



공개특허 10-2020-0084006



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0084006
(43) 공개일자 2020년07월09일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 16/30* (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2878 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7015459
- (22) 출원일자(국제) 2018년10월31일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2020년05월29일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2018/079781
- (87) 국제공개번호 WO 2019/086497
국제공개일자 2019년05월09일
- (30) 우선권주장
17199542.6 2017년11월01일
유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인
에프. 호프만-라 로슈 아게
스위스 체하-4070 바젤 그랜짜체스트라쎄 124
- (72) 발명자
바카크 마리나
스위스 8952 슬리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카
르트 아게
그라우-리카르츠 잔트라
스위스 8952 슬리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카
르트 아게
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
제일특허법인(유)

전체 청구항 수 : 총 38 항

(54) 발명의 명칭 표적화된 OX40 작용제를 사용하는 병용 요법

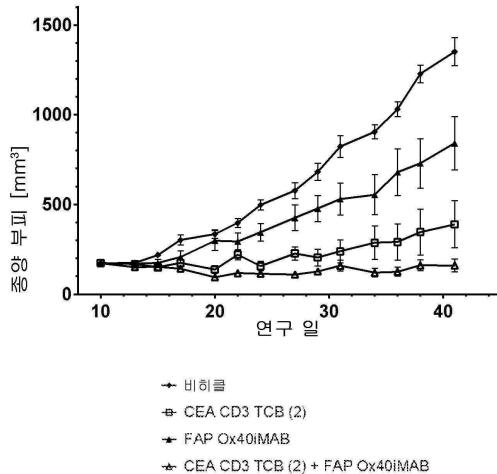
(57) 요 약

본 발명은, 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체와 조합된, 종양-표적화된 이중 특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 항체를 사용하는 병용 요법, 암의 치료를 위한 상기 병용 요법의 용도, 및 상기 병용 요법의 사용 방법에 관한 것이다.

대 표 도

(19A)

종양 성장



- ◆ 비하루
- CEA CD3 TCB (2)
- ▲ FAP OX40iMAB
- ▲ CEA CD3 TCB (2) + FAP OX40iMAB

(52) CPC특허분류

C07K 16/28 (2013.01)
C07K 16/2809 (2013.01)
C07K 16/2818 (2013.01)
C07K 16/3007 (2013.01)
C07K 16/40 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/35 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/71 (2013.01)

(72) 발명자

클라인 크리스티안

스위스 8952 숀리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카
르트 아게

샘 요하네스

스위스 8952 숀리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카
르트 아게

우마나 파블로

스위스 8952 숀리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카
르트 아게

랑 자비네

스위스 8952 숀리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카
르트 아게

아만 마리아

스위스 8952 숀리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카
르트 아게

핀차 무디타

스위스 8952 숀리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카
르트 아게

명세서

청구범위

청구항 1

암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체로서, 상기 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체와 조합으로 사용되는, 이중특이적 OX40 항체.

청구항 2

제1항에 있어서,

종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체가 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체 또는 항-Fc1R1/항-CD3 이중특이적 항체인, 이중특이적 OX40 항체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 및 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체가 함께 단일 조성물로 투여되거나 별개로 2개 이상의 상이한 조성물로 투여되는, 이중특이적 OX40 항체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체가 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체와 상승작용성으로 작용하는, 이중특이적 OX40 항체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체가 항-섬유아세포 활성화 단백질(FAP)/항-OX40 이중특이적 항체인, 이중특이적 OX40 항체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

(a) (i) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h FAP), 및 (iv) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L FAP), 또는

(b) (i) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h FAP), 및 (iv) 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L FAP)

을 포함하는 FAP에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

이중특이적 OX40 항체가, 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H FAP) 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L FAP)을 포함하는 FAP에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하거나, FAP에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인이 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H FAP) 및 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L FAP)을 포함하는, 이중특이적 OX40 항체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

(a) (i) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H OX40), 및 (iv) 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L OX40),

(b) (i) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H OX40), 및 (iv) 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L OX40),

(c) (i) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H OX40), 및 (iv) 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L OX40),

(d) (i) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H OX40), 및 (iv) 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L OX40),

(e) (i) 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H OX40), 및 (iv) 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L OX40),

(f) (i) 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H OX40), 및 (iv) 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L OX40), 또는

(g) (i) 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H OX40), 및 (iv) 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 39의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L OX40)

을 포함하는 OX40에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

- (a) 서열번호 40의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HOX40) 및 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40),
- (b) 서열번호 42의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HOX40) 및 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40),
- (c) 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HOX40) 및 서열번호 45의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40),
- (d) 서열번호 46의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HOX40) 및 서열번호 47의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40),
- (e) 서열번호 48의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HOX40) 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40),
- (f) 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HOX40) 및 서열번호 51의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40), 또는
- (g) 서열번호 52의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HOX40) 및 서열번호 53의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40)

을 포함하는 OX40에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

IgG Fc 도메인, 구체적으로 IgG1 Fc 도메인 또는 IgG4 Fc 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

Fc 수용체에 대한 결합 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 Fc 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

종양-연관된 표적에 대한 일가 결합 및 OX40에 대한 사가 결합을 포함하는 이중특이적 OX40 항체.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

CH1 도메인의 C-말단에서 OX40에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 Fab 단편의 VH 도메인에 융합된 OX40에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 Fab 단편, 및 CH1 도메인의 C-말단에서 OX40에 특이적으로 결합할 수 있는 제4 Fab 단편의 VH 도메인에 융합된 OX40에 특이적으로 결합할 수 있는 제3 Fab 단편을 포함하는 이중특이적 OX40 항체.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) 서열번호 54의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 55의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 56의 아미노산 서열을 포함하는 4개의 경쇄,

(ii) 서열번호 57의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 58의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄,

및 서열번호 56의 아미노산 서열을 포함하는 4개의 경쇄,

(iii) 서열번호 59의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 60의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 56의 아미노산 서열을 포함하는 4개의 경쇄, 또는

(iv) 서열번호 61의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 62의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 56의 아미노산 서열을 포함하는 4개의 경쇄

를 포함하는 이중특이적 OX40 항체.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체가 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체인, 이중특이적 OX40 항체.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

중쇄 가변 영역(V_H CD3) 및 경쇄 가변 영역(V_L CD3)을 포함하는 제1 항원 결합 도메인, 및 중쇄 가변 영역(V_H CEA) 및 경쇄 가변 영역(V_L CEA)을 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체가, 서열번호 63의 CDR-H1 서열, 서열번호 64의 CDR-H2 서열 및 서열번호 65의 CDR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD3); 및/또는 서열번호 66의 CDR-L1 서열, 서열번호 67의 CDR-L2 서열 및 서열번호 68의 CDR-L3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD3)을 포함하는 제1 항원 결합 도메인을 포함하는, 이중특이적 OX40 항체.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체가, 서열번호 69의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD3) 및/또는 서열번호 70의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD3)을 포함하는 제1 항원 결합 도메인을 포함하는, 이중특이적 OX40 항체.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체가,

(a) 서열번호 71의 CDR-H1 서열, 서열번호 72의 CDR-H2 서열 및 서열번호 73의 CDR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CEA), 및/또는 서열번호 74의 CDR-L1 서열, 서열번호 75의 CDR-L2 서열 및 서열번호 76의 CDR-L3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CEA), 또는

(b) 서열번호 79의 CDR-H1 서열, 서열번호 80의 CDR-H2 서열 및 서열번호 81의 CDR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CEA), 및/또는 서열번호 82의 CDR-L1 서열, 서열번호 83의 CDR-L2 서열 및 서열번호 84의 CDR-L3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CEA)

을 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는, 이중특이적 OX40 항체.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체가, 서열번호 77의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CEA) 및/ 또는 서열번호 78의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CEA)을 포함하는 제2 항원 결합 도메인, 또는 서열번호 85의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CEA) 및/ 또는 서열번호 86의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CEA)을 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는, 이중특이적 OX40 항체.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체가 CEA에 결합하는 제3 항원 결합 도메인을 포함하는, 이중특이적 OX40 항체.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체가, Fc 수용체에 대한 결합 및/ 또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 Fc 도메인을 포함하는, 이중특이적 OX40 항체.

청구항 23

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체가 항-Fo1R1/항-CD3 이중특이적 항체인, 이중특이적 OX40 항체.

청구항 24

제1항 내지 제14항 및 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체가, 중쇄 가변 영역(V_H CD3)을 포함하는 제1 항원 결합 도메인, 중쇄 가변 영역(V_H Fo1R1)을 포함하는 제2 항원 결합 도메인, 및 공통 경쇄 가변 영역을 포함하는, 이중특이적 OX40 항체.

청구항 25

제1항 내지 제14항, 제23항 및 제24항 중 어느 한 항에 있어서,

T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체가, 서열번호 95의 CDR-H1 서열, 서열번호 96의 CDR-H2 서열 및 서열번호 97의 CDR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD3)을 포함하는 제1 항원 결합 도메인; 서열번호 98의 CDR-H1 서열, 서열번호 99의 CDR-H2 서열 및 서열번호 100의 CDR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Fo1R1)을 포함하는 제2 항원 결합 도메인; 및 서열번호 101의 CDR-L1 서열, 서열번호 102의 CDR-L2 서열 및 서열번호 103의 CDR-L3 서열을 포함하는 공통 경쇄를 포함하는, 이중특이적 OX40 항체.

청구항 26

제1항 내지 제14항 및 제23항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서,

T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체가, 서열번호 104의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD3)을 포함하는 제1 항원 결합 도메인; 서열번호 105의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Fo1R1)을 포함하는 제2 항원 결합 도메인; 및 서열번호 106의 서열을 포함하는 공통 경쇄를 포함하는, 이중특이적 OX40 항체.

청구항 27

제1항 내지 제14항 및 제23항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서,

항-Fo1R1/항-CD3 이중특이적 항체가 Fo1R1에 결합하는 제3 항원 결합 도메인을 포함하는, 이중특이적 OX40 항체.

청구항 28

제1항 내지 제14항 및 제23항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서,

항-Fo1R1/항-CD3 이중특이적 항체가, 서열번호 107의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 108의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 109의 공통 경쇄를 포함하는, 이중특이적 OX40 항체.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서,

종양-연관된 항원에 특이적인 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체가, 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체와 조합으로 및 PD-L1/PD-1 상호작용 차단제와 조합으로 사용되는, 이중특이적 OX40 항체.

청구항 30

제29항에 있어서,

PD-L1/PD-1 상호작용 차단제가 항-PD-L1 항체 또는 항-PD1 항체인, 이중특이적 OX40 항체.

청구항 31

(A) 활성 성분으로서 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체, 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 제1 조성물; 및 (B) 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체 또는 항-Fo1R1/항-CD3 이중특이적 항체, 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 제2 조성물을 포함하는, 질병, 특히 암의 병용 치료, 순차적 치료 또는 동시에 치료에서 사용하기 위한 약학 제품.

청구항 32

항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체, 및 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체 또는 항-Fo1R1/항-CD3 이중특이적 항체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 33

제32항에 있어서,

PD-L1/PD-1 상호작용 차단제를 추가로 포함하는 약학 조성물.

청구항 34

제32항 또는 제33항에 있어서,

고형 종양의 치료에서 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 35

PD-L1/PD-1 상호작용 차단제와 조합으로 사용되는, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체.

청구항 36

제35항에 있어서,

PD-L1/PD-1 상호작용 차단제가 항-PD-L1 항체 또는 항-PD1 항체인, 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체.

청구항 37

제35항 또는 제36항에 있어서,

PD-L1/PD-1 상호작용 차단제가 항-PD-L1 항체인, 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체.

청구항 38

제35항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서,

PD-L1/PD-1 상호작용 차단제가 아테졸리주맙인, 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은, 종양-표적화된 항-CD3 이중특이적 항체 및 표적화된 OX40 작용제, 특히 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체를 사용하는 병용 요법, 암의 치료를 위한 상기 병용 요법의 용도, 및 상기 병용 요법의 사용 방법에 관한 것이다. 또한, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 OX40 작용제와 종양-표적화된 항-CD3 이중특이적 항체, 또는 PD-L1/PD-1 상호작용 차단제, 특히 PD-L1 항체를 사용하는 병용 요법이 포함된다.

배경 기술

[0002]

암은 전세계적으로 사망의 선두 원인 중 하나이다. 치료 선택권의 진보에도 불구하고, 진행암 환자의 예후는 여전히 불량한 채이다. 결과적으로, 허용가능하지 않는 독성을 일으키지 않으면서 암 환자의 생존을 증가시키는 최적의 치료법에 대한 지속적이고 시급한 의학적 필요성이 존재한다. 임상 시험으로부터의 최근의 결과는 면역 요법, 특히 면역 체크포인트 억제제가 암 환자의 전체 생존을 연장시키고 영속적인 응답을 유도할 수 있음을 입증하였다. 이러한 유망한 결과에도 불구하고, 현행 면역-기반 요법은 단지 일부의 환자에서만 유효하며 치료학적 이득을 개선시키기 위해서는 병용 전략이 필요하다.

[0003]

암과 싸우는 환자 자신의 면역계를 모집하는 한가지 방법은 T 세포 이중특이적 항체(TCB)의 사용이다. 이들 분자는, T 세포 상의 T 세포 수용체(TCR)에 특이적인 작용성(agonistic) 항-CD3 유닛, 및 독특한 암 항원에 특이적인 표적화 모이어티로 구성된다. 예를 들어, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는, 종양 세포 상에서 발현되는 CEA 및 T 세포 상에 존재하는 CD3 엡실론 쇄(CD3 ε)를 표적화하는 분자이다. TCB는 다클론 T 세포가 이의 세포 표면 상의 각각의 표적 항원을 발현하는 암 세포를 용해시키도록 전향시킨다. T 세포 활성화는 이러한 표적 항원의 부재 하에는 발생하지 않는다. CEA 양성 암 세포의 존재 하에, 순환 또는 조직 거주에 관계 없이, 약물학적 활성 투여량은 T 세포 활성화 및 연관된 시토카인 방출을 촉발시킬 것이다. 종양 세포 고갈과 함께, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는 제1 투여 후 24시간 이내에 말초혈의 T 세포의 일시적 감소, 및 시토카인 방출의 피크 후, 신속한 T 세포 회복 및 72시간 이내에 시토카인의 기저 수준으로의 회귀를 야기한다. 따라서, 종양 세포의 완전한 제거를 달성하기 위해, T 세포 활성화, 및 암 세포에 대한 면역 반응을 보존하는 추가적 제제가 필요하다.

[0004]

일차 자극의 강도 및 지속 기간에 따라, TCR의 촉발은, 공자극 분자, 예를 들어 종양 괴사 인자 수용체(TNFR) 상과의 구성원인 OX40의 발현을 증가시킨다. 각각의 리간드에 의한 이들 수용체의 수반되는 작용제 결찰은, 억제 메카니즘, 예를 들어 FoxP3의 발현 및 IL-10의 분비를 억제하면서, 차례로 훌마크 T 세포 효과기 기능, 예컨대 증식, 생존, 및 특정 전염증성 시토카인(IFN-γ, IL-2, TNF-α)의 분비를 촉진한다(문헌[M. Croft et al., Immunol. Rev. 2009, 229(1), 173-191]; [I. Gramaglia et al., J. Immunol. 1998, 161(12), 6510-6517]; [S. M. Jensen et al., Seminars in Oncology 2010, 37(5), 524-532]). 이러한 공자극은, 특히 약한 종양 항원 프라이밍에 있어서 종양 세포에 대한 T 세포의 최대 잠재력을 상승시키고 보호 기억 형성을 허용하는 제1 공격 후에 항종양 반응을 지속시키는 데 필요하다.

[0005]

그러나, 특정 종양에서 면역 억제 미세 환경은 공동-억제 신호, 예를 들어 PD-L1이 높으나, OX40 리간드의 충분한 발현이 부족하다. 이에 있어서 T 세포의 지속적 프라이밍은 T 세포 활성화의 약화, 고갈 및 면역 감시의 회피를 야기할 수 있다(문헌[Sharpe et al., Nat Rev 2002]; [Keir ME et al., 2008 Annu. Rev. Immunol. 26:677]).

[0006]

구체적으로 종양 미세 환경에서 OX40 공자극을 회복시키는 한가지 수단은, 종양-연관된 항원, 예를 들어 종양 스트로마의 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 대한 하나 이상의 항원 결합 도메인, 및 OX40에 대한 하나 이상의 항원 결합 도메인으로 구성된 이중특이적 항체이다. 예를 들어, 이러한 이중특이적 항체는 WO 2017/055398 A2 및 WO 2017/060144 A1에 기재되어 있다. 세포 표면 FAP에 의한 이러한 이중특이적 분자의 가교결합 및 표면 고정화는 OX40 양성 T 세포에 대해 고도로 작용성인 매트릭스를 생성하고, 여기서 이는 NF-κB 매개된 효과기 기능을 지지하고 OX40 리간드에 의한 결찰을 대체할 수 있다. FAP 고발현은, 종양 세포 자체 또는 면역 억제성 암-연관된 섬유아세포(CAF) 상에서 인간 종양 지표의 과잉의 경우 보고된다.

[0007]

강한 면역 억제되거나 고갈된 표현형을 갖는 특정 환자에서, 다클론의 종양 특이적 T 세포 모집(신호 1) 및 종양-제한된 양성 공자극의 회복(신호 2)의 조합만이 충분한 항종양 효능 및 지속되는 조정된 면역 보호를 용이하

게 할 수 있다. 이는 지속적으로 종양 미세 환경을 보다 면역 활성인 상태 및 덜 면역 억제성 상태로 유도할 수 있다. 또한, OX40의 FAP 의존성 공자극은 낮은 종양내 농도에서 종양 세포의 TCB 매개된 사멸을 용이하게 할 수 있고, 이는 전신 노출 및 상관된 부작용을 감소시킬 수 있다. 또한, 치료 간격은 낮은 TCB 농도가 활성 일 수 있기 때문에 연장될 수 있다.

[0008] 본원에서, TCB(항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체 및 항-Fo1R/항-CD3 이중특이적 항체)와 이중특이적 항-FAP/항-OX40 항체의 조합에 대한 시험관내 및 생체내 데이터가 제공되고, 이는 항종양 반응의 양 및 품질을 개선시키기 위해 T 세포 모집자와 종양-표적화된 OX40 작용제를 조합하는 것의 이유를 지지한다.

발명의 내용

[0009] 본 발명은, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-섬유아세포 활성화 단백질(FAP)/항-OX40 이중특이적 항체, 및 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체와의 조합에서 이의 용도, 특히 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법, 보다 특히 고형 종양을 치료하거나 고형 종양의 진행을 지연시키는 방법에서 이의 용도에 관한 것이다. 본원에 기재된 병용 요법이, 항-CD3 이중특이적 항체를 단독으로 사용하는 치료보다, 종양 성장을 억제하고 종양 세포를 제거함에 있어서 보다 효과적인 것이 밝혀졌다.

[0010] 한 양태에서, 본 발명은, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체를 제공하되, 상기 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체는 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체와 조합으로 사용된다. 한 양태에서, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체가 제공되되, 상기 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체는 또 다른 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체와 조합으로 사용된다. 한 양태에서, 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체는 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체 또는 항-Fo1R1/항-CD3 이중특이적 항체이다. 특히, 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체는 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체이다.

[0011] 추가적 양태에서, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체는, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 및 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체가 함께 단일 조성물로 투여되거나 별개로 2개 이상의 상이한 조성물로 투여되는 본원에 기재된 방법에서 사용하기 위한 것이다.

[0012] 또 다른 양태에서, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체는, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체가 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체와 상승작용성으로 작용하는, 본원에 기재된 방법에서 사용하기 위한 것이다.

[0013] 또 다른 양태에서, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체가 제공되되, 상기 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체는, 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체와 동시에, 그 전에 또는 그 후에 투여된다.

[0014] 특히, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체는 항-섬유아세포 활성화 단백질(FAP)/항-OX40 이중특이적 항체이다. 한 양태에서, 항-FAP/항-OX40 항체는 OX40 작용제이다. 한 양태에서, 항-FAP/항-OX40 항체는 Fc 도메인을 포함하는 항원 결합 분자이다. 특정 양태에서, 항-FAP/항-OX40 항체는, Fc γ 수용체 결합 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 변형을 갖는 Fc 도메인을 포함하는 항원 결합 분자이다. 종양-연관된 항원에 의한 가교결합은 비특이적 Fc γ R 매개된 가교결합을 피하는 것을 가능하게 만들어 통상적 OX40 항체와 비교하여 항-FAP/항-OX40 항체의 보다 높은 투여량 및 보다 효과적인 투여량이 투여될 수 있다.

[0015] 한 양태에서, 본 발명은, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한, 종양-연관된 항원

에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체를 제공하되, 상기 이중특이적 OX40 항체는 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체와 조합으로 사용되고, 상기 이중특이적 OX40 항체는

- [0016] (a) (i) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H FAP), 및 (iv) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L FAP), 또는
- [0017] (b) (i) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H FAP), 및 (iv) 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L FAP)
- [0018] 을 포함하는 FAP에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다.
- [0019] 추가적 양태에서, 본원 상기에 정의된 바와 같은, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체가 제공되되, 상기 이중특이적 OX40 항체는, 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H FAP) 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L FAP)을 포함하는 FAP에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인, 또는 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H FAP) 및 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L FAP)을 포함하는 FAP에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인을 포함한다. 특정 양태에서, 이중특이적 OX40 항체는 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H FAP) 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L FAP)을 포함하는 FAP에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 또 다른 양태에서, 이중특이적 OX40 항체는, 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H FAP) 및 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L FAP)을 포함하는 FAP에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다.
- [0020] 추가적 양태에서, 본원 상기에 정의된 바와 같은, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체가 제공되되, 상기 이중특이적 OX40 항체는
- [0021] (a) (i) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H OX40), 및 (iv) 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L OX40),
- [0022] (b) (i) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H OX40), 및 (iv) 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L OX40),
- [0023] (c) (i) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H OX40), 및 (iv) 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L OX40),
- [0024] (d) (i) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H OX40), 및 (iv) 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi)

서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40),

[0025] (e) (i) 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HOX40), 및 (iv) 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40),

[0026] (f) (i) 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HOX40), 및 (iv) 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40), 또는

[0027] (g) (i) 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HOX40), 및 (iv) 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 39의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40)

을 포함하는 OX40에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0029] 보다 특히, 이중특이적 OX40 항체는 (a) (i) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HOX40), 및 (iv) 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40)을 포함하는 OX40에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0030] 추가적 양태에서, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체가 제공되며, 상기 이중특이적 OX40 항체는

[0031] (a) 서열번호 40의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HOX40) 및 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40),

[0032] (b) 서열번호 42의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HOX40) 및 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40),

[0033] (c) 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HOX40) 및 서열번호 45의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40),

[0034] (d) 서열번호 46의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HOX40) 및 서열번호 47의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40),

[0035] (e) 서열번호 48의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HOX40) 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40),

[0036] (f) 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HOX40) 및 서열번호 51의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40), 또는

[0037] (g) 서열번호 52의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HOX40) 및 서열번호 53의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40)

을 포함하는 OX40에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0038] 특정 양태에서, 이중특이적 OX40 항체는 (a) 서열번호 40의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HOX40)

및 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L OX40)을 포함하는 OX40에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0040] 한 양태에서, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체가 제공되되, 상기 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체는, 안정하게 회합할 수 있는 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인을 추가로 포함하는 항원 결합 분자이다. 특히, 이중특이적 OX40 항체는 IgG Fc 도메인, 구체적으로 IgG1 Fc 도메인 또는 IgG4 Fc 도메인을 포함하는 항원 결합 분자이다. 보다 특히, 이중특이적 OX40 항체는 Fc 수용체에 대한 결합 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 Fc 도메인을 포함하는 항원 결합 분자이다. 특정 양태에서, 이중특이적 OX40 항체는 아미노산 치환 L234A, L235A 및 P329G를 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 포함한다.

[0041] 본 발명의 또 다른 양태에서, 본원 상기에 기재된 바와 같은, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체가 제공되되, 상기 이중특이적 OX40 항체는 종양-연관된 표적에 대한 일가 결합 및 OX40에 대한 적어도 이가 결합을 포함한다. 한 양태에서, 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체는 종양-연관된 표적에 대한 일가 결합 및 OX40에 대한 이가 결합을 포함한다. 특정 양태에서, 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체는 종양-연관된 표적에 대한 일가 결합 및 OX40에 대한 사가 결합을 포함한다.

[0042] 또 다른 양태에서, 본 발명은, 본원 상기에 기재된 바와 같은, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체를 제공하되, 상기 이중특이적 OX40 항체는 CH1 도메인의 C-말단에서 OX40에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 Fab 단편의 VH 도메인에 융합된 OX40에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 Fab 단편, 및 CH1 도메인의 C-말단에서 OX40에 특이적으로 결합할 수 있는 제4 Fab 단편의 VH 도메인에 융합된 OX40에 특이적으로 결합할 수 있는 제3 Fab 단편을 포함한다.

[0043] 한 양태에서, 본원 상기에 기재된 바와 같은, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체가 제공되되, 상기 이중특이적 OX40 항체는 하기를 포함한다:

[0044] (i) 서열번호 54의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 55의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 56의 아미노산 서열을 포함하는 4개의 경쇄,

[0045] (ii) 서열번호 57의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 58의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 56의 아미노산 서열을 포함하는 4개의 경쇄,

[0046] (iii) 서열번호 59의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 60의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 56의 아미노산 서열을 포함하는 4개의 경쇄, 또는

[0047] (iv) 서열번호 61의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 62의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 56의 아미노산 서열을 포함하는 4개의 경쇄.

[0048] 또 다른 양태에서, 본 발명은, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체를 제공하되, 상기 이중특이적 OX40 항체는 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체와 조합으로 사용되고, 상기 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체는 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체이다.

[0049] 한 양태에서, 본원 상기에 기재된 바와 같은, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체가 제공되되, 상기 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체는 중쇄 가변 영역(V_H CD3) 및 경쇄 가변 영역(V_L CD3)을 포함하는 제1 항원 결합 도메인, 및 중쇄 가변 영역(V_H CEA) 및 경쇄 가변 영역(V_L CEA)을 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0050] 또 다른 양태에서, 본 발명은, 본원 상기에 기재된 바와 같은, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에

서 사용하기 위한, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체를 제공되며, 상기 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체는 서열번호 63의 CDR-H1 서열, 서열번호 64의 CDR-H2 서열 및 서열번호 65의 CDR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h CD3); 및/또는 서열번호 66의 CDR-L1 서열, 서열번호 67의 CDR-L2 서열 및 서열번호 68의 CDR-L3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD3)을 포함하는 제1 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0051] 추가적 양태에서, 본원 상기에 기재된 바와 같은, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체가 제공되며, 상기 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체는 서열번호 69의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h CD3) 및/또는 서열번호 70의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD3)을 포함하는 제1 항원 결합 도메인을 포함한다. 한 양태에서, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체가 제공되며, 상기 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체는

[0052] (a) 서열번호 71의 CDR-H1 서열, 서열번호 72의 CDR-H2 서열 및 서열번호 73의 CDR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h CEA), 및/또는 서열번호 74의 CDR-L1 서열, 서열번호 75의 CDR-L2 서열 및 서열번호 76의 CDR-L3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CEA), 또는

[0053] (b) 서열번호 79의 CDR-H1 서열, 서열번호 80의 CDR-H2 서열 및 서열번호 81의 CDR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h CEA), 및/또는 서열번호 82의 CDR-L1 서열, 서열번호 83의 CDR-L2 서열 및 서열번호 84의 CDR-L3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CEA)

[0054] 을 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0055] 특정 양태에서, 본원 상기에 기재된 바와 같은, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체가 제공되며, 상기 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체는, 서열번호 77의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h CEA) 및/또는 서열번호 78의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CEA)을 포함하는 제2 항원 결합 도메인, 또는 서열번호 85의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h CEA) 및/또는 서열번호 86의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CEA)을 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0056] 또 다른 양태에서, 본 발명은, 본원 상기에 기재된 바와 같은, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체를 제공되며, 상기 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는 CEA에 결합하는 제3 항원 결합 도메인을 추가로 포함한다. 특히, 제3 항원 결합 도메인은 (a) 서열번호 71의 CDR-H1 서열, 서열번호 72의 CDR-H2 서열 및 서열번호 73의 CDR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h CEA), 및/또는 서열번호 74의 CDR-L1 서열, 서열번호 75의 CDR-L2 서열 및 서열번호 76의 CDR-L3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CEA), 또는 (b) 서열번호 79의 CDR-H1 서열, 서열번호 80의 CDR-H2 서열 및 서열번호 81의 CDR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h CEA), 및/또는 서열번호 82의 CDR-L1 서열, 서열번호 83의 CDR-L2 서열 및 서열번호 84의 CDR-L3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CEA)을 포함한다. 보다 특히, 제3 항원 결합 도메인은 서열번호 77의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h CEA) 및/또는 서열번호 78의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CEA)을 포함하거나, 제2 항원 결합 도메인은 서열번호 85의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h CEA) 및/또는 서열번호 86의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CEA)을 포함한다.

[0057] 추가적 양태에서, T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체는 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체이되며, 여기서 제1 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인 또는 불변 도메인이 교환된 크로스-Fab 분자이고, 제2 및 제3(존재하는 경우) 항원 결합 도메인은 통상적 Fab 분자이다.

[0058] 추가적 양태에서, T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체는 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체이되며, 여기서 (i) 제2 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C-말단에서 제1 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N-말단에 융합되고, 제1 항원

결합 도메인은 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제1 서브유닛의 N-말단에 융합되고, 제3 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제2 서브유닛의 N-말단에 융합되거나, (ii) 제1 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C-말단에서 제2 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N-말단에 융합되고, 제2 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제1 서브유닛의 N-말단에 융합되고, 제3 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제2 서브유닛의 N-말단에 융합된다.

[0059] 한 양태에서, 본원 상기에 기재된 바와 같은, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체가 제공되되, 여기서 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는 CEA에 결합하는 제3 항원 결합 도메인을 포함한다. 추가적 양태에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는 안정하게 회합할 수 있는 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인을 포함한다. 특히, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는 IgG Fc 도메인, 구체적으로 IgG1 Fc 도메인 또는 IgG4 Fc 도메인을 포함한다. 보다 특히, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는 Fc 수용체에 대한 결합 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 Fc 도메인을 포함한다. 특정 양태에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는 아미노산 치환 L234A, L235A 및 P329G를 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 포함한다.

[0060] 또 다른 양태에서, 본 발명은, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체를 제공하되, 상기 이중특이적 OX40 항체는 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체와 조합으로 사용되고, 상기 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체는 항-Fo1R1/항-CD3 이중특이적 항체이다.

[0061] 한 양태에서, 본 발명은, 본원 상기에 기재된 바와 같은, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체를 제공하되, 여기서 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체는 중쇄 가변 영역(V_h CD3)을 포함하는 제1 항원 결합 도메인, 중쇄 가변 영역(V_h Fo1R1)을 포함하는 제2 항원 결합 도메인, 및 공통 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0062] 본 발명의 또 다른 양태에서, 본원 상기에 기재된 바와 같은, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체가 제공되되, 여기서 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체는 서열번호 95의 CDR-H1 서열, 서열번호 96의 CDR-H2 서열 및 서열번호 97의 CDR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h CD3)을 포함하는 제1 항원 결합 도메인; 서열번호 98의 CDR-H1 서열, 서열번호 99의 CDR-H2 서열 및 서열번호 100의 CDR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h Fo1R1)을 포함하는 제2 항원 결합 도메인; 및 서열번호 101의 CDR-L1 서열, 서열번호 102의 CDR-L2 서열 및 서열번호 103의 CDR-L3 서열을 포함하는 공통 경쇄를 포함한다.

[0063] 추가적 양태에서, 본 발명은, 본원 상기에 기재된 바와 같은, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체를 제공하되, 여기서 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체는 서열번호 104의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h CD3)을 포함하는 제1 항원 결합 도메인, 및 서열번호 105의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h Fo1R1)을 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하고; 공통 경쇄는 서열번호 106의 서열을 포함한다.

[0064] 한 양태에서, 본원 상기에 기재된 바와 같은, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체가 제공되되, 여기서 항-Fo1R1/항-CD3 이중특이적 항체는 Fo1R1에 결합하는 제3 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0065] 추가적 양태에서, 본원 상기에 기재된 바와 같은, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체가 제공되되, 여기서 항-Fo1R1/항-CD3 이중특이적 항체는 서열번호 107의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 108의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열

번호 109의 공통 경쇄를 포함한다.

[0066] 또 다른 양태에서, 본 발명은, 본원 상기에 기재된 바와 같은, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체를 제공하되, 상기 이중특이적 OX40 항체는 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체와 조합으로 사용되고, 조합은 약 1주 내지 3주의 간격으로 투여된다.

[0067] 또 다른 양태에서, 본 발명은, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체를 제공하되, 상기 이중특이적 OX40 항체는 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체와 조합으로 및 PD-L1/PD-1 상호작용 차단제와 조합으로 사용된다. 특히, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 항-PD-L1 항체 또는 항-PD1 항체이다. 보다 특히, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 아테졸리주맙(atezolizumab), 두르발루맙(durvalumab), 펜브롤리주맙(pembrolizumab) 및 니볼루맙(nivolumab)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 구체적 양태에서, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 아테졸리주맙이다.

[0068] 추가적 양태에서, 본 발명은, 질병, 특히 암의 병용 치료, 순차적 치료 또는 동시 치료에서 사용하기 위한, (A) 활성 성분으로서 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체, 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 제1 조성물; 및 (B) 활성 성분으로서 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체, 특히 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체 또는 항-Fo1R1/항-CD3 이중특이적 항체, 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 제2 조성물을 포함하는 약학 제품을 제공한다.

[0069] 또 다른 양태에서, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체, 및 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체, 특히 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체 또는 항-Fo1R1/항-CD3 이중특이적 항체를 포함하는 약학 조성물이 제공된다. 한 양태에서, 약학 조성물은 PD-L1/PD-1 상호작용 차단제를 추가로 포함한다. 특히, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 항-PD-L1 항체 또는 항-PD1 항체이다. 보다 특히, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 아테졸리주맙, 두르발루맙, 펜브롤리주맙 및 니볼루맙으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 구체적 양태에서, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 아테졸리주맙이다. 하나의 특정한 양태에서, 약학 조성물은 고형 종양의 치료에서 사용하기 위한 것이다.

[0070] 추가적 양태에서, 본 발명은, (A) 활성 성분으로서 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체, 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 제1 조성물; (B) 활성 성분으로서 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체, 특히 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체 또는 항-Fo1R1/항-CD3 이중특이적 항체, 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 제2 조성물, 및 (C) 병용 요법에서 상기 조성물들의 사용에 대한 지시서를 포함하는 패키지를 포함하는, 개체에서 암을 치료하거나 이의 진행을 지연시키기 위한 키트를 제공한다. 한 양태에서, (A) 활성 성분으로서 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체, 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 제1 조성물; (B) 활성 성분으로서 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체, 특히 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체 또는 항-Fo1R1/항-CD3 이중특이적 항체, 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 제2 조성물, (C) 활성 성분으로서 PD-L1/PD-1 상호작용 차단제, 특히 아테졸리주맙, 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 제3 조성물, 및 (D) 병용 요법에서 상기 조성물들의 사용에 대한 지시서를 포함하는 패키지를 포함하는 개체에서 암을 치료하거나 이의 진행을 지연시키기 위한 키트가 제공된다.

[0071] 추가적 양태에서, 본 발명은 증식성 질병, 특히 암의 치료용 또는 이의 진행의 자연용 약제의 제조에서, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체, 및 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체, 특히 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체 또는 항-Fo1R1/항-CD3 이중특이적 항체의 조합의 용도에 관한 것이다.

[0072] 특히, 결장암, 폐암, 난소암, 위암, 방광암, 췌장암, 자궁내막암, 유방암, 신장암, 식도암 또는 전립선암으로 이루어진 군으로부터 선택된 질병의 치료용 약제의 제조에서, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 T 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체, 및 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체, 특히 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체 또

는 항-Fo1R1/항-CD3 이중특이적 항체의 조합의 용도가 제공된다.

[0073] 또 다른 양태에서, 본 발명은 개체에서 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법을 제공하되, 이는 상기 개체에게 유효량의 T 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체, 및 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체, 특히 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체 또는 항-Fo1R1/항-CD3 이중특이적 항체를 투여하는 단계를 포함한다. 또 다른 양태에서, 개체에서 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법이 제공되되, 이는 상기 개체에게 유효량의 T 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체, 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체, 특히 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체 또는 항-Fo1R1/항-CD3 이중특이적 항체, 및 PD-L1/PD-1 상호작용 차단제, 특히 항-PD-L1 항체 또는 항-PD1 항체를 투여하는 단계를 포함한다.

[0074] 추가적 양태에서, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체가 제공되되, 상기 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체는 PD-L1/PD-1 상호작용 차단제와 조합으로 사용된다. 특히, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 항-PD-L1 항체 또는 항-PD1 항체이다. 보다 특히, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 아테졸리주맙, 두르발루맙, 펜브롤리주맙 및 니볼루맙으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 구체적 양태에서, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 아테졸리주맙이다.

도면의 간단한 설명

[0075] 도 1A 및 1B는 실시예에 사용된 바와 같은, 특정 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체 및 특정 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체를 각각 보여준다. 이들 분자는 각각 실시예 1 및 2에 보다 상세히 기재된다. 굽은 흑색점은 뉴-인투-홀(knob-into-hole) 변형을 의미한다. *는 CH1 및 CL 도메인에서의 아미노산 변형(소위 하전된 잔기)을 상정한다. 도 1A는 OX40에 대한 사가 결합 및 FAP에 대한 일가 결합을 갖는 특정 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체를 보여준다(4+1 포맷, Fc 도메인의 C-말단에 융합된 FAP VH 및 VL). 상기 분자는 본원에서 FAP OX40 iMab로 지칭된다. 도 1B에서는, 2+1 포맷의 예시적 이중특이적 항-CEA/항-CD3 항체가 도시된다(CEACAM5 CD3 TCB로 지칭됨). 2+1 포맷의 또 다른 항-CEA/항-CD3 항체(CEA CD3 TCB로 지칭됨)가 도 1C에 도시되어 있다.

도 2에서는, 다양한 인간 면역 세포 제제에 의한 MKN45 NucLight red 종양 세포의 TCB 매개된 용해가 도시되어 있다(실시예 3). 상이한 인간 면역 효과기 세포 제제(휴지 중인 PBMC, CD4 또는 CD8 T 세포)를 CEACAM5 CD3 TCB(CEA CD3 TCB(2))의 연속 희석물 열의 존재 하에 48시간 동안 MKN-45 NucLight Red 세포 및 조사된 NIH/3T3 huFAP와 함께 공동-배양하였다. 살아있는 종양 세포의 양을, 3시간의 간격으로 48시간 동안 37°C 및 5% CO₂에서 인큐사이트 줌 시스템(Incucyte Zoom System)(에센바이오사이언스(Essenbioscience), HD 위상차, 녹색 형광 및 적색 형광, 10x 대물렌즈)을 사용하는 형광 현미경 검사 고 컨텐츠 라이프 이미징(fluorescence microscopy high content life imaging)에 의해 정량화하였다. 3회 실험(중앙)의 건강한 종양 세포의 통합된 적색 형광(RCU x μm²/이미지)을 사용하여 특이적 용해를 계산하고, 이를 사용된 TCB 농도에 대해 플로팅하여 T 세포의 세포 용해 가능성을 나타냈다.

도 3A 내지 3D는 TCB 자극시 T 세포 상의 OX40의 발현을 보여준다. 상이한 인간 면역 효과기 세포 제제(휴지 중인 PBMC, CD4 또는 CD8 T 세포)를 CEACAM5 CD3 TCB(CEA CD3 TCB(2))의 연속 희석물 열의 존재 하에 48시간 동안 MKN-45 NucLight Red 세포 및 조사된 NIH/3T3 huFAP와 함께 공동-배양하였다. OX40의 발현을 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 상에서 유세포 분석법에 의해 결정하였다. 3회 실험(중앙)의 양성 세포의 백분율(도 3A 및 3C) 및 MFI(도 3B 및 3D)를, CD4 양성 T 세포(도 3A 및 3B) 및 CD8 양성 T 세포(도 3C 및 3D)에 대하여 사용된 TCB 농도에 대해 플로팅하였다. 오차막대는 SEM을 나타낸다. TCB는 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포 상에서 OX40의 투여량 의존성 세포 표면 발현을 매개하였다(CD4⁺ T 세포 상에서 보다 높음).

도 4A 내지 4C에서는, OX40 공자극이 Fo1R1 CD3 TCB의 세포 용해 가능성에 영향을 미치지 않았음이 나타나 있다. 휴지 중인 CD4 T 세포를 48시간 동안 Fo1R1 CD3 TCB의 연속 희석물 열의 존재 하에 고정된 농도의 FAP OX40 iMAB의 존재(도 4B) 또는 부재(도 4A) 하에 HeLa NucLight Red 세포 및 조사된 NIH/3T3 huFAP와 함께 공동-배양하였다. 살아있는 종양 세포의 양을 3시간의 간격으로 42시간 동안 37°C 및 5% CO₂에서 인큐사이트 줌 시스템(에센바이오사이언스, HD 위상차, 녹색 형광 및 적색 형광, 10x 대물렌즈)을 사용하는 형광 현미경 검사 고 컨텐츠 라이프 이미징에 의해 정량화하였다. 3회 실험(중앙)의 건강한 종양 세포의 통합된 적색 형광(RCU x

$\mu\text{m}^2/\text{이미지}$)을 다양한 시점에 대하여 사용된 TCB 농도에 대해 플롯팅하여 T 세포의 세포 용해 가능성을 나타낸다. 오차막대는 SEM을 나타낸다. 각각의 시점에 대한 곡선 아래 면적을 세포 독성의 척도로서 계산하고 상기 시점에 대해 플롯팅하였다. AUC 비교를 위해, Fo1R1 CD3 TCB 단독 및 FAP OX40 iMAB와의 조합 모두에 대한 AUC 값을 도 4C에서 시간에 대해 플롯팅하였고, 이는 FAP OX40 iMab의 첨가가 Fo1R1 CD3 TCB의 세포 용해 가능성에 대해 영향을 미치지 않았음을 보여준다.

도 5A 내지 5C는 OX40 공자극이 CEACAM5 CD3 TCB(CEA CD3 TCB(2))의 세포 용해 가능성에 영향을 미치지 않았음을 보여준다. 상이한 인간 면역 효과기 세포 제제(도 5C의 휴지 중인 PBMC, 도 5A의 CD4 T 세포 및 도 5B의 CD8 T 세포)를 48시간 동안 CEACAM5 CD3 TCB의 연속 희석물 열의 존재 하에 고정된 농도의 FAP OX40 iMab의 존재 또는 부재 하에 MKN-45 NucLight Red 세포 및 조사된 NIH/3T3 huFAP와 함께 공동-배양하였다. 살아있는 종양 세포의 양을 3시간의 간격으로 48시간 동안 37°C 및 5% CO₂에서 인큐사이트 줌 시스템(에센바이오사이언스, HD 위상차, 녹색 형광 및 적색 형광, 10x 대물렌즈)을 사용하는 형광 현미경 검사 고 컨텐츠 라이프 이미징에 의해 정량화하였다. 3회 실험(중앙)의 건강한 종양 세포의 통합된 적색 형광(RCU x $\mu\text{m}^2/\text{이미지}$)을 사용하여 특이적 용해를 계산하고, 이를 사용된 TCB 농도에 대해 플롯팅하여 T 세포의 세포 용해 가능성을 나타낸다. 이 때, 42시간의 시점이 예시로서 도시된다. 오차막대는 SEM을 나타낸다.

도 6A 내지 6D에서는, FAP OX40 iMAB 공자극이 Fo1R1 CD3 TCB 매개된 TNF-α 분비를 증가시켰고 작용성 TCR 자극에 의존적이었음을 보여준다. 휴지 중인 CD4 T 세포를 48시간 동안 Fo1R1 CD3 TCB의 연속 희석물 열의 존재 하에 고정된 농도의 FAP OX40 iMAB의 존재 또는 부재 하에 조사된 TNF-α 센서 세포, NIH/3T3 huFAP 및 HeLa NucLight Red 세포와 함께 공동-배양하였다. TNF-α의 양을 3시간의 간격으로 42시간 동안 37°C 및 5% CO₂에서 인큐사이트 줌 시스템(에센바이오사이언스, HD 위상차, 녹색 형광 및 적색 형광, 10x 대물렌즈)을 사용하는 형광 현미경 검사 고 컨텐츠 라이프 이미징에 의해 TNF-α 센서 세포에서 GFP 유도로서 정량화하였다. 3회 실험(중앙)의 TNF-α 센서 세포의 통합된 녹색 형광(GCU x $\mu\text{m}^2/\text{이미지}$)을 사용된 TCB 농도에 대해 플롯팅하여 T 세포의 TNF-α 분비를 정량화하였다. 오차막대는 SEM을 나타낸다. Fo1R1 CD3 TCB에 대한 결과를 도 6A(공자극 부재) 및 도 6C(FAP OX40 iMAB 공자극 존재)에 도시한 반면에, 도 6B 및 6D에는 음성 대조군 CD3 TCB에 대한 결과가 도시되어 있다.

도 7A 내지 7D에서는, FAPOX40 iMAb 공자극이 CEA CD3 TCB 또는 CEACAM5 CD3 TCB 매개된 TNF-a 분비를 증가시켰음을 보여준다. 휴지 중인 CD4 T 세포를 48시간 동안 각각 CEA CD3 TCB 또는 CEACAM5 CD3 TCB의 연속 희석물 열의 존재 하에 고정된 농도의 FAP OX40 iMAB의 존재 또는 부재 하에 조사된 TNF-α 센서 세포, NIH/3T3 huFAP 및 MKN-45 NLR 세포와 함께 공동-배양하였다. TNF-α의 양을 상기에 기재된 형광 현미경 검사 고 컨텐츠 라이프 이미징에 의해 TNF-α 센서 세포에서 GFP 유도로서 정량화하였다. 3회 실험(중앙)의 TNF-α 센서 세포의 통합된 녹색 형광(GCUxum2/이미지)을 사용된 TCB 농도에 대해 플롯팅하여 T 세포의 TNF-α 분비를 정량화하였다. 오차막대는 SEM을 나타낸다. CEACAM5 CD3 TCB(CEA CD3 TCB(2))에 대한 결과를 도 7A(공자극 부재) 및 도 7C(FAP OX40 iMAB 공자극 존재)에 도시하였다. CEA CD3 TCB에 대한 결과를 도 7B(공자극 부재) 및 도 7D(FAP OX40 iMAB 공자극 존재)에 도시하였다.

도 8A 내지 8D는 각각 상이한 TCB 또는 상이한 세포주에 의해 나타난 영향을 개괄한다. 휴지 중인 CD4 T 세포를 48시간 동안 고정된 농도의 FAP OX40 iMAB의 존재 또는 부재 하에 Fo1R CD3 TCB(도 8B 및 8D), CEA CD3 TCB(도 8C) 또는 CEACAM5 CD3 TCB(도 8A)의 연속 희석물 열의 존재 하에 TNF-α 센서 세포, 조사된 NIH/3T3 huFAP, 및 상이한 표적 세포주 HeLa NucLight Red 세포(도 8B), MKN-45 NucLight Red 세포(도 8A 및 8C) 또는 Skov-3 세포(도 8D)와 함께 공동-배양하였다. TNF-α의 양을 형광 현미경 검사 고 컨텐츠 라이프 이미징 2에 의해 TNF-α 센서 세포에서 GFP 유도로서 정량화하였다. GFP의 AUC를 각각의 조건 및 시험에 대해 계산하였고 각각의 시점에 대해 플롯팅하여 T 세포의 TNF-α 분비를 정량화하였다. OX40 공자극은 CEA CD3 TCB, CEACAM5 CD3 TCB 및 Fo1R CD3 TCB 매개된 TNF-α 방출을 증가시켰다.

도 9A 내지 9D에서는, OX40 공자극이 CEACAM5 CD3 TCB 매개된 시토카인 분비를 조절하였음을 보여준다. 휴지 중인 CD4 T 세포를 48시간 동안 CEACAM5 CD3 TCB의 연속 희석물 열의 존재 하에 고정된 농도의 FAP OX40 iMAB의 존재 또는 부재 하에 MKN-45 NucLight Red 세포 및 조사된 NIH/3T3 huFAP와 함께 공동-배양하였다. TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-10, IL-9 및 IL-17A의 분비된 양을 48시간의 종점에서 혈구계산 비드 어레이(cytometric bead array) 기술을 사용하여 정량화하였다. 각각의 시토카인 농도를 TCB 농도에 대해 플롯팅하였다. 오프 노트 - 전염증성 시토카인 TNF-α(도 9A), IFN-γ(도 9C) 및 IL-2(도 9B)의 분비는 OX40 공자극에

의해 증진된 반면에, 면역 억제성 IL-10(도 9D)의 분비는 감소되었다.

도 10A 내지 10D에서는, OX40 공자극이 CEA CD3 TCB 매개된 시토카인 분비를 조절하였음을 보여준다. 휴지 중인 CD4 T 세포를 48시간 동안 CEA CD3 TCB의 연속 회석물 열의 존재 하에 고정된 농도의 FAP OX40 iMAB의 존재 또는 부재 하에 MKN-45 NucLight Red 세포 및 조사된 NIH/3T3 huFAP와 함께 공동-배양하였다. TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-10(도 10D), IL-9 및 IL-17A의 분비된 양을 48시간의 종점에서 혈구계산 비드 어레이 기술을 사용하여 정량화하였다. 각각의 시토카인 농도를 TCB 농도에 대해 플롯팅하였다. 오프 노트 - 전염증성 시토카인 TNF- α (도 10A), IFN- γ (도 10C) 및 IL-2(도 10B)의 분비는 OX40 공자극에 의해 증진되었다.

도 11A 내지 11D에서는, OX40 공자극이 FolR1 CD3 TCB 매개된 시토카인 분비를 조절하였음을 보여준다. 휴지 중인 CD4 T 세포를 48시간 동안 FolR1 CD3 TCB의 연속 회석물 열의 존재 하에 고정된 농도의 FAP OX40 iMAB의 존재 또는 부재 하에 HeLa NucLight Red 세포 및 조사된 NIH/3T3 huFAP와 함께 공동-배양하였다. TNF- α , IFN- γ , IL-2 및 IL-10의 분비된 양을 48시간의 종점에서 혈구계산 비드 어레이 기술을 사용하여 정량화하였다. 각각의 시토카인 농도를 TCB 농도에 대해 플롯팅하였다. 오프 노트 - 전염증성 시토카인 TNF- α (도 11A), IFN- γ (도 11C) 및 IL-2(도 11B)의 분비는 OX40 공자극에 의해 증진된 반면에, 면역 억제성 IL-10(도 11D)의 분비는 크게 감소하였다.

도 12A 내지 12D는 도 11A 내지 11D에 나타낸 바와 동일한 실험의 결과를 보여주나, 여기서 HeLa NucLight Red 세포를 Skov-3 세포로 대체하였다. 전염증성 시토카인 TNF- α (도 12A), IFN- γ (도 12C), IL-2(도 12B) 및 IL-10(도 12D)의 분비는 본 실험에서 OX40 공자극에 의해 증진된 반면에, 면역 억제성 IL-10(도 11D)의 분비는 별로 변하지 않았다.

도 9A 내지 9D, 도 10A 내지 10D, 도 11A 내지 11D 및 도 12A 내지 12D에 나타낸 결과의 요약을 도 13에 나타냈다. 시토카인 농도의 변화를 백분율로 계산하고, FAP OX40 iMab 공자극이 부재하는 각각의 샘플을 100%로 간주하였다. 변화의 정도는 사용된 종양 세포주 및 각각의 TCB에 의존적이었다.

휴지 중인 CD4 T 세포(도 14A 내지 14H), 휴지 중인 CD8 T 세포(도 15A 내지 15H) 및 휴지 중인 인간 PMBC(도 16A 내지 16H)에서 CEACAM5 CD3 TCB 매개된 시토카인 분비를 조절하는 FAP OX40 iMab 공자극의 능력을 비교하였다. 그레프는 시토카인 IL-2(도 14A, 15A 및 16A), IFN- γ (도 14B, 15B 및 16B), TNF- α (도 14C, 15C 및 16C), IL-4(도 14D, 15D 및 16D), IL-9(도 14E, 15E 및 16E), MIP-1 α (도 14F, 15F 및 16F), IL-17a(도 14G, 15G 및 16G) 및 IL-10(도 14H, 15H 및 16H)의 분비된 양을 보여준다. 휴지 중인 CD4 또는 CD8 T 세포, 또는 PBMC를 72시간 동안 CEACAM5 CD3 TCB(CEA CD3 TCB(2))의 연속 회석물 열의 존재 하에 고정된 농도의 FAP OX40 iMAB의 존재 또는 부재 하에 MKN-45 NucLight Red 세포 및 조사된 NIH/3T3 huFAP와 함께 공동-배양하였다. TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-10, IL-9, IL-4, Mip-1 α 및 IL-17A의 분비된 양을 48시간의 종점에서 혈구계산 비드 어레이 기술을 사용하여 정량화하였다. 각각의 시토카인 농도를 TCB 농도에 대해 플롯팅하였다.

FAP OX40 iMAB 공자극에 의해 야기된 시토카인 농도 증가의 비교를 TCB 최고 농도에 대해 도 17에 나타냈다.

도 18A 및 18B는, 실시예 4.4에 기재되는 생체내 실험 1에서 처리 제1주 동안 주사된 화합물의 약동학적 프로필을 보여준다. 군 당 2마리의 마우스를 제1 요법 10분, 6시간, 24시간, 96시간 및 7일 후에 채혈하고, 주사한 화합물의 노출을 분석하였다. 혈액을 혈청으로 가공하고, 샌드위치 ELISA를 수행하여 제1주 동안 FAP OX40 iMab(도 18A) 및 CEACAM5 CD3 TCB(도 18B)의 노출을 결정하였다. 전신 노출을 단일 요법을 제공받은 마우스 또는 병용 요법을 제공받은 마우스의 경우 비슷하였다.

도 19A는, 모든 다른 군과 비교하여, CEACAM5 CD3 TCB와 FAP(4B9) OX40 iMab의 조합만이 피하 종양의 퇴화를 이뤄 냈음을 보여준다. 이는 도 19B에 나타낸 워터폴 플롯(waterfall plot)으로부터 분명히 알 수 있다. 줄기 세포 인간화된 NOG 마우스에게 매트리겔 내의 MKN45 위 종양 세포 및 3T3huFAP 섬유아세포의 혼합물을 피하 주사하였다. 마우스를 제10일에 종양 크기 및 인간 T 세포 수에 대해 무작위화시켰고, 이때 평균 T 세포 수/ μ l 혈액은 140이었고, 평균 종양 크기는 170 mm³였다. 무작위화 날에, 마우스에게 비히클, CEACAM5 CD3 TCB(CEA CD3 TCB(2)), FAP OX40 iMAB 또는 이들의 조합을 연속하는 5주 동안 1주일에 1회 정맥내 주사하였다. 종양 부피를 1주일에 3회 측정하고 연구 시간에 대해 플롯팅하였다. 오차막대는 군 당 6 내지 8마리의 동물에 대한 표준 오차를 나타낸다(도 19A). 처리 개시시 종양 부피와 비교한 실험 제41일의 종양 부피의 변화율을 각각의 동물에 대해 계산하고 워터폴 플롯으로 플롯팅하였다(도 19B).

도 20A 및 20B는 실시예 4.5에 기재되는 생체내 실험 2에서 처리 제1주 동안 주사한 화합물의 약동학적 프로필을 보여준다. 군 당 2마리의 마우스를 제1 요법 10분, 6시간, 24시간, 96시간 및 7일 후에 채혈하고, 주사한 화합물의 노출을 분석하였다. 혈액을 혈청으로 가공하고, 샌드위치 ELISA를 수행하여 제1주 동안 상이한 투여

량의 FAP OX40 iMab 및 이의 CEACAM5 CD3 TCB와의 조합(도 20A) 또는 CEACAM5 CD3 TCB 및 이의 상이한 투여량의 FAP OX40 iMab와의 조합(도 20B)의 노출을 결정하였다. 도 20A에서는, 상이한 투여량의 FAP OX40 iMab의 분명한 투여량 의존성을 알 수 있다. CEACAM5 CD3 TCB의 노출은 단일 요법을 제공받은 마우스 또는 병용 요법을 제공받은 마우스의 경우 비슷하였다.

도 21A 내지 21C는 CEACAM5 CD3 TCB와 최고 투여량의 FAP(4B9) OX40 iMab(12.5 mg/kg, 도 21C)의 조합만이 모든 다른 군과 비교하여 종양 성장 억제에 있어서 개선된 효능을 나타냈음을 보여준다. 줄기 세포 인간화된 NOG 마우스에게 매트리겔 내의 MKN45 위 종양 세포 및 3T3huFAP 섬유아세포의 혼합물을 피하 주사하였다. 마우스를 제26일에 종양 크기 및 인간 T 세포 수에 대해 무작위화시켰고, 이때 평균 T 세포 수/ μ l 혈액은 115였고, 평균 종양 크기는 490 mm³였다. 무작위화 1일 후에, 마우스에게 비히클, CEACAM5 CD3 TCB(CEA CD3 TCB(2)), 및 상이한 투여량의 FAP OX40 iMab(각각 12.5 mg/kg, 4.2 mg/kg 및 1.4 mg/kg), 또는 OX40 표적화된 분자와 CEACAM5 CD3 TCB의 조합을 4주 동안 정맥내 주사하였다. 종양 부피를 1주일에 3회 측정하고 연구 시간에 따라 플롯팅하였다. 오차막대는 군 당 8 내지 10마리의 동물에 대한 표준 오차를 나타낸다. 도 21A는 FAP OX40 iMab 1.4 mg/kg을 사용하여 수득한 종양 퇴화를 보여주고, FAP OX40 iMab 4.2 mg/kg 또는 FAP OX40 iMab 12.5 mg/kg을 사용하여 수득한 종양 퇴화는 각각 도 21B 및 21C에 도시되어 있다.

도 22는 CEACAM5 CD3 TCB와 상이한 양의 FAP(4B9) OX40 iMab의 조합의 항종양 효능의 투여량 의존성을 개괄한다. 처리 개시일의 종양 부피와 비교한 실험 2의 처리 제35일의 종양 부피의 변화율을 각각의 동물에 대해 계산하고 워터풀 플롯으로서 플롯팅하였다.

도 23A 내지 23D에서는, CEACAM5 CD3 TCB 및 FAP(4B9) OX40 iMab의 조합이 모든 단일 요법과 비교하여 종양내 백혈구의 수를 유의미하게 증가시킴을 보여준다. 실시예 4.5에 기재되는 실험 2의 제50일에, 종양 침윤 립프구를 단리하고 유세포 분석법에 의해 인간 백혈구 및 T 세포의 존재에 대해 평가하였다. 살아있는 인간 백혈구(DAPI-, CD45+), NON-CD3 백혈구(DAPI-, CD45+, CD3-), CD4 및 CD8 T 세포(DAPI-, CD45+, CD3+, CD4 또는 CD8+)를 게이팅하고, 정규화된 수(μ g 종양 당)를 계산하고, 값을 각각의 처리군에 대해 플롯팅하였다: 도 23A: 살아있는 인간 백혈구, 도 23B: NON-CD3 백혈구, 도 23C: CD4 T 세포, 도 23D: CD8 T 세포. 오차막대는 군 당 5 내지 8마리의 동물에 대한 표준 오차를 나타낸다.

도 24A 및 24B에서는, FAP OX40 iMAB 공자극 및 CEA CD3 TCB(2)가 종양 특이적으로 작용하고 비장(도 24A) 및 혈액(도 24B)에서 전신 백혈구 수가 변하지 않음을 보여준다.

CEACAM5 CD3 TCB 및 FAP(4B9) OX40 iMab의 조합은 모든 단일 요법과 비교하여 종양내 T 세포 및 CD8 T 세포 수를 유의미하게 증가시켰다. huCD3 면역 조직 화학에 의해 검출된 CD3 양성 T 세포 수를 도 25A에 나타냈고, huCD8 면역 조직 화학에 의해 검출된 CD8 양성 T 세포 수를 도 25B에 나타냈다. HuCD8 및 HuCD3 면역 조직 화학을 4 μ m 파라핀 절편에 대해 수행하였다.

도 26A 내지 26C에서는, CEACAM5 CD3 TCB 및 FAP(4B9) OX40 iMab의 조합이 모든 단일 요법과 비교하여 종양내 시토카인의 농도를 유의미하게 증가시켰음을 보여준다. 말초에서는 유의미한 변화가 관찰되지 않았다. 실험 2의 제50일에, 종양, 비장 및 혈액을 샘플링하고 스냅 동결시켰다. 시토카인 농도를 바이오-플렉스 프로(Bio-Plex Pro, 상표) 인간 시토카인 17-플렉스 분석을 사용하여 균질액에서 결정하였다. 완전체 단백질 함량을 BCA 단백질 분석 키트에 의해 분석하고, 농도를 샘플의 단백질 함량에 대해 정규화하였다. 처리군 당 4마리의 동물의 중간 시토카인 농도를 종양의 경우 도 26A에, 비장에 대해 도 26B에, 및 혈액의 경우 도 26C에 도시하였다.

도 27A 내지 27F는, 종양내 시토카인 농도가 FAP OX40 iMab 및 CEACAM5 CD3 TCB의 조합으로 처리된 동물에서 종양 성장의 진행에 반비례 하나 종양내 백혈구 수에는 그렇지 않음을 보여준다. 이는 CEACAM5 CD3 TCB 단일 요법으로 처리된 동물에서 관찰되지 않았다. 각각의 빈 기호는 CEACAM5 CD3 TCB 단일 요법으로 처리된 개별적 동물을 의미하고, 각각의 채워진 기호는 상기 조합으로 처리된 개별적 동물을 의미한다. 도 27A에서는 T 세포 수를 종양 부피 변화율[%]에 대해 플롯팅하였고, TNF-a(도 27B), IFN-g(도 27C), MCP-1(도 27D), IL-8(도 27E) 및 IL-6(도 27F)의 농도를 또한 종양 부피 변화율[%]에 대해 플롯팅하였다.

도 28A 및 28B는 CEA CD3 TCB와 항-PD-L1 및 FAP OX40 iMab의 조합이 모든 다른 요법과 비교하여 종양 성장 억제에 있어서 개선된 효능을 이뤄 냈음을 보여준다(실시예 5). 도 28A 및 28B는 각각 종양 부피의 평균 또는 종양 부피의 평균 배수 차이로서 시간에 따른 종양 성장을 보여준다.

도 29A, 29B 및 29C는 실시예 5에 기재된 생체내 실험에서 처리의 제1주 동안 주사한 화합물의 약동학적 프로필을 보여준다. 군 당 2마리의 마우스를 제1 및 제3 요법 1시간 및 72시간 후에 채혈하고, 주사한 화합물의 노출

을 분석하였다. 혈액을 혈청으로 가공하고, 샌드위치 ELISA를 수행하여 CEACAM5 CD3 TCB와의 조합 또는 삼중 조합된 FAP OX40 iMab(도 29A), CEA CD3 TCB 및 이의 상이한 조합(도 29B) 및 항-PD-L1과의 조합 또는 삼중 조합된 CEA CD3 TCB(도 29C)의 노출을 결정하였다. 3개 모두의 화합물의 노출은 단일 요법을 제공받은 마우스 또는 병용 요법을 제공받은 마우스의 경우 비슷하였다.

CEACAM5 CD3 TCB와 항-PD-L1 및 FAP(4B9) OX40 iMab의 조합은 모든 단일 또는 이중 요법과 비교하여 종양내 T 세포 및 CD8 T 세포 수를 유의미하게 감소시켰다. huCD3 면역 조작 화학에 의해 검출된 CD3 양성 T 세포 수를 도 30A에 나타냈고, huCD8 면역 조작 화학에 의해 검출된 CD8 양성 T 세포 수를 도 30B에 나타냈다. HuCD8 및 HuCD3 면역 조작 화학을 4 μ m 파라핀 절편에 대해 수행하였다.

도 31 내지 35는 CEA CD3 TCB 및 FAP OX40 iMab의 조합 및 CEA CD3 TCB 및 FAP-4-1BBL과 항-PD-L1 항체(아테졸리주맙)의 삼중 조합의 효능을 시험하는 시험관내 분석의 결과에 관한 것이다. PBMC를 MKN45-PD-L1 및 NIH/3T3-huFAP 세포, 및 상이한 조합의 T 세포 활성제 CEA CD3 TCB, 체크포인트 억제제 a-PD-L1(아테졸리주맙) 및 면역 조절제 FAP OX40 iMab의 존재 하에 4일 동안 항온처리하였다. 제4일(실험의 종점)에, 세포를 표면 또는 세포내 마커에 대해 염색시키고, 상청액을 시토카인 분석을 위해 저장하였다. 각각의 기호는 개별적 공여자를 나타내고(각각의 군을 3회 실험으로 시험하였다), 각각의 색/패턴은 특정 처리 조합을 나타내고, 막대는 평균과 SEM을 나타낸다. 각각 CD4(도 31A) 및 CD8 T 세포(도 31B) 상에서 CD25의 표면 발현, CD4(도 32A) 및 CD8 T 세포(도 32B) 상에서의 증식, CD4(도 33A) 및 CD8 T 세포(도 33B) 상에서의 T-bet의 세포내 발현, 및 CD4(도 33C) 및 CD8 T 세포(도 33D) 상에서 그랜자임 B의 세포내 발현에 대한 단일 성분 및 이들의 조합과 비교한 조합의 효과를 6명의 상이한 공여자에 대해 나타냈다. 상이한 처리군 사이의 통계적 유의도를 2-원 ANOVA (터키 다중 비교 검정(Tukey's multiple comparisons test))를 사용하여 계산하였고, 여기서 3회 실험한 군 당 6명의 공여자의 평균을 계산하였다. 그래프에 나타낸 별표(*)는 p 값을 나타내며, *는 p 값 < 0.05임을 나타내고, **는 p 값 < 0.01임을 나타내고, ***는 p 값 < 0.001임을 나타낸다.

도 31A 및 31B는 100 nM CEA CD3 TCB 및 2 nM FAP OX40 iMAB의 조합, 또는 항-PD-L1 항체를 갖는 삼중 조합 처리가 CD25 발현 CD4(도 31A) 및 CD8(도 31B) T 세포의 백분율을 증가시킴을 보여준다.

도 32A 및 32B는 100 nM CEA CD3 TCB 및 2 nM FAP OX40 iMAB에 의한 조합 처리, 또는 80 nM 항-PD-L1 항체를 갖는 삼중 조합 처리가 증식하는 CD4 T 세포(도 32A) 및 CD8 T 세포(도 32B)의 백분율을 증가시킴을 보여준다. PBMC를 실험 개시 전에 증식 염료 CFSE로 라벨링하고, 증식을 FACS를 사용하여 CFSE 염료의 희석에 의해 측정하였다.

도 33A 및 33B는 100 nM CEA CD3 TCB 및 2 nM FAP OX40 iMAB를 사용한 조합 치료, 또는 80 nM 항-PD-L1 항체를 사용한 삼중 조합 치료가 T-bet 발현 CD4 T 세포의 백분율(도 33A) 및 CD8 T 세포 상의 T-bet의 MFI(평균 형광 강도)(도 33B)를 증가시킴을 보여준다. 도 33C 및 33D는 100 nM CEA CD3 TCB 및 2nM FAP OX40 iMAB를 사용한 조합 치료가 그랜자임 B 발현 CD4 T 세포(도 33C) 및 그랜자임 B 발현 CD8 T 세포(도 33D)의 백분율을 증가시킴을 보여준다. 항-PD-L1 항체를 사용하는 삼중 조합은 CEA CD3 TCB 및 FAP OX40 iMab 조합 치료와 비교하여 통계적으로 유의하게 그랜자임 B 발현 CD4 및 CD8 T 세포의 백분율을 추가로 증가시킨다. 분비된 시토카인 IFN γ , GM-CSF, TNF- α , IL-2, IL-8, 그랜자임 B 및 IL-10을, 항온처리 4일 후에, 제조사의 지시에 따라 혈구 계산 비드 어레이를 사용하여 상청액에서 분석하였다. 각각의 기호는 1명의 공여자(군 당 모든 3회 실험)을 나타내고, 각각의 색/패턴은 특정 처리 조합을 나타내고, 막대는 평균과 SEM을 나타낸다.

도 34A, 34B 및 34C는 100 nM CEA CD3 TCB 및 2 nM FAP OX40 iMAB를 사용한 병용 치료가 IFN γ (도 34A), 그랜자임 B(도 34B) 및 IL-8(도 34C)의 분비를 증가시킴을 보여준다. a-PD-L1을 사용한 삼중 조합은 전술된 셋 모두의 시토카인의 분비를 유의미하게 증가시킨다.

도 35A, 35B 및 35C는 기선으로 취한 CEA CD3 TCB 및 a-PD-L1 조합 치료 후 시토카인과 비교하여, CEA CD3 TCB, FAP OX40 iMab 및 a-PD-L1의 삼중 조합에 의한 처리 후 6명의 공여자의 시토카인의 증가 배수를 보여준다. 흑색 실선은 2배 변화를 나타낸다. IFN γ (도 35A), 그랜자임 B(도 35B) 및 IL-8(도 35C)의 증가 배수를 나타냈다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

[0076] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 기술과학 용어는 본 발명이 속하는 분야에 일반적으로 사용되는 바와 동

일한 의미를 갖는다. 본원을 해석하기 위해서, 하기의 정의를 적용하며 적합한 경우에는 단수로 사용된 용어가 복수를 또한 포함할 것이며 이의 역도 마찬가지이다.

[0078] 본원에 사용되는 바와 같이, "항원 결합 분자"란 용어는 이의 가장 넓은 의미로, 항원 결정 인자에 특이적으로 결합하는 분자를 지칭한다. 항원 결합 분자의 예는 항체, 항체 단편 및 스캐폴드(scaffold) 항원 결합 단백질이다.

[0079] 본원에서 "항체"란 용어는 가장 넓은 의미로 사용되며 다양한 항체 구조물, 예를 들어 비제한적으로 단클론 항체, 다클론 항체, 단일특이적 및 다중특이적 항체(예를 들어 이중특이적 항체), 및 항체 단편(목적하는 항원 결합 활성을 나타내는 한)을 포함한다.

[0080] 본원에 사용되는 바와 같은 "단클론 항체"란 용어는 실질적으로 동종인 항체의 집단으로부터 수득되는 항체를 지칭한다, 즉 상기 집단을 포함하는 개별적인 항체가, 가능한 변이체 항체, 예를 들어 천연 돌연변이를 함유하거나 단클론 항체 제제의 생산 동안 발생하는 항체(상기와 같은 변이체는 일반적으로 소량으로 존재한다)를 제외하고, 동일하고/하거나 동일한 에피토프에 결합한다. 전형적으로 상이한 결정 인자(에피토프)를 향하는 상이한 항체를 포함하는 다클론 항체 제제와 대조적으로, 단클론 항체 제제의 각각의 단클론 항체는 항원 상의 단일의 결정 인자를 향한다.

