1AF8143 | 82           | 0.14      | 0.4       |
| P1AF8142 | 80           | 0.13      | 0.5       |
| P1AD8325 | 85           | 0.50      | 13        |
| P1AF8139 | 45           | 0.60      | ~30       |

[1401]

[1402] Fc 감마 IIb 표는 다양한 수준의 CCL2 고갈/분해를 보여준다. 콘토르스바디 형식의 두 개의 이중특이적 항체인 P1AF8142 및 P1AF8143은 EC50이 약 0.13 nM인 가장 효율적인 CCL2 고갈제이다. 두 개의 해당 crossmab P1AD8325 & P1AF8139는 약 0.55 nM의 EC50을 갖는다. EC90 및 최대 고갈 수준은 표 감마-IIb에 요약되어 있다.

[1403] 참조 CKL02-SG1 (도 20c 감마 IIb)에 대해서도 상층액 중 CCL2 농도의 매우 가벼운 감소가 관찰되는데, 그 이유는 이 화합물이 항원 결합 부위를 갖기 때문이며, 다른 모든 이중특이적 항체 P1AD8325, P1AF8139, P1AF8142, P1AF8143, CKL02-SG1는 정규 Fc, 즉 wt IgG1을 가지므로 더 나은 흡수를 위해 조작된 Fc를 갖지 않으며, 세포로 수동적으로 흡수되는 경우 항원 CCL2는 낮은 pH에서 방출되고 분류되어 분해될 수 있다. 유사하게 추가 실험에서 P1AG5853 및 P1AG8317이 분석되고 결과가 표시된다.

[1404] **DC-T-세포 활성화 분석: DC :CD4 재 자극 분석**

[1405] **재료**

[1406] 건강한 공여자의 PBMC는 채혈 후 6시간 이내에 전혈로부터 준비되었다. 분석에 이용될 때까지 세포를 증기상 질소에 냉동보존하였다. 각 PBMC 제조물의 품질과 기능성은 미경험 T 세포 반응을 평가하기 위해 KLH와 같은 양성

대조를 이용하여 7일간 활성화하여 분석하였다.

[1407] 키홀 림프 헤모시아닌 (KLH)을 기술적 대조로 이용하고, 무균 조건에서 제조업체의 권장 사항에 따라 일회용 분취량으로 재구성하여 -80℃에서 보관하였다. 또한 베바시주맙 (Avastin®)이 양성 벤치마크 단백질로서 포함되었다. 모든 샘플은 DC 자극 단계와 APC 재자극 단계에 대해 0.3 μM의 최종 농도에서 검사되었다.

#### [1408] 방법

[1409] 자기 비드 선택을 통해 냉동 PBMC 샘플로부터 단핵구를 분리하고 GM-CSF 및 IL-4를 이용하여 미성숙 DC (iDC)로 분화시켰다. 그런 다음 iDC를 수확하고 세척한 후 최종 농도 300 nM에서 37℃에서 4시간 동안 각 개별 검사 단백질 (mAb (데이터는 표시되지 않음) 또는 면역 복합체)을 로딩하였다. 면역 복합체는 다음과 같이 새로 제조되었다: 600 nM의 mAb를 600 nM CCL2와 함께 실온에서 24시간 동안 인큐베이션하고 300 nM의 최종 농도로 iDC에 첨가하였다. TNF α 및 IL-1β를 함유하는 DC 성숙 카테일을 추가로 40-42시간 동안 첨가하여 DC (mDC)를 활성화/성숙시켰다. T 세포 상호작용 전에 DC가 활성화되도록 담보하기 위해, 미성숙 단계와 성숙 단계 둘 모두에서 주요 DC 표면 마커 (CD11c, CD14, CD40, CD80, CD83, CD86, CD209 및 HLA-DR)의 발현을 유세포 분석법으로 평가하였다. 이어서, 1.0x10<sup>5</sup> mDC를 1.2x10<sup>6</sup> 자가 CD4+ T 세포 (자기 비드 선택에 의해 분리됨)와 함께 가습 분위기에서 37℃, 5% CO<sub>2</sub>에서 6일 동안 공동 배양하였다. 6일차에 자성 비드 선택을 이용하여 PBMC로부터 자가 단핵구를 분리하고 초기에 DC를 로딩하는 데 이용되었던 선택된 단백질/펩티드를 로딩하였다. 37℃, 5% CO<sub>2</sub>, 가습 분위기에서 4시간 동안 인큐베이션한 후, 5x10<sup>4</sup> 단핵구/웰을 항-IFN-γ/항-IL-5 사전 코팅된 FluoroSpot 평판 (Mabtech)에 4중 (2.5x10<sup>5</sup> CD4+ T 세포/웰)의 상응하는 DC:T 공동 배양액과 함께 첨가하였다. FluoroSpot 평판을 37℃, 5% CO<sub>2</sub>, 가습 분위기에서 40-42시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후 FluoroSpot 평판은 사내 절차를 이용하여 현색되었으며, 각 검사 조건에서 각 사이토킨에 대해 웰당 스팟 형성 세포 (SFC)를 평가하였다.

[1410] DC 분화에 대한 검사 제품의 가능한 영향을 확인하고 CD4+ T 세포와의 후속 공동 배양 전에 DC의 품질을 평가할 수 있도록 미성숙 단계와 성숙 단계 둘 모두에서 단핵구 유래 DC에 대해 표면 마커 QC 검사를 수행하였다. 표면 마커는 형광 표지 항체 및 Guava® easyCyte™ 8HT 유세포 분석기를 이용하여 유세포 분석으로 평가된다.

#### [1411] 데이터 분석

[1412] 데이터 관리 및 통계 분석은 R 프로그래밍 언어 (<https://www.R-project.org/>, v. 3.6.1)에서 수행되었다. 데이터는 log<sub>2</sub> 척도로 변환되고 일반화 선형 모형 (GLM)을 적용하여 SI (배수 변화 및 95% CI)를 정량화한다. 조정 사항이 데이터 세트에 적용되고 (지수형 이분산성 조정, SFU 척도의 최하위에서 가우스 노이즈 주입, 선형 회귀 및 각 SI의 공백 값 0으로의 외삽) 및 QC 플롯이 생성된다 (DC 분화 마커, 화합물의 재현성 및 공여자 수준, 공여자의 상대적 자극).

[1413] 면역원성 위험 평가를 돕기 위해 각 공여자의 각 검사 조건에 대해 자극 지수 (SI)를 계산한다 (SFU/웰 및 일치하는 블랭크 사이의 비율).

[1414] p<0.05 (GLM으로부터 조정되지 않은 p-값)로 적어도 2배의 SI 변화가 확립되면 양성 공여자 반응이 계산된다. 30명의 건강한 공여자 코호트 내에 치료에 대한 긍정적인 공여자 반응의 수는 이 치료에 대한 상대적인 반응을 제공한다.

[1415] 반응률 개요 (St> 2, p>0.05) - SFU\_corr을 기준으로 관찰된 백분율 표

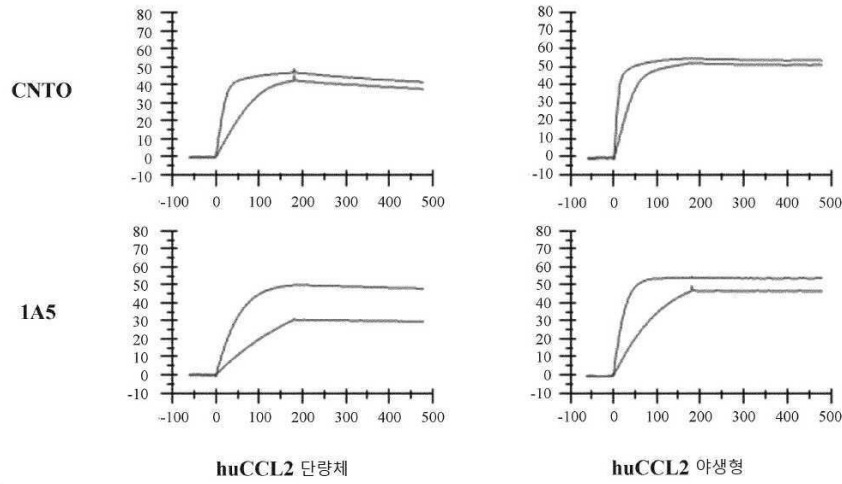
| 항체           | 면역 복합체 (항체 + CCL2)에 대한 반응률 (%) |
|--------------|--------------------------------|
| P1AD8325     | 3.33                           |
| P1AF8137-048 | 23.33                          |
| P1AF8139     | 33.33                          |
| P1AF8140     | 6.67                           |
| P1AF8142     | 3.33                           |
| P1AF8143     | 10                             |

[1416]

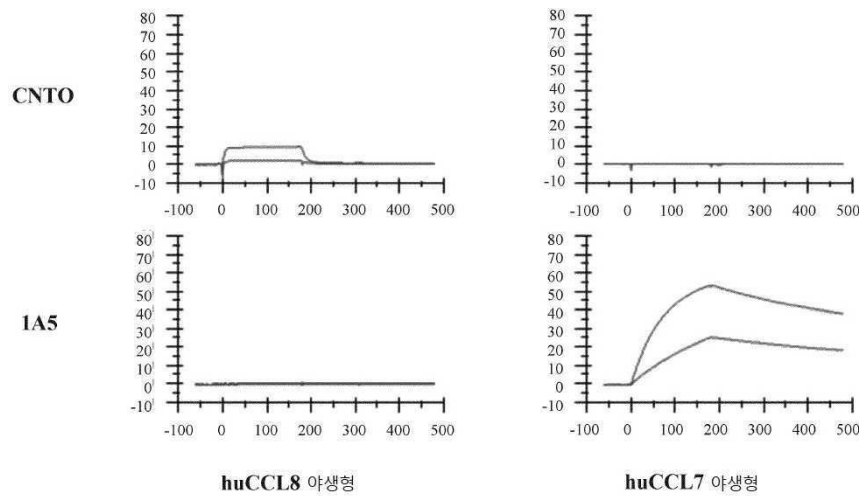
[1417] Fc $\gamma$ RIIb를 통한 흡수를 증가시키기 위해 조작된 Fc 모이어티를 갖는 화합물 P1AF8139는 화합물이 면역 복합체로 적용될 때 반응자의 수 (약 33%)가 증가된 반면, Y자형 항체 P1AF8139의 상응하는 콘토르스바딘 화합물 P1AF8143은 10%의 기준 수준의 응답자 비율을 나타낸다.

