

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0144777
(43) 공개일자 2022년10월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
 (52) CPC특허분류
C07K 16/2887 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
 (21) 출원번호 10-2022-0048257
 (22) 출원일자 2022년04월19일
 심사청구일자 2022년04월19일
 (30) 우선권주장
 1020210050921 2021년04월20일 대한민국(KR)

(71) 출원인
 고려대학교 산학협력단
 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
 에스지메디칼 주식회사
 서울특별시 송파구 오금로13길 3-11 (방이동, 한길빌딩2층,3층)
 (72) 발명자
 정상택
 서울특별시 강남구 선릉로69길 20, 112동 6층 702호(역삼동, 역삼 e-편한세상)
 이지철
 경기도 광명시 광덕산로 26, 105동 2202호(하안동, 광명 두산위브 트레지움)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 특허법인충현

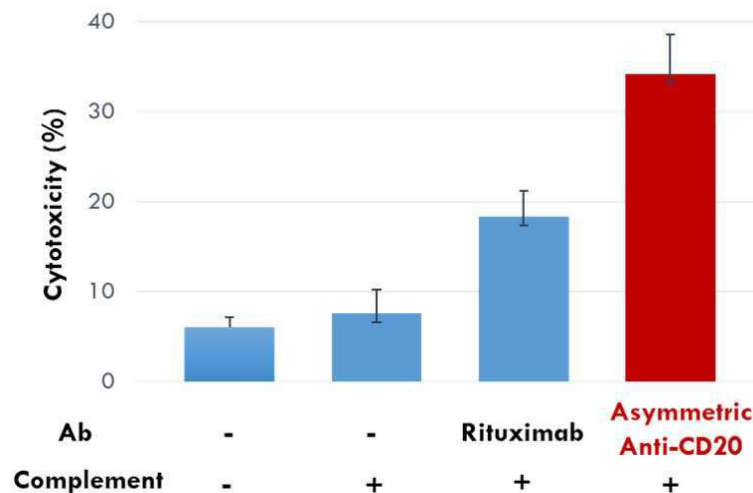
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 **향상된 암세포 사멸효능을 갖는 비대칭 항체**

(57) 요약

본 발명은 한쪽은 scFv (Single-chain variable fragment) 및 다른 한쪽은 Fab (Fragment antigen-binding)을 포함하는 항-CD20 비대칭 항체 (asymmetric antibody)에 관한 것이다. 본 발명의 비대칭 항체는 대칭구조의 항체와 비교하여 보체를 효과적으로 활성화하여 현저히 향상된 보체 의존 세포사멸능(Complement Dependent Cytotoxicity, CDC)을 나타내는 바, 효율적인 암 치료제 또는 치료 보조제로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)
C07K 2317/734 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

민성원

서울특별시 성동구 왕십리로 410, 106동 409호(하
왕십리동, 센트라스)

배공득

서울특별시 강동구 천호대로170길 50, 503호(성내
동, 명성빌라)

권형선

서울특별시 중랑구 면목로34길 28, 401호(면목동,
뜨라네12차)

이상민

경기도 가평군 청평면 잠곡로 7, 201호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	9991007727
과제번호	HN21C0103
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	국가신약개발재단
연구사업명	국가신약개발사업
연구과제명	혈중 반감기 및 치료용 작용기작 극대화 Fc 변이체가 도입된 암 치료용 유효 및 선
도 비대칭 Anti-CD20xCD55 이중항체 도출	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2021.07.01 ~ 2024.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

하기의 구성을 포함하는, 보체 의존 세포사멸능 (Complement Dependent Cytotoxicity, CDC)이 향상된 항-CD20 비대칭 항체 (asymmetric antibody) 또는 이의 항원 결합 단편:

(a) 서열번호 16의 LCDR1, 서열번호 18의 LCDR2, 서열번호 20의 LCDR3, 서열번호 24의 HCDR1, 서열번호 26의 HCDR2 및 서열번호 28의 HCDR3 서열을 포함하는 scFv (Single-chain variable fragment); 및

(b) 서열번호 33의 LCDR1, 서열번호 35의 LCDR2, 서열번호 37의 LCDR3, 서열번호 42의 HCDR1, 서열번호 44의 HCDR2 및 서열번호 46의 HCDR3 서열을 포함하는 Fab (Fragment antigen-binding).

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 scFv는 서열번호 51의 경쇄 가변 영역 (VL) 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 항-CD20 비대칭 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 scFv는 서열번호 52의 중쇄 가변 영역 (VH) 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 항-CD20 비대칭 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 scFv는 서열번호 15의 LFR1, 서열번호 17의 LFR2, 서열번호 19의 LFR3, 서열번호 21의 LFR4, 서열번호 23의 HFR1, 서열번호 25의 HFR2, 서열번호 27의 HFR3 및 서열번호 29의 HFR4로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 항-CD20 비대칭 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 scFv는 VL-링커-VH 형태인 것을 특징으로 하는, 항-CD20 비대칭 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 링커는 Gly 및 Ser의 조합인 것을 특징으로 하는, 항-CD20 비대칭 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 Fab은 서열번호 53의 경쇄 가변 영역 (VL) 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 항-CD20 비대칭 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 Fab은 서열번호 54의 중쇄 가변 영역 (VH) 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 항-CD20 비대칭 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 Fab은 서열번호 32의 LFR1, 서열번호 34의 LFR2, 서열번호 36의 LFR3, 서열번호 38의 LFR4, 서열번호 41의 HFR1, 서열번호 43의 HFR2, 서열번호 45의 HFR3 및 서열번호 47의 HFR4로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 항-CD20 비대칭 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 10

제 1 항에 있어서, 상기 Fab은 서열번호 39의 C κ (C kappa) 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 항-CD20 비대칭 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 11

제 1 항에 있어서, 상기 Fab은 서열번호 48의 CH1 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 항-CD20 비대칭 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 12

제 1 항에 있어서, 상기 Fab은 VL-C κ -링커-VH-CH1 형태인 것을 특징으로 하는, 항-CD20 비대칭 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 상기 링커는 Gly 및 Ser의 조합인 것을 특징으로 하는, 항-CD20 비대칭 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 14

제 1 항의 항-CD20 비대칭 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자.

청구항 15

제 14 항의 핵산분자를 포함하는 벡터.

청구항 16

제 15 항의 벡터로 형질전환된 단리된 숙주세포.

청구항 17

제 1 항의 항-CD20 비대칭 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵

산분자, 또는 상기 핵산분자를 포함하는 벡터를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 18

제 1 항의 항-CD20 비대칭 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자, 또는 상기 핵산분자를 포함하는 벡터의 약제학적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료방법.

청구항 19

제 1 항의 항-CD20 비대칭 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자, 또는 상기 핵산분자를 포함하는 벡터의 치료용도(for use in therapy).

청구항 20

제 1 항의 항-CD20 비대칭 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자, 또는 상기 핵산분자를 포함하는 벡터를 유효성분으로 포함하는 암의 진단용 조성물.

청구항 21

하기의 단계를 포함하는, 보체 의존 세포사멸능 (Complement Dependent Cytotoxicity, CDC)이 향상된 항-CD20 비대칭 항체 (asymmetric antibody) 또는 이의 항원 결합 단편의 제조방법:

- (a) 서열번호 16의 LCDR1, 서열번호 18의 LCDR2, 서열번호 20의 LCDR3, 서열번호 24의 HCDR1, 서열번호 26의 HCDR2 및 서열번호 28의 HCDR3 서열을 포함하는 scFv (Single-chain variable fragment)를 제조하는 단계; 및
- (b) 서열번호 33의 LCDR1, 서열번호 35의 LCDR2, 서열번호 37의 LCDR3, 서열번호 42의 HCDR1, 서열번호 44의 HCDR2 및 서열번호 46의 HCDR3 서열을 포함하는 Fab (Fragment antigen-binding)을 제조하는 단계.