[0081] 본원에 사용되는 바와 같은 "단일특이적" 항체란 용어는 각각의 결합 부위가 동일한 항원의 동일한 에피토프에 결합하는 하나 이상의 상기 결합 부위를 갖는 항체를 나타낸다. "이중특이적"이란 용어는 항원 결합 분자가 2개 이상의 별개의 항원 결정 인자에 특이적으로 결합할 수 있음을 의미한다. 전형적으로, 이중특이적 항원 결합 분자는 2개의 항원 결합 부위를 포함하며, 이들은 각각 상이한 항원 결정 인자에 특이적이다. 일부 실시양태에서, 상기 이중특이적 항원 결합 분자는 2개의 항원 결정 인자, 특히 2개의 별개의 세포상에서 발현된 2개의 항원 결정 인자에 동시에 결합할 수 있다.

[0082] 본원 내에 사용되는 바와 같은 "결합가"란 용어는 항원 결합 분자에서 하나 명시된 수의 결합 부위의 존재를 나타낸다. 이와 같이, "이가", "사가" 및 "육가"란 용어는 항원 결합 분자에서 각각 2개의 결합 부위, 4개의 결합 부위 및 6개의 결합 부위의 존재를 나타낸다.

[0083] "전장 항체", "완전 항체" 및 "전체 항체"란 용어는 본원에서 천연 항체 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖는 항체를 지칭하는 데 호환적으로 사용된다. "천연 항체"는 다양한 구조를 갖는 천연 면역 글로불린 분자를 지칭한다. 예를 들어, 천연 IgG-클래스 항체는 다이설파이드-결합되는 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄로 구성된, 약 150,000 달톤의 이종사량체성 당단백질이다. N-말단에서부터 C-말단까지, 각각의 중쇄는 가변 영역(VH)(또한 가변 중쇄 도메인 또는 중쇄 가변 도메인이라 칭한다)에 이어서 3개의 불변 도메인(CH1, CH2 및 CH3)(또한 중쇄 불변 영역이라 칭한다)을 갖는다. 유사하게, N-말단에서부터 C-말단까지, 각각의 경쇄는 가변 영역(VL)(또한 가변 경쇄 도메인 또는 경쇄 가변 도메인이라 칭한다)에 이어서 경쇄 불변 도메인(CL)(또한 경쇄 불변 영역이라 칭한다)을 갖는다. 항체의 중쇄는 α (IgA), δ (IgD), ε (IgE), γ (IgG) 또는 μ (IgM)라 칭하는 5가지 유형 중 하나로 할당될 수 있으며, 이들 중 일부는 하위 유형, 예를 들어 γ 1(IgG1), γ 2(IgG2), γ 3(IgG3), γ 4(IgG4), α 1(IgA1) 및 α 2(IgA2)로 추가로 분류될 수 있다. 항체의 경쇄는 이의 불변 도메인의 아미노산 서열을 근거로, 카파(κ) 및 람다(λ)라 칭하는 2가지 유형 중 하나로 배정될 수 있다.

[0084] "항체 단편"은 완전 항체가 결합하는 항원에 결합하는 상기 완전 항체의 일부를 포함하는 상기 완전 항체 이외의 분자를 지칭한다. 항체 단편의 예는 비제한적으로 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 다이아바디, 트라이아바디, 테트라바디, 크로스-Fab 단편; 선형 항체; 단쇄 항체 분자(예를 들어 scFv); 및 단일 도메인 항체를 포함한다. 일부 항체 단편의 리뷰를 위해서, 문헌[Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003)]을 참조한다. scFv 단편의 리뷰를 위해서, 예를 들어 문헌[Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다; 또한 WO 93/16185; 및 미국특허 제5,571,894호 및 미국특허 제5,587,458호를 참조한다. 구조 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하고 증가된 생체내 반감기를 갖는 Fab 및 F(ab')₂ 단편에 대한 논의에 대해서, 미국특허 제5,869,046호를 참조한다. 다이아바디는 이가이거나 이중특이적일 수 있는 2개의 항원 결합 부위를 갖는 항체 단편이고, 예를 들어 EP 0 404 097; WO 1993/01161; 문헌[Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003)]; 및 문헌[Hollinger et al., Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993)]을 참조한다. 트라이아바디 및 테트라바디가 또한 문헌[Hudson et al., Nat. Med. 9, 129-134(2003)]에 개시되어 있다. 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 일부 또는 전부 또는 경쇄 가변 도메인의 일부 또는 전부를 포함하는 항체 단편이다. 특정 실시양태에서, 단일-도메인 항체는 인간 단일-도메인 항체이다(도맨티스 인코포레이티드(Domantis, Inc., 미국 매사추세츠주 월탐 소

재); 예를 들어 미국특허 제6,248,516 B1호를 참조한다). 항체 단편을 본 발명에 개시된 바와 같은 다양한 기법, 예를 들어 비제한적으로 완전 항체의 단백질분해 절단뿐만 아니라 재조합 숙주 세포(예를 들어 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 또는 파지)에 의한 생산에 의해 생산할 수 있다.

[0085] 완전 항체의 파파인 절단은, 각각 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 및 또한 상기 경쇄의 불변 도메인 및 상기 중쇄의 제1 불변 도메인(CH1)을 함유하는, "Fab" 단편이라 칭하는 2개의 동일한 항원 결합 단편을 생산한다. 따라서, 본원에 사용되는 바와 같이, "Fab 단편"이란 용어는 경쇄의 VL 도메인 및 불변 도메인(CL), 및 중쇄의 VH 도메인 및 제1 불변 도메인(CH1)을 포함하는 경쇄 단편을 포함하는 항체 단편을 지칭한다. Fab' 단편은 중쇄 CH1 도메인의 카복시 말단에 항체 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 소수의 잔기의 첨가에 의해 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기가 유리 티올 기를 갖는 Fab' 단편이다. 펩신 처리는 2개의 항원 결합 부위(2개의 Fab 단편) 및 Fc 영역의 일부를 갖는 $F(ab')_2$ 단편을 제공한다.

[0086] "크로스-Fab 단편" 또는 "xFab 단편" 또는 "크로스오버 Fab 단편"이란 용어는 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 또는 불변 영역이 교환되는 Fab 단편을 지칭한다. 크로스오버 Fab 분자의 2개의 상이한 쇄 조성이 가능하며 이는 본 발명의 이중특이적 항체에 포함된다: 한편으로, Fab 중쇄 및 경쇄의 가변 영역이 교환된다, 즉 크로스오버 Fab 분자는 경쇄 가변 영역(VL) 및 중쇄 불변 영역(CH1)으로 구성된 펩티드 쇄, 및 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 불변 영역(CL)으로 구성된 펩티드 쇄를 포함한다. 크로스오버 Fab 분자를 또한 CrossFab_(VLVH)라 칭한다. 다른 한편으로, Fab 중쇄 및 경쇄의 불변 영역이 교환될 때, 크로스오버 Fab 분자는 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 불변 영역(CL)으로 구성된 펩티드 쇄, 및 경쇄 가변 영역(VL) 및 중쇄 불변 영역(CH1)으로 구성된 펩티드 쇄를 포함한다. 크로스오버 Fab 분자를 또한 CrossFab_(CLCH1)라 칭한다.

[0087] "단쇄 Fab 단편" 또는 "scFab"는 항체 중쇄 가변 도메인(VH), 항체 불변 도메인 1(CH1), 항체 경쇄 가변 도메인(VL), 항체 경쇄 불변 도메인(CL) 및 링커로 이루어지는 폴리펩티드며, 여기에서 상기 항체 도메인 및 상기 링커는 N-말단에서 C-말단 방향으로 하기의 순서 중 하나를 갖는다: a) VH-CH1-링커-VL-CL, b) VL-CL-링커-VH-CH1, c) VH-CL-링커-VL-CH1 또는 d) VL-CH1-링커-VH-CL; 여기에서 상기 링커는 30개 이상의 아미노산, 바람직하게는 32 내지 50개의 아미노산의 폴리펩티드다. 상기 단쇄 Fab 단편은 상기 CL 도메인과 CH1 도메인 사이의 천연 다이설파이드 결합을 통해 안정화된다. 또한, 이를 단쇄 Fab 분자는 시스테인 잔기의 삽입(예를 들어 카바트 넘버링에 따른 가변 중쇄의 위치 44 및 가변 경쇄의 위치 100)을 통해 쇄간 다이설파이드 결합의 생성에 의해 추가로 안정화될 수도 있다.

[0088] "크로스오버 단쇄 Fab 단편" 또는 "x-scFab"는 항체 중쇄 가변 도메인(VH), 항체 불변 도메인 1(CH1), 항체 경쇄 가변 도메인(VL), 항체 경쇄 불변 도메인(CL) 및 링커로 이루어지는 폴리펩티드며, 여기에서 상기 항체 도메인 및 상기 링커는 N-말단에서 C-말단 방향으로 하기의 순서 중 하나를 갖는다: a) VH-CL-링커-VL-CH1, 및 b) VL-CH1-링커-VH-CL; 여기에서 VH 및 VL은 함께 항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 형성하고, 여기에서 상기 링커는 30개 이상의 아미노산의 폴리펩티드이다. 또한, 이를 x-scFab 분자는 시스테인 잔기의 삽입(예를 들어 카바트 넘버링에 따른 가변 중쇄의 위치 44 및 가변 경쇄의 위치 100)을 통해 쇄간 다이설파이드 결합의 생성에 의해 추가로 안정화될 수도 있다.

[0089] "단쇄 가변 단편(scFv)"은 10 내지 약 25개의 아미노산의 짧은 링커 펩티드와 연결된, 항체의 중쇄(V_H) 및 경쇄(V_L)의 가변 영역의 융합 단백질이다. 링커는 대개 가요성을 위해 글리신이 풍부할 뿐만 아니라, 용해도를 위해서 세린 또는 트레오닌이 풍부하며, V_H 의 N-말단을 상기 V_L 의 C-말단과 연결시킬 수 있고, 이와 역으로 연결시킬 수도 있다. 상기 단백질은 불변 영역의 제거 및 링커의 도입에도 불구하고, 원래 항체의 특이성을 유지한다. scFv 항체는 예를 들어 문헌[Houston, J.S., Methods in Enzymol. 203 (1991) 46-96]에 기재되어 있다. 또한, 항체 단편은 기능성 항원 결합 부위에 대해, VH 도메인의 특징을 갖거나(즉 VL 도메인과 함께 조립될 수 있음) VL 도메인의 특징을 갖고(즉 VH 도메인과 함께 조립될 수 있음), 이에 따라 전장 항체의 항원 결합 특성을 제공할 수 있는 단쇄 폴리펩티드를 포함한다.

[0090] "스캐폴드 항원 결합 단백질"은 당분야에 공지되어 있으며, 예를 들어 피브로넥틴 및 설계된 안키린 반복 단백질(DARPin)이 항원 결합 도메인에 대한 대체 스캐폴드로서 사용되었다, 예를 들어 문헌[Gebauer and Skerra, Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. Curr Opin Chem Biol 13:245-255 (2009)] 및 문헌[Stumpp et al., Darpins: A new generation of protein therapeutics. Drug Discovery Today 13: 695-701 (2008)]을 참조한다. 본 발명의 하나의 양태에서, 스캐폴드 항원 결합 단백질은 CTLA-4(에비바디(Evibody)), 리포칼린(안티칼린(Anticalin)), 단백질 A-유래된 분자, 예를 들어 단백질 A의 Z-도메인(애피바디)

(Affibody)), A-도메인(애비머(Avimer)/맥시바디(Maxibody)), 혈청 트랜스페린(트랜스-바디); 설계된 안키린 반복 단백질(DARPin), 항체 경쇄 또는 중쇄의 가변 도메인(단일-도메인 항체, sdAb), 항체 중쇄의 가변 도메인(나노바디, VH), V_{NAR} 단편, 피브로넥틴(애드넥틴(AdNectin)), C-유형 렉틴 도메인(테트라넥틴(Tetranectin)); 신규의 항원 수용체 베타-락타마제의 가변 도메인(V_{NAR} 단편), 인간 감마-크리스탈린 또는 유비퀴틴(애플린(Affilin) 분자); 인간 프로테아제 억제제의 쿠니츠 유형 도메인, 마이크로바디, 예를 들어 크노틴파로부터의 단백질, 웨티드 앱타머 및 피브로넥틴(애드넥틴)으로 이루어지는 군 중에서 선택된다.

[0091] 리포칼린은 작은 소수성 분자, 예를 들어 스테로이드, 빌린, 레티노이드 및 지질을 수송하는 세포외 단백질의 패밀리이다. 상기는 상이한 표적 항원에 결합하도록 조작될 수 있는 원추형 구조의 개방 단부에 다수의 루프를 갖는 강성의 베타-시트 2차 구조를 갖는다. 안티칼린은 160 내지 180 아미노산 크기이며 리포칼린으로부터 유래된다. 추가의 상세한 내용에 대해서 문헌[Biochim Biophys Acta 1482: 337-350 (2000)], US 7,250,297 B1 및 US 2007/0224633을 참조한다.

[0092] 설계된 안키린 반복 단백질(DARPin)은 내재 막 단백질의 세포골격에 대한 부착을 매개하는 단백질의 패밀리인 안키린으로부터 유래된다. 단일 안키린 반복부는 2개의 알파-나선 및 베타-회전으로 이루어지는 33 잔기 모티프이다. 상기를 각 반복부의 제1 알파-나선 및 베타-회전 중의 잔기를 무작위화시킴으로써 상이한 표적 항원에 결합하도록 조작할 수 있다. 이들의 결합 접촉면은 모듈의 수를 증가시킴으로써 증가될 수 있다(친화도 성숙화 방법). 추가의 상세한 내용에 대해서 문헌[J. Mol. Biol. 332, 489-503 (2003), PNAS 100(4), 1700-1705 (2003)] 및 문헌[J. Mol. Biol. 369, 1015-1028 (2007)] 및 US 2004/0132028A1을 참조한다.

[0093] 단일 도메인 항체는 단일 단량체성 가변 항체 도메인으로 이루어지는 항체 단편이다. 제1 단일 도메인은 카멜리드의 항체 중쇄의 가변 도메인으로부터 유래되었다(나노바디 또는 V_HH 단편). 또한, 단일 도메인 항체란 용어는 자율적인 인간 중쇄 가변 도메인(aVH) 또는 상어로부터 유래된 V_{NAR} 단편을 포함한다.

[0094] 기준 분자와 "동일한 에피토프에 결합하는 항원 결합 분자"는 경쟁 분석에서 이의 항원에 대한 상기 기준 분자의 결합을 50% 이상만큼 차단하는 항원 결합 분자를 지칭한다, 환언하면 상기 기준 분자는 경쟁 분석에서 이의 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합을 50% 이상만큼 차단한다.

[0095] "항원 결합 도메인"이란 용어는 항원의 일부 또는 전부에 특이적으로 결합하고 이에 상보성인 영역을 포함하는 항원 결합 분자의 부분을 지칭한다. 항원이 큰 경우, 항원 결합 분자는 단지 상기 항원의 특정 부분에만 결합할 수 있으며, 상기 부분을 에피토프라 칭한다. 항원 결합 도메인은 예를 들어 하나 이상의 가변 도메인(또한 가변 영역이라 칭한다)에 의해 제공될 수 있다. 바람직하게, 항원 결합 도메인은 항체 경쇄 가변 영역(VL) 및 항체 중쇄 가변 영역(VH)을 포함한다.

[0096] 본원에 사용되는 바와 같이, "항원 결정 인자"란 용어는 "항원" 및 "에피토프"와 유의어이며, 항원 결합 모이어티가 결합하여, 항원 결합 모이어티-항원 복합체를 형성하는 폴리펩티드 거대분자상의 부위(예를 들어 아미노산의 연속적인 신장부 또는 비-연속적인 아미노산의 상이한 영역으로 구성된 입체형태적 배열)를 지칭한다. 유용한 항원 결정 인자는 예를 들어 종양 세포의 표면 상에서, 바이러스-감염된 세포의 표면 상에서, 다른 병든 세포의 표면 상에서, 면역 세포의 표면 상에서, 혈청 및/또는 세포외 기질(ECM) 중에서 자유롭게 발견될 수 있다. 본원에서 항원으로서 유용한 단백질은 달리 표시되지 않는 한, 임의의 척추동물 공급원, 예를 들어 포유동물, 예를 들어 영장류(예를 들어 인간) 및 설치류(예를 들어 마우스 및 래트)로부터의 임의의 천연 형태의 단백질일 수 있다. 특정한 실시양태에서, 상기 항원은 인간 단백질이다. 본원에서 특정한 단백질을 참조하는 경우, 상기 용어는 "전장"의 가공되지 않은 단백질뿐만 아니라, 세포 중에서의 가공으로부터 생성되는 임의의 형태의 단백질을 포함한다. 상기 용어는 또한 상기 단백질의 천연 변이체, 예를 들어 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포함한다.

[0097] "특이적 결합"은 결합이 항원에 대해 선택성이며 불필요하거나 비-특이적인 상호작용과 구별될 수 있음을 의미한다. 특정한 항원에 결합하는 항원 결합 분자의 능력은 효소-결합된 면역흡수 분석(ELISA) 또는 당분야의 숙련가에게 친숙한 다른 기법, 예를 들어 표면 플라스몬 공명(SPR) 기법(비아코어(BIAcore) 장비 상에서 분석된다)(문헌[Liljeblad et al., Glyco J 17, 323-329 (2000)]), 및 전통적인 결합 분석(문헌[Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)])을 통해 측정될 수 있다. 하나의 실시양태에서, 관련되지 않은 단백질에 대한 항원 결합 분자의 결합 정도는 예를 들어 SPR에 의해 측정되는 바와 같이 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합의 약 10% 미만이다. 일부 실시양태에서, 항원에 결합하는 분자는 ≤1 μM, ≤100 nM, ≤10 nM, ≤1 nM, ≤0.1

nM, ≤0.01 nM, 또는 ≤0.001 nM(예를 들어 10^{-8} M 이하, 예를 들어 10^{-8} M 내지 10^{-13} M, 예를 들어 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수(Kd)를 갖는다.

[0098]

"친화도" 또는 "결합 친화도"는 분자(예를 들어 항체)의 단일 결합 부위와 이의 결합 짹(예를 들어 항원)간의 비-공유 상호작용의 총 합의 강도를 지칭한다. 달리 표시되지 않는 한, 본원에 사용되는 바와 같이, "결합 친화도"는 결합 쌍의 구성원(예를 들어 항체와 항원)간의 1:1 상호작용을 반영하는 천연의 결합 친화도를 지칭한다. 분자 X의 이의 짹 Y에 대한 친화도를 일반적으로 해리 상수(Kd)에 의해 나타낼 수 있으며, 상기 상수는 해리속도 및 결합속도 상수(각각 koff 및 kon)의 비이다. 따라서, 균등한 친화도는 상기 속도 상수의 비가 동일하게 남아있는 한 상이한 속도 상수를 포함할 수도 있다. 친화도를 본원에 기재된 것을 포함하여 당분야에 공지된 통상적인 방법에 의해 측정할 수 있다. 친화도의 특정한 측정 방법은 표면 플라스몬 공명(SPR)이다.

[0099]

"종양-연관된 항원(TAA)"이란 용어는 종양 세포에 의해 또는 종양 스트로마에서 고도로 발현되는 임의의 항원을 의미한다. 용어 "종양-연관된"은 TAA가 종양에 대해 완전히 특이적이지 않고, 오히려 종양 또는 이의 스트로마상에서 과발현됨을 나타낸다. 특정 종양-연관된 항원은 CEA 또는 FAP뿐만 아니라, 다른 표적, 예컨대 폴레이트 수용체(Fo1R1), MCSP, EGFR 패밀리(HER2, HER3 및 EGFR/HER1), VEGFR, CD20, CD19, CD22, CD33, PD1, PD-L1, TenC, EpCAM, PSA, PSMA, STEAP1, MUC1(CA15-3) MUC16(CA125) 및 5T4(영양세포 당단백질)이다. 특정 TAA는 FAP, CEA 및 Fo1R1을 포함한다.

[0100]

용어 "섬유아세포 활성화 단백질(FAP)"(프롤릴 엔도펩티다제 FAP 또는 세프라제(EC 3.4.21)로도 공지됨)은, 달리 지시되지 않는 한, 포유동물, 예컨대 영장류(예를 들어 인간), 비-인간 영장류(예를 들어 시노몰구스 원숭이) 및 설치류(예를 들어 마우스 및 래트)를 포함하는 임의의 척추동물 공급원으로부터의 임의의 천연 FAP를 지칭한다. 상기 용어는 "전장"의 처리되지 않은 FAP, 및 세포에서의 처리로부터 야기된 임의의 형태의 FAP를 포함한다. 상기 용어는 또한 FAP의 천연 변이체, 예를 들어 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 인간, 마우스 및/또는 시노몰구스 FAP에 특이적으로 결합할 수 있다. 인간 FAP의 아미노산 서열은 UniProt(www.uniprot.org) 등록번호 Q12884(버전 149, 서열번호 120), 또는 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_004451.2에 나타나 있다. 인간 FAP의 세포외 도메인(EC D)은 아미노산 위치 26에서 760까지이다. His-태그된 인간 FAP ECD의 아미노산 서열은 서열번호 121에 나타나 있다. 마우스 FAP의 아미노산 서열은 UniProt 등록번호 P97321(버전 126, 서열번호 122), 또는 NCBI RefSeq NP_032012.1에 나타나 있다. 마우스 FAP의 세포외 도메인(ECD)은 아미노산 위치 26에서 761까지이다. 서열번호 123는 His-태그된 마우스 FAP ECD의 아미노산 서열을 나타낸다. 서열번호 124는 His-태그된 시노몰구스 FAP ECD의 아미노산 서열을 나타낸다. 바람직하게는, 본 발명의 항-FAP 결합 분자는 FAP의 세포외 도메인에 결합한다. 예시적인 항-FAP 결합 분자는 WO 2012/020006 A2에 기재되어 있다.

[0101]

"암배아 항원(CEA)"(암배아 항원-관련된 세포 부착 분자 5(CEACAM5)로도 공지됨)이란 용어는, 달리 지시되지 않는 한, 포유동물, 예컨대 영장류(예를 들어 인간), 비-인간 영장류(예를 들어 시노몰구스 원숭이) 및 설치류(예를 들어 마우스 및 래트)를 포함하는 임의의 척추동물 공급원으로부터의 임의의 천연 CEA를 지칭한다. 인간 CEA의 아미노산 서열은 유니프롯 등록번호 P06731(버전 151, 서열번호 125)에 나타나 있다. CEA는 오랫동안 종양-연관된 항원으로 확인되어 왔다(문헌[Gold and Freedman, J Exp Med., 121:439-462, 1965]; [Berinstein N. L., J Clin Oncol., 20:2197-2207, 2002]). 태아 조직에서만 발현되는 단백질로 당초에 분류되었던 CEA는 현재는 여러 정상 성인 조직에서 확인되었다. 이들 조직은 위장관, 기도 및 비뇨생식기의 세포, 및 결장, 자궁경부, 땀샘 및 전립선의 세포를 포함하는, 일차 상피 기원의 것이다(문헌[Nap et al., Tumour Biol., 9(2-3):145-53, 1988]; [Nap et al., Cancer Res., 52(8):2329-23339, 1992]). 상피 기원의 종양 및 이의 전이는 CEA를 종양-연관된 항원으로서 함유한다. CEA 존재 자체는 암 세포로의 전환을 의미하지 않고, CEA의 분포가 나타낸다. 정상 조직에서, CEA는 일반적으로 세포의 선단 표면 상에 발현되고(문헌[Hammarstrom S., Semin Cancer Biol. 9(2):67-81 (1999)]), 이는 혈류에서 항체에 대한 접근을 어렵게 만든다. 정상 조직과 대조적 으로, CEA는 암 세포의 전체 표면에 걸쳐 발현되는 경향이 있다(문헌[Hammarstrom S., Semin Cancer Biol. 9(2):67-81 (1999)]). 이러한 발현 패턴의 차이는 CEA가 암 세포에서 항체 결합에 대해 접근 가능하도록 만든다. 또한, CEA 발현은 암 세포에서 증가한다. 또한, 증가된 CEA 발현은 증가된 세포간 부착을 촉진하고, 이는 전이를 야기할 수 있다(문헌[Marshall J., Semin Oncol., 30(a Suppl. 8):30-6, 2003]). 다양한 종양 독립체에서 CEA 발현의 유병률은 일반적으로 매우 높다. 공개된 데이터에 따라, 조직 샘플에서 수행된 자체 연구는 이의 매우 높은 유병률을 확인시켜주었고, 대장암(CRC)에서 약 95%, 췌장암에서 90%, 위암에서 80%, 비-소세포 폐암(NSCLC, 여기서, 이는 HER3와 공동-발현된다)에서 60%, 및 유방암에서 40%였고; 낮은 발현은 소세포 폐

암 및 교아종에서 관찰되었다.

[0102]

CEA는 용이하게 세포 표면으로부터 절단되고 직접 또는 림프관을 통해 종양으로부터 혈류 내로 떨어진다. 이러한 특성 때문에, 혈청 CEA의 수준은 암의 진단 및 암, 특히 대장암 재발의 스크리닝을 위한 임상적 마커로서 사용되어 왔다(문헌[Goldenberg D M., The International Journal of Biological Markers, 7:183-188, 1992]; [Chau I., et al., J Clin Oncol., 22:1420-1429, 2004]; [Flamini et al., Clin Cancer Res; 12(23):6985-6988, 2006]).

[0103]

"FolR1"이라는 용어는 폴레이트 수용체 알파를 지칭하며, 많은 암의 잠재적 예후 및 치료 표적으로서 확인되었다. 이는, 달리 지시되지 않는 한, 포유동물, 예컨대 영장류(예를 들어 인간), 비-인간 영장류(예를 들어 시노몰구스 원숭이) 및 설치류(예를 들어 마우스 및 래트)를 포함하는 임의의 척추동물 공급원으로부터의 임의의 천연 FolR1을 지칭한다. 인간 FolR1의 아미노산 서열은 유니프롯 등록번호 P15328(서열번호 126)에 나타나 있고, 뮤린 FolR1은 유니프롯 등록번호 P35846의 아미노산 서열(서열번호 127)을 가지며, 시노몰구스 FolR1은 유니프롯 등록번호 G7PR14에 나타낸 아미노산 서열(서열번호 128)을 갖는다. FolR1은 세포의 원형질 막 상에 발현되는 N-글리코실화된 단백질이다. FolR1은 풀산 및 여러 환원된 풀산 유도체에 대한 높은 친화도를 가지며, 생리학적 폴레이트(5-메틸테트라하이드로폴레이트)를 세포 내부로 전달하는 것을 조정한다. FOLR1은 FOLR1-유도된 암 요법에 대한 바람직한 표적인데, 이는 이것이 대다수의 난소암, 및 많은 자궁암, 자궁내막암, 췌장암, 신장암, 폐암 및 유방암에서 과발현되는 반면에, 정상 조직 상에서 FOLR1의 발현은 신장 근위 세뇨관, 폐의 폐포 세포, 방광, 고환, 맥락막망 및 갑상선의 상피 세포의 선단 막에 제한되기 때문이다. FolR1 발현이 삼중 음성 유방암에서 특히 높다는 최근 연구가 확인되었다(문헌[Necela et al. PLoS One 2015, 10(3), e0127133]).

[0104]

용어 "MCSP"는 흑색종-연관된 콘드로이틴 설레이트 프로테오글리칸(콘드로이틴 설레이트 프로테오글리칸4(CSPG4)로도 공지됨)을 지칭한다. 이는, 달리 지시되지 않는 한, 포유동물, 예컨대 영장류(예를 들어 인간), 비-인간 영장류(예를 들어 시노몰구스 원숭이) 및 설치류(예를 들어 마우스 및 래트)를 포함하는 임의의 척추동물로부터의 임의의 천연 FolR1을 지칭한다. 인간 MCSP의 아미노산 서열은 유니프롯 등록번호 Q6UVK1(서열번호 129)에 나타나 있다. MCSP는 세포 막 상에서 발현되는 N-연결된 280 kDa 당단백질 성분 및 450-kDa 콘드로이틴 설레이트 프로테오글리칸 성분으로 이루어진 고도로 글리코실화된 막 내재 콘드로이틴 설레이트 프로테오글리칸이다(문헌[Ross et al., Arch. Biochem. Biophys. 1983, 225:370-38]). MCSP는 많은 정상 세포 및 형질전환된 세포에 보다 넓게 분포된다. 특히, MCSP는 표피의 대부분 모든 기저 세포에서 발견되었다. MCSP는 흑색종 세포에서 상이하게 발현되고, 분석된 양성 모반 및 흑색종 중 90% 초과에서 발현된 것으로 밝혀졌다. 또한, MCSP는 기저 세포암을 포함하는 비멜라닌 세포 기원의 종양, 신경관 기원의 다양한 종양 및 유방암에서 발현되는 것으로 밝혀졌다.

[0105]

본원에 사용된 "T 세포 항원"은 T 림프구, 특히 세포 독성 T 림프구의 표면 상에 제시되는 항원 결정인자를 지칭한다.

[0106]

본원에 사용된 "T 세포 활성화 치료제"는 개체에서 T 세포 활성화를 유도할 수 있는 치료제, 특히 개체에서 T 세포 활성화를 유도하도록 설계된 치료제를 지칭한다. T 세포 활성화 치료제의 예는 활성화 T 세포 항원, 예컨대 CD3, 및 표적 세포 항원, 예컨대 CEA 또는 폴레이트 수용체에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체를 포함한다.

[0107]

본원에 사용된 "활성화 T 세포 항원"은 T 림프구, 특히 세포 독성 T 림프구에 의해 발현되는 항원 결정인자를 지칭하고, 이는 항원 결합 분자와의 상호작용시 T 세포 활성화를 유도하거나 증진시킬 수 있다. 구체적으로, 항원 결합 분자와 활성화 T 세포 항원의 상호작용은 T 세포 수용체 복합체의 신호전달 캐스케이드를 촉발시킴으로써 T 세포 활성화를 유도할 수 있다. 예시적 활성화 T 세포 항원은 CD3이다.

[0108]

"CD3"이라는 용어는, 달리 지시되지 않는 한, 포유동물, 예컨대 영장류(예를 들어 인간), 비-인간 영장류(예를 들어 시노몰구스 원숭이) 및 설치류(예를 들어 마우스 및 래트)를 포함하는 임의의 척추동물 공급원으로부터의 임의의 천연 CD3을 지칭한다. 상기 용어는 "전장"의 가공되지 않은 CD3, 및 세포에서 가공으로부터 야기되는 임의의 형태의 CD3을 포함한다. 또한, 상기 용어는 CD3의 자연 발생 변이체, 예를 들어 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포함한다. 한 실시양태에서, CD3은 인간 CD3, 특히 인간 CD3의 앱실론 서브유닛(CD3 ε)이다. 인간 CD3 ε의 아미노산 서열은 유니프롯(www.uniprot.org) 등록번호 P07766(버전 144), 또는 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_000724.1에 나타나 있다. 또한, 서열번호 130을 참조한다. 시노몰구스[*Macaca fascicularis*] CD3 ε의 아미노산 서열은 NCBI 유전자 읍행 번호 BAB71849.1에 나타나 있다. 또한, 서열번호 131을 참조한다.

[0109] "가변 영역" 또는 "가변 도메인"이란 용어는 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합에 관련된 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 천연 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인(각각 VH 및 VL)은 일반적으로 유사한 구조를 가지며, 이때 각 도메인은 4개의 보존된 골격 영역(FR) 및 3개의 초가변 영역(HVR)을 포함한다. 예를 들어 문헌[Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)]을 참조한다. 단일의 VH 또는 VL 도메인이 항원 결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다.

[0110] 본원에 사용되는 바와 같은 "초가변 영역" 또는 "HVR"이란 용어는 서열이 초가변성이고/하거나 구조적으로 한정된 루프("초가변 루프")를 형성하는 항체 가변 도메인의 각 영역을 지칭한다. 일반적으로, 천연의 4-쇄 항체는 6개의 HVR; VH 중 3개(H1, H2, H3) 및 VL 중 3개(L1, L2, L3)를 포함한다. HVR은 일반적으로 상기 초가변 루프로부터 및/또는 "상보성 결정 영역"(CDR)으로부터의 아미노산 잔기를 포함하며, 후자는 최고의 서열 가변성을 갖고/갖거나 항원 인식에 관련된다. 예시적인 초가변 루프는 아미노산 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), 및 96-101 (H3)에 존재한다. (문헌[Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]). 예시적인 CDR(CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, 및 CDR-H3)은 L1의 24-34, L2의 50-56, L3의 89-97, H1의 31-35B, H2의 50-65, 및 H3의 95-102의 아미노산 잔기에 존재한다. (문헌[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]). 초가변 영역(HVR)은 또한 상보성 결정 영역(CDR)을 지칭하며, 이를 용어는 상기 항원 결합 영역을 형성하는 가변 영역의 부분을 참조하여 본원에서 호환적으로 사용된다. 상기 특정한 영역은 문헌[Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983)] 및 문헌[Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]에 기재되었으며, 여기에서 정의는 서로에 대해 비교될 때 아미노산 잔기의 중복 또는 부분집합을 포함한다. 그럼에도 불구하고, 항체 또는 이의 변이체의 CDR을 지칭하기 위한 어느 한 정의의 적용은 본원에서 정의되고 사용되는 용어의 범위 내에 있도록 되어있다. 상기 인용된 각각의 참고문헌에 의해 정의되는 바와 같은 CDR을 포함하는 적합한 아미노산 잔기를 비교로서 하기 표 A에 제시한다. 특정한 CDR을 포함하는 정확한 잔기 숫자는 상기 CDR의 서열 및 크기에 따라 변할 것이다. 당분야의 숙련가는 어느 잔기가 상기 항체의 가변 영역 아미노산 서열을 제공한 특정한 CDR을 포함하는지를 통상적으로 결정할 수 있다.

[0111] [표 A]

[0112] CDR 정의¹

CDR	카바트	코티아(Chothia)	AbM ²
V _H CDR1	31-35	26-32	26-35
V _H CDR2	50-65	52-58	50-58
V _H CDR3	95-102	95-102	95-102
V _L CDR1	24-34	26-32	24-34
V _L CDR2	50-56	50-52	50-56
V _L CDR3	89-97	91-96	89-97

¹ 표 A의 모든 CDR 넘버링은 카바트 등에 의해 제시된 넘버링 법칙을 따른다(하기 참조).

² 표 A에 사용된 바와 같이 소문자 "b"를 갖는 "AbM"은 옥스포드 몰레큘러(Oxford Molecular)의 "AbM" 항체 모델링 소프트웨어에 의해 정의된 CDR을 지칭한다.

[0113] [0114] 카바트 등은 또한 임의의 항체에 적용할 수 있는 가변 영역 서열에 대한 넘버링 시스템을 한정한다. 당분야의 통상적인 숙련가는 상기 "카바트 넘버링" 시스템을 상기 서열 자체에서 벗어난 임의의 실험 데이터에 의존하지 않으면서 임의의 가변 영역 서열에 명확하게 할당할 수 있다. 본원에 사용되는 바와 같이, "카바트 넘버링"은 문헌[Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983)]에 제시된 넘버링 시스템을 지칭한다. 달리 명시되지 않는 한, 항체 가변 영역 중의 특정한 아미노산 잔기 위치의 넘버링에 대한 참조는 상기 카바트 넘버링 시스템에 따른다.

[0115] VH의 CDR1을 제외하고, CDR은 일반적으로 초가변 루프를 형성하는 아미노산 잔기를 포함한다. CDR은 또한 항원과 접촉하는 잔기인 "특이적 결정 잔기" 또는 "SDR"을 포함한다. SDR은 약기된-CDR, 또는 a-CDR이라 칭하는 CDR의 영역 내에 함유된다. 예시적인 a-CDR(a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2, 및 a-CDR-H3)은 L1의 31-34, L2의 50-55, L3의 89-96, H1의 31-35B, H2의 50-58, 및 H3의 95-102 아미노산 잔기에 존재한다. (문헌[Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)])을 참조한다). 달리 표시하지 않는 한, 가변 도메인의 HVR 잔기 및 다른 잔기(예를 들어 FR 잔기)를 본원에서 상기 카바트 등에 따라 넘버링한다.

[0116] 본원에 사용된 바와 같이, 항원 결합 분자(예를 들어, 항체)에 있어서 "친화도 성숙된"이란 용어는, 기준 항원

결합 분자로부터 예를 들어 돌연변이에 의해 유래된 항원 결합 분자가 기준 항체와 동일한 항원, 바람직하게는 동일한 에피토프에 결합하고, 기준 항원 결합 분자의 것보다 높은 항원에 대한 친화도를 갖는 것을 지칭한다. 친화도 성숙은 일반적으로 항원 결합 분자의 하나 이상의 CDR의 하나 이상의 아미노산 잔기의 변형을 포함한다. 전형적으로, 친화도 성숙된 항원 결합 분자는 초기 기준 항원 결합 분자와 동일한 에피토프에 결합한다.

[0117] "골격" 또는 "FR"은 초가변 영역(HVR) 잔기 이외의 가변 도메인 잔기를 지칭한다. 가변 도메인의 FR은 일반적으로 4개의 FR 도메인, 즉 FR1, FR2, FR3 및 FR4로 이루어진다. 따라서, 상기 HVR 및 FR 서열은 일반적으로 VH(또는 VL)에서 하기의 순서로 존재한다: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

[0118] 본원에 있어서 "수용자 인간 골격"은, 하기에 정의되는 인간 면역 글로불린 골격 또는 인간 컨센서스 골격으로부터 유래된 경쇄 가변 도메인(VL) 골격 또는 중쇄 가변 도메인(VH) 골격의 아미노산 서열을 포함하는 골격이다. 인간 면역 글로불린 골격 또는 인간 컨센서스 골격으로부터 "유래된" 수용자 인간 골격은 이의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 이는 아미노산 서열 변화를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 아미노산 변화의 수는 10 이하, 9 이하, 8 이하, 7 이하, 6 이하, 5 이하, 4 이하, 3 이하 또는 2 이하이다. 일부 실시양태에서, VL 수용자 인간 골격은 VL 인간 면역 글로불린 골격 서열 또는 인간 컨센서스 골격 서열에 대한 서열과 동일하다.

[0119] "키메라" 항체란 용어는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 공급원 또는 종으로부터 유래하는 반면 상기 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지는 상이한 공급원 또는 종으로부터 유래하는 항체를 지칭한다.

[0120] 항체의 "클래스"는 상기 항체의 중쇄가 갖는 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을 지칭한다. 항체의 5개의 주요 클래스, 즉 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하며, 이들 중 다수는 서브클래스(동형), 예를 들어 IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂로 추가로 세분될 수 있다. 면역 글로불린의 상이한 클래스에 상응하는 중쇄 불변 도메인을 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 라 칭한다.

[0121] "인간화된" 항체는 비-인간 HVR로부터의 아미노산 잔기 및 인간 FR로부터의 아미노산 잔기를 포함하는 키메라 항체를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 인간화된 항체는 하나 이상, 및 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이며, 여기에서 HVR(예를 들어 CDR)의 모두 또는 실질적으로 모두는 비-인간 항체의 것에 상응하며, FR의 모두 또는 실질적으로 모두는 인간 항체의 것에 상응한다. 인간화된 항체는 임의적으로 인간 항체로부터 유래된 항체 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 항체, 예를 들어 비-인간 항체의 "인간화된 형태"는 인간화를 겪은 항체를 지칭한다. 본 발명에 의해 포함되는 "인간화된 항체"의 다른 형태는 불변 영역이 원래 항체의 경우로부터 추가로 변형되거나 변화되어, 특히 Clq 결합 및/또는 Fc 수용체(FcR) 결합에 관하여 본 발명에 따른 성질을 생성시키는 것이다.

[0122] "인간" 항체는 인간 또는 인간 세포에 의해 생산되거나, 인간 항체 래퍼토리 또는 다른 인간 항체-암호화 서열을 사용하는 비-인간 공급원으로부터 유래된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 것이다. 인간 항체의 이러한 정의는 비-인간 항원 결합 잔기를 포함하는 인간화된 항체를 특별히 제외시킨다.

[0123] 본원에서 "Fc 도메인" 또는 "Fc 영역"이란 용어는 불변 영역의 적어도 일부를 함유하는 항체 중쇄의 C-말단 영역을 한정하는 데 사용된다. 상기 용어는 천연 서열 Fc 영역 및 변형 Fc 영역을 포함한다. IgG Fc 영역은 IgG CH2 및 IgG CH3 도메인을 포함한다. 인간 IgG Fc 영역의 "CH2 도메인"은 대개 약 231번 위치의 아미노산 잔기로부터 약 340번 위치의 아미노산 잔기까지 연장된다. 하나의 실시양태에서, 탄수화물 쇄가 CH2 도메인에 부착된다. 본원에서 CH2 도메인은 천연 서열 CH2 도메인 또는 변형 CH2 도메인일 수 있다. "CH3 도메인"은 Fc 영역의 CH2 도메인에 C-말단인 잔기의 신장부(즉 IgG의 약 341번 위치의 아미노산 잔기로부터 약 447번 위치의 아미노산 잔기까지)를 포함한다. 본원에서 CH3 영역은 천연 서열 CH3 도메인 또는 변형 CH3 도메인(예를 들어 이의 하나의 쇄 중에 도입된 "돌기"("놉") 및 이의 다른 쇄 중에 도입된 상응하는 "공동"("홀")을 갖는 CH3 도메인)일 수 있다; 명백히 본 발명에 참고로 인용된 미국특허 제5,821,333호를 참조한다). 상기와 같은 변형 CH3 도메인을 사용하여 본원에 기재된 바와 같은 2개의 일치하지 않는 항체 중쇄의 이종 이량체화를 촉진할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 Cys226 또는 Pro230으로부터 상기 중쇄의 카복시-말단까지 연장된다. 그러나, 상기 Fc 영역의 C-말단 리신(Lys447)은 존재할 수도, 존재하지 않을 수도 있다. 본원에 달리 명시되지 않는 한, 상기 Fc 영역 또는 불변 영역의 아미노산 잔기의 넘버링은 문헌[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991]에 기재된 바와 같은 EU 넘버링 시스템(또한 EU 지수라 칭한다)에 따른다.

[0124] "놉-인투-홀" 기술은 예를 들어 미국특허 제5,731,168호; 미국특허 제7,695,936호; 문헌[Ridgway et al., Prot

Eng 9, 617-621 (1996)] 및 문헌[Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001)]에 기재되어 있다. 일반적으로, 상기 방법은 돌기가 이종이량체 형성을 촉진하고 동종이량체 형성을 방해하도록 공동 내에 위치할 수 있게 상기 돌기("놉")를 제1 폴리펩티드의 접촉면에 도입시키고 상응하는 공동("홀")을 제2 폴리펩티드의 접촉면에 도입시킴을 수반한다. 돌기는 제1 폴리펩티드의 접촉면으로부터의 작은 아미노산 측쇄를 보다 큰 측쇄(예를 들어 티로신 또는 트립토판)로 교체시킴으로써 구성된다. 상기 돌기와 동일하거나 유사한 크기의 보상 공동이, 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 것(예를 들어 알라닌 또는 트레오닌)으로 교체시킴으로써 제2 폴리펩티드의 접촉면에 생성된다. 돌기 및 공동을, 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을, 예를 들어 부위-특이적 돌연변이 유도에 의해 또는 웨პ티드 합성에 의해 변경시킴으로써 생산할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 놈 변형은 Fc 도메인의 2개 서브유닛 중 하나에 아미노산 치환 T366W를 포함하며, 홀 변형은 Fc 도메인의 2개 서브유닛 중 다른 하나에 아미노산 치환 T366S, L368A 및 Y407V를 포함한다. 추가의 특정한 실시양태에서, 놈 변형을 포함하는 Fc 도메인의 서브유닛은 아미노산 치환 S354C를 추가로 포함하고, 홀 변형을 포함하는 Fc 도메인의 서브유닛은 아미노산 치환 Y349C를 추가로 포함한다. 이들 2개의 시스테인 잔기의 도입은 Fc 영역의 2개 서브유닛 사이에 다이설파이드 가교를 형성시키고, 따라서 이량체를 더욱 안정화시킨다(문헌[Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)]).

[0125] "면역 글로불린의 Fc 영역과 동등한 영역"은 면역 글로불린의 Fc 영역의 천연 대립유전자 변이체뿐만 아니라, 치환, 부가 또는 결실을 생성시키지만 효과기 기능(예를 들어 항체-의존성 세포 세포독성)을 매개하는 면역 글로불린의 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 변경을 갖는 변이체를 포함한다. 예를 들어, 하나 이상의 아미노산을 생물학적 기능의 실질적인 상실 없이 면역 글로불린의 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단으로부터 결실시킬 수 있다. 상기와 같은 변이체를 활성에 대해 최소의 영향을 미치도록 당분야에 공지된 일반적인 법칙에 따라 선택할 수 있다(예를 들어 문헌[Bowie, J. U. et al., Science 247:1306-10 (1990)]을 참조한다).

[0126] "효과기 기능"이란 용어는, 항체 동형에 따라 변하는 항체의 Fc 영역에 기인할 수 있는 생물학적 활성을 지칭한다. 항체 효과기 기능의 예는 하기를 포함한다: Clq 결합 및 보체 의존적인 세포독성(CDC), Fc 수용체 결합, 항체-의존성 세포-매개된 세포독성(ADCC), 항체-의존성 세포 식작용(ADCP), 시토카인 분비, 항원 제시 세포에 의한 면역 복합체-매개된 항원 흡수, 세포 표면 수용체(예를 들어 B 세포 수용체)의 하향조절, 및 B 세포 활성화.

[0127] "활성화 Fc 수용체"는 항체의 Fc 영역에 의한 결합 후에 효과기 기능을 수행하도록 수용체-함유 세포를 자극하는 신호전달 사건을 유도하는 Fc 수용체이다. 활성화 Fc 수용체는 Fc γ RIIIa(CD16a), Fc γ RI(CD64), Fc γ RIIa(CD32), 및 Fc α RI(CD89)를 포함한다. 특정한 활성화 Fc 수용체는 인간 Fc γ RIIIa이다(UniProt 등록번호 P08637, 버전 141을 참조한다).

[0128] "펩티드 링커"란 용어는 하나 이상의 아미노산, 전형적으로 약 2 내지 20개의 아미노산을 포함하는 웨პ티드를 지칭한다. 웨პ티드 링커는 당분야에 공지되어 있거나 본원에 기재되어 있다. 적합한, 비-면역원성 링커 웨პ티드는 예를 들어 $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$ 또는 $G_4(SG_4)_n$ 웨პ티드 링커이며, 여기에서 "n"은 일반적으로 1 내지 10, 전형적으로 2 내지 4, 특히 2의 수이다, 즉 상기 웨პ티드는 GGGGS(서열번호 132), GGGGSGGGGS(서열번호 133), SGGGGSGGGG(서열번호 134) 및 GGGGSGGGGGGG(서열번호 135)로 이루어지는 군으로부터 선택될 뿐만 아니라 GSPGSSSSGS(서열번호 136), $(G_4S)_3$ (서열번호 137), $(G_4S)_4$ (서열번호 138), GSGSGSGS(서열번호 139), GSGSGNGS(서열번호 140), GGSGSGSG(서열번호 141), GGSGSG(서열번호 142), GGSG(서열번호 143), GGSGNGSG(서열번호 144), GGNGSGSG(서열번호 145) 및 GGNGSG(서열번호 146)를 포함한다. 특히 관심 웨პ티드 링커는 (G_4S) (서열번호 132), $(G_4S)_2$ (서열번호 133), $(G_4S)_3$ (서열번호 137) 및 $(G_4S)_4$ (서열번호 138)이다.

[0129] 본원 내에 사용된 바와 같은 "아미노산"이란 용어는 알라닌(3문자 코드: ala, 1문자 코드: A), 아르기닌(arg, R), 아스파라긴(asn, N), 아스파르트산(asp, D), 시스테인(cys, C), 글루타민(gln, Q), 글루탐산(glu, E), 글리신(gly, G), 히스티딘(his, H), 이소류신(ile, I), 류신(leu, L), 리신(lys, K), 메티오닌(met, M), 페닐알라닌(phe, F), 프롤린(pro, P), 세린(ser, S), 트레오닌(thr, T), 트립토판(trp, W), 티로신(tyr, Y), 및 발린(val, V)을 포함하는 천연 카복시 α-아미노산의 군을 나타낸다.

[0130] "융합된" 또는 "연결된"은 성분(예를 들어 폴리펩티드 및 4-1BBL의 엑토도메인)이 웨პ티드 결합에 의해, 직접적으로 또는 하나 이상의 웨პ티드 링커를 통해 결합됨을 의미한다.

[0131] 기준 폴리펩티드(단백질) 서열에 관한 "아미노산 서열 일치성 퍼센트(%)"는, 필요한 경우 최대의 서열 일치성 퍼센트를 성취하기 위해서, 및 상기 서열 일치성의 부분으로서 어떠한 보존적인 치환도 고려하지 않고, 서열을

정렬시킨고 갭을 도입한 후에, 기준 폴리펩티드 서열 중의 아미노산 잔기와 일치하는 후보 서열 중의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 아미노산 서열 일치성 퍼센트를 측정하기 위한 정렬은 당분야의 기술 내에 있는 다양한 방식으로, 예를 들어 공개적으로 입수할 수 있는 컴퓨터 소프트웨어, 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALGN, SAWI 또는 메그얼라인(Megalign)(DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 성취될 수 있다. 당분야의 숙련가는 서열을 정렬시키기에 적합한 매개변수, 예를 들어 비교하는 서열의 전체길이에 대해 최대의 정렬을 성취하기 위해 필요한 임의의 연산을 결정할 수 있다. 그러나, 본 발명의 목적을 위해서, 아미노산 서열 일치성%를 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 생성시킨다. 상기 ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제넨테크 인코포레이티드(Genentech, Inc.)에 의해 저술되었으며, 소스 암호는 미국 저작권 관청(미국 워싱턴 디씨 20559 소재)에 사용자 문서와 함께 제출되었다(이때 상기 코드는 미국 저작권 등록 번호 TXU510087로 등록되어 있다). 상기 ALIGN-2 프로그램은 미국 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 소재의 제넨테크 인코포레이티드로부터 공개적으로 입수할 수 있거나, 상기 소스 암호로부터 편집될 수 있다. 상기 ALIGN-2 프로그램을, 디지털 UNIX V4.0D를 포함하여, UNIX 실행 시스템상에서 사용하기 위해 편집해야 한다. 모든 서열 비교 매개변수는 상기 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되며 변하지 않는다. ALIGN-2를 아미노산 서열 비교를 위해 사용하는 경우에, 주어진 아미노산 서열 A의 주어진 아미노산 서열 B에의, 상기 B와의, 또는 상기 B에 대한 아미노산 서열 일치성%(이는 한편으로 주어진 아미노산 서열 B에, 상기 B와, 또는 상기 B에 대해 일정한 아미노산 서열 일치성%를 갖거나 포함하는 주어진 아미노산 서열 A로서 표현될 수 있다)를 하기와 같이 계산한다:

[0132] 100 x X/Y

[0133] 상기에서, X는 A 및 B의 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2의 정렬에서 상기 프로그램에 의해 일치성 합치로서 채점되는 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B 중 아미노산 잔기의 총수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우, A 대 B의 아미노산 서열 일치성%는 B 대 A의 아미노산 서열 일치성%와 동일하지 않음을 알 것이다. 달리 구체적으로 서술되지 않는 한, 본 발명에 사용된 모든 아미노산 서열 일치성% 값은 상기 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 사용하여 바로 앞의 단락에 개시된 바와 같이 획득된다.

[0134] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항원 결합 분자의 아미노산 서열 변이체가 고려된다. 예를 들어, 항원 결합 분자의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 항원 결합 분자의 아미노산 서열 변이체를, 상기 분자를 암호화하는 뉴클레오티드 서열에 적합한 변형을 도입시키거나, 펩티드 합성에 의해 생산할 수 있다. 상기와 같은 변형은 예를 들어 항체의 아미노산 서열로부터의 잔기의 결실 및/또는 서열 내로의 잔기의 삽입 및/또는 서열 내에서 잔기의 치환을 포함한다. 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합을 최종 구축물에 도달하도록 수행할 수 있으되, 최종 구축물은 목적하는 특징, 예를 들어 항원 결합성을 가져야 한다. 치환 돌연변이 유도를 위한 관심 부위는 HVR 및 골격(FR)를 포함한다. 보존적 치환을 표 B에서 "바람직한 치환"의 제목 하에 제공하고 아미노산 측쇄 클래스 (1) 내지 (6)을 참조하여 하기에 추가로 기재한다. 아미노산 치환을 관심 분자에 도입시키고 생성물을 목적하는 활성, 예를 들어 유지된/개선된 항원 결합, 감소된 면역 원성, 또는 개선된 ADCC 또는 CDC에 대해 선별할 수 있다.

[0135]

[표 B]

원래 잔기	예시적 치환	바람직한 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노 르류신	Leu
Leu (L)	노르류신; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노 르류신	Leu

[0136]

[0137] 아미노산을 공통 측쇄 성질에 따라 분류할 수도 있다:

[0138] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0139] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0140] (3) 산성: Asp, Glu;

[0141] (4) 염기성: His, Lys, Arg;

[0142] (5) 쇄 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro;

[0143] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[0144] 비-보존적인 치환은 이들 클래스 중 하나의 구성원을 또 다른 클래스에 대해 교환함을 수반할 것이다.

[0145] "아미노산 서열 변이체"란 용어는 모 항원 결합 분자(예를 들어 인간화된 항체 또는 인간 항체)의 하나 이상의 초가변 영역 잔기 중에 아미노산 치환이 존재하는 실질적인 변이체를 포함한다. 일반적으로, 추가의 연구를 위해 선택되는 상기 생성되는 변이체는 모 항원 결합 분자에 비해 몇몇 생물학적 특성(예를 들어 증가된 친화도, 감소된 면역원성)의 변형(예를 들어 개선)을 갖고/갖거나, 상기 모 항원 결합 분자의 몇몇 생물학적 특성을 실질적으로 유지할 것이다. 예시적인 치환 변이체는 친화도 성숙된 항체이며, 이는 편의상 예를 들어 파지 디스플레이-기반 친화도 성숙 기법, 예를 들어 본 발명에 개시된 것을 사용하여 생산될 수 있다. 간단히, 하나 이상의 CDR 잔기를 돌연변이시키고 변이체 항원 결합 분자를 파지상에 표시하고 특정한 생물학적 활성(예를 들어 결합 친화도)에 대해 선별한다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실이, 상기와 같은 변경이 항원에 결합하는 항원 결합 분자의 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 한, 하나 이상의 CDR 내에서 발생할 수 있다. 예를 들어, 결합 친화도를 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경(예를 들어 본 발명에 제공되는 바와 같은 보존적 치환)을 CDR에서 수행할 수 있다. 돌연변이 유도를 위해 표적화될 수 있는 항체의 잔기 또는 영역의 확인에 유용한 방법을 문헌[Cunningham and Wells(1989) Science 244: 1081-1085]에 기재된 바와 같이 "알라닌 주사 돌연변이 유도"라 칭한다. 상기 방법에서, 표적 잔기(예를 들어 하전된 잔기, 예를 들어 Arg, Asp, His, Lys 및 Glu)의 잔기 또는 기가 확인되며 이들을, 항원과 항체와의 상호작용이 영향을 받는지를 측정하기 위해 중성 또는 음으로 하전된 아미노산(예를 들어 알라닌 또는 폴리알라닌)에 의해 치환시킨다. 추가의 치환을 상기 아미노산 위치에 도입시켜 초기 치환에 대한 기능적 민감성을 입증할 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 상기 항원-항원 결합 분자 복합체의 결정 구조는 항체와 항원 사이의 접촉점을 확인한다. 이러한 접촉 잔기 및 이웃

하는 잔기는 치환용 후보로서 표적화되거나 제거될 수 있다. 변이체를, 상기 변이체는, 목적하는 성질을 함유하는지를 측정하기 위해서 선별될 수 있다.

[0146] 아미노산 서열 삽입은 하나의 잔기에서부터 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드까지의 길이 범위에 이르는 아미노- 및/또는 카복시-말단 융합뿐만 아니라 단일 또는 다수 아미노산 잔기의 서열 내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항원 결합 분자를 포함한다. 상기 분자의 다른 삽입 변이체는 항원 결합 분자의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드에 대한 N- 또는 C-말단에의 융합을 포함한다.

[0147] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항원 결합 분자는 상기 항체가 글리코실화되는 정도를 증가시키거나 감소시킬도록 변경된다. 상기 분자의 글리코실화 변이체를 편의상, 하나 이상의 글리코실화 부위가 생성되거나 제거되도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 획득할 수 있다. 항원 결합 분자가 Fc 영역을 포함하는 경우, 상기에 부착된 탄수화물을 변경시킬 수 있다. 포유동물 세포에 의해 생산된 천연 항체는 전형적으로 상기 Fc 영역의 CH₂ 도메인의 Asn297에 N-결합에 의해 일반적으로 부착되는 분자된, 이중축각 올리고사카라이드를 포함한다. 예를 들어 문헌[Wright et al. TIBTECH 15:26-32 (1997)]을 참조한다. 올리고사카라이드는 다양한 탄수화물, 예를 들어 만노스, N-아세틸 글루코스아민(GlcNAc), 갈락토스, 및 시알산뿐만 아니라 상기 이중축각 올리고사카라이드 구조의 "줄기" 중 GlcNAc에 부착된 퓨코스를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 분자에서 올리고사카라이드의 변형은 몇몇 개선된 특성을 갖는 변이체를 생산하기 위해 수행될 수도 있다. 하나의 양태에서, Fc 영역에 부착된(직접 또는 간접적으로) 퓨코스가 없는 탄수화물 구조를 갖는 항원 결합 분자의 변이체가 제공된다. 상기와 같은 퓨코실화 변이체는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 예를 들어 미국 특허 공보 제 US 2003/0157108(Presta, L.) 또는 US 2004/0093621(교와 하코 고교 캄파니 리미티드(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd))을 참조한다. 또한, 본 발명의 항원 결합 분자의 변이체는 이등분된 올리고사카라이드, 예를 들어 Fc 영역에 부착된 이중축각 올리고사카라이드가 GlcNAc에 의해 이등분된 것을 포함한다. 상기와 같은 변이체는 감소된 퓨코실화 및/또는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 예를 들어 WO 2003/011878(Jean-Mairet et al.); 미국특허 제6,602,684호(Umana et al.); 및 US 2005/0123546(Umana et al.)을 참조한다. Fc 영역에 부착된 올리고사카라이드 중에 하나 이상의 갈락토스 잔기를 갖는 변이체가 또한 제공된다. 상기와 같은 항체 변이체는 개선된 CDC 기능을 가질 수 있으며, 예를 들어 WO 1997/30087(Patel et al.); WO 1998/58964(Raju, S.); 및 WO 1999/22764(Raju, S.)에 개시되어 있다.

[0148] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항원 결합 분자의 시스테인 조작된 변이체, 예를 들어 상기 분자의 하나 이상의 잔기가 시스테인 잔기로 치환된 "티오MAb"를 생산하는 것이 바람직할 수 있다. 특정 실시양태에서, 치환된 잔기는 분자의 접근 가능한 부위에 존재한다. 이들 잔기를 시스테인으로 치환시킴으로써, 반응성 티올기가 항체의 접근 가능한 부위에 위치되며 이를 사용하여 본 발명에 추가로 개시된 바와 같이 항체를 다른 모이어티, 예컨대 약물 모이어티 또는 링커-약물 모이어티에 접합시켜 면역접합체를 생산할 수 있다. 특정 실시양태에서, 하기의 잔기 중 임의의 하나 이상을 시스테인으로 치환시킬 수도 있다: 경쇄의 V205(카바트 넘버링); 중쇄의 A118(EU 넘버링); 및 중쇄 Fc 영역의 S400(EU 넘버링). 시스테인 조작된 항원 결합 분자를 예를 들어 미국특허 제7,521,541호에 기재된 바와 같이 생산할 수 있다.

[0149] 특정 양태에서, 본원에 제공된 항원 결합 분자는 당분야에 공지되어 있고 용이하게 이용가능한 추가적 비-단백성 모이어티를 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 항체의 유도체화에 적합한 모이어티는 비제한적으로 수용성 중합체를 포함한다. 수용성 중합체의 비제한적인 예는 비제한적으로 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-다이옥솔란, 폴리-1,3,6-트라이옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산(단독중합체 또는 랜덤 공중합체), 및 텍스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸화된 폴리올(예를 들어, 글리세롤), 폴리비닐 알코올 및 이들의 혼합물을 포함한다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데하이드는 이의 수중 안정성 때문에 제조에서 유리점을 가질 수 있다. 중합체는 임의의 분자량의 것일 수 있고, 분자형이거나 비-분자형일 수 있다. 항체에 부착된 중합체의 수는 변할 수 있고, 하나 초과의 중합체가 부착되는 경우, 이는 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용된 중합체의 수 및/또는 유형은 개선해야 할 항체의 특정 특성 및 기능, 이중 특이적 항체 유도체가 한정된 조건 하에 요법에서 사용될 수 있는지 여부 등을 비제한적으로 포함하는 고려인자를 기반으로 결정될 수 있다. 또 다른 양태에서, 방사선에 노출시킴으로써 선택적으로 가열될 수 있는, 항체 및 비-단백성 모이어티의 접합체가 제공된다. 한 실시양태에서, 비-단백성 모이어티는 탄소 나노튜브이다(문헌 [Kam, N.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605]). 방사선은 임의의 파장의 것일 수 있고, 비제한적으로, 정상 세포에 유해하지 않으나 비-단백성 모이어티를 항체-비-단백성 모이어티 근위의 세포

가 사멸하는 온도로 가열하는 과정을 포함한다. 또 다른 양태에서, 본원에 제공된 4-1BBL-함유 항원 결합 분자의 면역 접합체가 수득될 수 있다. "면역 접합체"는, 비제한적으로 세포 독성제를 포함하는, 하나 이상의 이종 분자에 접합된 항체이다.

[0150] "폴리뉴클레오티드"란 용어는 단리된 핵산 분자 또는 구축물, 예를 들어 전령 RNA(mRNA), 바이러스-유래된 RNA 또는 플라스미드 DNA(pDNA)를 지칭한다. 폴리뉴클레오티드는 통상적인 포스포다이에스터 결합 또는 비-통상적인 결합(예를 들어 아미드 결합, 예컨대 펩티드 핵산(PNA)에서 발견되는 아미드 결합)을 포함할 수 있다. "핵산 분자"란 용어는 폴리뉴클레오티드에 존재하는 임의의 하나 이상의 핵산 분절, 예를 들어 DNA 또는 RNA 단편을 지칭한다.

[0151] "단리된" 핵산 분자 또는 폴리뉴클레오티드는 이의 천연 환경으로부터 제거된 핵산 분자, DNA 또는 RNA를 의미한다. 예를 들어, 본 발명의 목적을 위해 단리된 벡터 중에 함유된 폴리펩티드를 암호화하는 재조합 폴리뉴클레오티드가 고려된다. 단리된 폴리뉴클레오티드의 추가의 예는 이종 숙주 세포에서 유지된 재조합 폴리뉴클레오티드 또는 용액 중 정제된(부분적으로 또는 실질적으로) 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 단리된 폴리뉴클레오티드는 상기 폴리뉴클레오티드 분자를 통상적으로 함유하는 세포 중에 함유된 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하지만, 상기 폴리뉴클레오티드 분자는 염색체외에 존재하거나 이의 자연적인 염색체 위치와 상이한 염색체 위치에 존재한다. 단리된 RNA 분자는 본 발명의 생체내 또는 시험관내 RNA 전사물뿐만 아니라 양성 및 음성 가닥 형태, 및 이중-가닥 형태를 포함한다. 본 발명에 따른 단리된 폴리뉴클레오티드 또는 핵산은 합성적으로 생산된 분자를 추가로 포함한다. 또한, 폴리뉴클레오티드 또는 핵산은 프로모터, 리보솜 결합 부위 또는 전사 종결자와 같은 조절 요소일 수 있거나 프로모터, 리보솜 결합 부위 또는 전사 종결자와 같은 조절 요소를 포함할 수 있다.

[0152] 본 발명의 기준 뉴클레오티드 서열에 적어도, 예를 들어 95% "일치하는" 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산 또는 폴리뉴클레오티드는, 상기 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열이, 상기 폴리뉴클레오티드 서열이 상기 기준 뉴클레오티드 서열의 각 100 뉴클레오티드당 5개 이하의 점 돌연변이를 포함할 수 있음을 제외하고, 상기 기준 서열과 일치함을 의미한다. 즉, 기준 뉴클레오티드 서열에 적어도 95% 일치하는 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 수득하기 위해서, 상기 기준 서열 중 뉴클레오티드의 5% 이하를 결실시키거나 또 다른 뉴클레오티드로 치환하거나 상기 기준 서열 중 전체 뉴클레오티드의 5% 이하의 뉴클레오티드의 수를 상기 기준 서열 내에 삽입할 수 있다. 기준 서열의 이러한 변경은 기준 서열의 잔기들간에 개별적으로 또는 기준 서열 내 하나 이상의 연속적인 그룹 중에 산재된, 상기 기준 뉴클레오티드 서열의 5' 또는 3' 말단 위치 또는 상기 말단 위치 사이의 어디에서나 발생할 수 있다. 실용적인 문제로서, 임의의 특정한 폴리뉴클레오티드 서열이 본 발명의 뉴클레오티드 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 일치하는지의 여부는 통상적으로 공지된 컴퓨터 프로그램, 예를 들어 폴리펩티드에 대해 상기 논의된 것(예를 들어 ALIGN-2)을 사용하여 측정될 수 있다.

[0153] "발현 카세트"란 용어는 표적 세포에서 특정 핵산의 전사를 허용하는 일련의 명시된 핵산 요소와 함께 재조합적으로 또는 합성적으로 생성되는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 재조합 발현 카세트를 플라스미드, 염색체, 미토콘드리아 DNA, 플라스미드 DNA, 바이러스 또는 핵산 단편에 통합시킬 수 있다. 전형적으로, 발현 벡터의 재조합 발현 카세트 부분은 다른 서열 중에서도 전사되는 핵산 서열 및 프로모터를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 발현 카세트는 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자 또는 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0154] "벡터" 또는 "발현 벡터"란 용어는 "발현 구축물"과 유의어이며 특정한 유전자를 상기가 표적 세포와 작동적으로 관련되도록 도입시키고 이의 발현을 지시하는 데 사용되는 DNA 분자를 지칭한다. 상기 용어는 자기-복제 핵산 구조물로서 벡터뿐만 아니라 상기 벡터가 도입된 숙주 세포의 계놈 내에 통합된 벡터를 포함한다. 본 발명의 발현 벡터는 발현 카세트를 포함한다. 발현 벡터는 다량의 안정한 mRNA의 전사를 허용한다. 일단 상기 발현 벡터가 표적 세포 내에 있으면, 상기 유전자에 의해 암호화되는 리보핵산 분자 또는 단백질이 상기 세포 전사 및/또는 번역 기구에 의해 생성된다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 발현 벡터는 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자 또는 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다.

[0155] "숙주 세포", "숙주 세포주" 및 "숙주 세포 배양물"이란 용어는 호환적으로 사용되며 상기와 같은 세포의 자손을 포함하여, 외인성 핵산이 도입된 세포를 지칭한다. 숙주 세포는 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"를 포함하며, 이들은 계대의 수와 상관 없이 1차 형질전환된 세포 및 이로부터 유래된 자손을 포함한다. 자손은 모 세포와 핵산 함량이 완전히 동일할 필요는 없으나, 돌연변이를 함유할 수도 있다. 원래 형질전환된 세포에 대해

선별되거나 선택된 바와 동일한 기능 또는 생물 활성을 갖는 돌연변이 자손은 본 발명에 포함된다. 숙주 세포는 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자를 생산하는 데 사용될 수 있는 임의의 유형의 세포 시스템이다. 숙주 세포는 배양된 세포, 예를 들어 몇가지 언급하자면, 포유동물 배양된 세포, 예를 들어 CHO 세포, BHK 세포, NS0 세포, SP2/0 세포, YO 골수종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포 또는 하이브리도마 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 및 식물 세포를 포함하나, 또한 트랜스제닉 동물, 트랜스제닉 식물 또는 배양된 식물 또는 동물 조직 내에 포함된 세포를 포함한다.

[0156] 제제의 "유효량"은 제제가 투여되는 세포 또는 조직에서 생리학적 변화를 생성시키기에 필요한 양을 지칭한다.

[0157] 본 발명에 따라 병용 요법은 상승작용성 효과를 갖는다. 2개의 화합물의 "상승작용성 효과"는 2개의 제제의 조합이 이들 각각의 효과의 합보다 크고 대조군 및 단일 약물과 통계상 상이한 것이다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 병용 요법은 부가적 효과를 갖는다. 2개의 화합물의 "부가적 효과"는 2개의 제제의 조합의 효과가 이들 개별적 효과의 합이고 대조군 및/또는 단일 약물과 통계상 상이한 것이다.

[0158] 제제, 예를 들어 약학 조성물의 "치료 유효량"은 필요한 투여량 및 기간 동안 목적하는 치료학적 또는 예방학적 결과를 성취하기에 유효한 양을 지칭한다. 제제의 치료 유효량은 예를 들어 질병의 부작용을 제거하거나 감소시키거나 지연시키거나 최소화하거나 방지한다.

[0159] "개체" 또는 "대상체"는 포유동물이다. 포유동물은 비제한적으로 가축(예를 들어 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류(예를 들어 인간 및 비인간 영장류, 예를 들어 원숭이), 토끼 및 설치류(예를 들어 마우스 및 래트)를 포함한다. 특히, 상기 개체 또는 대상체는 인간이다.

[0160] "약학 조성물"이란 용어는, 함유된 활성 성분의 생물학적 활성을 유효하게 하는 형태이고 제형이 투여되는 개체에게 허용되지 않는 독성인 추가적인 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다.

[0161] "약학적으로 허용되는 담체"는 활성 성분 외에, 개체에게 무독성인 약학 조성물의 성분을 지칭한다. 약학적으로 허용되는 부형제는 비제한적으로 완충제, 안정화제 또는 보존제를 포함한다.

[0162] "패키지 삽입물"은 치료 제품의 사용에 관한 적응증, 용법, 투여량, 투여, 복합 요법, 금기 및/또는 경고에 관한 정보를 함유하는, 치료 제품의 상업적인 패키지에 통상적으로 포함되는 설명서를 지칭하는 데 사용된다.

[0163] 본원에 사용된 바와 같이, "치료"(및 "치료하다" 및 "치료하는"과 같은 이의 문법상 어미변화)는 치료 중인 개인의 자연적인 과정을 변경시키고자 하는 임상적 중재를 지칭하며, 예방을 위해서 또는 임상적 병리 과정 동안 수행될 수 있다. 치료의 바람직한 효과는 비제한적으로 질병의 발생 또는 재발 방지, 증상의 완화, 상기 질병의 임의의 직접적이거나 간접적인 병리학적 결과의 감소, 전이 방지, 질병 진행 속도의 감소, 질병 상태의 개선 또는 완화, 및 진정 또는 개선된 예후를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 분자를 사용하여 질병의 발생을 지연시키거나 질병의 진행을 늦춘다.

[0164] 본원에 사용된 "암"이란 용어는 증식성 질병, 예컨대 고형 종양 또는 흑색종을 지칭한다.

본 발명에서 사용하기 위한 예시적 표적화된 OX40 작용제

[0166] 특히, 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체와 병용으로 사용되는, 표적화된 OX40 작용제는 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중 특이적 OX40 항체이다.