## 도면

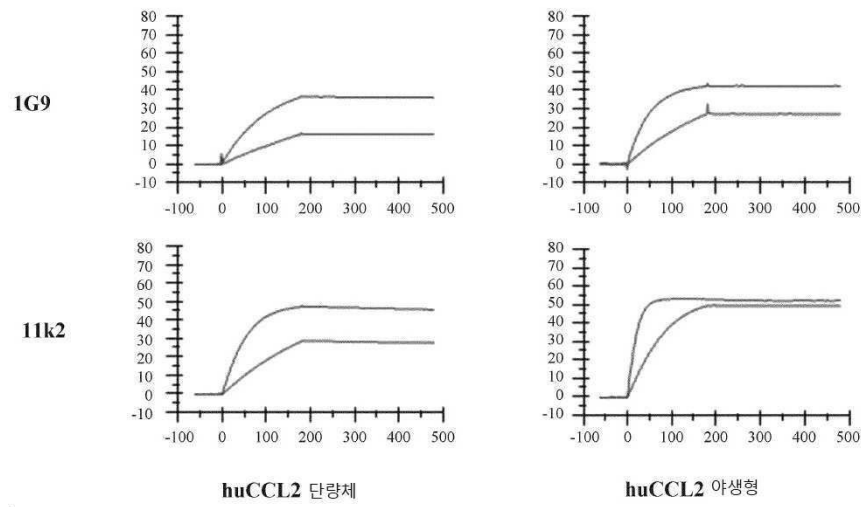
### 도면1a



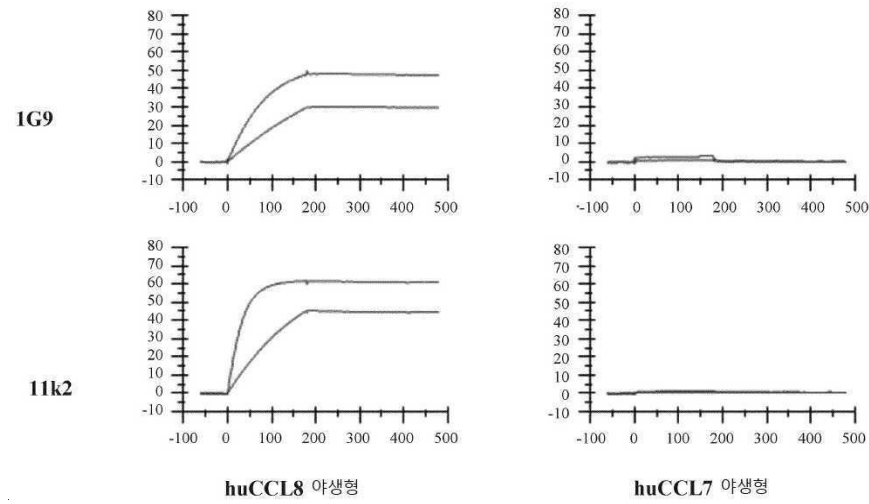
### 도면1b



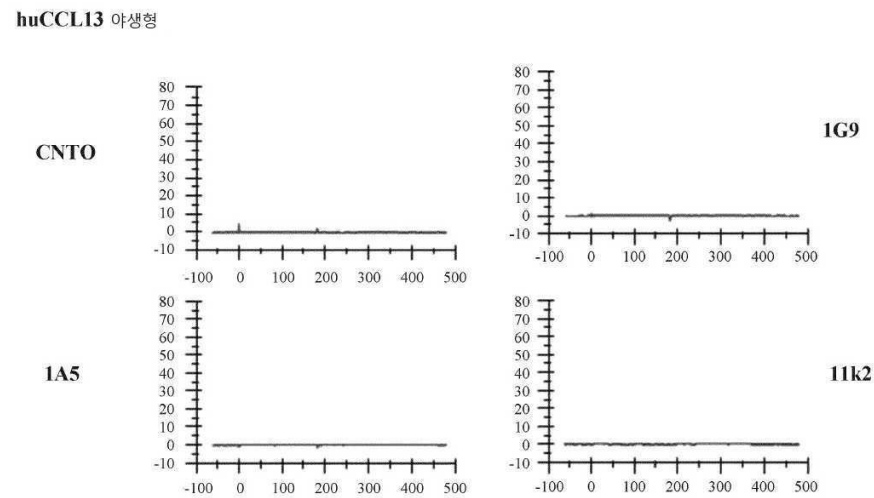
도면1c



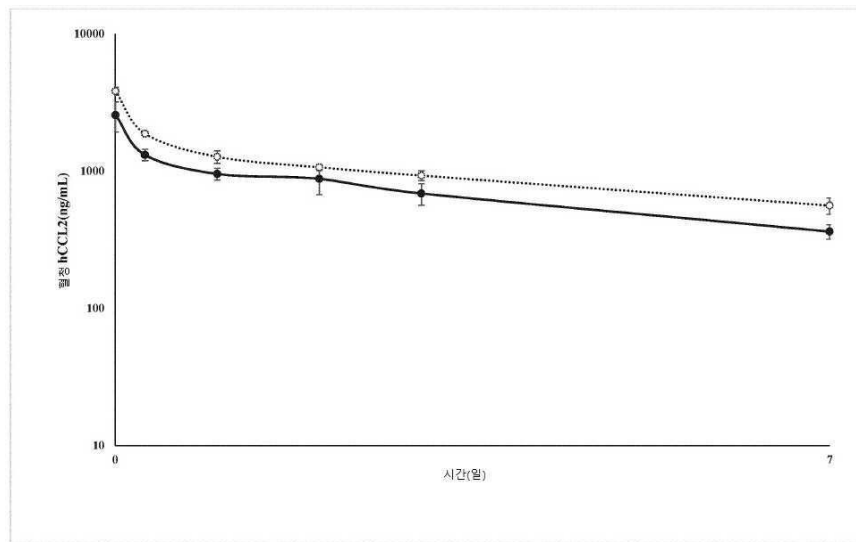
도면1d



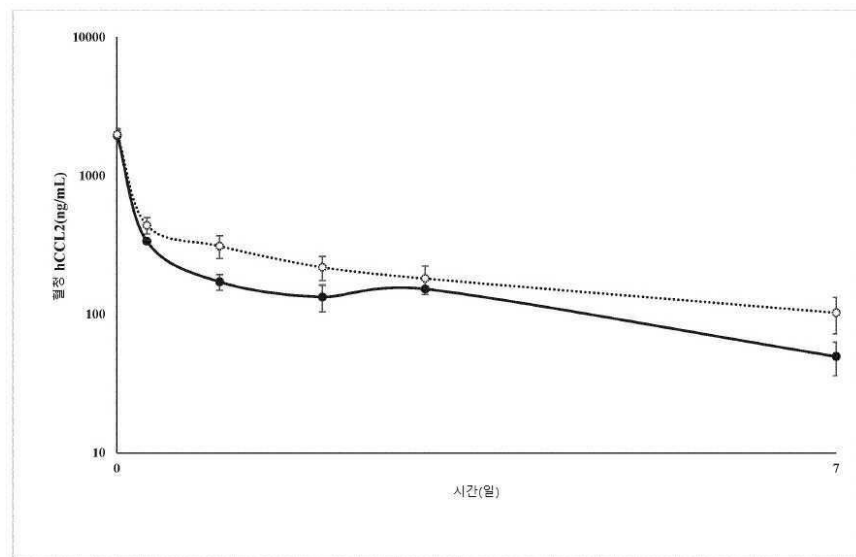
도면1e



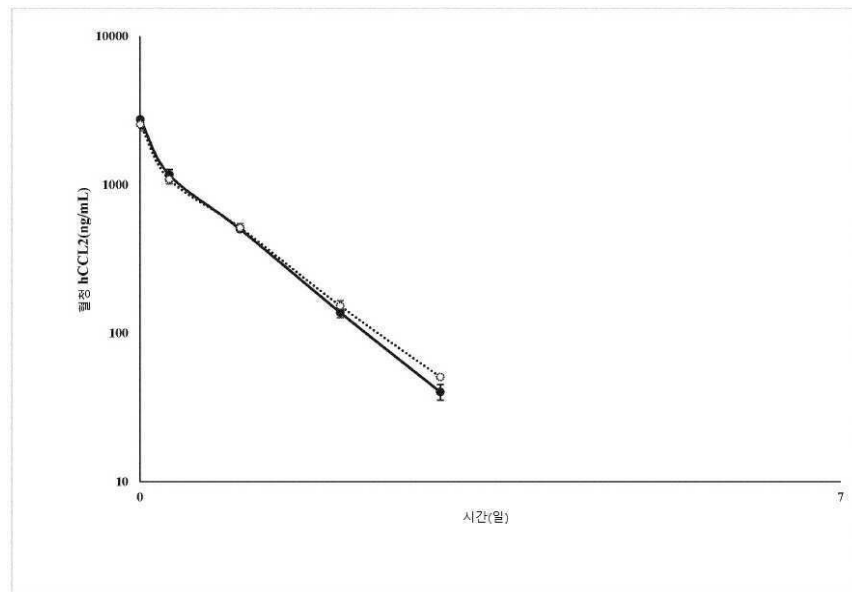
도면2a



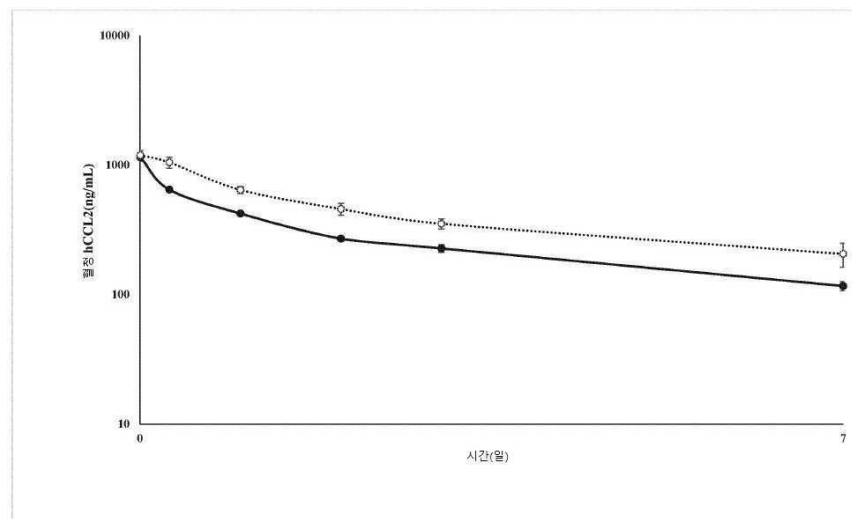
도면2b



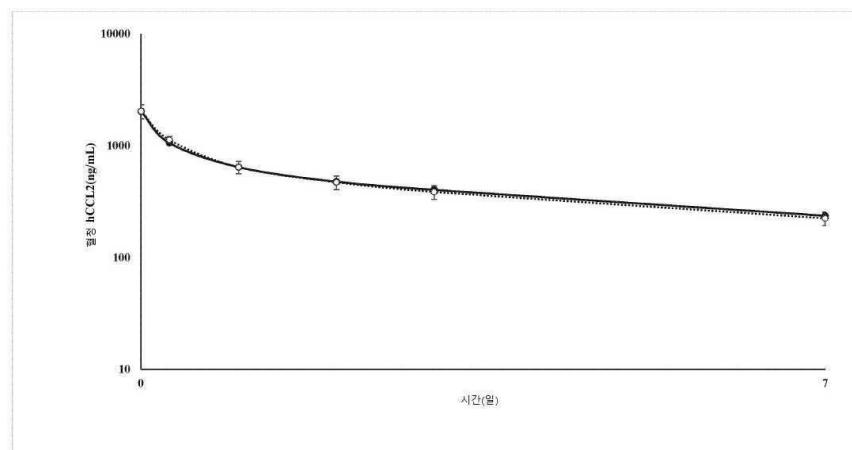
도면2c



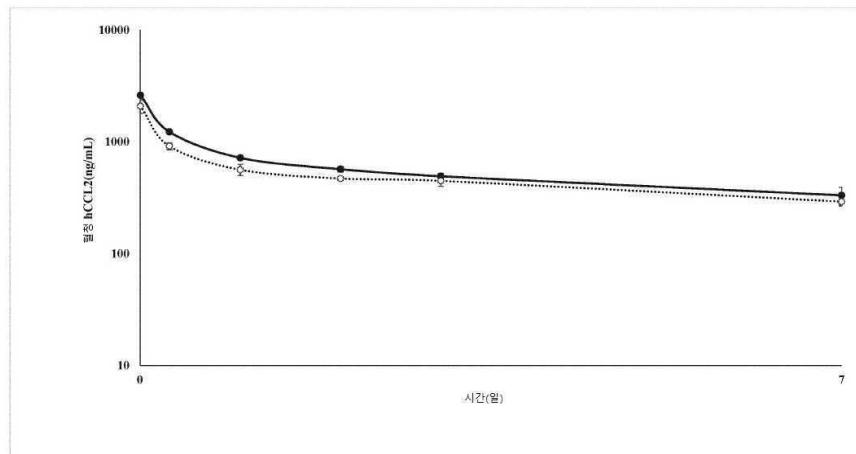
도면2d



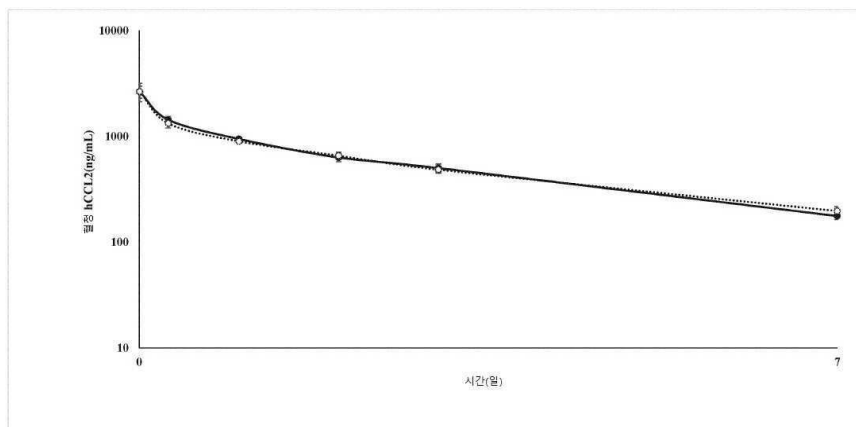
도면2e



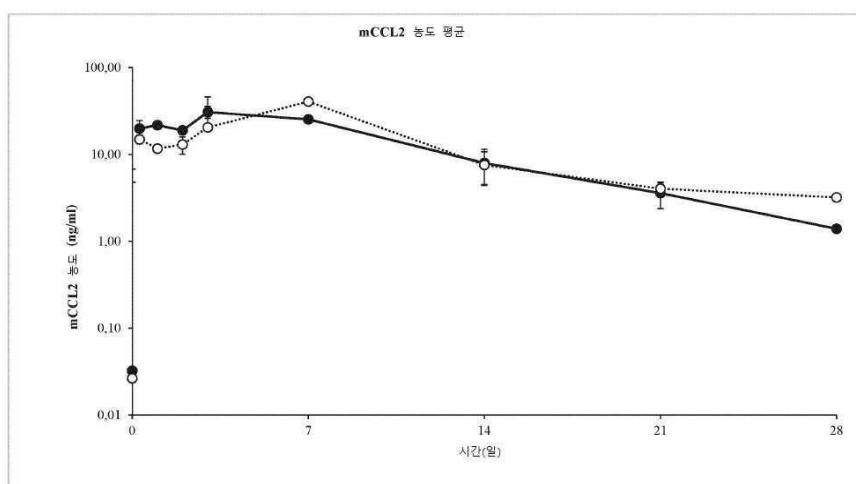
도면2f



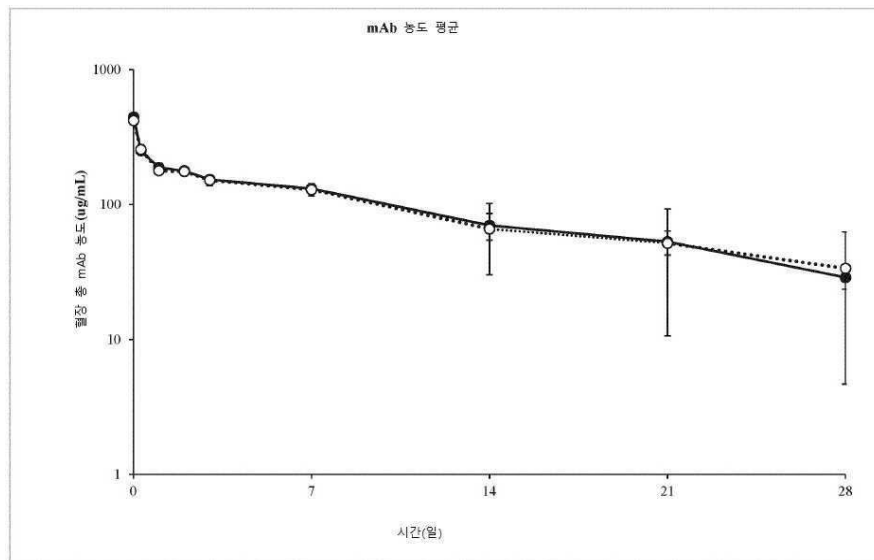
도면2g



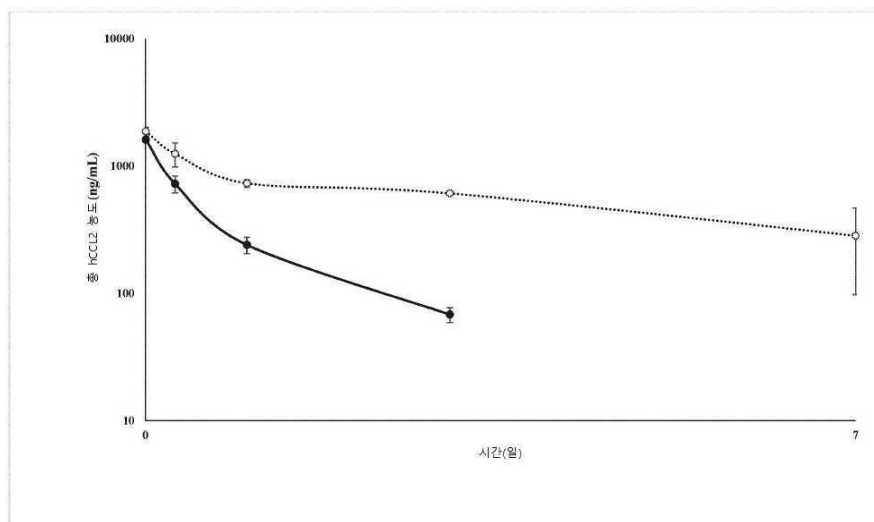
도면3a



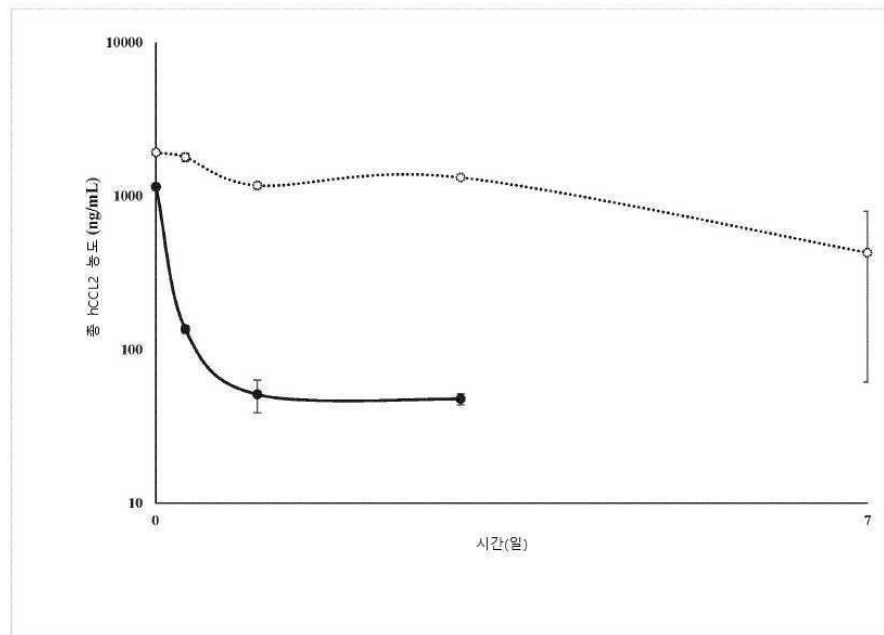
도면3b



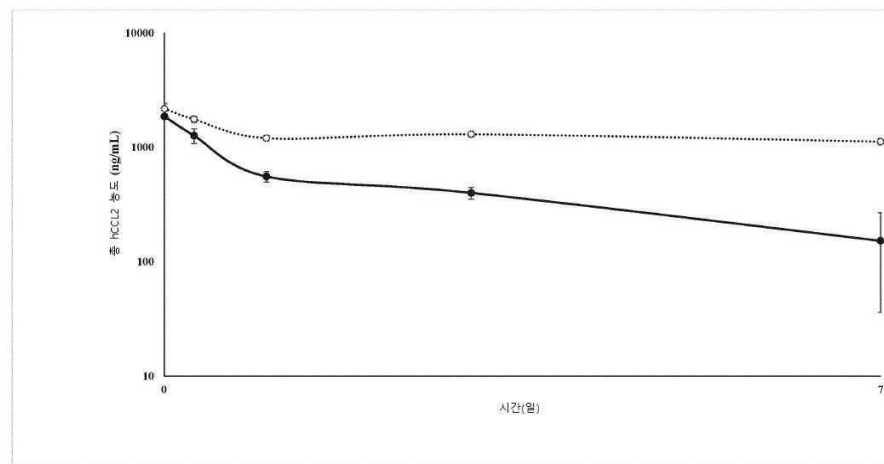
