



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년03월26일

(11) 등록번호 10-2231723

(24) 등록일자 2021년03월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/64 (2017.01) **A61K 39/00** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) **A61K 47/68** (2017.01)
C07K 16/30 (2006.01) **C07K 16/32** (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 47/642 (2017.08)
A61K 39/39558 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7028135(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2013년08월05일
 심사청구일자 2020년09월29일
- (85) 번역문제출일자 2020년09월29일
- (65) 공개번호 10-2020-0118220
- (43) 공개일자 2020년10월14일
- (62) 원출원 특허 10-2015-7003238
 원출원일자(국제) 2013년08월05일
 심사청구일자 2018년08월01일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2013/066351
- (87) 국제공개번호 WO 2014/023679
 국제공개일자 2014년02월13일
- (30) 우선권주장
 12179473.9 2012년08월07일
 유럽특허청(EPO)(EP)
- (56) 선행기술조사문헌
 WO2011001276 A1
 WO2012107416 A2
 WO2012146628 A1
- (73) 특허권자
 로슈 글리카트 아게
 스위스 솔리렌-취리히 체하-8952 바기슈트라세 18
- (72) 발명자
 거데스 크리스찬
 스위스 체하-8703 에렌마흐/제호 산드펠센스트라
 세 4
 클라인 크리스찬
 스위스 체하-8906 본스테텐 크뤼자헤르베크 41
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 제일특허법인(유)

전체 청구항 수 : 총 22 항

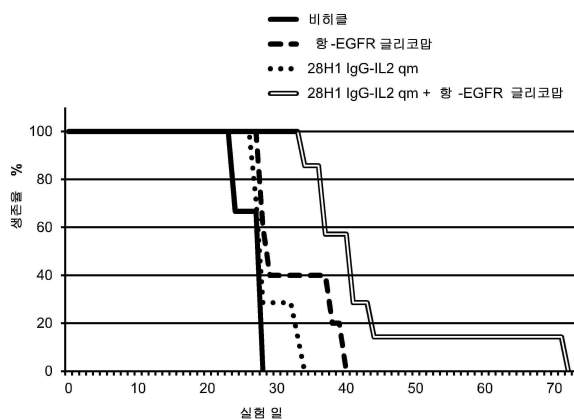
심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 감소된 및 증가된 효과기 기능을 갖도록 조작된 2개의 항체를 포함하는 조성물

(57) 요약

본 발명은 질환의 치료를 필요로 하는 개체에서 질환을 치료하는데 사용되는, (a) 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제1 항체 및 효과기 잔기를 포함하는 면역접합체와 (b) 증가된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제2 항체의 조합물을 제공한다. 상기 조합물을 포함하는 약학 조성물 및 이를 사용하는 방법도 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 47/6849 (2017.08)

A61K 47/6853 (2017.08)

C07K 16/30 (2013.01)

C07K 16/32 (2013.01)

A61K 2039/507 (2013.01)

C07K 2317/41 (2013.01)

C07K 2317/71 (2013.01)

C07K 2317/72 (2013.01)

C07K 2317/732 (2013.01)

(72) 발명자

니콜리니 발레리아 지

스위스 체하-8703 에렌바흐/제호 산드펠센스트라쎄

4

우마나 파블로

스위스 체하-8832 볼레라우 펠센라인스트라쎄 28

명세서

청구범위

청구항 1

개체에서 암배아 항원(CEA) 발현 또는 섬유모세포 활성화 단백질(FAP) 발현 암을 치료하기 위한 약학 조성물로서,

(a) (i) CEA 항원 또는 FAP 항원에 특이적으로 결합하는 제1 전장 IgG 항체로서, 인간 IgG Fc 영역을 포함하고, 상응하는 비-조작된 항체와 비교시 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작되고, EU 넘버링에 따른 S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D, P331S 및 P329G로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 치환을 중쇄에 포함하는 제1 전장 IgG 항체, 및

(ii) 돌연변이체 인터류킨-2(IL-2) 효과기 잔기로서, 서열번호 1의 아미노산 잔기 위치에 따른 아미노산 치환 F42A, Y45A 및 L72G를 포함하는 인간 IL-2인 돌연변이체 IL-2 효과기 잔기

를 포함하는 면역접합체, 및

(b) 표피 성장인자 수용체(EGFR)에 특이적으로 결합하는 제2 전장 IgG 항체로서, 세특시맙인 제2 전장 IgG 항체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