[0167] 특히, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체는 항-섬유아세포 활성화 단백질(FAP)/항-OX40 이중특이적 항체이다. 한 양태에서, 항-FAP/항-OX40 항체는 OX40 작용제이다. 한 양태에서, 항-FAP/항-OX40 항체는 Fc 도메인을 포함하는 항원 결합 분자이다. 특정 양태에서, 항-FAP/항-OX40 항체는, Fc γ 수용체 결합 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 변형을 갖는 Fc 도메인을 포함하는 항원 결합 분자이다. 종양-연관된 항원에 의한 가교결합은 특이적이지 않은 Fc γ R 매개된 가교결합을 피하는 것을 가능하게 하여 OX40 항체와 비교하여 보다 높고 보다 효과적인 투여량의 항-FAP/항-OX40 항체가 투여될 수 있다.

[0168] 한 양태에서, 본 발명은, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체를 제공하되, 여기서 상기 이중특이적 OX40 항체는 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체와 조합으로 사용되고, 상기 이중특이적 OX40 항체는 하기를 포함하는 FAP

에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다:

[0169] (a) (i) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h FAP), 및 (iv) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_l FAP), 또는

[0170] (b) (i) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h FAP), 및 (iv) 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_l FAP).

[0171] 추가적 양태에서, 본원 상기에 정의된 바와 같은, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체가 제공되되, 여기서 상기 이중특이적 OX40 항체는, 서열번호 7의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 중쇄 가변 영역(V_h FAP) 및 서열번호 8의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 경쇄 가변 영역(V_l FAP)을 포함하는 FAP에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인, 또는 서열번호 15의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 중쇄 가변 영역(V_h FAP) 및 서열번호 16의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 경쇄 가변 영역(V_l FAP)을 포함하는 FAP에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0172] 특정 양태에서, 이중특이적 OX40 항체는, 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h FAP) 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_l FAP)을 포함하는 FAP에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 또 다른 양태에서, 이중특이적 OX40 항체는, 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h FAP) 및 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_l FAP)을 포함하는 FAP에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0173] 추가적 양태에서, 본원 상기에 정의된 바와 같은, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체가 제공되되, 여기서 상기 이중특이적 OX40 항체는 하기를 포함하는 OX40에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다:

[0174] (a) (i) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h OX40), 및 (iv) 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_l OX40),

[0175] (b) (i) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h OX40), 및 (iv) 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_l OX40),

[0176] (c) (i) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h OX40), 및 (iv) 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_l OX40),

[0177] (d) (i) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h OX40), 및 (iv) 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi)

서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40),

[0178] (e) (i) 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HOX40), 및 (iv) 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40),

[0179] (f) (i) 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HOX40), 및 (iv) 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40), 또는

[0180] (g) (i) 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HOX40), 및 (iv) 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 39의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40).

[0181] 보다 특히, 이중특이적 OX40 항체는 하기를 포함하는 OX40에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다:

[0182] (a) (i) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HOX40), 및 (iv) 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40).

[0183] 추가적 양태에서, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체가 제공되며, 여기서 상기 이중특이적 OX40 항체는 하기를 포함하는 OX40에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다:

[0184] (a) 서열번호 40의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HOX40) 및 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40),

[0185] (b) 서열번호 42의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HOX40) 및 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40),

[0186] (c) 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HOX40) 및 서열번호 45의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40),

[0187] (d) 서열번호 46의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HOX40) 및 서열번호 47의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40),

[0188] (e) 서열번호 48의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HOX40) 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40),

[0189] (f) 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HOX40) 및 서열번호 51의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40), 또는

[0190] (g) 서열번호 52의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HOX40) 및 서열번호 53의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40).

[0191] 특정 양태에서, 이중특이적 OX40 항체는 하기를 포함하는 OX40에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원

결합 도메인을 포함한다:

[0192] (a) 서열번호 40의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 중쇄 가변 영역(V_HOX40) 및 서열번호 41의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 경쇄 가변 영역(V_LOX40).

[0193] 보다 특히, 이중특이적 OX40 항체는, 서열번호 40의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HOX40) 및 서열 번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LOX40)을 포함하는 OX40에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0194] 한 양태에서, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중 특이적 항체가 제공되되, 여기서 상기 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체는, 안정하게 회합할 수 있는 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인을 추가로 포함하는 항원 결합 분자이다. 특히, 이중특이적 OX40 항체는 IgG Fc 도메인, 구체적으로 IgG1 Fc 도메인 또는 IgG4 Fc 도메인을 포함하는 항원 결합 분자이다. 보다 특히, 이중특이적 OX40 항체는, Fc 수용체에 대한 결합 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 Fc 도메인을 포함하는 항원 결합 분자이다. 특정 양태에서, 이중특이적 OX40 항체는 아미노산 치환 L234A, L235A 및 P329G를 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 포함한다.

[0195] 본 발명의 또 다른 양태에서, 본원 상기에 기재된 바와 같은, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체가 제공되되, 여기서 상기 이중특이적 OX40 항체는 종양-연관된 표적에 대한 일가 결합 및 OX40에 대한 적어도 이가 결합을 포함한다. 한 양태에서, 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체는 종양-연관된 표적에 대한 일가 결합 및 OX40에 대한 이가 결합을 포함한다. 특정 양태에서, 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체는 종양-연관된 표적에 대한 일가 결합 및 OX40에 대한 사가 결합을 포함한다.

[0196] 또 다른 양태에서, 본 발명은, 본원 상기에 기재된 바와 같은, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체를 제공되되, 여기서 상기 이중특이적 OX40 항체는, CH1 도메인의 C-말단에서 OX40에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 Fab 단편의 VH 도메인에 융합된 OX40에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 Fab 단편, 및 CH1 도메인의 C-말단에서 OX40에 특이적으로 결합할 수 있는 제4 Fab 단편의 VH 도메인에 융합된 OX40에 특이적으로 결합할 수 있는 제3 Fab 단편을 포함한다.

[0197] 한 양태에서, 본원 상기에 기재된 바와 같은, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체가 제공되되, 여기서 상기 이중특이적 OX40 항체는 하기를 포함한다:

[0198] (i) 서열번호 54의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 55의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 56의 아미노산 서열을 포함하는 4개의 경쇄,

[0199] (ii) 서열번호 57의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 58의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 56의 아미노산 서열을 포함하는 4개의 경쇄,

[0200] (iii) 서열번호 59의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 60의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 56의 아미노산 서열을 포함하는 4개의 경쇄, 또는

[0201] (iv) 서열번호 61의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 62의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 56의 아미노산 서열을 포함하는 4개의 경쇄.

[0202] 하나의 특정한 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은, 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 특히 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체가 제공되되, 여기서 상기 이중특이적 OX40 항체는 서열번호 54의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 55의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 56의 아미노산 서열을 포함하는 4개의 경쇄를 포함한다.

[0203] 본 발명에서 사용하기 위한 예시적 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체

[0204] 본 발명은 표적화된 OX40 작용제, 및 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체와의 조합에서 이의 용도, 특히 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법, 보다 특히 고형 종양을 치료하거나 고형 종양의 진행을 지연시키는 방법에서 이의 용도에 관한 것이다. 특히, 종양-연관된 항원은 CEA이다. 본원에 사용된 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는, CD3에 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 CEA에 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체이다.

[0205] 따라서, 본원에 사용된 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는, 중쇄 가변 영역(V_H CD3) 및 경쇄 가변 영역(V_L CD3)을 포함하는 제1 항원 결합 도메인, 및 중쇄 가변 영역(V_H CEA) 및 경쇄 가변 영역(V_L CEA)을 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0206] 특정 양태에서, 조합으로 사용하기 위한 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는 서열번호 63의 CDR-H1 서열, 서열번호 64의 CDR-H2 서열 및 서열번호 65의 CDR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD3); 및/또는 서열번호 66의 CDR-L1 서열, 서열번호 67의 CDR-L2 서열 및 서열번호 68의 CDR-L3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD3)을 포함하는 제1 항원 결합 도메인을 포함한다. 보다 특히, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는, 서열번호 69의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 중쇄 가변 영역(V_H CD3)을 포함하는 제1 항원 결합 도메인 및/또는 서열번호 70의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 경쇄 가변 영역(V_L CD3)을 포함한다. 추가적 양태에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는 서열번호 69의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD3) 및/또는 서열번호 70의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD3)을 포함한다.

[0207] 한 양태에서, CD3에 특이적으로 결합하는 항체는 전장 항체이다. 한 양태에서, CD3에 특이적으로 결합하는 항체는 인간 IgG 클래스의 항체, 특히 인간 IgG₁ 클래스의 항체이다. 한 양태에서, CD3에 특이적으로 결합하는 항체는 항체 단편, 특히 Fab 분자 또는 scFv 분자, 보다 특히 Fab 분자이다. 특정 양태에서, CD3에 특이적으로 결합하는 항체는, Fab 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인 또는 불변 도메인이 교환된(즉, 서로 대체된) 크로스오버 Fab 분자이다. 한 양태에서, CD3에 특이적으로 결합하는 항체는 인간화된 항체이다.

[0208] 또 다른 양태에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는 하기를 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다:

[0209] (a) 서열번호 71의 CDR-H1 서열, 서열번호 72의 CDR-H2 서열 및 서열번호 73의 CDR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CEA), 및/또는 서열번호 74의 CDR-L1 서열, 서열번호 75의 CDR-L2 서열 및 서열번호 76의 CDR-L3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CEA), 또는

[0210] (b) 서열번호 79의 CDR-H1 서열, 서열번호 80의 CDR-H2 서열 및 서열번호 81의 CDR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CEA), 및/또는 서열번호 82의 CDR-L1 서열, 서열번호 83의 CDR-L2 서열 및 서열번호 84의 CDR-L3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CEA).

[0211] 보다 특히, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는, 서열번호 77의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 중쇄 가변 영역(V_H CEA) 및/또는 서열번호 78의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 경쇄 가변 영역(V_L CEA)을 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다. 추가적 양태에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는, 서열번호 77의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CEA) 및/또는 서열번호 78의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CEA)을 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다. 또 다른 양태에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는, 서열번호 85의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 중쇄 가변 영역(V_H CEA) 및/또는 서열번호 86의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 경쇄 가변 영역(V_L CEA)을 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다. 추가적 양태에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는, 서열번호 85의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CEA) 및/또는 서열번호 86의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CEA)을 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0212] 또 다른 특정 양태에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는 CEA에 결합하는 제3 항원 결합 도메인을 포함한다.

특히, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는 하기를 포함하는 제3 항원 결합 도메인을 포함한다:

- [0213] (a) 서열번호 71의 CDR-H1 서열, 서열번호 72의 CDR-H2 서열 및 서열번호 73의 CDR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h CEA), 및/또는 서열번호 74의 CDR-L1 서열, 서열번호 75의 CDR-L2 서열 및 서열번호 76의 CDR-L3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_l CEA), 또는
- [0214] (b) 서열번호 79의 CDR-H1 서열, 서열번호 80의 CDR-H2 서열 및 서열번호 81의 CDR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h CEA), 및/또는 서열번호 82의 CDR-L1 서열, 서열번호 83의 CDR-L2 서열 및 서열번호 84의 CDR-L3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_l CEA).
- [0215] 보다 특히, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는, 서열번호 77이 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 중쇄 가변 영역(V_h CEA) 및/또는 서열번호 78의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 경쇄 가변 영역(V_l CEA)을 포함하는 제3 항원 결합 도메인을 포함한다. 추가적 양태에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는, 서열번호 77의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h CEA) 및/또는 서열번호 78의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_l CEA)을 포함하는 제3 항원 결합 도메인을 포함한다. 또 다른 특정 양태에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는, 서열번호 85의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 중쇄 가변 영역(V_h CEA) 및/또는 서열번호 86의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 경쇄 가변 영역(V_l CEA)을 포함하는 제3 항원 결합 도메인을 포함한다. 추가적 양태에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는, 서열번호 85의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h CEA) 및/또는 서열번호 86의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_l CEA)을 포함하는 제3 항원 결합 도메인을 포함한다.
- [0216] 추가적 양태에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는, 제1 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인 또는 불변 도메인이 교환된 크로스-Fab 분자이고, 제2 및 제3(존재하는 경우) 항원 결합 도메인이 통상적 Fab 분자인, 이중특이적 항체이다.
- [0217] 또 다른 양태에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는, (i) 제2 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C-말단에서 제1 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N-말단에 융합되고, 제1 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제1 서브유닛의 N-말단에 융합되고, 제3 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제2 서브유닛의 N-말단에 융합되거나, (ii) 제1 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C-말단에서 제2 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N-말단에 융합되고, 제2 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제1 서브유닛의 N-말단에 융합되고, 제3 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제2 서브유닛의 N-말단에 융합되는, 이중특이적 항체이다.
- [0218] Fab 분자는 Fc 도메인에 또는 서로, 직접 또는 하나 이상의 아미노산, 전형적으로 약 2 내지 20개의 아미노산을 포함하는 웹티드 링커를 통해 융합될 수 있다. 웹티드 링커는 당분야에 공지되어 있고 본원에 기재되어 있다. 적합한 비-면역원성 웹티드 링커는 예를 들어 $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$, $(G_4S)_n$ 또는 $G_4(SG_4)_n$ 웹티드 링커를 포함한다. "n"은 일반적으로 1 내지 10, 전형적으로 2 내지 4의 정수이다. 한 실시양태에서, 상기 웹티드 링커는 5개 이상의 아미노산의 길이, 한 실시양태에서 5 내지 100개의 아미노산의 길이, 추가적 실시양태에서 10 내지 50개의 아미노산의 길이를 갖는다. 한 실시양태에서, 상기 웹티드 링커는 $(G_xS)_n$ 또는 $(G_xS)_nG_m$ 이 되, 여기서 G는 글리세린이고; S는 세린이고; x는 3이고, n은 3, 4, 5 또는 6이고, m은 0, 1, 2 또는 3이거나; x는 4이고, n은 2, 3, 4 또는 5이고, m은 0, 1, 2 또는 3이고, 한 실시양태에서 x는 4이고 n은 2 또는 3이고, 추가적 실시양태에서 x는 4이고 n은 2이다. 한 실시양태에서, 상기 웹티드 링커는 $(G_4S)_2$ 이다. 제1 및 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄를 서로 융합시키기에 특히 적합한 웹티드 링커는 $(G_4S)_2$ 이다. 제1 및 제2 Fab 단편의 Fab 중쇄를 연결시키기에 적합한 예시적 웹티드 링커는 서열 $(D)-(G_4S)_2$ 를 포함한다. 또 다른 적합한 상기 링커는 서열 $(G_4S)_4$ 를 포함한다. 또한, 링커는 면역 글로불린 헌지 영역(의 일부)을 포함할 수 있다. 특히, Fab 분자가 Fc 도메인 서브유닛의 N-말단에 융합되는 경우, 이는 면역 글로불린 헌지 영역 또는 이의 일부를 통해 추가적 웹티드 링커의 존재 또는 부재 하에 융합될 수 있다.
- [0219] 추가적 양태에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는, Fc 수용체에 대한 결합 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 Fc 도메인을 포함한다. 특히, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는 아미노

산 치환 L234A, L235A 및 P329G를 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 포함한다.

[0220] 특정 양태에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는, 서열번호 87의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 2개의 폴리펩티드, 서열번호 88의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 폴리펩티드, 서열 번호 89의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 폴리펩티드, 및 서열번호 90의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 폴리펩티드를 포함한다. 추가적 특정 실시양태에서, 이중특이적 항체는 서열번호 87의 2개의 폴리펩티드, 서열번호 88의 폴리펩티드, 서열번호 89의 폴리펩티드 및 서열번호 90의 폴리펩티드를 포함한다(CEA CD3 TCB).

[0221] 추가적 특정 양태에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는, 서열번호 91의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 2개의 폴리펩티드, 서열번호 92의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 폴리펩티드, 서열번호 93의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 폴리펩티드, 및 서열번호 94의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 폴리펩티드를 포함한다. 추가적 특정 실시양태에서, 이중특이적 항체는 서열번호 91의 2개의 폴리펩티드, 서열번호 92의 폴리펩티드, 서열번호 93의 폴리펩티드 및 서열번호 94의 폴리펩티드를 포함한다(CEACAM5 CD3 TCB).

[0222] 특정 이중특이적 항체가 WO 2014/131712 A1에 기재되어 있다.

[0223] 추가적 양태에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는 또한 이중특이적 T 세포 관여자(BiTET(등록상표))를 포함할 수 있다. 추가적 양태에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는 WO 2007/071426 또는 WO 2014/131712에 기재된 이중특이적 항체이다. 또 다른 양태에서, 이중특이적 항체는 MEDI565(AMG211)이다.

본 발명에서 사용하기 위한 예시적 항-Fo1R1/항-CD3 이중특이적 항체

[0225] 본 발명은 또한 항-Fo1R1/항-CD3 이중특이적 항체, 및 표적화된 OX40 작용제와의 조합에서 이의 용도, 특히 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법, 보다 특히 고형 종양을 치료하거나 고형 종양의 진행을 지연시키는 방법에서 이의 용도에 관한 것이다. 본원에 사용된 항-Fo1R1/항-CD3 이중특이적 항체는, CD3에 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 Fo1R1에 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체이다. 특히, 본원에 사용된 항-Fo1R1/항-CD3 이중특이적 항체는 Fo1R1에 결합하는 제3 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0226] 한 양태에서, T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체는, 중쇄 가변 영역(V_h CD3)을 포함하는 제1 항원 결합 도메인, 중쇄 가변 영역(V_h Fo1R1)을 포함하는 제2 항원 결합 도메인, 중쇄 가변 영역(V_h Fo1R1)을 포함하는 제3 항원 결합 도메인, 및 3개의 공통 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0227] 또 다른 양태에서, 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 95의 CDR-H1 서열, 서열번호 96의 CDR-H2 서열 및 서열번호 97의 CDR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h CD3)을 포함하고; 제2 항원 결합 도메인은 서열번호 98의 CDR-H1 서열, 서열번호 99의 CDR-H2 서열 및 서열번호 100의 CDR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h Fo1R1)을 포함하고; 제3 항원 결합 도메인은 서열번호 98의 CDR-H1 서열, 서열번호 99의 CDR-H2 서열 및 서열번호 100의 CDR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h Fo1R1)을 포함하고; 공통 경쇄는 서열번호 101의 CDR-L1 서열, 서열번호 102의 CDR-L2 서열 및 서열번호 103의 CDR-L3 서열을 포함한다. 또 다른 양태에서, 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 104의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h CD3)을 포함하고; 제2 항원 결합 도메인은 서열번호 105의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h Fo1R1)을 포함하고; 제3 항원 결합 도메인은 서열번호 105의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_h Fo1R1)을 포함하고; 공통 경쇄는 서열번호 106의 서열을 포함한다.

[0228] 특정 양태에서, 항-Fo1R1/항-CD3 이중특이적 항체는 서열번호 107의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열 번호 108의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 3개의 서열번호 109의 공통 경쇄를 포함한다.

본 발명에서 사용하기 위한 PD-L1/PD-1 상호작용 차단제

[0230] 본 발명의 한 양태에서, 표적화된 OX40 작용제, 특히 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체는 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에서 사용하기 위한 것으로서, 여기서 상기 표적화된 OX40 작용제는 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체, 특히 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체 또는 항-Fo1R1/항-CD3 이중특이적 항체와 조합으로 사용되고, 추가적으로 이는 PD-L1/PD-1 상호작용 차단제와 조합으로 사용된다. 한 양태에서, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 PD-L1 결합 길항체 또는 PD-1 결합 길항체이다. 특히, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 항-PD-L1

항체 또는 항-PD-1 항체이다.

[0231]

용어 "PD-L1"(CD274 또는 B7-H1로도 공지됨)은, 포유동물, 예컨대 영장류(예를 들어 인간), 비-인간 영장류(예를 들어 시노몰구스 원숭이) 및 설치류(예를 들어 마우스 및 래트)를 포함하는 임의의 척추동물 공급원으로부터의 임의의 천연 PD-L1, 특히 "인간 PD-L1"을 지칭한다. 완전한 인간 PD-L1의 아미노산 서열은 유니프롯(www.uniprot.org) 등록번호 Q9NZQ7(서열번호 110)에 나타나 있다. 용어 "PD-L1 결합 길항체"는, PD-L1과 이의 결합 파트너 중 하나 이상, 예컨대 PD-1 또는 B7-1의 상호작용으로부터 야기된 신호 전달을 감소시키거나 차단하거나 억제하거나 폐지하거나 간섭하는 분자를 지칭한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 길항체는 PD-L1이 PD-1 및/또는 B7-1에 결합하는 것을 억제한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 길항체는, 항-PD-L1 항체, 이의 항원 결합 단편, 면역 접합체, 융합 단백질, 올리고펩티드, 및 PD-L1과 이의 결합 파트너 중 하나 이상, 예컨대 PD-1 또는 B7-1의 상호작용으로부터 야기된 신호 전달을 감소시키거나 차단하거나 억제하거나 폐지하거나 간섭하는 다른 분자를 포함한다. 한 실시양태에서, PD-L1 결합 길항체는, 기능 장애성 T 세포를 덜 기능 장애성이도록 만들기 위해, PD-L1를 통해 신호 전달을 막개하는 T 림프구 상에서 발현되는 세포 표면 단백질에 의해 막개되거나 이를 통한 음성 공-자극 신호를 감소시킨다(예를 들어, 항원 인식에 대한 효과기 반응을 증진시킴). 특히, PD-L1 결합 길항체는 항-PD-L1 항체이다. 용어 "항-PD-L1 항체", "인간 PD-L1에 결합하는 항체" 또는 "인간 PD-L1에 특이적으로 결합하는 항체" 또는 "길항성 항-PD-L1"은, 1.0×10^{-8} mol/l 이하의 KD-값, 한 양태에서 1.0×10^{-9} mol/l 이하의 KD-값의 결합 친화도에 의해 인간 PD-L1 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 지칭한다. 결합 친화도는 표준 결합 분석, 예컨대 표면 플라스몬 공명 기술(비아코어(등록상표), 지이-헬쓰케어(GE-Healthcare, 스웨덴 옵살라 소재))에 의해 결정된다.

[0232]

특정 양태에서, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 항-PD-L1 항체이다. 구체적 양태에서, 항-PD-L1 항체는 아테졸리주맙(MPDL3280A, RG7446), 두르발루맙(MEDI4736), 아벨루맙(avelumab)(MSB0010718C) 및 MDX-1105로 이루어진 군으로부터 선택된다. 구체적 양태에서, 항-PD-L1 항체는 본원에 기재된 YW243.55 S70이다. 또 다른 특정 양태에서, 항-PD-L1 항체는 본원에 기재된 MDX-1105이다. 또 다른 특정 양태에서, 항-PD-L1 항체는 MEDI4736(두르발루맙)이다. 또 다른 추가적 양태에서, 항-PD-L1 항체는 MSB0010718C(아벨루맙)이다. 보다 특히, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 아테졸리주맙(MPDL3280A)이다. 또 다른 양태에서, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 서열번호 112의 중쇄 가변 도메인 VH(PDL-1) 및 서열번호 113의 경쇄 가변 도메인 VL(PDL-1)을 포함하는 항-PD-L1 항체이다. 또 다른 양태에서, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 서열번호 114의 중쇄 가변 도메인 VH(PDL-1) 및 서열번호 115의 경쇄 가변 도메인 VL(PDL-1)을 포함하는 항-PD-L1 항체이다.

[0233]

용어 "PD-1"(CD279, PD1 또는 프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1로도 공지됨)은, 포유동물, 예컨대 영장류(예를 들어 인간), 비-인간 영장류(예를 들어 시노몰구스 원숭이) 및 설치류(예를 들어 마우스 및 래트)를 포함하는 임의의 척추동물 공급원으로부터의 임의의 천연 PD-L1, 특히 유니프롯(www.uniprot.org) 등록번호 Q15116(서열 번호 111)에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 인간 단백질 PD-1을 지칭한다. 용어 "PD-1 결합 길항체"는 PD-1이 이의 리간드 결합 파트너에 결합하는 것을 억제하는 분자를 지칭한다. 일부 실시양태에서, PD-1 결합 길항체는 PD-L1에 대한 PD-1의 결합을 억제한다. 일부 실시양태에서, PD-1 결합 길항체는 PD-L1 및 PD-L2 둘 모두에 대한 PD-1의 결합을 억제한다. 특히, PD-L1 결합 길항체는 항-PD-L1 항체이다. 용어 "항-PD-1 항체", "인간 PD-1에 결합하는 항체", "인간 PD-1에 특이적으로 결합하는 항체" 또는 "길항성 항-PD-1"은, 1.0×10^{-8} mol/l 이하의 KD-값, 한 양태에서 1.0×10^{-9} mol/l 이하의 KD-값의 결합 친화도에 의해 인간 PD1 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 지칭한다. 결합 친화도는 표준 결합 분석, 예컨대 표면 플라스몬 공명 기술(비아코어(등록상표), 지이-헬쓰케어(스웨덴 옵살라 소재))에 의해 결정된다.

[0234]

한 양태에서, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 항-PD-1 항체이다. 구체적 양태에서, 항-PD-1 항체는 MDX 1106(니볼루맙), MK-3475(펩브롤리주맙), CT-011(피딜리주맙(pidilizumab)), MEDI-0680(AMP-514), PDR001, REGN2810 및 BGB-108로 이루어진 군으로부터, 특히 펩브롤리주맙 및 니볼루맙으로부터 선택된다. 또 다른 양태에서, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 서열번호 116의 중쇄 가변 도메인 VH(PD-1) 및 서열번호 117의 경쇄 가변 도메인 VL(PD-1)을 포함하는 항-PD-1 항체이다. 또 다른 양태에서, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 서열번호 118의 중쇄 가변 도메인 VH(PD-1) 및 서열번호 119의 경쇄 가변 도메인 VL(PD-1)을 포함하는 항-PD-1 항체이다.

[0235]

본 발명에서 사용하기 위한 이중특이적 항체의 생산

- [0236] 특정 양태에서, 조합으로 사용되는 치료제는 다중특이적 항체, 예를 들어 이중특이적 항체를 포함한다. 다중특이적 항체는 2개 이상의 상이한 부위에 대한 결합 특이성을 갖는 단클론 항체이다. 특정 양태에서, 결합 특이성은 상이한 항원에 대한 것이다. 특정 양태에서, 결합 특이성은 동일한 항원 상의 상이한 에피토프에 대한 것이다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편으로서 생산될 수 있다.
- [0237] 다중특이적 항체의 생산 기술은 비제한적으로 상이한 특이성을 갖는 2개의 면역 글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 재조합 공-발현[Milstein and Cuello, Nature 305: 537 (1983)], WO 93/08829 및 문헌[Traunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991)] 참조), 및 "늄-인-홀" 조작(예를 들어 US 5,731,168 참조)을 포함한다. 다중특이적 항체는, 정전기 스티어링 효과를 조작함으로써 항체 Fc-이중이량체 분자를 생산함(WO 2009/089004A1); 2개 이상의 항체 또는 단편을 가교결합시킴(예를 들어 US 4,676,980, 및 문헌[Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)] 참조); 류신 지퍼를 사용하여 이중특이적 항체를 생산함(예를 들어 문헌[Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)] 참조); 이중특이적 항체 단편을 생산하기 위한 "다이아바디(diabody)" 기술을 사용함(예를 들어 문헌[Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)] 참조); 단쇄 Fv(sFv) 이량체를 사용함(예를 들어 문헌[Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)] 참조); 및 예를 들어 문헌[Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991)]에 기재된 삼중특이적 항체를 생산함에 의해 생산될 수 있다.
- [0238] 3개 이상의 기능적 항원 결합 부위를 갖는 조작된 항체("옥토퍼스(Octopus) 항체"를 포함함)가 또한 본원에 포함된다(예를 들어 US 2006/0025576A1 참조).
- [0239] 본원에서 항체 또는 단편은 또한 2개의 상이한 항원에 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 "이중 작용 FAb" 또는 "DAF"를 포함한다(예를 들어 US 2008/0069820 참조). "Crossmab" 항체가 또한 본원에 포함된다(예를 들어 WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO2009/080253 또는 WO2009/080254 참조).
- [0240] 이중특이적 항체 단편을 생산하는 또 다른 기술은 "이중특이적 T 세포 관여자" 또는 BiTE(등록상표) 접근법이다(예를 들어 WO2004/106381, WO2005/061547, WO2007/042261 및 WO2008/119567 참조). 이러한 접근법은 단일 폴리펩티드 상에 배열된 2개의 항체 가변 도메인을 사용한다. 예를 들어, 단일 폴리펩티드 쇄는 2개의 단쇄 Fv(scFv) 단편을 포함하며, 각각은 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL) 도메인(이는 2개의 상기 도메인의 분자내 회합을 가능하게 하기에 충분한 길이의 폴리펩티드 링커에 의해 분리됨)을 갖는다. 이러한 단일 폴리펩티드는 2개의 scFv 단편 사이에 폴리펩티드 스페이서 서열을 추가로 포함한다. 각각의 scFv는 상이한 에피토프를 인식하고, 이들 에피토프는 상이한 세포 유형에 대해 특이적일 수 있어, 2개의 상이한 세포 유형의 세포는, 각각의 scFv가 이의 동족 에피토프에 관여할 때 근접하거나 매인다. 이러한 접근법의 하나의 특정 실시양태는 표적 세포, 예컨대 악성 또는 종양 세포에 의해 발현되는 세포-표면 항원을 인식하는 또 다른 scFv에 연결된, 면역 세포에 의해 발현되는 세포-표면 항원, 예를 들어 T 세포 상의 CD3 폴리펩티드를 인식하는 scFv를 포함한다.
- [0241] 단일 폴리펩티드이기 때문에, 이중특이적 T 세포 관여자는 당분야에 공지된 임의의 원핵 또는 진핵 세포 발현 시스템, 예를 들어 CHO 세포주를 사용하여 발현될 수 있다. 그러나, 특정 정제 기술(예를 들어 EP1691833 참조)이, 단량체성 이중특이적 T 세포 관여자를, 단량체의 의도된 활성 이외의 생물학적 활성을 가질 수 있는 다량체성 종으로부터 분리하는 데 필요할 수 있다. 하나의 예시적 정제 방법에서, 분비된 폴리펩티드를 함유하는 용액을 먼저 금속 친화도 크로마토그래피시키고, 폴리펩티드를 이미다졸 농도 구배에 의해 용리시킨다. 이러한 용리액은 음이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 추가로 정제되고, 폴리펩티드는 염화 나트륨 농도 구배에 의해 용리된다. 마지막으로, 이러한 용리액을 크기 배제 크로마토그래피시켜 단량체를 다량체성 종으로부터 분리한다. 한 양태에서, 본 발명에서 사용된 이중특이적 항체는, 웨이드 링커에 의해 서로 융합된 2개의 단쇄 FV 단편(scFV)을 포함하는 단일 폴리펩티드 쇄로 구성된다.
- [0242] **Fc 수용체 결합 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 Fc 도메인 변형**
- [0243] 본 발명의 항원 결합 분자의 Fc 도메인은, 면역 글로불린 분자의 중쇄 도메인을 포함하는 폴리펩티드 쇄의 쌍으로 이루어진다. 예를 들어, 면역 글로불린 G(IgG) 분자의 Fc 도메인은 이량체이고, 이의 각각의 서브유닛은 CH₂ 및 CH₃ IgG 중쇄 불변 도메인을 포함한다. Fc 도메인의 2개의 서브유닛은 서로 안정하게 회합할 수 있다.
- [0244] Fc 도메인은, 표적 조직에서의 양호한 축적 및 유리한 조직-혈액 분포비에 기여하는 긴 혈청 반감기를 포함하는 유리한 약동학적 특성을 본 발명의 항원 결합 분자에 부여한다. 그러나, 동시에, 이는 본 발명의 이중특이적 항체를 바람직한 항원-함유 세포보다는 Fc 수용체를 발현하는 세포에 바람직하지 않게 표적화시키는 것을 야기 할 수 있다. 따라서, 특정 양태에서, 본 발명의 항원 결합 분자의 Fc 도메인은, 천연 IgG1 Fc 도메인과 비교하

여, Fc 수용체에 대해 감소된 결합 친화도 및/또는 감소된 효과기 기능을 나타낸다. 한 양태에서, Fc는 실질적으로 Fc 수용체에 결합하지 않고/않거나 효과기 기능을 유도하지 않는다. 특정 양태에서, Fc 수용체는 Fc γ 수용체이다. 한 양태에서, Fc 수용체는 인간 Fc 수용체이다. 구체적 양태에서, Fc 수용체는 활성화 인간 Fc γ 수용체, 보다 구체적으로 인간 Fc γRIIIa, Fc γRI 또는 Fc γRIIa, 가장 구체적으로 인간 Fc γRIIIa이다. 한 양태에서, Fc 도메인은 효과기 기능을 유도하지 않는다. 감소된 효과기 기능은 비제한적으로 하기 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 감소된 보체 의존적 세포 독성(CDC), 감소된 항체 의존적 세포 매개된 세포 독성(ADCC), 감소된 항체 의존적 세포 식균 작용(ADCP), 감소된 시토카인 분비, 항원 제시 세포에 의한 감소된 면역 복합체 매개된 항원 흡수, NK 세포에 대한 감소된 결합, 대식세포에 대한 감소된 결합, 단핵구에 대한 감소된 결합, 다형 핵 세포에 대한 감소된 결합, 세포자멸을 유도하는 감소된 직접 신호 전달, 감소된 수지상 세포 성숙 또는 감소된 T 세포 프라이밍.

[0245] 특정 양태에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 본원에 제공된 항체의 Fc 영역 내로 도입되어 Fc 영역 변이체를 생산할 수 있다. Fc 영역 변이체는 하나 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형(예를 들어 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열(예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.

[0246] 특정 양태에서, 본 발명은, Fc 도메인이 Fc 수용체, 특히 Fc γ 수용체에 대한 결합을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 항체를 제공한다.

[0247] 한 양태에서, 본 발명의 항체의 Fc 도메인은 Fc 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합 친화도 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 포함한다. 전형적으로, 동일한 하나 이상의 아미노산 돌연변이는 Fc 도메인의 2개의 서브유닛 각각에 존재한다. 특히, Fc 도메인은 위치 E233, L234, L235, N297, P331 및 P329(EU 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함한다. 특히, Fc 도메인은 IgG 중쇄의 위치 234 및 235(EU 넘버링) 및/또는 329(EU 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함한다. 보다 특히, IgG 중쇄에 아미노산 치환 L234A, L235A 및 P329G("P329G LALA", EU 넘버링)을 갖는 Fc 도메인을 포함하는 본 발명에 따른 항체가 제공된다. 아미노산 치환 L234A 및 L235A는 소위 LALA 돌연변이를 지칭한다. 아미노산 치환의 "P329G LALA" 조합은 인간 IgG1 Fc 도메인의 Fc γ 수용체를 거의 완전히 폐지하고 WO 2012/130831 A1(이는 또한 이러한 돌연변이체 Fc 도메인의 생산 방법, 및 이의 특성, 예컨대 Fc 수용체 결합 또는 효과기 기능을 결정하는 방법을 기재함)에 기재되어 있다.

[0248] 또한, 감소된 Fc 수용체 결합 및/또는 효과기 기능을 갖는 Fc 도메인은 Fc 도메인 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329 중 하나 이상의 치환을 갖는 것을 포함한다(US 6,737,056). 이러한 Fc 돌연변이체는 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327 중 2개 이상에서의 치환을 갖는 Fc 돌연변이체(알라닌으로의 잔기 265 및 297의 치환을 갖는 "DANA" Fc 돌연변이체를 포함함)를 포함한다(US 7,332,581).

[0249] 또 다른 양태에서, Fc 도메인은 IgG4 Fc 도메인이다. IgG4 항체는, IgG1 항체와 비교하여, Fc 수용체에 대한 감소된 결합 친화도 및 감소된 효과기 기능을 나타낸다. 보다 특정한 양태에서, Fc 도메인은 위치 S228(Kabat 넘버링)에서 아미노산 치환, 특히 아미노산 치환 S228P를 포함하는 IgG4 Fc 도메인이다. 보다 특정한 양태에서, Fc 도메인은 아미노산 치환 L235E, S228P 및 P329G(EU 넘버링)를 포함하는 IgG4 Fc 도메인이다. 이러한 IgG4 Fc 도메인 돌연변이체 및 이의 Fc γ 수용체 결합 특성이 또한 WO 2012/130831에 기재되어 있다.

[0250] 돌연변이체 Fc 도메인은 당분야에 주지된 유전적 또는 화학적 방법을 사용하여 아미노산 결실, 치환, 삽입 또는 변형에 의해 생산될 수 있다. 유전적 방법은 암호화 DNA 서열의 부위-특이적 돌연변이 유발, PCR, 유전자 합성을 포함할 수 있다. 정확한 뉴클레오티드 변화는 예를 들어 서열분석에 의해 확인될 수 있다.

[0251] Fc 수용체에 대한 결합을 예를 들어 ELISA에 의해서 또는 비아코어 장비(지이 헬쓰케어)와 같은 표준 장비를 사용하는 표면 플라스몬 공명(SPR)에 의해서 쉽게 측정할 수 있으며 Fc 수용체 자체를 재조합 발현에 의해 수득할 수 있다. 대안적으로, Fc 수용체에 대한 Fc 도메인 또는 Fc 도메인을 포함하는 세포 활성화 항체의 결합 친화도를 특정한 Fc 수용체, 예를 들어 인간 NK 세포 발현 Fc γ IIIa 수용체를 발현하는 것으로 공지된 세포주를 사용하여 평가할 수 있다.

[0252] Fc 도메인, 또는 Fc 도메인을 포함하는 본 발명의 항체의 효과기 기능을 당분야에 공지된 방법에 의해 측정할 수 있다. ADCC를 측정하기에 적합한 분석은 본원에 기재되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 분석의 다른 예는 미국특허 제5,500,362호; 문헌[Hellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986)] 및 문헌[Hellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985)]; 미국특허 제5,821,337호; 문헌[Bruggemann et al., J Exp Med 166, 1351-1361 (1987)]에 기재되어 있다. 대안적으로, 비-방사성 분석 방법이 사용될 수 있다(예를 들어 유식 세포측정을 위한 ACTI(상표) 비-방사성 세포독성 분석(셀테

크놀로지 인코포레이티드(CellTechnology, Inc.) 미국 캘리포니아주 마운틴뷰 소재); 및 사이토톡스(CytoTox) 96(등록상표) 비-방사성 세포독성 분석(프로메가(Promega), 미국 위스콘신주 매디슨 소재)을 참조한다. 상기와 같은 분석에 유용한 효과기 세포는 말초 혈액 단핵세포(PBMC) 및 천연 살해(NK) 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 부가적으로, 상기 관심 분자의 ADCC 활성을 생체내에서, 예를 들어 문헌[Clynes et al., Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998)]에 개시된 바와 같은 동물 모델에서 평가할 수 있다.

[0253] 일부 양태에서, 보체 성분, 구체적으로 C1q에 대한 Fc 도메인의 결합은 감소된다. 따라서, Fc 도메인이 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작되는 일부 실시양태에서, 상기 감소된 효과기 기능은 감소된 CDC를 포함한다. C1q 결합 분석은 수행되어, 본 발명의 이중특이적 항체가 C1q에 결합할 수 있고 이에 따라 CDC 활성을 갖는지 결정된다. 예를 들어, WO 2006/029879 및 WO 2005/100402의 C1q 및 C3c 결합 ELISA를 참조한다. 보체 활성화를 평가하기 위해, CDC 분석을 수행할 수 있다(예를 들어 문헌[Gazzano-Santoro et al., J Immunol Methods 202, 163 (1996)]; [Cragg et al., Blood 101, 1045-1052 (2003)]; 및 [Cragg and Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004)] 참조).

[0254] 이중 이량체화를 촉진하는 Fc 도메인 변형

[0255] 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자는 상기 Fc 도메인의 2개의 서브유닛 중 하나 또는 다른 하나에 융합된 상이한 항원 결합 부위를 포함하며, 따라서, 상기 Fc 도메인의 2개의 서브유닛은 2개의 동일하지 않은 폴리펩티드 쇄 중에 포함될 수 있다. 이를 폴리펩티드의 재조합 공-발현 및 후속 이량체화는 상기 두 폴리펩티드의 다수의 가능한 조합을 도출한다. 따라서, 재조합체 생성에서 본 발명의 이항체의 수율 및 순도를 개선시키기 위해서, 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자의 Fc 도메인에 목적하는 폴리펩티드의 결합을 촉진하는 변형을 도입시키는 것이 유리할 것이다.

[0256] 따라서, 특정한 양태에서, 본 발명은 (a) 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인, (b) OX40에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인, 및 (c) 안정하게 회합할 수 있는 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인을 포함하는 이중특이적 항원 결합 분자에 관한 것으로서, 여기서 Fc 도메인은 Fc 도메인의 제1 및 제2 서브유닛의 회합을 촉진하는 변형을 포함한다. 인간 IgG Fc 도메인의 2개 서브유닛간의 가장 광범위한 단백질-단백질 상호작용 부위는 Fc 도메인의 CH3 도메인에 있다. 따라서, 하나의 양태에서, 상기 변형은 상기 Fc 도메인의 CH3 도메인에 있다.

[0257] 구체적 양태에서, 상기 변형은 소위 "놉-인투-홀" 변형으로, 상기 Fc 도메인의 2개의 서브유닛 중 하나에 "놉" 변형 및 상기 Fc 도메인의 2개의 서브유닛 중 다른 하나에 "홀" 변형을 포함한다. 따라서, 본 발명은 (a) 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인, (b) OX40에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인, 및 (c) 안정하게 회합할 수 있는 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인을 포함하는 항원 결합 분자에 관한 것으로서, 여기서 놉-인투-홀 방법에 따라 Fc 도메인의 제1 서브유닛은 놉을 포함하고 Fc 도메인의 제2 서브유닛은 홀을 포함한다. 특정한 양태에서, 상기 Fc 도메인의 제1 서브유닛은 아미노산 치환 S354C 및 T366W(EU 넘버링)를 포함하고 상기 Fc 도메인의 제2 서브유닛은 아미노산 치환 Y349C, T366S 및 Y407V(카바트 EU 지수에 따른 넘버링)를 포함한다.

[0258] 놉-인투-홀 기술은 예를 들어 미국특허 제5,731,168호; 미국특허 제7,695,936호; 문헌[Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996)] 및 문헌[Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001)]에 기재되어 있다. 일반적으로, 상기 방법은 돌기가 이중이량체 형성을 촉진하고 동종이량체 형성을 방해하도록 공동 내에 위치할 수 있게 상기 돌기("놉")를 제1 폴리펩티드의 접촉면에 도입시키고 상응하는 공동("홀")을 제2 폴리펩티드의 접촉면에 도입시킴을 수반한다. 돌기는 제1 폴리펩티드의 접촉면으로부터의 작은 아미노산 측쇄를 보다 큰 측쇄(예를 들어 티로신 또는 트립토판)로 교체시킴으로써 구축된다. 돌기와 동일하거나 유사한 크기의 보상 공동이, 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 것(예를 들어 알라닌 또는 트레오닌)으로 교체시킴으로써 제2 폴리펩티드의 접촉면에 생성된다.

[0259] 따라서, 하나의 양태에서, 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자의 Fc 도메인의 제1 서브유닛의 CH3 도메인에서 아미노산 잔기를 보다 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 교체시키고, 이에 의해 제2 서브유닛의 CH3 도메인 내의 공동에 위치할 수 있는 제1 서브유닛의 CH3 도메인 내에 돌기를 생성시키고, 상기 Fc 도메인의 제2 서브유닛의 CH3 도메인에서 아미노산 잔기를 보다 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 교체시키고, 이에 의해 제1 서브유닛의 CH3 도메인내의 돌기가 위치할 수 있는 제2 서브유닛의 CH3 도메인 내에 공동을 생성시킨다. 상기 돌기 및 공동은, 예를 들어 부위-특이적 돌연변이 유도에 의해서, 또는 웨이트 합성에 의해서 상기 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 변경시킴으로써 생산될 수 있다. 특정한 양태에서, 상기 Fc 도메인의 제1 서브유닛의

CH3 도메인에서 366번 위치의 트레오닌 잔기를 트립토판 잔기로 교체시키고(T366W), 상기 Fc 도메인의 제2 서브유닛의 CH3 도메인에서 407번 위치의 티로신 잔기를 발린 잔기로 교체시킨다(Y407V). 하나의 양태에서, 상기 Fc 도메인의 제2 서브유닛에서, 추가로 366번 위치의 트레오닌 잔기를 세린 잔기로 교체시키고(T366S) 368번 위치의 류신 잔기를 알라닌 잔기로 교체시킨다(L368A).

[0260] 또 다른 추가의 양태에서, Fc 도메인의 제1 서브유닛에서 추가로 354번 위치의 세린 잔기를 시스테인 잔기로 교체시키고(S354C), Fc 도메인의 제2 서브유닛에서 추가로 349번 위치의 티로신 잔기를 시스테인 잔기로 교체시킨다(Y349C). 이들 두 시스테인 잔기의 도입은 Fc 도메인의 2개 서브유닛간에 다이설파이드 가교를 형성시키며, 이는 상기 이량체를 추가로 안정화시킨다(문헌[Carter (2001), J Immunol Methods 248, 7-15]). 특정한 양태에서, Fc 도메인의 제1 서브유닛은 아미노산 치환 S354C 및 T366S(EU 넘버링)를 포함하고 Fc 도메인의 제2 서브유닛은 아미노산 치환 Y349C, T366S 및 Y407V(카바트 EU 지수에 따른 넘버링)를 포함한다.

[0261] 대안적 양태에서, Fc 도메인의 제1 및 제2 서브유닛의 결합을 촉진하는 변형은 예를 들어 WO 2009/089004에 기재된 바와 같은 정전기적 스티어링 효과를 매개하는 변형을 포함한다. 일반적으로, 상기 방법은 2개의 Fc 도메인 서브유닛의 접촉면에서, 하나 이상의 아미노산 잔기를 하전된 아미노산 잔기에 의해 교체시킴을 수반함으로써 동종이량체 형성을 정전기적으로 불리하게 되지만 이종 이량체화는 정전기적으로 유리하게 된다.

[0262] 본원에 보고된 바와 같은 이중특이적 항체의 중쇄의 C-말단은 아미노산 잔기 PGK로 종결되는 완전한 C-말단일 수 있다. 중쇄의 C-말단은 C-말단 아미노산 잔기 중 하나 또는 2개가 제거된 단축된 C-말단일 수 있다. 하나의 바람직한 양태에서, 중쇄의 C-말단은 PG로 종결되는 단축된 C-말단이다. 본원에 보고된 바와 같은 모든 양태 중 하나의 양태에서, 본원에 명시된 바와 같은 C-말단 CH3 도메인을 포함하는 중쇄를 포함하는 이중특이적 항체는 C-말단 글리신-리신 다이펩티드(G446 및 K447, 카바트 EU 지수에 따른 넘버링)를 포함한다. 본원에 보고된 바와 같은 모든 양태 중 하나의 실시양태에서, 본원에 명시된 바와 같은 C-말단 CH3 도메인을 포함하는 중쇄를 포함하는 이중특이적 항체는 C-말단 글리신 잔기(G446, 카바트 EU 지수에 따른 넘버링)를 포함한다.

Fab 도메인의 변형

[0264] 한 양태에서, 본 발명은, VH 및 VL의 가변 도메인 또는 CH1 및 CL의 불변 도메인이 교환된, 하나 이상의 Fab 단편을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것이다. 이중특이적 항체는 Crossmab 기술에 따라 생산된다.

[0265] 하나의 결합 아암에 도메인 교체/교환을 갖는 다중특이적 항체(CrossMabVH-VL 또는 CrossMabCH-CL)가 WO 2009/080252 및 문헌[Schaefer, W. et al., PNAS, 108 (2011) 11187-11191]에 상세히 기재되어 있다. 이는 제1 항원에 대한 경쇄와 제2 항원에 대한 틀린 중쇄와의 오합치에 의해 야기되는 부산물을 명백히 감소시킨다(상기와 같은 도메인 교환이 없는 접근법에 비해).

[0266] 한 양태에서, 본 발명은, 불변 도메인 CL 및 CH1이 서로 대체되어, CH1 도메인이 경쇄의 부분이고, CL 도메인이 중쇄의 부분인, Fab 단편을 포함하는 이중특이적 항원 결합 분자에 관한 것이다.

[0267] 또 다른 양태에서, 본 발명은, 가변 도메인 VL 및 VH이 서로 대체되어, VH 도메인이 경쇄의 부분이고, VL 도메인이 중쇄의 부분인, Fab 단편을 포함하는 이중특이적 항원 결합 분자에 관한 것이다.

[0268] 또 다른 양태에서, 정확한 페어링을 추가로 개선하기 위해, 이중특이적 항원 결합은 상이한 하전된 아미노산 치환(소위 "하전된 잔기")를 함유할 수 있다. 이들 변형은 교차되거나 교차되지 않은 CH1 및 CL 도메인에 도입될 수 있다. 특정 양태에서, 본 발명은, 위치 123(EU 넘버링)의 아미노산이 아르기닌(R)으로 대체되고, 위치 124(EU 넘버링)의 아미노산이 리신(K)으로 치환되고, CH1 도메인 중 하나에서 위치 147(EU 넘버링) 및 위치 213(EU 넘버링)의 아미노산이 글루탐산(E)으로 치환된, 이중특이적 항원 결합 분자에 관한 것이다.

폴리뉴클레오티드

[0270] 본 발명은 본원에 기재된 항체 또는 이의 단편을 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 추가로 제공한다.

[0271] 본 발명의 항체를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 전체 항원 결합 분자를 암호화하는 단일 폴리뉴클레오티드로서 또는 공-발현되는 다수의(예를 들어 2개 이상의) 폴리뉴클레오티드로서 발현시킬 수 있다. 공-발현되는 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 폴리펩티드는 예를 들어 다이설파이드 결합 또는 다른 수단을 통해 회합하여 기능성 항원 결합 분자를 형성시킬 수 있다. 예를 들어, 면역 글로불린의 경쇄 부분은 상기 면역 글로불린의 중쇄 부분으로부터 별도의 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화될 수 있다. 공-발현시, 상기 중쇄 폴리펩티드는 상기 경쇄 폴리펩티드와 회합하여 면역 글로불린을 형성할 것이다.

- [0272] 일부 양태에서, 단리된 폴리뉴클레오티드는 본원에 기재된 본 발명에 따른 전체 항체를 암호화한다. 다른 실시 양태에서, 단리된 폴리뉴클레오티드는 본원에 기재된 본 발명에 따른 항체에 포함되는 폴리펩티드를 암호화한다.
- [0273] 특정 실시양태에서, 상기 폴리뉴클레오티드 또는 핵산은 DNA이다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 RNA, 예를 들어 전령 RNA(mRNA)의 형태의 RNA이다. 본 발명의 RNA는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다.
- [0274] **제조합 방법**
- [0275] 본 발명에 사용된 이중특이적 항체는 예를 들어 고상 웨프티드 합성(예를 들어 메리필드(Merrifield) 고상 합성) 또는 재조합 생산에 의해 수득할 수 있다. 재조합체 생산을 위해서 예를 들어 상기에 기재된 바와 같이 항체를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 또는 이의 폴리펩티드 단편은 단리되고, 숙주 세포에서 추가적 클로닝 및/또는 발현을 위해 하나 이상의 벡터 내로 삽입된다. 이러한 폴리뉴클레오티드는 종래의 절차를 사용하여 용이하게 단리되고 서열분석될 수 있다. 본 발명의 하나의 양태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 중 하나 이상을 포함하는 벡터, 바람직하게는 발현 벡터를 제공한다. 당분야의 숙련가에게 주지된 방법을 사용하여 적합한 전사/번역 조절 신호와 함께 상기 항체(단편)의 암호화 서열을 함유하는 발현 벡터를 구축할 수 있다. 상기 방법은 시험관내 재조합 DNA 기법, 합성 기법 및 생체내 재조합/유전자 재조합을 포함한다. 예를 들어 문헌 [Maniatis et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989)]; 및 문헌[Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)]에 기재된 기법을 참조한다. 발현 벡터는 플라스미드, 바이러스의 부분 또는 핵산 단편일 수 있다. 상기 발현 벡터는 발현 카세트를 포함하며, 카세트 내로 항체 또는 이의 폴리펩티드 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드(즉 암호화 영역)가 프로모터 및/또는 다른 전사 또는 번역 조절 요소와 함께 작동 가능하게 회합되어 클로닝된다. 본원에 사용되는 바와 같이, "암호화 영역"은 아미노산으로 번역된 코돈으로 이루어지는 핵산의 일부이다. "정지 코돈"(TAG, TGA 또는 TAA)은 아미노산으로 번역되지 않지만, (존재하는 경우) 암호화 영역의 부분인 것으로 간주될 수 있고, 임의의 인접 서열, 예를 들어 프로모터, 리보솜 결합 부위, 전사 종결자, 인트론, 5' 및 3' 번역되지 않은 영역 등은 암호화 영역의 부분이 아니다. 2개 이상의 암호화 영역이 단일 폴리뉴클레오티드 구축물에, 예를 들어 단일 벡터 상에, 또는 별도의 폴리뉴클레오티드 구축물에, 예를 들어 별도의(상이한) 벡터 상에 존재할 수 있다. 더욱 또한, 임의의 벡터는 단일 암호화 영역을 함유하거나 2개 이상의 암호화 영역을 포함할 수 있고, 예를 들어 본 발명의 벡터는 하나 이상의 폴리펩티드를 암호화할 수 있으며, 이는 단백질 분해 절단을 통해 최종 단백질로 번역-후 또는 번역과 함께 분리된다. 또한, 본 발명의 벡터, 폴리뉴클레오티드 또는 핵산은 본 발명의 항체 또는 이의 폴리펩티드 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 또는 이의 변이체 또는 유도체에 융합되거나 융합되지 않은 이중 암호화 영역을 암호화할 수 있다. 이중 암호화 영역은 비제한적으로 전문화된 요소 또는 모티프, 예를 들어 분비 신호 웨프티드 또는 이중 기능성 도메인을 포함한다. 작동성 회합은 유전자 산물의 암호화 영역, 예를 들어 폴리펩티드가, 상기 유전자 산물의 발현을 조절 서열의 영향 또는 통제 하에 두는 방식으로 하나 이상의 조절 서열과 회합하는 경우이다. 2개의 DNA 단편(예를 들어 폴리펩티드 암호화 영역 및 상기와 회합된 프로모터)은 프로모터 기능의 유도가 목적하는 유전자 산물을 암호화하는 mRNA의 전사를 생성시키고 상기 두 DNA 단편간의 결합의 성질이 유전자 산물의 발현을 지시하는 발현 조절 서열의 능력을 방해하지 않거나 DNA 주형이 전사되는 능력을 방해하지 않는 경우 "작동적으로 회합된다". 따라서, 프로모터 영역은 프로모터가 핵산의 전사를 실행할 수 있는 경우 폴리펩티드를 암호화하는 핵산과 작동적으로 회합될 것이다. 프로모터는 오직 예정된 세포에서만 DNA의 실질적인 전사를 지시하는 세포-특이적 프로모터일 수 있다. 프로모터 외에, 다른 전사 조절 요소, 예를 들어 인핸서, 오퍼레이터, 리프레서, 및 전사 종결 신호가 폴리뉴클레오티드와 작동적으로 회합되어 세포-특이적 전사를 지시할 수 있다.
- [0276] 적합한 프로모터 및 다른 전사 조절 영역을 본원에 개시한다. 다양한 전사 조절 영역이 당분야의 숙련가에게 공지되어 있다. 여기에는 비제한적으로 척추동물 세포에서 기능하는 전사 조절 영역, 예를 들어 비제한적으로 거대세포 바이러스로부터의 프로모터 및 인핸서 분절(예를 들어 인트론-A와 함께, 전초기 프로모터), 유인원 바이러스 40(예를 들어 초기 프로모터), 및 레트로바이러스(예를 들어 라우스 육종 바이러스)를 포함한다. 다른 전사 조절 영역은 척추동물 유전자로부터 유래된 것, 예를 들어 액틴, 열충격 단백질, 소 성장 호르몬 및 토키 a-글로빈뿐만 아니라 진핵생물 세포에서 유전자 발현을 조절할 수 있는 다른 서열을 포함한다. 추가의 적합한 전사 조절 영역은 조직-특이적 프로모터 및 인핸서뿐만 아니라 유도성 프로모터(예를 들어 프로모터 유도성 테트라사이클린)를 포함한다. 유사하게, 다양한 번역 조절 요소가 당분야의 통상적인 숙련가에게 공지되어 있다. 여기에는 비제한적으로 리보솜 결합 부위, 번역 개시 및 종결 코돈, 및 바이러스 시스템으로부터 유래된 요소

(특히 내부 리보솜 진입 부위, 또는 IRES, 또한 CITE 서열로서 지칭됨)가 있다. 상기 발현 카세트는 또한 다른 특징, 예를 들어 복제 기원, 및/또는 염색체 통합 요소, 예를 들어 레트로바이러스 긴 말단 반복부(LTR), 또는 아데노-회합된 바이러스(AAV) 반전 말단 반복부(ITR)를 포함할 수 있다.

[0277] 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 핵산 암호화 영역을 분비 또는 신호 웨პ티드(본 발명의 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화된 폴리웨პ티드의 분비를 지시한다)를 암호화하는 추가적인 암호화 영역과 회합시킬 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 이의 폴리웨პ티드 단편의 분비를 원하는 경우, 신호 서열을 암호화하는 DNA를 상기 핵산 본 발명의 항체 또는 이의 폴리웨პти드 단편의 상류에 둘 수 있다. 상기 신호 가설에 따라, 포유동물 세포에 의해 분비된 단백질은, 일단 거친 소포체를 가로질러 성장하는 단백질 쇄의 수출이 개시되었으면, 성숙한 단백질로부터 절단된 신호 웨პ티드 또는 분비 리더 서열을 갖는다. 당분야의 통상적인 숙련가는 척추동물 세포에 의해 분비된 폴리웨პ티드가 일반적으로 폴리웨პ티드의 N-말단에 융합된 신호 웨პ티드(이는 번역된 폴리웨პ티드로부터 절단되어 폴리웨პ티드의 분비된 또는 "성숙한" 형태를 생성시킨다)를 가짐을 안다. 일부 실시양태에서, 천연의 신호 웨პ티드, 예를 들어 면역 글로불린 중쇄 또는 경쇄 신호 웨პ티드, 또는 상기와 작동적으로 회합된 폴리웨პ티드의 분비를 지시하는 능력을 유지하는 서열의 기능성 유도체가 사용된다. 대안적으로, 이종 포유동물 신호 웨პ티드, 또는 이의 기능성 유도체를 사용할 수 있다. 예를 들어, 상기 야생형 리더 서열을 인간 조직 플라스미노겐 활성제(TPA) 또는 마우스 β -글루쿠로니다제의 리더 서열로 치환시킬 수 있다.

[0278] 나중의 정제를 촉진하거나(예를 들어 히스티딘 태그) 또는 융합 단백질의 라벨링을 지원하는 데 사용될 수 있는 짧은 단백질 서열을 암호화하는 DNA를, 본 발명의 항체 또는 이의 폴리웨პ티드 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 내에 또는 상기의 단부에 포함시킬 수 있다.

[0279] 본 발명의 추가의 양태에서, 본 발명의 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 하나 이상의 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 폴리뉴클레오티드 및 벡터는 각각 폴리뉴클레오티드 및 벡터와 관련하여 본원에 기재된 특징 중 어느 하나를 단독으로 또는 함께 통합할 수 있다. 하나의 양태에서, 숙주 세포는 본 발명의 항체(의 부분)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함한다(예를 들어 상기 벡터로 형질전환되거나 형질감염되었다). 본원에 사용되는 바와 같이, "숙주 세포"란 용어는 본 발명의 융합 단백질 또는 이의 단편을 생산하도록 조작될 수 있는 임의의 종류의 세포계를 지칭한다. 항원 결합 분자를 복제하고 이의 발현을 지지하기에 적합한 숙주 세포는 당분야에 주지되어 있다. 상기와 같은 세포를 특정한 발현 벡터로 적합하게 형질감염시키거나 형질도입시킬 수 있으며 다량의 벡터-함유 세포를 대규모 발효기의 시당을 위해 증식시켜 임상용으로 충분한 양의 항원 결합 분자를 수득할 수 있다. 적합한 숙주 세포는 원핵 미생물, 예를 들어 에스카리키아 콜라이, 또는 다양한 진핵생물 세포, 예를 들어 중국 햄스터 난소 세포(CHO), 곤충 세포 등을 포함한다. 예를 들어 폴리웨პ티드를, 특히 글리코실화가 필요하지 않은 경우, 세균 중에 생산할 수 있다. 발현 후에, 상기 폴리웨პ티드를 용액 분획 중 세균 세포 페이스트로부터 단리하고 추가로 정제할 수 있다. 원핵생물 외에, 진핵 미생물, 예를 들어 섬유상 진균 또는 효모, 예를 들어 글리코실화 경로가 "인간화되어" 부분적이거나 완전한 인간 글리코실화 패턴을 갖는 폴리웨პ티드를 생산하는 진균 및 효모 균주가 폴리웨პ티드-암호화 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 문헌[Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004)], 및 문헌[Li et al., Nat Biotech 24, 210-215 (2006)]을 참조한다.

[0280] (글리코실화된) 폴리웨პ티드의 발현에 적합한 숙주 세포는 또한 다세포 유기체(무척추동물 및 척추동물)로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포이다. 특히 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포의 형질감염을 위해, 곤충 세포와 함께 사용될 수 있는 다수의 바클로바이러스 균주가 동정되었다. 식물 세포 배양물을 또한 숙주로서 사용할 수 있다. 예를 들어 미국특허 제5,959,177호, 미국특허 제6,040,498호, 미국특허 제6,420,548호, 미국특허 제7,125,978호 및 미국특허 제6,417,429호(트랜스제닉 식물에서 항체를 생성시키기 위한 플랜티바디스(PLANTIBODIES)(상표) 기술을 개시한다)를 참조한다. 척추동물 세포를 또한 숙주로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 혼탁액에서 증식시키기에 적합한 포유동물 세포주가 유용할 수 있다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 다른 예는 SV40(COS-7)에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 계통; 인간 배아 신장 계통(예를 들어 문헌[Graham et al., J Gen Virol 36, 59 (1977)]에 기재된 바와 같은 293 또는 293T 세포), 아기 햄스터 신장세포(BHK), 마우스 세르톨리 세포(예를 들어 문헌[Mather, Biol Reprod 23, 243-251 (1980)]에 기재된 바와 같은 TM4 세포), 원숭이 신장세포(CV1), 아프리카 녹색 원숭이 신장세포(VERO-76), 인간 경부암종 세포(HELA), 개 신장세포(MDCK), 베팔로 래트 간세포(BRL 3A), 인간 폐세포(W138), 인간 간세포(Hep G2), 마우스 유방 종양세포(MMT 060562), TRI 세포(예를 들어 문헌[Mather et al., Annals N.Y. Acad Sci 383, 44-68 (1982)]에 기재된 바와 같은), MRC 5 세포, 및 FS4 세포이다. 다른 유용한 포유동물 숙주 세포주는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 예를 들어 dhfr- CHO 세포(문헌[Urlaub et al., Proc Natl Acad Sci USA 77,

4216 (1980)]; 및 골수종 세포주, 예를 들어 YO, NS0, P3X63 및 Sp2/0을 포함한다. 단백질 생산에 적합한 몇몇 포유동물 숙주 세포주의 리뷰를 위해서는, 예를 들어 문헌[Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)]을 참조한다. 숙주 세포는 배양된 세포, 예를 들어 단지 몇 개를 언급하자면, 포유동물 배양된 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 세균 세포 및 식물 세포뿐만 아니라, 트랜스제닉 동물, 트랜스제닉 식물 또는 배양된 식물 또는 동물 조직 내에 포함된 세포를 포함한다. 하나의 실시양태에서, 상기 숙주 세포는 진핵생물 세포, 바람직하게는 포유동물 세포, 예를 들어 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 인간 배신장(HEK) 세포 또는 럼프양 세포(예를 들어 YO, NS0, Sp20 세포)이다. 이들 시스템에서 외래 유전자를 발현시키는 표준 기술은 당분야에 공지되어 있다. 면역 글로불린의 중쇄 또는 경쇄를 포함하는 폴리펩티드를 발현하는 세포를, 상기 발현된 생성물이 중쇄 및 경쇄를 모두 갖는 면역 글로불린이도록 상기 면역 글로불린 쇄의 다른 하나를 또한 발현하도록 조작할 수 있다.

[0281]

하나의 양태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 폴리펩티드 단편의 생산 방법을 제공하며, 여기에서 상기 방법은 본 발명의 항체 또는 이의 폴리펩티드 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포를, 본 발명의 항체 또는 이의 폴리펩티드 단편의 발현에 적합한 조건하에서 본원에 제공된 바와 같이 배양하고, 상기 숙주 세포(또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 본 발명의 항체 또는 이의 폴리펩티드 단편을 회수함을 포함한다.

[0282]

특정 실시양태에서, 항원 결합 분자의 부분을 형성할 수 있는 표적 세포 항원(예를 들어 Fab 단편)에 특이적으로 결합할 수 있는 모이어티는 항원에 결합할 수 있는 면역 글로불린 가변 영역을 적어도 포함한다. 가변 영역은 자연 또는 비-자연 발생 항체 또는 이의 단편의 부분을 형성할 수 있거나 이로부터 유래될 수 있다. 디클론 항체 및 단클론 항체의 생산 방법은 당분야에 주지되어 있다(예를 들어 문헌[Harlow and Lane, "Antibodies, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988] 참조). 비-자연 발생 항체는 고상-펩티드 합성을 사용하여 구축될 수 있거나, 재조합으로 생산될 수 있거나(예를 들어 US 4,186,567에 기재됨) 가변 중쇄 및 가변 경쇄를 포함하는 조합 라이브러리를 스크리닝함으로써 수득될 수 있다(예를 들어 US 5,969,108(McCafferty) 참조).

[0283]

임의의 동물 종의 면역 글로불린이 본 발명에 사용될 수 있다. 본 발명에서 유용한 비제한적인 면역 글로불린은 뮤린, 영장류 또는 인간 기원의 것일 수 있다. 융합 단백질이 인간 용도를 위해 의도되는 경우, 면역 글로불린의 키메라 형태가 사용될 수 있고, 여기서 면역 글로불린의 불변 영역이 인간으로부터 기원한 것이다. 또한, 인간화되거나 완전한 인간 형태의 면역 글로불린이 당분야에 주지된 방법에 따라 생산될 수 있다(예를 들어 US 5,565,332(Winter) 참조). 인간화는 비제한적으로 하기를 포함하는 다양한 방법에 의해 달성될 수 있다: (a) 중요한 골격 잔기(예를 들어 양호한 항원 결합 친화도 또는 항체 기능을 유지하는 데 중요한 것)를 유지하거나 유지하지 않으면서, 비-인간(예를 들어, 공여자 항체) CDR을 인간(예를 들어 수용자 항체) 골격 및 불변 영역에 그래프팅함, (b) 단지 비-인간 특이성-결정 영역(SDR 또는 a-CDR; 항체-항원 상호작용에 중요한 잔기)을 인간 골격 및 불변 영역에 그래프팅함, 또는 (c) 전체 비-인간 가변 도메인을 이식하나 이를 인간-유사 절편으로 표면 잔기의 대체에 의해 "클로킹함(cloaking)". 인간화된 항체 및 이의 생산 방법은 예를 들어 문헌[Almagro and Fransson, *Front Biosci* 13, 1619-1633 (2008)]에 검토되어 있고, 예를 들어 문헌[Riechmann et al., *Nature* 332, 323-329 (1988)]; [Queen et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 10029-10033 (1989)]; US 5,821,337, 7,527,791, 6,982,321 및 7,087,409; 문헌[Jones et al., *Nature* 321, 522-525 (1986)]; [Morrison et al., *Proc Natl Acad Sci* 81, 6851-6855 (1984)]; [Morrison and Oi, *Adv Immunol* 44, 65-92 (1988)]; [Verhoeyen et al., *Science* 239, 1534-1536 (1988)]; [Padlan, *Molec Immun* 31(3), 169-217 (1994)]; [Kashmiri et al., *Methods* 36, 25-34 (2005) (describing SDR (a-CDR) grafting)]; [Padlan, *Mol Immunol* 28, 489-498 (1991) (describing "resurfacing")]; [Dall'Acqua et al., *Methods* 36, 43-60 (2005) (describing "FR shuffling")]; 및 [Osbourne et al., *Methods* 36, 61-68 (2005) and Klimka et al., *Br J Cancer* 83, 252-260 (2000) (describing the "guided selection" approach to FR shuffling)]에 추가로 기재되어 있다. 본 발명에 따른 특정 면역 글로불린은 인간 면역 글로불린이다. 인간 항체 및 인간 가변 영역은 당분야에 공지된 다양한 기술을 사용하여 생산될 수 있다. 인간 항체는 일반적으로 문헌[van Dijk and van de Winkel, *Curr Opin Pharmacol* 5, 368-74 (2001)] 및 [Lonberg, *Curr Opin Immunol* 20, 450-459 (2008)]에 기재되어 있다. 인간 가변 영역은, 하이브리도마 방법에 의해 생산된 인간 단클론 항체의 일부를 형성할 수 있거나 이로부터 유래될 수 있다(예를 들어 문헌[Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)] 참조). 또한, 인간 항체 및 인간 가변 영역은, 항원 챠린지에 대한 반응으로 완전 인간 항체 또는 인간 가변 영역을 갖는 완전 항체를 생산하도록 변형된 형질전환된 동물에게 면역원을 투여함으로써 생산될 수 있다(예를 들어 문헌[Lonberg, *Nat Biotech* 23, 1117-1125 (2005)] 참조). 또한, 인간 항체 및 인간 가변 영역은, 인간-유래된 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론

가변 영역 서열을 단리시킴으로써 생산될 수 있다(예를 들어 문헌[Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178, 1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001)]; 및 [McCafferty et al., Nature 348, 552-554; Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991)] 참조). 파지는 전형적으로 항체 단편을 단체 Fv(scFv) 단편 또는 Fab 단편으로서 나타낸다.

[0284] 특정 양태에서, 항체는, WO 2012/020006(친화도 성숙에 관한 실시예 참조) 또는 US 2004/0132066에 개시된 방법에 따라 증진된 결합 친화도를 갖도록 조작된다. 특정 항원 결합인자에 결합하는 본 발명의 항원 결합 분자의 능력은 효소-결합된 면역 흡착 분석(ELISA) 또는 당업자에게 친숙한 다른 기술, 예를 들어 표면 플라스몬 공명 기술(문헌[Li1jeblad, et al., Glyco J 17, 323-329 (2000)]), 및 종래의 결합 분석(문헌[Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)])을 통해 측정될 수 있다. 경쟁 분석은 특정 항원에 대한 결합에 대해 기준 항체와 경쟁하는 항원 결합 분자를 확인하는 데 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 이러한 경쟁하는 항원 결합 분자는 기준 항원 결합 분자에 의해 결합되는, 동일한 에피토프(예를 들어 선형 또는 형태 에피토프)에 결합한다. 항원 결합 분자가 결합하는 에피토프를 맵핑하는 상세한 예시적 방법은 문헌[Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)]에 제공된다. 예시적 경쟁 분석에서, 고정된 항원은 항원에 결합하는 라벨링된 제1 항원 결합 분자, 및 항원에 대한 결합에 대해 제1 항원 결합 분자와 경쟁하는 능력에 대해 시험할 라벨링되지 않은 제2 항원 결합 분자를 포함하는 용액에서 항온 처리된다. 제2 항원 결합 분자는 하이브리도마 상청액에 존재할 수 있다. 대조군으로서, 고정된 항원은 라벨링된 제1 항원 결합 분자를 포함하거나 라벨링되지 않은 제2 항원 결합 분자를 포함하지 않는 용액에서 항온 처리된다. 항원에 대한 제1 항체의 결합에 대해 관대한 조건 하에 항온처리 후에, 과량의 미결합된 항체가 제거되고, 고정된 항원에 결합된 라벨의 양을 측정한다. 고정된 항원에 결합된 라벨의 양이 대조군 샘플과 비교하여 시험 샘플에서 실질적으로 감소된 경우, 이는 제2 항원 결합 분자가 항원에 대한 결합에 대해 제1 항원 결합 분자와 경쟁적임을 시사한다. 문헌[Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)]을 참조한다.