도면4a



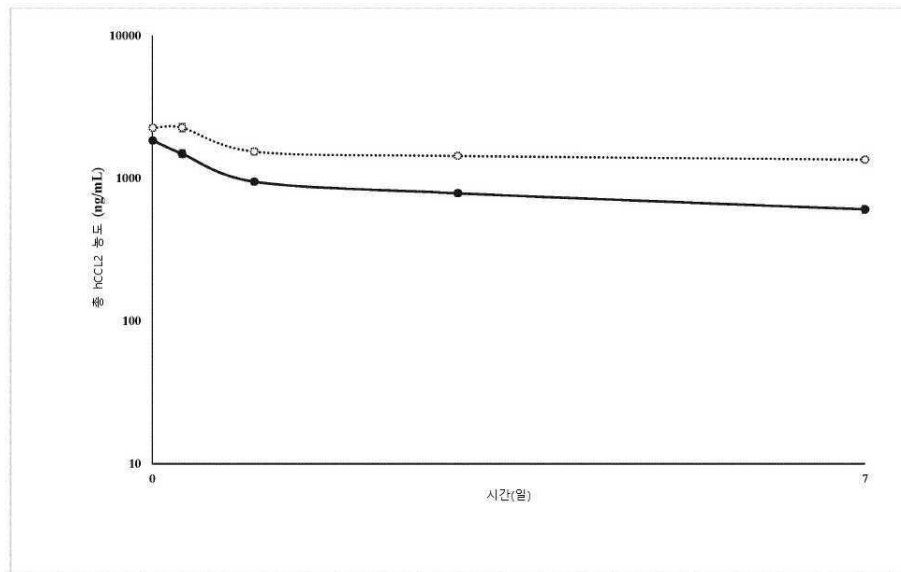
도면4b



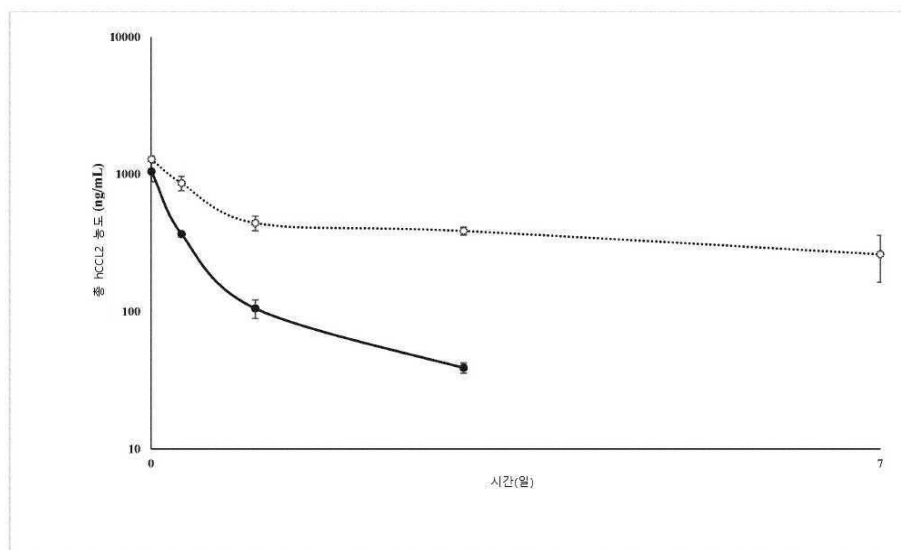
도면4c



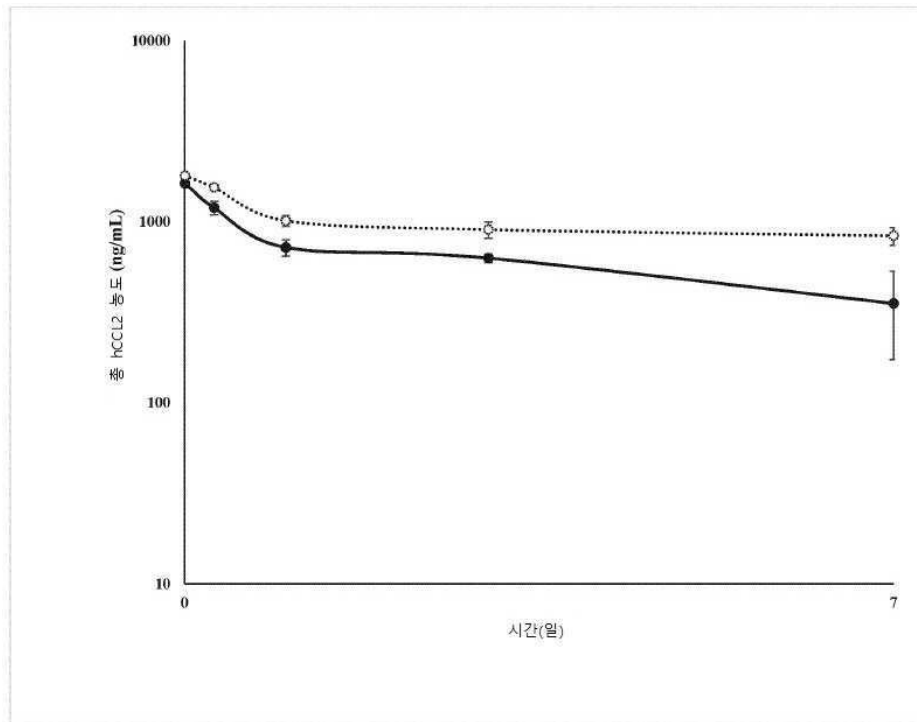
도면4d



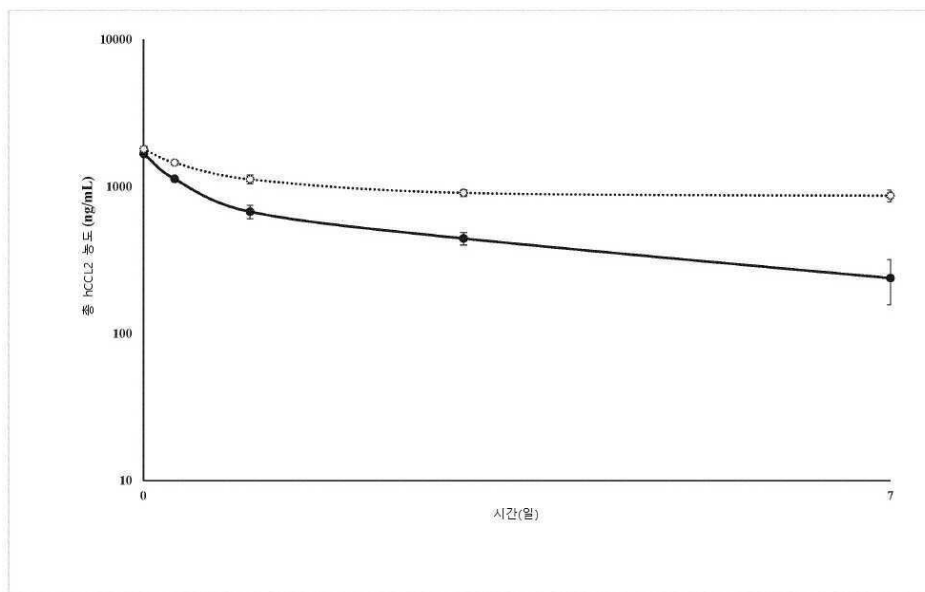
도면4e



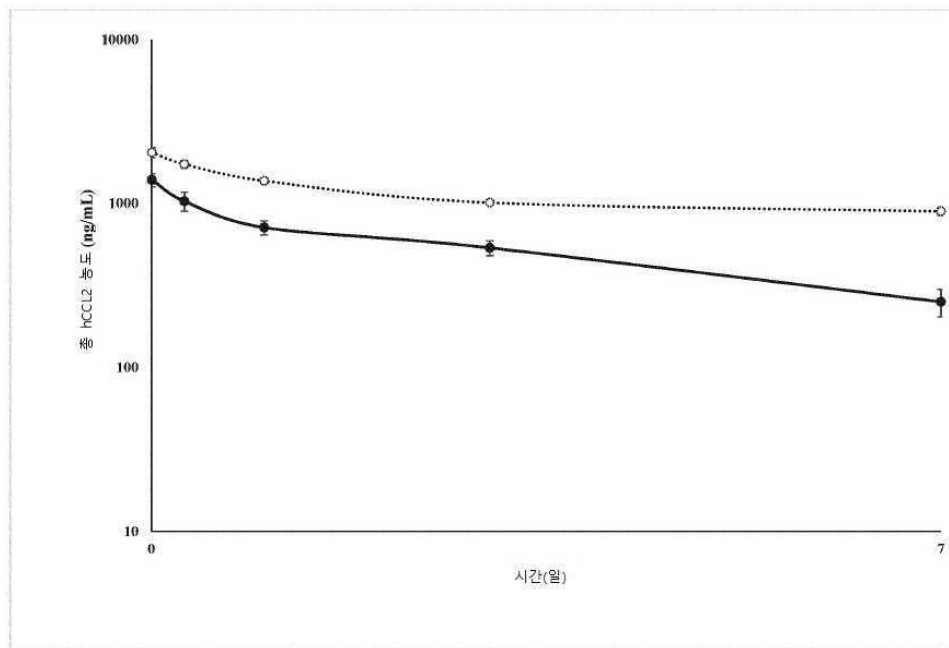
도면4f



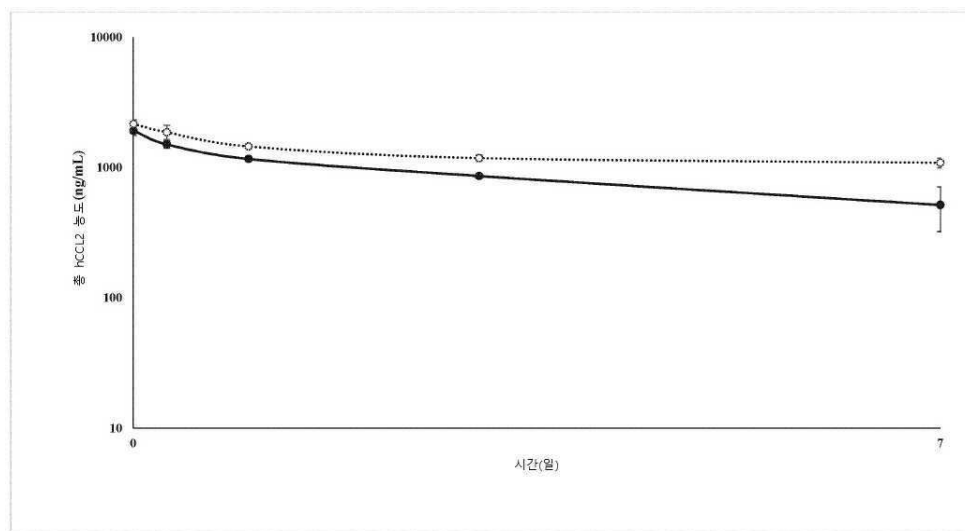
도면4g



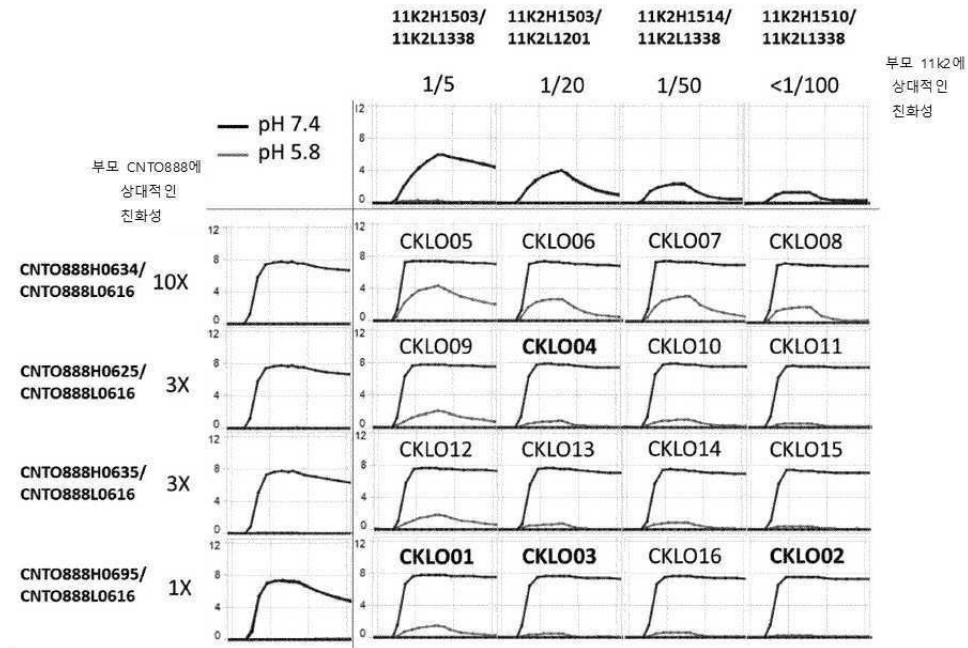
도면4h



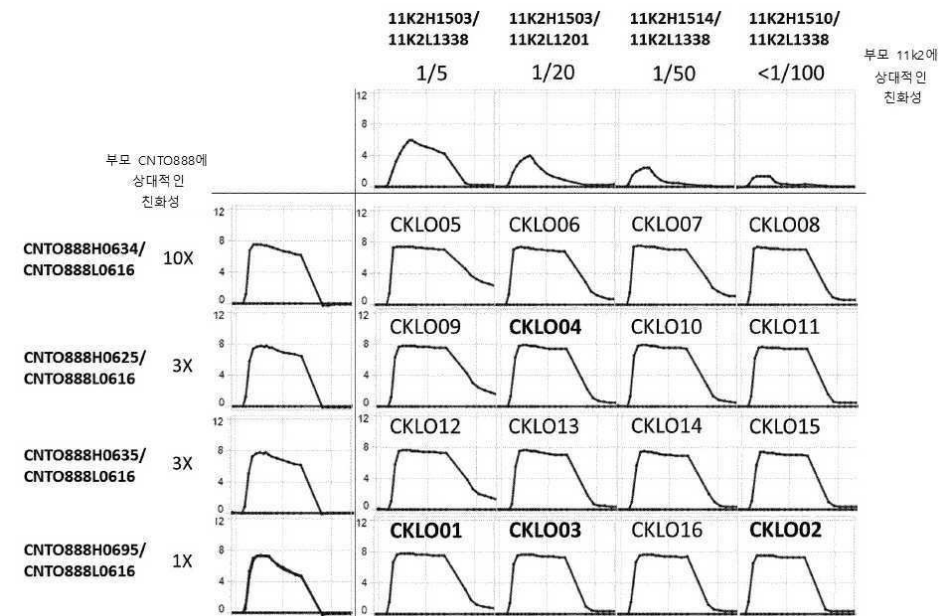
도면4i



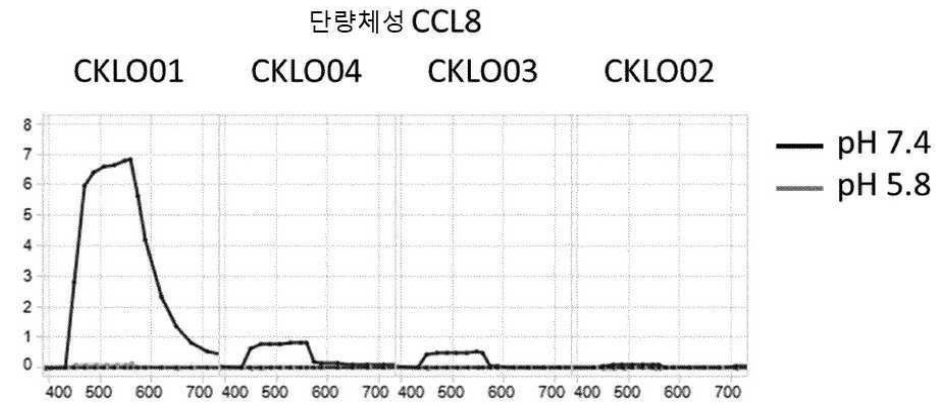
도면5a



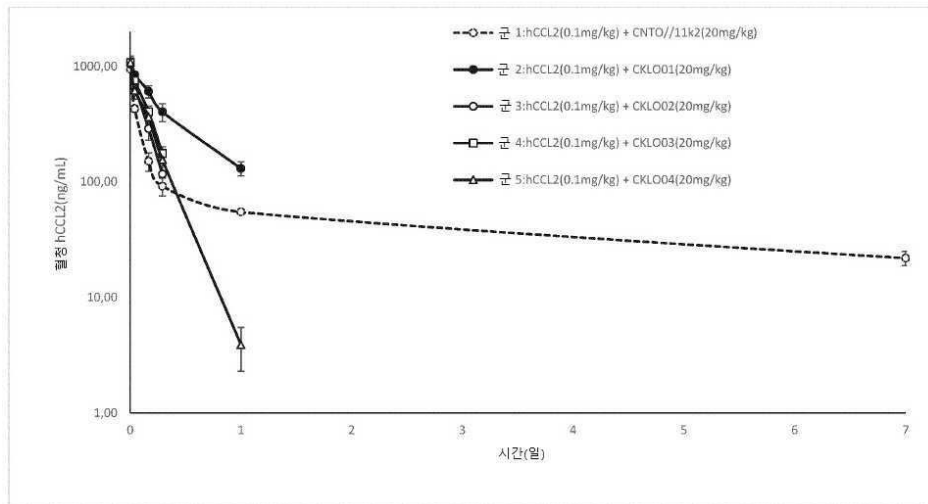
도면5b



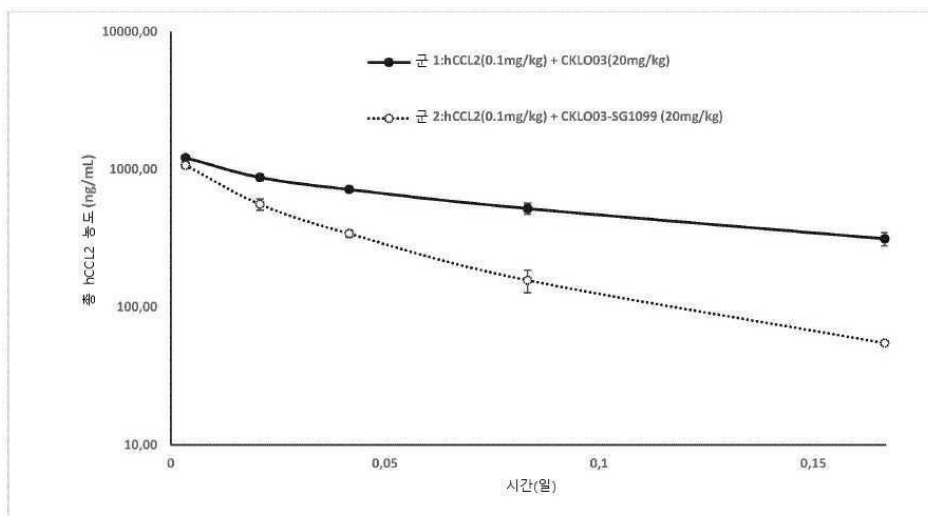
도면6



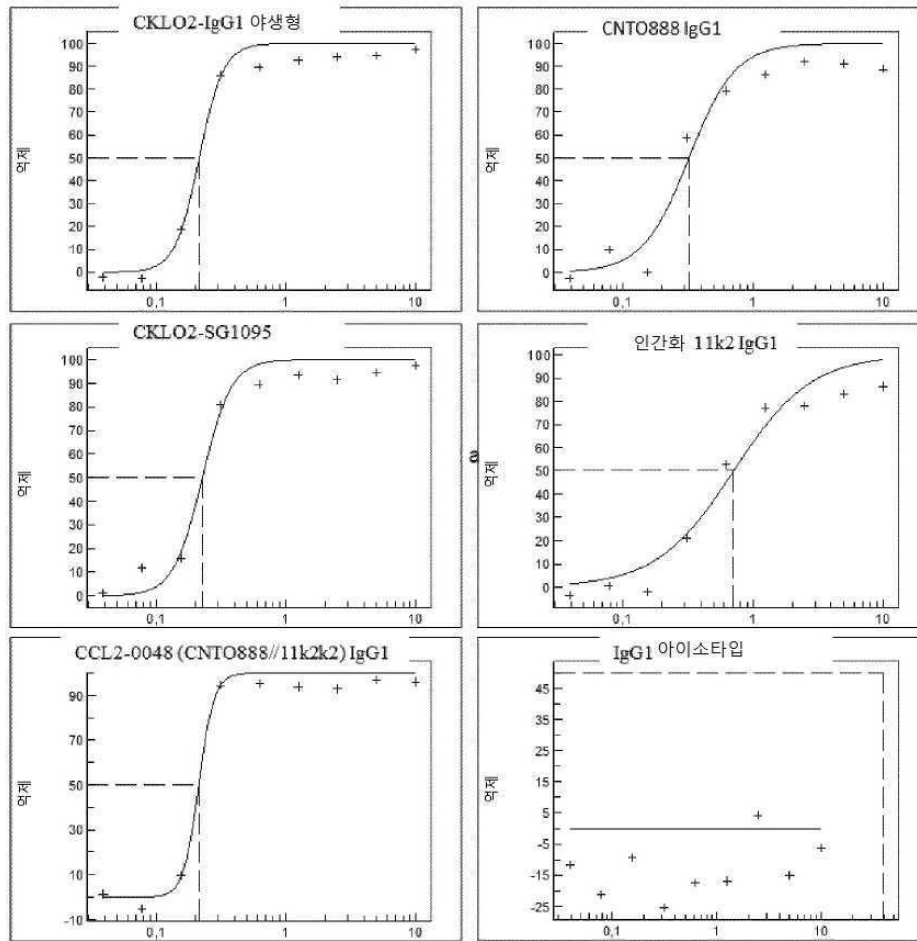
도면7a



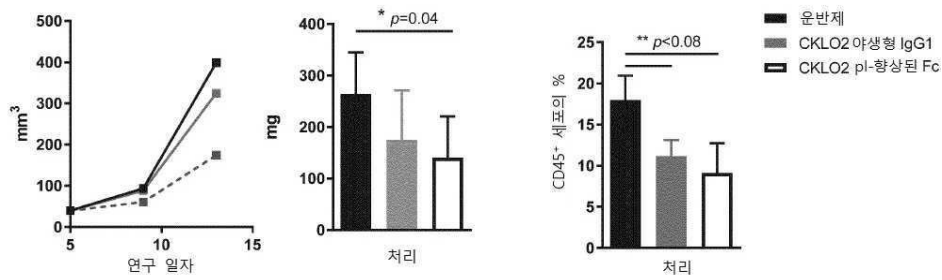
도면7b



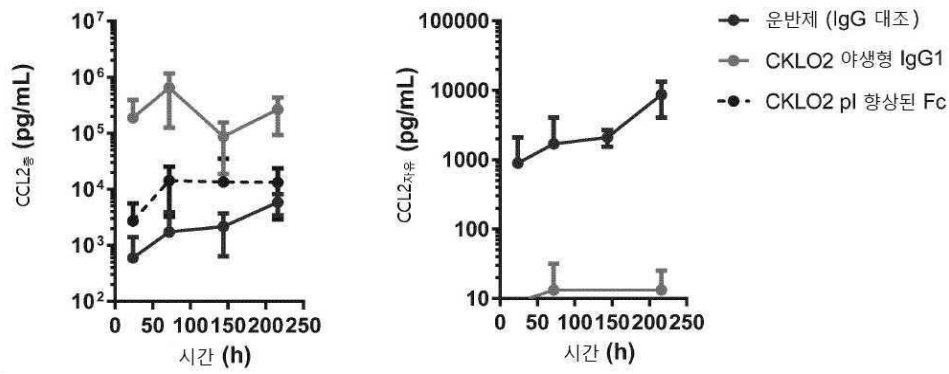
도면8



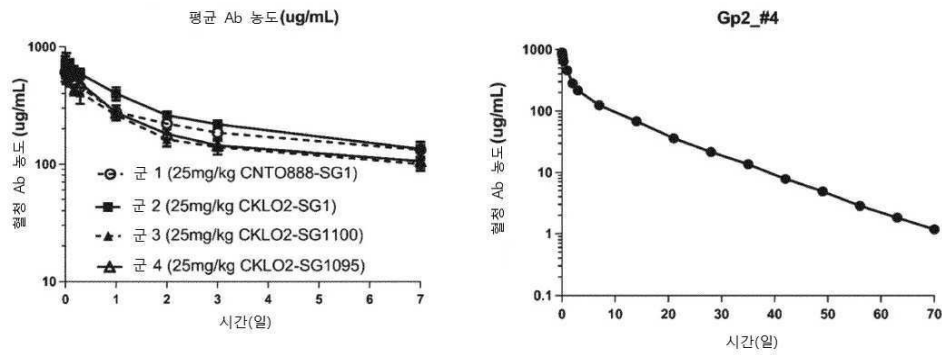
도면9