제1 전장 IgG 항체가 IgG₁ 항체인, 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

돌연변이체 IL-2 효과기 잔기가 제1 전장 IgG 항체와 아미노-말단 또는 카복시-말단 펩티드 결합을 공유하는, 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

제1 전장 IgG 항체가, 활성화 Fc 수용체와의 감소된 결합을 갖거나 인간 Fc γ RIIIa와의 감소된 결합을 갖도록 조작되는, 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

제1 전장 IgG 항체가 EU 넘버링에 따른 면역글로불린 중쇄의 위치 P329에서 아미노산 치환을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

제1 전장 IgG 항체가 EU 넘버링에 따른 면역글로불린 중쇄 내에 아미노산 치환 L234A, L235A 및 P329G를 포함하는, 약학 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

면역접합체가 돌연변이체 IL-2 효과기 잔기 및 제1 전장 IgG 항체로 본질적으로 구성되고, 이때 상기 돌연변이

체 IL-2 효과기 잔기가 그의 아미노-말단 아미노산에서 상기 제1 전장 IgG 항체의 중쇄들 중 한 중쇄의 카복시-말단에, 임의적으로 펩티드 연결제를 통해, 융합되는, 약학 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

효과기 기능이 활성화 Fc 수용체와의 결합, 항체 의존적 세포-매개된 세포독성(ADCC), 항체 의존적 세포성 식세포작용(ADCP), 보체 의존적 세포독성(CDC) 및 사이토카인 분비로 구성된 군으로부터 선택되는, 약학 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

효과기 기능이 활성화 Fc 수용체와의 결합 및/또는 ADCC인, 약학 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

개체가 인간인, 약학 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서,

제1 전장 IgG 항체가 서열번호 114의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열번호 115의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서,

제1 전장 IgG 항체가

- (a) 서열번호 12의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열번호 11의 경쇄 가변 영역 서열;
 - (b) 서열번호 17의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열번호 16의 경쇄 가변 영역 서열;
 - (c) 서열번호 47의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열번호 46의 경쇄 가변 영역 서열;
 - (d) 서열번호 63의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열번호 62의 경쇄 가변 영역 서열; 또는
 - (e) 서열번호 67의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열번호 66의 경쇄 가변 영역 서열
- 을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서,

돌연변이체 IL-2가 서열번호 1의 아미노산 잔기 위치에 따른 위치 3에 상응하는 위치에서 IL-2의 O-글리코실화 부위를 제거하는 아미노산 돌연변이를 추가로 포함하는, 약학 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서,

추가 아미노산 돌연변이가 쓰레오닌 잔기를 알라닌 잔기로 교체하는 아미노산 치환인, 약학 조성물.

청구항 15

제1항에 있어서,

돌연변이체 IL-2가 서열번호 2의 서열을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 16

제1항에 있어서,

암이 폐암, 대장암, 신장암 및 두경부암으로 구성된 군으로부터 선택되는, 약학 조성물.

청구항 17

제1항에 있어서,

제1 전장 IgG 항체가 CEA에 결합하고,

- a) 중쇄 가변 도메인 내에 서열번호 108의 CDR1, 서열번호 109의 CDR2 및 서열번호 110의 CDR3을 포함하고,
- b) 경쇄 가변 도메인 내에 서열번호 111의 CDR1, 서열번호 112의 CDR2 및 서열번호 113의 CDR3을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 18

제1항에 있어서,

제1 전장 IgG 항체의 인간 IgG Fc 영역이 인간 IgG1 Fc 영역인, 약학 조성물.

청구항 19

암배아 항원(CEA) 발현 또는 섬유모세포 활성화 단백질(FAP) 발현 암을 갖는 개체에서 효과기 세포 기능을 자극하기 위한 약학 조성물로서,

(a) (i) CEA 항원 또는 FAP 항원에 특이적으로 결합하는 제1 전장 IgG 항체로서, 인간 IgG Fc 영역을 포함하고, 상응하는 비-조작된 항체와 비교시 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작되고, EU 넘버링에 따른 S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D, P331S 및 P329G로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 치환을 중쇄에 포함하는 제1 전장 IgG 항체, 및

(ii) 돌연변이체 인터류킨-2(IL-2) 효과기 잔기로서, 상기 돌연변이체 IL-2 효과기가 서열번호 1의 아미노산 잔기 위치에 따른 아미노산 치환 F42A, Y45A 및 L72G를 포함하는 인간 IL-2인, 돌연변이체 IL-2 효과기 잔기를 포함하는 면역집합체, 및