청구항 22

하기의 단계를 포함하는, 보체 의존 세포사멸능 (Complement Dependent Cytotoxicity, CDC)이 향상된 항-CD20 비대칭 항체 (asymmetric antibody) 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자의 제조방법:

- (a) 서열번호 16의 LCDR1, 서열번호 18의 LCDR2, 서열번호 20의 LCDR3, 서열번호 24의 HCDR1, 서열번호 26의 HCDR2 및 서열번호 28의 HCDR3 서열을 포함하는 scFv (Single-chain variable fragment)를 코딩하는 핵산분자를 제조하는 단계; 및
- (b) 서열번호 33의 LCDR1, 서열번호 35의 LCDR2, 서열번호 37의 LCDR3, 서열번호 42의 HCDR1, 서열번호 44의 HCDR2 및 서열번호 46의 HCDR3 서열을 포함하는 Fab (Fragment antigen-binding)을 코딩하는 핵산분자를 제조하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 보체 의존 세포사멸능 (Complement Dependent Cytotoxicity, CDC)이 향상된 신규한 항-CD20 비대칭 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및/또는 이를 이용한 암의 예방, 치료 및/또는 진단용 조성물에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0003] 전 세계 항암제 시장은 지난 10년 간 연평균 10 - 13%의 성장률을 보여 왔으며, 2022년에는 총 2,000억 달러에 달할 것으로 예상된다. 2020년 현재 전 세계 남성은 5명 중 1명, 여성은 6명 중 1명이 평생 1회 이상의 암 발병을 경험하고 있으며, 남성 8명 중 1명과 여성 11명 중 1명이 암으로 사망하고 있을 만큼 암의 유병률과 사망률은 지속적으로 증가하고 있다.
- [0004] 전 세계 항암제 시장은 1세대 화학요법을 시작으로 2세대 표적 항암제와 3세대 면역 항암제까지 패러다임 전환이 이루어지고 있다. 초창기 단순한 암의 축소·억제를 목적으로 하던 치료 방법에서 벗어나 정상적으로 빠르게 분열하는 세포에 대한 손상이 가해지지 않고 암세포만을 선택적으로 공격하는 표적 항암 치료 기술이 활발하게 연구되고 있으며, 이러한 표적 항암치료 기술의 개발은 암세포를 선택적으로 표적화할 수 있도록 하는, 암세포에서 특이적으로 발현되는 수용체의 선별과 수용체와 결합하는 표적화 화합물의 개발의 두 단계로 이루어진다.
- [0005] 리툽시맵은 chimeric anti-CD20 단일클론 항체로서 종양 치료목적으로 상용화되어 미국 FDA로부터 최초로 승인된 단일클론 항체 치료제이다. 1980년대 초기의 CD20 항원의 항체는 마우스로부터 만들어진 단일클론 항체로서 항원과의 반응성은 우수하지만 생체 반감기가 짧고 이중 항원으로 인한 항원성(HAMA, human anti-mouse antibody)이 유발되는 단점이 있었다. 이러한 마우스 기원 항체의 결점을 보완하고 생물학적 효과를 높이기 위하여 항원 인식이 이루어지는 가변부위(variable region)는 마우스 기원이고 항체의 불변부위(constant region)는 인간 기원인 키메라 항체인 리툽시맵이 유전자 재조합 기술을 통하여 합성되었다.
- [0006] CD20 항원은 B세포 계열이 세포주기(cell-cycle entry)에 들어가거나 B세포로 분화하는데 관여하는 것으로 알려져 있다. CD20 항원은 세포 표면으로부터 쉽게 탈각되거나 변형 혹은 흡입되지 않는 특성을 지니고 있어 표적 분자로서 활용하기에 적당한 특징을 갖고 있다. CD20 항원의 분포는 정상 세포의 경우, pre-B 세포 단계에서 활성화된 B 세포(activated B cell) 단계까지 광범위하게 분포하지만 조혈모세포, 형질세포와 다른 계열의 세포에는 분포하지 않으며 림프종의 경우는 B 세포 림프종과 만성 림프구성 백혈병의 대부분과 pre-B cell 급성림프구성 백혈병의 50%에서 CD20 항원이 발현되어 단일클론 항체를 이용한 종양특이적 면역반응을 유도하는데 적절한 표적이 될 수 있다(Maloney DG et al., IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed lowgrade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, 90:2188-2195, 1997; McLaughlin P et al., Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol*, 16:2825-2833, 1998).
- [0007] 하지만, 상기 리툽시맵의 경우 약 절반 정도의 저도 림프종 환자 및 약 60-70% 정도의 고도 림프종 환자에서 내성을 보이며, CD55 또는 CD59 등의 발현이 많은 경우 보체 매개성 세포독성이 감소한다는 일부 보고가 있으나, 상당수의 환자에서 반응하지 않는 이유에 대해 확실하지 않은 상황이다.
- [0009] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 이에 본 발명자들은 리툽시맵에 반응성을 나타내지 않거나 이에 내성을 갖는 암세포를 효과적으로 사멸할 수 있는 치료제를 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 한쪽은 scFv 및 다른 한쪽은 Fab을 포함하는 항-CD20 비대칭 항체를 이용할 경우 현저히 향상된 보체 의존 세포사멸능 (Complement Dependent Cytotoxicity, CDC)을 갖는다는 것을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0012] 따라서 본 발명의 목적은, scFv (Single-chain variable fragment) 및 Fab (Fragment antigen-binding)을 포함하는, 보체 의존 세포사멸능 (CDC)이 향상된 항-CD20 비대칭 항체 (asymmetric antibody) 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는데 있다.

- [0013] 본 발명의 다른 목적은, 상기 항-CD20 비대칭 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자를 제공하는 데 있다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 핵산분자를 포함하는 벡터를 제공하는데 있다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공하는데 있다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 항-CD20 비대칭 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자, 또는 상기 핵산분자를 포함하는 벡터를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는데 있다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 항-CD20 비대칭 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자, 또는 상기 핵산분자를 포함하는 벡터의 약제학적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료방법을 제공하는데 있다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 항-CD20 비대칭 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자, 또는 상기 핵산분자를 포함하는 벡터의 치료용도(for use in therapy)를 제공하는데 있다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 항-CD20 비대칭 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자, 또는 상기 핵산분자를 포함하는 벡터를 유효성분으로 포함하는 암의 진단용 조성물을 제공하는데 있다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 목적은, scFv를 제조하는 단계 및 Fab을 제조하는 단계를 포함하는, 보체 의존 세포사멸능이 향상된 항-CD20 비대칭 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조방법을 제공하는데 있다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 목적은, scFv를 코딩하는 핵산분자를 제조하는 단계 및 Fab을 코딩하는 핵산분자를 제조하는 단계를 포함하는, 보체 의존 세포사멸능이 향상된 항-CD20 비대칭 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자의 제조방법을 제공하는데 있다.
- [0023] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0025] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 보체 의존 세포사멸능 (Complement Dependent Cytotoxicity, CDC)이 향상된 항-CD20 비대칭 항체 (asymmetric antibody) 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자의 제조방법을 제공한다:
- [0026] (a) 서열번호 16의 LCDR1, 서열번호 18의 LCDR2, 서열번호 20의 LCDR3, 서열번호 24의 HCDR1, 서열번호 26의 HCDR2 및 서열번호 28의 HCDR3 서열을 포함하는 scFv (Single-chain variable fragment)를 코딩하는 핵산분자를 제조하는 단계; 및
- [0027] (b) 서열번호 33의 LCDR1, 서열번호 35의 LCDR2, 서열번호 37의 LCDR3, 서열번호 42의 HCDR1, 서열번호 44의 HCDR2 및 서열번호 46의 HCDR3 서열을 포함하는 Fab (Fragment antigen-binding)을 코딩하는 핵산분자를 제조하는 단계.
- [0029] 본 발명자들은 리톡시맙에 반응성을 나타내지 않거나 이에 내성을 갖는 암세포를 효과적으로 사멸할 수 있는 치료제를 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 한쪽은 scFv 및 다른 한쪽은 Fab을 포함하는 항-CD20 비대칭 항체를 이용할 경우 현저히 증가된 보체 의존 세포사멸능을 갖는다는 것을 발견하였다.
- [0030] 본 명세서에서 용어 "항체(antibody)"는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 포함하는, 항원을 특이적으로 인식하는 수용체 역할을 하는 단백질 분자를 의미하며 다클론항체 및 단클론항체를 모두 포함한다.
- [0031] 항체는 완전한 전장(full-length) 항체 형태뿐만 아니라 항체 분자의 항원 결합 단편(항체 단편)을 포함한다.

완전한 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조로서 각각의 경쇄는 중쇄와 이황화 결합으로 연결되어 있다. 중쇄 불변영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ϵ) 타입을 가지고 서브클래스로 감마1(γ 1), 감마2(γ 2), 감마3(γ 3), 감마4(γ 4), 알파1(α 1) 및 알파2(α 2)를 가진다. 경쇄의 불변영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다.