[0285] 본원에 기재된 바와 같이 생산된 본 발명의 항체를 당분야에 공지된 기법, 예를 들어 고성능 액체 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 젤 전기영동, 친화도 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 등에 의해 정제할 수 있다. 특정 단백질의 정제에 사용되는 실제 조건은 부분적으로, 순 전하, 소수성, 친수성 등과 같은 인자에 의존할 것이며, 이는 당분야의 숙련가에게 자명할 것이다. 친화도 크로마토그래피 정제를 위해서 상기 항원 결합 분자가 결합하는 항체, 리간드, 수용체 또는 항원을 사용할 수 있다. 예를 들어 본 발명의 이중특이적 항체의 친화도 크로마토그래피 정제를 위해서, 단백질 A 또는 단백질 G를 갖는 기질을 사용할 수 있다. 연속적인 단백질 A 또는 G 친화도 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 필수적으로 실시예에 기재된 바와 같이 항원 결합 분자를 단리할 수 있다. 상기 항원 결합 분자 또는 이의 단편의 순도를 젤 전기영동, 고압 액체 크로마토그래피 등을 포함한 임의의 다양한 주제된 분석 방법에 의해 측정할 수 있다. 예를 들어, 상기 실시예에 기재된 바와 같은 항체는 환원 및 비-환원 SDS-PAGE에 의해 입증된 바와 같이 온전하며 적합하게 조립된 것으로 나타났다.

분석

[0287] 본원에 제공된 항원 결합 분자는 당분야에 공지된 다양한 분석에 의해 이의 물리적/화학적 특성 및/또는 생물학적 활성에 대해 확인되거나 스크리닝되거나 특성규명될 수 있다.

1. 친화도 분석

[0289] 상응하는 수용체에 대한 본원에 제공된 이중특이적 항원 결합 분자의 친화도는 표준 기기, 예컨대 비아코어 기기(지이 헬쓰케어)를 사용하여 표면 플라스몬 공명(SPR)에 의해 실시예에 제시된 방법에 따라 결정될 수 있고, 수용체 또는 표적 단백질은 재조합 발현에 의해 생산될 수 있다. 또한, 표적 세포 항원에 대한 이중특이적 항원 결합 분자의 친화도는 표준 기기, 예컨대 비아코어 기기(지이 헬쓰케어)를 사용하는 표면 플라스몬 공명(SPR)에 의해 결정될 수 있고, 수용체 또는 표적 단백질은 재조합 발현에 의해 생산될 수 있다. FAP-OX40 이중특이적 항체의 경우, 상기 방법은 WO 2017/055398 A2 또는 WO 2017/060144 A1에 보다 상세히 기재되어 있다. 한 양태에 따라, KD는 25°C에서 비아코어(등록상표) T100 기계(지이 헬쓰케어)를 사용하여 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된다.

2. 결합 분석 및 기타 분석

[0291] 한 양태에서, 본원에 보고된 FAP-OX40 이중특이적 항체는, WO 2017/055398 A2 또는 WO 2017/060144 A1에 보다

상세히 기재된 바와 같이 이의 항원 결합 활성에 대해 시험된다.

[0292] 3. 활성 분석

[0293] 한 양태에서, 표적화된 OX40 이중특이적 항원 결합 분자의 생물학적 활성을 확인하기 위한 분석이 제공된다.

[0294] 특정 실시양태에서, 본원에 보고된 항체는 이러한 생물학적 활성에 대해 시험된다.

[0295] 약학 조성물, 제형 및 투여 경로

[0296] 추가적 양태에서, 본 발명은, 임의의 하기 치료 방법에서 사용하기 위해 본원에 제공된, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 및 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체, 특히 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체 또는 항-Fo1R1/항-CD3 이중특이적 항체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 한 실시양태에서, 약학 조성물은 본원에 제공된 항체 및 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 약학 조성물은 본원에 제공된 항체 및 하나 이상의 추가적 치료제(예를 들어 하기에 기재된 것)를 포함한다.

[0297] 한 양태에서, 본 발명은, 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체, 및 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체, 특히 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체 또는 항-Fo1R1/항-CD3 이중특이적 항체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0298] 또 다른 양태에서, 본 발명은, 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체, 및 PD-L1/PD-1 상호작용 차단제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 특히, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 길항성 항-PD-L1 항체 또는 길항성 항-PD1 항체이다. 보다 특히, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 아테졸리주맙, 두르밸루맙, 펜브롤리주맙 및 니볼루맙으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 구체적 양태에서, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 아테졸리주맙이다.

[0299] 본 발명의 약학 조성물은 치료 유효량의, 약학적으로 허용되는 부형제 중에 용해되거나 분산된 하나 이상의 항체를 포함한다. "약학적으로 또는 약물학적으로 허용되는"이란 어구는 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 일반적으로 무독성인, 즉 적합한 대로 동물, 예를 들어 인간에게 투여시 불리하거나, 알러지성이거나 다른 부적합한 반응을 생성시키지 않는 분자 독립체 및 조성물을 지칭한다. 활성 성분(예를 들어 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 OX40 항체, 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체 및/또는 PD-L1/PD-1 상호작용 차단제)을 포함하는 약학 조성물의 제조는 본원에 참고로 인용된 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990]에 예시된 바와 같이 본원에 비추어 당업자에게 공지될 것이다. 특히, 상기 조성물은 동결건조된 제형 또는 수용액이다. 본원에 사용되는 바와 같이, "약학적으로 허용되는 부형제"는 당분야의 통상적인 숙련가에게 공지된 바와 같은 모든 용매, 완충제, 분산 매질, 코팅제, 계면활성제, 산화방지제, 보존제(예를 들어 항균제, 항진균제), 등장성제, 염, 안정화제 및 이들의 조합을 포함한다.

[0300] 비경구 조성물은 주사에 의해, 예를 들어 피하, 피내, 병변내, 정맥내, 동맥내, 근육내, 경막내 또는 복강내 주사에 의해 투여하기 위해 설계된 것을 포함한다. 주사용으로, 본 발명의 항원 결합 분자를 수용액 중에, 바람직하게는 생리학적으로 적합한 완충제, 예를 들어 헤크 용액, 링거액, 또는 생리식염수 완충제 중에서 제형화할 수 있다. 상기 용액은 제형화제, 예를 들어 혼탁, 안정화 및/또는 분산제를 함유할 수 있다. 대안적으로, 용합 단백질은 사용 전에 적합한 비히클, 예를 들어 멀균 밸셜성 물질 제거수로 조성되는 분말 형태 중에 존재할 수 있다. 멀균 주사액은 본 발명의 용합 단백질을 필요에 따라, 하기에 열거되는 다양한 다른 성분과 함께 적합한 용매 중에 필요한 양으로 혼입시킴으로써 제조된다. 멀균은 예를 들어 멀균 여과막을 통한 여과에 의해 쉽게 수행될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 다양한 멀균된 활성 성분을 기본 분산 매질 및/또는 다른 성분을 함유하는 멀균 비히클 중에 혼입시킴으로써 제조된다. 멀균 주사액, 혼탁액 또는 유화액의 제조에 사용하기 위한 멀균 분말의 경우에, 바람직한 제조 방법은 앞서 멀균-여과된 액체 매질로부터 활성 성분 및 임의의 추가적인 목적하는 성분의 분말을 제공하는 진공-건조 또는 동결-건조이다. 상기 액체 매질을 필요한 경우 적합하게 완충시켜야 하며 상기 액체 희석제를 주사전에 먼저 충분한 염수 또는 글루코스로 등장성으로 만들어야 한다. 상기 조성물은 제조 및 보관 조건하에서 안정해야 하며, 미생물, 예를 들어 세균 및 진균의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 내독소 오염을, 예를 들어 0.5 ng/mg 단백질 미만의 안전 수준에서 최소로 유지시켜야 함을 알 것이다. 적합한 약학적으로 허용되는 희석제는 비제한적으로 완충제, 예를 들어 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함한 산화방지제; 보존제(예를 들어 옥타데실다이메틸벤질 암모늄

클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드; 벤즈에토늄 클로라이드; 폐놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예를 들어 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 사이클로헥산올; 3-펜탄올; 및 3-크레졸); 저분자량(약 10 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역 글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신; 모노사카라이드, 다이사카라이드, 및 다른 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스, 또는 텍스트란; 키레이트화제, 예를 들어 EDTA; 당, 예를 들어 슈크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 솔비톨; 염-형성 대이온, 예를 들어 나트륨; 금속 착체(예를 들어 Zn-단백질 착체); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함한다. 수성 주사 혼탁액은 상기 혼탁액의 점도를 개선시키는 화합물, 예를 들어 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 솔비톨, 텍스트란 등을 함유할 수 있다. 임의적으로, 상기 혼탁액은 또한 적합한 안정화제 또는 고도로 농축된 용액의 제조를 허용하도록 상기 화합물의 용해도를 증가시키는 제제를 함유할 수 있다. 추가로, 상기 활성 화합물의 혼탁액을 적합한 대로 유성 주사 혼탁액으로서 제조할 수 있다. 적합한 친지성 용매 또는 비히클은 지방 오일, 예를 들어 참깨 오일, 또는 합성 지방산 에스터, 예를 들어 에틸 클리에이트 또는 트라이글리세라이드, 또는 리포솜을 포함한다.

[0301] 활성 성분을 예를 들어 코아세르베이션 기법에 의해서 또는 계면 중합에 의해서 제조된 미세캡슐, 예를 들어 콜로이드 약물 전달 시스템(예를 들어 리포솜, 알부민 미소구, 미세유화액, 나노-입자 및 나노캡슐) 중의 또는 거대유화액 중의 각각의 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-미세캡슐 및 폴리-(메틸메트아크릴레이트) 미세캡슐 중에 포집할 수 있다. 상기와 같은 기법은 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences(18th Ed. Mack Printing Company, 1990)]에 개시되어 있다. 서방성 제제를 제조할 수도 있다. 서방성 제제의 적합한 예는 상기 폴리펩티드를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 기질(상기 기질은 성형품, 예를 들어 필름 또는 미세 캡슐의 형태이다)을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 주사성 조성물의 연장된 흡수는 상기 조성물 중에 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트, 젤라틴 또는 이들의 조합의 사용에 의해 발생될 수 있다.

[0302] 본원에서 예시적인 약학적으로 허용되는 부형제는 간질성 약물 분산제, 예를 들어 용해성 중성-활성 히알루로니다제 당단백질(sHASEGP), 예를 들어 인간 용해성 PH-20 히알루로니다제 당단백질, 예를 들어 rHuPH20(하이레넥스(HYLENEX)(등록상표), 박스터 인터내셔널 인코포레이티드(Baxter International, Inc.)를 추가로 포함한다. rHuPH20을 포함한 몇몇 예시적인 sHASEGP 및 사용 방법이 미국 특허 공보 2005/0260186 및 2006/0104968에 개시되어 있다. 하나의 양태에서, sHASEGP를 하나 이상의 추가적인 글리코스아미노글리카나제, 예를 들어 콘드로이티나제와 조합된다.

[0303] 예시적인 동결건조된 항체 제형이 미국특허 제6,267,958호에 개시되어 있다. 수성 항체 제형은 미국특허 제6,171,586호 및 WO 2006/044908에 개시된 것을 포함하며, 후자의 제형은 히스티딘-아세테이트 완충제를 포함한다.

[0304] 앞서 기재된 조성물 외에, 활성 성분을 또한 데포 제제로서 제형화할 수 있다. 상기와 같은 장기간 작용하는 제형은 이식(예를 들어 피하 또는 근육내)에 의해 또는 근육내 주사에 의해 투여될 수 있다. 따라서, 예를 들어 상기 응합 단백질을 적합한 중합체성 또는 소수성 물질(예를 들어 허용되는 오일 중의 유화액으로서) 또는 이온 교환 수지와, 또는 드물게 용해성인 유도체, 예를 들어 드물게 용해성인 염으로서 제형화할 수 있다.

[0305] 본 발명의 활성 성분을 포함하는 약학 조성물을 통상적인 혼합, 용해, 유화, 캡슐화, 포집 또는 동결건조 공정에 의해 제조할 수 있다. 약학 조성물을 하나 이상의 생리학적으로 허용되는 담체, 희석제, 부형제, 또는 상기 단백질의, 약학적으로 사용될 수 있는 제제로의 가공을 용이하게 하는 보조제를 사용하여 통상적인 방식으로 제형화할 수 있다. 적합한 제형화는 선택된 투여 경로에 따라 변한다.

[0306] 본 발명의 항체를 유리 산 또는 유리 염기, 중성 또는 염 형태의 조성물로 제형화할 수 있다. 약학적으로 허용되는 염은 상기 유리 산 또는 유리 염기의 생물학적 활성을 실질적으로 유지시키는 염이다. 상기는 산 부가염, 예를 들어 단백질성 조성물의 유리 아미노 기에 의해 형성되거나 무기산(예를 들어 염산 또는 인산) 또는 유기 산(예컨대 아세트산, 옥살산, 타르타르산 또는 만델산)에 의해 형성되는 것을 포함한다. 유리 카복시 기에 의해 염은 또한 무기염기, 예를 들어 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘 또는 철 수산화물; 또는 이소프로필아민, 트라이메틸아민, 히스티딘 또는 프로카인과 같은 유기염기로부터 유도될 수 있다. 약학적 염은 상응하는 유리 염기 형태보다 수성 및 다른 양성자성 용매 중에서 더 용해성으로 되는 성향이 있다.

[0307] 본원의 조성물은 또한 치료되는 특정한 적응증에 필요한 바와 같은 하나 초과의 활성 성분, 바람직하게는 서로 불리한 영향을 미치지 않는 상보성 활성을 갖는 것을 함유할 수 있다. 상기와 같은 활성 성분은 적합하게는 의

도하는 목적에 유효한 양으로 함께 존재한다.

[0308] 생체내 투여에 사용되는 제형은 일반적으로 멸균성이다. 멸균은 예를 들어 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 쉽게 수행될 수 있다.

[0309] 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체 및 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체, 특히 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체의 투여

[0310] 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체 및 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체, 특히 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체 둘 모두(모두 본원에서 물질로 지정됨)는 비경구, 폐내 및 비강내 투여, 및 국소 치료가 바람직한 경우에는 병소내 투여를 포함하는 임의의 적합한 방법에 의해 투여될 수 있다. 그러나, 본 발명의 방법은 비경구, 특히 정맥내 주입에 투여되는 치료제와 관련하여 특히 유용하다.

[0311] 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 투여는, 부분적으로 투여가 깊은지 또는 만성적인지에 따라, 임의의 적합한 경로에 의해, 예를 들어 주사, 예컨대 정맥내 또는 피하 주사에 의해 수행될 수 있다. 비제한적으로 단일 투여 또는 다양한 시점에 걸친 다중 투여, 볼루스 투여 및 펄스 주입을 포함하는 다양한 투여 일정이 본원에서 고려된다. 한 실시양태에서, 치료제는 비경구적으로, 특히 정맥내로 투여된다. 특정 실시양태에서, 치료제는 정맥내 주입에 의해 투여된다.

[0312] 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체 및 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체, 특히 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체 둘 모두는 타당한 의료 행위에 일치하는 방식으로 제형화되고 투여되고 투약될 수 있다. 본원에 있어서 고려 인자는 치료할 특정 장애, 치료 받을 특정 포유동물, 개별적 환자의 임상적 상태, 장애의 원인, 제제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 일정, 및 의사에게 공지된 기타 인자를 포함한다. 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체 및 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체, 특히 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체 둘 모두는, 당해 장애를 예방하거나 치료하는 데 현재 사용되는 하나 이상의 제제와 함께 필수적인 것은 아니나 임의적으로 제형화된다. 이러한 다른 제제의 유효량은 제형에 존재하는 치료제의 양, 장애 또는 치료의 유형, 및 상기에 논의된 다른 인자에 좌우된다. 이는 일반적으로 본원에 기재된 바와 동일한 투여량 및 투여 경로로 사용되거나, 본원에 기재된 투여량의 약 1 내지 99%로, 또는 적합한 것으로 경험상/임상적으로 결정된 임의의 투여량으로 임의의 경로에 의해 사용된다.

[0313] 질병의 예방 또는 치료를 위해, 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체 및 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체, 특히 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체의 적절한 투여량(이들의 조합으로 사용되거나 하나 이상의 다른 추가적 치료제와 사용되는 경우)은, 치료할 질병의 유형, 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체의 유형, 질병의 중증도 및 추이, 둘 모두의 제제가 예방 목적으로 사용되는지 또는 치료 목적으로 사용되는지 여부, 이전 요법, 환자의 병력 및 치료제에 대한 반응, 및 담당의의 재량에 좌우될 것이다. 각각의 물질은 적합하게는 환자에게 1회 또는 일련의 치료에 걸쳐 투여된다. 질병의 유형 및 중증도에 따라, 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 15 mg/kg (예를 들어 0.1 내지 10 mg/kg)의 물질이 예를 들어 1회 이상의 개별적 투여 또는 연속 주입에 의해 개체에게 투여하기 위한 초기 후보자일 수 있다. 하나의 전형적인 1일 투여량은 상기에 언급된 인자에 따라 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 100 mg/kg 이상 범위일 수 있다. 며칠 이상에 걸친 반복 투여의 경우, 상태에 따라, 치료는 일반적으로 질병 증상의 목적하는 억제가 발생할 때까지 지속될 수 있다. 각각의 물질의 하나의 예시적 투여량은 약 0.05 내지 약 10 mg/kg 범위일 수 있다. 따라서, 약 0.5 mg/kg , 2.0 mg/kg , 4.0 mg/kg 또는 10 mg/kg (또는 이들의 임의의 조합)의 하나 이상의 투여량이 개체에게 투여될 수 있다. 이러한 투여량은 (예를 들어 개체가 약 2 내지 약 12회의 투여량, 또는 약 6회의 투여량의 치료제를 제공받도록) 간헐적으로, 예를 들어 1주일마다, 2주일마다 또는 3주일마다 투여될 수 있다. 초기 고 적재량 투여량 후에 1회 이상의 저 투여량, 또는 초기 저 투여량 후에 1회 이상의 고 투여량이 투여될 수 있다. 예시적 투여 양생법은, 약 10 mg 의 초기 투여량 투여 후에 약 20 mg 의 격주 투여량의 치료제를 투여하는 것을 포함한다. 그러나, 다른 투여 양생법이 유용할 수 있다. 이러한 요법의 진행은 종래 기술 및 분석에 의해 용이하게 모니터링된다.

[0314] 한 양태에서, 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체 및 종양-연관된 항원에 특이적인 T 세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체, 특히 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체 둘 모두의 투여는 단일 투여이다. 특정 양태에서, 치료제의 투여는 2회 이상의 투여이다. 이러한 한 양태에서, 물질은 1주일마다, 2주일마다 또는 3주일마다, 특히 2주일마다 투여된다. 한 양태에서, 물질은 치료적 유효량으로 투여된다. 한 양태에서, 물질은 약 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 약 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 약 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 약 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 약 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 약 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 약 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 약 700 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 약 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 약 900 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 또는 약 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 투여량으로 투여된다. 한 실시양태에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는, 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체의 투여 없는 상응하는 치료 양생법에서 항-CEA/항-CD3 이중

특이적 항체의 투여량보다 높은 투여량으로 투여된다. 한 양태에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체의 투여는 제1 투여량의 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체의 초기 투여, 및 제2 투여량의 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체의 1회 이상의 후속 투여를 포함하되, 제2 투여량은 제1 투여량보다 높다. 한 양태에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체의 투여는 제1 투여량의 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체의 초기 투여, 및 제2 투여량의 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체의 1회 이상의 후속 투여를 포함하되, 제1 투여량은 제2 투여량보다 낮지 않다.

[0315] 한 양태에서, 본 발명에 따른 치료 양생법에서 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체의 투여는 개체에게 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체의 제1 투여(적어도 동일한 치료 과정 내에서)이다. 한 양태에서, 개체에게 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체의 투여는 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체의 투여 전에 이루어지지 않는다.

[0316] 본 발명에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체 및 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체의 조합은 요법에서 추가적 제제와 조합으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 추가적 치료제가 공동-투여될 수 있다. 특정 양태에서, 추가적 치료제는 면역 치료제이다.

[0317] 한 양태에서, 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체 및 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체의 조합은 PD-1 축 결합 길항체와 조합으로 사용될 수 있다. 한 양태에서, PD-1 축 결합 길항체는 PD-1 결합 길항체, PD-L1 결합 길항체 및 PD-L2 결합 길항체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 양태에서, PD-1 축 결합 길항체는 PD-1 결합 길항체, 특히 길항성 PD-1 항체이다. 한 양태에서, PD-1 축 결합 길항체는 MDX 1106(니볼루맙, CAS 등록번호 946414-94-4), MK-3475(펩브롤리주맙), CT-011(파딜리주맙), MEDI-0680(AMP-514), PDR001, REGN2810 및 BGB-108로부터 선택된다. 또 다른 특정 양태에서, PD-1 축 결합 길항체는 PD-L1 결합 길항체, 특히 길항성 PD-L1 항체이다. 한 양태에서, PD-1 축 결합 길항체는 MPDL3280A(아테졸리주맙), YW243.55.S70, MDX-1105, MEDI4736(두르발루맙) 및 MSB0010718C(아벨루맙)로부터 선택된다. 한 양태에서, PD-L1 길항성 항체는 아데졸리주맙, 두르발루맙 및 아벨루맙으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 보다 특히, 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체 및 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체의 조합은 MPDL3280A(아테졸리주맙)와 조합으로 사용될 수 있다. 일부 양태에서, 아테졸리주맙은 약 800 내지 약 1500 mg의 투여량으로 3주일마다(예를 들어, 3주일마다 약 1000 내지 약 1300 mg, 예를 들어 3주일마다 약 1100 내지 약 1200 mg) 투여될 수 있다. 하나의 특정한 양태에서, 아데졸리주맙은 약 1200 mg의 투여량으로 3주일마다 투여된다.

[0318] PD-1 축 결합 길항체의 투여와 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체 및 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체를 포함하는 병용 요법의 투여 사이의 기간 및 투여량은 예컨대 병용 요법의 투여 전에 개체의 종양을 효과적으로 줄어들게 하도록 선택된다.

[0319] 상기에 언급된 이러한 병용 요법은 병용 투여(여기서 2개 이상의 치료제가 동일하거나 별개인 제형에 포함됨), 및 개별적 투여(이 경우, 치료제의 투여가 추가적 치료제의 투여 전에 및/또는 동시에 및/또는 후에 발생할 수 있다)를 포함한다. 한 실시양태에서, 치료제의 투여 및 추가적 치료제의 투여는 서로 약 1개월 이내에, 약 1, 2 또는 3주일 이내에, 또는 약 1, 2, 3, 4, 5 또는 6일 이내에 발생한다.

치료 방법 및 조성물

[0321] 상이한 세포 집단 상의 2개의 세포 표면 단백질을 인식하는 이중특이적 항체는 병원성 표적 세포의 파괴를 위한 세포 독성 면역 세포를 재유도하는 가능성을 갖는다.

[0322] 한 양태에서, 개체에서 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법을 제공하되, 이는 상기 개체에게 유효량의 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체 및 항-CEA/항-CD3 항체를 투여하는 단계를 포함한다.

[0323] 하나의 이러한 양태에서, 상기 방법은 개체에게 유효량의 하나 이상의 추가적 치료제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 추가적 실시양태에서, 개체에게 유효량의 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체 및 항-CEA/항-CD3 항체를 투여하는 단계를 포함하는 종양 축소 방법이 제공된다. 상기 양태 중 어느 하나에 따라 "개체" 또는 "대상체"는 바람직하게는 인간이다.

[0324] 추가적 양태에서, 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체 및 항-CEA/항-CD3 항체를 포함하는, 암 면역 요법에서 사용하기 위한 조성물이 제공된다. 특정 실시양태에서, 암 면역 요법의 방법에서 사용하기 위한 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체 및 항-CEA/항-CD3 항체를 포함하는 조성물이 제공된다.

[0325] 추가적 양태에서, 약제의 제조 또는 생산에서 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체 및 항-CEA/항-CD3 항체를 포함하는 조성물의 용도가 제공된다. 한 실시양태에서, 약제는 고형 종양의 치료를 위한 것이다. 추가적 실시양태에서, 약제는, 고형 종양을 갖는 개체에게 유효량의 약제를 투여하는 단계를 포함하는 종양 축소 방법에서 사용하

기 위한 것이다. 하나의 이러한 실시양태에서, 상기 방법은 개체에게 유효량의 하나 이상의 추가적 치료제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 추가적 실시양태에서, 약제는 고형 종양을 치료하기 위한 것이다. 일부 양태에서, 개체는 CEA 양성 암을 앓는다. 일부 양태에서, CEA 양성 암은 결장암, 폐암, 난소암, 위암, 방광암, 췌장암, 자궁내막암, 유방암, 신장암, 식도암 또는 전립선암이다. 일부 양태에서, 유방암은 유방 암종 또는 유방 선암종이다. 일부 양태에서, 유방 암종은 침윤성 관 암종이다. 일부 양태에서, 폐암은 폐 선암종이다. 일부 실시양태에서, 결장암은 대장 선암종이다. 상기 실시양태 중 어느 하나에 따른 "개체"는 인간일 수 있다.

[0326] 상기에 언급된 병용 요법은 병용 투여(여기서 2개 이상의 치료제가 동일하거나 별개인 제형에 포함됨), 및 개별적 투여(이 경우, 본원에 보고된 항체의 투여가 추가적 치료제의 투여 전에 및/또는 동시에 및/또는 후에 발생할 수 있다)를 포함한다. 한 양태에서, 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체 및 항-CEA/항-CD3 항체의 투여, 및 임의적으로 추가적 치료제의 투여는 서로 약 1개월 이내에, 약 1, 2 또는 3주일 이내에, 또는 약 1, 2, 3, 4, 5 또는 6일 이내에 발생한다.

[0327] 본원에 보고된 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체 및 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체 (및 임의의 추가적 치료제) 모두는 비경구, 폐내 및 비강내 투여, 및 국소 치료가 바람직한 경우에는 병소내 투여를 포함하는 임의의 적합한 방법에 의해 투여될 수 있다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 투여는, 부분적으로 투여가 짧은지 또는 만성적인지에 따라, 임의의 적합한 경로에 의해, 예를 들어 주사, 예컨대 정맥내 또는 피하 주사에 의해 수행될 수 있다. 비제한적으로 단일 투여 또는 다양한 시점에 걸친 다중 투여, 볼루스 투여 및 펠스 주입을 포함하는 다양한 투여 일정이 본원에서 고려된다.

[0328] 본원에 보고된 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체 및 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체 둘 모두는 타당한 의료 행위에 일치하는 방식으로 제형화되고 투여되고 투약될 수 있다. 본원에 있어서 고려 인자는 치료할 특정 장애, 치료 받을 특정 포유동물, 개별적 환자의 임상적 상태, 장애의 원인, 제제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 일정, 및 의사에게 공지된 기타 인자를 포함한다. 항체는 당해 장애를 예방하거나 치료하는 데 현재 사용되는 하나 이상의 제제와 함께 필수적인 것은 아니나 임의적으로 제형화된다. 이러한 다른 제제의 유효량은 제형에 존재하는 항체의 양, 장애 또는 치료의 유형, 및 상기에 논의된 다른 인자에 좌우된다. 이는 일반적으로 본원에 기재된 바와 동일한 투여량 및 투여 경로로 사용되거나, 본원에 기재된 투여량의 약 1 내지 99%로, 또는 적합한 것으로 경험상/임상적으로 결정된 임의의 투여량으로 임의의 경로에 의해 사용된다.

제조 물품(키트)

[0330] 본 발명의 또 다른 양태에서, 상술한 장애의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용한 물질을 함유하는 키트를 제공한다. 상기 키트는 하나 이상의 용기 및 상기 용기 상의 또는 상기 용기와 결합된 라벨 또는 패키지 삽입물을 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 주사기, IV 용액 주머니 등을 포함한다. 상기 용기는 다양한 물질, 예를 들어 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 상기 용기는 조성물을 단독으로, 또는 상태의 치료, 예방 및/또는 진단에 유효한 또 다른 조성물과 함께 유지하며 멸균 출입구를 가질 수 있다(예를 들어 상기 용기는 정맥내 용액 주머니 또는 피하주사 바늘에 의해 관통될 수 있는 마개를 갖는 바이알일 수 있다). 한 양태에서, 키트의 2개 이상의 활성제는 본 발명의 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체 및 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체이다.

[0331] 특정 양태에서, (A) 활성 성분으로서 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체, 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 제1 조성물, (B) 활성 성분으로서 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 제2 조성물, 및 (C) 병용 요법에서 상기 조성물들의 사용에 대한 지시서를 포함하는 패키지를 포함하는, 개체에서 암을 치료하거나 이의 진행을 지연시키기 위한 키트가 제공된다.

[0332] 하나의 추가적 양태에서, (A) 활성 성분으로서 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체, 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 제1 조성물, (B) 활성 성분으로서 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 제2 조성물, (C) 활성 성분으로서 PD-L1/PD-1 상호작용 차단제 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 제3 조성물, 및 (D) 병용 요법에서 상기 조성물들의 사용에 대한 지시서를 포함하는 패키지를 포함하는, 개체에서 암을 치료하거나 이의 진행을 지연시키기 위한 키트가 제공된다.

[0333] 상기 라벨 또는 패키지 삽입물은 어떻게 상기 조성물이 선택된 질환의 치료에 사용되는지를 지시하며 병용 요법에서 상기 조성물의 사용에 대한 지시서를 제공한다. 또한, 상기 키트는 (a) 내부에 조성물이 함유된 제1 용기(여기서, 상기 조성물은 본 발명의 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체를 포함한다); 및 (b) 내부에 조성물이 함유된 제2 용기(여기서, 상기 조성물은 본 발명의 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체를 포함한다)를 포함할 수

있다. 또한, 상기 키트는 조합으로 사용될 수 있는 추가적 활성 성분을 포함하는 하나 이상의 추가적 용기를 포함할 수 있다. 본 발명의 상기 실시양태에서 제조 물품은 조성물이 특정 질환을 치료할 수 있음을 지시하는 패키지 삽입물을 추가로 포함할 수 있다.

[0334] 대안적으로 또는 부가적으로, 상기 키트는 약학적으로 허용되는 완충제, 예를 들어 주사용 정균수(BWFI), 포스페이트-완충된 염수, 릴거액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2(또는 제3) 용기를 추가로 포함할 수 있다. 상기 물품은 상업적 및 사용자 관점에서 바람직할 수 있는 다른 물질, 예를 들어 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기를 추가로 포함할 수도 있다.

[0335] [표 C]

서열

서열 번호	명칭	서열
1	FAP(4B9) CDR-H1	SYAMS
2	FAP(4B9) CDR-H2	AIIGSGASTYYADSVKG
3	FAP(4B9) CDR-H3	GWFGGFNY
4	FAP(4B9) CDR-L1	RASQSVTSSYLA
5	FAP(4B9) CDR-L2	VGSRRAT
6	FAP(4B9) CDR-L3	QQGIMLPPT
7	FAP(4B9) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGW FGGFNYWGQGTLVTVSS
8	FAP(4B9) VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLINVGSRRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTK VEIK
9	FAP (28H1) CDR-H1	SHAMS
10	FAP (28H1) CDR-H2	AIWASGEQYYADSVKG
11	FAP (28H1) CDR-H3	GWLGNFDY
12	FAP (28H1) CDR-L1	RASQSVRSYLA
13	FAP (28H1) CDR-L2	GASTRAT
14	FAP (28H1) CDR-L3	QQGQVIPPT
15	FAP(28H1) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSHAM SWVRQAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGW LGNFDYWGQGTLVTVSS
16	FAP(28H1) VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLA WYQQKPGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSG DFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGVIPPTFGQGTKV EIK
17	OX40(8H9,49B4,1G4, 20B7) CDR-H1	SYAIS
18	OX40(CLC-563, CLC-564, 17A9) CDR-H1	SYAMS

[0336]

서열 번호	명칭	서열
19	OX40(8H9,49B4,1G4, 20B7) CDR-H2	GIPIFGTANYAQKFQG
20	OX40(CLC-563, CLC-564, 17A9) CDR-H2	AISGGSTYYADSVKG
21	OX40(8H9) CDR-H3	EYGWMDY
22	OX40(49B4) CDR-H3	EYYRGPYDY
23	OX40(1G4) CDR-H3	EYGSMDY
24	OX40(20B7) CDR-H3	VNYPYSYWGDFDY
25	OX40(CLC-563) CDR-H3	DVGAFDY
26	OX40(CLC-564) CDR-H3	DVGPFDY
27	OX40(17A9)-CDR-H3	VFYRGGVSMDY
28	OX40(8H9,49B4,1G4, 20B7) CDR-L1	RASQSISSWLA
29	OX40(CLC-563, CLC564) CDR-L1	RASQSVSSSYLA
30	OX40(17A9) CDR-L1	QGDSLRSYYAS
31	OX40(8H9,49B4,1G4, 20B7) CDR-L2	DASSLES
32	OX40(CLC-563, CLC564) CDR-L2	GASSRAT
33	OX40(17A9) CDR-L2	GKNNRPS
34	OX40(8H9) CDR-L3	QQYLTYSRFT
35	OX40(49B4) CDR-L3	QQYSSQPYT
36	OX40(1G4) CDR-L3	QQYISYSMLT
37	OX40(20B7) CDR-L3	QQYQAFSLT
38	OX40(CLC-563, CLC-564) CDR-L3	QQYGSSPLT
39	OX40(17A9) CDR-L3	NSRVMPHNRV
40	OX40(49B4) VH	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGR VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYY <u>RGPYDYWGQGTTVTVSS</u>

[0337]

서열 번호	명칭	서열
41	OX40(49B4) VL	DIQMTQSPTLSASVGDRVTIT <u>CRASQSISSWLA</u> <u>WYQQKPGKAPKLIYDASSLES</u> GVP ^R FSGSGSG TEFTLTISLQPDDFATYYCQQYSSQPYTFGQGT KVEIK
42	OX40(8H9) VH	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI <u>SWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGR</u> VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYG <u>WMDYWGQGTTVTVSS</u>
43	OX40(8H9) VL	DIQMTQSPTLSASVGDRVTIT <u>CRASQSISSWLA</u> <u>WYQQKPGKAPKLIYDASSLES</u> GVP ^R FSGSGSG TEFTLTISLQPDDFATYYCQQYLTSRFTFGQGT KVEIK
44	OX40(1G4) VH	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI <u>SWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGR</u> VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYG <u>SMDYWGQGTTVTVSS</u>
45	OX40(1G4) VL	DIQMTQSPTLSASVGDRVTIT <u>CRASQSISSWLA</u> <u>WYQQKPGKAPKLIYDASSLES</u> GVP ^R FSGSGSG TEFTLTISLQPDDFATYYCQQYISYSMLTFGQGT KVEIK
46	OX40(20B7) VH	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI <u>SWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGR</u> VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARVNY <u>PYSYWGDFDYWGQGTTVTVSS</u>
47	OX40(20B7) VL	DIQMTQSPTLSASVGDRVTIT <u>CRASQSISSWLA</u> <u>WYQQKPGKAPKLIYDASSLES</u> GVP ^R FSGSGSG TEFTLTISLQPDDFATYYCQQYQAFSLTFGQGT KVEIK
48	OX40(CLC-563) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM <u>SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGR</u> FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCALDV <u>GAFDYWGQGALTVSS</u>
49	OX40(CLC-563) VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGQGT KVEIK
50	OX40(CLC-564) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM <u>SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGR</u> FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAFDV <u>GPFDYWGQGTLTVSS</u>

[0338]

서열 번호	명칭	서열
51	OX40(CLC-564) VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRATGIPDRFSGSGSG</u> TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQY <u>GSSPLTFGQGTK</u> VEIK
52	OX40(17A9) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT <u>FSSYAM</u> <u>SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSTYYADSVKGR</u> FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARVFY</u> <u>RGGVSMDYWGGT</u> LTVSS
53	OX40(17A9) VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITC <u>QGDSSLRSYYASW</u> YQQKPGQAPVLIY <u>GKNRPSGIPDRFSGSSGN</u> TASLTITGAQAEDEADYYC <u>CNSRVMPHNRVFGGG</u> TKLTV
54	HC 1 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc 旨 VH (4B9)	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGR VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYY RGPYDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAA <u>LGCLVKDYFPEPVTVWSN</u> SGALTSGV HTFP <u>AVLQSSGLYSLSVV</u> TPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDDKVEPKSCDGGGGGGGGSQVQ LVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI <u>SWV</u> RQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTIT ADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYYRGP YDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVWSN <u>SGALTSGV</u> HFP AVLQSSGLYSLSVV <u>TPSSSLGTQTYICNV</u> NHKP SNTKVDDKVEPKSCDKTH <u>TCP</u> CPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVGVEVHN <u>AKTKPREEQYN</u> STYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI <u>SK</u> AKGQPREPQVYTLPPCRDELT <u>KNQVSL</u> WCLVKG FYPSDIAVEWESNGQ <u>PENNY</u> KTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRW <u>QQGNF</u> SCVMHEALHNHYT QKSLSLSPGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQL LESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT <u>FSSYAM</u> SWV RQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWF <u>GG</u> FNYWGQGTLTVSS

[0339]

서열 번호	명칭	서열
55	HC 2 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc 혹은 VL (4B9)	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGR VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYY RGPYDYWGQGTTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWNNSGALTSGV HTFPALQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGGGGGGSQVQ LVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIISWV RQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTIT ADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYYRGP YDYWGQGTTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVWNNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNVNHP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLCAVKG YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEIVLTQ SPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQK PGQAPRLLINVGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK
56	LC (49B4)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLA WYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSG TEFTLTISLQPDDFATYYCQQYSSQPYTFQGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

[0340]

서열 번호	명칭	서열
57	HC 1 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc 혹은 VH (28H1)	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGR VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYY RGPYDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAAALGCLVKDYZFPEPVTVWSNSGALTSGV HTFPALQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPPCPAEEAGGPS LVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIISWV RQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTIT ADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYYRGP YDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYZFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNVNHP SNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPPCPAEEAGGPS VFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQL LESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSHAMSWV RQAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGN FDYWGQGTLTVSS

[0341]

서열 번호	명칭	서열
58	HC 2 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc 혹은 VL (28H1)	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGR VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYY RGPYDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAAALGCLVKDYZFPEPVTVWSNSGALTSGV HTFPALQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPPCPAEEAGGPS LVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIISWV RQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTIT ADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYYRGP YDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYZFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNVNHP SNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPPCPAEEAGGPS VFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEIVLTQ SPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQK PGQAPRLLIIIGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQQGVIPPTFGQGTKVEIK

[0342]

서열 번호	명칭	서열
59	HC 1 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc 혹은 VL (4B9)	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGR VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYY RGPYDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAAALGCLVKDYZFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS LVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIISWV RQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTIT ADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYYRGP YDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYZFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPVQVTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVHEALHNHYT QKSLSLSPGGGGSGGGGGSGGGGGSEIVLT QSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQ KPGQAPRLLINVGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTVKEIK

[0343]

서열 번호	명칭	서열
60	HC 2 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc 혹은 VH (4B9)	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGR VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYY RGPYDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAAALGCLVKDYZFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS LVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIISWV RQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTIT ADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYYRGP YDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYZFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPVQVTLPPSRDELTKNQVSLCAVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFF VSKLTVDKSRWQQGNVFCSVHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGSGGGGGSGGGGGSEVQL ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGF NYWGQGTLTVSS

[0344]

서열 번호	명칭	서열
61	HC 1 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc wt 놈 VH (4B9)	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGR VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYY RGPYDYWGQQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDDKVEPKSCDGGGGGGGGSQVQ LVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIISWV RQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTIT ADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYYRGP YDYWGQQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAWESENQNPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLL ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAIIIGSASTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGF NYWGQGTLVTVSS

[0345]

서열 번호	명칭	서열
62	HC 2 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc wt 흑 VL (4B9)	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGR VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYY RGPYDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSQVQ LVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIWV RQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTIT ADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYYRGP YDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPPKPKDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKA KGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLCAVKGFY PSDIAWEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLV SKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQK SLSLSPGGGGSGGGGGGGGGGGSEIVLTQS PGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKP GQAPRLLINVGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK
63	CD3-HCDR1	TYAMN
64	CD3-HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG
65	CD3-HCDR3	HGNFGNSYVSWFAY
66	CD3-LCDR1	GSSTGAVTTSNYAN
67	CD3-LCDR2	GTNKRAP
68	CD3-LCDR3	ALWYSNLWV
69	CD3 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAM NWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSV KGRFTISRDDSNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCV RHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLTVSS
70	CD3 VL	QAVVTQEPLTVSPGGTVLTCGSSTGAVTTSNY ANWVQEKGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGS LLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVF GGGTKLTVL
71	CEA-HCDR1	EFGMN
72	CEA-HCDR2	WINTKTGEATYVEEFKG

[0346]

서열 번호	명칭	서열
73	CEA-HCDR3	WDFAYYVEAMDY
74	CEA-LCDR1	KASAAAVGTYVA
75	CEA-LCDR2	SASYRKR
76	CEA-LCDR3	HQYYTYPLFT
77	CEA VH	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTEFG <u>MNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEF</u> <u>KGRVTFTTDSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR</u> <u>WDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSS</u>
78	CEA VL	DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCKASA <u>Avgtyva</u> WYQQKPGKAPKLLIYSASYRKRGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQG TKLEIK
79	CEA-HCDR1 (CEACAM5)	DTYMH
80	CEA-HCDR2 (CEACAM5)	RIDPANGNSKYVPKFQG
81	CEA-HCDR3 (CEACAM5)	FGYYVSDYAMAY
82	CEA-LCDR1 (CEACAM5)	RAGESVDIFGVGFLH
83	CEA-LCDR2 (CEACAM5)	RASN RAT
84	CEA-LCDR3 (CEACAM5)	QQT NEDPYT
85	CEA VH (CEACAM5)	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGFNIKDTY MHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKF QGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPF GYYVSDYAMAYWGQGTLTVSS
86	CEA VL (CEACAM5)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGF LHWYQQKPGQAPRLLIYRASN RATGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTNEDPYTFGQG TKLEIK
87	Light 쇄 ,,CEA _{2F1} ” (CEA TCB)	DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCKASA <u>Avgtyva</u> WYQQKPGKAPKLLIYSASYRKRGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFRNRGEC

[0347]

서열 번호	명칭	서열
88	경쇄 인간화된 CD3 _{CH2527} (Crossfab, VL- CH1) (CEA TCB)	QAVVTQEPLTVSPGGTTLTCGSSTGAVTSNY <u>ANWVQEKGQAFRGLIGTNKRAPGTPARFSGS</u> LLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYC <u>ALWYSNLWVF</u> GGGTKLTVLSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPABL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSC
89	CEA _{CH1A1A 98/99} — 인간화된 CD3 _{CH2527} (Crossfab VH- Ck) — Fc(旨) P329GLALA (CEA TCB)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFG <u>MNWRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEF</u> <u>KGRVTFTTDSTSTAYMELRSLSDDTAVYYCAR</u> <u>WDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVF</u> PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGGG GGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFST <u>YAMNWVRQAPGKGLEWVSRISKYNNYATYYA</u> <u>DSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY</u> YCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLTVSSASV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRN GECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPDKTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALGAPIEKTIKAKGQQREPQVYT LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
90	CEA _{CH1A1A 98/99} (VH-CH1) — Fc(旨) P329GLALA (CEA TCB)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFG MNWRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEF KGRVTFTTDSTSTAYMELRSLSDDTAVYYCAR WDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPDKTL MISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTIKAKGQQREPQVCTLPPSRDELTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGVFCSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK

[0348]

서열 번호	명칭	서열
91	CD3 VH-CL (CEACAM5 TCB)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
92	인간화된 CEA VH-CH1(EE)-Fc (HttpServletRequest, P329G LALA) (CEACAM5 TCB)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVEDYFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPL
93	인간화된 CEA VH-CH1(EE)-CD3 VL-CH1-Fc (HttpServletRequest, P329G LALA) (CEACAM5 TCB)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVEDYFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPL

[0349]

서열 번호	명칭	서열
94	인간화된 CEA VL-CL(RK) (CEACAM5 TCB)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGF LHWYQQKPGQAPRLLIYRASN RATGIPARFSGSG SGTDFLTISLEPEDFAVYYCQQTNEDPYTFGQG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSLTL SKADYEHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
95	(CH2527) CD3-HCDR1	TYAMN
96	(CH2527) CD3-HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG
97	(CH2527) CD3-HCDR3	HGNFGNSYVSWFAY
98	(16D5) FolR1-HCDR1	NAWMS
99	(16D5) FolR1-HCDR2	RIKS KTDGGTTDYAAPVKG
100	(16D5) FolR1-HCDR3	PWEWSWYDY
101	(CH2527-VL7-46-13)- LCDR1	GSSTGAVTTSNYAN
102	(CH2527-VL7-46-13)- LCDR2	GTNKRAP
103	(CH2527-VL7-46-13)- LCDR3	ALWYSNLWV
104	(CH2527) CD3 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAM NWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSV KGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCV RHGNFGNSYVSWFAYWGQQTLTVSS
105	(16D5) FolR1 VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAW MSWVRQAPGKGLEWVGRIKS KTDGGTTDYAAP VKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCT TPWEWSWYDYWGQQTLTVSS
106	(CH2527-VL7-46-13)VL	QAVVTQEPLTVSPGGTVLTCGSSTGAVTTSNY ANWVQEKGQAFRGLIGTNKRAPGTPARFSGS LLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVF GGGTKLTVL

[0350]

서열 번호	명칭	서열
107	(16D5)VH-CH1- (CH2527)VH-CH1 Fc 韶 PGLALA	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAW MSWVRQAPGKGLEWVGRIGSKTDGGTTDYAAP VKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCT TPWEWSWYDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWNSG ALTSGVHTPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGG GSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTY AMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYAD SVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC VRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKDLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALGAPIEKTIKAKGQPREPVYTLPPCRDEL TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
108	(16D5)VH-CH1-Fc PGLALA H435R-Y436F	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAW MSWVRQAPGKGLEWVGRIGSKTDGGTTDYAAP VKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCT TPWEWSWYDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWNSG ALTSGVHTPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPPKDLMISRTPEVTCVV DVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTIKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQV SLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNRTQKSLSLSPGK
109	(CH2527-VL7-46-13)VL-CL (공통 경쇄)	QAVVTQEPLTVSPGGTVLTCGSSTGAUTTSNY ANWVQEKGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGS LLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVF GGGTLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKAT LVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPS KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS

[0351]

서열 번호	명칭	서열
110	인간 PD-L1 (유니프롯 Q9NZQ7)	MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGS NMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQI TDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAP YNキンQRLVVDPTSEHELTCAEGYPKAELVIW TSSDHQVLSGKTTTNSKREEKLFNVTSTLRINT TTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELP LAHPPNERTHLVLIGAILLCLGVALTFIFRLRKGR MMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET
111	인간 PD-1 (유니프롯 Q15116)	MQIPQAPWPVVAVLQLGWRPGWFLSPDRPW NPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNW YRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQL PNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQ IKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPRPAGQFQT LVVGVVGGLLGSVLVVWVLAIVCSRAARGTIGA RRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELEDFQWREKTPE PPVPCVPEQTEYATIVFPGMTSSPARRGSADGP RSAQPLRPEDGHCSWPL
112	VH (PD-L1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWI HWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKG RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARR HWPGGF DYWGQGTLTVSS
113	VL (PD-L1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFYSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTK VEIK
114	VH (PD-L1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYW MSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR EGGWFGE LAFDYWGQGTLTVSS
115	VL (PD-L1)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGS LPWTFGQGT KVEIK
116	VH (PD-1)	QVQLVQSGVEVKPGASVKVSCKASGYTFTNY YMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKF KNRVTLTTDSSTTAYMELKSLQFDDTAVYYCAR RDYRFDMGFDYWGQGTTTVSS
117	VL (PD-1)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYS YLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLESGVPARFSGS GSGTDFLTISLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGG GTKVEIK

서열 번호	명칭	서열
118	VH (PD-1)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSG MHWVRQAPGKGLEWAVIWIYDGSKRYYADSV KGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAT NDDYWGQQGTLTVSS
119	VL (PD-1)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQS VSSY LAW YQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGT DFTLTISSEPEDFAVYYCQQSSNW PRTFGQGTK VEIK
120	인간 (hu) FAP	유니프로 번호 Q12884
121	hu FAP 액토도메인+poly-lys-tag+his ₆ -tag	RPSRVHNSEENTMRALTLKDILNGTFSYKTFFPN WISGQEYLHQ\$ADNNIVLYNIETGQS YTI LS NRT MKS VNA S NYGLSPDRQFVYLES DY SKLW RY SYT ATYYIYDLSN GEFVRGNELPRPIQYLCWSPVGSK LAYVYQNNIYLKQR PGDPPFQITFNGREN KIFNGI PDWVYEEMLATKYALWWSPNGKFLAYAEFND TDIPVI AYSYYGDEQYPR TINIPYPKAGAKNPVVR IFIIDTTYPAYVGPQE VPV PAMIASSDYYFSWLTW VTDERVCLQWLKRVQNVS VLSICDFREDWQTW DCPKTQE HIEESRTG WAGG FFVSTPVFSYDAISY YKIFSDKDGYKHIHYIKDTVENAIQITSGKWEAI NIFRVTQDSL FYSSNEFE EYPGRRNIYRISIGSYPP SKKCVTCHLRKERCQYYTASFSDYAKYYALVCY GPGIPISTLHDGRTDQEIKILEENKELENALKNIQL PKEEIKKLEVDEITLWYK MILPPQFDRSKYPLI QVYGGPCSQSVRSVFAVN WISY LASKEGMVIAL VDGRGTA FQGD KLLYAVYRKLGVYEVEDQITAV RKFIEMGFIDEKRIAIWGWSYGGYVSSLALASGT GLFKCGIAV PSSWE YYASVYTERFMGLPTKD DNLEHYKNSTVMARA EYFRNV D YLLIHGTADD NVHFQNSAQIAKALVNAQDFQAMWYSDQNH GLS GLSTN HLYTHMTHFLKQCFSL SDG KKKKK GHHHHHH
122	마우스 FAP	유니프로 번호 P97321

[0353]

서열 번호	명칭	서열
123	뮤린 FAP 엑토도메인+poly-lys-tag+his ₆ -tag	RPSRVYKPEGNTKRALTLKDILNGTFSYKTYFPN WISEQEYLHQSEDDNIVFYNIETRESYIILSNSTM KSVNATDYGLSPDRQFVYLESDYSKLWRYSYTA TYYIYDLQNGEFVRGYELPRPIQYLCWSPVGSKL AYVYQNNIYLKQRPGDPPFQITYTGRENRFNGIP DWVYEEEMLATKYALWWSPDGKFLAYVEFNDS DIPIIAYSYYGDGQYPRTINIPYPKAGAKNPVVRV FIVDTTYPHHVGPMEVPPVPEMIASSDYYFSWLT WVSSERVCLQWLKRVQNVSVLSICDFREDWHA WECPKNQEHVEESRTGWAGGFFVSTPAFSQDAT SYYKIFSDKDGYKHHIYIKDTVENAIQITSGKWE AIYIFRVTQDSLFFYSSNEFEGYPGRRNIYRISIGNS PPSKKCVTCHLRKERCQYYTASFYKAKYYALV CYGPGPLPISTLHDGRTDQEIQVLEENKELENSLR NIQLPKVEIKKLKDGGGLTFWYKMLPPQFDRSKK YPLLIQVYGGPCSQSVKSFAVNWITYLASKEGI VIALVDGRGTAFAQGDKFLHAVYRKLGVYEVEDQ LTAVRKFIEMGFIDEERIAIWGWSYGGYVSSLAL ASGTGLFKCGIAVAPVSSWEYYASIYSERFMGLP TKDDNLEHYKNSTVMARAELYFRNDYLLIHGT DDNVHFQNSAQIAKALVNAQVDFQAMWYSDQ NHGILSGRSQNHLYTHMTHFLKQCFSLSDGKKKK KKKGHHHHHH
124	시노몰구스 FAP 엑토도메인+poly-lys-tag+his ₆ -tag	RPPRVHNSEENTMRALTLKDILNGTFSYKTFFPN WISGQEYLHQSADENNIVLYNIETGQSYTILSNRT MKSVNASNYGLSPDRQFVYLESDYSKLWRYSYT ATYYIYDLNSNGEFVRGNELPRPIQYLCWSPVGSK LAYVYQNNIYLKQRPGDPPFQITFNGRENKIFNGI PDWVYEEEMLATKYALWWSPNGKFLAYAEFND TDIPVIAYSYYDEQYPRTINIPYPKAGAKNPVVR IFIIDTTPAYVGPQEVPPAMIASSDYYFSWLT VTDERVCLQWLKRVQNVSVLSICDFREDWQT DCPKTQEHEESRTGWAGGFFVSTPVFSYDAISY YKIFSDKDGYKHHIYIKDTVENAIQITSGKWEAI NIFRVTQDSLFFYSSNEFEDYPGRRNIYRISIGSYPP SKKCVTCHLRKERCQYYTASFSDYAKYYALVCY GPGIPISTLHDGRTDQEIKILEENKELENALKNIQL PKEEIKKLEVDEITLWYKMLPPQFDRSKYPLLI QVYGGPCSQSVRSVFAVNWISYLASKEGMVIAL VDGRGTAFAQGDKLLAVYRKLGVYEVEDQITAV RKFIEMGFIDEKRIA_IWGWSYGGYVSSLALASGT GLFKCGIAVAPVSSWEYYASVYTERFMGLPTKD DNLEHYKNSTVMARAELYFRNDYLLIHGTADD NVHFQNSAQIAKALVNAQVDFQAMWYSDQNH GLSGLSTNHLYTHMTHFLKQCFSLSDGKKKKKK GHHHHHH

[0354]

서열 번호	명칭	서열
125	인간 CEA	유니프롯 번호 P06731
126	인간 FolR1	유니프롯 번호 P15328
127	뮤린 FolR1	유니프롯 번호 P35846
128	시노몰구스 FolR1	유니프롯 번호 G7PR14
129	인간 MCSP	유니프롯 번호 Q6UVK1
130	인간 CD3 ϵ	유니프롯 번호 P07766
131	시노몰구스 CD3 ϵ	NCBI 유전자 은행 번호 BAB71849.1 유니프롯 Q05LI5
132	G4S 웹티드 링커	GGGGS
133	(G4S)2	GGGGSGGGGS
134	(SG4)2	SGGGGSGGGG
135	웹티드 링커	GGGGSGGGGSGGGG
136	웹티드 링커	GSPGSSSSGS
137	(G4S) ₃ 웹티드 링커	GGGGSGGGGSGGGS ₃
138	(G4S) ₄ 웹티드 링커	GGGGSGGGGSGGGSGGGS
139	웹티드 링커	GSGSGSGS
140	웹티드 링커	GSGSGNGS
141	웹티드 링커	GGSGSGSG
142	웹티드 링커	GGSGSG
143	웹티드 링커	GGSG
144	웹티드 링커	GGSGNGSG
145	웹티드 링커	GGNGSGSG
146	웹티드 링커	GGNGSG

[0355]

[0356]

인간 면역 글로불린 경쇄 및 중쇄의 뉴클레오티드 서열에 관한 일반적 정보는 문헌[Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에 제공된다. 항체 쇄의 아미노산은 상기에 정의된 바와 같이 카바트에 따른 넘버링 시스템에 따라 넘버링되고 지정된다(문헌[Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]).

[0357]

실시예

[0358]

하기는 본 발명의 방법 및 조성물의 실시예이다. 상기에 제공된 일반적 설명을 고려하여 다양한 다른 실시양태를 실행할 수 있음이 이해된다.

[0359]

제조합 DNA 기법

[0360]

문헌[Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989]에 기재된 바와 같은 표준 방법을 사용하여 DNA를 조작하였다. 분자 생물학 시약을 제조사의 설명서에 따라 사용하였다. 인간 면역 글로불린 경쇄 및 중쇄의 뉴클레오티드 서열에 관한 일반적인 정보는 문헌[Kabat, E.A. et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest,

Fifth Ed., NIH Publication No 91-3242]에 제공되어 있다.

[0361] DNA 서열분석

[0362] DNA 서열을 이중 가닥 서열분석에 의해 결정하였다.

[0363] 유전자 합성

[0364] 목적하는 유전자 분절을 적합한 주형을 사용하여 PCR에 의해 생성시키거나, 자동화된 유전자 합성에 의해 합성 올리고뉴클레오티드 및 PCR 산물로부터 진아트 아게(Geneart AG, 독일 로젠스부르크 소재)에 의해 합성하였다. 정확한 유전자 서열을 입수할 수 없는 경우에, 올리고뉴클레오티드 프라이머를 가장 가까운 상동체로부터의 서열에 기반하여 설계하고 적합한 조작으로부터 기원하는 RNA로부터 RT-PCR에 의해 유전자를 단리하였다. 단일 제한 엔도뉴클레아제 절단 부위가 측면에 인접한 유전자 분절을 표준 클로닝/서열분석 백터 내에 클로닝하였다. 상기 플라스미드 DNA를 형질전환된 세균으로부터 정제하고 UV 분광학에 의해 농도를 측정하였다. 서브클로닝된 유전자 단편의 DNA 서열을 DNA 서열분석에 의해 확인하였다. 유전자 분절을 각각의 발현 백터 내로의 서브클로닝을 허용하기에 적합한 제한 부위로 설계하였다. 모든 구축물을 진핵생물 세포에서의 분비를 위해 단백질을 표적화하는 리더 웨이프티드를 암호화하는 5'-단부 DNA 서열로 설계하였다.

[0365] 세포 배양 기술

[0366] 표준 세포 배양 기술을 문헌[Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. and Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc]에 기재된 바와 같이 사용하였다.

[0367] 단백질 정제

[0368] 단백질을 표준 프로토콜을 참조하여 여과된 세포 배양 상청액으로부터 정제하였다. 간단히, 항체를 단백질 A 세파로스(Sephadex) 컬럼(지이 헬쓰케어)에 적용시키고 PBS로 세척하였다. 항체의 용출을 pH 2.8에서 성취한 다음 샘플을 즉시 중화시켰다. 응집된 단백질을 PBS 중에서 또는 20 mM 히스티딘, 150 mM NaCl pH 6.0 중에서 크기 배제 크로마토그래피(수퍼덱스(Superdex) 200, 지이 헬쓰케어)에 의해 단량체성 항체로부터 분리시켰다. 단량체성 항체 분획을 모으고, 예를 들어 밀리포어 아미콘 울트라(MILLIPORE Amicon Ultra)(30 MWCO) 원심분리 농축기를 사용하여 농축시키고(필요한 경우), 동결시키고 -20°C 또는 -80°C에서 저장하였다. 상기 샘플의 부분을 예를 들어 SDS-PAGE, 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 또는 질량 분광분석법에 의한 후속의 단백질 분석 및 분석학적 특성규명을 위해 제공하였다.

[0369] SDS-PAGE

[0370] NuPAGE(등록상표) Pre-Cast 젤 시스템(인비트로젠(Invitrogen))을 제조사의 지시에 따라 사용하였다. 특히, 10% 또는 4 내지 12% NuPAGE(등록상표) 노벡스(Novex, 등록상표) 비스-트리스 Pre-Cast 젤(pH 6.4) 및 NuPAGE(등록상표) MES(환원된 젤, NuPAGE(등록상표) 산화방지제 러닝 완충제 첨가제와 함께) 또는 MOPS(환원되지 않은 젤) 러닝 완충제를 사용하였다.

[0371] 분석학적 크기 배제 크로마토그래피

[0372] 항체의 응집 및 올리고머성 상태의 측정을 위한 크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 HPLC 크로마토그래피에 의해 수행하였다. 간단히, 단백질 A 정제된 항체를 에이질런트(Agilent) HPLC 1100 시스템 상에서 300 mM NaCl, 50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7.5 중의 토소(Tosoh) TSKgel G3000SW 컬럼에 또는 다이오넥스(Dionex) HPLC-시스템 상에서 2xPBS 중의 수퍼덱스(수퍼덱스) 200 컬럼(지이 헬쓰케어)에 적용시켰다. 상기 용출된 단백질을 UV 흡광도 및 피크 면적의 적분에 의해 정량분석하였다. 바이오라드(BioRad) 젤 여과 표준 151-1901은 표준으로서 작용하였다.

[0373] 질량 분광분석법

[0374] 본 섹션은 올바른 조립체를 강조하면서 VH/VL 교환을 갖는 다종특이적 항체(VH/VL CrossMab)의 특성규명을 기재한다. 예상되는 1차 구조물을 탈글리코실화된 완전한 CrossMab 및 탈글리코실화된/플라스민 절단된 또는 대안적으로 탈글리코실화된/제한된 LysC 절단된 CrossMab의 전기분무 이온화 질량 분광분석법(ESI-MS)에 의해 분석하였다.

[0375] VH/VL CrossMab를 1 mg/ml의 단백질 농도에서 17시간 이하 동안 37°C에서 포스페이트 또는 트리스 완충제 중의

N-글리코시다제 F로 탈글리코실화시켰다. 플라스민 또는 제한된 LysC(로슈(Roche)) 절단을 각각 실온에서 120시간 동안 및 37°C에서 40분 동안 트리스 완충제(pH 8) 중의 100 µg의 탈글리코실화된 VH/VL CrossMab를 사용하여 수행하였다. 질량 분광분석에 앞서, 상기 샘플을 세파덱스(Sephadex) G25 컬럼(지이 헬쓰케어) 상에서 HPLC를 통해 탈염시켰다. 총 질량을 트라이벌사 나노메이트(Trivesta NanoMate) 소스(애드비온(Advion))가 구비된 maXis 4G UHR-QTOF MS 시스템(브루커 달토닉(Bruker Daltonik)) 상에서 ESI-MS를 통해 측정하였다.

[0376] 표면 플라스몬 공명(SPR)(비아코어)을 사용한, 각각의 항원에 대한 다중특이적 항체의 결합 및 결합 친화도의 결정

[0377] 각각의 항원에 대한 생산된 항체의 결합을 비아코어 기기(지이 헬쓰케어 바이오사이언시즈 에이비(스웨덴 융살라 소재))를 사용하여 표면 플라스몬 공명에 의해 조사하였다. 간략히, 친화도 측정을 위해, 염소-항-인간 IgG, JIR 109-005-098 항체를 각각의 항원에 대한 항체의 제시를 위해 아민 커플링을 통해 CM5 칩 상에 고정시킨다. 결합을 HBS 완충제(HBS-P(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.005% 트윈 20, pH 7.4)에서 25°C에서 (또는 대안적으로 37°C에서) 측정한다. 항원(알앤디 시스템즈(R&D Systems) 또는 사내 정제됨)을 다양한 농도로 용액에 첨가한다. 결합을 80초 내지 3분의 항원 주사에 의해 측정하였다; 해리를 칩 표면을 HBS 완충제로 3 내지 10분 동안 세척함으로써 측정하고, KD 값을 1:1 랭뮤어(Langmuir) 결합 모델을 사용하여 추산하였다. 음성 대조군 데이터(예를 들어 완충제 곡선)를, 시스템 내재 기선 드리프트의 보정을 위해 및 노이즈 신호 감소를 위해 샘플 곡선으로부터 감하였다. 각각의 비아코어 평가 소프트웨어를 센서그램의 분석 및 친화도 데이터의 계산을 위해 사용하였다.

실시예 1

항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체의 생산, 정제 및 특성규명

[0379] 항-FAP/항-OX40 이중특이적 항체를 WO 2017/055398 A2 또는 WO 2017/060144 A1에 기재된 바와 같이 생산하였다.

[0380] 특히, OX40에 대한 사가 결합 및 FAP에 대한 일가 결합을 갖는, WO 2017/060144 A1의 실시예 4.4에 따른 분자를 생산하였다. 높-인투-홀 기술을 적용하여 2개의 상이한 중쇄의 조립을 가능하게 하였다. 4+1 포맷의 이중특이적 항체의 개략도를 도 1A에 나타냈다.

[0381] 분자 A에서, 제1 중쇄(HC 1)는, 항-OX40 바인더 49B4의 2개의 Fab 유닛(VHCH1_VHCH1)에 뒤따르는, (G4S) 링커에 의해 항-FAP 바인더 4B9 VH 도메인에 융합된 Fc 놈 쇄로 구성되었다. 구축물의 제2 중쇄(HC 2)는 항-OX40 바인더 49B4의 2개의 Fab 유닛(VHCH1_VHCH1)에 뒤따르는, (G4S) 링커에 의해 항-FAP 바인더 4B9의 VL 도메인에 융합된 Fc 홀 쇄로 구성되었다. 따라서, 분자 A(FAP OX40 iMAB)는, 서열번호 54의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 55의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 4개의 서열번호 56의 경쇄를 포함한다.

[0382] 분자 B를 분자 A와 유사하게 생산하였으나, FAP 바인더 4B9를 FAP 바인더 28H1로 대체하였다. 분자 B는 서열번호 57의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 58의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 4개의 서열번호 56의 경쇄를 포함한다.

[0383] 분자 C에서, 제1 중쇄(HC 1)는, 항-OX40 바인더 49B4의 2개의 Fab 유닛(VHCH1_VHCH1)에 뒤따르는, (G4S) 링커에 의해 항-FAP 바인더 4B9의 VL 도메인에 융합된 Fc 놈 쇄로 구성되었다. 구축물의 제2 중쇄(HC 2)는, 항-OX40 바인더 49B4의 2개의 Fab 유닛(VHCH1_VHCH1)에 뒤따르는, (G4S) 링커에 의해 항-FAP 바인더 4B9의 VH 도메인에 융합된 Fc 홀 쇄로 구성되었다. 분자 C는 서열번호 59의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 60의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 4개의 서열번호 56의 경쇄를 포함한다.

[0384] 이들 모든 분자에서 Pro329Gly, Leu234Ala 및 Leu235Ala 돌연변이가 WO 2012/130831에 기재된 방법에 따라 Fc 감마 수용체에 대한 결합을 제거하도록 놈 및 홀 중쇄의 불변 영역에 도입된 반면에, 분자 D에서는 놈-인투-홀 돌연변이를 갖는 야생형 인간 IgG1 Fc 도메인이 사용되었다. 분자 D는 서열번호 61의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 62의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 4개의 서열번호 56의 경쇄를 포함한다.

[0385] 분자의 생산 및 특성규명은 WO 2017/060144 A1에 상세히 기재되어 있다.

실시예 2

T 세포 이중특이적(TCB) 항체의 생산, 정제 및 특성규명

[0386] TCB 분자를 WO 2014/131712 A1 또는 WO 2016/079076 A1에 기재된 방법에 따라 생산하였다.

- [0390] 실험에 사용된 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체(CEA CD3 TCB 또는 CEA TCB)의 생산은 WO 2014/131712 A1의 실시 예 3에 기재되어 있다. CEA CD3 TCB는 "2+1 IgG CrossFab" 항체이고, 2개의 상이한 중쇄 및 2개의 상이한 경쇄(이들 중 하나는 분자에 2회 존재함)로 구성된다. CH3 도메인의 점 돌연변이("놉-인투-홀")를 2개의 상이한 중쇄의 조립을 촉진하도록 도입하였다. CD3 결합 Fab에서 VH 및 VL 도메인의 교환은 2개의 상이한 경쇄의 정확한 조립을 촉진하기 위해 이루어졌다. 2+1은, 분자가 CEA에 특이적인 2개의 항원 결합 도메인 및 CD3에 특이적인 1개의 항원 결합 도메인을 갖는 것을 의미한다. CEACAM5 CD3 TCB는 유사한 포맷을 가지나, 또 다른 CEA 바인더를 포함하고, 경쇄의 정확한 페어링을 지지하기 위해 CD3 바인더의 CH 및 CL 도메인에서 점 돌연변이를 포함한다.
- [0391] CEA CD3 TCB는 서열번호 87의 아미노산 서열의 2개의 경쇄, 서열번호 88의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 서열번호 89의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 90의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 2+1 포맷의 이중특이적 항체의 개략도가 도 1C에 도시되어 있다. CEACAM5 CD TCB는 서열번호 91의 아미노산 서열의 2개의 경쇄, 서열번호 92의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 서열번호 93의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 94의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 2+1 포맷의 이중특이적 항체의 개략도는 도 1B에 도시되어 있다.
- [0392] 실험에 사용된 항-Fo1R1/항-CD3 이중특이적 항체(Fo1R1 CD3 TCB 또는 Fo1R1 TCB)의 생산은 WO 2016/079076 A1에 기재되어 있다. Fo1R1 CD3 TCB는 WO 2016/079076의 도 1D에 "Fo1R1 TCB 2+1 클래지컬(공통 경쇄)"로 도시되어 있고, 2개의 상이한 중쇄 및 3개의 동일한 VLCL 경쇄(공통 경쇄)로 구성된다. CH3 도메인의 점 돌연변이("놉-인투-홀")가 2개의 상이한 중쇄의 조립을 촉진하기 위해 도입되었다. 2+1은, 분자가 Fo1R1에 특이적인 2개의 항원 결합 도메인 및 CD3에 특이적인 1개의 항원 결합 도메인을 갖는 것을 의미한다. CD3 바인더는 Fab 중쇄의 C-말단에서 높 돌연변이를 포함하는 Fc 도메인의 제1 서브유닛의 N-말단에 융합된다.
- [0393] Fo1R1 CD3 TCB는 서열번호 107의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 108의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 3개의 서열번호 109의 공통 경쇄를 포함한다.
- [0394] 실시예 3
- [0395] 인간 면역 효과기 세포를 사용한 시험관내 공동-배양 분석
- [0396] T 세포의 면역 기능을 TCB(CEA CD3 TCB, CEACAM5 CD3 TCB 및 Fo1R1 CD3 TCB) 및 FAP OX40 iMab의 존재 하에 인간 면역 효과기 세포(휴지 중인 PBMC, CD4 또는 CD8 T 세포), 표적 항원 양성 종양 세포 및 FAP 양성 섬유아세포를 사용하여 시험관내 공동-배양 분석에서 시험하였다. 평가한 종양 세포주는 위암 세포주 MKN-45, 난소 선암종 세포주 SK-OV-3 및 자궁경부암 세포주 HeLa였다. 인간 FAP를 발현하도록 형질전환된 마우스 배아 섬유아세포 세포주 NIH/3T3을 FAP 양성 섬유아세포로서 사용하였다. 효과기 세포는 휴지 중인 인간 PBMC 및 단리된 휴지 중인 CD4 또는 CD8 T 세포였다. 일부 분석에서, TNF-α 센서 세포를 참가하여 TNF-α 유도를 모니터링하였다. 종양 세포 용해(동적 고 컨텐츠 라이프 이미징, 종점 유세포 분석법), 세포 표면 활성화 및 성숙 마커의 발현(종점 유세포 분석법) 및 시토카인 분비(동적 고 컨텐츠 라이프 이미징, 종점 혈구계산 비드 어레이)를 사용하여, TCB에 의해 유도되고 FAP OX40 iMAB(분자 A)에 의해 조절된 T 세포 기능의 정도를 모니터링하였다.
- [0397] a) 표적 세포주 및 섬유아세포
- [0398] SK-OV-3 세포(ATCC, 카탈로그 번호 HTP-77)는 자연히 폴레이트 수용체를 발현한다. HeLa NLR 세포(에센바이오사이언스, 카탈로그 번호 4489)는 자연히 폴레이트 수용체를 발현하고, MKN45 NLR 세포는 자연히 CEA를 발현한다. 세포주 모두는, 핵에 제한된 NucLight Red 형광 단백질을 안정하게 발현하는 에센 셀플레이어(Essen CellPlayer) NucLight Red 렌티 바이러스(에센바이오사이언스, 카탈로그 번호 4476; EF1α, 푸로마이신(Puromycin))의 온상이다. 이는 비-형광 효과기 T 세포 또는 섬유아세포로부터의 용이한 분리를 가능하게 한다. 측정한 적색 형광이 적핵의 수, 및 따라서 건강한 종양 세포의 수에 정비례하기 때문에, 고 처리량 라이프 형광 현미경 검사에 의한 종양 세포 용해 또는 증식의 실시간 평가가 가능하다.
- [0399] HeLa NucLight Red(NLR) 세포를 10% 소태아 혈청(FBS, 핍코 바이 라이프 테크놀로지(핍코 바이 라이프 테크놀로지), 카탈로그 번호 16000-044, Lot 941273, 감마-조사됨, 무-마이코플라스마, 56°C에서 35분 동안 열 불활성화됨), 1% (v/v) GlutaMAX I(핍코 바이 라이프 테크놀로지스, 카탈로그 번호 35050 038) 및 1 mM 나트륨-피루베이트(시그마(시그마), 카탈로그 번호 S8636)를 함유하는 DMEM(핍코(GIBCO), 카탈로그 번호 42430-082)에서 배양하였다.