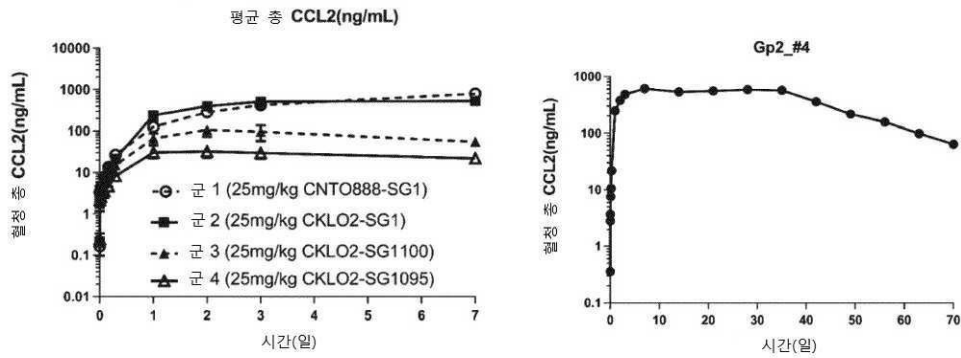
도면10



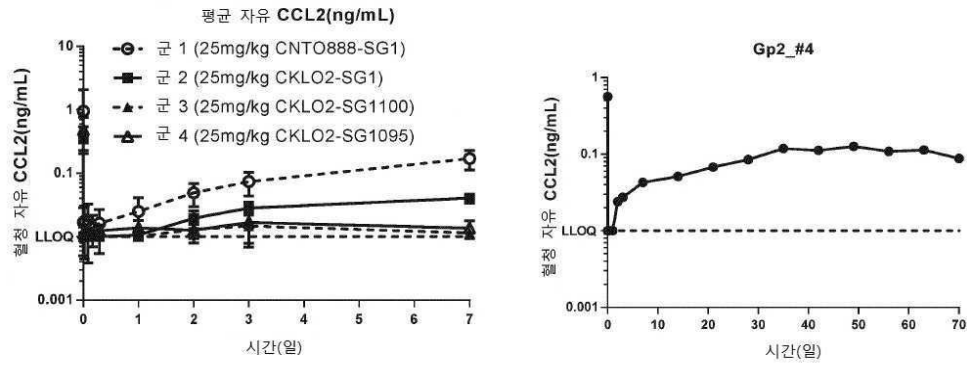
도면11



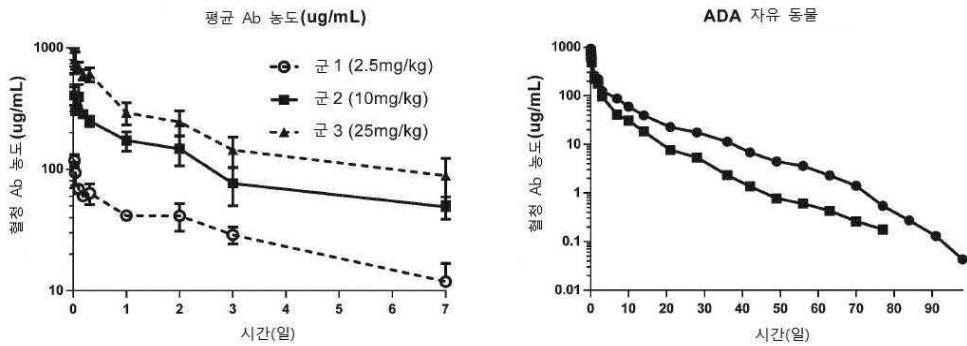
도면12



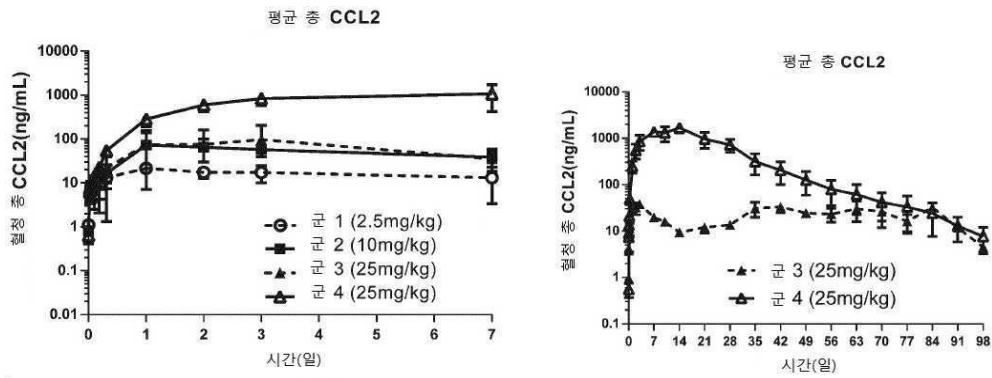
도면13



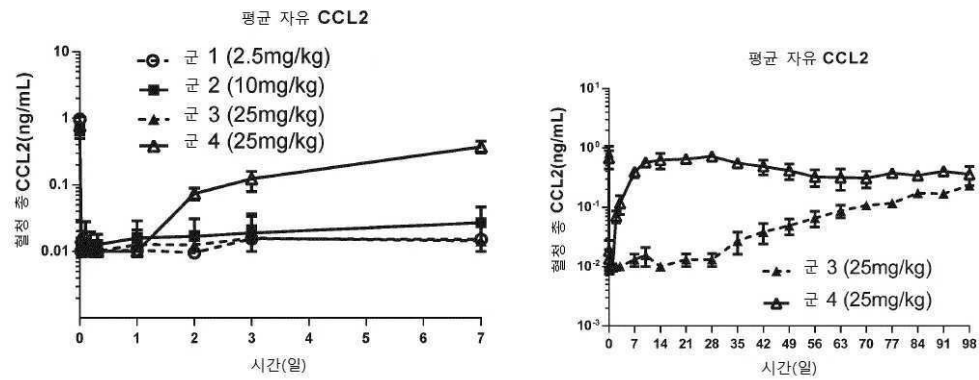
도면14



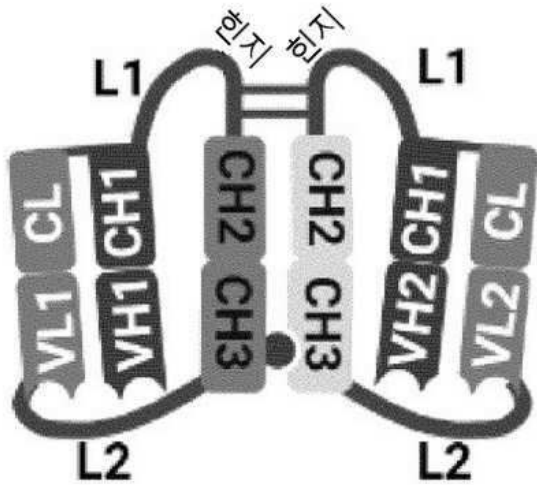
도면15



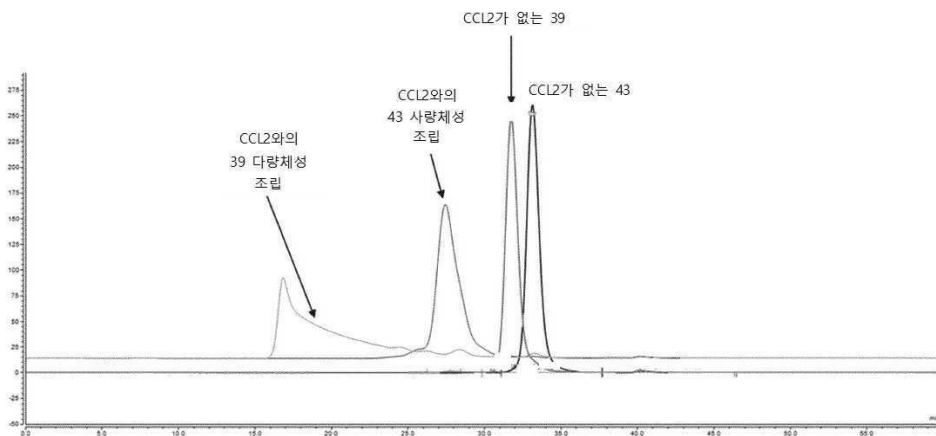
도면16



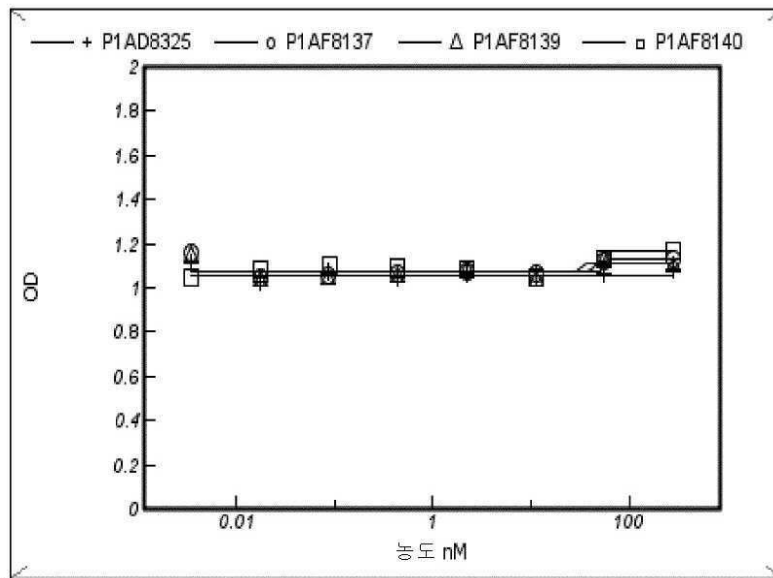
도면17



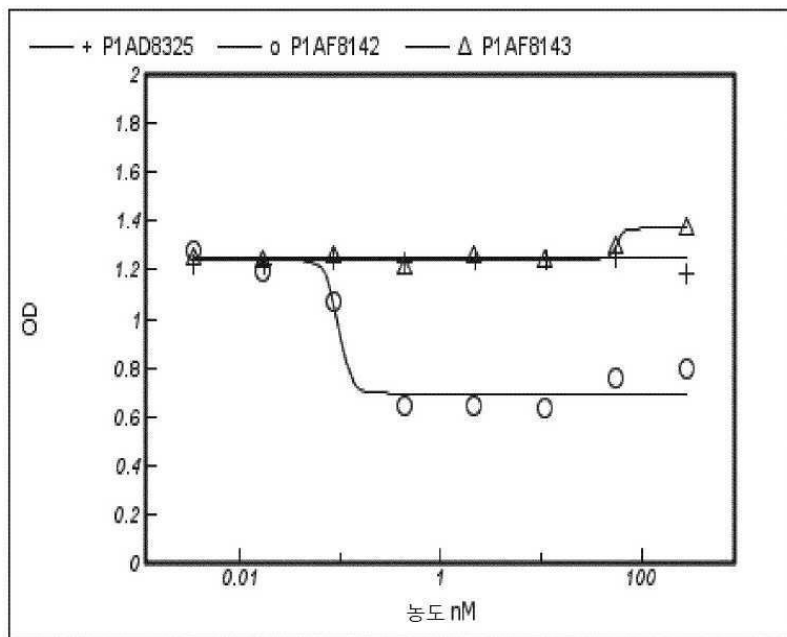
도면18



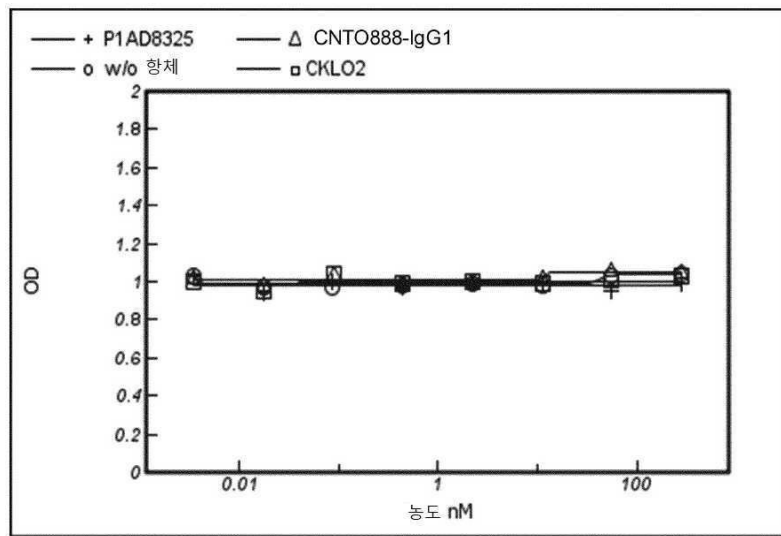
도면19a



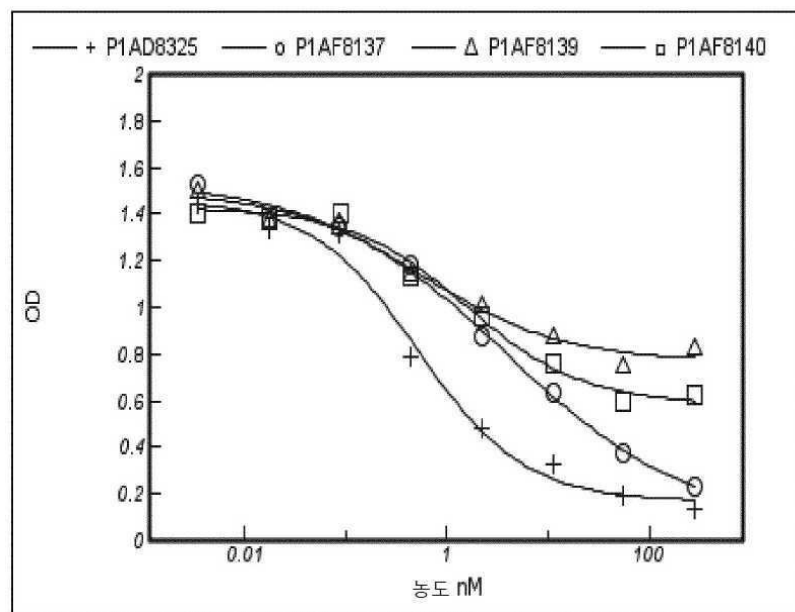
도면19b



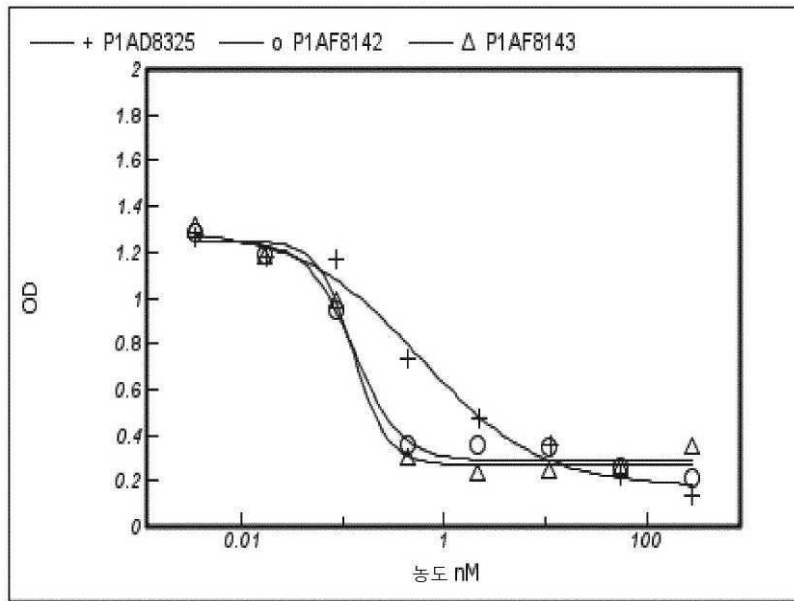
도면19c



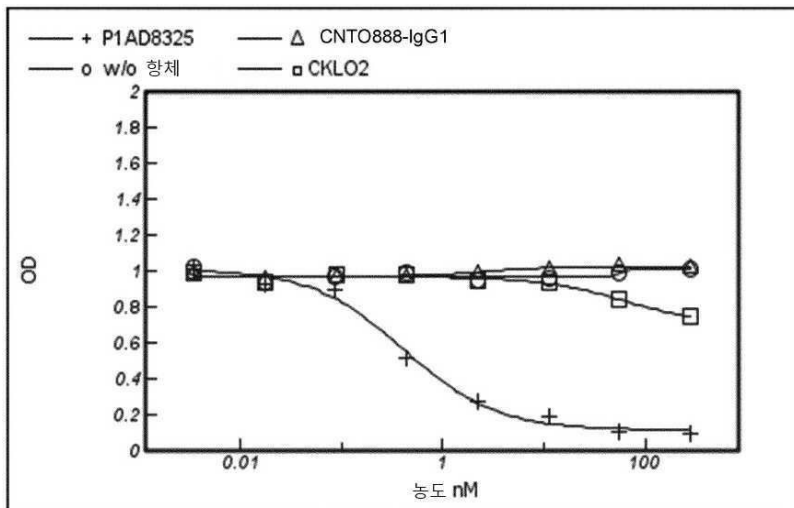
도면20a



도면20b



도면20c



## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

Hoffmann-La Roche Inc.