[0032] 본 명세서에서 용어 "항체의 항원 결합 단편"은 전체 항체 분자 내에서 항원을 특이적으로 인식하고 항원-항체 결합 기능을 보유하는 단편을 의미하며, 단일-도메인 항체(sdAb), 단일쇄 항체(scFv), Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다. 단편의 예로는, VL, VH, C κ (또는 CL) 및 CH1 도메인으로 구성된 1가 단편(Fab 단편); 힌지 영역에서 이황화물 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편(F(ab')₂ 단편); VH 및 CH1 도메인으로 구성된 Fd 단편; 항체의 하나의 암(arm)의 VL 및 VH 도메인, 및 이황화물-연결된 Fv(sdFv)로 구성된 Fv 단편; VH 도메인으로 구성된 dAb 단편; 및 분리된 상보성 결정 영역(CDR) 또는 링커에 의해 선택적으로 이어질 수 있는 둘 이상의 분리된 CDR의 조합을 포함한다. 또한, scFv는 VL과 VH 영역이 쌍을 이루어 1가 분자를 형성한 단일 단백질 사슬을 이루도록 링커에 의해 이어질 수 있다. 이러한 단일쇄 항체도 항체의 단편에 포함된다. 또한, 상기 항체 또는 항체의 단편은 2개의 중쇄 분자와 2개의 경쇄 분자를 포함하는 테트라머 항체; 항체 경쇄 모노머; 항체 중쇄 모노머; 항체 경쇄 다이머, 항체 중쇄 다이머; 인트라바디; 1가 항체; 낙타 항체; 및 단일-도메인 항체(sdAb)를 포함한다.

[0033] Fv는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 PCT 국제 공개특허출원 WO 88/10649, WO 88/106630, WO 88/07085, WO 88/07086 및 WO 88/09344에 개시되어 있다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역이 연결되어 있고 단쇄 Fv(single-chain Fv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변영역과 단쇄의 가변영역이 공유결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다), 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수도 있다.

[0034] 본 명세서에서 용어 "중쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 VH 및 3개의 불변영역 도메인 CH1, CH2 및 CH3을 포함하는 전체길이 중쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다. 또한, 본 명세서 용어 "경쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 VL 및 불변영역 도메인 C κ (또는 CL)를 포함하는 전체길이 경쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다.

[0035] 본 명세서에서, 용어 "CDR(complementarity determining region)"은 면역글로블린의 중쇄 및 경쇄의 고가변 영역(hypervariable region)의 아미노산 서열을 의미한다(Kabat *et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 4th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)). 중쇄(HCDR1, HCDR2 및 HCDR3) 및 경쇄(LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)에는 각각 3개의 CDR이 포함되어 있으며, 이들 CDR은 항체가 항원 또는 에피토프에 결합하는 데 있어서 주요한 접촉 잔기를 제공한다. 상기 CDR은 프레임워크 영역(FR)이라고 명명된 더 보존된 영역들에 산재된다. 각 VH 및 VL은 3개의 CDR과 4개의 FR로 이루어지며, 이들은 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4 순서로 아미노-말단에서 카복시-말단으로 배열된다.

[0036] 본 발명의 항체 또는 항체 단편의 범위에는 CDR 영역에 보존적 아미노산 치환을 갖는 변이체가 포함되며, CD20을 특이적으로 인식할 수 있는 범위 내에서 첨부한 서열목록에 기재된 아미노산 서열에 대한 변이체를 포함할 수 있다. 예를 들면, 항체의 결합 친화도 외에 반감기, 생체 적합성 기타 생물학적 특성을 보다 개선시키기 위하여 항체의 아미노산 서열에 추가적인 변화를 줄 수 있다. 이러한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명의 항체 또는 이를 코딩하는 핵산 분자는 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인 하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 열라인 된 서열을 분석한 경우에, 최소 61%의 상동성, 일 특정예에 따르면 70%의 상동성, 다른 특정예에 따르면 80%의 상동성, 또 다른 특정예에 따르면 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 열라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 열라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* (1981) 2:482 Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio.* (1970) 48:443; Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* (1988) 24: 307-31; Higgins and Sharp, *Gene* (1988) 73:237-44; Higgins and Sharp, *CABIOS* (1989) 5:151-3; Corpet *et al. Nuc. Acids Res.* (1988) 16:10881-90; Huang *et al. Comp. Appl.*

BioSci. (1992) 8:155-65 및 *Pearson et al. Meth. Mol. Biol.* (1994) 24:307-31에 개시되어 있다.

- [0037] 본 명세서에서 용어 "대칭 항체"는 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄를 가지는 항체가 한쪽 및 다른 쪽이 서로 대칭된 구조(예를 들어, 한쪽 및 다른 쪽이 동일한 경쇄 가변 영역 및 동일한 중쇄 가변 영역을 갖는 항체)를 갖는 항체를 의미한다.
- [0038] 본 명세서에서 용어 "비대칭 항체"는 상기 "대칭 항체"가 아닌 비대칭 구조의 항체를 의미한다. 예를 들어, 한쪽은 VL-링커-VH를 포함하는 단편(즉, scFv) 및 다른 한쪽은 VL-C κ (또는 CL)-링커-VH-CH1를 포함하는 단편(즉, Fab)을 포함할 수 있다. 또한, 한쪽은 Fab을 포함하는 단편 및 다른 한쪽은 Fab과 scFv를 포함하는 단편을 포함할 수 있다. 상기 비대칭 항체는 추가로 Fc 부위를 포함할 수도 있다. 예를 들어, 한쪽은 VL-링커-VH-CH2-CH3를 포함하는 단편 및 다른 한쪽은 VL-C κ (또는 CL)-링커-VH-CH1-CH2-CH3를 포함하는 단편을 포함하여 비 대칭 구조의 항체를 제작할 수도 있다.
- [0039] 본 명세서에서 용어 "친화도(affinity)"는 항체 또는 이의 항원결합 단편과 항원 간의 결합 강도를 의미하며, 이에 "결합력"으로도 표현될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 scFv는 서열번호 51의 경쇄 가변 영역 (VL) 서열을 포함한다.
- [0041] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 scFv는 서열번호 52의 중쇄 가변 영역 (VH) 서열을 포함한다.
- [0042] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 scFv는 서열번호 15의 LFR1, 서열번호 17의 LFR2, 서열번호 19의 LFR3, 서열번호 21의 LFR4, 서열번호 23의 HFR1, 서열번호 25의 HFR2, 서열번호 27의 HFR3 및 서열번호 29의 HFR4로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다.
- [0043] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 scFv는 VL-링커-VH 형태이다.
- [0044] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 링커는 Gly 및 Ser의 조합일 수 있다.
- [0045] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 Fab은 서열번호 53의 경쇄 가변 영역 (VL) 서열을 포함한다.
- [0046] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 Fab은 서열번호 54의 중쇄 가변 영역 (VH) 서열을 포함한다.
- [0047] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 Fab은 서열번호 32의 LFR1, 서열번호 34의 LFR2, 서열번호 36의 LFR3, 서열번호 38의 LFR4, 서열번호 41의 HFR1, 서열번호 43의 HFR2, 서열번호 45의 HFR3 및 서열번호 47의 HFR4로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다.
- [0048] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 Fab은 서열번호 39의 C κ (C kappa) 서열을 포함한다.
- [0049] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 Fab은 서열번호 48의 CH1 서열을 포함한다.
- [0050] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 VL-C κ -링커-VH-CH1 형태이다.
- [0051] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 링커는 Gly 및 Ser의 조합일 수 있다.
- [0052] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 비대칭 항체는 중쇄끼리의 원치 않는 쌍의 결합을 막기 위해 10 내지 100개, 보다 구체적으로는 15 내지 60개의 Gly과 Ser으로 구성된 링커를 사용할 수 있다.
- [0053] 구체적으로는, 본 발명의 이중특이적 항체는 CD20-scFv-knob(VL-linker20-VH-CH2-CH3)과 CD20-Fab-hole(VL-C κ -linker40-VH-CH1-CH2-CH3)이 결합된 형태일 수 있다.
- [0054] linker20은 상기 Gly 또는 Ser을 20개 포함하는 것으로, 이의 예로는 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ser을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0055] linker40은 상기 Gly 또는 Ser을 40개 포함하는 것으로, 이의 예로는 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Ser을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0057] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 전술한 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자를 제공한다.