(b) 표피 성장인자 수용체(EGFR)에 특이적으로 결합하는 제2 전장 IgG 항체로서, 세록시맙인 제2 전장 IgG 항체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서,

제1 전장 IgG 항체가 CEA에 결합하고,

- a) 중쇄 가변 도메인 내에 서열번호 108의 CDR1, 서열번호 109의 CDR2 및 서열번호 110의 CDR3을 포함하고,
- b) 경쇄 가변 도메인 내에 서열번호 111의 CDR1, 서열번호 112의 CDR2 및 서열번호 113의 CDR3을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 21

제19항에 있어서,

제1 전장 IgG 항체가 서열번호 114의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열번호 115의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 22

제19항에 있어서,

돌연변이체 IL-2가 서열번호 2의 서열을 포함하는, 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 면역치료에 관한 것이다. 보다 특히, 본 발명은 면역치료제로서 조합 사용되는 항원-표적화된 면역접합체 및 Fc-조작된 항체에 관한 것이다. 추가로, 본 발명은 상기 면역접합체와 항체의 조합물을 포함하는 약학 조성물, 및 질환의 치료에 있어서 이를 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 개별 세포 또는 특정 유형의 세포의 선택적 파괴는 종종 다양한 임상 현장에서 바람직하다. 예를 들면, 암 치료의 일차 목적은 건강한 세포 및 조직을 온전한 무손상 상태로 남겨두면서 종양 세포를 특이적으로 파괴하는 것이다.

[0003] 이를 달성하는 흥미로운 방법은 면역 효과기 세포, 예컨대, 천연 살해(NK) 세포 또는 세포독성 T 림프구(CTL)가 종양 세포를 공격하여 파괴하도록 종양에 대한 면역 반응을 유도하는 것이다. 효과기 세포는 면역 세포의 표면 상의 그들의 수용체와의 결합을 통해 신호전달 사건을 유도하는 다수의 사이토카인을 포함하는 다양한 자극들에 의해 활성화될 수 있다. 예를 들면, 특히 세포독성 T 세포 및 NK 세포의 증식 및 활성화를 자극하는 인터류킨-2(IL-2)는 전이성 신장세포암종 및 악성 흑색종의 치료용으로 승인되었다. 그러나, 신속한 혈액 제거 및 종양 특이성의 결여는 면역 반응을 활성화시키거나 항-종양 효과를 갖도록 종양 부위에서 충분히 높은 농도의 사이토카인을 달성하기 위해서는 고용량의 사이토카인의 전신 투여를 필요로 한다. 사이토카인의 이러한 높은 전신 수준은 심각한 독성 및 불리한 반응을 야기할 수 있고, IL-2의 경우에도 마찬가지이다. 따라서, 암 치료에 사용되기 위해서는 사이토카인을 종양 또는 종양 미세환경으로 특이적으로 전달하는 것이 바람직하다. 이것은 사이토카인을 종양 항원에 대해 특이적인 표적화 잔기, 예를 들면, 항체 또는 항체 단편에 접합시킴으로써 달성될 수 있다. 이러한 면역접합체의 추가 장점은 비-접합된 사이토카인과 비교시 증가된 그의 혈청 반감기이다. 이러한 사이토카인 면역접합체는 보다 낮은 용량에서 전신 부작용을 최소한의 수준으로 유지하면서 종양 부위에서 면역자극 활성을 최대화하는 그의 능력 때문에 최적 면역치료제가 된다.