<120> Bispecific anti-CCL2 antibodies

<130> P36927-WO (WJ)

<150> EP21180204.6

<151> 2021-06-18

<160> 191

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR-H1 1A4

<400> 1

Trp Ile Cys

1

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR-H2 1A4

<400> 2

Cys Ile Gly Ala Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR-H3 1A4

<400> 3

Thr Gly Thr Glu Phe Thr Tyr Tyr Ser Leu

1 5 10

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR-L1 1A4

<400> 4

Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Met Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR-L2 1A4

<400> 5

Thr Ala Ser Ser Leu Ala Ser

1 5

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR-L3 1A4

<400> 6

Ala Gly Tyr Lys Ser Tyr Ser Asn Asp Glu Tyr Gly

1 5 10

<210> 7

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain variable domain VH 1A4

<400> 7

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser

1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Glu Leu Asp Phe Tyr Trp Ile Cys

20 25 30

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ala Cys Ile

35 40 45

Gly Ala Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly

50 55 60

Arg Phe Thr Val Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr Leu Gln Met

65 70 75 80

Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Thr  
85 90 95

Gly Thr Glu Phe Thr Tyr Tyr Ser Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 8

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain variable domain VL 1A4

<400> 8

Ala Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly

1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn  
20 25 30

Asn Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Thr Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser His Phe Arg  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu

65 70 75 80

Ser Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Tyr Lys Ser Tyr Ser  
85 90 95

Asn Asp Glu Tyr Gly Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys  
100 105 110

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR-H1 1A5

<400> 9

Thr Ser Tyr Trp Met Cys

1 5

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR-H2 1A5

<400> 10

Cys Ile Ser Ser Ser Ile Gly Val Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Glu

1 5 10 15

Gly

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR-H3 1A5

<400> 11

Thr Thr Asp Asp Asn Trp Asn Val Gly Phe Asn Leu

1 5 10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR-L1 1A5

<400> 12

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn Arg Tyr Leu Ser

1 5 10

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR-L2 1A5

<400> 13

Gly Thr Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR-L3 1A5

<400> 14

Gln Gln Gly Ala Thr Ile Ser Tyr Leu Asp Asn Ala

1 5 10

<210> 15

<211> 121

<212>

> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain variable domain VH 1A5

<400> 15

Gln Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Glu Gly

1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Thr Ser

20 25 30

Tyr Trp Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu

35 40 45

Ile Ala Cys Ile Ser Ser Ser Ile Gly Val Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp

50 55 60

Ala Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr

65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Val Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Thr Thr Asp Asp Asn Trp Asn Val Gly Phe Asn Leu Trp Gly

100 105 110

Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 16

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain variable domain VL 1A5

<400> 16

Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Gly Val Gly

1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn Arg

20 25 30

Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu

65 70 75 80

Ser Ala Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Thr Ile Ser

85 90 95

Tyr Leu Asp Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys

100 105 110

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR-H1 1G9

<400> 17

Leu Tyr Ser Tyr Met Cys

1 5

<210> 18

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR-H2 1G9

<400> 18

Cys Val Asp Ala Gly Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 19

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR-H3 1G9

<

400> 19

Gly Ile Leu Tyr Tyr Thr Trp Pro Tyr Pro Ala Gly Ala Ile Asp Ala

1 5 10 15

Phe Asp Ser

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR-L1 1G9

<400> 20

Gln Ala Ser Glu Ser Ile Ser Asn Tyr Leu Ser

1 5 10

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR-L2 1G9

<400> 21

Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR-L3 1G9

<400> 22

Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Ser Asn Val Phe Asn Thr

1 5 10

<210> 23

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain variable domain VH 1G9

<400> 23

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Ala Cys Val Asp Ala Gly Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp

50 55 60

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr

65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Ile Leu Tyr Tyr Thr Trp Pro Tyr Pro Ala Gly Ala Ile

100 105 110

Asp Ala Phe Asp Ser Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 24

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain variable domain VL 1G9

<400> 24

Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Ser Glu Pro Val Gly

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

65 70 75 80  
Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Ser Asn  
85 90 95  
Val Phe Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys  
100 105 110

<210> 25

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR-H1 2F6

<400> 25

Asn Asn Tyr Tyr Met Cys

1 5

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213>

> Artificial

<220><223> heavy chain CDR-H2 2F6

<400> 26

Cys Ile Ser Thr Asp Asp Ser Asn Thr His Tyr Ala Ser Trp Ala Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 27

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR-H3 2F6

<400> 27

Asp Ala His Phe Thr Ser Tyr Gly Tyr Gly Phe Asp Leu

1 5 10

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR-L1 2F6

<400> 28

Arg Ala Ser Glu Asp Ile Glu Asn Leu Val Ala

1 5 10

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR-L2 2F6

<400> 29

Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser

1 5

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR-L3 2F6

<400> 30

Gln Gly Asp Tyr Gly Ser Gly Trp Ile Met Tyr Ser

1 5 10

<210> 31

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain variable domain VH 2F6

<400> 31

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

1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Asn Asn Tyr

20 25 30

Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Cys Ile Ser Thr Asp Asp Ser Asn Thr His Tyr Ala Ser Trp Ala

50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Ser Ser Thr Ala Leu Thr Leu

65 70 75 80

Gln Val Ala Gly Leu Thr Val Ala Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys Ala

85 90 95

Arg Asp Ala His Phe Thr Ser Tyr Gly Tyr Gly Phe Asp Leu Trp Gly

100 105 110

Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 32

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain variable domain VL 2F6

<400> 32

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Ser Ala Ala Val Gly

1 5 10 15

Gly Thr Val Ser Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Glu Asn Leu

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Gly Asp Leu Glu Ser

65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Asp Tyr Gly Ser Gly Trp

85 90 95

Ile Met Tyr Ser Phe Gly Gly Gly Thr Asp Leu Val Val Lys

100 105 110

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR-H1 CNT0888

<400> 33

Ser Tyr Gly Ile Ser

1 5

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR-H2 CNT0888

<400> 34

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR-H3 CNT0888

<400>

35

Tyr Asp Gly Ile Tyr Gly Glu Leu Asp Phe

1 5 10

<210> 36

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR-L1 CNT0888

<400> 36

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Ala Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR-L2 CNT0888

<400> 37

Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213>

> Artificial

<220><223> light chain CDR-L3 CNT0888

<400> 38

His Gln Tyr Ile Gln Leu His Ser Phe Thr

1 5 10

<210> 39

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain variable domain VH CNT0888

<400> 39

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala 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 Tyr Asp Gly Ile Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
100                    105                    110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 40

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain variable domain VL CNT0888

<400> 40

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 Asp Ala

20                    25                    30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35                    40                    45

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser

50                    55                    60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu

65                    70                    75                    80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ile Gln Leu His

85

90

95

Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 41

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR-H1 Humanized 11K2 (= 11K2)

<400> 41

Asp Thr Tyr Met His

1

5

<210> 42

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR-H2 Humanized 11K2 (= 11K2)

<400> 42

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Phe Asp Pro Lys Phe Gln

1

5

10

15

Gly

<210> 43

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR-H3 Humanized 11K2 (= 11K2)

<400> 43

Gly Val Phe Gly Phe Phe Asp Tyr

1

5

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR-L1 Humanized 11K2 (= 11K2)

<400> 44

Lys Ala Thr Glu Asp Ile Tyr Asn Arg Leu Ala

1 5 10

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR-L2 Humanized 11K2 (= 11K2)

<400> 45

Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr

1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR-L3 Humanized 11K2 (= 11K2)

<400> 46

Gln Gln Phe Trp Ser Ala Pro Tyr Thr

1 5

<210> 47

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain variable domain VH Humanized 11K2 (= 11K2)

<400> 47

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 Leu Thr Ile Ser Asp Thr

20 25 30

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

35 40 45

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile 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 Phe Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 48

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain variable domain VL Humanized 11K2 (= 11K2)

<400> 48

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Thr Glu Asp Ile Tyr Asn Arg

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Ser Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Trp Ser Ala Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 49

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR-H1 ABN912

<400> 49

His Tyr Trp Met Ser

1 5

<

210> 50

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR-H2 ABN912

<400> 50

Asn Ile Glu Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 51

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR-H3 ABN912

<400> 51

Asp Leu Glu Gly Leu His Gly Asp Gly Tyr Phe Asp Leu

1 5 10

<210> 52

<211> 11

<212> PRT

<213>

> Artificial

<220><223> light chain CDR-L1 ABN912

<400> 52

Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Ala Leu Ala

1 5 10

<210> 53

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR-L2 ABN912

<400> 53

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser

1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR-L3 ABN912

<400> 54

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 55

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain variable domain VH ABN912

<400> 55

Glu Val Gln Leu Val Gln 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 His Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Asn Ile Glu Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val 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 Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Leu Glu Gly Leu His Gly Asp Gly Tyr Phe Asp Leu Trp  
100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 56

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain variable domain VL ABN912

<400> 56

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15  
Asp Arg Val Ile Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Ala  
20 25 30  
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

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

<210> 57

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR-H1 mutated variant CNT0888

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> X is I or T

<400> 57

Ser His Tyr Gly Xaa Ser

1 5

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR-H2 mutated variant CNT0888

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X is V or I or H

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> X is P or H

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> X is H or G

<400> 58

Gly Xaa Ile Xaa Ile Phe Xaa Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR-H3 mutated variant CNT0888

<400> 59

Tyr Asp Ala His Tyr Gly Glu Leu Asp Phe

1 5 10

<210> 60

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR-L1 mutated variant CNT0888

<400> 60

Arg Ala Ser Gln His Val Ser Asp Ala Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 61

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR-L2 mutated variant CNT0888

<400> 61

Asp Ala Ser Asp Arg Ala Glu

1 5

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR-L3 mutated variant CNT0888

<400> 62

His Gln Tyr Ile His Leu His Ser Phe Thr

1 5 10

<

210> 63

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain FR-H1 mutated variant CNT0888

<400> 63

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

20 25

<210> 64

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain FR-H2 mutated variant CNT0888

<400> 64

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

1 5 10

<210> 65

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain FR-H3 mutated variant CNT0888

<400> 65

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 66

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> heavy chain FR-H4 mutated variant CNT0888

<400> 66

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 67

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain FR-L1 mutated variant CNT0888

<400> 67

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

20

<210> 68  
<211> 15  
<212> PRT

<213> Artificial  
<220><223> light chain FR-L2 mutated variant CNT0888  
<400> 68

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr  
1 5 10 15

<210> 69  
<211> 32  
<212> PRT

<213> Artificial  
<220><223> light chain FR-L3 mutated variant CNT0888  
<400> 69

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 70  
<211> 9  
<212> PRT

<213> Artificial  
<220><223> light chain FR-L4 mutated variant CNT0888  
<400> 70

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
1 5

<210> 71  
<211> 119  
<212> PRT

<213> Artificial  
<220><223> heavy chain variable domain VH mutated variant CNT0888 H0695  
<400> 71

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 His Tyr

20                      25                      30

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

35                      40                      45

Gly Gly Val Ile Pro Ile Phe His Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50                      55                      60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala 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 Tyr Asp Ala His Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly

100                      105                      110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 72

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain variable domain VH            mutated variant    CNT0888 H0625

<400> 72

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 His Tyr

20                      25                      30

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

35                      40                      45

Gly Gly Ile Ile His Ile Phe His Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50                      55                      60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala 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 Tyr Asp Ala His Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 73

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain variable domain VH mutated variant CNT0888 H0634

<400> 73

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 His Tyr

20 25 30

Gly Thr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ile Ile His Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala 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 Tyr Asp Ala His Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 74

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain variable domain VH mutated variant CNT0888 H0635

<400> 74

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 His Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Gly His Ile His Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala 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 Tyr Asp Ala His Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 75

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain variable domain VL mutated variant CNT0888 L0616

<400> 75

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 His Val Ser Asp Ala

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Arg Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu  
65 70 75 80  
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ile His Leu His  
85 90 95  
Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210>

76

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR-H1 mutated variant humanized 11K2

<400> 76

His Thr Tyr Met His

1 5

<210> 77

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR-H2 mutated variant humanized 11K2

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> X is D or E

<400> 77

Arg Ile Asp Pro Xaa Asn His Asn Thr Lys Phe Asp Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 78

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR-H3 mutated variant humanized 11K2

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> X is D or E

<400> 78

Gly Val Phe Gly Phe Phe Xaa His

1 5

<210> 79

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR-L1 mutated variant humanized 11K2

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X is F or T

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> X is R or L

<400> 79

Lys Ala Xaa Glu Asp Ile Tyr Asn Arg Xaa Ala

1 5 10

<210> 80

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR-L2 mutated variant humanized 11K2

<400> 80

Gly Ala Thr Ser Leu Glu His

1 5

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR-L3 mutated variant humanized 11K2

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> X is W or R

<400> 81

Gln Gln Phe Xaa Ser Ala Pro Tyr Thr

1 5

<210> 82

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain FR-H1 mutated variant humanized 11K2

<400> 82

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 Leu Thr Ile Ser

20 25 30

<210> 83

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain FR-H2 mutated variant humanized 11K2

<400> 83

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

1 5 10

<210> 84

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain FR-H3 mutated variant humanized 11K2

<400> 84

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 85

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain FR-H4 mutated variant humanized 11K2

<400> 85

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 86

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain FR-L1 mutated variant 11K2

<400> 86

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

20

<210> 87

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain FR-L2 mutated variant humanized 11K2

<400> 87

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile His

1 5 10 15

<210> 88

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain FR-L3 mutated variant humanized 11K2

<400> 88

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 89

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain FR-L4 mutated variant humanized 11K2

<400> 89

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 90

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain variable domain VH mutated variant humanized 11K2

H1503

<400> 90

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 Leu Thr Ile Ser His Thr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile 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 Phe Gly Phe Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 91

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain variable domain VH mutated variant humanized 11K2

H1510

<400> 91

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 Leu Thr Ile Ser His Thr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile 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 Phe Gly Phe Phe Glu His Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 92

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain variable domain VH mutated variant humanized 11K2

H1514

<400> 92

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile 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 Phe Gly Phe Phe Glu His Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
                     100                      105                      110  
 Val Thr Val Ser Ser  
                     115

<210> 93

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain variable domain VL            mutated variant humanized 11K2

L1338

<400> 93

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

|            |                                                               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |  |
|------------|---------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|----|--|
| 65         | 70                                                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80 |    |    |    |  |
| Glu        | Asp                                                           | Phe | Ala | Thr | Tyr | Tyr | Cys | Gln | Gln | Phe | Trp | Ser | Ala | Pro | Tyr |    |    |    |    |  |
|            |                                                               |     |     | 85  |     |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     |    |    | 95 |    |  |
| Thr        | Phe                                                           | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Val | Glu | Ile | Lys |     |     |     |     |     |    |    |    |    |  |
|            |                                                               |     |     | 100 |     |     |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |    |    |    |    |  |
| <210>      | 94                                                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |  |
| <211>      | 107                                                           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |  |
| <212>      | PRT                                                           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |  |
| <213>      | Artificial                                                    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |  |
| <220><223> | light chain variable domain VL mutated variant humanized 11K2 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |  |
| L1201      |                                                               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |  |
| <400>      |                                                               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |  |
| 94         |                                                               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |  |
| Asp        | Ile                                                           | Gln | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Ser | Ser | Leu | Ser | Ala | Ser | Val | Gly |    |    |    |    |  |
| 1          |                                                               |     |     | 5   |     |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     |    | 15 |    |    |  |
| Asp        | Arg                                                           | Val | Thr | Ile | Thr | Cys | Lys | Ala | Thr | Glu | Asp | Ile | Tyr | Asn | Arg |    |    |    |    |  |
|            |                                                               |     |     | 20  |     |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |    |    | 30 |    |  |
| Leu        | Ala                                                           | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Lys | Ala | Pro | Lys | Leu | Leu | Ile |    |    |    |    |  |
|            |                                                               |     |     | 35  |     |     |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     |    |    | 45 |    |  |
| His        | Gly                                                           | Ala | Thr | Ser | Leu | Glu | His | Gly | Val | Pro | Ser | Arg | Phe | Ser | Gly |    |    |    |    |  |
| 50         |                                                               |     |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     |     |     | 60  |     |    |    |    |    |  |
|            |                                                               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |  |
| Ser        | Gly                                                           | Ser | Gly | Thr | Asp | Tyr | Thr | Leu | Thr | Ile | Ser | Ser | Leu | Gln | Pro |    |    |    |    |  |
| 65         |                                                               |     |     |     | 70  |     |     |     |     |     |     | 75  |     |     |     |    |    |    | 80 |  |
| Glu        | Asp                                                           | Phe | Ala | Thr | Tyr | Tyr | Cys | Gln | Gln | Phe | Arg | Ser | Ala | Pro | Tyr |    |    |    |    |  |
|            |                                                               |     |     | 85  |     |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     |    |    | 95 |    |  |
| Thr        | Phe                                                           | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Val | Glu | Ile | Lys |     |     |     |     |     |    |    |    |    |  |
|            |                                                               |     |     | 100 |     |     |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |    |    |    |    |  |
| <210>      | 95                                                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |  |
| <211>      | 107                                                           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |  |
| <212>      | PRT                                                           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |  |
| <213>      | homo sapiens                                                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |  |
| <400>      | 95                                                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |  |
| 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> 96

<211> 105

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 96

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu

1                      5                      10                      15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe

                    20                      25                      30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val

                    35                      40                      45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys

                    50                      55                      60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser

65                      70                      75                      80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu

                    85                      90                      95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

100 105

<210> 97

<211> 328

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 97

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 Asp Glu  
 225 230 235 240

Leu 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  
 325

<210> 98

<211> 328

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> exemplary human heavy chain constant region derived from IgG1  
 with mutations L234A, L235A and P329G (Fcγ receptor silenced)

<400> 98

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 | Gly | 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 | Asp | Glu |
| 225 |     |     |     | 230 |     |     |     | 235 |     |     |     | 240 |     |     |     |
| Leu | 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

325

<210> 99

<211> 328

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 99

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  
325

<210> 100

<211> 328

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> exemplary human heavy chain constant region derived from IgG1  
with mutations (SG105-IgG1 allotype - Fcγ receptor silenced)

<400> 100

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 Arg Arg Gly Pro Lys 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  
325

<210> 101

<211> 328

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> SG1095-exemplary human heavy chain constant region derived from  
IgG1 including the mutations (Kabat EU numbering)

L235W/G236N/H268D/Q295L/A330K/K326T, Q311R/P343R, N434A,  
Q438R/S440E

<400> 101

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

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

305                      310                      315                      320  
Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro

325

<210> 102

<211> 328

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> SG1099-exemplary human heavy chain constant region derived from  
IgG1 including mutations (Kabat EU numbering) Q311R/P343R

<400> 102

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

225 230 235 240

Leu 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

325

<210> 103

<211> 328

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> SG1100-exemplary human heavy chain constant region derived from

IgG1 including the mutations (Kabat EU numbering) Q311R/P343R,

N434A, Q438R/S440E

<400> 103

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

225

230

235

240

Leu 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 Ala His Tyr Thr

305

310

315

320

Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro

325

<210> 104

<211> 437

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain 1- CNT0888//11K2-WT IgG1

<400> 104

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Thr Glu Asp Ile Tyr Asn Arg

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Ser Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Trp Ser Ala Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr

100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu

130 135 140

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His

145 150 155 160

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

165 170 175

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys

180 185 190

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu

195 200 205

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

210 215 220

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 225                      230                      235                      240  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
                                  245                      250                      255  
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
                                  260                      265                      270  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
                                  275                      280                      285  
  
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
                                  290                      295                      300  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
 305                      310                      315                      320  
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
                                  325                      330                      335  
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys  
                                  340                      345                      350  
  
 Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
                                  355                      360                      365  
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
                                  370                      375                      380  
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 385                      390                      395                      400  
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
                                  405                      410                      415  
  
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
                                  420                      425                      430  
 Leu Ser Leu Ser Pro  
                                  435  
 <210> 105  
 <211> 447  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220><223> heavy chain 2- CNT0888//11K2-WT IgG1

<400> 105

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

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

35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala 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 Tyr Asp Gly Ile Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly

100 105 110

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

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

225                      230                      235                      240  
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
                          245                      250                      255  
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
                          260                      265                      270  
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
                          275                      280                      285  
  
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
                          290                      295                      300  
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 305                      310                      315                      320  
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
                          325                      330                      335  
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr  
                          340                      345                      350  
  
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser  
                          355                      360                      365  
 Cys Ala 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 Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
                          405                      410                      415  
  
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
                          420                      425                      430  
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
                          435                      440                      445  
  
 <210> 106  
 <211> 224  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> light chain 1- CNT0888//11K2-WT IgG1

<400> 106

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 Leu Thr Ile Ser Asp Thr  
20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile 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 Phe Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe  
115 120 125

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

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val  
145 150 155 160

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln  
165 170 175

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser  
180 185 190

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His  
195 200 205

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215 220

<210> 107

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain 2- CNT0888//11K2-WT IgG1

<400> 107

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 Asp Ala

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ile Gln Leu His

85 90 95

Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val

100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys

115 120 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg

130 135 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn

145 150 155 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser

165 170 175

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

180 185 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr

195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 108

<211> 437

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain 1- CKL02 IgG1

<400> 108

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Phe Glu Asp Ile Tyr Asn Arg

20 25 30

Arg Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

His Gly Ala Thr Ser Leu Glu His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Trp Ser Ala Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr

100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu

130 135 140

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His

145 150 155 160

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

165 170 175

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys

180 185 190

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu

195                      200                      205  
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 210                      215                      220  
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 225                      230                      235                      240  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
  
 245                      250                      255  
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 260                      265                      270  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
 275                      280                      285  
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 290                      295                      300  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
  
 305                      310                      315                      320  
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 325                      330                      335  
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys  
 340                      345                      350  
 Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 355                      360                      365  
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
  
 370                      375                      380  
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 385                      390                      395                      400  
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
 405                      410                      415  
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 420                      425                      430  
 Leu Ser Leu Ser Pro  
 435  
 <210

> 109

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain 2- CKL02 IgG1

<400> 109

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 His Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Gly Val Ile Pro Ile Phe His Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala 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 Tyr Asp Ala His Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly

100 105 110

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

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr  
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser  
355 360 365

Cys Ala 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 Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
435 440 445

<210> 110

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain 1- CKL02 IgG1

<400> 110

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 Leu Thr Ile Ser His Thr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile 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 Phe Gly Phe Phe Glu His Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe

115 120 125

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys

130 135 140

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val

145 150 155 160

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln

165 170 175

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser

180 185 190

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His

195 200 205

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215 220  
 <210> 111  
 <211> 216  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> light chain 2- CKL02 IgG1  
 <400> 111  
 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 His Val Ser Asp Ala  
 20 25 30  
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 35 40 45  
 Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Arg Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu

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

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

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr

195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 112

<211> 437

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain 1- CKL02 - SG1095

<400> 112

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Phe Glu Asp Ile Tyr Asn Arg

20 25 30

Arg Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

His Gly Ala Thr Ser Leu Glu His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Trp Ser Ala Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr

100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu

130 135 140

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His

145 150 155 160

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

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
|                                                                 |     |     |
| Glu Leu Trp Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| 240                                                             |     |     |
| Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Leu Tyr |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
|                                                                 |     |     |
| Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Arg Asp |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Thr Ala Leu |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| 320                                                             |     |     |
| Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Arg Arg |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |
| Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |
|                                                                 |     |     |
| Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp |     |     |
| 355                                                             | 360 | 365 |
| Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys |     |     |
| 370                                                             | 375 | 380 |
| Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 |
| 400                                                             |     |     |
| Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser |     |     |
| 405                                                             | 410 | 415 |

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Arg Lys Glu

420 425 430

Leu Ser Leu Ser Pro

435

<210> 113

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain 2- CKL02 - SG1095

<400> 113

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 His Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Gly Val Ile Pro Ile Phe His Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala 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 Tyr Asp Ala His Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly

100 105 110

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

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Trp Asn 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 Asp Glu Asp  
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Leu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
290 295 300

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

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Thr Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys  
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr  
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser  
355 360 365

Cys Ala 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 Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

420                      425                      430  
 Ala Leu His Ala His Tyr Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro  
 435                      440                      445  
 <210> 114  
 <211> 224  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> light chain 1- CKLO2 - SG1095  
 <400> 114  
 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 Leu Thr Ile Ser His Thr  
  
 20                      25                      30  
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35                      40                      45  
 Gly Arg Ile Asp Pro Asp Asn His Asn Thr Lys Phe Asp Pro Lys Phe  
 50                      55                      60  
 Gln Gly Arg Val Thr Ile 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 Phe Gly Phe Phe Glu His Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100                      105                      110  
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe  
 115                      120                      125  
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys  
 130                      135                      140  
 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val  
  
 145                      150                      155                      160  
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln  
 165                      170                      175  
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser

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

210 215 220

<210> 115

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain 2- CKL02 - SG1095

<400> 115

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 His Val Ser Asp Ala

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Arg Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ile His Leu His

85 90 95

Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val

100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys

115 120 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg

130 135 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn

145 150 155 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser

165 170 175

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

180 185 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr

195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 116

<211> 437

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain 1- CKLO2 - SG1099

<400> 116

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Phe Glu Asp Ile Tyr Asn Arg

20 25 30

Arg Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

His Gly Ala Thr Ser Leu Glu His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Trp Ser Ala Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr

100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu

130                      135                      140  
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
 145                      150                      155                      160  
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
                          165                      170                      175  
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys  
                          180                      185                      190  
  
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu  
                          195                      200                      205  
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
                          210                      215                      220  
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 225                      230                      235                      240  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
                          245                      250                      255  
  
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
                          260                      265                      270  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
                          275                      280                      285  
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Arg Asp  
                          290                      295                      300  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
 305                      310                      315                      320  
  
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Arg Arg  
                          325                      330                      335  
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys  
                          340                      345                      350  
 Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
                          355                      360                      365  
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
                          370                      375                      380

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
385 390 395 400  
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
405 410 415  
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
420 425 430  
Leu Ser Leu Ser Pro  
435  
<210> 117  
<211> 447  
<212> PRT  
<213> Artificial  
<220><223> heavy chain 2- CKL02 - SG1099  
  
<400> 117  
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 His Tyr  
20 25 30  
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45  
Gly Gly Val Ile Pro Ile Phe His Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60  
  
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala 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 Tyr Asp Ala His Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
100 105 110  
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
115 120 125  
  
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
130 135 140

Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
145 150 155 160  
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
165 170 175  
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
180 185 190  
  
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
195 200 205  
Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
210 215 220  
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
225 230 235 240  
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
245 250 255  
  
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
260 265 270  
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
275 280 285  
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
290 295 300  
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
305 310 315 320  
  
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
325 330 335  
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr  
340 345 350  
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser  
355 360 365  
Cys Ala 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 Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
                          405                      410                      415  
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
                          420                      425                      430  
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
                          435                      440                      445

<210> 118

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain 1- CKL02 - SG1099

<400> 118

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

Gly Arg Ile Asp Pro Asp Asn His Asn Thr Lys Phe Asp Pro Lys Phe  
                          50                      55                      60  
 Gln Gly Arg Val Thr Ile 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 Phe Gly Phe Phe Glu His Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
                          100                      105                      110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe  
                          115                      120                      125  
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys  
                          130                      135                      140  
 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val

145                      150                      155                      160  
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln  
                                  165                      170                      175

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

<210> 119

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain 2- CKL02 - SG1099

<400> 119

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 His Val Ser Asp Ala  
                                  20                      25                      30  
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
                                  35                      40                      45  
 Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Arg Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser  
                                  50                      55                      60

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

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg  
130 135 140  
Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn  
145 150 155 160  
Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser  
165 170 175  
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys  
180 185 190  
  
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr  
195 200 205  
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215  
<210> 120  
<211> 437  
<212> PRT  
<213> Artificial  
<220><223> heavy chain 1- CKL02 - SG1100  
<400> 120  
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15  
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Phe Glu Asp Ile Tyr Asn Arg  
20 25 30  
Arg Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45  
His Gly Ala Thr Ser Leu Glu His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60  
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80  
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Trp Ser Ala Pro Tyr  
85 90 95  
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr  
100 105 110

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser  
 115 120 125  
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu  
 130 135 140  
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
  
 145 150 155 160  
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
 165 170 175  
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys  
 180 185 190  
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu  
 195 200 205  
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
  
 210 215 220  
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 225 230 235 240  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 245 250 255  
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 260 265 270  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
  
 275 280 285  
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Arg Asp  
 290 295 300  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
 305 310 315 320  
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Arg Arg  
 325 330 335  
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys  
  
 340 345 350  
 Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

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

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

Leu Ser Leu Ser Pro

435

<210> 121

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain 2- CKLO2 - SG1100

<400> 121

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 His Tyr

20 25 30  
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Val Ile Pro Ile Phe His Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala 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 Tyr Asp Ala His Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly

100 105 110

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

115                      120                      125  
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
 130                      135                      140  
 Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
  
 145                      150                      155                      160  
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
 165                      170                      175  
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 180                      185                      190  
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
 195                      200                      205  
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
  
 210                      215                      220  
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
 225                      230                      235                      240  
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
 245                      250                      255  
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
 260                      265                      270  
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
  
 275                      280                      285  
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
 290                      295                      300  
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 305                      310                      315                      320  
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
 325                      330                      335  
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr  
  
 340                      345                      350  
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser  
 355                      360                      365

Cys Ala 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 Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
 405 410 415  
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 420 425 430  
 Ala Leu His Ala His Tyr Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445  
 <210> 122  
 <211> 224  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> light chain 1- CKL02 - SG1100  
 <400> 122  
 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 Leu Thr Ile Ser His Thr  
 20 25 30  
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Arg Ile Asp Pro Asp Asn His Asn Thr Lys Phe Asp Pro Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Ile 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 Phe Gly Phe Phe Glu His Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe  
 115 120 125

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

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val  
145 150 155 160

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln  
165 170 175

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser  
180 185 190

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His  
195 200 205

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215 220

<210> 123

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain 2- CKL02 - SG1100

<400> 123

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 His Val Ser Asp Ala  
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Arg Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu  
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ile His Leu His  
85 90 95

Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val

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

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

<210> 124

<211> 437

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain 1- CKL03 - SG1095

<400> 124

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

50 55 60  
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80  
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Arg Ser Ala Pro Tyr

85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr  
 100 105 110  
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser  
 115 120 125  
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu  
 130 135 140  
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
 145 150 155 160  
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
 165 170 175  
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys  
 180 185 190  
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu  
 195 200 205  
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 210 215 220  
 Glu Leu Trp Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 225 230 235 240  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 245 250 255  
 Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 260 265 270  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Leu Tyr  
 275 280 285  
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Arg Asp  
 290 295 300  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Thr Ala Leu  
 305 310 315 320  
 Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Arg Arg  
 325 330 335

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys  
340 345 350

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

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
370 375 380

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
385 390 395 400

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
405 410 415

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

Leu Ser Leu Ser Pro  
435

<210

> 125

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain 2- CKLO3 - SG1095

<400> 125

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 His Tyr  
20 25 30

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

Gly Gly Val Ile Pro Ile Phe His Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala 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 Tyr Asp Ala His Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
100 105 110  
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
115 120 125  
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
130 135 140  
Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
145 150 155 160  
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
165 170 175  
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
180 185 190  
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
195 200 205  
Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
210 215 220  
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Trp Asn 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 Asp Glu Asp  
260 265 270  
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
275 280 285  
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Leu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
290 295 300  
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
305 310 315 320  
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Thr Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys  
325 330 335  
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr

340 345 350  
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser  
355 360 365  
Cys Ala 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 Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
405 410 415  
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
420 425 430  
Ala Leu His Ala His Tyr Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445  
<210> 126  
<211> 224  
<212> PRT  
<213> Artificial  
<220><223> light chain 1- CKL03 - SG1095  
<400> 126

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

Gly Arg Ile Asp Pro Asp Asn His Asn Thr Lys Phe Asp Pro Lys Phe  
50 55 60  
Gln Gly Arg Val Thr Ile 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 Phe Gly Phe Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe

115 120 125

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys

130 135 140

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val

145 150 155 160

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln

165 170 175

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser

180 185 190

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His

195 200 205

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215 220

<210> 127

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain 2- CKL03 - SG1095

<400> 127

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 His Val Ser Asp Ala

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Arg Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ile His Leu His  
85 90 95

Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val  
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys  
115 120 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg  
130 135 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn  
145 150 155 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser  
165 170 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys  
180 185 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr  
195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

<210> 128

<211> 437

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain 1- CKL03 - SG1099

<400> 128

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Thr Glu Asp Ile Tyr Asn Arg  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

His Gly Ala Thr Ser Leu Glu His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80  
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Arg Ser Ala Pro Tyr  
85 90 95  
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr  
100 105 110  
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser  
115 120 125  
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu  
130 135 140  
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
145 150 155 160  
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
165 170 175  
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys  
180 185 190  
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu  
195 200 205  
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
210 215 220  
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
225 230 235 240  
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
245 250 255  
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
260 265 270  
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
275 280 285  
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Arg Asp  
290 295 300  
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

305                      310                      315                      320  
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Arg Arg  
                          325                      330                      335  
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys  
  
                          340                      345                      350  
 Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
                          355                      360                      365  
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
                          370                      375                      380  
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 385                      390                      395                      400  
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
  
                          405                      410                      415  
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
                          420                      425                      430  
 Leu Ser Leu Ser Pro  
                          435  
 <210> 129  
 <211> 447  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> heavy chain 2- CKLO3 - SG1099  
 <400> 129  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1                      5                      10                      15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser His Tyr  
  
                          20                      25                      30  
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
                          35                      40                      45  
 Gly Gly Val Ile Pro Ile Phe His Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
                          50                      55                      60  
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala 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  |     |     |     |  |  |    |  |
| Ala | Arg | Tyr | Asp | Ala | His | Tyr | Gly | Glu | Leu | Asp | Phe | Trp | Gly | Gln | Gly |  |  |    |  |
|     |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     |     |     | 105 |     |     |     |  |  |    |  |
| Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe |  |  |    |  |
|     |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     |     |     | 120 |     |     |     |  |  |    |  |
| Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu |  |  |    |  |
|     |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     |     |     | 135 |     |     |     |  |  |    |  |
| Gly | Cys | Leu | Val | Glu | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp |  |  |    |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |    |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     |     |     | 155 |     |     | 160 |  |  |    |  |
| Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu |  |  |    |  |
|     |     |     |     |     | 165 |     |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     |  |  |    |  |
| Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser |  |  |    |  |
|     |     |     |     |     | 180 |     |     |     |     |     |     | 185 |     |     |     |  |  |    |  |
| Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro |  |  |    |  |
|     |     |     |     |     | 195 |     |     |     |     |     |     | 200 |     |     |     |  |  |    |  |
| Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Glu | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys |  |  |    |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |    |  |
| 210 |     |     |     |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     |     |     | 220 |  |  |    |  |
| Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro |  |  |    |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     |     |     | 235 |     |     | 240 |  |  |    |  |
| Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser |  |  |    |  |
|     |     |     |     |     | 245 |     |     |     |     |     |     | 250 |     |     |     |  |  |    |  |
| Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp |  |  |    |  |
|     |     |     |     |     | 260 |     |     |     |     |     |     | 265 |     |     |     |  |  |    |  |
| Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn |  |  |    |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |    |  |
| 275 |     |     |     |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     |     |     | 285 |  |  |    |  |
| Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val |  |  |    |  |
| 290 |     |     |     |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     |     |     | 300 |  |  |    |  |
| Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Arg | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu |  |  |    |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     |     |     | 315 |     |     | 320 |  |  |    |  |

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
 325 330 335  
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr  
 340 345 350  
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser  
 355 360 365  
 Cys Ala 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 Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
 405 410 415  
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 420 425 430  
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445  
 <210> 130  
 <211> 224  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> light chain 1- CKL03 - SG1099  
 <400> 130  
 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 Leu Thr Ile Ser His Thr  
 20 25 30  
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Arg Ile Asp Pro Asp Asn His Asn Thr Lys Phe Asp Pro Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Ile 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 | Phe | Gly | Phe | Phe | Asp | His | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Thr |  |  |    |  |     |  |  |  |  |
|            |                               |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |  |  |    |  |     |  |  |  |  |
| Val        | Thr                           | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Val | Ala | Ala | Pro | Ser | Val | Phe | Ile | Phe |  |  |    |  |     |  |  |  |  |
|            |                               |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |  |  |    |  |     |  |  |  |  |
| Pro        | Pro                           | Ser | Asp | Glu | Gln | Leu | Lys | Ser | Gly | Thr | Ala | Ser | Val | Val | Cys |  |  |    |  |     |  |  |  |  |
|            |                               |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |  |  |    |  |     |  |  |  |  |
|            |                               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |    |  |     |  |  |  |  |
| Leu        | Leu                           | Asn | Asn | Phe | Tyr | Pro | Arg | Glu | Ala | Lys | Val | Gln | Trp | Lys | Val |  |  |    |  |     |  |  |  |  |
|            |                               |     |     |     | 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |  |  |    |  | 160 |  |  |  |  |
| Asp        | Asn                           | Ala | Leu | Gln | Ser | Gly | Asn | Ser | Gln | Glu | Ser | Val | Thr | Glu | Gln |  |  |    |  |     |  |  |  |  |
|            |                               |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |  |  |    |  |     |  |  |  |  |
| Asp        | Ser                           | Lys | Asp | Ser | Thr | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Thr | Leu | Thr | Leu | Ser |  |  |    |  |     |  |  |  |  |
|            |                               |     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |  |  |    |  |     |  |  |  |  |
| Lys        | Ala                           | Asp | Tyr | Glu | Lys | His | Lys | Val | Tyr | Ala | Cys | Glu | Val | Thr | His |  |  |    |  |     |  |  |  |  |
|            |                               |     |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |  |  |    |  |     |  |  |  |  |
|            |                               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |    |  |     |  |  |  |  |
| Gln        | Gly                           | Leu | Ser | Ser | Pro | Val | Thr | Lys | Ser | Phe | Asn | Arg | Gly | Glu | Cys |  |  |    |  |     |  |  |  |  |
|            |                               |     |     |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |  |  |    |  |     |  |  |  |  |
| <210>      | 131                           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |    |  |     |  |  |  |  |
| <211>      | 216                           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |    |  |     |  |  |  |  |
| <212>      | PRT                           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |    |  |     |  |  |  |  |
| <213>      | Artificial                    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |    |  |     |  |  |  |  |
| <220><223> | light chain 2- CKL03 - SG1099 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |    |  |     |  |  |  |  |
| <400>      | 131                           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |    |  |     |  |  |  |  |
| 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 | His | Val | Ser | Asp | Ala |  |  |    |  |     |  |  |  |  |
|            |                               |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |  |  |    |  |     |  |  |  |  |
|            |                               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |    |  |     |  |  |  |  |
| Tyr        | Leu                           | Ala | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Ala | Pro | Arg | Leu | Leu |  |  |    |  |     |  |  |  |  |
|            |                               |     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |  |  |    |  |     |  |  |  |  |

Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Arg Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu  
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ile His Leu His  
85 90 95

Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val  
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys  
115 120 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg  
130 135 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn  
145 150 155 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser  
165 170 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys  
180 185 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr  
195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

<210> 132

<211> 437

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain 1- CKLO3 - SG1100

<400> 132

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Thr Glu Asp Ile Tyr Asn Arg  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 His Gly Ala Thr Ser Leu Glu His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Arg Ser Ala Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr  
 100 105 110  
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser  
 115 120 125  
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu  
 130 135 140  
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
 145 150 155 160  
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
 165 170 175  
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys  
 180 185 190  
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu  
 195 200 205  
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 210 215 220  
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 225 230 235 240  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 245 250 255  
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 260 265 270  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr

275                      280                      285  
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Arg Asp  
 290                      295                      300  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
  
 305                      310                      315                      320  
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Arg Arg  
 325                      330                      335  
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys  
 340                      345                      350  
 Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 355                      360                      365  
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
  
 370                      375                      380  
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 385                      390                      395                      400  
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
 405                      410                      415  
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Arg Lys Glu  
 420                      425                      430  
 Leu Ser Leu Ser Pro  
 435  
  
 <210  
 > 133  
 <211> 447  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> heavy chain 2- CKL03 - SG1100  
 <400> 133  
  
 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 His Tyr  
 20                      25                      30  
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35                      40                      45  
 Gly Gly Val Ile Pro Ile Phe His Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
  
 50                      55                      60  
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala 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 Tyr Asp Ala His Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
 100                      105                      110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
  