- [0059] 본 명세서에서 용어 "핵산 분자"는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산 분자에서 기본 구성단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다(Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, (1990) 90:543-584). 본 발명의 중쇄 및 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자의 서열은 변형될 수 있다. 상기 변형은 뉴클레오타이드의 추가, 결실, 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다.
- [0060] 본 발명의 핵산 분자는 상기한 뉴클레오타이드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 뉴클레오타이드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인 된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 일 특정예에서는 최소 90%의 상동성, 다른 특정예에서는 최소 95%의 상동성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다.
- [0062] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 전술한 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0064] 본 명세서에서 용어 "벡터"는 상기 폴리뉴클레오타이드(핵산) 서열을 복제할 수 있는 세포로의 도입을 위해서 폴리뉴클레오타이드 서열을 삽입할 수 있는 전달체를 의미한다. 폴리뉴클레오타이드 서열은 외생(Exogenous) 또는 이종(Heterologous)일 수 있다. 벡터로서는 플라스미드, 코스미드 벡터 및 바이러스 벡터(레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-부속 바이러스 벡터 등)를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 당업자는 표준적인 재조합 기술에 의해 벡터를 구축할 수 있다(Maniatis, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988; 및 Ausubel et al., In: Current Protocols in Molecular Biology, John, Wiley & Sons, Inc, NY, 1994 등).
- [0065] 본 명세서에서 용어 "발현 벡터"는 전사되는 유전자 산물 중 적어도 일부분을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한 벡터를 의미한다. 일부의 경우에는 그 후 RNA 분자가 단백질, 폴리펩타이드, 또는 펩타이드로 번역된다. 발현 벡터에는 다양한 조절서열을 포함할 수 있다. 전사 및 번역을 조절하는 조절서열과 함께 벡터 및 발현 벡터에는 또 다른 기능도 제공하는 핵산 서열도 포함될 수 있다.
- [0067] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 전술한 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.
- [0069] 본 명세서에서 용어 "세포"는 진핵세포 및 원핵세포를 포함하며, 상기 벡터를 복제할 수 있거나 벡터에 의해 코딩되는 유전자를 발현할 수 있는 임의의 형질 전환 가능한 세포를 의미한다. 세포는 상기 벡터에 의해 형질감염(Transfected), 형질도입(Transduced) 또는 형질전환(Transformed) 될 수 있으며, 이는 외생의 폴리뉴클레오타이드(핵산분자)가 숙주세포 내에 전달되거나 도입되는 과정을 의미한다. 본 명세서에서 용어 "형질전환"은 상기 형질감염(Transfected) 및 형질도입(Transduced)을 포함하는 의미로 사용된다.
- [0070] 본 발명의(숙주)세포는 제한되지 않으나, 바람직하게는 곤충세포 또는 포유동물 세포, 보다 바람직하게는 곤충 세포의 경우 Sf9, 포유동물 세포의 경우 HEK293 세포, HeLa 세포, ARPE-19 세포, RPE-1 세포, HepG2 세포, Hep3B 세포, Huh-7 세포, C8D1a 세포, Neuro2A 세포, CHO 세포, MES13 세포, BHK-21 세포, COS7 세포, COP5 세포, A549 세포, MCF-7 세포, HC70 세포, HCC1428 세포, BT-549 세포, PC3 세포, LNCaP 세포, Capan-1 세포, Panc-1 세포, MIA PaCa-2 세포, SW480 세포, HCT166 세포, LoVo 세포, A172 세포, MKN-45 세포, MKN-74 세포, Kato-III 세포, NCI-N87 세포, HT-144 세포, SK-MEL-2 세포, SH-SY5Y 세포, C6 세포, HT-22 세포, PC-12 세포, NIH3T3 세포 등을 이용할 수 있다.
- [0071] 본 발명의 숙주세포는 바람직하게는 단리된 숙주세포이다.
- [0073] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 전술한 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자, 또는 상기 핵산분자를 포함하는 벡터를 유효성분으로 포함하는

암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

- [0075] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 전술한 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자, 또는 상기 핵산분자를 포함하는 벡터의 약제학적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [0077] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 전술한 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자, 또는 상기 핵산분자를 포함하는 벡터의 치료용도(for use in therapy)를 제공한다.
- [0078] 본 명세서에서 용어 "예방"은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸릴 가능성이 있는 대상체에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다.
- [0079] 본 명세서에서 용어 "치료"는 (a) 질환, 질병 또는 증상의 발전의 억제; (b) 질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c) 질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물을 대상체에 투여하면 CD20에 대하여 rituximab과 동등 수준의 결합력을 나타내며, rituximab 대비 유의미한 보체 활성화 및/또는 이로 인한 CDC 효과로 인하여 암세포의 증식을 억제하여 암의 진행을 저해하거나, 이로 인한 증상을 제거하거나 또는 경감시키는 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 그 자체로 암 치료용 조성물이 될 수도 있고, 혹은 다른 약리성분과 함께 투여되어 이의 치료 반응성을 향상시키는 치료 보조제로 적용될 수도 있다. 이에, 본 명세서에서 용어 "치료" 또는 "치료제"는 "치료 보조" 또는 "치료 보조제"의 의미를 포함한다.
- [0080] 본 명세서에서 용어 "투여" 또는 "투여하다"는 본 발명의 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다.
- [0081] 본 발명에서 용어 "치료적 유효량"은 본 발명의 약제학적 조성물을 투여하고자 하는 개체에게 조성물 내의 약리성분이 치료적 또는 예방적 효과를 제공하기에 충분한 정도로 함유된 조성물의 함량을 의미하며, 이에 "예방적 유효량"을 포함하는 의미이다.
- [0082] 본 명세서에서 용어 "대상체"는 제한없이 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함한다. 구체적으로는, 본 발명의 대상체는 인간이다.
- [0083] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료될 수 있는 암은 CD20 양성 암이다.
- [0084] CD20 양성 암은 예를 들어, 림프종, 백혈병 등의 혈액암 및 흑색종, 폐암, 갑상선암, 유방암, 대장암, 전립선암, 두경부암, 위암, 간장암, 방광암, 신장암, 자궁경부암, 췌장암, 난소암, 자궁경부암, 자궁내막세포암 등의 고형암을 포함하며, 바람직하게는 B 세포 비호지킨 림프종 (non-Hodgkin's lymphomas) (NHL), 여포성 림프종(follicular lymphoma), 확산 거대 B-세포 림프종(diffuse large B cell lymphoma), 외투세포 림프종(mantle cell lymphoma), 만성 림프성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia), 소림프구성 림프종[small lymphocytic lymphoma (SLL)], 변연부 림프종 [marginal zone lymphoma (MZL)], 림프구성 질세포성림프종 [Lymphoplasmacytic lymphoma (LDL)], 거대글로블린혈증 [Waldenstrom macroglobulinemia (WM)] 등을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0086] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 전술한 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자, 또는 상기 핵산분자를 포함하는 벡터를 유효성분으로 포함하는 암의 진단용 조성물을 제공한다.
- [0088] 본 발명에서 사용되는 항체 또는 그의 항원결합 단편과 대상이 되는 암에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0089] 본 명세서에서 용어 "진단"은 특정 질환에 대한 개체의 감수성(susceptibility)의 판정, 특정 질환을 현재 개체가 가지고 있는 지 여부의 판정, 및 특정 질환에 걸린 한 개체의 예후(prognosis)의 판정을 포함한다.
- [0090] CD20은 B 세포 림프종 및 만성 림프구성 백혈병과 같은 암 조직에서 정상수준에 비해 높은 발현 수준을 보이는

전형적인 암 진단 마커로서, CD20에 특이적으로 결합하는 본 발명의 항체는 생물학적 시료 내 종양의 존재를 정확하게 판정할 수 있다. 아울러, 본 발명의 항체는 다양한 면역 어세이 방법을 통해 종양 내 CD55의 발현 수준을 정확히 측정하여 해당 종양의 CDC 약물에 대한 치료 민감성을 예측함으로써, 암의 성격에 따른 맞춤형 치료 전략을 조기에 수립하는 데에 유용하게 이용될 수 있다.