[0400]

MKN45 NucLight Red(NLR) 세포는 자연히 CEA를 발현한다. MKN45 NucLight Red 세포를, 10% 소태아 혈청(FBS, 핍코 바이 라이프 테크놀로지, 카탈로그 번호 16000-044, 감마-조사됨, 무-마이코플라스마, 및 56°C에서 35분 동안 열 불활성화됨), 1% (v/v) GlutaMAX I(깁코 바이 라이프 테크놀로지스, 카탈로그 번호 35050 038), 1 mM 나트륨 피루베이트(시그마, 카탈로그 번호 S8636) 및 0.5 μ g/mL 푸로마이신(시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 카탈로그 번호 ant-pr-1)을 함유하는 DMEM(깁코, 카탈로그 번호 42430-082)에서 배양하였다. MKN-45(DSMZ; ACC409)를 에센 셀플레이어 NucLight Red 렌티 바이러스 시약(에센바이오사이언스, 카탈로그 번호 4476; EF1 a, 푸로마이신)에 의해 5의 MOI(TU/세포)에서 8 μ g/mL 폴리브렌의 존재 하에 제조사의 지시에 따라 형질도입시켜 핵-제한된 NucLight Red 형광 단백질을 안정하게 발현하였다. 이는 비-형광 효과기 T 세포 또는 섬유아세포로부터의 용이한 분리 및 고 처리량 라이프 형광 현미경 검사에 의한 종양 세포 성장의 모니터링을 가능하게 하였다. 따라서, 시간에 따른 웨일 당 정량화는 종양 세포 용해 또는 증식의 실시간 평가를 가능하게 하였다.

[0401]

세포 표면 FAP에 의한 FAP 결합 항체의 가교결합은 인간 섬유아세포 활성화 단백질(huFAP) 발현 NIH/3T3-huFAP 클론 19에 의해 제공되었다. 이러한 세포주를, huFAP를 발현하도록 발현 벡터 pETR4921에 의해 마우스 배아 섬유아세포 NIH/3T3 세포주(ATCC CRL-1658)를 형질감염시킴으로써 생산하였다. 세포를 10% 송아지 혈청(시그마-알드리치, 카탈로그 번호 C8056-500ml, 감마-조사됨, 무-마이코플라스마, 및 56°C에서 35분 동안 열 불활성화됨) 및 1.5 μ g/mL 푸로마이신(시그마-알드리치, 카탈로그 번호 ant-pr-1)을 함유하는 DMEM(깁코, 카탈로그 번호 42430-082)에서 배양하였다.

[0402]

b) 효과기 세포의 생산

[0403]

버피 코트를 취리히 헌혈 센터로부터 입수하였다. 신선한 말초혈 단핵 세포(PBMC)를 단리하기 위해, 상기 버피 코트를 동일 부피의 DPBS(깁코 바이 라이프 테크놀로지스, 카탈로그 번호 14190 326)로 회석하였다. 50 mL 폴리프로필렌 원심분리 튜브(TPP, 카탈로그 번호 91050)를 15 mL 히스토페크(Histopaque) 1077(시그마 라이프 사이언스(SIGMA Life Science), 카탈로그 번호 10771, 폴리슈크로스 및 나트륨 다이아트라이조에이트, 1.077 g/mL의 밀도로 조정됨)로 보충하고, 상기 버피 코트 용액을 상기 히스토페크 1077 상에 적층하였다. 상기 튜브를 30분 동안 400 x g에서 실온에서 저 가속화와 함께 쉬는 시간 없이 원심분리하였다. 이후, PBMC를 계면으로부터 수집하고 3회 DPBS로 세척하고, 10% 소태아 혈청(FBS, 핍코 바이 라이프 테크놀로지, 카탈로그 번호 16000-044, Lot 941273, 감마-조사됨, 무-마이코플라스마, 및 56°C에서 35분 동안 열 불활성화됨), 1% (v/v) GlutaMAX I(깁코 바이 라이프 테크놀로지스, 카탈로그 번호 35050 038), 1 mM 나트륨 피루베이트(시그마, 카탈로그 번호 S8636), 1% (v/v) MEM 비필수 아미노산(시그마, 카탈로그 번호 M7145) 및 50 μ M β -мер캅토에탄올(시그마, M3148)로 보충된 RPMI 1640 배지(깁코 바이 라이프 테크놀로지, 카탈로그 번호 42401-042)로 이루어진 T 세포 배지에 재현탁하였다. 일부 경우에, RPMI1640을, 백그라운드 형광이 감소된, 개선된 고 컨텐츠 라이브 현미경 검사를 위해 플루오로브라이트(FluoroBrite) DMEM 배지(깁코, 인비트로젠, 카탈로그 번호 A18967-01)로 대체하였다.

[0404]

휴지 중인 CD4 T 세포 또는 CD8 T 세포를 각각 제조사의 지시에 따라, 본래 그대로의 인간 CD4+ T 세포 단리 키트(밀테나이(Miltenyi), 카탈로그 번호 130-096-533) 및 본래 그대로의 인간 CD8+ T 세포 단리 키트(밀테나이, 카탈로그 번호 130-096-495)를 사용하여 단리하는 동안에, PBMC를 단리 직후 효과기 세포(휴지 중인 인간 PBMC) 또는 소분획물로서 사용하였다. 간략히, 인간 PBMC를 8분 동안 400 x g에서 4°C에서 원심분리하고, 1회 MACS 완충제(PBS + BSA(0.5% v/w, 시그마-알드리치, 카탈로그 번호 A9418) + EDTA([2 nM], Ambion, AM9261))로 세척하였다. 펠럿을 각각의 제공된 스트렙타비딘 라벨링된 음성 항체 칵테일에 의해 재현탁하고 5분 동안 4°C에서 항온처리한 후에(1×10^7 세포 당 40 μ L MACS 완충제 및 10 μ L 항체 믹스), 10분 동안 4°C에서 비오티닐화된 자성 포착 비드와 함께 후속 항온처리가 뒤따랐다(1×10^7 세포 당 30 μ L MACS 완충제 및 20 μ L 비드 믹스). 라벨링된 비-CD4 또는 비-C8 T 세포를, 제조사의 지시에 따라 LS 컬럼(밀테나이, 카탈로그 번호 130-042-401)을 사용하여 자성 분리에 의해 제거하였다. 각각 라벨링되지 않은 휴지 중인 CD4 및 CD8 T 세포를 함유하는 컬럼 통과액을 원심분리하고 상기에 기재된 바와 같은 MACS 완충제로 1회 세척하였다. 세포를 RPMI1640 또는 플루오로브라이트(Fluorobright) DMEM 기반 T 세포 배지에서 2 mio 세포/mL로 조정하였다.

[0405]

c) TNF- α 센서 세포

[0406]

TNF- α 센서 세포는, NF κ B 민감성 프로모터 요소의 제어 하에 녹색 형광 단백질(GFP)을 암호화하는 리포터 플라스미드 pETR14327에 의해 형질도입된 HEK 293T 세포(ATCC, 카탈로그 번호 xxx)였다. HEK 293T 세포는 활성화된 T 세포에 의해 분비된 TNF- α 가 결합할 수 있는 TNF 수용체를 자연히 발현한다. 이는 NF κ B의 투여량의

존성 활성화 및 핵의 전좌를 야기하고, 이는 차례로 투여량 의존성 GFP 생산을 스작동시킨다. GFP 형광은 시간에 따른 고 쳐리량 라이프 형광 현미경 검사에 의해 정량화될 수 있고, 따라서 TNF-α 분비의 실시간 평가를 가능하게 한다.

[0407] TNF-α 센서 세포주는, HEK293T 세포(ATCC; CRL-3216)의 렌티 바이러스 형질도입에 의해 생산된다. 렌티 바이러스-기반 바이러스 벡터를, 렌티 바이러스 패키징 플라스미드, 및 최소 시토메갈로 바이러스(mCMV) 프로모터에 커플링된 녹색 형광 단백질(GFP)을 암호화하는 렌티 바이러스 발현 벡터(pETR14372)에 의해 NF κ B 컨센서스 전사 반응 요소와 함께 HEK293T 세포의 공동-형질감염시킴으로써 생산하였다. HEK293T 세포 내로 플라스미드 형질감염을 제조사의 지시에 따라 리포펙타민 LTX(라이프 테크놀로지스(Life Technologies))를 사용하여 수행하였다. 형질감염을 형질감염 전날에 6×10^5 세포/웰로 시딩된 6-웰 플레이트에서 2.5 μg 의 플라스미드 DNA를 사용하여 수행하였다. 렌티 바이러스 벡터-함유 상청액을 48시간 후에 수집하고 0.45 μm 공극-크기의 폴리에터설폰 막을 통해 여과하였다. 안정한 발현 세포주를 생산하기 위해, HEK293T 세포를 6-웰 플레이트에 1.0×10^6 세포/웰로 시딩하고 1 mL의 바이러스 벡터-함유 상청액으로 덮어씌웠다. 형질도입을 800 x g에서 32°C에서 30분 동안 에펜도르프(Eppendorf) 원심분리 5810 테이블-탑(table-top) 원심분리기(에펜도르프)에서 회전접종에 의해 수행하였다. TNF-α 유도성 세포 클론을 FACS 분류(FACS ARIA, 벡튼, 디킨슨 앤 컴퍼니(Becton, Dickinson and Company))에 의해 수득하였다.

[0408] d) 세포 독성 및 T 세포 활성화 분석

[0409] 마우스 배아 섬유아세포 NIH/3T3-huFAP 세포, TNF-α 센서 세포 및 MKN45 NLR 세포를 10분 동안 37°C에서 세포 해리 완충제(인비트로젠, 카탈로그 번호 13151-014)를 사용하여 채취하였다. 세포를 1회 DPBS로 세척하였다. TNF-α 센서 세포 또는 섬유아세포를 4500 RAD의 용량을 사용하여 X-선 조사기에서 조사시켜 효과기 또는 종양 세포주의 후속 과성장을 방지하였다. 표적 세포주, NIH/3T3-huFAP 및 일부 분석에서 TNF-α 센서 세포를 0.1×10^5 세포/웰의 밀도로 T 세포 배지에서 멸균 96-웰 평저 부착 조직 배양 플레이트(TPP, 카탈로그 번호 92097)에서 밤새 37°C에서 및 5% CO₂에서 항온처리기(Hera Cell 150)에서 배양하였다.

[0410] 휴지 중인 인간 PBMC, 인간 CD4 T 세포, 인간 CD8 T 세포 또는 NLV-특이적 T 세포를 상기에 기재된 바와 같이 생산하고, 0.5×10^5 세포/웰의 밀도로 첨가하였다. 연속 희석물 열의 TCB(CEA CD3 TCB 또는 CEA CD3 TCB(2)) 및 고정된 농도의 FAP OX40 iMab(2 nM)를 웰 당 200 μL 의 총 부피까지 첨가하였다. 세포를 72시간 이하 동안 37°C 및 5% CO₂에서 항온처리기(Hera Cell 150)에서 공동-배양하였다.

[0411] 일부 분석에서, 플레이트를 3시간의 간격으로 72시간 이하 동안 37°C 및 5% CO₂에서 인큐사이트 줌 시스템(에센 바이오사이언스, HD 위상차, 녹색 형광 및 적색 형광, 10 x 대물렌즈)을 사용하여 형광 현미경 검사 고 컨텐츠 라이프 이미징에 의해 모니터링하였다. NLR⁺ 세포/웰의 양에 비례하는 건강한 종양 세포의 통합된 적색 형광(RCUxum2/이미지)을 인큐사이트 줌 소프트웨어를 사용하여 정량화하여 종양 세포 성장 대 T 세포에 의한 용해를 모니터링하였다. 값을 사용된 TCB 농도에 대해 각각의 시점 및 조건에 대하여 플롯팅하여 T 세포의 세포 용해 가능성에 대한 영향을 분석하였다.

[0412] TNF-α 센서 세포가 존재하는 일부 분석에서, 통합된 녹색 RCUxum2/이미지를 인큐사이트 줌 소프트웨어를 사용하여 정량화하여 TNF-α 센서 세포에 의한 GFP의 TNF-α 유도된 생산을 모니터링하였다. 값을 사용된 TCB 농도에 대해 각각의 시점 및 조건에 대하여 플롯팅하여 T 세포에 의한 TNF-α 분비에 대한 효과를 분석하였다.

[0413] 72시간 후에, 상청액을, 제조사의 지시에 따라 혈구계산 비드 어레이를 사용하여, 선택된 시토카인의 후속 분석을 위해 수집하였다. 평가한 시토카인은 IL-2(인간 IL-2 CBA Flex- set (비드 A4), 비디 바이오사이언스(BD Bioscience), 카탈로그 번호 558270), IL-17A(인간 IL-17A CBA Flex- set (비드 B5), 비디 바이오사이언스, 카탈로그 번호 560383), TNF-α(인간 TNF-α CBA Flex- set (비드 C4), 비디 바이오사이언스, 카탈로그 번호 560112), IFN-γ(IFN-γ CBA Flex- set (비드 E7), 비디 바이오사이언스, 카탈로그 번호 558269), IL-4(인간 IL-4 CBA Flex- set (비드 A5), 비디 바이오사이언스, 카탈로그 번호 558272), IL-10(인간 IL-10 CBA Flex- set (비드 B7), 비디 바이오사이언스, 카탈로그 번호 558274) 및 IL-9(인간 IL-9 CBA Flex- set (비드 B6), 비디 바이오사이언스, 카탈로그 번호 558333)였다.

[0414] 이후, 모든 세포를, 세포 해리 완충제에 의해 10분 동안 37°C에서 항온처리한 후에 400xg에서 4°C에서 원심분리 함으로써 웰로부터 탈착시켰다. 펠릿을 BSA(0.1% v/w, 시그마-알드리치, 카탈로그 번호 A9418)를 함유하는 매

우 찬 FACS 완충제(DPBS (깁코 바이 라이프 테크놀로지스, 카탈로그 번호 14190 326)로 세척하였다. 세포를, 형광 염료-접합된 항체 항-인간 CD4(클론 RPA-T4, 바이오레전드(BioLegend), 카탈로그 번호 300532), CD8(클론 RP-T8, 바이오레전드, 카탈로그 번호 3010441), CD62L(클론 DREG-56, 바이오레전드, 카탈로그 번호 304834), CD127(클론 019D5, 바이오레전드, 카탈로그 번호 A019D5), CD134(클론 Ber-ACT35, 바이오레전드, 카탈로그 번호 350008), CD137(클론 4B4-1, 바이오레전드, 카탈로그 번호 309814), GITR(클론 621, 바이오레전드, 카탈로그 번호 3311608) 및 CD25(클론 M-A251, 바이오레전드, 카탈로그 번호 356112)에 의해 20분 동안 4°C에서 FACS 완충제에서 표면-염색시켰다. 이어서, 이를 1회 FACS 완충제로 세척한 후에, 0.2 μg/mL DAPI(산타 크루즈 바이오텍(Santa Cruz Biotech), 카탈로그 번호 Sc-3598)를 함유하는 85 μL/웰 FACS 완충제에 재현탁한 후에, 이를 5-레이저 LSR-Fortessa(비디 바이오사이언스, DIVA 소프트웨어를 사용함)를 사용하여 동일한 날에 획득하였다. 살아있는 CD4 및 CD8 T 세포를 게이팅하고(DAPI-, NucLight RED-, CD4 또는 CD8+) 계수하고, 활성화 마커(CD134, CD137, GITR, CD25) 또는 성숙 마커(CD127, CD62L)의 평균 형광 강도(MFI) 또는 양성 세포의 백분율을 사용된 TCB 농도에 대해 각각의 조건에 대하여 플롯팅하여 T 활성화에 대한 효과를 분석하였다.

[0415] 결과

[0416] 3.1 T 세포 이중특이적 항체는 CD8 및 CD4 T 세포 상의 OX40의 투여량 의존성 상향조절을 유도한다.

[0417] 상이한 인간 면역 효과기 세포 제제(휴지 중인 PBMC, CD4 또는 CD8 T 세포, NLV 특이적 CD8 T 효과기 기억 세포)를 CEACAM5 CD3 TCB의 연속 희석물 열의 존재 하에 48시간 동안 MKN-45 NucLight Red 세포 및 조사된 NIH/3T3 huFAP와 함께 공동-배양하였다. 살아있는 종양 세포의 양을 인큐사이트 줌 시스템을 사용하여 형광 현미경 검사 고 컨텐츠 라이프 이미징에 의해 정량화하고, 건강한 종양 세포의 통합된 적색 형광을 사용하여 특이적 용해를 계산하였다(도 2). OX40의 발현을 CD4 및 CD8 양성 T 세포에 대한 유세포 분석법에 의해 평가하였다(도 3A 내지 3D).

[0418] CEACAM5 CD3 TCB는, 도 2에 나타낸 바와 같이 42시간의 시점 동안에 모든 사용된 면역 효과기 세포 제제에서 MKN45 NucLight red 세포의 용해를 유도할 수 있었다. EC₅₀ 값 및 용해의 규모는 상이한 효과기 세포 제제 사이에 약간 달랐으며, 단리된 CD8 T 세포의 경우 최고치를 나타냈다. 종양 세포 용해에 수반하여, T 세포는 OX40을 포함하는 활성화 마커의 표면 발현을 증가시켰다(도 3A 내지 3D). OX40의 표면 발현은 CD4 양성 T 세포 상에서 최고였으나, 또한 CD8 양성 T 세포 상에서 보다 낮은 정도로 검출되었다. OX40 발현의 정도는 헬퍼 세포의 존재에 의존적이지 않았다(CD4 또는 CD8 T 세포의 경우 PBMC 대 단리된 집단에서의 발현 수준의 차이 없음).

[0419] 3.2 FAP-표적화된 OX40 작용제의 존재는 T 세포의 세포 용해 가능성에 영향을 미치지 않는다.

[0420] 다음으로, TCB 매개된 종양 세포 용해에 대한 OX40 공자극의 영향을 평가하였다. 3.1에 기재된 바와 같이, T 세포를 CEACAM5 CD3 TCB의 연속 희석물 열의 존재 하에, 각각 고정된 농도의 FAP OX40 iMAB의 존재 또는 부재 하에, MKN-45 NucLight Red 세포 및 조사된 NIH/3T3 huFAP와 함께 48시간 동안 공동-배양하였다.

[0421] 살아있는 종양 세포의 양을 3시간의 간격으로 인큐사이트 줌 시스템을 사용하여 형광 현미경 검사 고 컨텐츠 라이프 이미징에 의해 정량화하고 건강한 종양 세포의 통합된 적색 형광을 사용하여 특이적 용해를 계산하였다.

[0422] 종양 세포 용해의 정도에 대한 FAP OX40 iMAB 공자극의 영향 없음이 모든 평가된 시점에서 FoIR1 CD3 TCB에 대해 관찰되었다(도 4A 내지 4C). 보다 용이한 시간에 따른 비교를 위해, 곡선 아래 면적(AUC)을 FAP OX40 iMAB 공자극의 존재 또는 부재 하에 각각의 시점에 대해 계산하고 시간에 대해 플롯팅하였다. 종양 세포가 TCB의 부재 하에 증식한 것과 같이 AUC는 시간에 따라 증가하였으나, AUC의 공자극 의존성 차이는 명확히 발견되지 않았다.

[0423] OX40 공자극의 존재는 또한 종양 세포 용해를 가속화시키지 않고 CEACAM5 CD3 TCB에 의한 종양 세포 용해의 규모를 증가시키지 않고 특정 백분율의 종양 세포의 용해를 달성하는 데 필요한 TCB 농도(예를 들어 EC₅₀ 값의 변화)를 증가시키지 않았다. 이는 모든 평가된 효과기 세포에 대해 해당하였고, 도 5A 내지 5C에서 42시간의 시점에 대한 예시로 나타나 있다.

[0424] 유사한 결과가 CEA CD3 TCB를 사용하여 수득되었다(데이터는 나타나지 않음).

[0425] 3.3 FAP 표적화된 OX40 작용제의 존재는 시토카인의 분비에 영향을 미친다.

[0426] 일부 분석에서, TNF-α 센서 세포를 상기에 기재된 세팅에 부가적으로 배양하였다. TNF-α 센서 세포는 자연히

TNF- α 수용체를 발현하며, 이를 NF κ B 민감성 프로모터 요소의 제어 하에 GFP에 의해 유전적으로 변형시켰다. 활성화된 T 세포에 의해 분비된 TNF- α 의 결합은 NF κ B의 투여량 의존성 활성화 및 후속적으로 GFP의 발현을 야기한다. GFP 형광은 시간에 따른 고 처리량 라이프 형광 현미경 검사에 의해 정량화될 수 있고, 따라서 TNF- α 분비의 실시간 평가를 가능하게 한다. 상기 3.1에 기재된 바와 같이, CD4 T 세포를 고정된 농도의 FAP OX40 iMAB, 및 각각 CEACAM5 CD3 TCB, Fo1R1 CD3 TCB 및 CEA CD3 TCB의 연속 희석물 열의 존재 하에 표적 세포MKN-45 NucLight Red 세포 및 조사된 NIH/3T3 huFAP와 함께 48시간 동안 공동-배양하였다.

[0427] 존재하는 TCB에 의한 T 세포의 활성화는 TNF- α 의 투여량 의존성 방출을 야기하였고, 이는 TNF- α 센서 세포에서 시간에 따라 GFP 형광의 투여량 의존성 증가를 야기하였다. FAP OX40 iMab에 의한 추가적 공자극은 GFP 형광, 및 이에 따른 활성화된 T 세포에 의한 TNF- α 분비를 추가로 증가시켰다(도 6A 내지 6D 및 7A 내지 7D). 이러한 효과는 대부분 TCB 매개된 TNF- α 분비의 정도에 작용하나, TNF- α 분비가 유도되는 TCB 농도(EC₅₀ 값의 변화)를 낮추지는 않았다. 또한, 작용성 TCR 자극이 시토카인 분비에 대한 이러한 양성 영향을 관찰하는 데 필요하였고, 비특이적 TNF- α 분비는 대조군 TCB 처리된 샘플에서 발견되지 않았다.

[0428] 보다 용이한 시간에 따른 비교를 위해, 곡선 아래 면적(AUC)을 OX40 공자극의 존재 또는 부재 하에 각각의 시점에 대해 계산하고 시간에 대해 플롯팅하였다(도 8A 내지 8D). 증가된 AUC가 모든 시험된 TCB(CEA CD3 TCB, Fo1R1 TCB 및 CEACAM5 CD3 TCB)에서 및 상이한 종양 세포주(MKN45 NLR, HeLa NLR red, Skov-3)의 존재 하에 관찰되었다.

[0429] 모든 샘플의 상청액을 종점(48시간)에서 혈구계산 비드 어레이 시스템(비디 바이오사이언스)을 사용하여 평가하여 TNF- α 이상의 여러 시토카인의 분자에 대한 효과를 정량화하였다. 평가한 시토카인은 일반적 T 세포 활성화에 대한 마커로서 IL-2 및 TNF- α , 특정 Th 서브클래스로의 분화를 모니터링하기 위한 IFN- γ (Th1 시토카인), IL-4(Th2 시토카인), IL-9(Th9 시토카인) 및 IL-17A(Th17 시토카인), 및 면역 억제성 시토카인으로서 IL-10이었다.

[0430] 존재하는 TCB에 의한 T 세포의 활성화는, TNF- α 와 비교하여, 모든 평가한 시토카인, 즉 IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-17a 및 IL-10의 투여량 의존성 방출을 야기하였다(도 9A 내지 9D, 도 10A 내지 10D, 도 11A 내지 11D 및 도 12A 내지 12D). 이러한 시토카인 방출의 정도는 동일한 표적 세포주가 사용되었을 때 TCB에 대해 상이하였다. 이는 도 9A 내지 9D(CEACAM5 CD3 TCB) 및 도 10A 내지 10D(CEA CD3 TCB)의 비교로부터 알 수 있다. 그러나, 또한, 동일한 TCB(Fo1R CD3 TCB)가 사용되었을 때, 상이한 표적 세포주가 사용된 경우 차이가 관찰될 수 있었다. 도 11A 내지 11D는 HeLa NLR 세포에 의한 시토카인 방출을 보여주는 반면에, Skov-3 세포는 도 12A 내지 12D에서 사용되었다.

[0431] FAP OX40 iMab에 의한 추가적 공자극은 투여량 의존성 시토카인 분비의 정도를 조절하였으나, 시토카인 분비에 필요한 TCB 역치 농도를 낮추지는 않았다. 이로써, 전염증성 IL-2, TNF- α 및 IFN- γ 분비의 증가가 관찰되었고, 면역 억제성 IL-10의 농도가 낮아졌다. 보다 용이한 비교를 위해, OX40 공자극을 받은 샘플에서 시토카인 농도의 변화를 공자극을 받지 않은 것과 비교하여 TCB 안정기 농도에 대해 계산하였다(도 13).

[0432] 이로써, 전염증성 IL-2, TNF- α 및 IFN- γ 분비의 증가는 분명하였고, 면역 억제성 IL-10의 농도는 동일한 표적 세포/TCB 조합에서만 낮아졌다. 보다 확실한 T 세포 활성화와 강한 투여량 의존성 시토카인 분비가 또한 OX40 공자극에 의해 보다 강하게 조절되었다는 뚜렷한 경향이 있다. 특히, 면역 억제성 IL-10 방출의 감소는 강한 T 세포 활성화와 연결된다.

[0433] 휴지 중인 CD4 및 CD8 T 세포 및 휴지 중인 인간 PBMC의 시토카인 분비를 조절하는 OX40 공자극의 능력을 시험하였다. 3.1에 기재된 바와 같이, 휴지 중인 인간 PBMC, 단리된 CD4 또는 CD8 T 세포를, CEACAM5 CD3 TCB의 연속 희석물 열의 존재 하에 고정된 농도의 FAP OX40 iMAB의 존재 또는 부재 하에 MKN-45 NucLight Red 세포 및 조사된 NIH/3T3 huFAP와 함께 72시간 동안 공동-배양하였다. 상청액을 상기에 기재된 바와 같이 혈구계산 비드 어레이(CBA)를 사용하여 72시간에서 평가하였다.

[0434] OX40 공자극은 휴지 중인 인간 PBMC에서 및 CD8 T 세포 상에서 또한 적은 정도로 전염증성 시토카인의 분비를 지원하였다(투여량 의존성, 휴지 중인 CD4 T 세포의 경우 도 14A 내지 14H, 휴지 중인 CD8 T 세포의 경우 도 15A 내지 15H, 및 휴지 중인 PBMC의 경우 도 16A 내지 16H 참조). 최고 TCB 농도에 대한 비교를 도 17에 나타냈다. 휴지 중인 CD8 T 세포에 의한 IL-2 및 TNF- α 생산에 대한 영향이 특히 현저하였다.

[0435] 따라서, OX40을 통한 공자극은 시험관내 세포 독성 분석에서 48 내지 72시간 내에 T 세포의 세포 용해 가능성을 직접적으로 증가시키지 않으나, 이는 시토카인을 분비하고 시토카인 미세 환경을 조절하는 능력을 증가시켰다.

종양에서 보다 전염증성인 시토카인 환경은 종양 미세 환경을 보다 면역 활성이고 덜 면역 억제성인 상태로 변화시킬 수 있고, 예를 들어 보다 낮은 수준의 IL-10 및 증가된 농도의 IFN- γ 는 종양에서 골수 세포가 Th1, 및 항원 제시 세포를 지원하는 세포 독성 T 세포로 성숙하는 것을 가능하게 한다. 지지 시토카인 네트워크로의 이동은 종양이 면역 조절을 벗어나기 전에 성공적이고 지속된 종양 세포 제거를 회복시킬 것이다. CD4 T 세포 상에서 OX40의 우선적 발현에 따라, 보다 강한 조절이 CD8 T 세포 상에서 시토카인 분비와 대조적으로 CD4 T 세포 상에서 시토카인 분비에 대해 관찰되었다. 그러나, 세포 유형 모두는 영향을 받았다.

[0436] 실시예 4

[0437] 생체내 FAP OX40 iMab 및 CEACAM5 TCB의 병용 요법

[0438] 4.1 방법

[0439] 하기 실시예에서, TCB 및 FAP OX40 iMab의 조합이 각각의 단일 요법과 비교하여 생체내 우수한 항종양 효능을 야기하는지를 시험하였다.

[0440] 인간 일가 FAP 표적화된, 사가 OX40 이중특이적 항체(FAP OX40 iMab)를, 비히클 및 CEACAM5 CD3 TCB 단일 처리된 동물과 비교하여, 단일 제제로서 및 인간 CEACAM5 CD3 TCB(CEA CD3 TCB(2))와의 조합으로 시험하였다. 인간 MKN45 위암 세포를, NOG 인간화된 마우스에서 마우스 섬유아세포 세포주(3T3)와 함께 피하 이식하였다.

[0441] 4.2 세포주 및 종양 모델

[0442] 인간 MKN45 세포(인간 위 암종)를 본래 ATCC로부터 입수하였고, 확장 후에 글리카트(Glycart) 내부 세포 은행에 예치하였다. 세포를 37°C에서 수-포화된 대기에서 5% CO₂에서 10% FCS를 함유하는 DMEM에서 배양하였다. 시험 판내 관 7을 98%의 생존능에서 피하 주사를 위해 사용하였다. 인간 섬유아세포 NIH-3T3을 본래 ATCC로부터 입수하였고, 인간 FAP를 발현하도록 로슈 너틀리(Roche Nutley)에서 조작하였고, 10% 송아지 혈청, 1x 나트륨 피루베이트 및 1.5 ug/ml 푸로마이신을 함유하는 DMEM에서 배양하였다. 클론 39를 각각 98.8% 및 98.4%의 생존능에서 각각 시험판내 관 번호 9(실험 1, 표 1) 및 7(실험 2, 표 2)에서 사용하였다.

[0443] 50 μL 매트리겔과 혼합된 50 μL 세포 혼탁액(1×10^6 MKN45 세포 + 1×10^6 3T3-huFAP)을 22G 내지 30G 바늘에 의해 마취된 마우스의 옆구리에 피하 주사하였다.

[0444] 4.3 마우스 모델

[0445] NOG 암컷 마우스가 타코닉(Taconic)에 의해 전달되었고 인간 줄기 세포와 함께 사내 이동되었다. 마우스를 약속된 가이드라인에 따라(GV-Solas; Felasa; TierschG) 12시간 명/12시간 암의 1일 주기로 특정 병원체 부재 조건 하에 사육하였다. 실험 연구 프로토콜을 지방 정부(P ZH193/2014)가 검토하고 승인하였다. 도착 후에, 동물을 1주일 동안 새로운 환경에 적응시키고 관찰하기 위해 사육하였다. 연속식 건강 모니터링을 정기적으로 수행하였다.

[0446] 4.4 실험 1의 처리 및 실험 조작

[0447] OX40에 대한 사가 결합을 갖는, 인간 일가 FAP-표적화된 OX40 이중특이적 항체(FAP OX40 iMab, 실시예 1에 기재된 분자 A)를 단일 제제로서 및 인간 CEACAM5 CD3 TCB와의 조합으로 시험하였다. FAP OX40 iMab 구축물에서 사용한 FAP 바인더는 4B9였다. 인간 MKN45 위암 세포를 NOG 인간화된 마우스에 마우스 섬유아세포 세포주(3T3)와 함께 피하 이식하였다.

[0448] 세포 주사 7일 전에, 마우스를 채혈하고 혈액 내 인간 T 세포의 양에 대해 스크리닝하였다. 마우스에게 연구 제0일에 1×10^6 3T3 섬유아세포와 혼합된 1×10^6 MKN45 세포로 피하 주사하였다. 종양을 전체 실험 동안 1주일에 2 내지 3회 캘리퍼에 의해 측정하였다. 제10일에 마우스를 종양 크기 및 인간 T 세포 수에 대해 무작위화시키고, 이때 평균 T 세포 수/ μ l 혈액은 140이었고, 평균 종양 크기는 170 mm³였다. 무작위화 날에, 마우스에게 비히클, CEACAM5 CD3 TCB, FAP(4B9) OX40 iMab, 또는 FAP(4B9) OX40 iMab와 CEACAM5 CD3 TCB의 조합을 5주 동안 정맥내 주사하였다.

[0449] 모든 마우스에게 200 μ l의 적절한 용액으로 정맥내 주사하였다. 비히클 군의 마우스에게 히스티딘 완충제를 주사하고, 처리군에게 OX40 작용성 구축물, CEACAM5 CD3 TCB 또는 조합을 주사하였다. 200 μ l 당 적절한 양의 화합물을 수득하기 위해 스톡 용액을 필요에 따라 히스티딘 완충제로 희석하였다. CEACAM5 TCB에 대해 사용되는 투여량 및 일정은 0.5 mg/kg 1회/1주일인 반면에, FAP OX40 iMab는 12.5 mg/kg의 투여량으로 1회/1주일 제

공된다.

[0450] 제1 요법 10분, 4시간, 72시간 및 168시간 후에 2마리 마우스/군을 채혈하여 제1주 동안 화합물의 노출을 결정하였다. 인간 OX40에 대한 구축물의 결합 및 huCH1-도메인의 검출에 대해 FAP OX40 iMab를 샌드위치 ELISA에 의해 측정하였다. 항-CD3-CDR 특이적 항체에 대한 TCB의 결합 및 인간 Fc의 검출에 대해 CEACAM5 CD3 TCB를 샌드위치 ELISA에 의해 검출하였다(도 18A 및 18B 참조).

[0451] 실험을 연구 제44일에 종결하였다. 종양, 혈액 및 비장을 PBS에 채취하고, 단일 세포 혼탁액을 생산하고 상이한 면역 세포 마커에 대해 염색시키고 FACS에 의해 분석하였다. 전혈 샘플의 적혈구 용해를 3분 동안 실온에서 제조사의 지시에 따라 비디 팜(BD Pharm) 용해 완충제(BD, 카탈로그 번호 555899)를 사용하여 수행하였다. 비장 세포를 세포 여과기(나일론 필터 70 μm , 비디 팔콘(BD Falcon))를 통해 비장의 균질화에 의해 단리한 후에 상기에 기재된 바와 같이 적혈구 용해를 수행하였다. 종양 단일 세포 혼탁액을 gentleMACS Dissociator(밀테나이)를 사용하여 생산하고 30분 동안 37°C에서 DNase I([0.025mG/mL], 로슈다이어그노스틱스, 카탈로그 번호 11284932001) 및 콜라게나제 D([1 mG/mL], 로슈다이어그노스틱스(RocheDiagnostics), 카탈로그 번호 11088882001)를 사용하여 균질액을 절단하였다. 이후, 세포 혼탁액을 세포 여과기(나일론 필터 70 μm , 비디 팔콘)를 통해 여과하여 잔해를 제거하였다. 모든 제제를 과량의 매우 찬 FACS 완충제로 세척하였다. 세포를 정제된 래트 항-마우스 CD16/CD32(클론 2.4G2, BD, 카탈로그 번호 553142)의 존재 하에 30분 동안 4°C에서 암에서 FACS 완충제에서 형광 염료-접합된 항체 항-마우스 CD4(클론 GK 1.5, 바이오레전드, 카탈로그 번호 100422), CD8(클론 53-6.7, 바이오레전드, 카탈로그 번호 100730), CD45(클론 30-F11, 바이오레전드, 카탈로그 번호 103116) 및 CD3(클론 145-2C11, 바이오레전드, 카탈로그 번호 100351)에 의해 표면-염색시켰다. 샘플을 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI(산타 크루즈 바이오텍, 카탈로그 번호 Sc-3598)를 함유하는 FACS 완충제에 재현탁시킨 후에, 이를 동일한 날에 5-레이저 LSR-Fortessa(비디 바이오사이언스, DIVA 소프트웨어 사용)를 사용하여 획득하였다. 살아있는 CD4 및 CD8 T 세포를 계이팅하고(DAPI-, CD45+, CD3+, CD4 또는 CD8+), (μL 혈액, mg 비장 또는 mg 종양 당) 정규화된 수를 계산하고, 값을 각각의 처리군에 대해 플롯팅하였다.

[0452] [표 1]

[0453] 생체내 실험에 사용된 조성물

화합물	투여량 (mg/kg)	제형 완충제	농도 (mg/mL)
FAP(4B9) OX40 iMab (실시예 1의 분자 A)	12.5	20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl, pH 6.0, 0.01% 트워-20	4.41 (=스톡 농도)
CEACAM5 CD3 TCB (실시예 2)	0.5	20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl, pH 6.0, 0.01% 트워20	1.72 (=스톡 농도)

[0454] [0455] 4.5 실험 2의 처리 및 실험 조작

[0456] 인간 일가 항-FAP(4B9)/항-OX40 이중특이적 항체(FAP OX40 iMab)를 3개의 상이한 투여량으로 단일 제제로서 및 인간 CEACAM5 CD3 TCB와 조합으로 시험하였다. 인간 MKN45 위암 세포를 상기에 기재된 바와 같이 인간 줄기 세포를 갖는 NOG 인간화된 마우스에게 마우스 섬유아세포 세포주(3T3)와 함께 피하 이식하였다.

[0457] 세포 주사 7일 전에 마우스를 채혈하고 혈액 내 인간 T 세포의 양에 대해 스크리닝하였다. 마우스에게 연구 제0일에 1×10^6 3T3 섬유아세포와 혼합된 1×10^6 MKN45 세포를 피하 주사하였다. 종양을 전체 실험 동안 캘리퍼에 의해 1주일 당 2 내지 3회 측정하였다. 제26일에, 마우스를 종양 크기 및 인간 T 세포 수에 대해 무작위화시켰고, 이때 평균 T 세포 수/ μl 혈액은 115였고, 평균 종양 크기는 490 mm^3 였다. 무작위화 1일 후에 마우스에게 비히클, CEACAM5 CD3 TCB, FAP OX40 iMab, 또는 FAP OX40 iMab와 CEACAM5 CD3 TCB의 조합을 4주 동안 정맥내 주사하였다.

[0458] 모든 마우스에게 200 μl 의 적절한 용액으로 정맥내 주사하였다. 비히클 군의 마우스에게 히스티딘 완충제를 주사하고, 처리군에게는 OX40 작용성 구축물, CEACAM5 CD3 TCB 또는 조합을 주사하였다. 200 μl 당 적절한 양의 화합물을 수득하기 위해 스톡 용액을 필요에 따라 히스티딘 완충제로 희석하였다. CEACAM5 CD3 TCB에 대해 사용된 용량 및 일정은 0.5 mg/kg 1회/1주일이었던 반면에, FAP OX40 iMab는 12.5 mg/kg, 4.2 mg/kg 또는 1.4 mg/kg의 용량으로 1회/1주일 제공되었다.

[0459] 실험을 연구 제50일에 종결하였다. 종양, 혈액 및 비장을 PBS에 채취하고, 단일 세포 혼탁액을 생산하고 상이

한 면역 세포 마커로 염색시키고 FACS에 의해 분석하였다.

[0460] 군 당 모든 남아있는 마우스의 비장 및 종양을 종결시 유세포 분석법에 의해 분석하였다. 단일 세포 혼탁액을 CD45, CD3, CD4 및 CD8에 대해 염색시키고, 세포의 양을 분석하였다. 종결시 및 실험 동안 동물로부터의 종양의 부분을 포르말린 고정시키고, 이후 파라핀에 내장시켰다. 샘플을 절단하고 CD3 및 CD8에 대해 염색시켰다. 비장 및 종양의 부분뿐만 아니라 혈장을 시토카인 분석을 위해 멀티플렉스(Multiplex)를 통해 동결시켰다. 종결시 종양의 부분을 포르말린 고정시키고, 이후 파라핀에 내장시켰다. 샘플을 절단하고 CD3 및 CD8에 대해 염색시켰다.

[0461] [표 2]

[0462] 생체내 실험에서 사용된 조성물

화합물	투여량 (mg/kg)	제형 완충제	농도 (mg/mL)
FAP(4B9) OX40 iMab (실시예 1의 문자 A)	12.5, 4.2, 또는 1.4	20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl, pH 6.0, 0.01% 트윈 -20	3.2 (=스톡 농도)
CEACAM5 CD3 TCB (실시예 2)	0.5	20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl, pH 6.0, 0.01% 트윈 -20	3.1 (=스톡 농도)

[0463]

[0464] 제1주 동안 주사한 화합물의 약동학적 프로필을 결정하기 위해, 군 당 2마리의 마우스를 제1 요법 10분, 4시간, 72시간 및 7일 후에 채혈하고, 주사한 화합물을 ELISA에 의해 분석하였다. OX40 iMab를 OX40 결합을 통해 검출한 반면에(A), CEACAM5 CD3 TCB를 항-CD3 CDR 항체에 대한 결합을 통해 검출하였다(B).

[0465] (A) 비오티닐화된 인간 OX40, 시험 샘플, 디곡시게닌 라벨링된 항-huCH1 항체 및 항-디곡시게닌 검출 항체(POD)를 96-웰 스트렙타비딘-코팅된 마이크로타이터 플레이트에 단계적으로 첨가하고, 매 단계 후에 1시간 동안 실온에서 항온처리하였다. 플레이트를 각각의 단계 후에 3회 세척하여 미결합 물질을 제거하였다. 마지막으로, 페옥시다제-결합된 복합물을 ABTS 기질 용액을 첨가하여 착색된 반응 생성물을 형성함으로써 시각화하였다. 반응 생성물 강도를 405 nm에서 결정하였고(490 nm의 기준 파장 사용), 이는 혈청 샘플 내 분석물 농도에 비례하였다.

[0466] (B) 비오티닐화된 항-huCD3 -CDR 항체, 시험 샘플, 디곡시게닌 라벨링된 항-huFc 항체 및 항-디곡시게닌 검출 항체(POD)를 96-웰 스트렙타비딘-코팅된 마이크로타이터 플레이트에 단계적으로 첨가하고, 매 단계 후에 1시간 동안 실온에서 항온처리하였다. 플레이트를 각각의 단계 후에 3회 세척하여 미결합 물질을 제거하였다. 마지막으로, 페옥시다제-결합된 복합물을 ABTS 기질 용액을 첨가하여 착색된 반응 생성물을 형성함으로써 시각화하였다. 반응 생성물 강도를 405 nm에서 결정하였고(490 nm의 기준 파장 사용), 이는 혈청 샘플 내 분석물 농도에 비례하였다.

[0467] 4.6 종양, 비장 및 혈청 샘플의 시토카인 분석

[0468] 혈청을 수집하고, 피하 종양 및 비장을 종결시(제50일), 마지막 Ab 투여 2일 후에 동물로부터 채취하였다. 20 내지 30 mg의 스냅-동결된 비장 및 종양 조직을 연구 종결시 완전체 단백질 단리를 위해 처리하였다. 간략히, 조직 샘플을 150 μl의 총 부피의 용해 완충제에서 조직 라이서(Tissue Lyser) 시스템 및 스테인리스 강 비드를 사용하여 파쇄하였다. 파쇄된 샘플을 원심분리에 의해 제거하고 완전체 단백질 함량을 제조사의 지시에 따라 상청액에서 BCA 단백질 분석 키트(피셔 씨모 사이언티픽(Fischer Thermo Scientific))에 의해 분석하였다. 제조사의 지시에 따라(바이오-플렉스 프로(상표) 인간 시토카인 17-플렉스 분석, 바이오라드) 바이오-플렉스 시스템에 의해 상이한 시토카인/케모카인의 분석을 위해 총 200 μg의 종양 및 비장 용해물의 완전체 단백질 및 혈청 샘플의 1:10 희석물이 사용되었다.

[0469] 4.7 면역 조직 화학

[0470] 면역 조직 화학 분석을, 인간화된 NOG 마우스에서 지시된 처리군으로부터 유래된 3T3 뮤린 섬유아세포와 함께 이식된 인간 MKN45 위 피하 종양에 대해 수행하였다. 피하 종양을 종결시, 마지막 Ab 투여 2일 후에 동물로부터 채취하고, 포르말린 10%(시그마, 독일)에서 고정하고 나중에 FFPET에 대해 처리하였다(레이카(Leica) 1020, 독일). 이어서, 4 μm 파라핀 절편을 마이크로톰(레이카 RM2235, 독일)에서 절단하였다. HuCD8 및 HuCD3 면역 조직 화학을, 제조사의 프로토콜에 따라 레이카 오토스테이너(레이카 ST5010, 독일)에서 항-인간 CD8(셀 마크

코포레이션(Cell Marque Corporation), 캘리포니아) 및 항-인간 CD3(씨모피셔 사이언티픽(ThermoFischer Scientific), 미국))을 사용하여 수행하였다. huCD3 및 huCD8 양성 T 세포의 정량화를 디피니엔스(Definiens) 소프트웨어(디피니엔스, 독일)에 의해 수행하였다. 통계를 다중 비교 검정으로 1-원 ANOVA에 의해 분석하였다.

[0471] 4.8 실험 1의 결과

FAP OX40 iMab가 T 세포 활성화 상태 및 시토카인 방출을 변화시킬 수 있음이 이미 시험관내 실험에서 알 수 있다. 또한, OX40의 영향이 CD8 양성 T 세포보다 CD4 양성 T 세포에 대해 강한 것으로 보이는 것이 확인되었다.

[0473] FAP OX40 iMab가 또한 면역 상태를 보다 유익한 결과로 생체내 변화시킬 수 있다는 것을 시험하기 위해, 인간 줄기 세포를 면역 결핍된 마우스 내로 이동시켜 주로 T 및 B 세포로 이루어진 부분적 인간 면역계를 생성한 인간화된 마우스 모델을 사용하였다. MKN45, CEA 발현 인간 위암 세포주 및 3T3 섬유아세포를 공동-주사하였고, 이는 종양에서 스트로마 성분 및 FAP 발현을 개선한다. CEA는 CEACAM5 CD3 TCB에 의해 표적화되어 T 세포를 종양 세포와 가교결합시키고 종양 세포의 T 세포 매개된 사멸 및 T 세포 활성화를 유도한다. T 세포 활성화시 OX40은 상향조절된다. FAP OX40 iMab는 FAP 발현 섬유아세포 및 OX40 발현 T 세포를 가교결합시켜 OX40 신호 전달을 유도한다. 이는 개선된 T 세포 생존 및 시토카인 방출을 야기한다.

[0474] 본 연구에서 FAP OX40 iMab 및 CEACAM5 CD3 TCB의 병용 요법이 단일 요법과 비교하여 개선된 효능을 야기함을 입증할 수 있다. 또한, FAP OX40 iMab 단일 요법은 비히클과 비교하여 유의미하게 개선된 효능을 나타냈다.

[0475] 효능 차이의 원인으로서 노출 차이를 배제하기 위해 각각의 단일 요법으로 및 병용 군으로 제1 처리시 CEACAM5 CD3 TCB 및 FAPOX40 iMab의 혈청 농도를 평가하였다. 오류에 나타낸 바와 같다. 기준 소스를 찾을 수 없다. A 및 18B에서는, 모든 구축물에 대한 노출이 단일 요법 및 병용 요법에서 비슷하였다.

[0476] 도 19에 나타낸 바와 같이, FAP OX40 iMab 단일 요법 처리된 동물은 약간 지연된 종양의 진행을 나타냈고, CEACAM5 CD3 TCB는 보다 뚜렷했다. 그러나, 병용 요법에서만, 피하 종양의 퇴화가 달성되었다(표 3 참조).

[0477] [표 3]

[0478] 연구 제41일 및 제43일의 종양 성장 억제(TGI)

군	제41일 TGI [%]	제43일 TGI [%]
CEACAM5 CD3 TCB	93.6	92.6
FAP OX40 iMab	55.2	35.9
CEACAM5 CD3 TCB + FAP OX40 iMab	103.8	103.4

[0479]

[0480] 4.9 실험 2의 결과

[0481] 제2 연구에서, 단일 요법으로서 및 CEACAM5 CD3 TCB(CEA CD3 TCB(2))와의 조합으로서 상이한 투여량의 FAPOX40 iMab를 시험하였다. 여기서, 또한, 제1 연구의 170 mm^3 와 비교하여, 490 mm^3 의 중간 종양 크기에 도달할 때까지 실험 개시를 지연하였다.

[0482] 화합물로 주사한 모든 군은 상이한 군, OX40 표적화된 화합물 또는 TCB 사이에 분자의 비슷한 최대 농도를 나타냈다. 도 20A 및 20B에서는, 제1주 동안 주사한 화합물의 약동학적 프로필을 나타냈다.

[0483] 도 21A 내지 21C에 플로팅한 바와 같이, 다시 한번, 단일 요법에 비해 병용 요법의 우수한 항종양 효능을 확인할 수 있었다. 임의의 시험된 투여량의 FAP OX40 iMab 및 단일 요법의 CEACAM5 CD3 TCB는 모두 종양 성장의 진행을 느리게 만들 수 없었고, 이는 아마도 치료 개시시 상당한 종양 부담 때문이었다. 병용 치료만이 유의미하게 전체 연구 기간 동안 종양 성장의 진행을 방지하였다(표 4). 강한 치료성이 12.5 mg/kg 투여량의 FAP OX40 iMAB에서 관찰되었으나, 낮은 투여량(4.2 및 1.4 mg/kg)은 CEACAM5 CD3 TCB 단일 요법과 비교하여 단지 일시적으로 진행을 감소시킬 수 있었다(도 22). 분명한 투여량 의존성이 관찰되었다. 도 20A 및 20B에 나타낸 바와 같이, 모든 구축물에 대한 노출은 단일 요법 및 병용 요법에서 비슷하였다.

[0484] 중간값을 기반으로 하는 종양 성장 억제를 연구 제40일 및 제49일에 계산하였다. 값은 하기 표 4에서 찾아볼 수 있다.

[0485] [표 4]

[0486]

연구 제40일 및 제49일의 종양 성장 억제(TGI)

군	제40일 TGI [%]	제49일 TGI [%]
CEACAM5 CD3 TCB	67.3	36.7
FAP OX40 iMab 1.4 mg/kg	11.2	-6.3
FAP OX40 iMab 4.2 mg/kg	16.2	20.5
FAP OX40 iMab 12.5 mg/kg	38.1	23.9
CEACAM5 CD3 TCB + FAP OX40 iMab 1.4 mg/kg	55.2	26.7
CEACAM5 CD3 TCB + FAP OX40 iMab 4.2 mg/kg	55.0	61.9
CEACAM5 CD3 TCB + FAP OX40 iMab 12.5 mg/kg	108.5	102.3

[0487]

다중 비교에서 군 평균의 유의미한 차이를 시험하기 위해, 분산의 표준 분석(ANOVA)을 던넷 방법(Dunnett's method)을 사용하여 자동으로 생성하였다. 던넷 방법은 평균이 대조군의 평균과 상이한지를 시험한다.

[0489]

[표 5]

[0490] p 값: 던넷 방법을 사용한 대조군과의 비교(AUC=곡선 아래 면적)

군	비히클에 대한 제49일 p 값	비히클에 대한 제49일까지의 p 값 AUC	CEA CD3 TCB(2)에 대한 제49일 p 값	CEA CD3 TCB(2)에 대한 제49일까지의 p 값 AUC
비히클	1	1	0.1051	0.2158
CEACAM5 CD3 TCB	0.1088	0.2158	1	1
FAP OX40 iMab 12.5 mg/kg	0.5990	0.7234	0.7956	0.9171
FAP OX40 iMab 4.2 mg/kg	0.8848	0.9178	0.5394	0.7588
FAP OX40 iMab 1.4 mg/kg	0.9986	0.7666	0.2130	0.8886
CEACAM5 CD3 TCB + FAP OX40 iMab 12.5 mg/kg	<0.0001*	<0.0001*	0.0032*	0.0099*
CEACAM5 CD3 TCB + FAP OX40 iMab 4.2 mg/kg	0.0234*	0.0151*	0.9924	0.8131
CEACAM5 CD3 TCB + FAP OX40 iMab 1.4 mg/kg	0.0449*	0.0803	0.9998	0.9970

[0491]

유세포 분석(도 23A 내지 23D) 및 병리조직학(도 25A 및 25B) 평가는 침윤이 증가한 종양 덩어리 및 인간 백혈구를 나타냈다. 이는 CEACAM5 CD3 TCB 단일 요법에 대해 이미 관찰되었으나, CEACAM5 CD3 TCB와 4.2 또는 12.5 mg/kg FAP OX40 iMAB의 조합에서 강하게 증진되었다. FAP OX40 iMAB 단일 요법 자체는 종양내 백혈구 수를 단지 최소로 증가시켰다. 검출된 세포 유형은 인간 CD4 및 CD8 T 세포, 뿐만 아니라 비-T 세포(예를 들어 B 세포 또는 골수 유래된 세포)였다. 흥미롭게도, CEACAM5 CD3 TCB 단일 요법과 비교한 병용 요법의 증가 배수는 CD8 T 세포 수보다 CD4 T 세포의 경우 뚜렷하였고, 이는 주로 CD4 T 세포 상에 발현되는 OX40의 생물학에 일치한다. 말초에서, 세포 수의 유의미한 변경이 검출되지 않았으며, 모든 화합물의 종양 표적화된 성질을 강조하였다(도 24A 및 24B).

[0493]

또한, 비장, 혈액 및 종양내 시토카인의 농도를 평가하였다(바이오-플렉스 프로(상표) 인간 시토카인 17-플렉스 분석, 바이오라드). 또한, 최고 항종양 효능을 갖는 군은 종양내 시토카인(예를 들어 IL-6, IL-8, IFN-γ, TNF-α, MCP-1, MIP-1β)의 최대 전체 증가를 나타냈고(도 26A 내지 26C), 이는 FAP OX40 iMAB(12.5 mg/kg) 및 CEACAM5 CD3 TCB의 조합이었다. 유의미한 변화가 말초(비장 또는 혈액)에서 관찰되지 않았다. 따라서, FAP OX40 iMAB 및 CEACAM5 CD3 TCB 처리에 의해 촉발된 면역 변화는 종양-특이적이었고, 이는 인간 T 세포의 가교결합 및 활성화가 CEA 발현 종양에서 배타적으로 발생하고 CEA에 대해 음성인 다른 영역, 예컨대 혈액 및 비장에서는 발생하지 않음을 시사한다.

- [0494] 또한, 조합 처리된 동물에 대한 종양내 백혈구수 사이에 대한 것이 아닌, 종양 진행과 종양내 시토카인 농도의 양 사이의 직접적인 음의 상관관계를 밝혔다(도 27A 내지 27F). 존재하는 시토카인의 양은 모든 동물에 대하여 침윤성 백혈구의 수와 염밀히 상관관계에 있지 않았다. 특히, CEACAM5 CD3 TCB 단일 요법 처리된 동물을 조합 처리된 동물과 비교하였을 때, 유사한 백혈구수는 동일한 항종양 효능 또는 시토카인 함량이 존재함을 반드시 의미하는 것은 아니었다. 이는, 단지 증가된 종양 내 T 세포의 수를 넘어서, 세포 당 더 높은 종양내 T 세포의 시토카인을 분비시키는 기능 및 가능성이 FAP OX40 iMAB 및 CEACAM5 CD3 TCB의 조합의 증진된 항종양 활성을 대한 원인이라는 가정을 유도한다.
- [0495] 개선된 시토카인 환경은 항종양 효능을 조정하는 데 있어서 주요 역할을 한다. 이는 보다 많은 림프구를 종양에 모집하여 증식을 지원하고 이를 T 세포의 생존을 증가시킬 수 있고 억제 및 고갈의 확립을 방지한다. FAP OX40 iMAB가 상이한 종양 세포주, 효과기 집단 및 종양 표적에 대해 시험관내 시토카인의 TCB 매개된 분비를 보다 염증성이고 덜 억제성인 쪽으로 향하게 조절할 수 있음을 보여줄 수 있었다. 또한, 인간 면역계를 모의실험 하는 인간화된 마우스 모델에서 개선된 항종양 효능으로 번역되었음을 보여줄 수 있다.
- [0496] **실시예 5**
- [0497] **FAP OX40 iMab, CEA TCB 및 PD-L1 항체의 생체내 병용 요법**
- [0498] 5.1 실험 절차
- [0499] 하기 실시예에서, 인간 FAP 표적화된 OX40 작용제 FAP OX40 iMAB(FAP 바인더 4B9)를 인간 MKN45 위암 모델에서 인간 CEA CD3 TCB 및 항-PD-L1 항체(a-PD-L1)와의 조합으로 12.5 mg/kg의 농도에서 시험하였다. MKN45 세포를 NSG 인간화된 마우스에게 마우스 섬유아세포 세포주(3T3)와 함께 피하 이식하였다.
- [0500] 인간 MKN45 세포(인간 위 암종)를 본래 DSMZ로부터 입수하고, 확장 후에 글리카트 내부 세포 은행에 예치하였다. 세포를 37°C에서 수-포화된 대기에서 5% CO₂에서 10% FCS를 함유하는 DMEM에서 배양하였다. 시험관내 관 13을 99.1%의 생존능에서 피하 주사를 위해 사용하였다. 인간 섬유아세포 NIH-3T3을 본래 ATCC로부터 입수하고, 호프만-라 로슈 인코포레이티드(Hoffmann-La Roche Inc.)에서 인간 FAP를 발현하도록 조작하고, 10% 송아지 혈청, 1x 나트륨 피루베이트 및 1.5 μg/ml 푸로마이신을 함유하는 DMEM에서 배양하였다. 클론 39를 시험관내 관 번호 8에서 및 97.6%의 생존능에서 사용하였다.
- [0501] 50 μL 매트리겔과 혼합된 50 μL 세포 혼탁액(1×10^6 MKN45 세포 + 1×10^6 3T3-huFAP)을 22G 내지 30G 바늘에 의해 마취된 마우스의 옆구리에 피하 주사하였다. NSG 암컷 마우스(찰스 리버(Charles River)로부터 구매)(실험 개시시 5주령)를, 약속된 가이드라인에 따라(GV-Solas; Felasa; TierschG) 12시간 명/12시간 암의 1일 주기를 사용하여 특이적 병원체 부재 조건 하에 사육하였다. 실험 연구 프로토콜을 지방 정부당국에서 검토하고 승인하였다. 도착 후에, 동물을 1주일 동안 새로운 환경에 적응시키고 관찰하기 위해 사육하였다. 연속식 건강 모니터링을 매일 수행하였다.
- [0502] 인간화를 위해, 마우스에게 부설판(Busulfan, 20 mg/kg)을 주사하고, 24시간 후에 100,000 인간 HSC(스템셀 테크놀로지스(StemCell Technologies)로부터 구매)를 주사하였다.
- [0503] 세포 주사 7 내지 14일 전에 마우스를 채혈하고 혈액 내 인간 T 세포의 양에 대해 스크리닝하였다. 마우스를 인간 T 세포에 대해 무작위화시키고, 이때 평균 T 세포 수/ul 혈액은 131이었다. 마우스에게 연구 제0일에 1×10^6 3T3 섬유아세포와 혼합된 1×10^6 MKN45 세포를 피하 주사하였다. 종양을 전체 실험 동안에 캘리퍼에 의해 1주일에 2 내지 3회 측정하였다. 제17일에, 마우스를 종양 크기에 대해 무작위화시켰고, 이때 평균 종양 크기는 205 mm³였다. 무작위화 날에, 마우스에게 비히클, CEA CD3 TCB, CEA CD3 TCB + a-PD-L1, CEA CD3 TCB + FAP OX40 iMAB, 또는 CEA CD3 TCB, a-PD-L1 및 FAP OX40 iMAB의 삼중 조합을 4주 이하 동안 매주 정맥내 주사하였다. 모든 마우스에게 200 μl의 적절한 용액으로 정맥내 주사하였다. 비히클 군의 마우스에게 히스티딘 완충제를 주사하고, 처리군에게는 CEA CD3 TCB, 및 CEA CD3 TCB 및/또는 FAP OX40 iMAB의 조합을 주사하였다. 200 μl 당 적절한 양의 화합물을 수득하기 위해 스톡 용액을 필요에 따라 히스티딘 완충제로 희석하였다. CEA CD3 TCB에 대해 사용된 투여량 및 일정은 2.5 mg/kg 2회/1주일이었던 반면에, FAP OX40 iMAB는 12.5 mg/kg의 투여량으로 제공되었고 a-PD-L1은 10 mg/kg의 투여량으로 1회/1주일 제공되었다(표 7). 실험을 연구 제44일에 종결하였다. 일부 마우스는 실험 동안 좋지 않은 건강 상태로 인해 희생시켜야 했다.
- [0504] [표 6]

[0505] 제44일에 살아있는 마우스

군	비히클	CEA CD3 TCB	CEA CD3 TCB + FAP OX40 iMAb	CEA CD3 TCB + a-PD-L1	CEA CD3 TCB + FAP OX40 iMAb + a-PD-L1
제44일에 살아 있는 마우스	7/9	5/9	5/10	3/9	6/10

[0506]

[0507] 종양 및 혈액을 PBS에 채취하고, 단일 세포 혼탁액을 생산하고 상이한 면역 세포 마커에 대해 염색시키고, FACS에 의해 분석하였다. 종양의 부분뿐만 아니라 혈장을 시토카인 분석을 위해 멀티플렉스를 통해 동결시켰다. 종결시 종양의 부분을 포르말린 고정시키고, 이후 파라핀에 내장시켰다. 샘플을 절단하고 CD3 및 CD8에 대해 염색시켰다.

[0508]

[표 7]

[0509] 생체내 실험에서 사용한 조성물

화합물	투여량 (mg/kg)	농도 (mg/mL)	제형 완충제
a-PD-L1 (iTME-0005)	10	2.54 (=스톡 농도)	20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl, pH 6.0
CEA CD3 TCB	2.5	4.82 (=스톡 농도)	20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl, 0.01% 트윈 20, pH 6.0
FAP OX40 iMAb	3.2	4.82 (=스톡 농도)	20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl, pH 6.0

[0510]

[0511] 5.2 결과

[0512] 본 연구에서, 처음으로 FAP OX40 iMAb가 CEA CD3 TCB 및 a-PD-L1의 조합에 의해 매개된 효능을 개선할 수 있음을 입증하고자 하였다. a-PD-L1은 면역 체크포인트 억제제이고, 암 면역 요법 분야에 확립되어 있다. a-PD-L1 바인더는 마우스 PD-L1에 교차반응성이 있고 뮤린 IgG 포맷으로 생산되었다. CEA CD3 TCB는 암 세포 상에 발현되는 CEA를 표적화하고, FAP OX40 iMAb는 종양 스트로마에서 FAP 발현 섬유아세포에 결합한다. FAP OX40 iMAb는 매주 12.5 mg/kg의 투여량으로 제공되었고, a-PD-L1은 10 mg/kg의 투여량으로 제공된 반면에, CEA CD3 TCB는 2.5 mg/kg의 투여량으로 2회/1주일 제공되었다.

[0513]

인간 구축물을 시험하기 위해, 인간 면역 세포, 구체적으로 T 세포는 마우스 시스템에 존재해야 한다. 이런 이유로, 인간화된 마우스(인간 줄기 세포를 제공받은 마우스를 의미함)를 사용하였다. 이들 마우스는 주로 T 및 B 세포로 이루어진 부분적 인간 면역계를 시간에 따라 발달시켰다.

[0514]

MKN45, CEA 발현 인간 위암 세포주 및 3T3 섬유아세포를 공동-주사하였고, 이는 종양에서 스트로마 성분을 개선한다. CEA는 CEA CD3 TCB에 의해 표적화되어, T 세포를 종양 세포와 가교결합시키고 종양 세포의 T 세포 매개된 사멸 및 T 세포 활성화를 유도한다. T 세포 활성화시 PD-1뿐만 아니라 OX40이 상향조절된다. FAP OX40 iMAb는 FAP 발현 스트로마 세포 및 OX40 발현 T 세포를 가교결합시켜 OX40 신호 전달을 유도한다. 이는 개선된 시토카인 분비, 및 T 세포의 생존 및 증식을 야기한다. PD-L1은 주로 종양 세포에 의해 발현되고, PD-L1의 차단은 PD-1 발현 T 세포와의 가교결합을 방지하고 T 세포의 활성화에 있어서 PD-1의 존성을 방지한다.

[0515]

본 연구에서, a-PD-L1 및 FAP OX40 iMAb와 조합된 CEA CD3 TCB가 비히클 군과 비교하여 종양 성장 억제에 있어서 개선된 효능을 매개함을 입증할 수 있다(도 28A 및 28B). 중간값을 기반으로 하는 종양 성장 억제를 제36일, 제38일, 제41일 및 제43일에 계산하였다. CEA CD3 TCB + a-PD-L1 + FAP OX40 iMAb로 처리된 군은 종양 성장의 최강 억제를 나타냈다.

[0516]

[표 8]

[0517] 제36일, 제38일, 제41일 및 제43일의 종양 성장 억제(TGI)

군	제36일	제38일	제41일	제43일
CEA CD3 TCB	62.77	55.13	47.30	32.73
CEA CD3 TCB + FAP OX40 iMab 12.5 mg/kg	36.76	40.63	32.97	19.48
CEA CD3 TCB + a-PD-L1	45.91	55.32	41.35	37.60
CEA CD3 TCB + a-PD-L1 + FAP OX40 iMab	81.28	82.63	71.61	59.21

[0518]

[0519] 제43일까지 곡선 아래 면적(AUC)을 고려하면, CEA CD3 TCB + a-PD-L1 + FAP OX40 iMab의 조합만이 비히를 단일 요법과 유의미하게 상이하였다.

[0520]

[표 9]

[0521]

비히를과 비교한 제43일까지 종양 부피(AUC)의 1-원 분석

던넷 방법을 사용하여 대조군과 평균 비교 (sAUC)	p 값
대조군 = 비히를	-
CEA CD3 TCB	0.0563
CEA CD3 TCB + FAP OX40 iMab	0.6395
CEA CD3 TCB + a-PD-L1	0.1318
CEA CD3 TCB + a-PD-L1 + FAP OX40 iMab	0.0079*

[0522]

[표 10]

[0524]

비히를과 비교한 제43일의 종양 부피(AUC)의 1-원 분석

던넷 방법을 사용하여 대조군과 비교 (제43일)	p 값
대조군 = 비히를	-
CEA CD3 TCB	0.1311
CEA CD3 TCB + FAP OX40 iMab	0.7221
CEA CD3 TCB + a-PD-L1	0.1186
CEA CD3 TCB + a-PD-L1 + FAP OX40 iMab	0.0024*

[0525]

[0526] 모든 다른 군(단일 요법 및 이중 요법)은 비히를과 비교하여 유의미하게 효능을 개선하지 않았다.

[0527]

제1주 동안 주사한 화합물의 약동학적 프로필을 실시에 4에 기재된 바와 같이 연구하였다. 또한 a-PD-L1 비오티닐화된 항-인간 Fc를 검출하기 위해, PD-L1-huFc, 시험 샘플 및 딜클론 항-뮤린 IgG(HRP)를 96-웰 스트렙타비딘-코팅된 마이크로타이터 플레이트에 단계적으로 첨가하고 매 단계 후에 1시간 동안 실온에서 항온처리하였다. 플레이트를 각각의 단계 후에 3회 세척하여 미결합 물질을 제거하였다. 마지막으로, 마지막으로, 퍼옥시다제-결합된 복합물을 ABTS 기질 용액을 첨가하여 착색된 반응 생성물을 형성함으로써 시각화하였다. 반응 생성물 강도를 405 nm에서 결정하였고(490 nm의 기준 파장 사용), 이는 혈청 샘플 내 분석물 농도에 비례하였다. 군 당 2마리의 마우스를 제1 및 제3 요법 1시간 및 72시간 후에 채혈하고, 주사한 화합물을 ELISA에 의해 분석하였다. 화합물로 주사한 모든 군은 상이한 군, FAP OX40 iMab, CEA CD3 TCB 또는 a-PD-L1 사이에 분자의 비슷한 노출을 나타냈다(도 29A, 29B 및 29C 참조).

[0528]

제44일에 IHC(면역 조직 화학)에 의한 종결시 종양에서 T 세포 침윤은 모든 다른 군과 비교하여 삼중 조합 군에서 유의미하게 증가하였다(도 30A 및 30B 참조).

[0529]

실시예 6

[0530] FAP OX40 iMab, CEA TCB 및 PD-L1 항체의 시험관내 병용 요법

[0531]

6.1 실험 절차

[0532]

본 분석에서, 실시예 5에 기재된 바와 유사하게, FAP OX40 iMab를, CEA CD3 TCB 및 아테졸리주맙(Tecentriq, 항-인간 PD-L1-특이적 인간화된 인간 IgG1 κ 항체)의 존재 또는 부재 하에 인간 PBMC(버퍼 코트로부터 단리되고, 동결되고 액체 질소에서 저장됨)를 활성화시키는 가능성에 대하여 시험하였다. 종양 환경을 모방하기 위해, 6명의 상이한 공여자의 PBMC를 FAP-발현 NIH/3T3-huFAP 섬유아세포 세포주와 함께 및 CEA-발현 MKN45-Fo1R1-PDL1 위암 세포주와 함께 4일 동안 2 nM FAP OX40 iMab 및/또는 100 nM CEA CD3 TCB 및/또는 80

nM 아테졸리주맙의 존재 또는 부재 하에 항온처리하였다. PBMC 활성화를 결정하기 위해, CD4 및 CD8 T 세포를, 증식(CFSE-희석), CD25(IL-2R α), 4-1BB(CD137), OX-40(CD134), T-bet(T-box 전사 인자), Eomes(에오메소더민(Eomesodermin)), 그랜자임 B 및 PD-1 발현에 대해 유세포 분석법에 의해 분석하였다. 상청액을 멀티플렉스에 의해 IFN γ , TNF- α , GM-CSF, 그랜자임 B, IL-2, IL-8 및 IL-10에 대해 분석하였다.