 115                      120                      125  
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
 130                      135                      140  
 Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
 145                      150                      155                      160  
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
 165                      170                      175  
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
  
 180                      185                      190  
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
 195                      200                      205  
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
 210                      215                      220  
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
 225                      230                      235                      240  
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
  
 245                      250                      255  
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
 260                      265                      270  
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 275                      280                      285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr  
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser  
355 360 365

Cys Ala 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 Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
420 425 430

Ala Leu His Ala His Tyr Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

<210> 134

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain 1- CKL03- SG1100

<400> 134

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 Leu Thr Ile Ser His Thr  
20 25 30

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

35                      40                      45  
 Gly Arg Ile Asp Pro Asp Asn His Asn Thr Lys Phe Asp Pro Lys Phe  
 50                      55                      60  
 Gln Gly Arg Val Thr Ile 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 Phe Gly Phe Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100                      105                      110  
  
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe  
 115                      120                      125  
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys  
 130                      135                      140  
 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val  
 145                      150                      155                      160  
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln  
 165                      170                      175  
  
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser  
 180                      185                      190  
 Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His  
 195                      200                      205  
 Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210                      215                      220  
 <210> 135  
 <211> 216  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> light chain 2- CKL03 - SG1100  
 <400> 135  
  
 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 His Val Ser Asp Ala  
 20 25 30  
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 35 40 45  
 Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Arg Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser  
 50 55 60  
  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu  
 65 70 75 80  
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ile His Leu His  
 85 90 95  
 Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val  
 100 105 110  
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys  
 115 120 125  
  
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg  
 130 135 140  
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn  
 145 150 155 160  
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser  
 165 170 175  
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys  
 180 185 190  
  
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr  
 195 200 205  
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215  
 <210> 136  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> heavy chain variable domain VH 2F2  
 <400> 136

Gln Glu Gln Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ile Asp His

20 25 30

Tyr Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Ala Tyr Ile Gly Gly Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asn Arg Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr Leu Gln

65 70 75 80

Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg

85 90 95

Asn Leu Asp Val Ser Ala Ser Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 137

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain variable domain VL 2F2

<400> 137

Gln Val Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Ser Ala Ala Val Gly Gly

1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn

20 25 30

Leu Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Ser Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln

65 70 75 80

Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Glu Gly Ala Phe Leu Cys Thr

85 90 95

Thr Tyr Asp Cys Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys

100 105 110

<210> 138

<211> 117

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 138

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Ala Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Pro Ala Ser Gly Leu Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Val Phe Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 139

<211> 107

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 139

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Ser Ser Ser Phe Ser Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Thr Glu Asp Ile Tyr Asn Arg  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
35 40 45

Ser Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Thr Leu Ser Ile Thr Ser Leu Gln Thr  
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Trp Ser Ala Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 140

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain variable domain VH 1H11

<400> 140

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

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

Tyr Trp Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu

35 40 45

Ile Ala Cys Ile Ser Ser Ser Ile Gly Val Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp  
50 55 60

Ala Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Thr Thr Asp Asp Asn Trp Asn Val Gly Phe Asn Leu Trp Gly

100 105 110  
 Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 <210> 141  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> light chain variable domain VL 1H11  
 <400> 141  
 Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Gly Val Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn Arg Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Gly Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Cys  
 65 70 75 80  
 Ala Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Thr Ile Ser Tyr  
 85 90 95  
 Leu Asp Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys  
 100 105 110  
 <210> 142  
 <211> 76  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens  
 <400> 142  
 Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr  
 1 5 10 15  
 Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu Ala Ser Tyr Arg Arg Ile Thr  
 20 25 30

Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Ile Val Ala

35 40 45

Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser Met

50 55 60

Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr Pro Lys Thr

65 70 75

<210> 143

<211> 76

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> exemplary human CCL2 (MCP1) - P8A variant

<400> 143

Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Ala Val Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr

1 5 10 15

Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu Ala Ser Tyr Arg Arg Ile Thr

20 25 30

Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Ile Val Ala

35 40 45

Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser Met

50 55 60

Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr Pro Lys Thr

65 70 75

<210> 144

<211> 76

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> exemplary human CCL2 (MCP1) - T10C variant

<400> 144

Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val Cys Cys Cys Tyr Asn Phe Thr

1 5 10 15

Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu Ala Ser Tyr Arg Arg Ile Thr

20 25 30

Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Ile Val Ala  
35 40 45

Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser Met  
50 55 60

Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr Pro Lys Thr  
65 70 75

<210> 145

<211> 76

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 145

Gln Pro Asp Ser Val Ser Ile Pro Ile Thr Cys Cys Phe Asn Val Ile  
1 5 10 15  
Asn Arg Lys Ile Pro Ile Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Thr Arg Ile Thr  
20 25 30

Asn Ile Gln Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Arg Gly  
35 40 45

Lys Glu Val Cys Ala Asp Pro Lys Glu Arg Trp Val Arg Asp Ser Met  
50 55 60

Lys His Leu Asp Gln Ile Phe Gln Asn Leu Lys Pro  
65 70 75

<210> 146

<211> 76

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> SEQ ID NO: 146 exemplary human CCL8 (MCP2) - P8A variant

<400> 146

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

35 40 45  
Lys Glu Val Cys Ala Asp Pro Lys Glu Arg Trp Val Arg Asp Ser Met  
50 55 60  
Lys His Leu Asp Gln Ile Phe Gln Asn Leu Lys Pro

65 70 75  
<210> 147  
<211> 76  
<212> PRT  
<213> homo sapiens  
<400> 147  
Gln Pro Val Gly Ile Asn Thr Ser Thr Thr Cys Cys Tyr Arg Phe Ile  
1 5 10 15  
Asn Lys Lys Ile Pro Lys Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Arg Arg Thr Thr  
20 25 30  
Ser Ser His Cys Pro Arg Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Leu Asp  
35 40 45

Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Thr Gln Lys Trp Val Gln Asp Phe Met  
50 55 60  
Lys His Leu Asp Lys Lys Thr Gln Thr Pro Lys Leu  
65 70 75  
<210> 148  
<211> 82  
<212> PRT  
<213> homo sapiens  
<400> 148

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

Lys Ser Tyr Val Ile Thr Thr Ser Arg Cys Pro Gln Lys Ala Val Ile  
35 40 45  
Phe Arg Thr Lys Leu Gly Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Glu Lys

50 55 60  
Trp Val Gln Asn Tyr Met Lys His Leu Gly Arg Lys Ala His Thr Leu  
65 70 75 80  
Lys Thr

<210> 149

<211> 76

<212> PRT

<213> macaca fascicularis

<400> 149

Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr

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

65 70 75

<210> 150

<211> 125

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 150

Gln Pro Asp Ala Val Asn Ala Pro Leu Thr Cys Cys Tyr Ser Phe Thr

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

Arg Glu Val Cys Ala Asp Pro Lys Lys Glu Trp Val Gln Thr Tyr Ile

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 50  |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |     |     |
| Lys | Asn | Leu | Asp | Arg | Asn | Gln | Met | Arg | Ser | Glu | Pro | Thr | Thr | Leu | Phe |
| 65  |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |     |     |
| Lys | Thr | Ala | Ser | Ala | Leu | Arg | Ser | Ser | Ala | Pro | Leu | Asn | Val | Lys | Leu |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     | 90  |     |     |     | 95  |     |     |     |
| Thr | Arg | Lys | Ser | Glu | Ala | Asn | Ala | Ser | Thr | Thr | Phe | Ser | Thr | Thr | Thr |
| 100 |     |     |     | 105 |     |     |     | 110 |     |     |     |     |     |     |     |

Ser Ser Thr Ser Val Gly Val Thr Ser Val Thr Val Asn  
115 120 125

<210> 151

<211> 328

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> GG01 - exemplary human heavy chain constant region derived from

IgG1 including the mutations (Kabat EU numbering)

L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K, Q311R/P343R, N434A,

Q438R/S440E

<400> 151

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

115 120 125

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

130 135 140

Val Val Ile 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 Pro Val Leu

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Leu 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 Ala His Tyr Thr

305 310 315 320

Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro

325

<210> 152

<211> 328

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> GG02 - exemplary human heavy chain constant region derived from

IgG1 including mutations (Kabat EU numbering)

L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K, Q311R/P343R,

M428L/N434A/Y436T,Q438R/S440E

<400> 152

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

115 120 125

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

130 135 140

Val Val Ile 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 Pro Val Leu

180 185 190

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

195 200 205  
Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220  
Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

225 230 235 240  
Leu 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 Leu His Glu Ala Leu His Ala His Thr Thr

305 310 315 320  
Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro

325

<210> 153

<211> 328

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> GG03 -exemplary human heavy chain constant region derived from  
IgG1 (comprising-IgG1 allotype sequences) including the mutations  
(Kabat EU numbering) L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K,

Q311R/P343R, N434A,Q438R/S440E

<400> 153

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

115

120

125

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

130

135

140

Val Val Ile 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 Pro Val Leu

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

Gln Arg 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 Ala His Tyr Thr

305 310 315 320  
Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro

325  
<210> 154  
<211> 328  
<212> PRT  
<213> Artificial  
<220><223> GG04 -exemplary human heavy chain constant region derived from  
IgG1 (comprising-IgG1 allotype sequences) including mutations  
(Kabat EU numbering) L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K,  
Q311R/P343R, M428L/N434A/Y436T, Q438R/S440E  
<400> 154  
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 Tyr Leu Gly Gly Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125  
Lys Pro Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140  
Val Val Ile 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 Pro Val Leu  
180 185 190  
His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205  
Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
210 215 220  
Gln Arg 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 Leu His Glu Ala Leu His Ala His Thr Thr  
305 310 315 320  
Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro

325

<210> 155

<211> 437

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain 1- CKL02 - GG01

<400> 155

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1                    5                    10                    15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Phe Glu Asp Ile Tyr Asn Arg  
                   20                    25                    30  
 Arg Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
                   35                    40                    45  
  
 His Gly Ala Thr Ser Leu Glu His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
                   50                    55                    60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65                    70                    75                    80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Trp Ser Ala Pro Tyr  
                   85                    90                    95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr  
                   100                    105                    110  
  
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser  
                   115                    120                    125  
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu  
                   130                    135                    140  
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
 145                    150                    155                    160  
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
                   165                    170                    175  
  
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys  
                   180                    185                    190  
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu  
                   195                    200                    205  
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
                   210                    215                    220  
 Glu Tyr Leu Gly Gly Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 225                    230                    235                    240  
  
 Asp Val Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Ile  
                   245                    250                    255

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 260 265 270  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
 275 280 285  
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Leu His Arg Asp  
 290 295 300  
  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
 305 310 315 320  
 Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Arg Arg  
 325 330 335  
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys  
 340 345 350  
 Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 355 360 365  
  
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 370 375 380  
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 385 390 395 400  
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
 405 410 415  
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Arg Lys Glu  
 420 425 430  
  
 Leu Ser Leu Ser Pro  
 435  
 <210> 156  
 <211> 447  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> heavy chain 2- CKL02 - GG01  
 <400> 156  
 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 His Tyr  
20 25 30

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

Gly Gly Val Ile Pro Ile Phe His Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala 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 Tyr Asp Ala His Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
130 135 140

Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
145 150 155 160

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

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Tyr Leu Gly Gly Asp  
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Met Ile Ser  
245 250 255

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

260 265 270  
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 275 280 285  
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
 290 295 300  
  
 Val Ser Val Leu Pro Val Leu His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 305 310 315 320  
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys  
 325 330 335  
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr  
 340 345 350  
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser  
 355 360 365  
  
 Cys Ala 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 Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
 405 410 415  
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 420 425 430  
  
 Ala Leu His Ala His Tyr Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445  
 <210> 157  
 <211> 224  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> light chain 1- CKL02 GG01  
 <400> 157  
 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 Leu Thr Ile Ser His Thr

20 25 30  
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
  
 35 40 45  
 Gly Arg Ile Asp Pro Asp Asn His Asn Thr Lys Phe Asp Pro Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Ile 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 Phe Gly Phe Phe Glu His Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe  
 115 120 125  
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys  
 130 135 140  
 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val  
 145 150 155 160  
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln  
  
 165 170 175  
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser  
 180 185 190  
 Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His  
 195 200 205  
 Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215 220  
 <210> 158  
 <211> 216  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220><223> light chain 2- CKL02 GG01  
 <400> 158

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 His Val Ser Asp Ala  
                     20                      25                      30  
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
                     35                      40                      45  
 Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Arg Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser  
  
                     50                      55                      60  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu  
 65                      70                      75                      80  
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ile His Leu His  
                     85                      90                      95  
 Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val  
                     100                      105                      110  
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys  
  
                     115                      120                      125  
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg  
                     130                      135                      140  
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn  
 145                      150                      155                      160  
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser  
                     165                      170                      175  
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys  
  
                     180                      185                      190  
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr  
                     195                      200                      205  
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
                     210                      215  
 <210> 159  
 <211> 437  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220><223> heavy chain 1- CKL02 GG02

<400> 159

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Phe Glu Asp Ile Tyr Asn Arg  
20 25 30

Arg Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

His Gly Ala Thr Ser Leu Glu His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Trp Ser Ala Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr  
100 105 110

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

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu  
130 135 140

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
145 150 155 160

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

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys  
180 185 190

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu  
195 200 205

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
210 215 220

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

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

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

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

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

<210> 160

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain 2- CKL02 GG02

<400> 160

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 His Tyr  
20 25 30

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

Gly Gly Val Ile Pro Ile Phe His Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala 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 Tyr Asp Ala His Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
130 135 140

Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
145 150 155 160

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

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Tyr Leu Gly Gly Asp  
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Met Ile Ser  
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Ile Asp Val Ser His Glu Asp  
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
290 295 300

Val Ser Val Leu Pro Val Leu His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys  
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr  
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser  
355 360 365

Cys Ala 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 Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu  
420 425 430

Ala Leu His Ala His Thr Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro  
435 440 445

<210> 161

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain 1- CKL02 - GG02

<400> 161

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 Leu Thr Ile Ser His Thr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile 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 Phe Gly Phe Phe Glu His Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe

115 120 125

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys

130 135 140

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val

145 150 155 160

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln

165 170 175

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser

180 185 190

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His

195 200 205

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215 220

<210> 162

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain 2- CKL02 - GG02

<400> 162

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 His Val Ser Asp Ala

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Arg Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ile His Leu His

85 90 95

Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val

100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys

115 120 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg

130 135 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn

145 150 155 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser

165 170 175

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

180 185 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr

195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 163

<211> 437

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain 1- CKLO2 - GG03

<400> 163

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Phe Glu Asp Ile Tyr Asn Arg

20 25 30

Arg Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

His Gly Ala Thr Ser Leu Glu His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Trp Ser Ala Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr

100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu

130 135 140

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His

145 150 155 160

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

165 170 175

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys

180 185 190

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu

195 200 205

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
210 215 220

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

Asp Val Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Ile  
245 250 255

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
260 265 270

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
275 280 285

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Leu His Arg Asp  
290 295 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
305 310 315 320

Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Arg Arg  
325 330 335

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Glu Glu Met Thr Lys  
340 345 350

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

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
370 375 380

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
385 390 395 400

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
405 410 415

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

Leu Ser Leu Ser Pro  
435

<210> 164

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain 2- CKL02 - GG03

<400> 164

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 His Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Gly Val Ile Pro Ile Phe His Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala 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 Tyr Asp Ala His Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly

100 105 110

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

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

210                      215                      220  
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Tyr Leu Gly Gly Asp  
 225                      230                      235                      240  
  
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Met Ile Ser  
                                  245                      250                      255  
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Ile Asp Val Ser His Glu Asp  
                                  260                      265                      270  
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
                                  275                      280                      285  
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
                                  290                      295                      300  
  
 Val Ser Val Leu Pro Val Leu His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 305                      310                      315                      320  
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys  
                                  325                      330                      335  
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr  
                                  340                      345                      350  
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser  
                                  355                      360                      365  
  
 Cys Ala 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 Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
                                  405                      410                      415  
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
                                  420                      425                      430  
  
 Ala Leu His Ala His Tyr Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro  
                                  435                      440                      445  
 <210> 165  
 <211> 224

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain 1- CKLO2 - GG03

<400> 165

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 Leu Thr Ile Ser His Thr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile 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 Phe Gly Phe Phe Glu His Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe

115 120 125

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys

130 135 140

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val

145 150 155 160

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln

165 170 175

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser

180 185 190

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His

195 200 205

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215 220

<210> 166

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain 2- CKLO2 - GG03

<400> 166

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 His Val Ser Asp Ala

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Arg Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ile His Leu His

85 90 95

Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val

100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys

115 120 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg

130 135 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn

145 150 155 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser

165 170 175

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

180 185 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr

195                      200                      205  
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210                      215  
 <210> 167  
 <211> 437  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> heavy chain 1- CKLO2 - GG04  
 <400> 167  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1                      5                      10                      15  
  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Phe Glu Asp Ile Tyr Asn Arg  
 20                      25                      30  
 Arg Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35                      40                      45  
 His Gly Ala Thr Ser Leu Glu His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50                      55                      60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65                      70                      75                      80  
  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Trp Ser Ala Pro Tyr  
 85                      90                      95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr  
 100                      105                      110  
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser  
 115                      120                      125  
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu  
 130                      135                      140  
  
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
 145                      150                      155                      160  
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
 165                      170                      175  
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys

180 185 190  
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu  
 195 200 205  
  
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 210 215 220  
 Glu Tyr Leu Gly Gly Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 225 230 235 240  
 Asp Val Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Ile  
 245 250 255  
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 260 265 270  
  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
 275 280 285  
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Leu His Arg Asp  
 290 295 300  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
 305 310 315 320  
 Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Arg Arg  
 325 330 335  
  
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Glu Glu Met Thr Lys  
 340 345 350  
 Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 355 360 365  
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 370 375 380  
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 385 390 395 400  
  
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
 405 410 415  
 Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ala His Thr Thr Arg Lys Glu  
 420 425 430

Leu Ser Leu Ser Pro

435

<210> 168

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain 2- CKL02 - GG04

<400> 168

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 His Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Gly Val Ile Pro Ile Phe His Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala 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 Tyr Asp Ala His Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly

100 105 110

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

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Tyr Leu Gly Gly Asp  
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Met Ile Ser  
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Ile Asp Val Ser His Glu Asp  
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
290 295 300

Val Ser Val Leu Pro Val Leu His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys  
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr  
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser  
355 360 365

Cys Ala 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 Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu  
420 425 430

Ala Leu His Ala His Thr Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

<210> 169

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain 1- CKL02 - GG04

<400> 169

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 Leu Thr Ile Ser His Thr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile 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 Phe Gly Phe Phe Glu His Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe

115 120 125

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys

130 135 140

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val

145 150 155 160

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln

165 170 175

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser

180 185 190

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His

195

200

205

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

215

220

<210> 170

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain 2- CKL02 - GG04

<400> 170

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 His Val Ser Asp Ala

20

25

30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35

40

45

Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Arg Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser

50

55

60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu

65

70

75

80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ile His Leu His

85

90

95

Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val

100

105

110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys

115

120

125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg

130

135

140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn

145

150

155

160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser

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

<210> 171

<211> 437

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain 1- CKL02 - GG03/GG04

<400> 171

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

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

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser  
 115 120 125  
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu  
 130 135 140  
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His