- [0091] 본 명세서에서 용어 "진단용 조성물"은 대상체의 암 발병 여부를 판단하거나 CDC 약물에 대한 치료 민감성을 예측하기 위해 CD20 단백질의 발현량 측정수단으로서 본 발명의 항체를 포함하는 통합적인 혼합물(mixture) 또는 장비(device)를 의미하며, 이에 "진단용 키트"로 표현될 수도 있다.
- [0092] 본 명세서에서 용어 "생물학적 시료"란 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 뇨, 림프액, 척수액, 조직 부검 시료(뇌, 피부, 림프절, 척수 등), 세포 배양 상등액, 파열된 진핵세포 및 세균 발현계를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0093] 생물학적 시료에서 CD20 단백질의 검출은, 비색법(colormetric method), 전기화학법(electrochemical method), 형광법(fluorimetric method), 발광법(luminometry), 입자계수법(particle counting method), 육안측정법(visual assessment) 또는 섬광계수법(scintillation counting method)을 이용한 항원-항체 복합체 형성의 검출을 통하여 수행할 수 있다. 본 명세서에서 용어 "검출"은 항원-항체 복합체의 형성 여부를 판정하기 위한 일련의 과정을 의미한다. 검출은 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자 또는 방사성 동위원소를 포함하는 다양한 표지체를 사용하여 실시할 수 있다.
- [0094] 검출 표지체로서 사용되는 효소는 예를 들어 아세틸콜린에스테라제, 알칼라인 포스파타제, β -D-갈락토시다제, 호스래디쉬 퍼옥시다제 및 β -라타마제를 포함하며, 형광물로는 플루오레세인, Eu^{3+} , Eu^{3+} 킬레이트 또는 크립테이트 등을 포함하고, 리간드로는 바이오틴 유도체 등을 포함하며, 발광물로는 아크리디늄 에스테르 및 이소루미놀 유도체 등을 포함하고, 미소입자로는 콜로이드 금 및 착색된 라텍스 등을 포함하며, 방사성 동위원소로는 ^{57}Co , ^3H , ^{125}I 및 ^{125}I -볼톤(Bonton) 헌터(Hunter) 시약 등을 포함할 수 있다.
- [0095] 본 발명의 일구현예에 따르면, 항원-항체 복합체를 효소면역흡착법(ELISA)을 이용하여 검출할 수 있다. 본 발명의 항체는 검출 표지를 가질 수 있으며, 검출표지를 가지지 않을 경우는 본 발명의 항체를 포획할 수 있고 검출 표지를 가지는 또 다른 항체를 처리하여 확인할 수 있다.
- [0097] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 보체 의존 세포사멸능 (Complement Dependent Cytotoxicity, CDC)이 향상된 항-CD20 비대칭 항체 (asymmetric antibody) 또는 이의 항원 결합 단편의 제조방법을 제공한다:
- [0098] (a) 서열번호 16의 LCDR1, 서열번호 18의 LCDR2, 서열번호 20의 LCDR3, 서열번호 24의 HCDR1, 서열번호 26의 HCDR2 및 서열번호 28의 HCDR3 서열을 포함하는 scFv (Single-chain variable fragment)를 제조하는 단계; 및
- [0099] (b) 서열번호 33의 LCDR1, 서열번호 35의 LCDR2, 서열번호 37의 LCDR3, 서열번호 42의 HCDR1, 서열번호 44의 HCDR2 및 서열번호 46의 HCDR3 서열을 포함하는 Fab (Fragment antigen-binding)을 제조하는 단계.
- [0101] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 보체 의존 세포사멸능 (Complement Dependent Cytotoxicity, CDC)이 향상된 항-CD20 비대칭 항체 (asymmetric antibody) 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자의 제조방법을 제공한다:
- [0102] (a) 서열번호 16의 LCDR1, 서열번호 18의 LCDR2, 서열번호 20의 LCDR3, 서열번호 24의 HCDR1, 서열번호 26의 HCDR2 및 서열번호 28의 HCDR3 서열을 포함하는 scFv (Single-chain variable fragment)를 코딩하는 핵산분자를 제조하는 단계; 및
- [0103] (b) 서열번호 33의 LCDR1, 서열번호 35의 LCDR2, 서열번호 37의 LCDR3, 서열번호 42의 HCDR1, 서열번호 44의 HCDR2 및 서열번호 46의 HCDR3 서열을 포함하는 Fab (Fragment antigen-binding)을 코딩하는 핵산분자를 제조하는 단계.
- [0105] 본 발명의 비대칭 항체는 안정하게 회합할 수 있는 제 1 및 제 2 서브유닛으로 이루어진 Fc 영역을 포함할 수

있다. 본 명세서에서 용어 "Fc 영역"은 전장 항체의 불변 영역 중 적어도 일부분을 함유하는 항체 중쇄의 C-말단 영역을 의미하며, 이는 야생형 서열 Fc 영역과 변이체 Fc 영역을 모두 포함한다. IgG의 Fc 영역은 IgG CH2 및 IgG CH3 도메인을 포함한다. 본 발명의 비대칭 항체의 CH3 영역은 야생형 또는 변이체 CH3 도메인(예를 들어, 그의 한 쇠에 도입된 "돌출부"("뿔") 및 그의 다른 쇠에 상응하는 도입된 "공동(cavity)"("홀")을 갖는 CH3 도메인일 수 있다.

[0106] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 비대칭 항체는 중쇄끼리의 원치 않는 쌍의 결합을 막기 위해 뿔-인투 홀(knob-into-hole)방법을 사용할 수 있다. "뿔-인투-홀" 방법[US 5,731,168; US7,695,936; Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996); Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001)]은 이중이량체 생성을 촉진하고 동중이량체 생성을 저해하기 위해 돌출부가 공동에 위치할 수 있도록, 제 1 폴리펩타이드의 계면에 돌출부("뿔") 및 제 2 폴리펩타이드의 계면에 상응하는 공동("홀")을 도입한다. 돌출부는 제 1 폴리펩타이드의 계면으로부터 작은 아미노산 측쇄를 보다 큰 측쇄(예, 티로신 또는 트립토판)로 치환시킴으로써 구성된다. 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 측쇄(예, 알라닌 또는 트레오닌)로 치환시킴으로써, 돌출부와 동일하거나 유사한 크기의 상호보완적 공동이 제 2 폴리펩타이드의 계면에 생성된다.

[0107] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 비대칭 항체는 VL-linker-VH-CH2-CH3 형태의 scFv 및 VL-C_K-linker-VH-CH1-CH2-CH3 형태의 Fab이 결합된 형태일 수 있다.

발명의 효과

[0109] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0110] (i) 본 발명은 한쪽은 scFv (Single-chain variable fragment) 및 다른 한쪽은 Fab (Fragment antigen-binding)을 포함하는, 보체 의존 세포사멸능 (Complement Dependent Cytotoxicity, CDC)이 향상된 항-CD20 비대칭 항체 (asymmetric antibody) 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0111] (ii) 본 발명의 비대칭 항체는 대칭구조의 항체와 비교하여 현저히 향상된 보체 의존 세포사멸능 (Complement Dependent Cytotoxicity, CDC)을 나타내는 바, 리툽시맙 등의 항암제에 내성이 유도된 다양한 질환에서 약물의 내성을 근원적으로 제거하고 치료 반응성을 현저히 개선시키는 효율적인 치료제 또는 치료 보조제로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0113] 도 1은 IgG와 비대칭 형태의 항체의 모식도를 나타낸다.

도 2는 비대칭 형태의 anti-CD20 항체의 SDS-PAGE 분석 결과이다.

도 3은 비대칭 형태의 anti-CD20 항체의 CD20에 대한 친화도 분석 ELISA 결과이다.

도 4는 rituximab과 비대칭 형태의 anti-CD20 항체의 보체 활성능을 C4d 농도 측정으로 비교한 ELISA 결과이다.