[0533]

a) PBMC의 생산

[0534]

버피 코트를 취리히 헌혈 센터로부터 입수하였다. 신선한 말초혈 단핵 세포(PBMC)를 단리하기 위해, 버피 코트를 동일 부피의 DPBS(깁코 바이 라이프 테크놀로지스, 카탈로그 번호 14190326)로 희석하였다. 50 mL 팔콘 원심분리 튜브(TPP, 카탈로그 번호 91050)를 15 mL 히스토팩 1077(시그마 라이프 사이언스, 카탈로그 번호 10771, 폴리슈크로스 및 나트륨 다이아트라이조에이트, 1.077 g/mL의 밀도로 조정됨)로 보충하고, 버피 코트 용액을 15 mL 히스토팩 1077에 적층하였다. 상기 튜브를 30분 동안 400 x g에서 실온에서 저 가속화와 함께 쉬는 시간 없이 원심분리하였다. 이후, PBMC를 계면으로부터 수집하고 3회 DPBS로 세척하고, 90% (v/v) 소태아 혈청(FBS, 깁코 바이 라이프 테크놀로지, 카탈로그 번호 16000-044, Lot 941273, 감마-조사됨, 무-마이코플라스마, 및 56 °C에서 35분 동안 열 불활성화됨) 및 10% 다이메틸 셀록사이드(시그마, 카탈로그 번호 D2650) 10% (v/v)로 이루어진 T 세포 동결 배지에 재현탁하였다. 1 mL를 멀균 저온 바이알에 신속히 옮기고 저온 박스에 옮기고 24시간 동안 -80°C에서 저장하였다. 이후, 바이알을 액체 질소 용기 또는 기상 용기에 옮겼다.

[0535]

6명의 공여자로부터의 바이알을 37°C에서 수욕에서 해동시키고, 10% (v/v) 소태아 혈청(FBS), 1% (v/v) GlutaMAX I, 1 mM 나트륨 피루베이트(시그마, 카탈로그 번호 S8636), 1% (v/v) MEM 비필수 아미노산(시그마, 카탈로그 번호 M7145) 및 50 μM β-미캡토에탄올(시그마, M3148)로 보충된 RPMI 1640 배지로 이루어진 분석 배지에서 세척하였다. 해동 후에, 세포를 2시간 동안 세포 항온처리기에서 37°C 및 5% CO₂에서 휴지시켰다. 세포를 계수하고 DPBS로 세척하고 37°C DPBS에 1x10⁶ 세포/mL로 재현탁하였다. CFDA-SE를 200 nM의 최종 농도로 첨가하고 10분 동안 37°C에서 항온처리하였다. 이후, FBS를 첨가하고, 세포를 세척하고 분석 배지에서 2 x 10⁶ 세포/mL로 설정하였다.

[0536]

b) 표적 세포주

[0537]

NIH/3T3-huFAP 클론 19를 함유하는 T150 플라스크를 DPBS로 세척하고 효소-미함유 PBS-기반 해리 완충제와 함께 8분 동안 37°C에서 항온처리하였다. 세포를 수집하고 세척하고 분석 배지에 재현탁하고 X-선 조사기 RS 2000을 사용하여 50 Gy로 조사하였다. 세포를 분석 배지에 1 x 10⁶ 세포/mL로 설정하였다.

[0538]

MKN45-Fo1R1-PDL1 위암 세포주를 함유하는 T150 플라스크를 DPBS로 세척하고 효소-미함유 PBS-기반 해리 완충제와 함께 8분 동안 37°C에서 항온처리하였다. 세포를 수집하고 DPBS로 세척하고 C 희석제에 재현탁하였다(적어도 250 μL, 8 x 10⁷ 세포/mL 이하). 동일한 양의 C 희석제를 4 μL/mL PKH-26 염료로 보충하고 완전히 혼합하였다. 이러한 염료 용액을 세포에 첨가하고 완전히 즉시 혼합하였다. 세포를 5분 동안 실온에서 항온처리하였다. 이후, FBS를 첨가하고, 세포를 분석 중 세척하고 분석 배지에 재현탁하고 X-선 조사기 RS 2000(라드 소스(Rad source))을 사용하여 50 Gy로 조사하였다. 세포를 분석 배지에 1 x 10⁶ 세포/mL로 설정하였다.

[0539]

c) 분석 설정

[0540]

화합물을 시험하기 위해, 각각의 성분으로 이루어진 마스터 용액을 분석 배지 내에 하기와 같이 제조하였다: 16 nM FAP OX40 iMAB, 800 nM CEA CD3 TCB 및 640 nM 아테졸리주맙. 세포 및 성분을 96-웰 환저 조직 배양 플레이트(TTP, 카탈로그 번호 92097)에서 50 μL의 PKH-26 레드 라벨링된 MKN45-Fo1R1-PD-L1(10,000 세포/웰), 50 μL의 NIH/3T3-huFAP 클론 19(10,000 세포/웰), 25 μL의 1명의 공여자의 PBMC(50,000 세포/웰), 25 μL의 16 nM FAP OX40 iMAB 용액 또는 분석 배지(최종 농도 2 nM), 25 μL의 800 nM CEA CD3 TCB 용액 또는 분석 배지(최종 농도 100 nM), 및 25 μL의 640 nM 아테졸리주맙 용액 또는 분석 배지(최종 농도 80 nM)의 양으로 합하였다. 이어서, 플레이트를 4일 동안 37°C에서 및 5% CO₂에서 가습된 세포 항온처리기에서 항온처리하였다.

[0541]

4일 후에, 50 μL 상청액을 제거하고 -80°C에서 저장하여 나중에 시토카인 함량을 분석하였다(하기 참조). T 세포 증식 및 T 세포 활성화 마커의 표면 발현의 유세포 분석법 분석을 수행하기 위해, 플레이트를 원심분리하고 1회 찬 DPBS로 세척하였다. 샘플을, 2개의 개별적 염색 패널을 위해 동일한 부피로 2개의 96-웰 플레이트에 나누었다. 염색 패널 1의 경우, 세포를 15분 동안 실온(RT)에서 1:800 희석된 LIVE/DEAD 픽서블 아쿠아 데드 셀 스테인(Fixable Aqua Dead Cell Stain)으로 보충된 50 μL/웰 DPBS에서 염색시켰다. 세포를 1회 200 μL/

웰 FACS 완충제로 세척하였다(350 x g 4 분 4°C에서 원심분리, 플리크 오프(flick off)). 이후, 이를 항체 항-인간 CD4(클론 A161A1, 바이오레전드, 카탈로그 번호- 357410), CD8(클론 RPA-T8, 바이오레전드, 카탈로그 번호 301040), CD25(클론 BC96, 바이오레전드, 카탈로그 번호 302636), PD-1(클론 EH12.2H7, 바이오레전드, 카탈로그 번호329920), CD134(클론 Ber-ACT35, 바이오레전드, 카탈로그 번호-350008), CD137(클론 4B4-1, 바이오레전드, 카탈로그 번호- 309814)을 함유하는 FACS 완충제로 구성된 25 μL/웰 염색 용액으로 재현탁시키고 20분 동안 4°C에서 항온처리하였다. 세포를 1회 200 μL/웰 FACS 완충제로 세척하고(350 x g 4분 4°C 원심분리, 플리크 오프), 120 μL/웰 FACS 완충제에 재현탁시킨 후에, 이를 4-레이저 LSRII(비디 바이오사이언스, DIVA 소프트웨어 사용)를 사용하여 동일한 날에 획득하였다.

[0542] 염색 패널 2의 경우, 세포를 15분 동안 실온(RT)에서 1:800 희석된 LIVE/DEAD 꽈서블 아쿠아 데드 셀 스테인으로 보충된 50 μL/웰 DPBS에서 염색시키고 1회 200 μL/웰 FACS 완충제로 세척하였다(350 x g 4분 4°C 원심분리, 플리크 오프). 세포를, 항체 항-인간 CD4(클론 RPA-T4, 바이오레전드, 카탈로그 번호 300558), CD8(SK-1, 바이오레전드, 카탈로그 번호 344710), CCR7(클론 G043H7, 바이오레전드, 카탈로그 번호353204), CD45RO(클론 BC96, 바이오레전드, 카탈로그 번호 304236)를 함유한 FACS 완충제로 구성된 25 μL/웰 염색 용액에 재현탁시키고 20분 동안 4°C에서 항온처리하였다. 세포를 1회 200 μL/웰 FACS 완충제로 세척하고(350 x g 4분 4°C 원심분리, 플리크 오프), 60분 동안 RT에서 1부의 Foxp3 고정/투과화 농축물을 3부의 Foxp3 고정/투과화 희석제(FoxP3/전사 인자 염색 완충제 세트, 이바이오사이언시즈(eBiosciences), 카탈로그 번호-005523-00)와 혼합함에 의한 100 μL/웰의 Foxp3 고정/투과화 작업 용액에 재현탁시켰다. 이어서, 세포를 1부의 투과화 완충제를 9부의 물과 혼합함에 의한 투과화 완충제 작업 용액(FoxP3/전사 인자 염색 완충제 세트, 이바이오사이언시즈, 카탈로그 번호-005523-00)으로 1회 세척하고, 항체 항-인간 EOMES(클론 Dan11mag, 이바이오사이언시즈, 카탈로그 번호-25-4857-80), T-bet(클론 4B10, 바이오레전드, 카탈로그 번호-644815) 및 그랜자임 B(클론 GB11, 바이오레전드, 카탈로그 번호515406)을 함유하는 투과화 완충제 작업 용액으로 구성된 50 μL/웰 염색 용액에 40분 동안 RT에서 재현탁하였다. 이어서, 세포를 2회 200 μL/웰 투과화 완충제 작업 용액으로 세척하고, 120 μL/웰 FACS 완충제에 재현탁시킨 후에, 4-레이저 LSRII(비디 바이오사이언스, DIVA 소프트웨어 사용)를 사용하여 동일한 날에 획득하였다. 데이터를 PC용 플로우조(FlowJo) v10.3(플로우조 엘엘씨), 마이크로소프트 엑셀(Microsoft Excel)(프로페셔널 플러스(professional Plus) 2010) 및 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) v6.07(그래프패드 소프트웨어 인코포레이티드)을 사용하여 분석하였다. 살아있는 CD4 및 CD8 T 세포를 게이팅하고(좀비 아쿠아(Zombie Aqua)-, CD4 또는 CD8+), 계수하고, 활성화 마커(CD134, CD137, CD25, PD-1), 성숙 마커(CCR7, CD45RO), 전사 인자(T-bet, Eomes) 또는 시토카인(그랜자임 B)의 평균 형광 강도(MFI) 및 양성 세포의 백분율 또는 평균 형광 강도(MFI)를 각각의 조건에 대해 플롯팅하였다.

[0543] 상청액에 방출된 시토카인을 분석하기 위해, 이전에 동결된 샘플을 가져와 제조사의 지시에 따라 혈구계산 비드 어레이를 사용하여 IFN γ , GM-CSF, TNF-α, IL-2, 그랜자임 B, IL-8 및 IL-10에 대해 분석하였다. 평가한 시토카인은 IL-2(인간 IL-2 CBA Flex- set (비드 A4), 비디 바이오사이언스, 카탈로그 번호 558270), TNF-α(인간 TNF-α CBA Flex- set (비드 C4), 비디 바이오사이언스, 카탈로그 번호 560112), IFN-γ(IFN-γ CBA Flex-set (비드 E7), 비디 바이오사이언스, 카탈로그 번호 558269), IL-10(인간 IL-10 CBA Flex- set (비드 B7), 비디 바이오사이언스, 카탈로그 번호 558274), TNF(인간 TNF CBA Flex- set (비드 C4), 비디 바이오사이언스, 카탈로그 번호 560112), IL-8(인간 IL-8 CBA Flex- set (비드 A9), 비디 바이오사이언스, 카탈로그 번호 558277), 그랜자임 B(인간 그랜자임 B CBA Flex- set (비드 D7), 비디 바이오사이언스, 카탈로그 번호 560304)였다.

6.2 결과

6.2.1 CEA CD3 TCB 및 FAP OX40 iMAb의 조합은 a-PD-L1과의 조합보다 우수하였다.

[0546] 도 31A 및 31B에 나타낸 바와 같이, 100 nM CEA CD3 TCB의 첨가(점으로 채워진 막대, 채워진 삼각형)는 활성화 마커 CD25의 발현, 및 CD4 및 CD8 T 세포의 증식을 증가시킬 수 있었으나, 2 nM FAP OX40 iMAb 단독(빈 막대, 빈 원)은 그렇지 않았다. FAP OX40 iMAb와 CEA CD3 TCB(회색 막대, 빈 정사각형)의 조합 및/또는 FAP OX40 iMAb와 a-PD-L1의 조합(흑색 막대, 채워진 회색 정사각형)은, 도 31A 및 31B에 나타낸 바와 같이 CEA CD3 TCB 및 a-PD-L1의 병용 치료와 비교하여(빈 막대, 채워진 흑색 원), 최고 활성화 및 CD4 및 CD8 T 세포의 증식을 야기하였다. 또한, FAP OX40 iMAb 및 CEA CD3 TCB 조합은 CD4 T 세포 상의 T 세포 전사 인자(T-bet)의 보다 높은 백분율 및 CD8 T 세포 상의 T-bet의 보다 높은 발현을 야기하였다(도 32A 및 32B). T-bet 발현은 T 혈펴 1 세포 혈통 위탁을 조절하고, 이를 결과는 FAP OX40 iMAb 처리가 Th1 T 세포 반응 유도를 야기함을 보여준다. 또한, 도 33A 내지 33D에 나타낸 바와 같이, FAP OX40 iMAb 및 CEA CD3 TCB 조합 처리가 그랜자임 B 발현 CD4

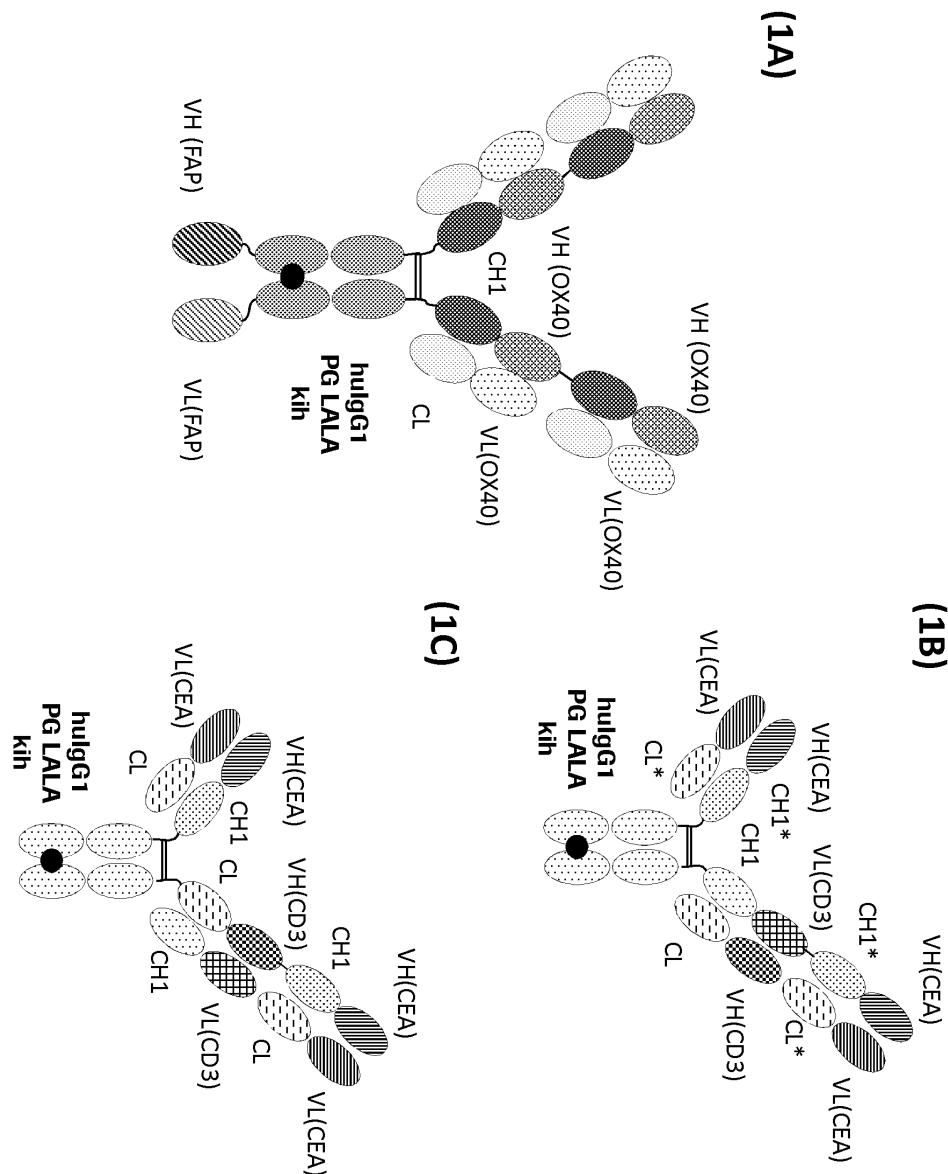
및 CD4 T 세포의 보다 높은 백분율을 야기하고, 이는 T 세포의 보다 높은 세포 독성 가능성을 시사한다. 실험의 종점에서 상청액의 시토카인 분석은 CEA CD3 TCB 및 a-PD-L1 처리와 비교하여, CEA CD3 TCB 및 FAP OX40 iMAb 처리에서 전염증성 시토카인 IFN- γ 및 그랜자임 B의 보다 많은 양을 나타냈으나, 공여자 대 공여자의 높은 가변성 때문에, 차이는 통계적으로 유의하지 않았다. 종합해보면, CEA CD3 TCB와 FAP OX40 iMAb의 조합은 CD4 및 CD8 T 세포 둘 모두에서 우수한 활성화, 증식 및 Th1 분화를 야기하였다.

[0547] 6.2.2 CEA CD3 TCB, FAP OX40 iMAb 및 PD-L1의 삼중 조합은 최고 시토카인 분비를 야기한다.

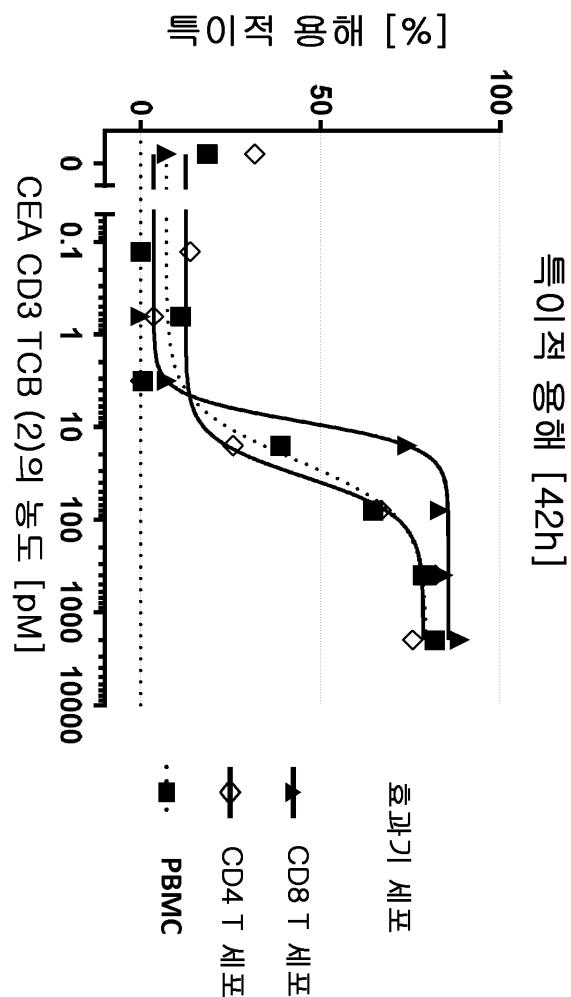
[0548] 도 34A 내지 34C에 나타낸 바와 같이, CEA CD3 TCB, FAP OX40 iMAb 및 PD-L1의 삼중 조합(흑색 막대, 채워진 희색 정사각형)은 모든 다른 처리군과 비교하여 면역 세포-활성화 전염증성 시토카인, 예컨대 IFN- γ , 그랜자임 B 및 IL-8 방출에 있어서 가장 효과적이었다. 도 34C에 나타낸 바와 같이, 삼중 조합 처리는 또한, 분비된 시토카인 측정 결과와 일치하여, CD4 및 CD8 T 세포 상의 세포 용해성 효소 그랜자임 B의 최고 세포내 발현을 야기하였다. 삼중 조합을 CEA CD3 TCB 및 a-PD-L1의 조합과 비교한 시토카인의 증가 배수를 도 35A 내지 35C에 나타냈다. 상이한 공여자 사이에 시토카인 분비 수준의 큰 차이에도 불구하고, 삼중 조합은 대부분의 시험된 공여자에서 2배 초과의 차이를 야기하였다. 최고 변화 배수는 IL-8 및 IFN γ 에 대해 관찰되었다. 도 31A 및 31B에 나타낸 바와 같이, 삼중 조합(흑색 막대, 채워진 희색 원)은, CEA CD3 TCB 및 FAP OX40 iMAb 조합 처리와 비교하여 CD4 및 CD8 T 세포의 증식 및 활성화에서 변화를 야기하지 않았다. 종합해보면, CEA CD3 TCB와 조합될 때 FAP OX40 iMAb 공자극은 T 세포 활성화, Th1 혈통의 증식 및 세포내 발현, 전사 인자 T-bet 및 그랜자임 B 발현의 자극에 있어서 강한 효과를 야기한다. 이러한 조합에 PD-L1의 첨가는, 세포내 증가된 발현 및 분비된 그랜자임 B 및 전염증성 시토카인 IFN- γ 에 의해 알 수 있는 바와 같이, CD4 및 CD8 T 세포 둘 모두에 대한 세포 독성 가능성을 추가로 증진시킨다.

도면

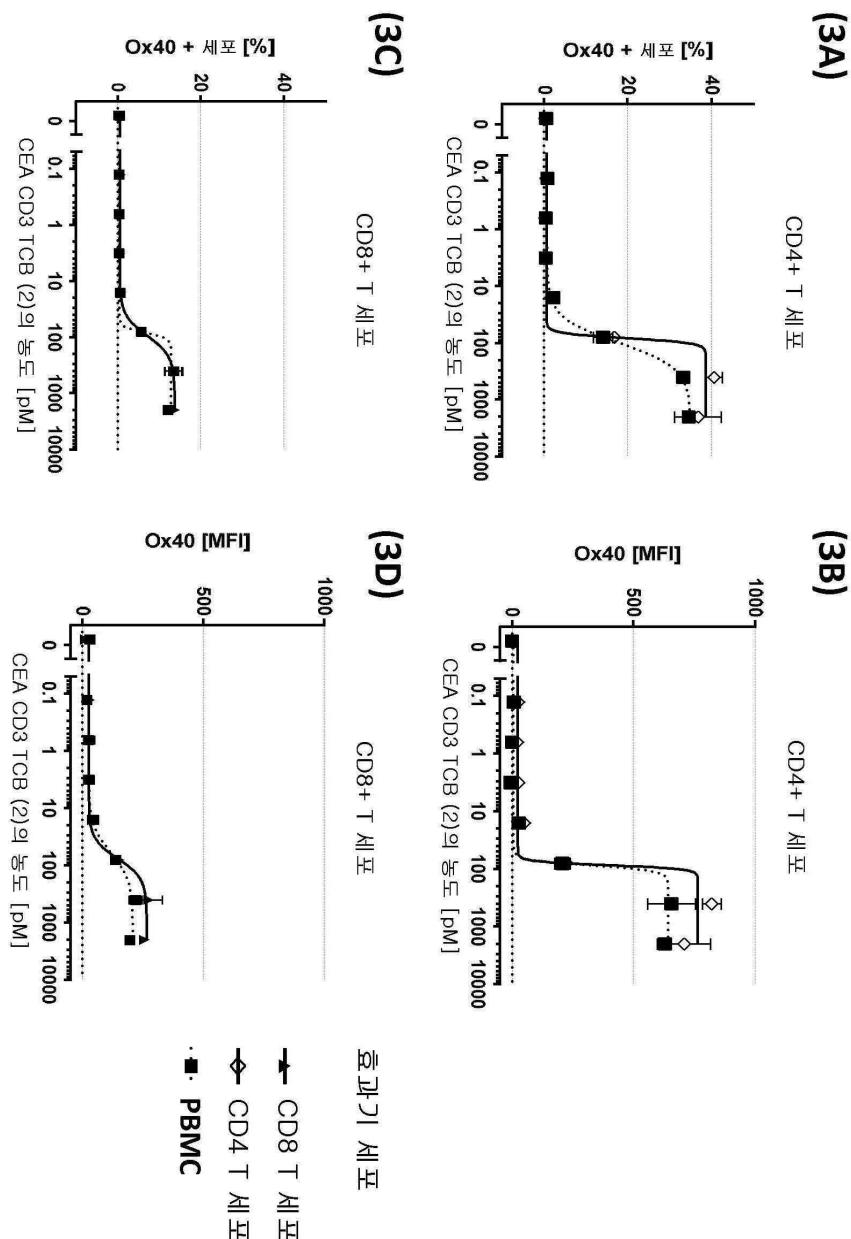
도면1



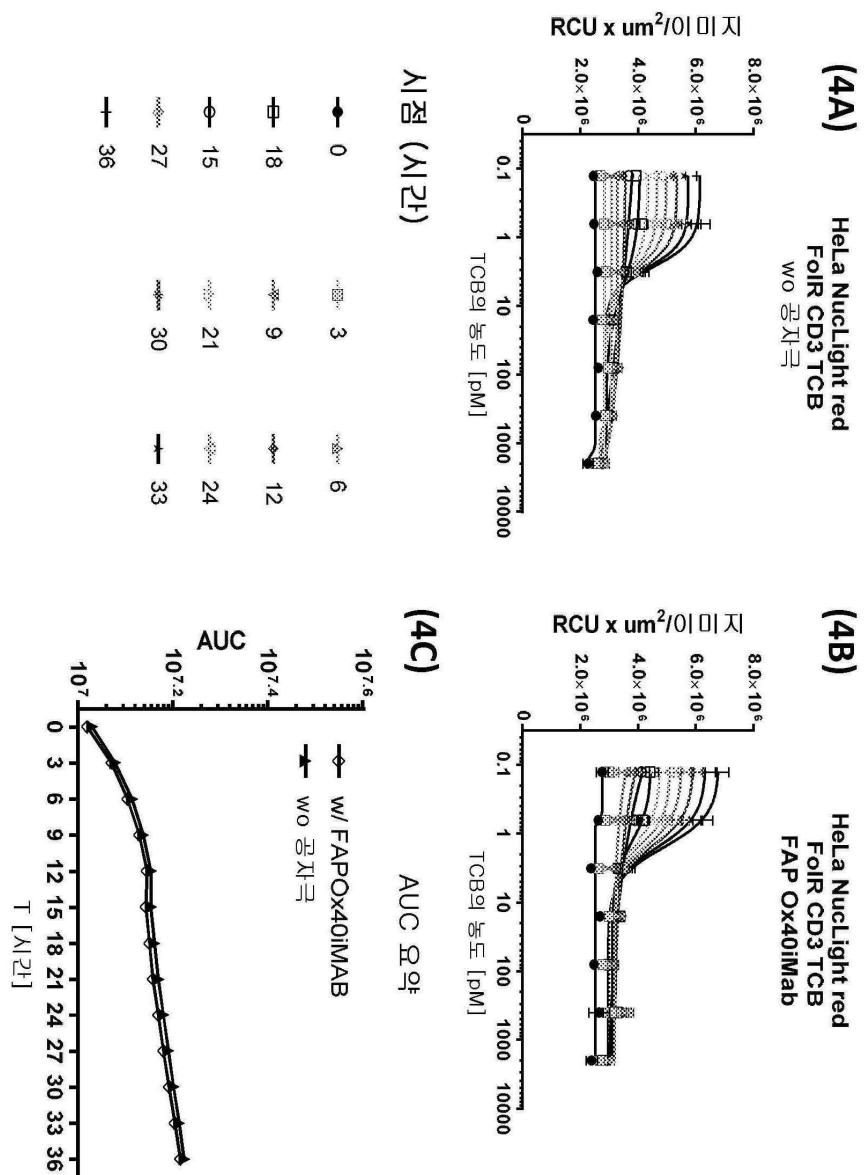
도면2



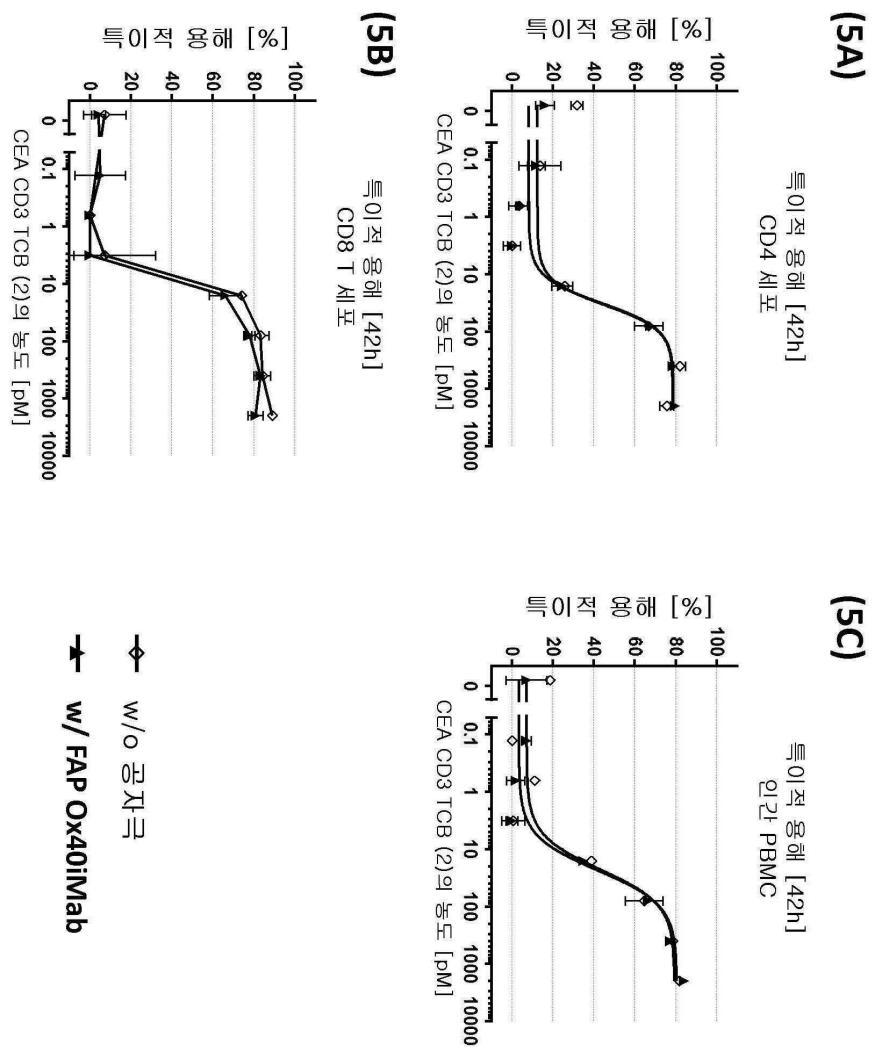
도면3



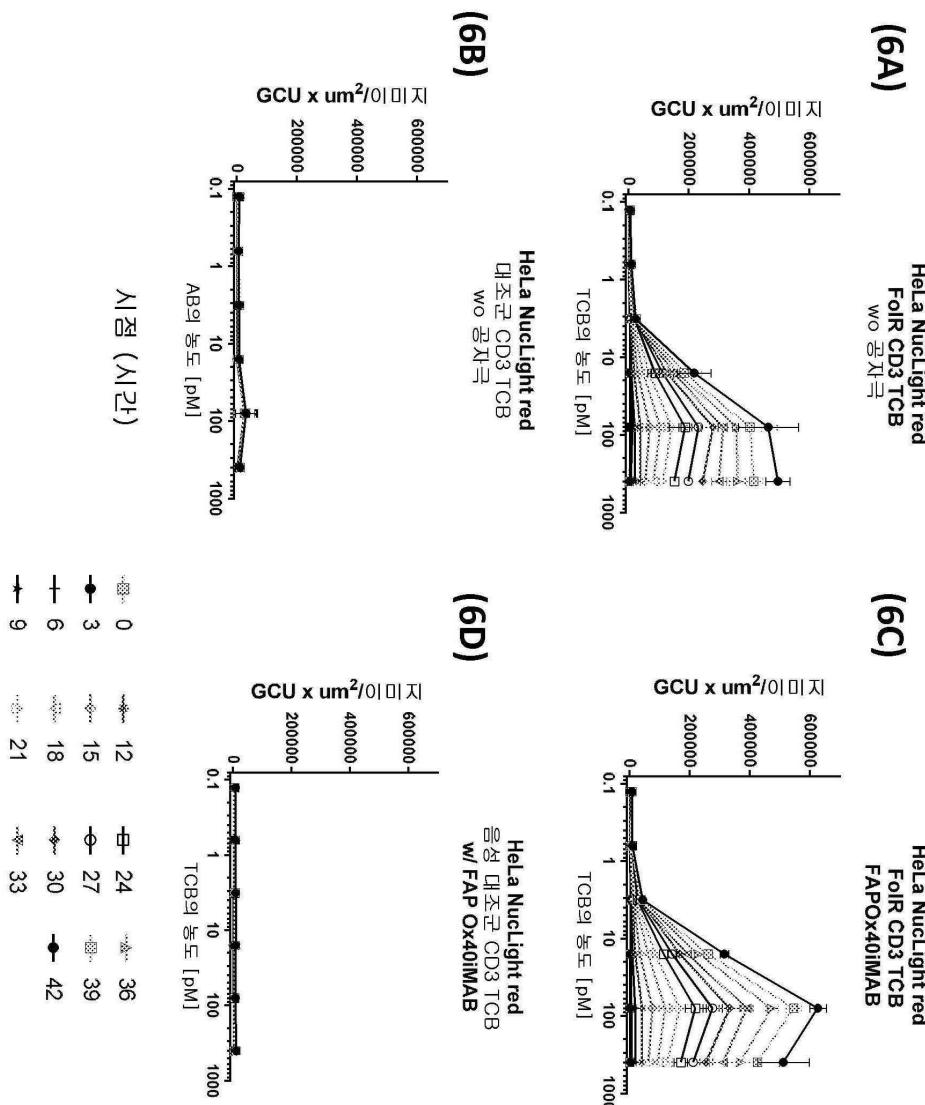
도면4



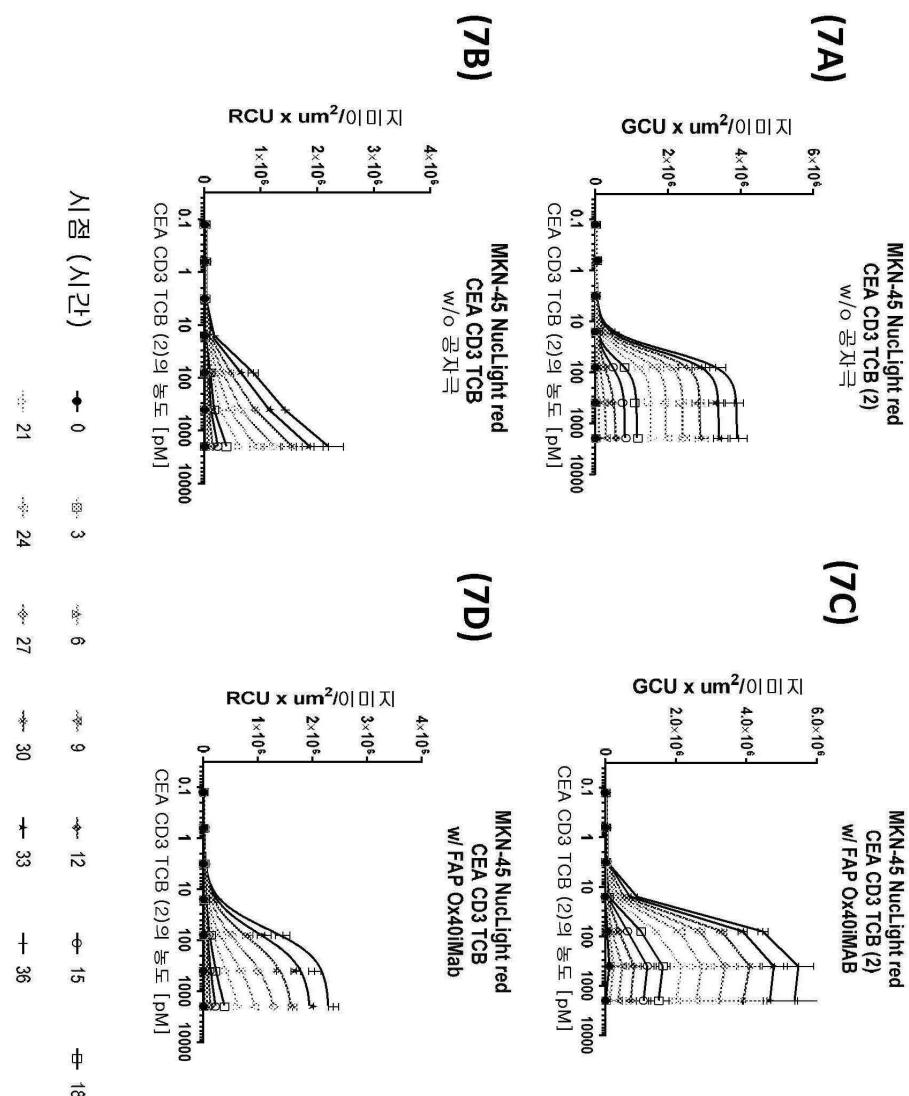
도면5



도면6



도면7



시점 (시간)	◆ 0	◑ 3	▲ 6	△ 9	▲ 12	◐ 15	■ 18
··· 21	··· 24	··· 27	··· 30	··· 33	··· 36		

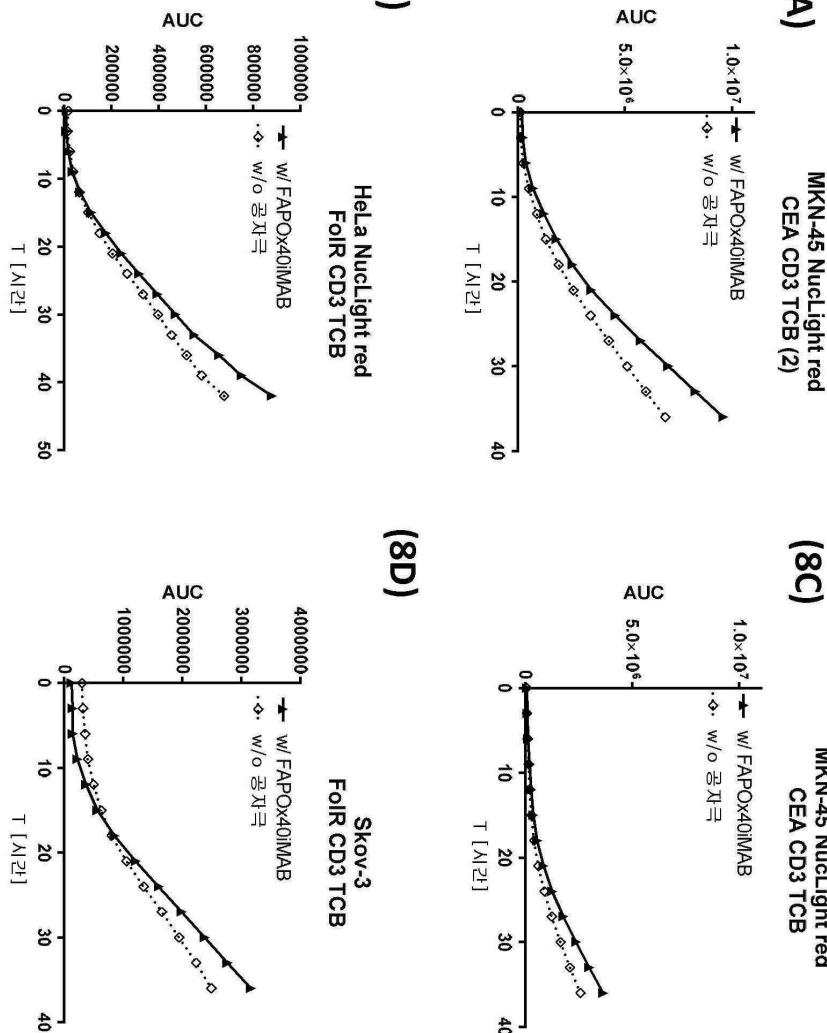
도면8

(8A)

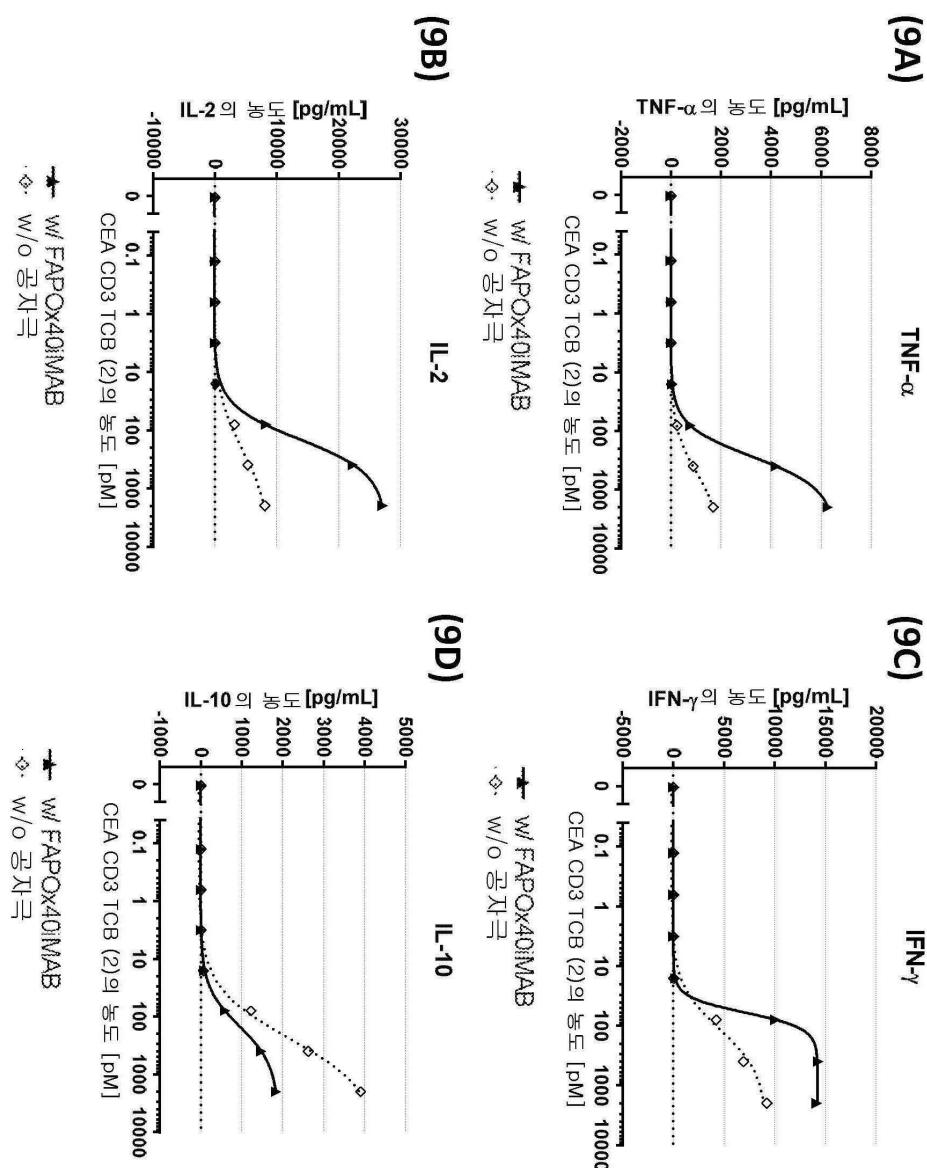
(8B)

(8C)

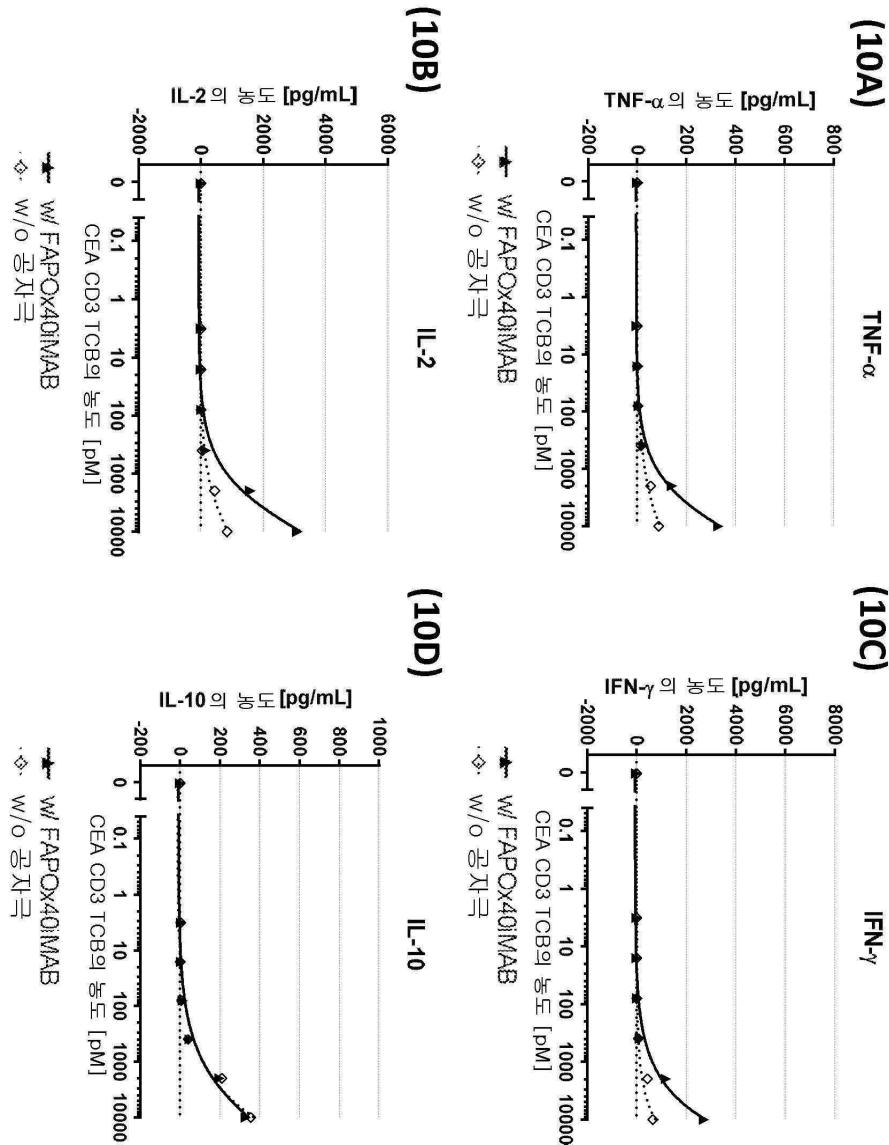
(8D)



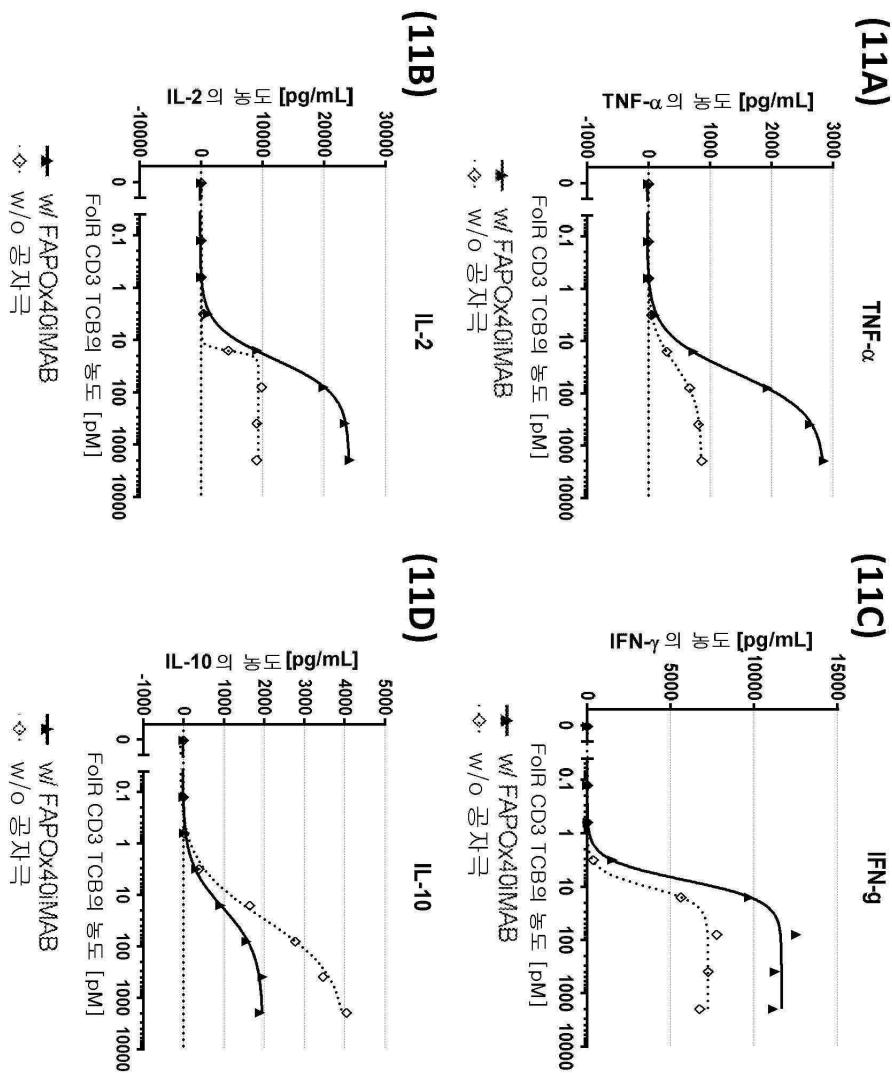
도면9



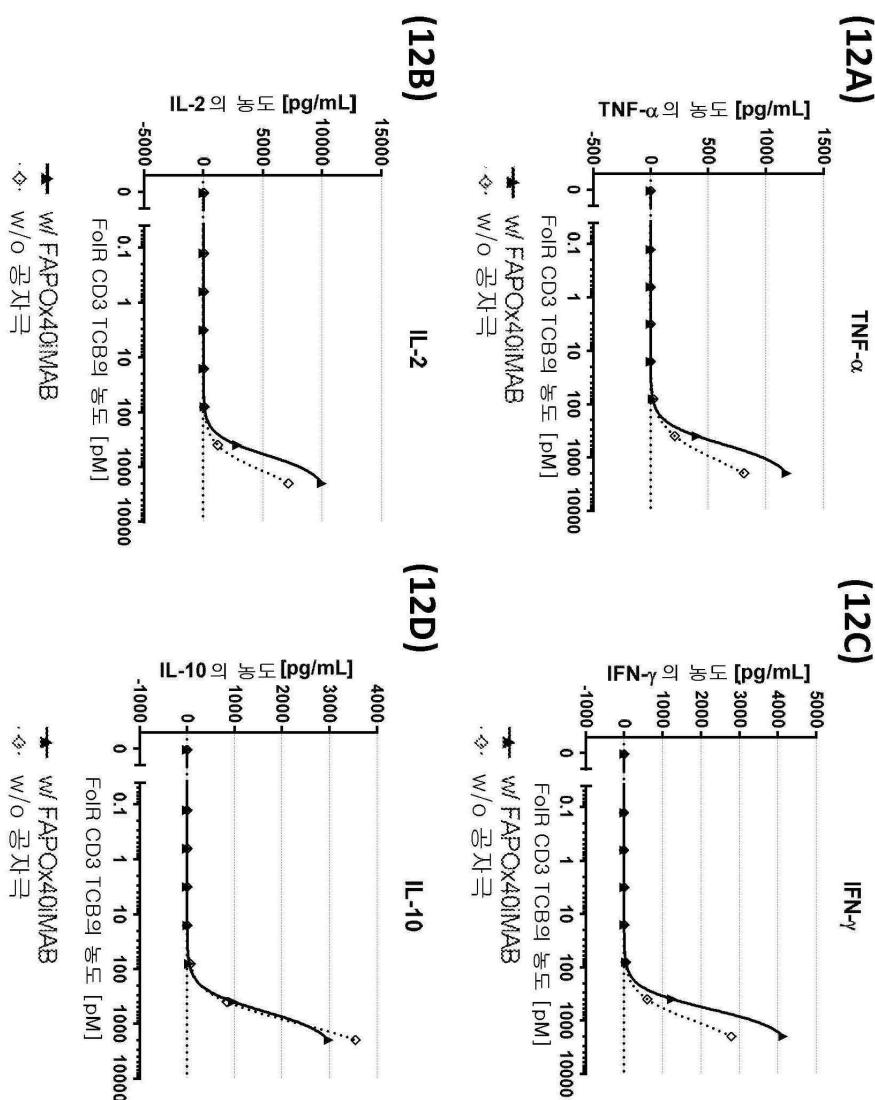
도면10



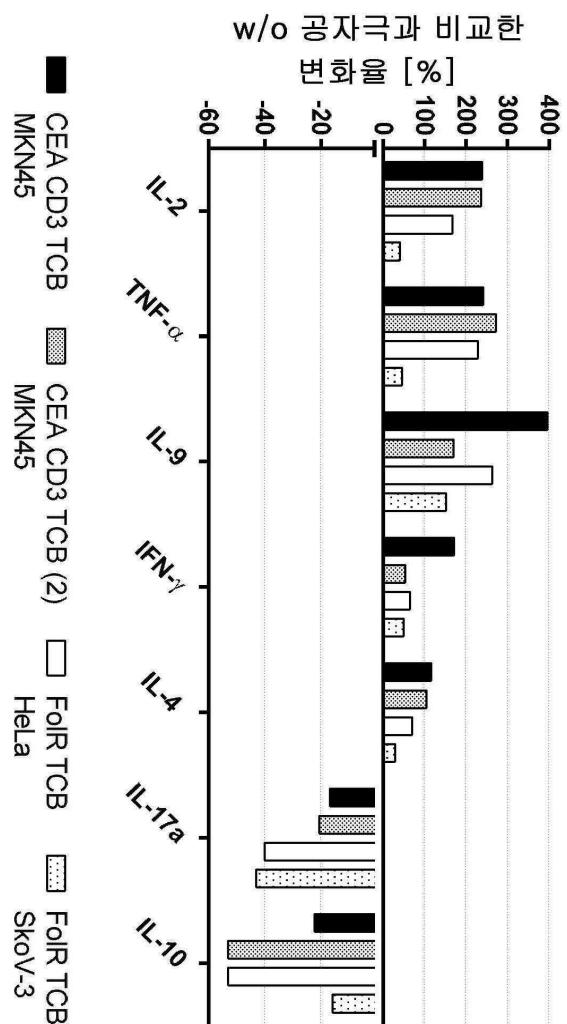
도면11



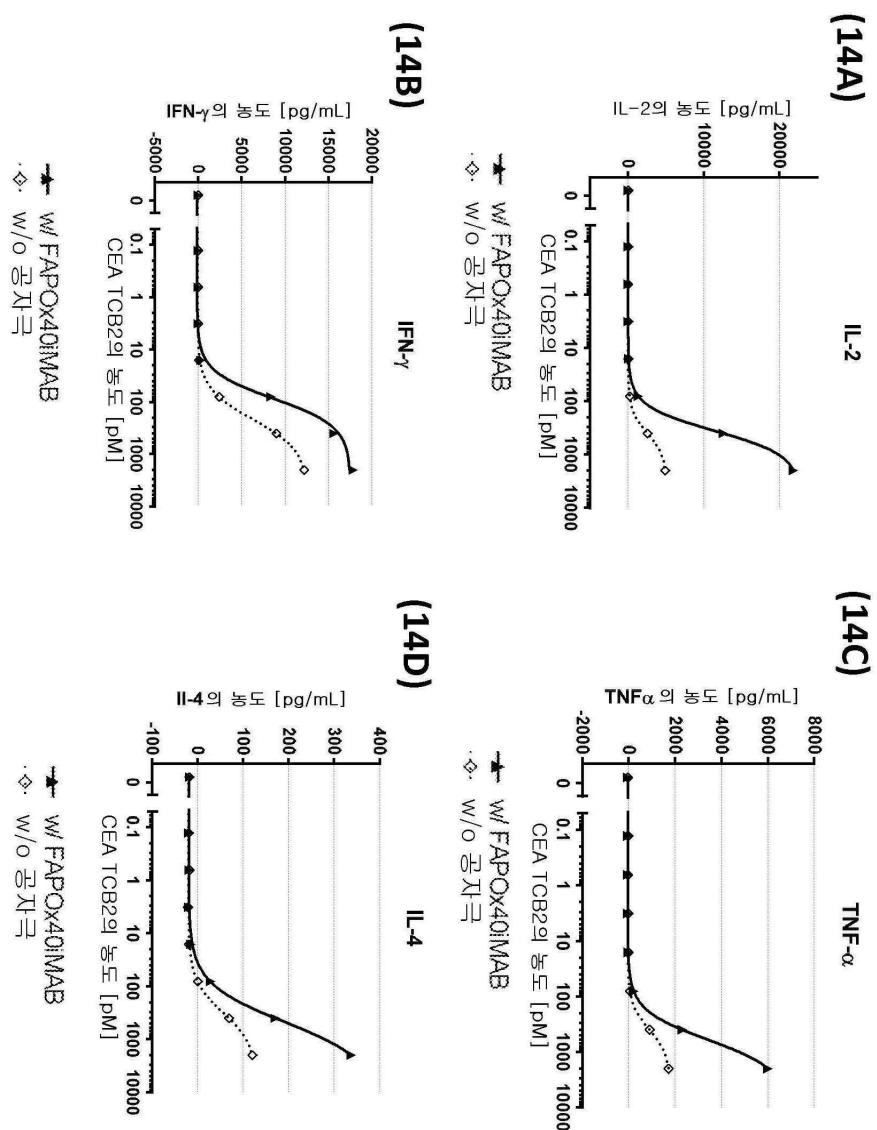
도면12



도면13



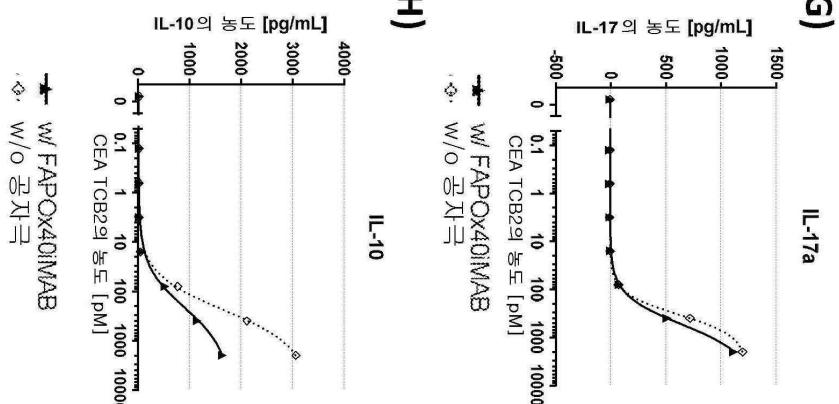
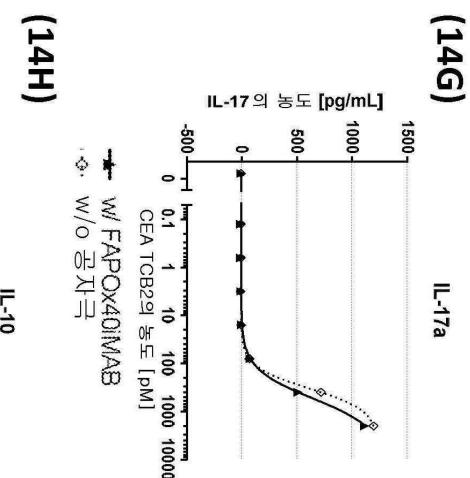
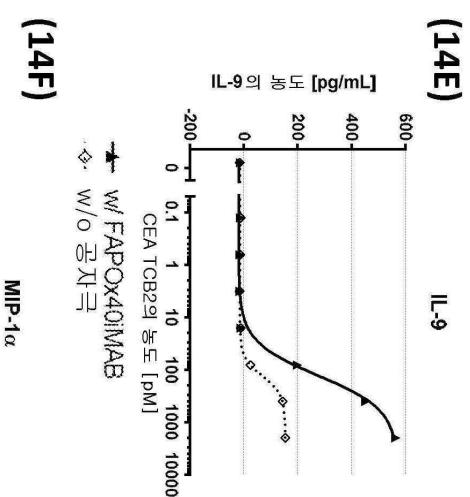
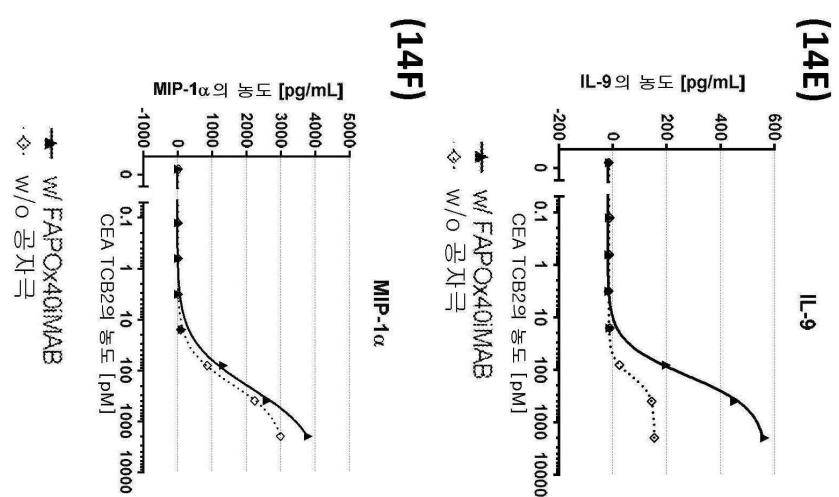
도면14a