145                      150                      155                      160  
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
                          165                      170                      175  
  
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys  
                          180                      185                      190  
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu  
                          195                      200                      205  
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
                          210                      215                      220  
 Glu Tyr Leu Gly Gly Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 225                      230                      235                      240  
  
 Asp Val Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Ile  
                          245                      250                      255  
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
                          260                      265                      270  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
                          275                      280                      285  
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Leu His Arg Asp  
                          290                      295                      300  
  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
 305                      310                      315                      320  
 Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Arg Arg  
                          325                      330                      335  
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Glu Glu Met Thr Lys  
                          340                      345                      350  
 Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
                          355                      360                      365  
  
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
                          370                      375                      380  
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 385                      390                      395                      400

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

Leu Ser Leu Ser Pro  
435

<210> 172

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain 2- CKL02 - GG03/GG04

<400> 172

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 His Tyr  
20 25 30  
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Gly Val Ile Pro Ile Phe His Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60  
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala 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 Tyr Asp Ala His Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
115 120 125  
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
130 135 140  
Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
145 150 155 160

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

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Tyr Leu Gly Gly Asp  
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Met Ile Ser  
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Ile Asp Val Ser His Glu Asp  
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
290 295 300

Val Ser Val Leu Pro Val Leu His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys  
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr  
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser  
355 360 365

Cys Ala 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 Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

405 410 415  
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu  
420 425 430

Ala Leu His Ala His Thr Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro  
435 440 445

<210> 173

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain 1- CKL02 - GG03/GG04

<400> 173

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 Leu Thr Ile Ser His Thr  
20 25 30  
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45  
Gly Arg Ile Asp Pro Asp Asn His Asn Thr Lys Phe Asp Pro Lys Phe  
50 55 60  
Gln Gly Arg Val Thr Ile 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 Phe Gly Phe Phe Glu His Trp Gly Gln Gly Thr Thr

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

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln

165 170 175

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser

180 185 190

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His

195 200 205

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215 220

<210> 174

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain 2- CKLO2 - GG03/GG04

<400> 174

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 His Val Ser Asp Ala

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Arg Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ile His Leu His

85 90 95

Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val

100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys

115 120 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg

130 135 140  
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn  
 145 150 155 160  
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser  
 165 170 175  
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys

180 185 190  
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr  
 195 200 205  
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215  
 <210> 175  
 <211> 685  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> polypeptide chain 1- CKL02 - CB- SG1095  
 <400> 175

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 His Tyr  
 20 25 30  
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Gly Val Ile Pro Ile Phe His Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala 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 Tyr Asp Ala His Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 115                                                             | 120 | 125 |     |
| Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu |     |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |     |
|                                                                 |     |     |     |
| Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu |     |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |     |
| Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser |     |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |     |
| Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro |     |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |     |
|                                                                 |     |     |     |
| Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly |     |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |     |
| Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| Cys Pro Ala Pro Glu Leu Trp Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro |     |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |     |
| Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr |     |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |     |
|                                                                 |     |     |     |
| Cys Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn |     |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |     |
| Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg |     |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |     |
| Glu Glu Leu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val |     |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 | 320 |
| Leu His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser |     |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |     |
|                                                                 |     |     |     |
| Asn Thr Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys |     |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |     |
| Gly Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp |     |     |     |
| 355                                                             | 360 | 365 |     |

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe  
 370 375 380  
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 385 390 395 400  
  
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
 405 410 415  
 Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
 420 425 430  
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr  
 435 440 445  
 Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Ser Gly Gly  
 450 455 460  
  
 Gly Gly Ser Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu  
 465 470 475 480  
 Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
 485 490 495  
 His Val Ser Asp Ala Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 500 505 510  
 Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Arg Ala Glu Gly Val  
 515 520 525  
  
 Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 530 535 540  
 Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln  
 545 550 555 560  
 Tyr Ile His Leu His Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu  
 565 570 575  
 Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser  
 580 585 590  
  
 Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn  
 595 600 605  
 Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala

610                      615                      620  
 Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys  
 625                      630                      635                      640  
 Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp  
                          645                      650                      655  
  
 Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu  
                          660                      665                      670  
 Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
                          675                      680                      685  
 <210> 176  
 <211> 681  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> polypeptide chain 2- CKL02 - CB- SG1095  
 <400> 176  
 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 Leu Thr Ile Ser His Thr  
  
                          20                      25                      30  
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
                          35                      40                      45  
 Gly Arg Ile Asp Pro Asp Asn His Asn Thr Lys Phe Asp Pro Lys Phe  
                          50                      55                      60  
 Gln Gly Arg Val Thr Ile 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 Phe Gly Phe Phe Glu His Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
                          100                      105                      110  
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu  
                          115                      120                      125  
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys

130                      135                      140  
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser  
  
 145                      150                      155                      160  
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser  
  
 165                      170                      175  
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser  
  
 180                      185                      190  
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn  
  
 195                      200                      205  
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Ser Gly  
  
  
 210                      215                      220  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 225                      230                      235                      240  
 Ala Pro Glu Leu Trp Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
  
 245                      250                      255  
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
  
 260                      265                      270  
 Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
  
  
 275                      280                      285  
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
 290                      295                      300  
 Leu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 305                      310                      315                      320  
 Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Thr  
  
 325                      330                      335  
 Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
  
  
 340                      345                      350  
 Arg Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu  
 355                      360                      365  
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 370                      375                      380

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
385 390 395 400  
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
405 410 415  
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
420 425 430  
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Arg  
435 440 445  
Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
450 455 460  
Ser Gly Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala  
465 470 475 480  
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Phe Glu Asp Ile  
485 490 495  
Tyr Asn Arg Arg Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys  
500 505 510  
Leu Leu Ile His Gly Ala Thr Ser Leu Glu His Gly Val Pro Ser Arg  
515 520 525  
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser  
530 535 540  
Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Trp Ser  
545 550 555 560  
Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr  
565 570 575  
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu  
580 585 590  
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro  
595 600 605  
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly  
610 615 620  
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr

625                      630                      635                      640  
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His  
                          645                      650                      655  
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val  
  
                          660                      665                      670  
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
                          675                      680  
 <210> 177  
 <211> 685  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> polypeptide chain 1- CKL02 - CB- GG02  
 <400> 177  
 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 His Tyr  
                          20                      25                      30  
  
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
                          35                      40                      45  
 Gly Gly Val Ile Pro Ile Phe His Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
                          50                      55                      60  
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala 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 Tyr Asp Ala His Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
                          100                      105                      110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
                          115                      120                      125  
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
                          130                      135                      140  
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145                      150                      155                      160  
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
                                  165                      170                      175  
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
                                  180                      185                      190  
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
                                  195                      200                      205  
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly  
                                  210                      215                      220  
  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro  
 225                      230                      235                      240  
 Cys Pro Ala Pro Glu Tyr Leu Gly Gly Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro  
                                  245                      250                      255  
 Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr  
                                  260                      265                      270  
 Cys Val Val Ile Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn  
                                  275                      280                      285  
  
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
                                  290                      295                      300  
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val  
 305                      310                      315                      320  
 Leu His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
                                  325                      330                      335  
 Asn Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
                                  340                      345                      350  
  
 Gly Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp  
                                  355                      360                      365  
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe  
                                  370                      375                      380  
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 385                      390                      395                      400

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
405 410 415

Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
420 425 430

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ala His Thr  
435 440 445

Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Ser Gly Gly  
450 455 460

Gly Gly Ser Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu  
465 470 475 480

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
485 490 495

His Val Ser Asp Ala Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
500 505 510

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Arg Ala Glu Gly Val  
515 520 525

Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
530 535 540

Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln  
545 550 555 560

Tyr Ile His Leu His Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu  
565 570 575

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser  
580 585 590

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn  
595 600 605

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala  
610 615 620

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys  
625 630 635 640

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp

645 650 655  
Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu  
660 665 670

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
675 680 685

<210> 178

<211> 681

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> polypeptide chain 2- CKL02 - CB- GG02

<400> 178

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 Leu Thr Ile Ser His Thr  
20 25 30

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

35 40 45  
Gly Arg Ile Asp Pro Asp Asn His Asn Thr Lys Phe Asp Pro Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile 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 Phe Gly Phe Phe Glu His Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100 105 110  
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu  
115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys  
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser  
145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn

195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Ser Gly

210 215 220

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

225 230 235 240

Ala Pro Glu Tyr Leu Gly Gly Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

245 250 255

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

260 265 270

Val Ile Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Arg Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415  
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

420 425 430  
Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ala His Thr Thr Arg

435 440 445  
Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

450 455 460  
Ser Gly Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala

465 470 475 480  
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Phe Glu Asp Ile

485 490 495  
Tyr Asn Arg Arg Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

500 505 510  
Leu Leu Ile His Gly Ala Thr Ser Leu Glu His Gly Val Pro Ser Arg

515 520 525  
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser

530 535 540  
Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Trp Ser

545 550 555 560  
Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr

565 570 575  
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu

580 585 590  
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro

595 600 605  
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly

610 615 620  
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr

625 630 635 640  
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His

645 650 655

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val  
660 665 670

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
675 680

<210> 179  
<211> 685  
<212> PRT  
<213> Artificial  
<220><223> polypeptide chain 1- CKL02 - CB- GG02-KG  
<400> 179

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 His Tyr  
20 25 30  
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Gly Val Ile Pro Ile Phe His Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60  
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala 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 Tyr Asp Ala His Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

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

165                                      170                                      175  
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 180                                      185                                      190  
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
 195                                      200                                      205  
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly  
 210                                      215                                      220  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro  
 225                                      230                                      235                                      240  
  
 Cys Pro Ala Pro Glu Tyr Leu Gly Gly Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro  
 245                                      250                                      255  
 Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr  
 260                                      265                                      270  
 Cys Val Val Ile Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn  
 275                                      280                                      285  
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
 290                                      295                                      300  
  
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val  
 305                                      310                                      315                                      320  
 Leu His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
 325                                      330                                      335  
 Asn Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
 340                                      345                                      350  
 Gly Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp  
 355                                      360                                      365  
  
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe  
 370                                      375                                      380  
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 385                                      390                                      395                                      400  
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
 405                                      410                                      415

Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
420 425 430

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ala His Thr  
435 440 445

Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
450 455 460

Gly Gly Ser Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu  
465 470 475 480

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
485 490 495

His Val Ser Asp Ala Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
500 505 510

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Arg Ala Glu Gly Val  
515 520 525

Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
530 535 540

Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln  
545 550 555 560

Tyr Ile His Leu His Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu  
565 570 575

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser  
580 585 590

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn  
595 600 605

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala  
610 615 620

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys  
625 630 635 640

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp  
645 650 655

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu

|            |                      |       |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|------------|----------------------|-------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|            |                      |       | 660 |     |      |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |
| Ser        | Ser                  | Pro   | Val | Thr | Lys  | Ser | Phe | Asn | Arg | Gly | Glu | Cys |     |     |     |
|            |                      | 675   |     |     |      |     | 680 |     |     |     |     | 685 |     |     |     |
| <210>      | 180                  |       |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <211>      | 681                  |       |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <212>      | PRT                  |       |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <213>      | Artificial           |       |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <220><223> | polypeptide chain 2- | CKL02 | -   | CB- | GG02 | -   | KG  |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <400>      | 180                  |       |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 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 | Leu | Thr | Ile | Ser | His | Thr |
|            |                      |       | 20  |     |      |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |
| Tyr        | Met                  | His   | Trp | Val | Arg  | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Met |
|            |                      |       | 35  |     |      |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |
| Gly        | Arg                  | Ile   | Asp | Pro | Asp  | Asn | His | Asn | Thr | Lys | Phe | Asp | Pro | Lys | Phe |
|            |                      |       | 50  |     |      |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |
| Gln        | Gly                  | Arg   | Val | Thr | Ile  | 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 | Phe | Gly  | Phe | Phe | Glu | His | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Thr |
|            |                      |       |     |     |      | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     | 110 |
| Val        | Thr                  | Val   | Ser | Ser | Ala  | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu |
|            |                      |       |     |     |      | 115 |     |     |     |     |     |     |     | 120 |     |
| Ala        | Pro                  | Ser   | Ser | Lys | Ser  | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys |
|            |                      |       |     |     |      | 130 |     |     |     |     |     |     |     | 135 |     |
| Leu        | Val                  | Lys   | Asp | Tyr | Phe  | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser |
| 145        |                      |       |     |     |      | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |
| Gly        | Ala                  | Leu   | Thr | Ser | Gly  | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser |
|            |                      |       |     |     |      | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     | 175 |

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

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn  
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Ser Gly  
210 215 220

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
225 230 235 240

Ala Pro Glu Tyr Leu Gly Gly Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
245 250 255

Pro Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
260 265 270

Val Ile Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
275 280 285

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
290 295 300

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Leu His  
305 310 315 320

Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
325 330 335

Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
340 345 350

Arg Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu  
355 360 365

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
370 375 380

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
385 390 395 400

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
405 410 415

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

420 Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ala His Thr Thr Arg  
 435 440 445  
 Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 450 455 460  
 Ser Gly Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala  
 465 470 475 480  
 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Phe Glu Asp Ile  
 485 490 495  
  
 Tyr Asn Arg Arg Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys  
 500 505 510  
 Leu Leu Ile His Gly Ala Thr Ser Leu Glu His Gly Val Pro Ser Arg  
 515 520 525  
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser  
 530 535 540  
 Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Trp Ser  
 545 550 555 560  
  
 Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr  
 565 570 575  
 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu  
 580 585 590  
 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro  
 595 600 605  
 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly  
 610 615 620  
  
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr  
 625 630 635 640  
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His  
 645 650 655  
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val  
 660 665 670

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

675

680

<210> 181

<211> 685

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> polypeptide chain 1- CKL02 - CB- SG1095-KG

<400> 181

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 His Tyr

20

25

30

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

35

40

45

Gly Gly Val Ile Pro Ile Phe His Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala 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 Tyr Asp Ala His Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly

100

105

110

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

115

120

125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130

135

140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145

150

155

160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165

170

175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190  
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
 195 200 205  
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly  
 210 215 220  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro  
 225 230 235 240  
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Trp Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro  
  
 245 250 255  
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr  
 260 265 270  
 Cys Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn  
 275 280 285  
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
 290 295 300  
 Glu Glu Leu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
  
 305 310 315 320  
 Leu His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
 325 330 335  
 Asn Thr Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
 340 345 350  
 Gly Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp  
 355 360 365  
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe  
  
 370 375 380  
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 385 390 395 400  
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
 405 410 415  
 Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
 420 425 430

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr

435 440 445  
Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
450 455 460  
Gly Gly Ser Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu  
465 470 475 480  
Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
485 490 495  
His Val Ser Asp Ala Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

500 505 510  
Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Arg Ala Glu Gly Val  
515 520 525  
Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
530 535 540  
Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln  
545 550 555 560  
Tyr Ile His Leu His Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

565 570 575  
Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser  
580 585 590  
Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn  
595 600 605  
Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala  
610 615 620  
Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys

625 630 635 640  
Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp  
645 650 655  
Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu  
660 665 670  
Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

|                                                                          |                                            |  |     |  |     |
|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|--|-----|--|-----|
|                                                                          | 675                                        |  | 680 |  | 685 |
| <210>                                                                    | 182                                        |  |     |  |     |
| <211>                                                                    | 681                                        |  |     |  |     |
| <212>                                                                    | PRT                                        |  |     |  |     |
| <213>                                                                    | Artificial                                 |  |     |  |     |
| <220><223>                                                               | polypeptide chain 2- CKL02 - CB- SG1095-KG |  |     |  |     |
| <400>                                                                    | 182                                        |  |     |  |     |
| 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 Leu Thr Ile Ser His Thr          |                                            |  |     |  |     |
| 20                25                30                                   |                                            |  |     |  |     |
| Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met          |                                            |  |     |  |     |
| 35                40                45                                   |                                            |  |     |  |     |
| Gly Arg Ile Asp Pro Asp Asn His Asn Thr Lys Phe Asp Pro Lys Phe          |                                            |  |     |  |     |
| 50                    55                    60                           |                                            |  |     |  |     |
|                                                                          |                                            |  |     |  |     |
| Gln Gly Arg Val Thr Ile 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 Phe Gly Phe Phe Glu His Trp Gly Gln Gly Thr Thr          |                                            |  |     |  |     |
| 100                105                110                                |                                            |  |     |  |     |
| Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu          |                                            |  |     |  |     |
| 115                120                125                                |                                            |  |     |  |     |
|                                                                          |                                            |  |     |  |     |
| Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys          |                                            |  |     |  |     |
| 130                    135                    140                        |                                            |  |     |  |     |
| Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser          |                                            |  |     |  |     |
| 145                    150                    155                    160 |                                            |  |     |  |     |
| Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser          |                                            |  |     |  |     |
| 165                170                175                                |                                            |  |     |  |     |
| Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser          |                                            |  |     |  |     |
| 180                185                190                                |                                            |  |     |  |     |

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn  
 195 200 205  
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Ser Gly  
 210 215 220  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 225 230 235 240  
 Ala Pro Glu Leu Trp Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 245 250 255  
  
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 260 265 270  
 Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
 275 280 285  
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
 290 295 300  
 Leu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 305 310 315 320  
  
 Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Thr  
 325 330 335  
 Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 340 345 350  
 Arg Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu  
 355 360 365  
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 370 375 380  
  
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 385 390 395 400  
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 405 410 415  
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
 420 425 430  
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Arg

435                                      440                                      445  
 Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 450                                      455                                      460  
 Ser Gly Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala  
 465                                      470                                      475                                      480  
 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Phe Glu Asp Ile  
 485                                      490                                      495  
 Tyr Asn Arg Arg Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys  
 500                                      505                                      510  
  
 Leu Leu Ile His Gly Ala Thr Ser Leu Glu His Gly Val Pro Ser Arg  
 515                                      520                                      525  
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser  
 530                                      535                                      540  
 Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Trp Ser  
 545                                      550                                      555                                      560  
 Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr  
 565                                      570                                      575  
  
 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu  
 580                                      585                                      590  
 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro  
 595                                      600                                      605  
 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly  
 610                                      615                                      620  
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr  
 625                                      630                                      635                                      640  
  
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His  
 645                                      650                                      655  
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val  
 660                                      665                                      670  
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 675                                      680

<210> 183  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> polypeptide linker GSGGSGGSGG  
 <400> 183  
 Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly  
 1 5 10

<210> 184  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> polypeptide linker GSGGGSGGGG  
 <400> 184  
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 1 5 10

<210> 185  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> polypeptide linker GSGGGGSGGG  
 <400> 185  
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 1 5 10

<210> 186  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> polypeptide linker GSGGGSGGGG  
 <400> 186

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 1 5 10  
 <210> 187

<211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> polypeptide linker GGSGGGSGGG  
 <400> 187  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 1 5 10  
 <210> 188  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> polypeptide linker GGSGGGSGGG  
 <400> 188  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 1 5 10  
 <210> 189  
 <211> 10  
 <  
 212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> polypeptide linker GGSGGGSGGG  
 <400> 189  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 1 5 10  
 <210> 190  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> polypeptide linker GGSGGGSGGG  
 <400> 190  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 1 5 10  
 <210> 191  
 <211> 10  
 <212> PRT

<213> Artificial

<220><223> polypeptide linker GGGGSGGSGG

<400> 191

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly

1

5

10