도 5는 rituximab에 대한 내성을 나타내는 Ramos-RR 세포에서 rituximab과 비대칭 형태의 anti-CD20 항체의 CDC 효과를 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0114] 이하, 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0116] 실시예

[0117] 실시예 1. 동물 세포 발현을 위한 비대칭 형태의 anti-CD20 항체 클로닝

[0118] 비대칭 형태의 anti-CD20 항체는 중쇄끼리의 원하지 않는 pair와 결합하는 것을 막기 위해 knob-into-hole 기법

을 사용하였으며, 경쇄끼리의 잘못된 결합을 막기 위해서는 Gly과 Ser으로 구성된 linker를 사용하였다. CD20-scFv-knob (VL-linker20-VH-CH2-CH3) 과 CD20-Fab-hole (VL-C_κ-linker40-VH-CH1-CH2-CH3) 형태로 각각 클로닝을 진행하였으며, CD20-scFv-knob의 경우에는 Drug Data Bank에 나온 Rituximab sequence를 토대로 표 1의 프라이머 조합을 이용하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 유전체는 *Bss*HII 와 *Xba*I (New England Biolab, 영국) 효소를 처리하였고, 마찬가지로 동일한 제한효소로 처리된 동물세포 발현용 벡터인 pMAZ 벡터에 라이게이션하였다. 라이게이션이 완료된 플라스미드는 DH5α competent cell (New England Biolab, 영국)에 열충격을 가하여 형질전환 하였고, 확보한 콜로니를 대량 배양하여 플라스미드를 수득하였다.

[0119] CD20-Fab-hole (VL-C_κ-linker40-VH-CH1-CH2-CH3) 형태를 만들기 위해서는 CD20-scFv-knob와 마찬가지로 Drug Data Bank에 나온 Rituximab sequence를 토대로 표 2의 프라이머 조합을 이용해서 PCR을 수행하였다. 증폭된 유전체는 *Bss*HII와 *Xba*I 효소를 처리하였고, 마찬가지로 동일한 제한효소로 처리된 동물세포 발현용 벡터인 pMAZ 벡터에 라이게이션 하였다. 라이게이션이 완료된 플라스미드는 DH5α competent cell (New England Biolab, 영국)에 열충격을 가하여 형질전환 하였고, 확보한 콜로니를 대량 배양하여 플라스미드를 수득하여 sequence 분석(표 3)을 완료하였다.

표 1

[0121] CD20-scFv-knob 클로닝 시 사용되는 프라이머 리스트

	프라이머	서열	
V _L	정방향	CGC AGC GAG CGC GCA CTC CCA GAT CGT CCT GAG TCA GAG CC	서열번호 1
	역방향	AGA GCC GCC AGA TCC ACT GCC TCC TCC ACC GCT ACC GCC ACC ACC ACT CCC GCC TCC GCC CTT AAT CTC CAA TTT AGT TCC CCC GC	서열번호 2
V _H	정방향	GCA GTG GAT CTG GCG GCT CTC AGG TCC AGC TCC AAC AGC CC	서열번호 3
	역방향	GGT GGG CAT GTG TGA GTT TTG TCT GAG CCG CCA GCA CTC ACC GTC ACA GTG GTA C	서열번호 4
C _H	정방향	GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CC	서열번호 5
	역방향	CTC TCC CTG TCC CCG GGT AAA TGA CTA GAA CTA	서열번호 6

표 2

[0122] CD20-Fab-hole 클로닝 시 사용되는 프라이머 리스트

	프라이머	서열	
V _L - C _κ	정방향	CGC AGC GAG CGC GCA CTC CCA GAT TGT CCT GTC TCA GTC TCC TGC	서열번호 7
	역방향	CGG CCG CCG TGC GAG ATC TTT TGA TTT CCA GTT TAG TTC CGC CG	서열번호 8
V _H	정방향	CAA GTC CAA CTG CAA CAA CCG GG	서열번호 9
	역방향	GGA AGA CCG ATG GGC CCT TGA AGC TAG CGG CGG AAA CCG TTG TGC CAG AG	서열번호 10
C _H	정방향	GCA AGC TTC AAG GGC	서열번호 11
	역방향	CTC TCC CTG TCC CCG GGT AAA TGA CTA GAA CTA	서열번호 12

표 3

[0123] CD20-scFv-knob과 CD20-Fab-hole의 아미노산 서열

	아미노산	
CD20-scFv-knob	QIVLSQSPAILASAPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFFQKPGSSPKPIYATSNLASGVP VRFSGSGSGTSYSLTISRVEADAATYYCQWTSNPPTFGGGTKLEIKGGGSGGGGS GGGSGSGGSQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWI GAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDW YFNWVGAGTTVTVSAGGSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	서열번호 13

CD20-Fab-hole	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWYIATSNLASGVP VRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQWTSNPPTFGGGTKLEIKRSRTAAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY SLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGSGGGSGGS GGSGGGSGGGSGGGSGSSQVQLQQPAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMH WVKQTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAV YYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTSAASFSGKPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	서열번호 14
---------------	--	---------

[0125] **실시예 2. 동물세포에서 발현 및 정제**

[0126] 비대칭 형태의 anti-CD20 항체는 서열번호 13 및 14의 서열을 이용하여 각각의 플라스미드를 Polyethylenimine (PEI) (Polysciences, 미국)와 150 mM NaCl을 이용하여 HEK293F 세포 (Invitrogen, 미국)에 transfection 시키고 Freestyle 293 expression medium (Invitrogen, 미국)에서 37℃의 온도, 8% CO₂ 그리고 55% Humidity 조건으로 7일간 배양하였다. 발현 세포 배양액을 4,000 rpm, 10분간 원심분리한 후, 상등액을 취해 0.22 μm filter를 통해 여과하였다. 여과된 상등액은 4℃에서 KappaSelect (GE Healthcare, 미국) 레진 1 ml에 결합 유도하였다. 결합된 resin은 10 cv (column volume)의 PBS 용액으로 세척 후, 100 mM glycine-HCl (pH 2.7) 용액을 사용하여 결합된 항체를 용출한 후, 1 M Tris-HCL (pH 9.0)으로 중화하였다. pH 7.2~7.4 PBS로 buffer change 진행 후 SDS-PAGE를 통해 정제된 항체의 경쇄와 중쇄의 크기와 순도를 확인하였고 그 결과 이론적 계산치와 일치하는 분자량과 높은 순도를 확인할 수 있었다 (도 2).

[0127] 비대칭 형태의 anti-CD20 항체는 한쪽의 결합부위가 Fab이고 다른 한쪽의 결합부위가 scFv인 hetero form이다. Fab의 C kappa 부분을 이용하여 KappaSelect 로 정제를 하면 이중항체 정제 시 생성 가능성이 가장 높다고 알려진 knob-knob homodimer 또는 knob monomer (Giese, et al., Bispecific antibody process development: Assembly and purification of knob and hole bispecific antibodies. Biotechnol Prog, 34(2)397-404)의 생성을 억제하고 원하는 형태인 heterodimer만은 얻을 수 있다.

[0129] **실시예 3. ELISA를 통한 비대칭 형태의 anti-CD20 항체의 CD20 결합력 확인**

[0130] 상기 실시예 2에서 제작한 비대칭 형태의 anti-CD20 항체가 타겟하는 항원인 CD20에 대한 친화도를 indirect ELISA로 확인하였다.

[0131] Indirect ELISA는 50 μl의 PBS에 1 ug/ml로 CD20 ectodomain loop 영역 항원을 희석하여 96웰 면역 플레이트 (Corning, 미국)에 넣고, 4℃에서 보관하여 밤새 흡착시켰다. 4% skim milk (BD, 미국)가 포함된 완충용액으로 상온에서 1시간 반응시킨 후, 0.5% Tween 20 (Amresco, 미국)이 포함된 완충용액으로 3회 세척하고, 순차적 농도 (0.1, 0.3, 1, 3, 11, 33, 100 nM)로 희석한 각각의 항체를 웰 당 50 μl씩 처리하였다. 항원에 항체가 결합할 수 있도록 상온에서 2시간 반응시킨 후, 0.5% Tween 20 (Amresco, 미국)이 포함된 완충용액으로 3회 세척하였다. 항-인간 면역글로불린 Fc-HRP 항체 (Jackson Immunoresearch, 미국)를 1:3,000으로 2% skim milk (BD, 미국)가 포함된 완충용액을 이용하여 희석하고 웰 당 50 μl씩 처리한 후, 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 0.5% Tween 20 (Amresco, 미국)이 포함된 완충용액으로 3회 세척한 후, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (ThermoFisher Scientific, 미국) 50 μl씩 넣고 10분간 발색 시켰다. 분광 광도계 (Biotek, 미국)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 그 결과를 도 3에 나타내었다. 그 결과, 비대칭 형태의 anti-CD20 항체는 CD20에 대하여 rituximab과 동등 수준의 결합력을 나타냈다.