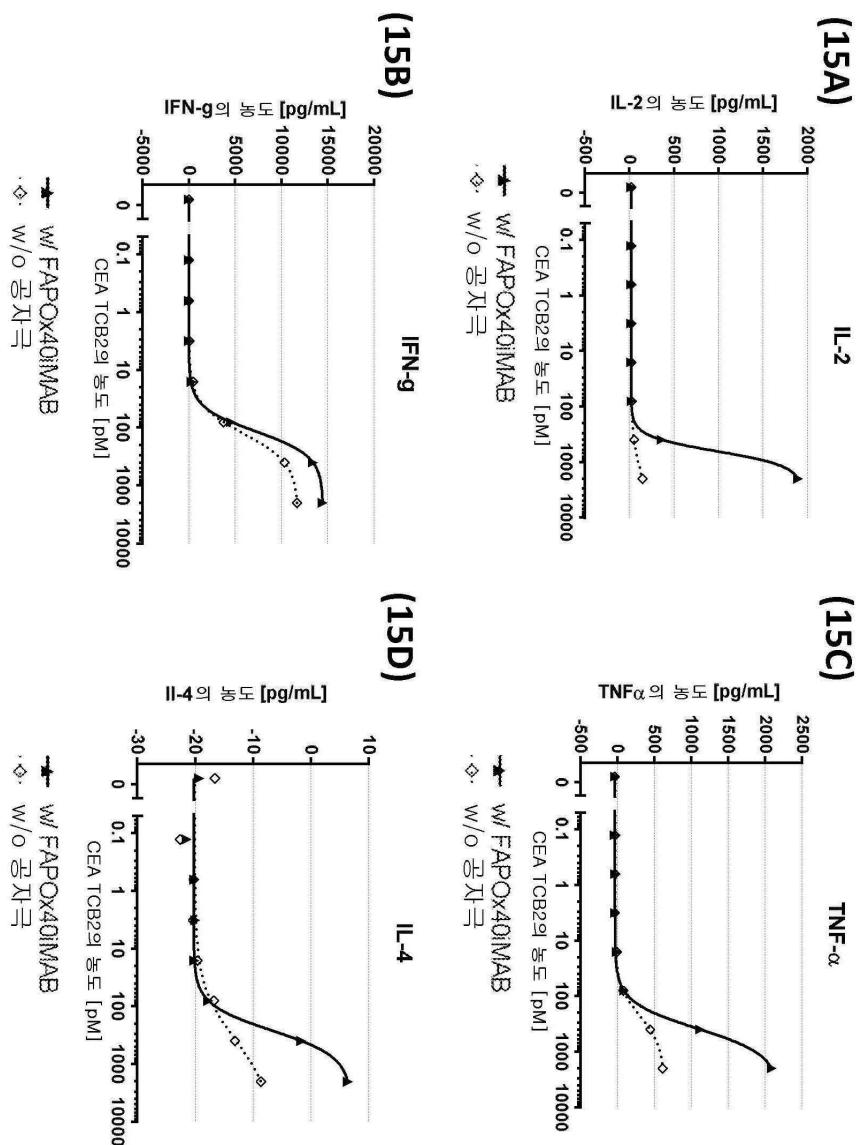
■ w/ FAPCOX40MAB
◊ w/o 공자극

■ w/ FAPCOX40MAB
◊ w/o 공자극

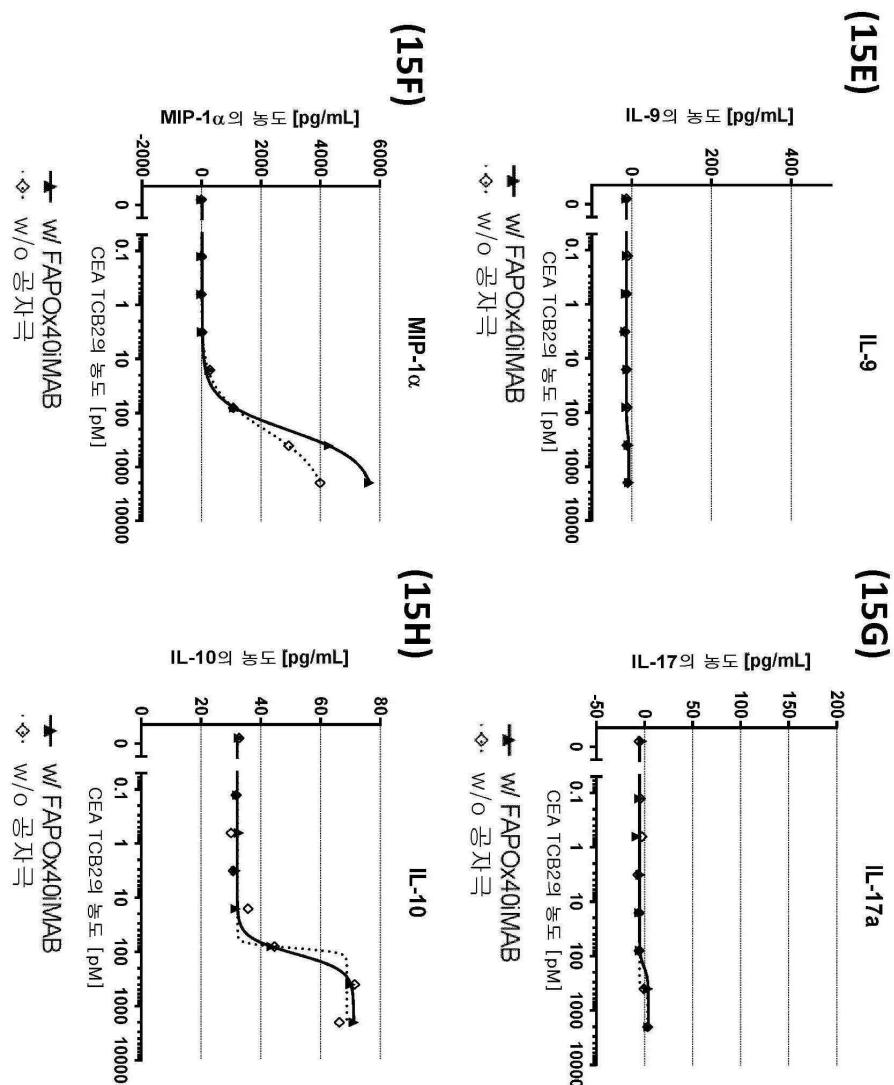
도면14b



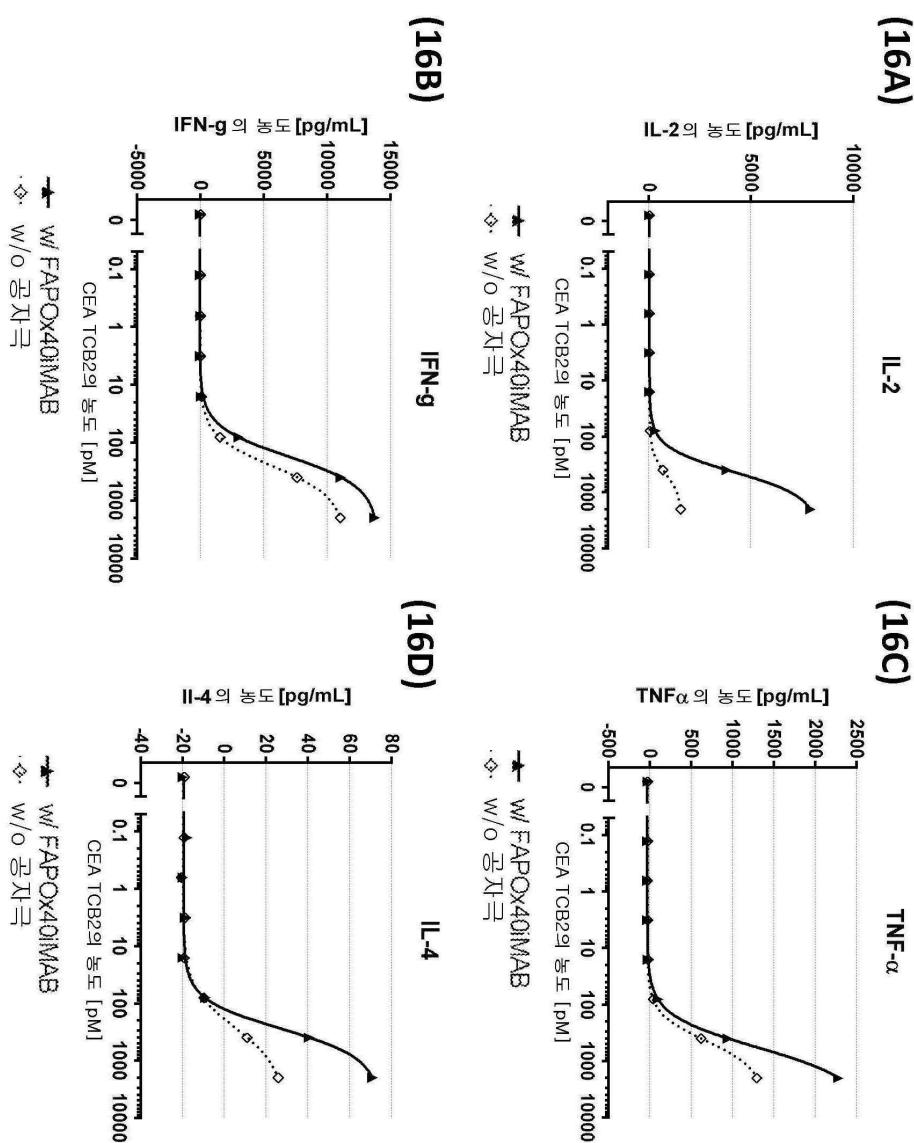
도면15a



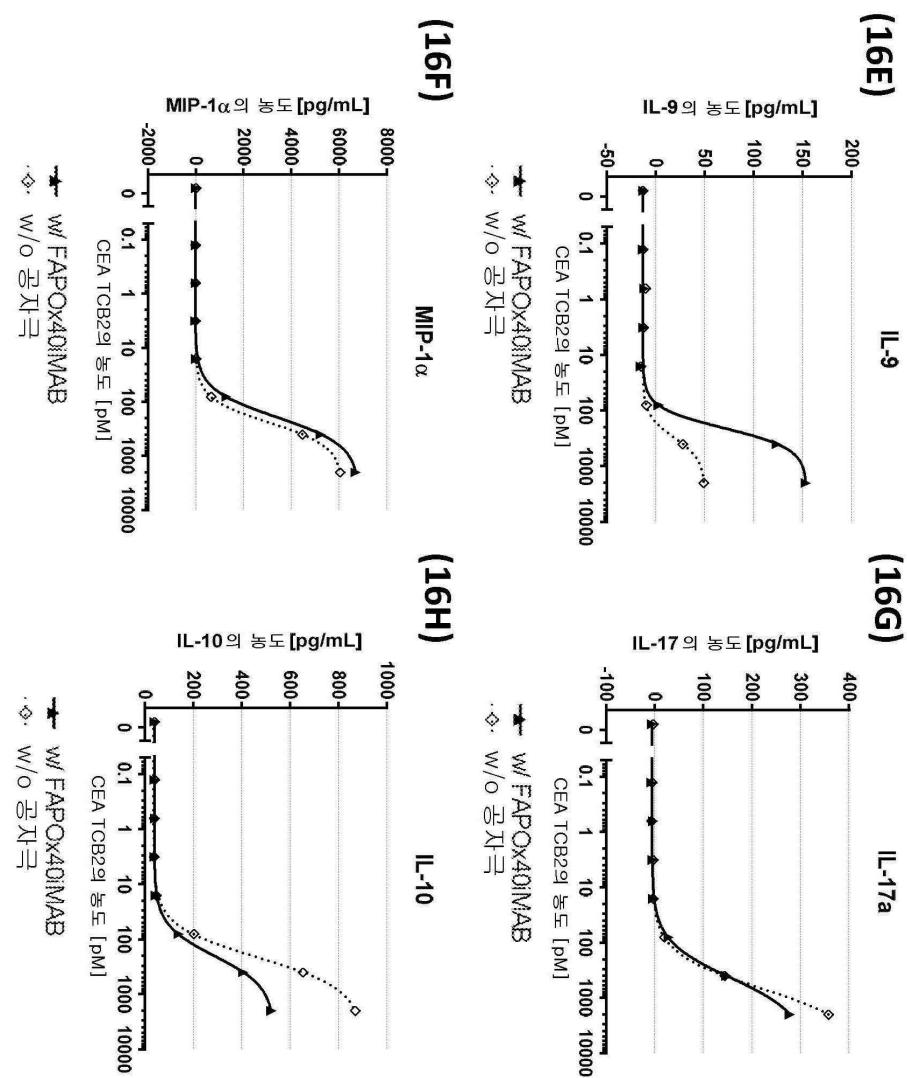
도면15b



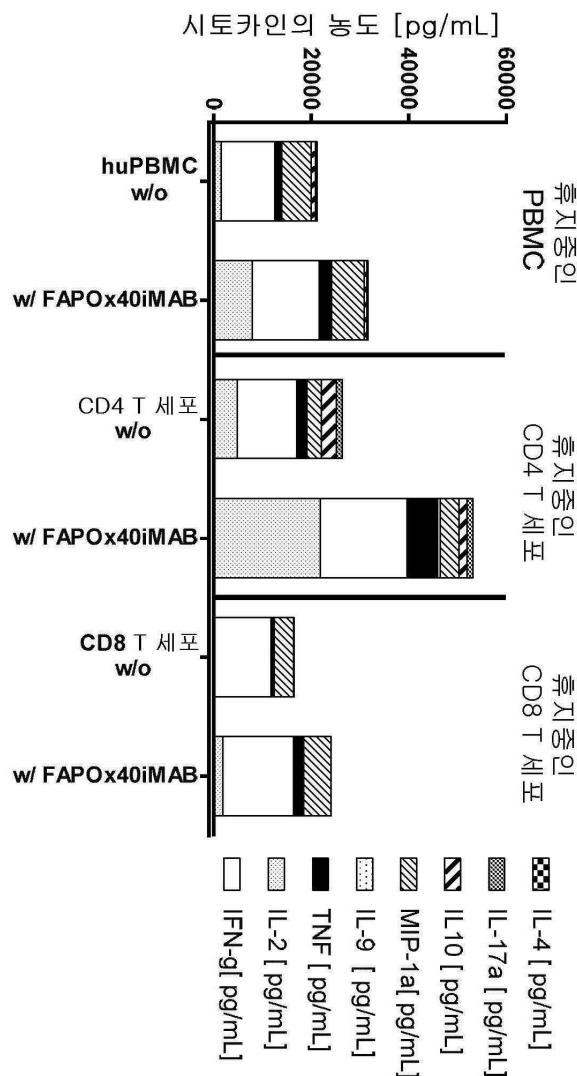
도면16a



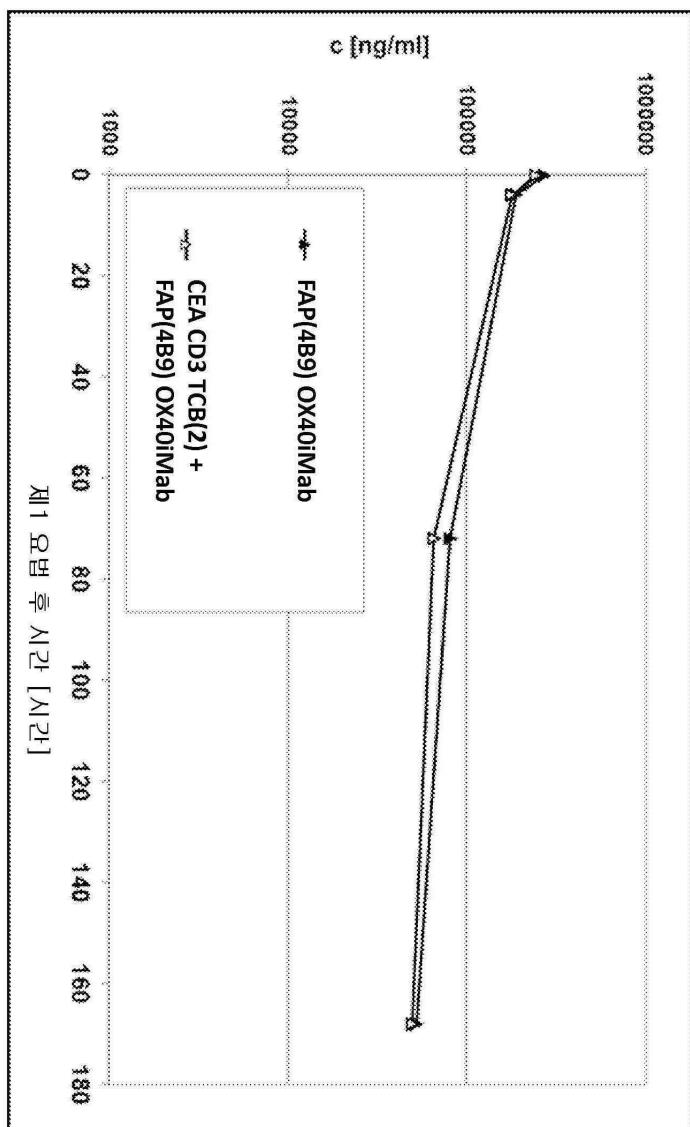
도면16b



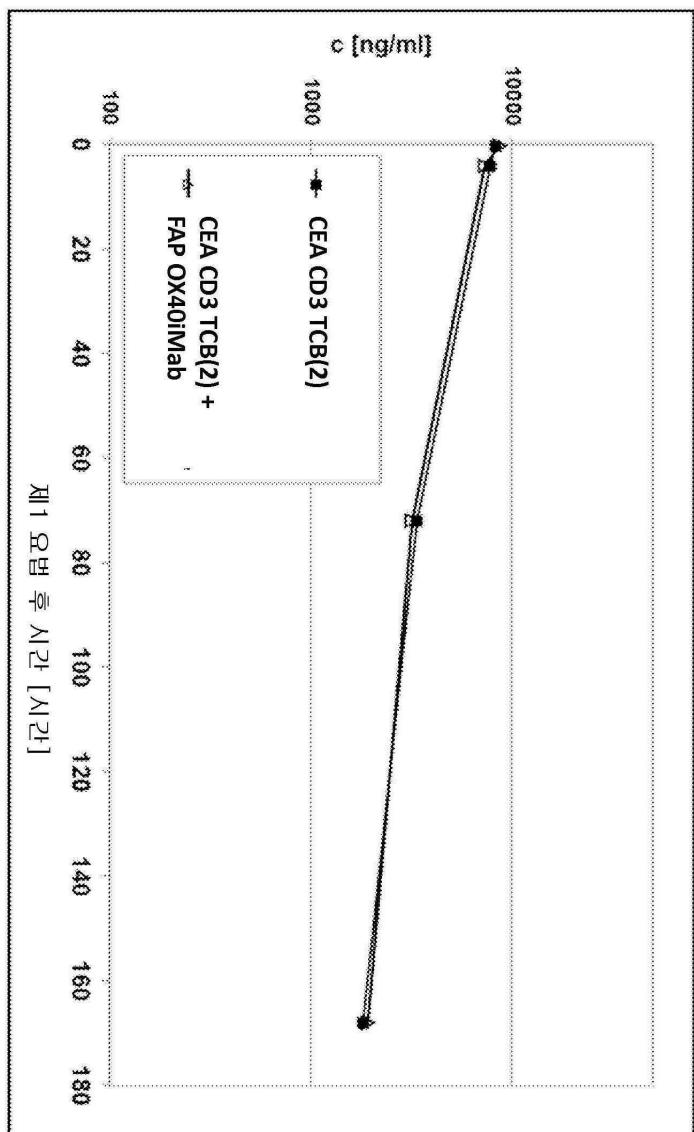
도면17



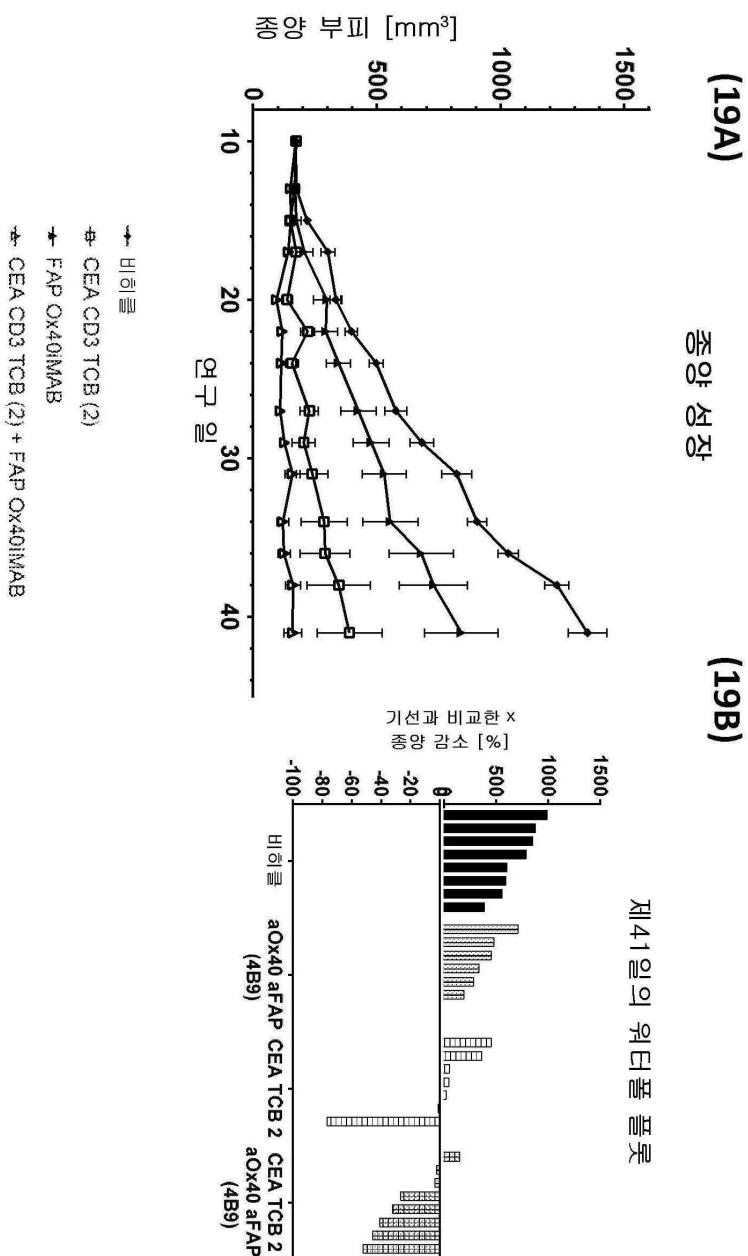
도면18a



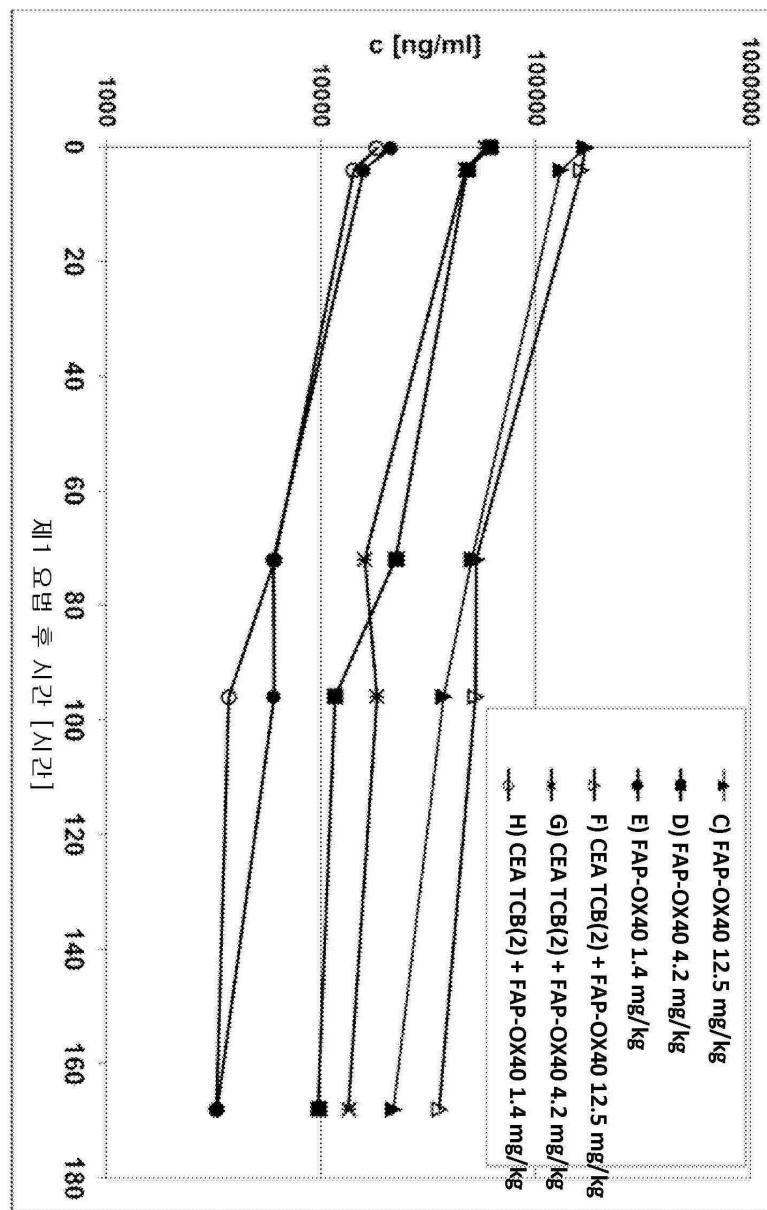
도면18b



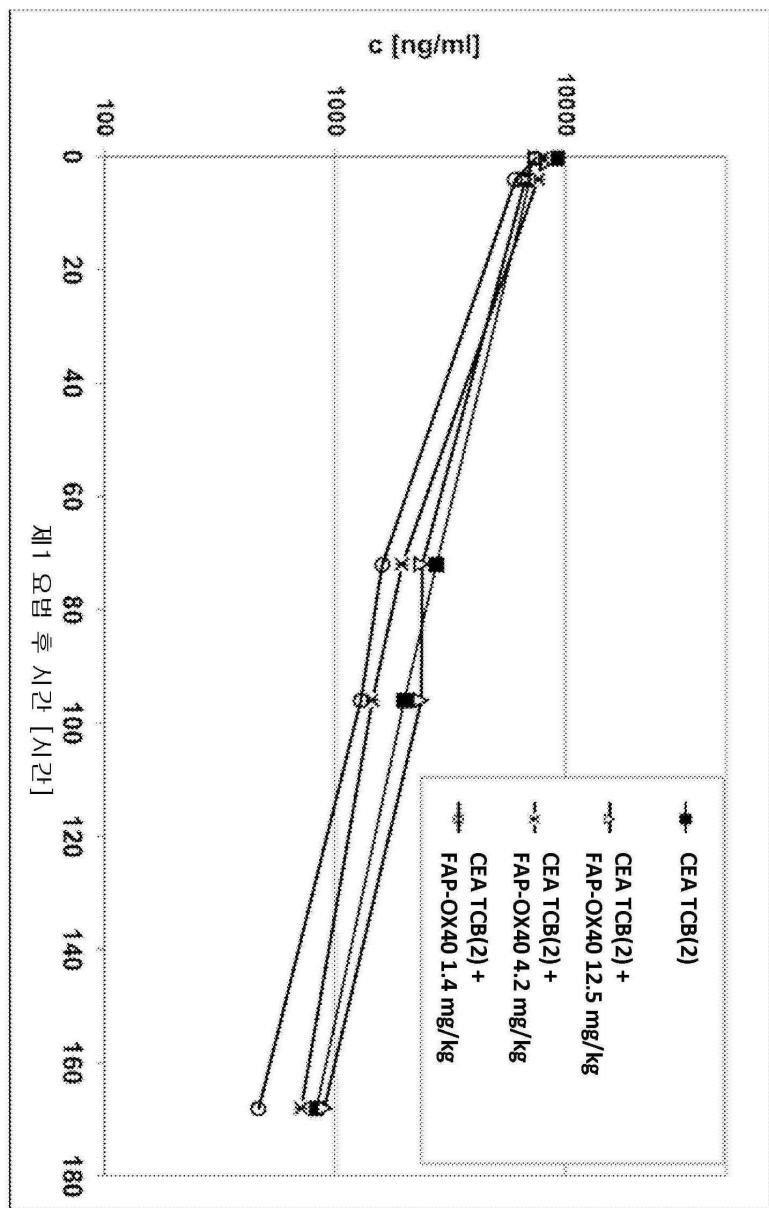
도면19



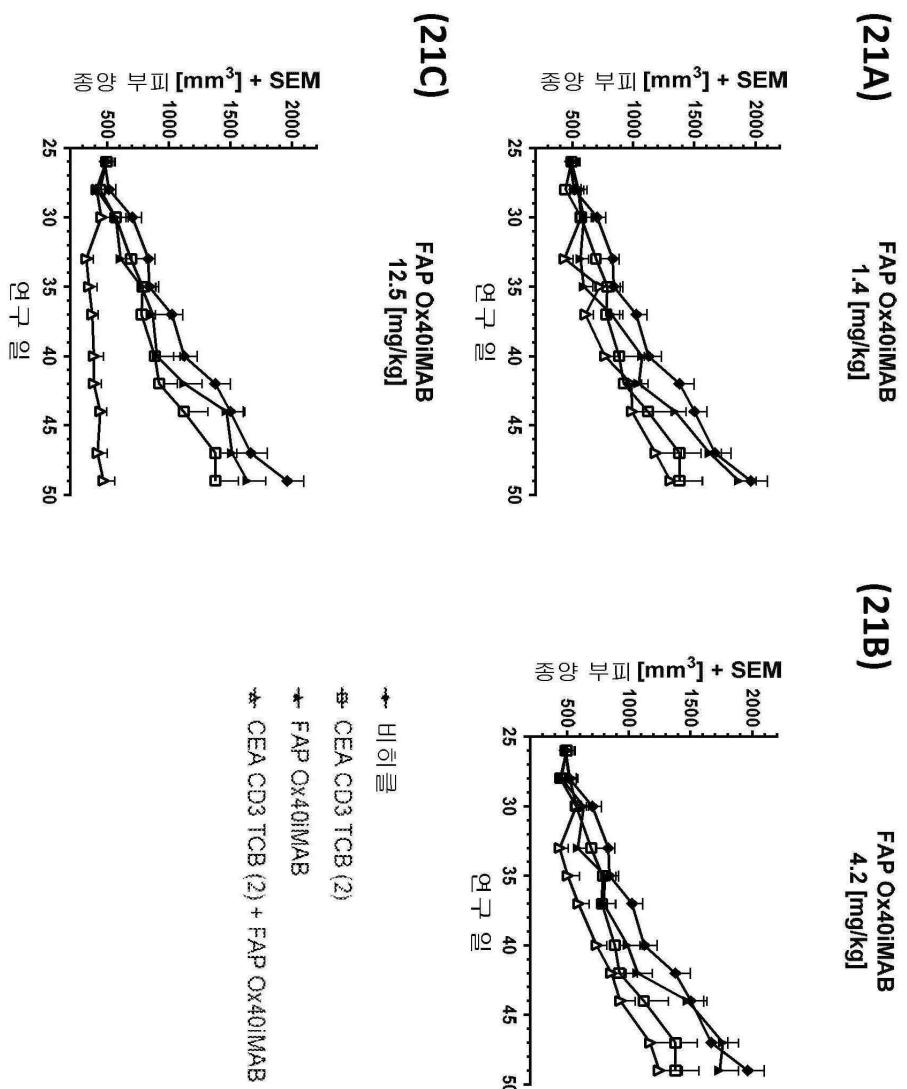
도면20a



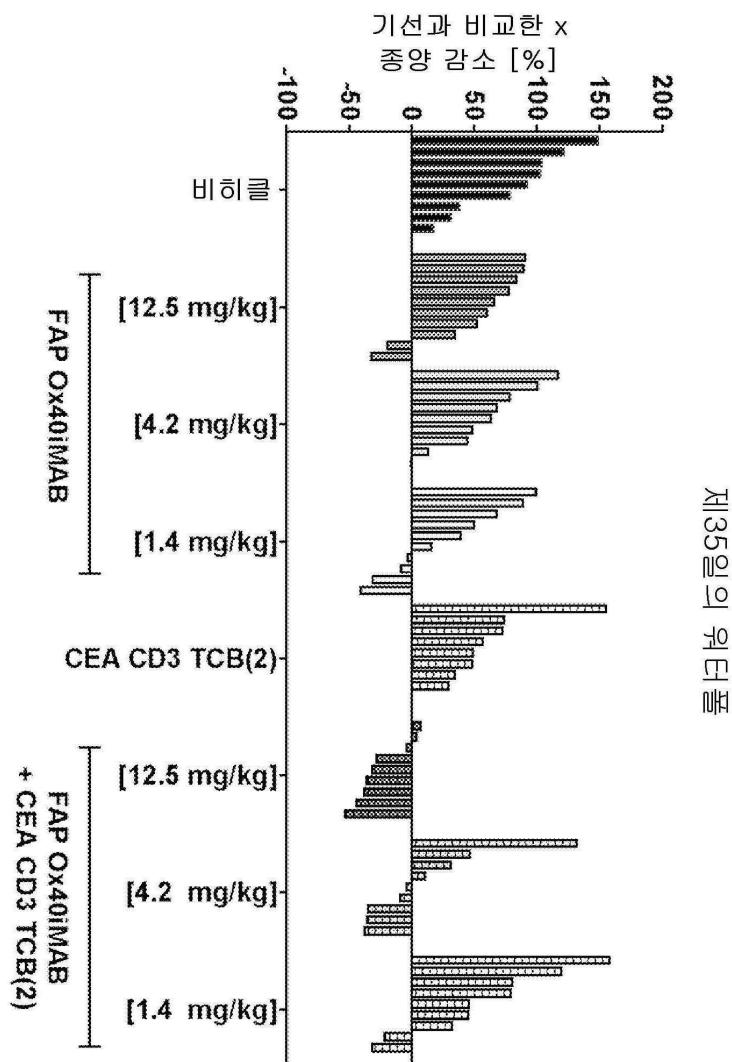
도면20b



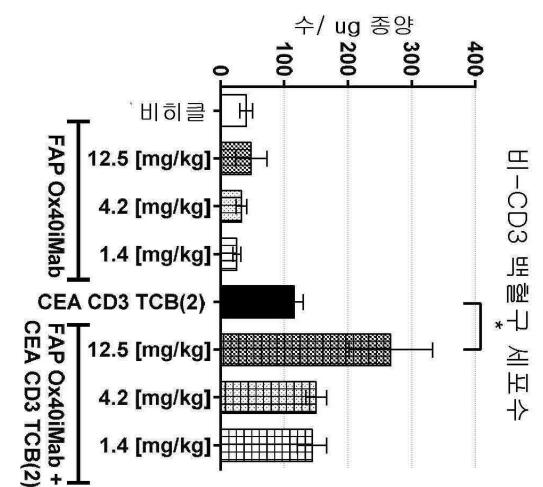
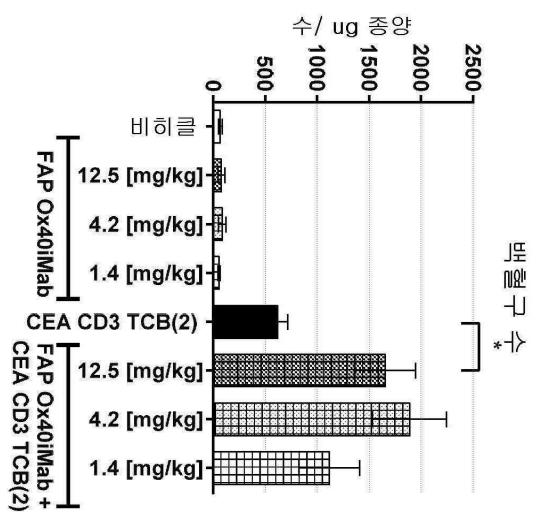
도면21



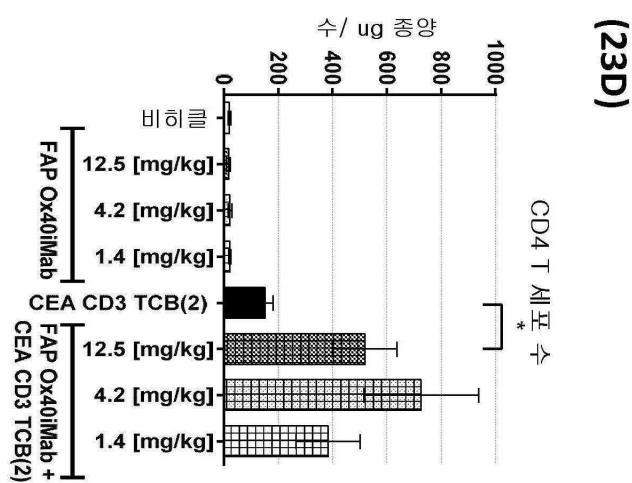
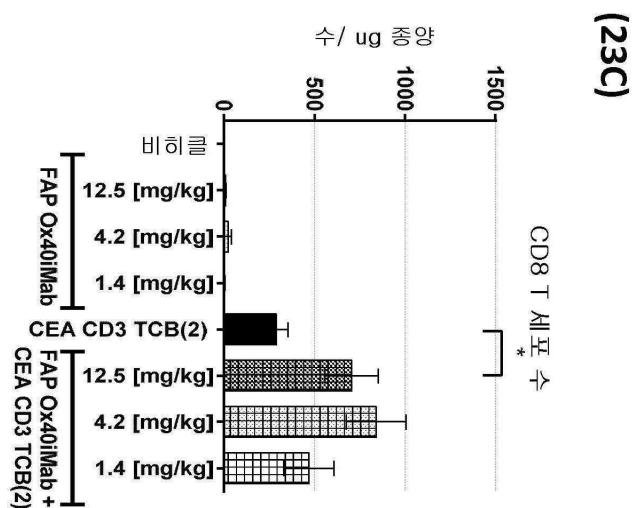
도면22



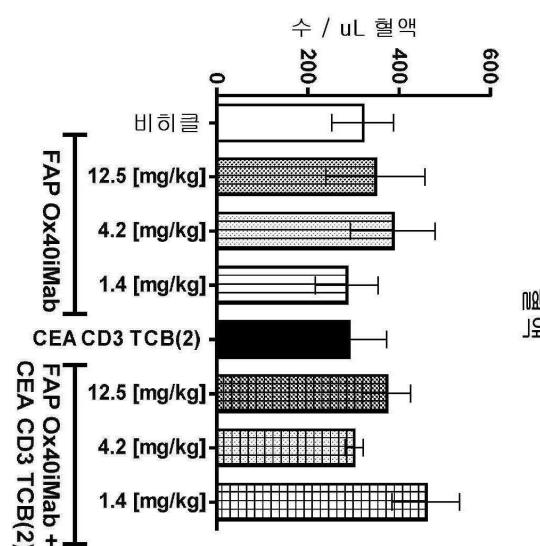
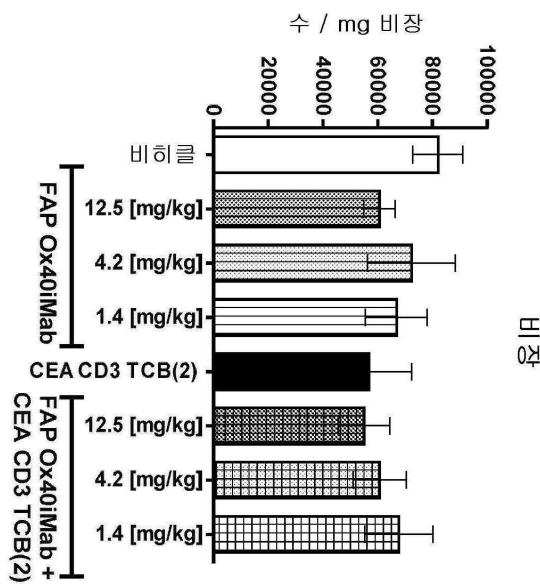
도면23a



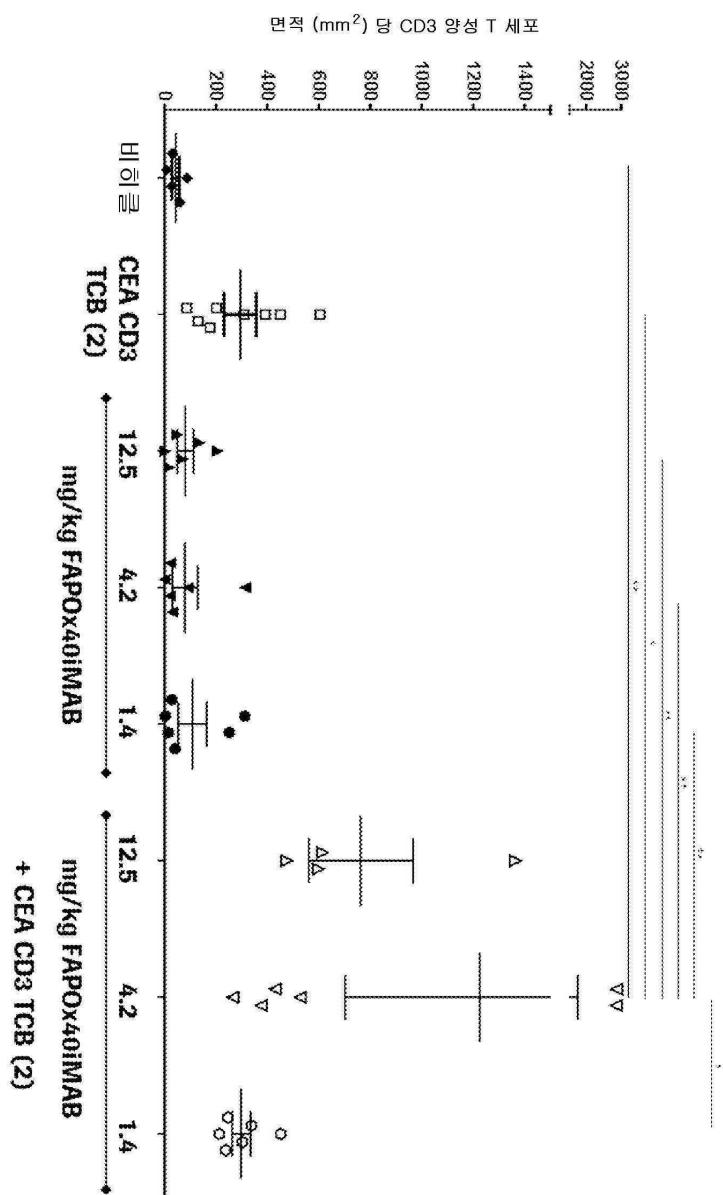
도면23b



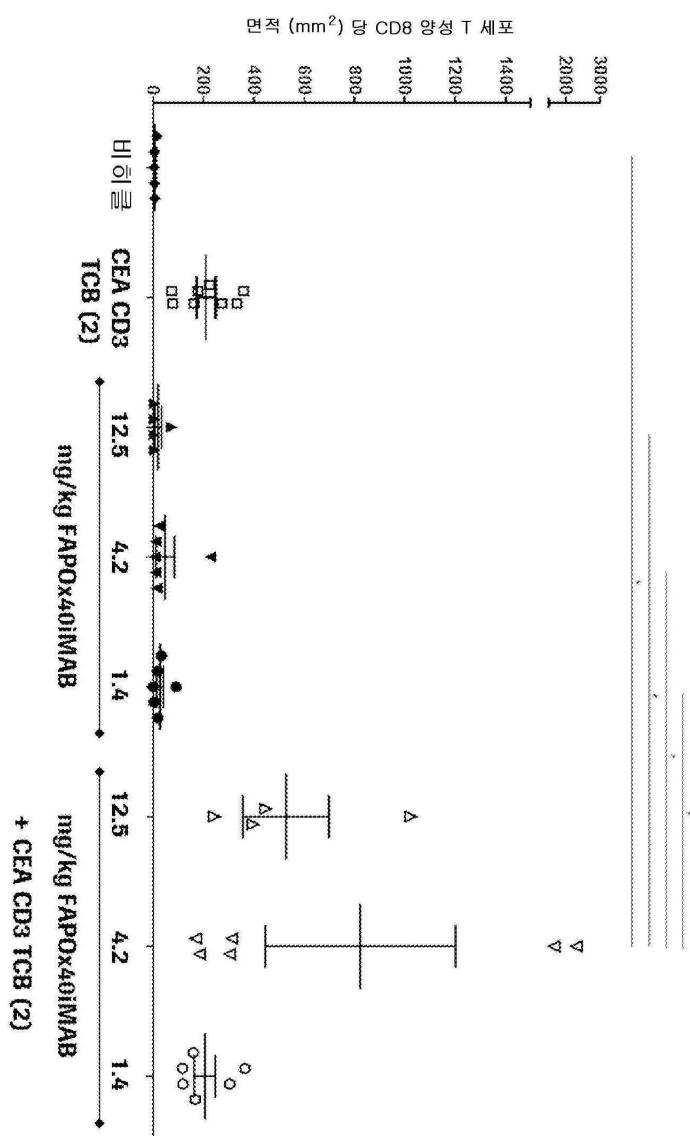
도면24



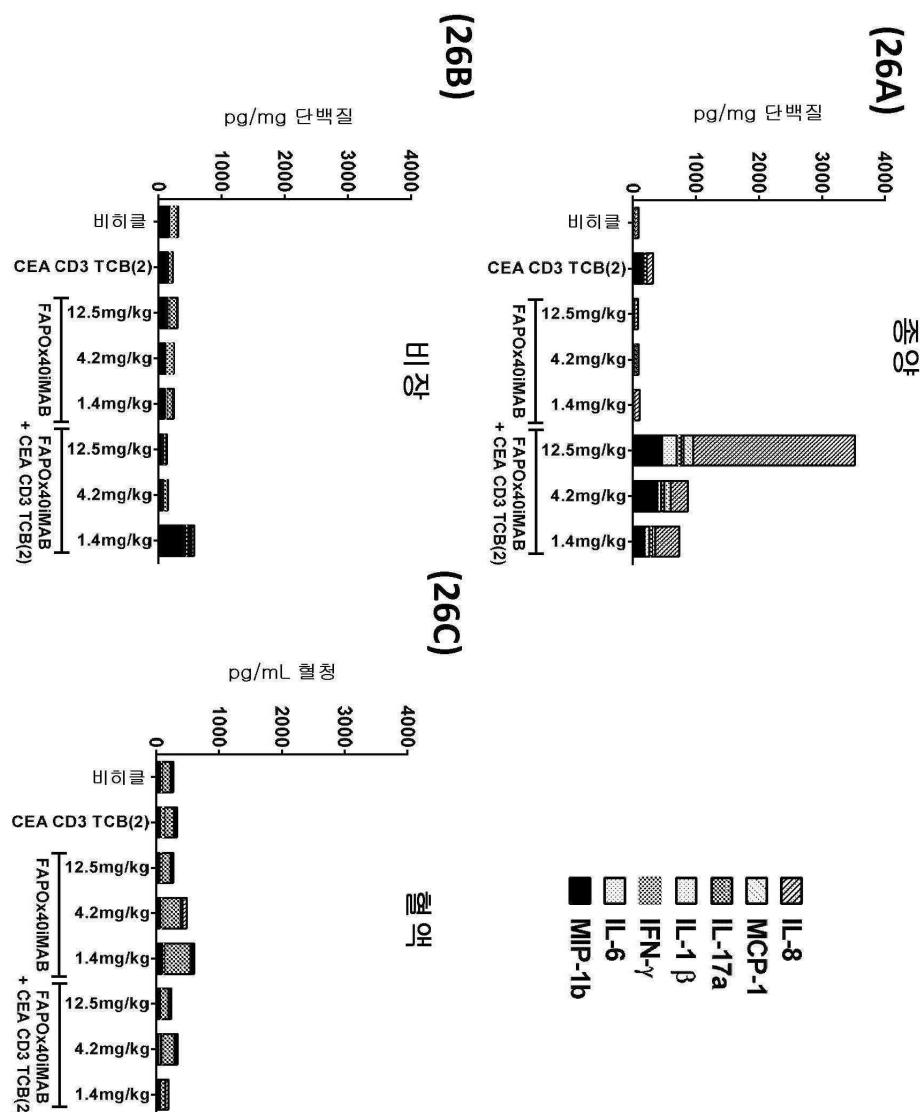
도면25a



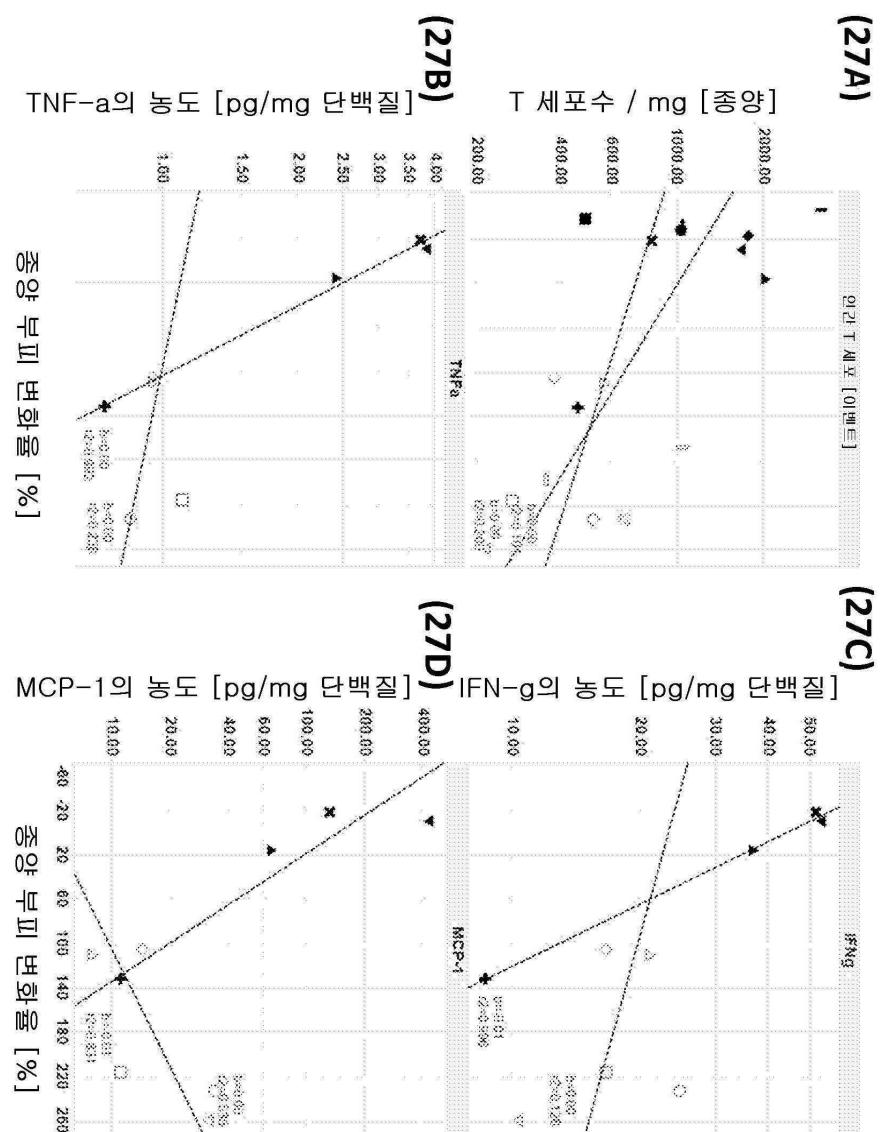
도면25b



도면26

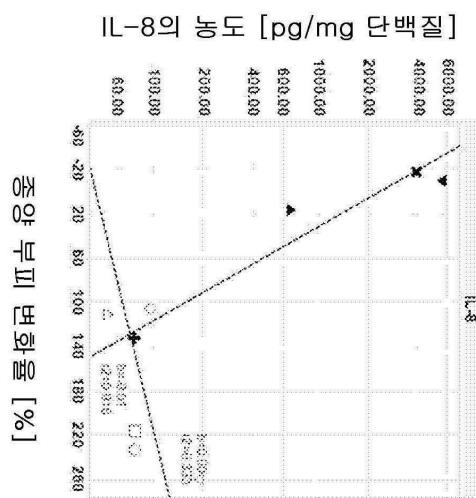


도면27a

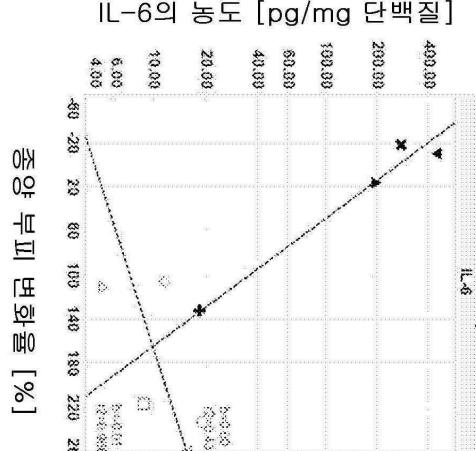


도면27b

(27E)

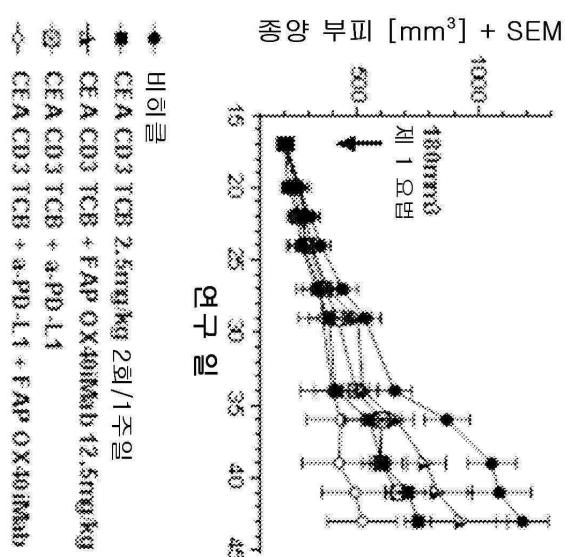


(27F)

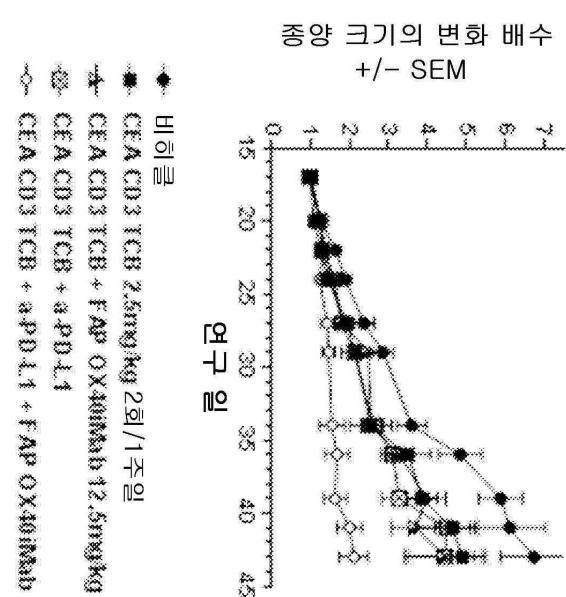


도면28

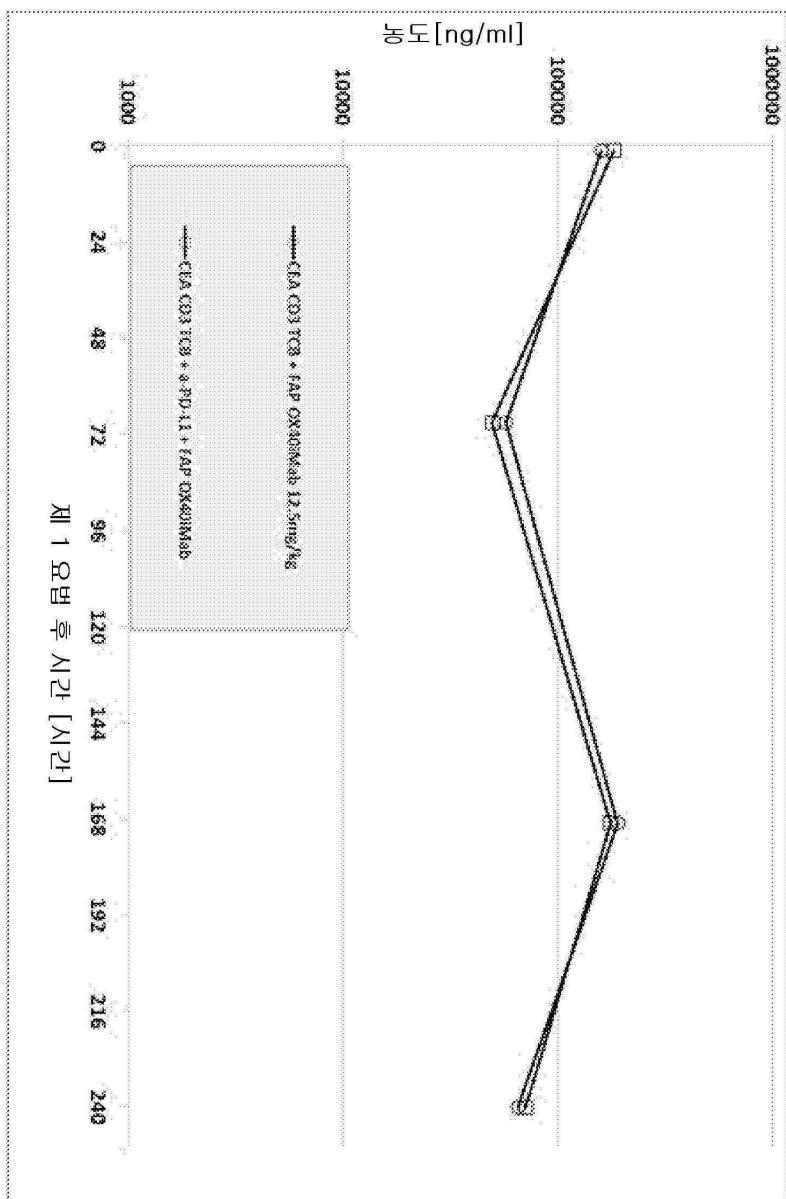
(28A)



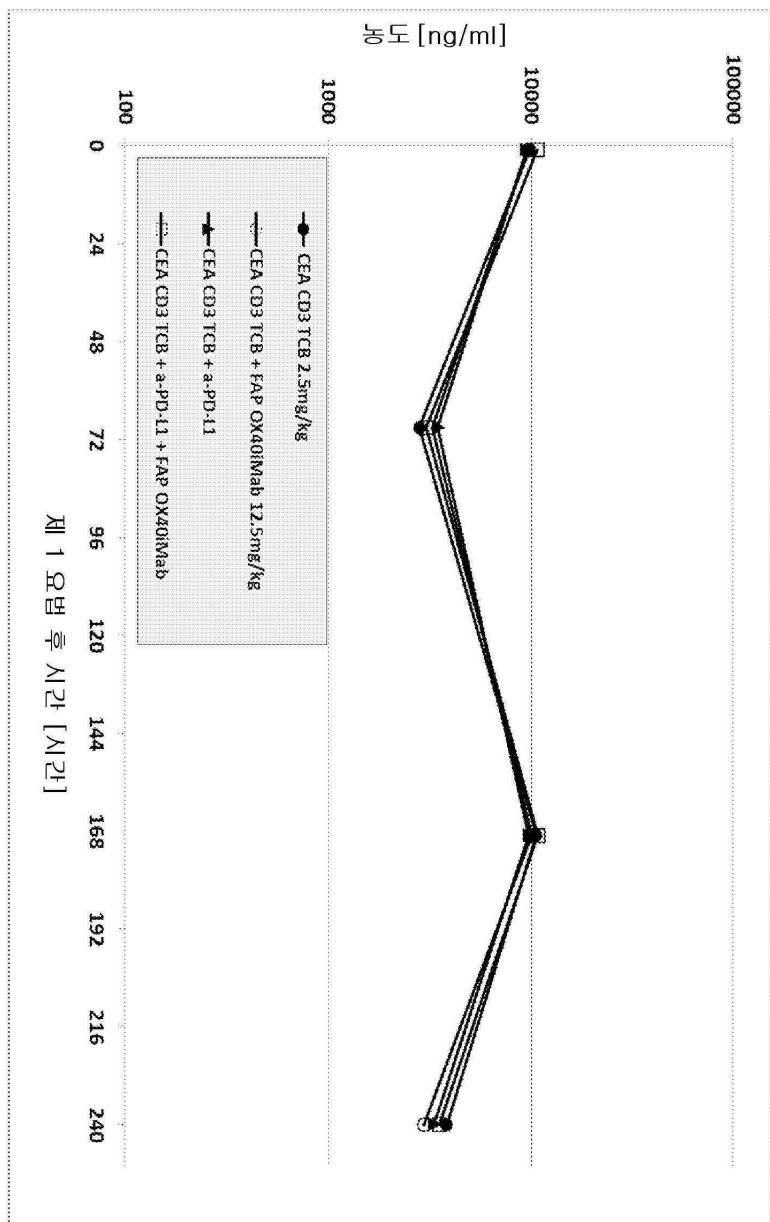
(28B)



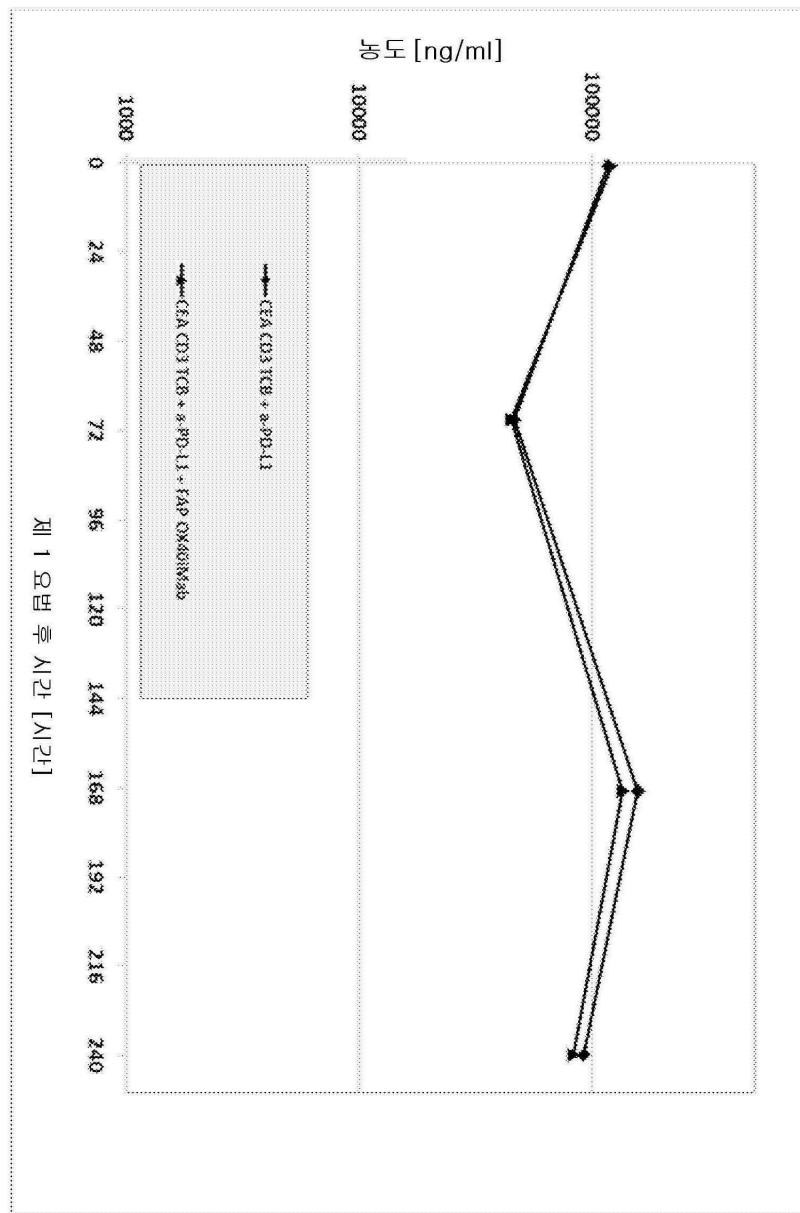
도면29a



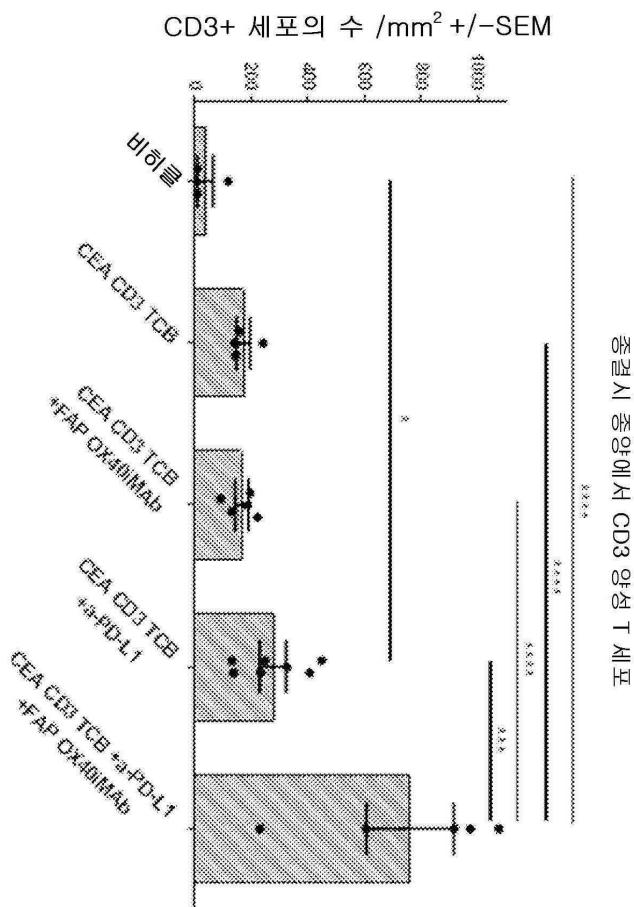
도면29b



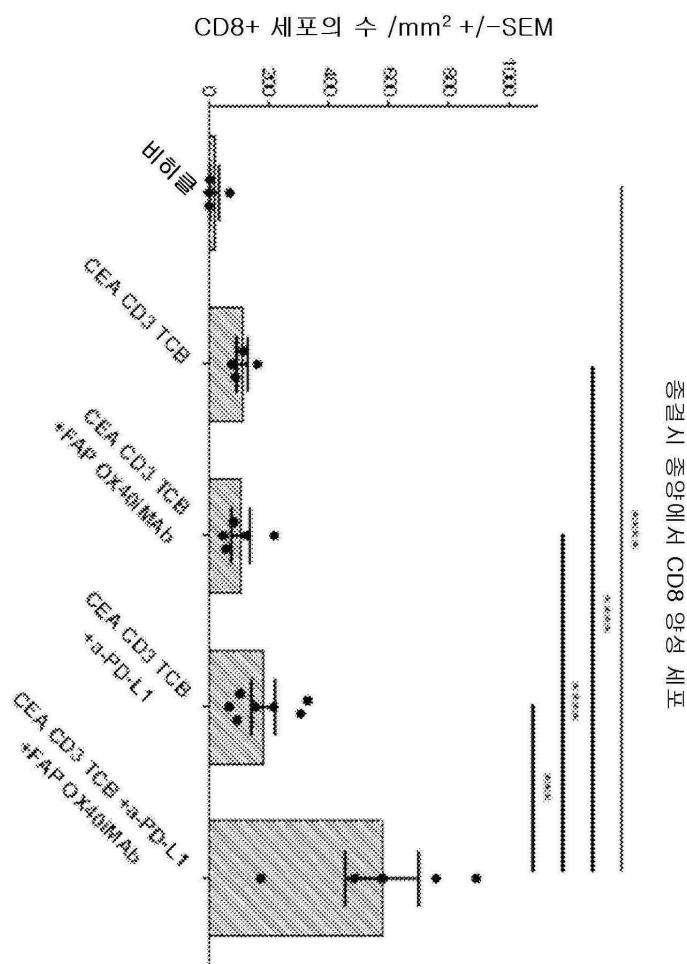
도면29c



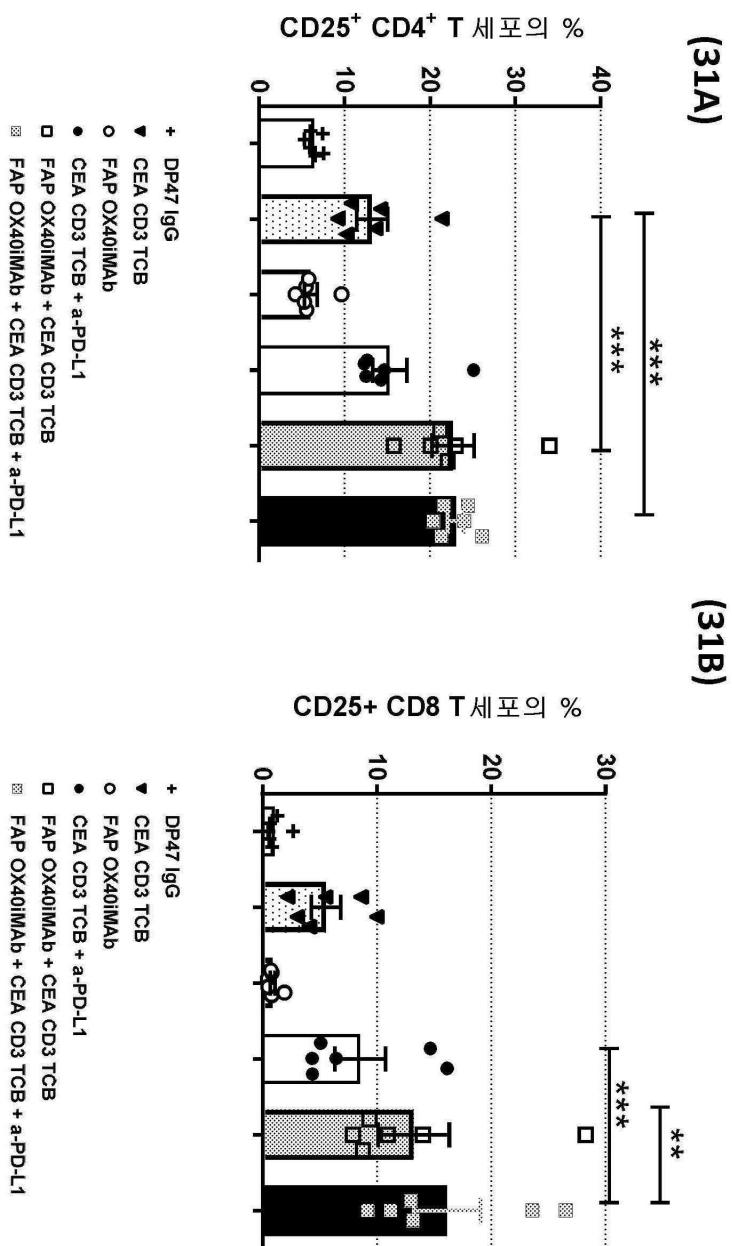
도면30a



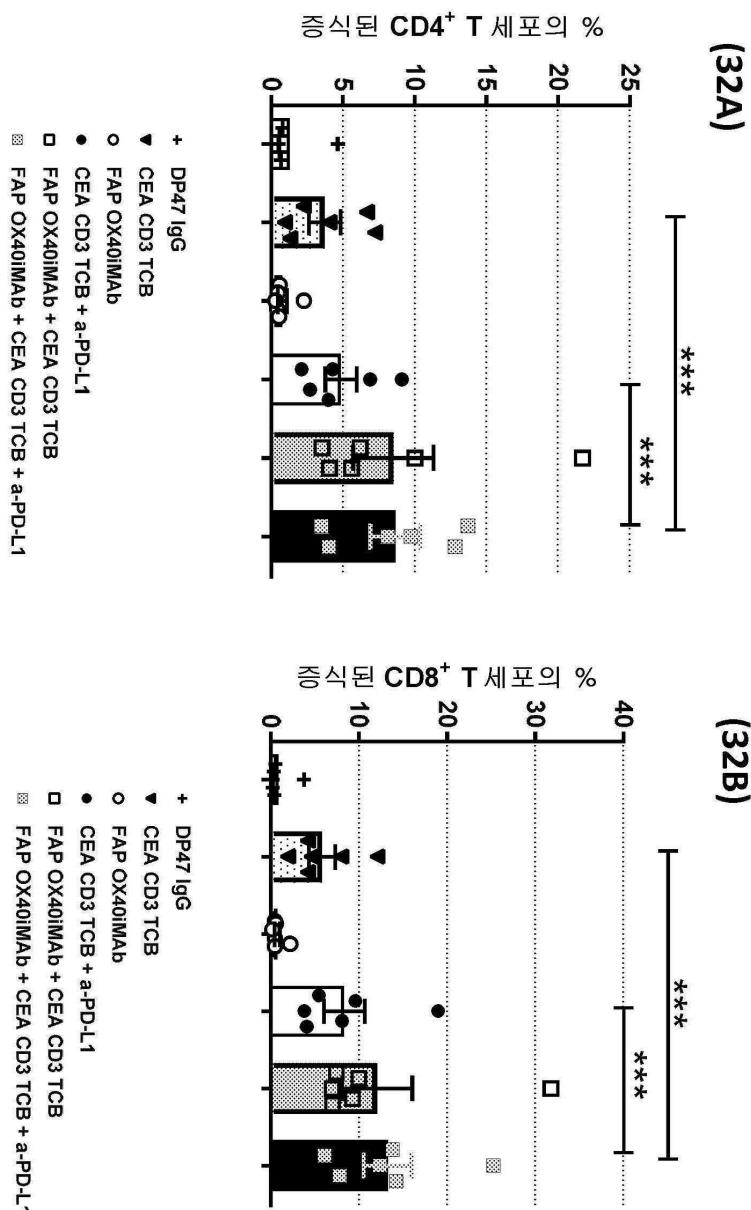
도면30b



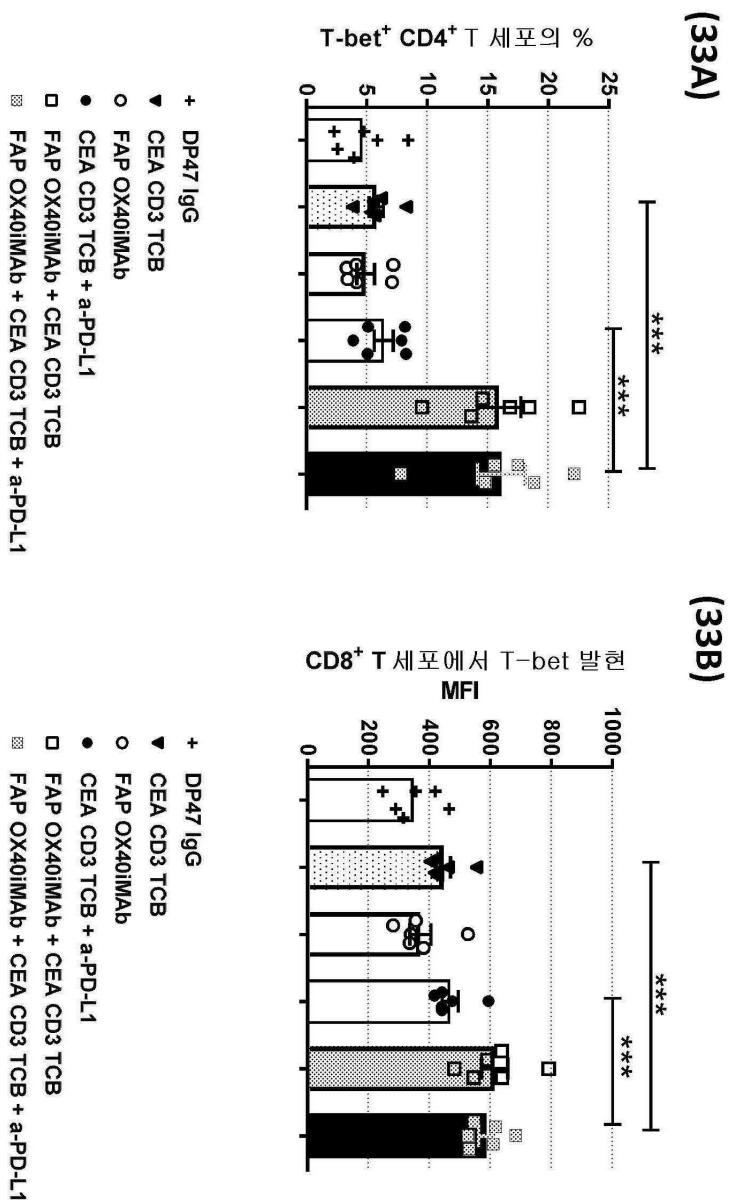
도면31



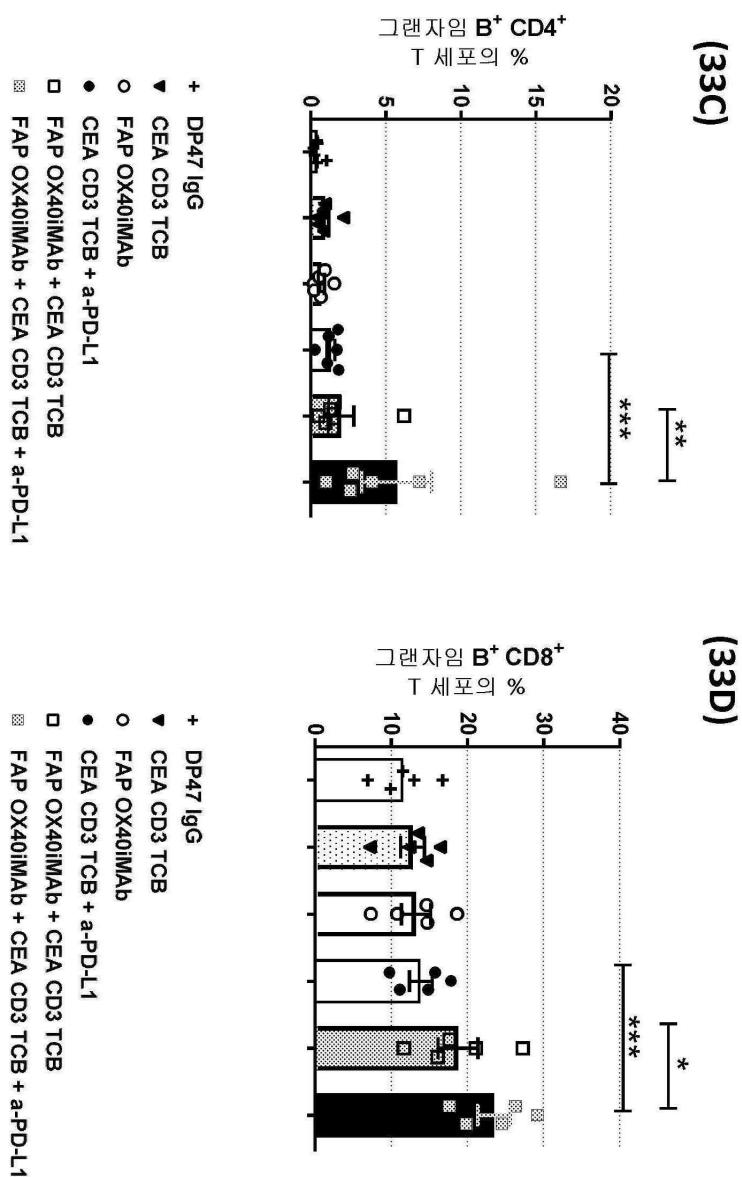
도면32



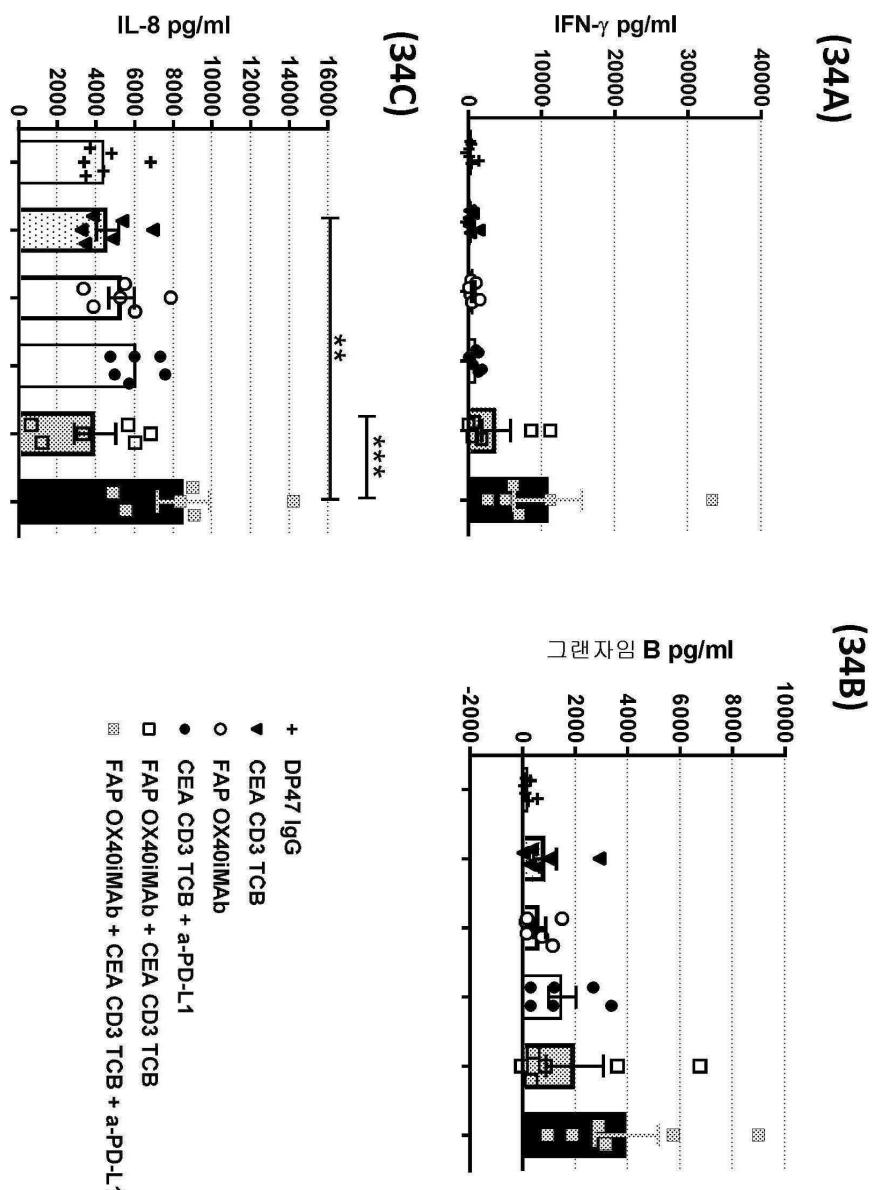
도면33a



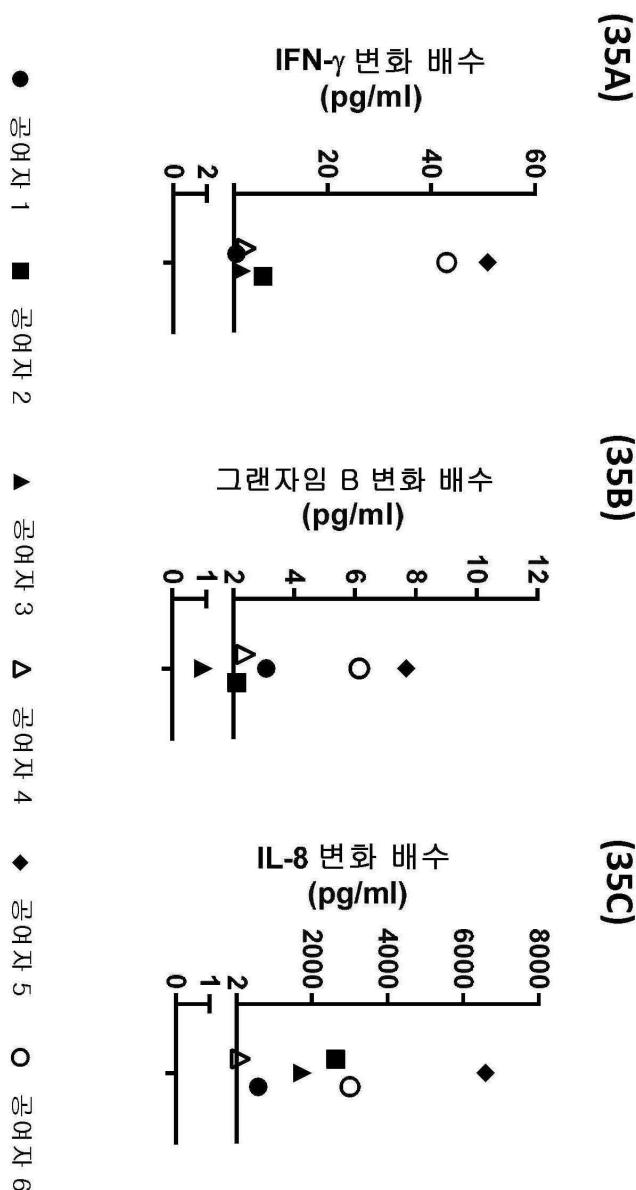
도면33b



도면34



도면35



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Combination therapy with targeted OX40 agonists