[0133] **실시예 4. C4d ELISA를 통한 비대칭 형태의 anti-CD20 항체의 보체 활성화 확인**

[0134] 상기 실시예 2에서 제작한 비대칭 형태의 anti-CD20 항체의 보체 활성능을 C4d ELISA를 통하여 확인하였다. C4d는 보체 고전 경로의 활성화에 대한 marker로 (Cohen, et al., Pros and cons for C4d as a biomarker.

Kidney Int., 81(7)628-39) C4d 농도 측정으로 보체 활성화 확인이 가능하다.

[0135] 먼저 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 Rituximab 또는 비대칭 형태의 anti-CD20 항체 10 μl 를 1 mg/ml 농도의보체 (Quidel, 미국) 90 μl 1시간 반응시킨 후, 10배 희석하여 MicroVue Complement C4d Fragment EIA kit (Quidel, 미국)를 이용하여 C4d 농도를 확인하여 그 결과를 도 4에 나타내었다. 그 결과 비대칭 형태의 anti-CD20 항체는 보체 의존 세포사멸 (Complement Dependent Cytotoxicity, CDC)이 주요 치료 기작인 rituximab에 비하여 C4d 농도를 증가시켰다. 이는 비대칭 형태의 anti-CD20 항체의 보체 활성화능이 rituximab에 비하여 우수함을 의미한다.

[0137] **실시예 5. Rituximab 내성 세포주인 Ramos-RR에서 비대칭 형태의 anti-CD20 항체의 CDC 효과 확인**

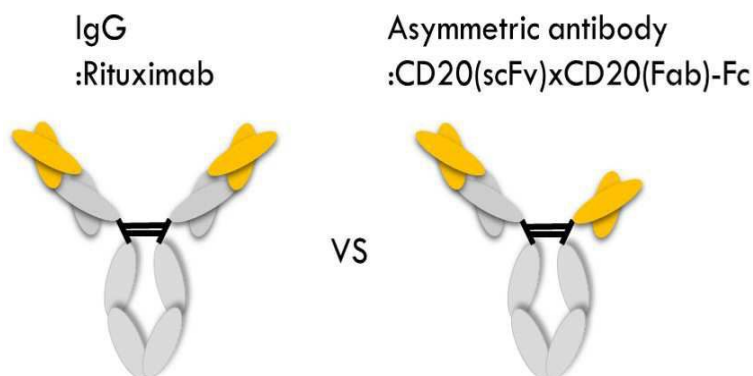
[0138] Rituximab에 대한 내성을 나타내는 Ramos-RR에서 rituximab과 비대칭 형태의 anti-CD20 항체의 CDC 효과를 확인하였다. 샘플 당 5×10^5 개의 Ramos-RR 세포에 rituximab 또는 비대칭 형태의 anti-CD20 항체를 각각 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도가 되도록 20% complement sera human (Sigma, 미국)이 첨가된 RPMI 배지로 희석하여 최종 100 μl 를 처리한 후, $37^\circ\text{C}/5\%/\text{CO}_2$ 조건에서 2시간 동안 배양하였다. 그 후, FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD (BioLegend, 미국)를 이용하여 FACS 분석 장비인 Attune NxT (ThermoFisher Scientific, 미국)로 사멸 세포를 확인하여 CDC를 관찰하였다 (도 5). Ramos-RR 세포는 rituximab에 대한 CDC 효과가 낮았으나, 비대칭 형태의 anti-CD20 항체는 그 효과를 증가시켰다.

[0139] 이러한 결과는 IgG 항체에 비하여 비대칭 형태의 항체가 보체를 효과적으로 활성화하여 CDC를 효과적으로 유도하는 것을 보여주며, CDC가 주요 치료 기작인 암 치료용 항체의 경우 비대칭 형태의 항체가 암 치료에 더 유리함을 의미한다.

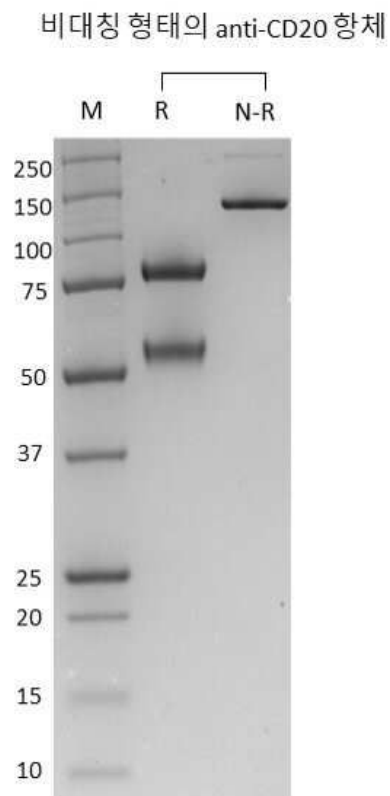
[0141] 이상, 본 발명의 실시예들에 대하여 설명하였으나, 해당 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 특허청구범위에 기재된 본 발명의 사상으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서, 구성 요소의 부가, 변경, 삭제 또는 추가 등에 의해 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있을 것이며, 이 또한 본 발명의 권리범위 내에 포함된다고 할 것이다.

도면

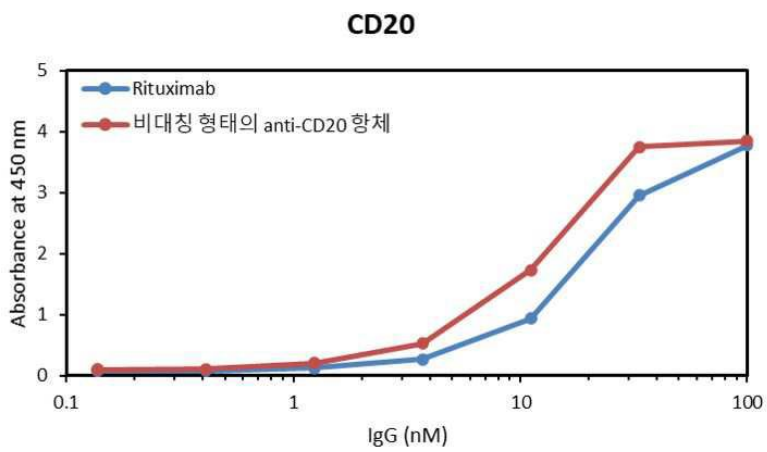
도면1



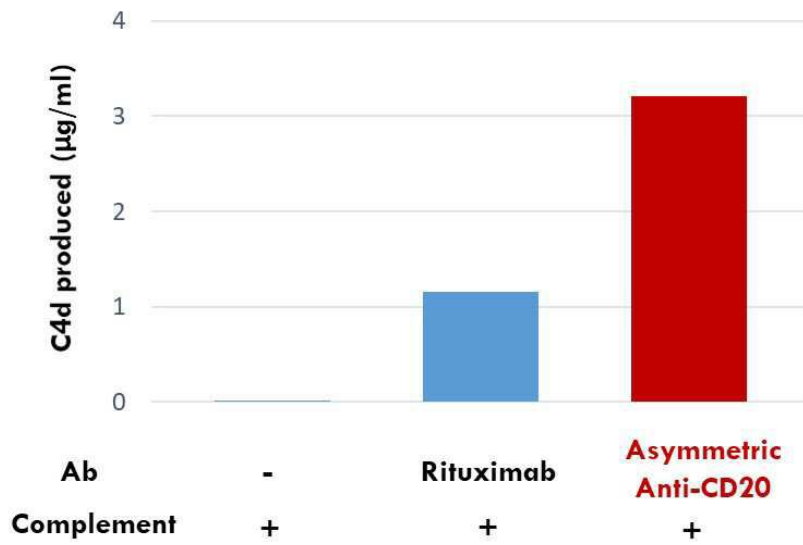
도면2



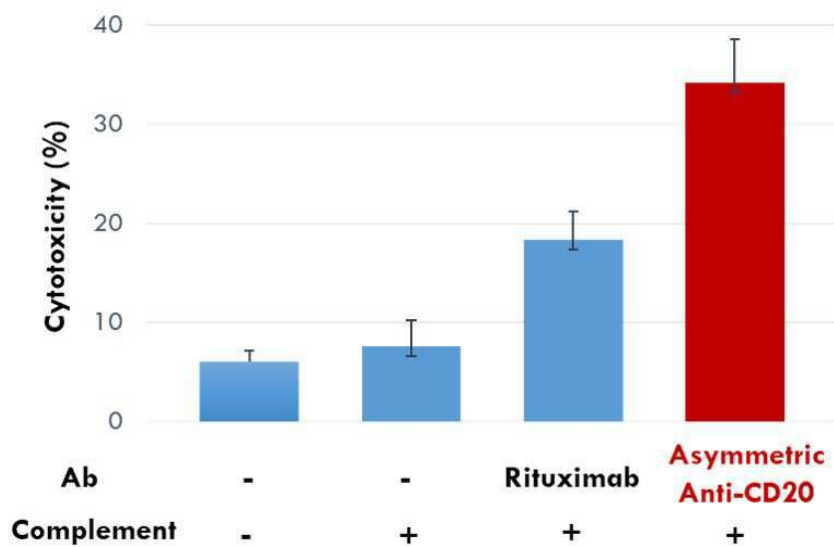
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> SG Medical, Inc.
- <120> Asymmetric antibody with enhanced target cell clearance
- <130> HPC-10589
- <150> KR 10-2021-005092
- <151> 2021-04-20
- <160> 54
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1