<130> P34512-W0

<140> PCT/EP2018/079781

<141> 2018-10-31

<150> EP17199542.6

<151> 2017-11-01

<160> 146

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAP(4B9) CDR-H1

<400> 1

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FAP(4B9) CDR-H2

<400> 2

Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAP(4B9) CDR-H3

<400> 3

Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr

1 5

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAP(4B9) CDR-L1

<400> 4

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

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAP(4B9) CDR-L2

<400> 5

Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAP(4B9) CDR-L3

<400> 6

Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro Pro Thr

1 5

<210> 7

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAP(4B9) VH

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 8

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAP(4B9) VL

<400> 8

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro

85 90 95

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

100 105

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAP(28H1) CDR-H1

<400> 9

Ser His Ala Met Ser

1 5

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAP(28H1) CDR-H2

<400> 10

Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAP(28H1) CDR-H3

<400> 11

Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr

1 5

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAP(28H1) CDR-L1

<400> 12

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

1 5 10

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAP(28H1) CDR-L2

<400> 13

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAP(28H1) CDR-L3

<400> 14

Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro Pro Thr

1 5

<210> 15

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAP(28H1) VH

<400> 15

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 16

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

FAP(28H1) VL

<400> 16

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly 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 Arg Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro

85 90 95

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

100 105

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> anti-OX40 CDR-H1

<400> 17

Ser Tyr Ala Ile Ser

1 5

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> ant i-OX40 CDR-H1

<400> 18

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> ant i-OX40 CDR-H2

<400> 19

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

1 5 10 15

Gly

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> ant i-OX40 CDR-H2

<400> 20

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> ant i-OX40 CDR-H3

<400> 21

Glu Tyr Gly Trp Met Asp Tyr

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> anti-OX40 CDR-H3

<400> 22

Glu Tyr Tyr Arg Gly Pro Tyr Asp Tyr

1 5

<210> 23

<

211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> anti-OX40 CDR-H3

<400> 23

Glu Tyr Gly Ser Met Asp Tyr

1 5

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> anti-OX40 CDR-H3

<400> 24

Val Asn Tyr Pro Tyr Ser Tyr Trp Gly Asp Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> anti-OX40 CDR-H3

<400> 25

Asp Val Gly Ala Phe Asp Tyr

1 5

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> anti-OX40 CDR-H3

<400> 26

Asp Val Gly Pro Phe Asp Tyr

1 5

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> anti-OX40 CDR-H3

<400> 27

Val Phe Tyr Arg Gly Gly Val Ser Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> anti-OX40 CDR-L1

<400> 28

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> anti-OX40 CDR-L1

<400> 29

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

1 5 10

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> anti-OX40 CDR-L1

<400> 30

Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser

1 5 10

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> anti-OX40 CDR-L2

<400> 31

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser

1 5

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> anti-OX40 CDR-L2

<400> 32

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> anti-OX40 CDR-L2

<400> 33

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> anti-OX40 CDR-L3

<400> 34

Gln Gln Tyr Leu Thr Tyr Ser Arg Phe Thr

1 5 10

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> anti-OX40 CDR-L3

<400> 35

Gln Gln Tyr Ser Ser Gln Pro Tyr Thr

1 5

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> anti-OX40 CDR-L3

<400> 36

Gln Gln Tyr Ile Ser Tyr Ser Met Leu Thr

1 5 10

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> anti-OX40 CDR-L3

<400> 37

Gln Gln Tyr Gln Ala Phe Ser Leu Thr

1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> anti-OX40 CDR-L3

<400> 38

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Thr

1 5

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> anti-OX40 CDR-L3
<400> 39

Asn Ser Arg Val Met Pro His Asn Arg Val

1	5	10
---	---	----

<210> 40
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> 49B4 VH
<400> 40

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

Gly 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 Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

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

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

85	90	95
----	----	----

Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Gly Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

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

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 41
<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 49B4 VL

<400> 41

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 42

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 8H9 VH

<400> 42

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

<210> 43

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223>

8H9 VL

<400> 43

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

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

<210> 44

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1G4 VH

<400> 44

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

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

<210> 45

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 1G4 VL

<400> 45

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

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

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105

<210> 46

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 20B7 VH

<400> 46

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly 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 Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Val Asn Tyr Pro Tyr Ser Tyr Trp Gly Asp Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 47

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 20B7 VL

<400> 47

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

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

<210> 48

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CLC-563 VH

<400> 48

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

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50	55	60
----	----	----

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

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

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

85	90	95	
----	----	----	--

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

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

Thr Val Ser Ser

115			
-----	--	--	--

<210> 49

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CLC-563 VL

<400> 49

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20	25	30	
----	----	----	--

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

35	40	45	
----	----	----	--

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

50	55	60	
----	----	----	--

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

85	90	95	
----	----	----	--

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

100	105		
-----	-----	--	--

<210> 50

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CLC-564 VH

<400> 50

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Phe Asp Val Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 51

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CLC-564 VL

<400> 51

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

85 90 95

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

100 105

<210> 52

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 17A9 VH

<400> 52

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Val Phe Tyr Arg Gly Gly Val Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 53

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 17A9 VL

<400> 53

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

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

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val
 100 105

<210> 54

<211> 816

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HC 1 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc knob VH (4B9)

<400> 54

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

35 40 45
 Gly 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 Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85	90	95
Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Gly Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
100	105	110
Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro		
115	120	125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly		
130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
145	150	155
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
180	185	190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly		
210	215	220
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly		
225	230	235
Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala		
245	250	255
Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala		
260	265	270
Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly		
275	280	285
Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala		
290	295	300
Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser		
305	310	315
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Gly Pro		
325	330	335

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 340 345 350
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 355 360 365
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 370 375 380
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 385 390 395 400
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 405 410 415
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 420 425 430
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 435 440 445
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 450 455 460
 Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 465 470 475 480
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 485 490 495
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 500 505 510
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 515 520 525
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 530 535 540
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 545 550 555 560
 Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 565 570 575
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr

580	585	590
Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
595	600	605
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
610	615	620
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
625	630	635
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe		
645	650	655
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
660	665	670
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
675	680	685
Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu		
690	695	700
Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser		
705	710	715
Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val		
725	730	735
Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ile Gly		
740	745	750
Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr		
755	760	765
Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser		
770	775	780
Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Phe		
785	790	795
Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
805	810	815
<210> 55		
<211> 807		

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HC 2 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc hole VL (4B9)

<400> 55

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly 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 Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Gly Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly

210 215 220

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly

225 230 235 240

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

245 250 255

Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala

260 265 270

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly

275 280 285

Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala

290 295 300

Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser

305 310 315 320

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Gly Pro

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465	470	475	480
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val			
485	490	495	
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val			
500	505	510	
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln			
515	520	525	
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln			
530	535	540	
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala			
545	550	555	560
Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro			
565	570	575	
Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr			
580	585	590	
Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser			
595	600	605	
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr			
610	615	620	
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val			
625	630	635	640
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe			
645	650	655	
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys			
660	665	670	
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly			
675	680	685	
Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr			
690	695	700	
Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu			
705	710	715	720

Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr
 725 730 735
 Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Asn Val Gly Ser
 740 745 750
 Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 755 760 765
 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
 770 775 780
 Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gln
 785 790 795 800
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 805

<210> 56
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> LC (49B4)

<400> 56

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

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

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

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 57

<211> 815

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HC 1 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc knob VH (28H1)

<400> 57

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly 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 Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85	90	95
Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Gly Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
100	105	110
Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro		
115	120	125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly		
130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
145	150	155
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
180	185	190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly		
210	215	220
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly		
225	230	235
240		
Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala		
245	250	255
Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala		
260	265	270
Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly		
275	280	285
Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala		
290	295	300
Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser		
305	310	315
320		
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Gly Pro		
325	330	335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr

580	585	590
-----	-----	-----

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

595	600	605
-----	-----	-----

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

610	615	620
-----	-----	-----

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

625	630	635
-----	-----	-----

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

645	650	655
-----	-----	-----

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

660	665	670
-----	-----	-----

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

675	680	685
-----	-----	-----

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Val Gln Leu Leu

690	695	700
-----	-----	-----

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

705	710	715
-----	-----	-----

720

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His Ala Met Ser Trp Val

725	730	735
-----	-----	-----

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

740	745	750
-----	-----	-----

Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile

755	760	765
-----	-----	-----

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu

770	775	780
-----	-----	-----

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Leu Gly

785	790	795
-----	-----	-----

800

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

805	810	815
-----	-----	-----

<210> 58

<211> 807

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HC 2 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc hole VL (28H1)

<400> 58

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly 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 Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Gly Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly

210	215	220
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly		
225	230	235
Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala		
245	250	255
Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala		
260	265	270
Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly		
275	280	285
Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala		
290	295	300
Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser		
305	310	315
320		
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Gly Pro		
325	330	335
Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser		
340	345	350
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr		
355	360	365
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro		
370	375	380
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val		
385	390	395
400		
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser		
405	410	415
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile		
420	425	430
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val		
435	440	445
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
450	455	460

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 465 470 475 480
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 485 490 495

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 500 505 510
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 515 520 525

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 530 535 540
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 545 550 555 560
 Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 565 570 575
 Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 580 585 590

Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 595 600 605
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 610 615 620
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
 625 630 635 640
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 645 650 655

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 660 665 670
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 675 680 685
 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr
 690 695 700
 Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu

705 710 715 720

Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr

725 730 735

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Ile Gly Ala Ser

740 745 750

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

755 760 765

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala

770 775 780

Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln

785 790 795 800

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

805

<210> 59

<211> 807

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HC 1 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc knob VL (4B9)

<400> 59

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly 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 Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

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

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

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

340	345	350
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr		
355	360	365
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro		
370	375	380
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val		
385	390	395
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser		
405	410	415
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile		
420	425	430
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val		
435	440	445
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
450	455	460
Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		
465	470	475
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
485	490	495
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val		
500	505	510
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
515	520	525
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln		
530	535	540
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala		
545	550	555
Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
565	570	575
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr		
580	585	590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

675 680 685

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr

690 695 700

Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu

705 710 715 720

Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr

725 730 735

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Asn Val Gly Ser

740 745 750

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

755 760 765

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala

770 775 780

Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gln

785 790 795 800

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

805

<210> 60

<211> 816

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HC 2 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc hole VH (4B9)

<400> 60

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly 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 Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Gly Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly

210 215 220

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

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

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

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 420 425 430
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 435 440 445
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 450 455 460
 Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

465	470	475	480
-----	-----	-----	-----

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

485	490	495	
-----	-----	-----	--

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

500	505	510	
-----	-----	-----	--

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

515	520	525	
-----	-----	-----	--

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

530	535	540	
-----	-----	-----	--

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

545	550	555	560
-----	-----	-----	-----

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

565	570	575	
-----	-----	-----	--

Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr

580	585	590	
-----	-----	-----	--

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

595	600	605	
-----	-----	-----	--

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

610	615	620	
-----	-----	-----	--

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

625	630	635	640
-----	-----	-----	-----

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

645	650	655	
-----	-----	-----	--

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

660	665	670	
-----	-----	-----	--

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

675	680	685	
-----	-----	-----	--

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

690	695	700	
-----	-----	-----	--

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

705	710	715	720
-----	-----	-----	-----

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val

725 730 735

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

740 745 750

Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr

755 760 765

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser

770 775 780

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Phe

785 790 795 800

Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

805 810 815

<210> 61

<211> 816

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HC 1 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc wt knob VH (4B9)

<400> 61

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly 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 Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Gly Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100	105	110
Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro		
115	120	125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly		
130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
145	150	155
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
180	185	190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly		
210	215	220
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly		
225	230	235
Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala		
245	250	255
Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala		
260	265	270
Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly		
275	280	285
Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala		
290	295	300
Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser		
305	310	315
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Gly Pro		
325	330	335
Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser		
340	345	350

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

 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 420 425 430
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 435 440 445
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 450 455 460
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 465 470 475 480

 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 485 490 495
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 500 505 510
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 515 520 525
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 530 535 540

 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 545 550 555 560
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 565 570 575
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr
 580 585 590
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

595	600	605
-----	-----	-----

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

610	615	620
-----	-----	-----

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

625	630	635	640
-----	-----	-----	-----

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

645	650	655
-----	-----	-----

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

660	665	670
-----	-----	-----

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

675	680	685
-----	-----	-----

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

690	695	700
-----	-----	-----

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

705	710	715	720
-----	-----	-----	-----

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val

725	730	735
-----	-----	-----

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

740	745	750
-----	-----	-----

Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr

755	760	765
-----	-----	-----

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser

770	775	780
-----	-----	-----

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Phe

785	790	795	800
-----	-----	-----	-----

Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

805	810	815
-----	-----	-----

<210> 62

<211> 807

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HC 2 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc wt hole VL (4B9)

<400> 62

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly 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 Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

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

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly

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

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

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

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile			
420	425	430	
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val			
435	440	445	
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala			
450	455	460	
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro			
465	470	475	480

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 485 490 495
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 500 505 510
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 515 520 525
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 530 535 540

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 545 550 555 560
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 565 570 575
 Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 580 585 590
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 595 600 605

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 610 615 620
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
 625 630 635 640
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 645 650 655
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 660 665 670

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 675 680 685
 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr
 690 695 700
 Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu
 705 710 715 720
 Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr

725	730	735
-----	-----	-----

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Asn Val Gly Ser

740	745	750
-----	-----	-----

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

755	760	765
-----	-----	-----

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala

770	775	780
-----	-----	-----

Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gln

785	790	795	800
-----	-----	-----	-----

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

805		
-----	--	--

<210> 63

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3-HCDR1

<400> 63

Thr Tyr Ala Met Asn

1	5	
---	---	--

<210> 64

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3-HCDR2

<400> 64

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser

1	5	10	15
---	---	----	----

Val Lys Gly

<210> 65

<211> 14

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> CD3-HCDR3

<400> 65

Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 66

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3-LCDR1

<400> 66

Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn

1 5 10

<210> 67

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3-LCDR2

<400> 67

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro

1 5

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3-LCDR3

<400> 68

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val

1 5

<210> 69

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3 VH

<400> 69

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 70

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3 VL

<400> 70

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

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

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 71

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-HCDR1

<400> 71

Glu Phe Gly Met Asn

1 5

<210> 72

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-HCDR2

<400> 72

Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 73

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-HCDR3

<400> 73

Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 74

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-LCDR1

<400> 74

Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr Val Ala

1 5 10

<210> 75

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-LCDR2

<400> 75

Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg

1 5

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-LCDR3

<400> 76

His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu Phe Thr

1 5 10

<210> 77

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA VH

<400> 77

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 78

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA VL

<400> 78

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 Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu

85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 79

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-HCDR1 (CEACAM5)

<400> 79

Asp Thr Tyr Met His

1 5

<210> 80

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-HCDR2 (CEACAM5)

<400> 80

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 81

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-HCDR3 (CEACAM5)

<400> 81

Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr

1 5 10

<210> 82

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-LCDR1 (CEACAM5)

<400> 82

Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe Gly Val Gly Phe Leu His

1 5 10 15

<210> 83

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-LCDR2 (CEACAM5)

<400> 83

Arg Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-LCDR3 (CEACAM5)

<400> 84

Gln Gln Thr Asn Glu Asp Pro Tyr Thr

1 5

<210> 85

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA VH (CEACAM5)

<400> 85

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys 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 Ser Lys Tyr Val 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 Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 86

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA VL (CEACAM5)

<400> 86

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 Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe

20 25 30

Gly Val Gly Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn

85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 87

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CEA (CEA TCB)

<400> 87

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 Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu

85	90	95
----	----	----

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala

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

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser

115	120	125
-----	-----	-----

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu

130	135	140
-----	-----	-----

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu

165	170	175
-----	-----	-----

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val

180	185	190
-----	-----	-----

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys

195	200	205
-----	-----	-----

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210	215
-----	-----

<210> 88

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CD3 (CEA TCB)

<400> 88

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

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Val Glu Pro Lys Ser Cys

210

<210> 89

<211> 694

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA CD3 crossfab VHck fc knob P329GLALA (CEA TCB)

<400> 89

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

1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe			
20	25	30	
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
35	40	45	
Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe			
50	55	60	
Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly			
100	105	110	
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser			
115	120	125	
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala			
130	135	140	
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val			
145	150	155	160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala			
165	170	175	
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val			
180	185	190	
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His			
195	200	205	
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys			

210	215	220
Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu		
225	230	235
Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser		
245	250	255
Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val		
260	265	270
Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Arg Ser		
275	280	285
Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg		
290	295	300
Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met		
305	310	315
Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His		
325	330	335
Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln		
340	345	350
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val		
355	360	365
Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser		
370	375	380
Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln		
385	390	395
400		
Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val		
405	410	415
Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu		
420	425	430
Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu		
435	440	445
Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg		
450	455	460

Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 465 470 475 480
 Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 485 490 495
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 500 505 510
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 515 520 525
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 530 535 540
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 545 550 555 560
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly
 565 570 575
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 580 585 590
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 595 600 605
 Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 610 615 620
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 625 630 635 640
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 645 650 655
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 660 665 670
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 675 680 685
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 690
 <210> 90
 <211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA VHCH1 Fc hole P329GLALA (CEA TCB)

<400> 90

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115 120 125

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

130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

210	215	220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly		
225	230	235
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
245	250	255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
260	265	270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
275	280	285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
290	295	300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
305	310	315
320		
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile		
325	330	335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
340	345	350
Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		
355	360	365
Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
370	375	380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
385	390	395
400		
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val		
405	410	415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
420	425	430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
435	440	445
Pro Gly Lys		
450		

<210> 91

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3 VH-CL (CEACAM5 TCB)

<400> 91

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110

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

115 120 125

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys

130 135 140

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg

145 150 155 160

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn

165 170 175

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser

180 185 190

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

195 200 205

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 210 215 220
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230
 <210> 92
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> CEACAM5 VH-CH1(EE)-Fc (hole, P329G LALA)
 <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 Phe Asn Ile Lys 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 Ser Lys Tyr Val 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 Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

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

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Pro

<210> 93

<211> 674

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEACAM5 VH-CH1(EE)-CD3 VL-CH1-Fc (knob, P329G LALA)

<400> 93

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys 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 Ser Lys Tyr Val 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 Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

210 215 220

Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr

275 280 285

Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu

290 295 300

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

305 310 315 320

Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

370 375 380

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro

385 390 395 400

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

405 410 415

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn

420 425 430

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 660 665 670
 Ser Pro

<210> 94

<211> 218

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEACAM5 VL-CL(RK)

<400> 94

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 Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe

20 25 30

Gly Val Gly Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn

85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys

115 120 125

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

130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 95

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> (CH2527) CD3-HCDR1

<400> 95

Thr Tyr Ala Met Asn

1 5

<210> 96

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> (CH2527) CD3-HCDR2

<400> 96

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 97

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> (CH2527) CD3-HCDR3

<400> 97

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 98

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> (16D5) Fo1R1-HCDR1

<400> 98

Asn Ala Trp Met Ser

1 5

<210> 99

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> (16D5) Fo1R1-HCDR2

<400> 99

Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 100

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> (16D5) Fo1R1-HCDR3

<400> 100

Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr

1 5

<210> 101

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> (CH2527-VL7-46-13)-LCDR1

<400> 101

Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn

1 5 10

<210> 102

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> (CH2527-VL7-46-13)-LCDR2

<400> 102

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro

1 5

<210> 103

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> (CH2527-VL7-46-13)-LCDR3

<400> 103

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val

1 5

<210> 104

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> (CH2527) CD3 VH

<400> 104

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
<210> 105
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> (16D5) Fc1R1 VH
<400> 105

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
<210> 106
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> (CH2527-VL7-46-13)VL

<400> 106

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

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 107

<211> 689

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> (16D5)VH-CH1-(CH2527)VH-CH1 Fc knob PGLALA

<400> 107

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala

50 55 60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210 215 220

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

225 230 235 240

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys

245 250 255

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg

260 265 270

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

275 280 285

Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe

290 295 300

Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn

305 310 315 320

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

325	330	335
Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly		
340	345	350
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe		
355	360	365
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		
370	375	380
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
385	390	395
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
405	410	415
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
420	425	430
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
435	440	445
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		
450	455	460
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro		
465	470	475
480		
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
485	490	495
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
500	505	510
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
515	520	525
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
530	535	540
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
545	550	555
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys		
565	570	575

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

580 585 590

Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp

595 600 605

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

610 615 620

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

625 630 635 640

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

645 650 655

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

660 665 670

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

675 680 685

Lys

<210> 108

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> (16D5)VH-CH1-Fc hole PGLALA H435R-Y436F

<400> 108

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala

50 55 60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210 215 220

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

225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

260 265 270

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

275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly Lys

450

<210> 109

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> (CH2527-VL7-46-13)VL-CL

<400> 109

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

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro

100 105 110

Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu

115 120 125

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

130 135 140

Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala

145 150 155 160

Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala

165 170 175

Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg

180 185 190

Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr

195 200 205

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210 215

<210> 110

<211> 290

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 110

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu

35 40 45

Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
 50 55 60
 Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
 65 70 75 80
 Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
 85 90 95
 Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
 100 105 110
 Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
 115 120 125
 Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
 130 135 140
 Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
 145 150 155 160
 Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
 165 170 175
 Gly Lys Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
 180 185 190
 Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
 195 200 205
 Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
 210 215 220
 Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
 225 230 235 240
 Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
 245 250 255
 Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
 260 265 270
 Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
 275 280 285
 Glu Thr
 290

<210> 111

<211> 288

<212

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln

1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp

20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp

35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val

50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala

65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg

85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg

100 105 110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu

115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val

130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro

145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly

165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys

180 185 190

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

195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly

210 215 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro

225 230 235 240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly

245 250 255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg

260 265 270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu

275 280 285

<210> 112

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH (PD-L1)

<400> 112

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser

20 25 30

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

35 40 45

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 113

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL (PD-L1)

<400> 113

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 114

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH (PD-L1) 2

<400> 114

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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 Arg Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Asn Ile Lys 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 Tyr Cys
 85 90 95

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 115

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL (PD-L1) 2

<400> 115

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser

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 Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro

85 90 95

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

100 105

<210> 116

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH (PD-1)

<400> 116

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 117

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL (PD-1)

<400> 117

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95

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

<210> 118

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH (PD-1) 2

<400> 118

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

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

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

35 40 45

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

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

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

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

100 105 110

Ser

<210> 119

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL (PD-1) 2

<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 Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 120

<211> 760

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 120

Met Lys Thr Trp Val Lys Ile Val Phe Gly Val Ala Thr Ser Ala Val

1 5 10 15

Leu Ala Leu Leu Val Met Cys Ile Val Leu Arg Pro Ser Arg Val His

20 25 30

Asn Ser Glu Glu Asn Thr Met Arg Ala Leu Thr Leu Lys Asp Ile Leu

35 40 45

Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Phe Pro Asn Trp Ile Ser Gly

50 55 60

Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Ala Asp Asn Asn Ile Val Leu Tyr Asn

65	70	75	80
Ile Glu Thr Gly Gln Ser Tyr Thr Ile Leu Ser Asn Arg Thr Met Lys			
85	90	95	
Ser Val Asn Ala Ser Asn Tyr Gly Leu Ser Pro Asp Arg Gln Phe Val			
100	105	110	
Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala			
115	120	125	
Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Ser Asn Gly Glu Phe Val Arg Gly Asn			
130	135	140	
Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys Trp Ser Pro Val Gly Ser			
145	150	155	160
Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu Lys Gln Arg Pro			
165	170	175	
Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Phe Asn Gly Arg Glu Asn Lys Ile			
180	185	190	
Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu Glu Glu Met Leu Ala Thr			
195	200	205	
Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly Lys Phe Leu Ala Tyr Ala			
210	215	220	
Glu Phe Asn Asp Thr Asp Ile Pro Val Ile Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly			
225	230	235	240
Asp Glu Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile Pro Tyr Pro Lys Ala Gly			
245	250	255	
Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Ile Phe Ile Ile Asp Thr Thr Tyr Pro			
260	265	270	
Ala Tyr Val Gly Pro Gln Glu Val Pro Val Pro Ala Met Ile Ala Ser			
275	280	285	
Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp Val Thr Asp Glu Arg Val			
290	295	300	
Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn Val Ser Val Leu Ser Ile			
305	310	315	320

Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp Gln Thr Trp Asp Cys Pro Lys Thr Gln
 325 330 335
 Glu His Ile Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp Ala Gly Gly Phe Phe Val
 340 345 350
 Ser Thr Pro Val Phe Ser Tyr Asp Ala Ile Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe
 355 360 365
 Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His Tyr Ile Lys Asp Thr Val
 370 375 380
 Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys Trp Glu Ala Ile Asn Ile
 385 390 395 400
 Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr Ser Ser Asn Glu Phe Glu
 405 410 415
 Glu Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg Ile Ser Ile Gly Ser Tyr
 420 425 430
 Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His Leu Arg Lys Glu Arg Cys
 435 440 445
 Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu
 450 455 460
 Val Cys Tyr Gly Pro Gly Ile Pro Ile Ser Thr Leu His Asp Gly Arg
 465 470 475 480
 Thr Asp Gln Glu Ile Lys Ile Leu Glu Glu Asn Lys Glu Leu Glu Asn
 485 490 495
 Ala Leu Lys Asn Ile Gln Leu Pro Lys Glu Glu Ile Lys Leu Glu
 500 505 510
 Val Asp Glu Ile Thr Leu Trp Tyr Lys Met Ile Leu Pro Pro Gln Phe
 515 520 525
 Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gln Val Tyr Gly Pro
 530 535 540
 Cys Ser Gln Ser Val Arg Ser Val Phe Ala Val Asn Trp Ile Ser Tyr
 545 550 555 560
 Leu Ala Ser Lys Glu Gly Met Val Ile Ala Leu Val Asp Gly Arg Gly

565	570	575	
Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Leu Leu Tyr Ala Val Tyr Arg Lys Leu			
580	585	590	
Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Ile Thr Ala Val Arg Lys Phe Ile			
595	600	605	
Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Lys Arg Ile Ala Ile Trp Gly Trp Ser			
610	615	620	
Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ser Gly Thr Gly Leu			
625	630	635	640
Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr			
645	650	655	
Ala Ser Val Tyr Thr Glu Arg Phe Met Gly Leu Pro Thr Lys Asp Asp			
660	665	670	
Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val Met Ala Arg Ala Glu Tyr			
675	680	685	
Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His Gly Thr Ala Asp Asp Asn			
690	695	700	
Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala Lys Ala Leu Val Asn Ala			
705	710	715	720
Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser Asp Gln Asn His Gly Leu			
725	730	735	
Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr His Met Thr His Phe Leu			
740	745	750	
Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp			
755	760		

<210> 121

<211> 748

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> hu FAP ectodomain+poly-lys-tag+his6-tag

<400> 121

Arg Pro Ser Arg Val His Asn Ser Glu Glu Asn Thr Met Arg Ala Leu

1	5	10	15
Thr Leu Lys Asp Ile Leu Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Phe Phe			
20	25	30	
Pro Asn Trp Ile Ser Gly Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Ala Asp Asn			
35	40	45	
Asn Ile Val Leu Tyr Asn Ile Glu Thr Gly Gln Ser Tyr Thr Ile Leu			
50	55	60	
Ser Asn Arg Thr Met Lys Ser Val Asn Ala Ser Asn Tyr Gly Leu Ser			
65	70	75	80
Pro Asp Arg Gln Phe Val Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp			
85	90	95	
Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Ser Asn Gly			
100	105	110	
Glu Phe Val Arg Gly Asn Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys			
115	120	125	
Trp Ser Pro Val Gly Ser Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile			
130	135	140	
Tyr Leu Lys Gln Arg Pro Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Phe Asn			
145	150	155	160
Gly Arg Glu Asn Lys Ile Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu			
165	170	175	
Glu Glu Met Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly			
180	185	190	
Lys Phe Leu Ala Tyr Ala Glu Phe Asn Asp Thr Asp Ile Pro Val Ile			
195	200	205	
Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly Asp Glu Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile			
210	215	220	
Pro Tyr Pro Lys Ala Gly Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Ile Phe Ile			
225	230	235	240
Ile Asp Thr Thr Tyr Pro Ala Tyr Val Gly Pro Gln Glu Val Pro Val			
245	250	255	

Pro Ala Met Ile Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp

260 265 270

Val Thr Asp Glu Arg Val Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn

275 280 285

Val Ser Val Leu Ser Ile Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp Gln Thr Trp

290 295 300

Asp Cys Pro Lys Thr Gln Glu His Ile Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp

305 310 315 320

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

325 330 335

Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His

340 345 350

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

355 360 365

Trp Glu Ala Ile Asn Ile Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr

370 375 380

Ser Ser Asn Glu Phe Glu Glu Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg

385 390 395 400

Ile Ser Ile Gly Ser Tyr Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His

405 410 415

Leu Arg Lys Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Ala Ser Phe Ser Asp Tyr

420 425 430

Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu Val Cys Tyr Gly Pro Gly Ile Pro Ile Ser

435 440 445

Thr Leu His Asp Gly Arg Thr Asp Gln Glu Ile Lys Ile Leu Glu Glu

450 455 460

Asn Lys Glu Leu Glu Asn Ala Leu Lys Asn Ile Gln Leu Pro Lys Glu

465 470 475 480

Glu Ile Lys Lys Leu Glu Val Asp Glu Ile Thr Leu Trp Tyr Lys Met

485 490 495

Ile Leu Pro Pro Gln Phe Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile

500	505	510
Gln Val Tyr Gly Gly Pro Cys Ser Gln Ser Val Arg Ser Val Phe Ala		
515	520	525
Val Asn Trp Ile Ser Tyr Leu Ala Ser Lys Glu Gly Met Val Ile Ala		
530	535	540
Leu Val Asp Gly Arg Gly Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Leu Leu Tyr		
545	550	555
Ala Val Tyr Arg Lys Leu Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Ile Thr		
565	570	575
Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Lys Arg Ile		
580	585	590
Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu		
595	600	605
Ala Ser Gly Thr Gly Leu Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val		
610	615	620
Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr Ala Ser Val Tyr Thr Glu Arg Phe Met Gly		
625	630	635
640		
Leu Pro Thr Lys Asp Asp Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val		
645	650	655
Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His		
660	665	670
Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala		
675	680	685
Lys Ala Leu Val Asn Ala Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser		
690	695	700
Asp Gln Asn His Gly Leu Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr		
705	710	715
720		
His Met Thr His Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp Gly Lys		
725	730	735
Lys Lys Lys Lys Gly His His His His His		
740	745	
<210> 122		

<

211> 761

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 122

Met Lys Thr Trp Leu Lys Thr Val Phe Gly Val Thr Thr Leu Ala Ala

1 5 10 15

Leu Ala Leu Val Val Ile Cys Ile Val Leu Arg Pro Ser Arg Val Tyr

20 25 30

Lys Pro Glu Gly Asn Thr Lys Arg Ala Leu Thr Leu Lys Asp Ile Leu

35 40 45

Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Tyr Phe Pro Asn Trp Ile Ser Glu

50 55 60

Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Glu Asp Asp Asn Ile Val Phe Tyr Asn

65 70 75 80

Ile Glu Thr Arg Glu Ser Tyr Ile Ile Leu Ser Asn Ser Thr Met Lys

85 90 95

Ser Val Asn Ala Thr Asp Tyr Gly Leu Ser Pro Asp Arg Gln Phe Val

100 105 110

Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala

115 120 125

Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Gln Asn Gly Glu Phe Val Arg Gly Tyr

130 135 140

Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys Trp Ser Pro Val Gly Ser

145 150 155 160

Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu Lys Gln Arg Pro

165 170 175

Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Tyr Thr Gly Arg Glu Asn Arg Ile

180 185 190

Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu Glu Glu Met Leu Ala Thr

195 200 205

Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asp Gly Lys Phe Leu Ala Tyr Val

210	215	220
Glu Phe Asn Asp Ser Asp Ile Pro Ile Ile Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly		
225	230	235
Asp Gly Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile Pro Tyr Pro Lys Ala Gly		
245	250	255
Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Val Phe Ile Val Asp Thr Thr Tyr Pro		
260	265	270
His His Val Gly Pro Met Glu Val Pro Val Pro Glu Met Ile Ala Ser		
275	280	285
Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp Val Ser Ser Glu Arg Val		
290	295	300
Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn Val Ser Val Leu Ser Ile		
305	310	315
Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp His Ala Trp Glu Cys Pro Lys Asn Gln		
325	330	335
Glu His Val Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp Ala Gly Gly Phe Phe Val		
340	345	350
Ser Thr Pro Ala Phe Ser Gln Asp Ala Thr Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe		
355	360	365
Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His Tyr Ile Lys Asp Thr Val		
370	375	380
Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys Trp Glu Ala Ile Tyr Ile		
385	390	395
Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr Ser Ser Asn Glu Phe Glu		
405	410	415
Gly Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg Ile Ser Ile Gly Asn Ser		
420	425	430
Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His Leu Arg Lys Glu Arg Cys		
435	440	445
Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Tyr Lys Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu		
450	455	460

Val Cys Tyr Gly Pro Gly Leu Pro Ile Ser Thr Leu His Asp Gly Arg
 465 470 475 480
 Thr Asp Gln Glu Ile Gln Val Leu Glu Glu Asn Lys Glu Leu Glu Asn
 485 490 495
 Ser Leu Arg Asn Ile Gln Leu Pro Lys Val Glu Ile Lys Lys Leu Lys
 500 505 510
 Asp Gly Gly Leu Thr Phe Trp Tyr Lys Met Ile Leu Pro Pro Gln Phe
 515 520 525
 Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gln Val Tyr Gly Gly Pro
 530 535 540
 Cys Ser Gln Ser Val Lys Ser Val Phe Ala Val Asn Trp Ile Thr Tyr
 545 550 555 560
 Leu Ala Ser Lys Glu Gly Ile Val Ile Ala Leu Val Asp Gly Arg Gly
 565 570 575
 Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Phe Leu His Ala Val Tyr Arg Lys Leu
 580 585 590
 Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Leu Thr Ala Val Arg Lys Phe Ile
 595 600 605
 Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Glu Arg Ile Ala Ile Trp Gly Trp Ser
 610 615 620
 Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ser Gly Thr Gly Leu
 625 630 635 640
 Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr
 645 650 655
 Ala Ser Ile Tyr Ser Glu Arg Phe Met Gly Leu Pro Thr Lys Asp Asp
 660 665 670
 Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val Met Ala Arg Ala Glu Tyr
 675 680 685
 Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His Gly Thr Ala Asp Asp Asn
 690 695 700
 Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala Lys Ala Leu Val Asn Ala

705	710	715	720
Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser Asp Gln Asn His Gly Ile			
725	730	735	
Ser Ser Gly Arg Ser Gln Asn His Leu Tyr Thr His Met Thr His Phe			
740	745	750	
Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp			
755	760		

<210> 123
<211> 749
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Murine FAP ectodomain+poly-lys-tag+his6-tag
<400> 123

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

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

Glu Phe Val Arg Gly Tyr Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys			
115	120	125	
Trp Ser Pro Val Gly Ser Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile			
130	135	140	
Tyr Leu Lys Gln Arg Pro Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Tyr Thr			

145 150 155 160

Gly Arg Glu Asn Arg Ile Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu

165 170 175

Glu Glu Met Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asp Gly

180 185 190

Lys Phe Leu Ala Tyr Val Glu Phe Asn Asp Ser Asp Ile Pro Ile Ile

195 200 205

Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly Asp Gly Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile

210 215 220

Pro Tyr Pro Lys Ala Gly Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Val Phe Ile

225 230 235 240

Val Asp Thr Thr Tyr Pro His His Val Gly Pro Met Glu Val Pro Val

245 250 255

Pro Glu Met Ile Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp

260 265 270

Val Ser Ser Glu Arg Val Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn

275 280 285

Val Ser Val Leu Ser Ile Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp His Ala Trp

290 295 300

Glu Cys Pro Lys Asn Gln Glu His Val Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp

305 310 315 320

Ala Gly Gly Phe Phe Val Ser Thr Pro Ala Phe Ser Gln Asp Ala Thr

325 330 335

Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

Ser Ser Asn Glu Phe Glu Gly Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg

385 390 395 400

Ile Ser Ile Gly Asn Ser Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His
 405 410 415
 Leu Arg Lys Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Tyr Lys
 420 425 430

Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu Val Cys Tyr Gly Pro Gly Leu Pro Ile Ser
 435 440 445
 Thr Leu His Asp Gly Arg Thr Asp Gln Glu Ile Gln Val Leu Glu Glu
 450 455 460
 Asn Lys Glu Leu Glu Asn Ser Leu Arg Asn Ile Gln Leu Pro Lys Val
 465 470 475 480
 Glu Ile Lys Lys Leu Lys Asp Gly Gly Leu Thr Phe Trp Tyr Lys Met
 485 490 495

Ile Leu Pro Pro Gln Phe Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile
 500 505 510
 Gln Val Tyr Gly Gly Pro Cys Ser Gln Ser Val Lys Ser Val Phe Ala
 515 520 525
 Val Asn Trp Ile Thr Tyr Leu Ala Ser Lys Glu Gly Ile Val Ile Ala
 530 535 540
 Leu Val Asp Gly Arg Gly Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Phe Leu His
 545 550 555 560

Ala Val Tyr Arg Lys Leu Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Leu Thr
 565 570 575
 Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Glu Arg Ile
 580 585 590
 Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu
 595 600 605
 Ala Ser Gly Thr Gly Leu Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val
 610 615 620

Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr Ala Ser Ile Tyr Ser Glu Arg Phe Met Gly
 625 630 635 640
 Leu Pro Thr Lys Asp Asp Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val

645	650	655
Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His		
660	665	670
Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala		
675	680	685
Lys Ala Leu Val Asn Ala Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser		
690	695	700
Asp Gln Asn His Gly Ile Leu Ser Gly Arg Ser Gln Asn His Leu Tyr		
705	710	715
Thr His Met Thr His Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp Gly		
725	730	735
Lys Lys Lys Lys Lys Gly His His His His His		
740	745	
<210> 124		

<211> 748

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Cynomolgus FAP ectodomain+poly-lys-tag+his6-tag

<400> 124

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

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

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

Glu Phe Val Arg Gly Asn Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys

115	120	125
-----	-----	-----

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

130	135	140
-----	-----	-----

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

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Gly Arg Glu Asn Lys Ile Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu

165	170	175
-----	-----	-----

Glu Glu Met Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly

180	185	190
-----	-----	-----

Lys Phe Leu Ala Tyr Ala Glu Phe Asn Asp Thr Asp Ile Pro Val Ile

195	200	205
-----	-----	-----

Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly Asp Glu Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile

210	215	220
-----	-----	-----

Pro Tyr Pro Lys Ala Gly Ala Lys Asn Pro Phe Val Arg Ile Phe Ile

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Ile Asp Thr Thr Tyr Pro Ala Tyr Val Gly Pro Gln Glu Val Pro Val

245	250	255
-----	-----	-----

Pro Ala Met Ile Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp

260	265	270
-----	-----	-----

Val Thr Asp Glu Arg Val Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn

275	280	285
-----	-----	-----

Val Ser Val Leu Ser Ile Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp Gln Thr Trp

290	295	300
-----	-----	-----

Asp Cys Pro Lys Thr Gln Glu His Ile Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

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

325	330	335
-----	-----	-----

Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His

340	345	350
-----	-----	-----

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

355 360 365

Trp Glu Ala Ile Asn Ile Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr

370 375 380
 Ser Ser Asn Glu Phe Glu Asp Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg
 385 390 395 400
 Ile Ser Ile Gly Ser Tyr Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His
 405 410 415

Leu Arg Lys Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Asp Tyr
 420 425 430

Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu Val Cys Tyr Gly Pro Gly Ile Pro Ile Ser
 435 440 445

Thr Leu His Asp Gly Arg Thr Asp Gln Glu Ile Lys Ile Leu Glu Glu
 450 455 460
 Asn Lys Glu Leu Glu Asn Ala Leu Lys Asn Ile Gln Leu Pro Lys Glu
 465 470 475 480
 Glu Ile Lys Lys Leu Glu Val Asp Glu Ile Thr Leu Trp Tyr Lys Met
 485 490 495

Ile Leu Pro Pro Gln Phe Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile
 500 505 510

Gln Val Tyr Gly Gly Pro Cys Ser Gln Ser Val Arg Ser Val Phe Ala
 515 520 525
 Val Asn Trp Ile Ser Tyr Leu Ala Ser Lys Glu Gly Met Val Ile Ala
 530 535 540
 Leu Val Asp Gly Arg Gly Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Leu Leu Tyr
 545 550 555 560

Ala Val Tyr Arg Lys Leu Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Ile Thr

565 570 575

Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Lys Arg Ile

580 585 590

Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu

595 600 605

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

610 615 620

Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr Ala Ser Val Tyr Thr Glu Arg Phe Met Gly

625 630 635 640

Leu Pro Thr Lys Asp Asp Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val

645 650 655

Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His

660 665 670

Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala

675 680 685

Lys Ala Leu Val Asn Ala Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser

690 695 700

Asp Gln Asn His Gly Leu Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr

705 710 715 720

His Met Thr His Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp Gly Lys

725 730 735

Lys Lys Lys Lys Gly His His His His His

740 745

<210> 125

<

211> 702

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

Met Glu Ser Pro Ser Ala Pro Pro His Arg Trp Cys Ile Pro Trp Gln

1 5 10 15

Arg Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr

20 25 30

Thr Ala Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly

35 40 45

Lys Glu Val Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln His Leu Phe Gly

50	55	60
Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Ile		
65	70	75
Gly Tyr Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser		
85	90	95
Gly Arg Glu Ile Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Ile		
100	105	110
Ile Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu His Val Ile Lys Ser Asp		
115	120	125
Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu		
130	135	140
Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu Asp Lys		
145	150	155
Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Ala Thr Tyr		
165	170	175
Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln		
180	185	190
Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Arg Asn		
195	200	205
Asp Thr Ala Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Ala Arg		
210	215	220
Arg Ser Asp Ser Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro		
225	230	235
Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr Arg Ser Gly Glu Asn Leu Asn		
245	250	255
Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe		
260	265	270
Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn		
275	280	285
Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys Gln Ala His Asn Ser		
290	295	300

Asp Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Thr Ile Thr Val Tyr Ala

305 310 315 320

Glu Pro Pro Lys Pro Phe Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu

325 330 335

Asp Glu Asp Ala Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Ile Gln Asn Thr

340 345 350

Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg

355 360 365

Leu Gln Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr

370 375 380

Arg Asn Asp Val Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Lys Leu Ser

385 390 395 400

Val Asp His Ser Asp Pro Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp

405 410 415

Asp Pro Thr Ile Ser Pro Ser Tyr Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Val Asn

420 425 430

Leu Ser Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser

435 440 445

Trp Leu Ile Asp Gly Asn Ile Gln Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Ile

450 455 460

Ser Asn Ile Thr Glu Lys Asn Ser Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Asn

465 470 475 480

Asn Ser Ala Ser Gly His Ser Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Thr Val

485 490 495

Ser Ala Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro

500 505 510

Val Glu Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Ala Gln

515 520 525

Asn Thr Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser

530 535 540

Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn

545 550 555 560
 Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn Ser

 565 570 575
 Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr Gly
 580 585 590
 Pro Asp Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly
 595 600 605
 Ala Asn Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln
 610 615 620
 Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu

 625 630 635 640
 Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe
 645 650 655
 Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile
 660 665 670
 Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala Gly Ala Thr
 675 680 685
 Val Gly Ile Met Ile Gly Val Leu Val Gly Val Ala Leu Ile

 690 695 700
 <210> 126
 <211> 257
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 126

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

 Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala

50	55	60
Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr		
65	70	75
Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys		
85	90	95
Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn		
100	105	110
Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg		
115	120	125
Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu		
130	135	140
Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp		
145	150	155
160		
Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln		
165	170	175
Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile		
180	185	190
Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg		
195	200	205
Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu		
210	215	220
Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala		
225	230	235
240		
Ala Trp Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu		
245	250	255
Ser		
<210> 127		
<211> 255		
<212> PRT		
<213> Mus musculus		
<400> 127		

Met Ala His Leu Met Thr Val Gln Leu Leu Leu Val Met Trp Met
 1 5 10 15
 Ala Glu Cys Ala Gln Ser Arg Ala Thr Arg Ala Arg Thr Glu Leu Leu
 20 25 30
 Asn Val Cys Met Asp Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly Pro Glu
 35 40 45
 Asp Asn Leu His Asp Gln Cys Ser Pro Trp Lys Thr Asn Ser Cys Cys
 50 55 60
 Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Ile Ser Tyr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Thr Met Thr Ser Glu Cys Lys Arg
 85 90 95
 His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly
 100 105 110
 Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Ile Leu
 115 120 125
 Asp Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Gln Gln Trp Trp Glu Asp Cys
 130 135 140
 Gln Ser Ser Phe Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp
 145 150 155 160
 Ser Ser Gly His Asn Glu Cys Pro Val Gly Ala Ser Cys His Pro Phe
 165 170 175
 Thr Phe Tyr Phe Pro Thr Ser Ala Ala Leu Cys Glu Glu Ile Trp Ser
 180 185 190
 His Ser Tyr Lys Leu Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile
 195 200 205
 Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala
 210 215 220
 Arg Phe Tyr Ala Glu Ala Met Ser Gly Ala Gly Phe His Gly Thr Trp
 225 230 235 240
 Pro Leu Leu Cys Ser Leu Ser Leu Val Leu Leu Trp Val Ile Ser

	245	250	255	
<210>	128			
<211>	257			
<212>	PRT			
<213>	Macaca fascicularis			
<400>	128			
Met Ala Gln Arg Met Thr Thr Gln Leu Leu Leu Leu Val Trp Val				
1	5	10	15	
Ala Val Val Gly Glu Ala Gln Thr Arg Thr Ala Arg Ala Arg Thr Glu				
	20	25	30	
Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly				
	35	40	45	
Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Lys Lys Asn Ala				
	50	55	60	
Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr				
	65	70	75	80
Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys				
	85	90	95	
Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn				
	100	105	110	
Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg				
	115	120	125	
Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Arg Trp Trp Glu				
	130	135	140	
Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp				
	145	150	155	160
Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Pro Val Gly Ala Ala Cys Gln				
	165	170	175	
Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile				
	180	185	190	
Trp Thr Tyr Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg				
	195	200	205	

Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu

210 215 220

Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala

225 230 235 240

Ala Trp Pro Leu Leu Leu Ser Leu Ala Leu Thr Leu Leu Trp Leu Leu

245 250 255

Ser

<210> 129

<211> 2322

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 129

Met Gln Ser Gly Pro Arg Pro Pro Leu Pro Ala Pro Gly Leu Ala Leu

1 5 10 15

Ala Leu Thr Leu Thr Met Leu Ala Arg Leu Ala Ser Ala Ala Ser Phe

20 25 30

Phe Gly Glu Asn His Leu Glu Val Pro Val Ala Thr Ala Leu Thr Asp

35 40 45

Ile Asp Leu Gln Leu Gln Phe Ser Thr Ser Gln Pro Glu Ala Leu Leu

50 55 60

Leu Leu Ala Ala Gly Pro Ala Asp His Leu Leu Leu Gln Leu Tyr Ser

65 70 75 80

Gly Arg Leu Gln Val Arg Leu Val Leu Gly Gln Glu Glu Leu Arg Leu

85 90 95

Gln Thr Pro Ala Glu Thr Leu Leu Ser Asp Ser Ile Pro His Thr Val

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Gly Leu Phe Val Gly Gly Thr Gly Thr Leu Gly Leu Pro Tyr Leu Arg

145 150 155 160

Gly Thr Ser Arg Pro Leu Arg Gly Cys Leu His Ala Ala Thr Leu Asn

165 170 175

Gly Arg Ser Leu Leu Arg Pro Leu Thr Pro Asp Val His Glu Gly Cys

180 185 190

Ala Glu Glu Phe Ser Ala Ser Asp Asp Val Ala Leu Gly Phe Ser Gly

195 200 205

Pro His Ser Leu Ala Ala Phe Pro Ala Trp Gly Thr Gln Asp Glu Gly

210 215 220

Thr Leu Glu Phe Thr Leu Thr Thr Gln Ser Arg Gln Ala Pro Leu Ala

225 230 235 240

Phe Gln Ala Gly Gly Arg Arg Gly Asp Phe Ile Tyr Val Asp Ile Phe

245 250 255

Glu Gly His Leu Arg Ala Val Val Glu Lys Gly Gln Gly Thr Val Leu

260 265 270

Leu His Asn Ser Val Pro Val Ala Asp Gly Gln Pro His Glu Val Ser

275 280 285

Val His Ile Asn Ala His Arg Leu Glu Ile Ser Val Asp Gln Tyr Pro

290 295 300

Thr His Thr Ser Asn Arg Gly Val Leu Ser Tyr Leu Glu Pro Arg Gly

305 310 315 320

Ser Leu Leu Leu Gly Gly Leu Asp Ala Glu Ala Ser Arg His Leu Gln

325 330 335

Glu His Arg Leu Gly Leu Thr Pro Glu Ala Thr Asn Ala Ser Leu Leu

340 345 350

Gly Cys Met Glu Asp Leu Ser Val Asn Gly Gln Arg Arg Gly Leu Arg

355 360 365

Glu Ala Leu Leu Thr Arg Asn Met Ala Ala Gly Cys Arg Leu Glu Glu

370 375 380

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

385 390 395 400

Leu Ala Pro Glu Ala Trp Pro Ala Met Glu Leu Pro Glu Pro Cys Val

405 410 415

Pro Glu Pro Gly Leu Pro Pro Val Phe Ala Asn Phe Thr Gln Leu Leu

420 425 430

Thr Ile Ser Pro Leu Val Val Ala Glu Gly Gly Thr Ala Trp Leu Glu

435 440 445

Trp Arg His Val Gln Pro Thr Leu Asp Leu Met Glu Ala Glu Leu Arg

450 455 460

Lys Ser Gln Val Leu Phe Ser Val Thr Arg Gly Ala Arg His Gly Glu

465 470 475 480

Leu Glu Leu Asp Ile Pro Gly Ala Gln Ala Arg Lys Met Phe Thr Leu

485 490 495

Leu Asp Val Val Asn Arg Lys Ala Arg Phe Ile His Asp Gly Ser Glu

500 505 510

Asp Thr Ser Asp Gln Leu Val Leu Glu Val Ser Val Thr Ala Arg Val

515 520 525

Pro Met Pro Ser Cys Leu Arg Arg Gly Gln Thr Tyr Leu Leu Pro Ile

530 535 540

Gln Val Asn Pro Val Asn Asp Pro Pro His Ile Ile Phe Pro His Gly

545 550 555 560

Ser Leu Met Val Ile Leu Glu His Thr Gln Lys Pro Leu Gly Pro Glu

565 570 575

Val Phe Gln Ala Tyr Asp Pro Asp Ser Ala Cys Glu Gly Leu Thr Phe

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

Arg Val Ser Asp Gly Leu Gln Ala Ser Pro Pro Ala Thr Leu Lys Val
 645 650 655
 Val Ala Ile Arg Pro Ala Ile Gln Ile His Arg Ser Thr Gly Leu Arg
 660 665 670
 Leu Ala Gln Gly Ser Ala Met Pro Ile Leu Pro Ala Asn Leu Ser Val
 675 680 685
 Glu Thr Asn Ala Val Gly Gln Asp Val Ser Val Leu Phe Arg Val Thr
 690 695 700
 Gly Ala Leu Gln Phe Gly Glu Leu Gln Lys Gln Gly Ala Gly Gly Val
 705 710 715 720
 Glu Gly Ala Glu Trp Trp Ala Thr Gln Ala Phe His Gln Arg Asp Val
 725 730 735
 Glu Gln Gly Arg Val Arg Tyr Leu Ser Thr Asp Pro Gln His His Ala
 740 745 750
 Tyr Asp Thr Val Glu Asn Leu Ala Leu Glu Val Gln Val Gly Gln Glu
 755 760 765
 Ile Leu Ser Asn Leu Ser Phe Pro Val Thr Ile Gln Arg Ala Thr Val
 770 775 780
 Trp Met Leu Arg Leu Glu Pro Leu His Thr Gln Asn Thr Gln Gln Glu
 785 790 795 800
 Thr Leu Thr Thr Ala His Leu Glu Ala Thr Leu Glu Glu Ala Gly Pro
 805 810 815
 Ser Pro Pro Thr Phe His Tyr Glu Val Val Gln Ala Pro Arg Lys Gly
 820 825 830
 Asn Leu Gln Leu Gln Gly Thr Arg Leu Ser Asp Gly Gln Gly Phe Thr
 835 840 845
 Gln Asp Asp Ile Gln Ala Gly Arg Val Thr Tyr Gly Ala Thr Ala Arg
 850 855 860
 Ala Ser Glu Ala Val Glu Asp Thr Phe Arg Phe Arg Val Thr Ala Pro
 865 870 875 880
 Pro Tyr Phe Ser Pro Leu Tyr Thr Phe Pro Ile His Ile Gly Gly Asp

885	890	895
Pro Asp Ala Pro Val Leu Thr Asn Val Leu Leu Val Val Pro Glu Gly		
900	905	910
Gly Glu Gly Val Leu Ser Ala Asp His Leu Phe Val Lys Ser Leu Asn		
915	920	925
Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Glu Val Met Glu Arg Pro Arg His Gly Arg		
930	935	940
Leu Ala Trp Arg Gly Thr Gln Asp Lys Thr Thr Met Val Thr Ser Phe		
945	950	955
Thr Asn Glu Asp Leu Leu Arg Gly Arg Leu Val Tyr Gln His Asp Asp		
965	970	975
Ser Glu Thr Thr Glu Asp Asp Ile Pro Phe Val Ala Thr Arg Gln Gly		
980	985	990
Glu Ser Ser Gly Asp Met Ala Trp Glu Glu Val Arg Gly Val Phe Arg		
995	1000	1005
Val Ala Ile Gln Pro Val Asn Asp His Ala Pro Val Gln Thr Ile		
1010	1015	1020
Ser Arg Ile Phe His Val Ala Arg Gly Gly Arg Arg Leu Leu Thr		
1025	1030	1035
Thr Asp Asp Val Ala Phe Ser Asp Ala Asp Ser Gly Phe Ala Asp		
1040	1045	1050
Ala Gln Leu Val Leu Thr Arg Lys Asp Leu Leu Phe Gly Ser Ile		
1055	1060	1065
Val Ala Val Asp Glu Pro Thr Arg Pro Ile Tyr Arg Phe Thr Gln		
1070	1075	1080
Glu Asp Leu Arg Lys Arg Arg Val Leu Phe Val His Ser Gly Ala		
1085	1090	1095
Asp Arg Gly Trp Ile Gln Leu Gln Val Ser Asp Gly Gln His Gln		
1100	1105	1110
Ala Thr Ala Leu Leu Glu Val Gln Ala Ser Glu Pro Tyr Leu Arg		
1115	1120	1125

Val Ala Asn Gly Ser Ser Leu Val Val Pro Gln Gly Gly Gln Gly

1130 1135 1140

Thr Ile Asp Thr Ala Val Leu His Leu Asp Thr Asn Leu Asp Ile

1145 1150 1155

Arg Ser Gly Asp Glu Val His Tyr His Val Thr Ala Gly Pro Arg

1160 1165 1170

Trp Gly Gln Leu Val Arg Ala Gly Gln Pro Ala Thr Ala Phe Ser

1175 1180 1185

Gln Gln Asp Leu Leu Asp Gly Ala Val Leu Tyr Ser His Asn Gly

1190 1195 1200

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

1205 1210 1215

Pro Val His Thr Asp Ala Thr Leu Gln Val Thr Ile Ala Leu Glu

1220 1225 1230

Gly Pro Leu Ala Pro Leu Lys Leu Val Arg His Lys Lys Ile Tyr

1235 1240 1245

Val Phe Gln Gly Glu Ala Ala Glu Ile Arg Arg Asp Gln Leu Glu

1250 1255 1260

Ala Ala Gln Glu Ala Val Pro Pro Ala Asp Ile Val Phe Ser Val

1265 1270 1275

Lys Ser Pro Pro Ser Ala Gly Tyr Leu Val Met Val Ser Arg Gly

1280 1285 1290

Ala Leu Ala Asp Glu Pro Pro Ser Leu Asp Pro Val Gln Ser Phe

1295 1300 1305

Ser Gln Glu Ala Val Asp Thr Gly Arg Val Leu Tyr Leu His Ser

1310 1315 1320

Arg Pro Glu Ala Trp Ser Asp Ala Phe Ser Leu Asp Val Ala Ser

1325 1330 1335

Gly Leu Gly Ala Pro Leu Glu Gly Val Leu Val Glu Leu Glu Val

1340 1345 1350

Leu Pro Ala Ala Ile Pro Leu Glu Ala Gln Asn Phe Ser Val Pro

1355	1360	1365
Glu	Gly	Gly Ser Leu Thr Leu Ala Pro Pro Leu Leu Arg Val Ser
1370	1375	1380
Gly	Pro	Tyr Phe Pro Thr Leu Leu Gly Leu Ser Leu Gln Val Leu
1385	1390	1395
Glu	Pro	Pro Gln His Gly Ala Leu Gln Lys Glu Asp Gly Pro Gln
1400	1405	1410
Ala	Arg	Thr Leu Ser Ala Phe Ser Trp Arg Met Val Glu Glu Gln
1415	1420	1425
Leu	Ile	Arg Tyr Val His Asp Gly Ser Glu Thr Leu Thr Asp Ser
1430	1435	1440
Phe	Val	Leu Met Ala Asn Ala Ser Glu Met Asp Arg Gln Ser His
1445	1450	1455
Pro	Val	Ala Phe Thr Val Thr Val Leu Pro Val Asn Asp Gln Pro
1460	1465	1470
Pro	Ile	Leu Thr Thr Asn Thr Gly Leu Gln Met Trp Glu Gly Ala
1475	1480	1485
Thr	Ala	Pro Ile Pro Ala Glu Ala Leu Arg Ser Thr Asp Gly Asp
1490	1495	1500
Ser	Gly	Ser Glu Asp Leu Val Tyr Thr Ile Glu Gln Pro Ser Asn
1505	1510	1515
Gly	Arg	Val Val Leu Arg Gly Ala Pro Gly Thr Glu Val Arg Ser
1520	1525	1530
Phe	Thr	Gln Ala Gln Leu Asp Gly Gly Leu Val Leu Phe Ser His
1535	1540	1545
Arg	Gly	Thr Leu Asp Gly Gly Phe Arg Phe Arg Leu Ser Asp Gly
1550	1555	1560
Glu	His	Thr Ser Pro Gly His Phe Phe Arg Val Thr Ala Gln Lys
1565	1570	1575
Gln	Val	Leu Leu Ser Leu Lys Gly Ser Gln Thr Leu Thr Val Cys
1580	1585	1590

Pro Gly Ser Val Gln Pro Leu Ser Ser Gln Thr Leu Arg Ala Ser
 1595 1600 1605
 Ser Ser Ala Gly Thr Asp Pro Gln Leu Leu Leu Tyr Arg Val Val
 1610 1615 1620
 Arg Gly Pro Gln Leu Gly Arg Leu Phe His Ala Gln Gln Asp Ser
 1625 1630 1635
 Thr Gly Glu Ala Leu Val Asn Phe Thr Gln Ala Glu Val Tyr Ala

 1640 1645 1650
 Gly Asn Ile Leu Tyr Glu His Glu Met Pro Pro Glu Pro Phe Trp
 1655 1660 1665
 Glu Ala His Asp Thr Leu Glu Leu Gln Leu Ser Ser Pro Pro Ala
 1670 1675 1680
 Arg Asp Val Ala Ala Thr Leu Ala Val Ala Val Ser Phe Glu Ala
 1685 1690 1695
 Ala Cys Pro Gln Arg Pro Ser His Leu Trp Lys Asn Lys Gly Leu

 1700 1705 1710
 Trp Val Pro Glu Gly Gln Arg Ala Arg Ile Thr Val Ala Ala Leu
 1715 1720 1725
 Asp Ala Ser Asn Leu Leu Ala Ser Val Pro Ser Pro Gln Arg Ser
 1730 1735 1740
 Glu His Asp Val Leu Phe Gln Val Thr Gln Phe Pro Ser Arg Gly
 1745 1750 1755
 Gln Leu Leu Val Ser Glu Glu Pro Leu His Ala Gly Gln Pro His

 1760 1765 1770
 Phe Leu Gln Ser Gln Leu Ala Ala Gly Gln Leu Val Tyr Ala His
 1775 1780 1785
 Gly Gly Gly Gly Thr Gln Gln Asp Gly Phe His Phe Arg Ala His
 1790 1795 1800
 Leu Gln Gly Pro Ala Gly Ala Ser Val Ala Gly Pro Gln Thr Ser
 1805 1810 1815
 Glu Ala Phe Ala Ile Thr Val Arg Asp Val Asn Glu Arg Pro Pro

1820	1825	1830
Gln Pro Gln Ala Ser Val Pro Leu Arg Leu Thr Arg Gly Ser Arg		
1835	1840	1845
Ala Pro Ile Ser Arg Ala Gln Leu Ser Val Val Asp Pro Asp Ser		
1850	1855	1860
Ala Pro Gly Glu Ile Glu Tyr Glu Val Gln Arg Ala Pro His Asn		
1865	1870	1875
Gly Phe Leu Ser Leu Val Gly Gly Leu Gly Pro Val Thr Arg		
1880	1885	1890
Phe Thr Gln Ala Asp Val Asp Ser Gly Arg Leu Ala Phe Val Ala		
1895	1900	1905
Asn Gly Ser Ser Val Ala Gly Ile Phe Gln Leu Ser Met Ser Asp		
1910	1915	1920
Gly Ala Ser Pro Pro Leu Pro Met Ser Leu Ala Val Asp Ile Leu		
1925	1930	1935
Pro Ser Ala Ile Glu Val Gln Leu Arg Ala Pro Leu Glu Val Pro		
1940	1945	1950
Gln Ala Leu Gly Arg Ser Ser Leu Ser Gln Gln Gln Leu Arg Val		
1955	1960	1965
Val Ser Asp Arg Glu Glu Pro Glu Ala Ala Tyr Arg Leu Ile Gln		
1970	1975	1980
Gly Pro Gln Tyr Gly His Leu Leu Val Gly Gly Arg Pro Thr Ser		
1985	1990	1995
Ala Phe Ser Gln Phe Gln Ile Asp Gln Gly Glu Val Val Phe Ala		
2000	2005	2010
Phe Thr Asn Phe Ser Ser Ser His Asp His Phe Arg Val Leu Ala		
2015	2020	2025
Leu Ala Arg Gly Val Asn Ala Ser Ala Val Val Asn Val Thr Val		
2030	2035	2040
Arg Ala Leu Leu His Val Trp Ala Gly Gly Pro Trp Pro Gln Gly		
2045	2050	2055

Ala Thr Leu Arg Leu Asp Pro Thr Val Leu Asp Ala Gly Glu Leu

2060	2065	2070
Ala Asn Arg Thr Gly Ser Val Pro Arg Phe Arg Leu Leu Glu Gly		
2075	2080	2085
Pro Arg His Gly Arg Val Val Arg Val Pro Arg Ala Arg Thr Glu		
2090	2095	2100
Pro Gly Gly Ser Gln Leu Val Glu Gln Phe Thr Gln Gln Asp Leu		
2105	2110	2115
Glu Asp Gly Arg Leu Gly Leu Glu Val Gly Arg Pro Glu Gly Arg		

2120	2125	2130
Ala Pro Gly Pro Ala Gly Asp Ser Leu Thr Leu Glu Leu Trp Ala		
2135	2140	2145
Gln Gly Val Pro Pro Ala Val Ala Ser Leu Asp Phe Ala Thr Glu		
2150	2155	2160
Pro Tyr Asn Ala Ala Arg Pro Tyr Ser Val Ala Leu Leu Ser Val		
2165	2170	2175
Pro Glu Ala Ala Arg Thr Glu Ala Gly Lys Pro Glu Ser Ser Thr		

2180	2185	2190
Pro Thr Gly Glu Pro Gly Pro Met Ala Ser Ser Pro Glu Pro Ala		
2195	2200	2205
Val Ala Lys Gly Gly Phe Leu Ser Phe Leu Glu Ala Asn Met Phe		
2210	2215	2220
Ser Val Ile Ile Pro Met Cys Leu Val Leu Leu Leu Leu Ala Leu		
2225	2230	2235
Ile Leu Pro Leu Leu Phe Tyr Leu Arg Lys Arg Asn Lys Thr Gly		

2240	2245	2250
Lys His Asp Val Gln Val Leu Thr Ala Lys Pro Arg Asn Gly Leu		
2255	2260	2265
Ala Gly Asp Thr Glu Thr Phe Arg Lys Val Glu Pro Gly Gln Ala		
2270	2275	2280
Ile Pro Leu Thr Ala Val Pro Gly Gln Gly Pro Pro Pro Gly Gly		

2285	2290	2295
Gln Pro Asp Pro Glu Leu Leu Gln Phe Cys Arg Thr Pro Asn Pro		
2300	2305	2310
Ala Leu Lys Asn Gly Gln Tyr Trp Val		
2315	2320	
<210> 130		
<211> 207		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 130		
Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser		
1	5	10
Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr		
20	25	30
Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr		
35	40	45
Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys		
50	55	60
Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp		
65	70	75
His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr		
85	90	95
Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu		
100	105	110
Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met		
115	120	125
Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu		
130	135	140
Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys		
145	150	155
Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn		

165	170	175
Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg		
180	185	190
Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile		
195	200	205
<210> 131		
<211> 198		
<212> PRT		
<213> Macacus fascularis		
<400> 131		
Met Gln Ser Gly Thr Arg Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser		
1	5	10
Ile Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Ser Ile Thr		
20	25	30
Gln Thr Pro Tyr Gln Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr		
35	40	45
Cys Ser Gln His Leu Gly Ser Glu Ala Gln Trp Gln His Asn Gly Lys		
50	55	60
Asn Lys Glu Asp Ser Gly Asp Arg Leu Phe Leu Pro Glu Phe Ser Glu		
65	70	75
Met Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Asn Pro		
85	90	95
Glu Asp Ala Ser His His Leu Tyr Leu Lys Ala Arg Val Cys Glu Asn		
100	105	110
Cys Met Glu Met Asp Val Met Ala Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp		
115	120	125
Ile Cys Ile Thr Leu Gly Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys		
130	135	140
Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly		
145	150	155
Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn		
165	170	175

Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Gln Asp Leu Tyr Ser Gly

180 185 190

Leu Asn Gln Arg Arg Ile

195

<210> 132

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> G4S peptide linker

<400> 132

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 133

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> (G4S)2

<400> 133

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 134

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> (SG4)2

<400> 134

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

1 5 10

<210> 135

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker

<400> 135

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

1 5 10

<210> 136

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker

<400> 136

Gly Ser Pro Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser

1 5 10

<210> 137

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker 2

<400> 137

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 138

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker 3

<400> 138

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 139

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker 4

<400> 139

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5

<210> 140

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker 5

<400> 140

Gly Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser

1 5

<210> 141

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker 6

<400> 141

Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 142

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker 7

<400> 142

Gly Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 143

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker 8

<400> 143

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 144

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker 9

<400> 144

Gly Gly Ser Gly Asn Gly Ser Gly

1 5

<210> 145

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker 10

<400> 145

Gly Gly Asn Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 146

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker 11

<400> 146

Gly Gly Asn Gly Ser Gly

1 5