<211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL Primer (F) CD20-scFv-knob
 <400> 1
 cgcagcgagc ggcactccc agatcgctct ggtcagagc c 41
 <210> 2
 <211> 86
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL Primer (R) CD20-scFv-knob
 <400> 2
 agagccgcca gatccactgc ctctccacc gctaccgcca ccaccactcc cgctccgcc 60
 cttaatctcc aatttagttc ccccg 86
 <210> 3
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH Primer (F) CD20-scFv-knob
 <400> 3
 gcagtggatc tggcggctct caggtccagc tccaacagcc c 41
 <210> 4
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH Primer (R) CD20-scFv-knob
 <400> 4
 ggtgggcatg tgtgagtttt gtctgagccg ccagactca ccgtcacagt ggtac 55
 <210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CH Primer (F) CD20-scFv-knob

<400>	5	
gacaaaactc acacatgccc acc		23
<210>	6	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CH Primer (R) CD20-scFv-knob	
<400>	6	
ctctccctgt ccccggttaa atgactagaa cta		33
<210>	7	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	VL- CK Primer (F) CD20-Fab-hole	
<400>	7	
gcgagcgagc gcgcactccc agattgtcct gtctcagtct cctgc		45
<210>	8	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	VL- CK Primer (R) CD20-Fab-hole	
<400>	8	
cggccgcgt gcgagatctt ttgatttcca gtttagttcc gccg		44
<210>	9	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	VH Primer (F) CD20-Fab-hole	
<400>	9	
caagtccaac tgcaacaacc ggg		23
<210>	10	
<211>	50	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Primer (R) CD20-Fab-hole

<400> 10

ggaagaccga tgggcccttg aagctagcgg cggaaccgt tgtgccagag 50

<210> 11

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CH Primer (F) CD20-Fab-hole

<400> 11

gcaagcttca agggc 15

<210> 12

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CH Primer (R) CD20-Fab-hole

<400> 12

ctctccctgt ccccggttaa atgactagaa cta 33

<210> 13

<211> 477

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD20-scFv-knob

<400> 13

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile

20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu

65						70						75						80	
Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Thr	Ser	Asn	Pro	Pro	Thr				
					85					90					95				
Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly				
					100					105					110				
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gln	Val				
					115					120					125				
Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val				
					130					135					140				
Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	Asn	Met				
					145					150					155				
His	Trp	Val	Lys	Gln	Thr	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Ala				
					165					170					175				
Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly				
					180					185					190				
Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln				
					195					200					205				
Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg				
					210					215					220				
Ser	Thr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asn	Val	Trp	Gly	Ala	Gly				
					225					230					235				
Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Gly	Gly	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys				
					245					250					255				
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu				
					260					265					270				
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu				
					275					280					285				
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys				
					290					295					300				
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys				
					305					310					315				
320																			

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu

325 330 335

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys

340 345 350

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

355 360 365

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser

370 375 380

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys

385 390 395 400

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln

405 410 415

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly

420 425 430

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

435 440 445

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

450 455 460

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

465 470 475

<210> 14

<211> 706

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD20-Fab-hole

<400> 14

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile

20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Arg Thr Ala 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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 210 215 220
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Ser Gln
 245 250 255
 Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
 260 265 270
 Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn
 275 280 285

Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly
290 295 300

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
305 310 315 320

Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
325 330 335

Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
340 345 350

Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly Ala
355 360 365

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Phe Lys Gly Pro Ser Val
370 375 380

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
385 390 395 400

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
405 410 415

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
420 425 430

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
435 440 445

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
450 455 460

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
465 470 475 480

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
485 490 495

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
500 505 510

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
515 520 525

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
530 535 540

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

545 550 555 560

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

565 570 575

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

580 585 590

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

595 600 605

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

610 615 620

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

625 630 635 640

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

645 650 655

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp

660 665 670

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

675 680 685

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

690 695 700

Gly Lys

705

<210> 15

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LFR1 of CD20-scFv-knob

<400> 15

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys

20

<210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LCDR1 of CD20-scFv-knob
 <400> 16

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His
 1 5 10

<210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LFR2 of CD20-scFv-knob
 <400> 17

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LCDR2 of CD20-scFv-knob
 <400> 18

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

<210> 19
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LFR3 of CD20-scFv-knob
 <400> 19

Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR3 of CD20-scFv-knob

<400> 20

Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr

1 5

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LFR4 of CD20-scFv-knob

<400> 21

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 22

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker of CD20-scFv-knob

<400> 22

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Ser Gly Gly Ser

20

<210> 23

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HFR1 of CD20-scFv-knob

<400> 23

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR1 of CD20-scFv-knob

<400> 24

Ser Tyr Asn Met His

1 5

<210> 25

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HFR2 of CD20-scFv-knob

<400> 25

Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR2 of CD20-scFv-knob

<400> 26

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

1 5 10 15

Gly

<210> 27

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HFR3 of CD20-scFv-knob

<400> 27

Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR3 of CD20-scFv-knob

<400> 28

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

1 5 10

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HFR4 of CD20-scFv-knob

<400> 29

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala

1 5 10

<210> 30

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CH2 of CD20-scFv-knob

<400> 30

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

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

85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 115 120

<210> 31

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CH3 of CD20-scFv-knob

<400> 31

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 1 5 10 15
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe

20 25 30
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

35 40 45
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 32
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LFR1 of CD20-Fab-hole
 <400> 32
 Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
 20

<210> 33
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LCDR1 of CD20-Fab-hole

<400> 33
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His
 1 5 10

<210> 34
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LFR2 of CD20-Fab-hole

<400> 34
 Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 35
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LCDR2 of CD20-Fab-hole

<400> 35
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 36
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LFR3 of CD20-Fab-hole
 <400> 36
 Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 <210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LCDR3 of CD20-Fab-hole
 <400> 37
 Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr

1 5

<210> 38
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LFR4 of CD20-Fab-hole
 <400> 38
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 39
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ckappa of CD20-Fab-hole
 <400> 39

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 40

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker of CD20-Fab-hole

<400> 40

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30

Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Ser
 35 40

<210> 41

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HFR1 of CD20-Fab-hole

<400> 41

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 42

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR1 of CD20-Fab-hole

<400> 42

Ser Tyr Asn Met His

1 5

<210> 43

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HFR2 of CD20-Fab-hole

<400> 43

Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR2 of CD20-Fab-hole

<400> 44

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

1 5 10 15

Gly

<210> 45

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HFR3 of CD20-Fab-hole

<400> 45

Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 46

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR3 of CD20-Fab-hole

<400> 46

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

1 5 10

<210> 47

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HFR4 of CD20-Fab-hole

<400> 47

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala

1 5 10

<210> 48

<211> 103

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CH1 of CD20-Fab-hole

<400> 48

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 100

<210> 49
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CH2 of CD20-Fab-hole
 <400> 49

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 115 120

<210> 50

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CH3 of CD20-Fab-hole

<400> 50

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp

1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe

20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

50 55 60

Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 51

<211> 106

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><223> VL of CD20-scFv-knob

<400> 51

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile

20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50

55

60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu

65

70

75

80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr

85

90

95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 52

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH of CD20-scFv-knob

<400> 52

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala

115

120

<210> 53

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL of CD20-Fab-hole

<400> 53

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile

20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 54

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH of CD20-Fab-hole

<400> 54

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95
Ala	Arg	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asn	Val	Trp	Gly
				100					105				110		
Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ala							
				115				120							