[0004] 효과기 세포를 활성화시키는 또 다른 방식은 면역글로불린의 Fc 부분, 또는 Fc 영역을 포함하는 제조합 융합 단백질로 효과기 세포의 표면 상의 활성화 Fc 수용체를 포획하는 것이다. 항체의 Fc 영역에 의해 매개되는 항체의 소위 효과기 기능은 항체에 근거한 암 면역치료에 있어서 중요한 작용 기작이다. 항체 의존적 세포-매개된 세포독성, 즉 NK 세포에 의한 항체-코팅된 표적 세포(예를 들면, 종양 세포)의 파괴는 세포의 표면에 결합된 항체가 NK 세포 상의 Fc 수용체와 상호작용할 때 유발된다. NK 세포는 IgG₁ 또는 IgG₃ 서브클래스의 면역글로불린을 인식하는 FcγRIIIa(CD16a)를 발현한다. 추가 효과기 기능은 항체 의존적 세포-매개된 식세포작용(ADCP) 및 보체 의존적 세포독성(CDC)을 포함하고, 상이한 유형의 면역 세포가 상이한 유형 및 아류형의 면역글로불린 중쇄 불변 도메인(예를 들면, 각각 IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM 클래스 항체에 상응하는 α, δ, γ, ε 또는 μ 중쇄 불변 도메인)을 인식하는 Fc 수용체의 상이한 세트를 보유하기 때문에 항체의 클래스 및 서브클래스마다 상이하다. 다양한 방법들이 항체의 효과기 기능을 증가시키는 데에 이용되어 왔다. 예를 들면, 문헌(Shields et al., J Biol Chem 9(2), 6591-6604 (2001))은 Fc 영역의 위치 298, 333 및/또는 334(잔기의 EU 넘버링)에서의 아미노산 치환이 항체와 FcγRIIIa 수용체의 결합 및 ADCC를 개선한다는 것을 보여준다. Fc 영역 내에 아미노산 변경을 갖고 개선된 Fc 수용체 결합 및 효과기 기능을 나타내는 추가 항체 변이체는 미국 특허 제6,737,056호, 국제 특허출원 공개 제WO 2004/063351호 및 국제 특허출원 공개 제WO 2004/099249호에 기재되어 있다. 대안적으로, 증가된 Fc 수용체 결합 및 효과기 기능은 항체의 글리코실화를 변경시킴으로써 수득될 수 있다. 암 면역치료에서 가장 흔히 사용되는 항체인 IgG₁ 유형 항체는 Fc 영역의 각각의 CH2 도메인 내의 Asn297에서 보존된 N-연결된 글리코실화 부위를 갖는다. Asn297에 부착된 2개의 복합체 바이안테나리(biantennary) 올리고사카라이드는 폴리펩티드 골격과 광범위한 접촉을 형성하는 CH2 도메인들 사이에 묻혀있고, 그들의 존재는 항체가 항체 의존적 세포-매개된 세포독성(ADCC)을 비롯한 효과기 기능을 매개하는 데에 필수적이다(Lifely et al., Glycobiology 5, 813-822 (1995); Jefferis et al., Immunol Rev 163, 59-76 (1998); Wright and Morrison, Trends Biotechnol 15, 26-32 (1997)). 단백질 조작 연구는 FcγR이 IgG CH2 도메인의 보다 낮은 힌지 영역과 상호작용한다는 것을 보여주었다(Lund et al., J Immunol 157, 4963-69 (1996)). 그러나, FcγR 결합은 CH2 영역 내의 상기 올리고사카라이드의 존재도 필요로 하는데(Lund et al., J Immunol 157, 4963-69 (1996); Wright and Morrison, Trends Biotech 15, 26-31 (1997)), 이것은 상기 올리고사카라이드 및 폴리펩티드 둘다가 상호작용 부위에 직접적으로 기여하거나 상기 올리고사카라이드가 활성 CH2

폴리펩티드 입체구조를 유지하는 데에 필요하다는 것을 암시한다. 따라서, 상기 올리고사카라이드 구조물의 변경은 IgG₁과 Fc γ R 사이의 상호작용의 친화성을 증가시키고 IgG₁ 항체의 ADCC 활성을 증가시키는 수단으로서 탐구될 수 있다. 문헌(Umana et al., Nat Biotechnol 17, 176-180 (1999)) 및 미국 특허 제6,602,684호(국제 특허출원 공개 제WO 99/54342호)(이들의 내용은 온전히 그대로 본원에 참고로 도입됨)는 이등분된 올리고사카라이드의 형성을 촉매작용하는 글리코실트랜스퍼라제인 β (1,4)-N-아세틸글루코사아미닐트랜스퍼라제 III(GnTIII)을 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에서 과다발현시킨 것이 이들 세포에서 생성된 항체의 시험관내 ADCC 활성을 유의하게 증가시킨다는 것을 보여주었다. 생성 세포주에서의 GnTIII의 과다발현은 일반적으로 비-푸코실화되어 있는 하이브리드 유형의 올리고사카라이드인 이등분된 올리고사카라이드가 풍부한 항체를 발생시킨다. GnTIII 이외에 만노시다제 II(ManII)가 생성 세포주에서 과다발현된 경우, 복합체 유형의 이등분된 비-푸코실화된 올리고사카라이드가 풍부한 항체가 수득된다(Ferrara et al., Biotechn Bioeng 93, 851-861 (2006)). 두 유형의 항체들이 비-변경된 글리칸을 갖는 항체와 비교시 강력히 증가된 ADCC를 보이지만, 대다수의 N-글리칸이 복합체 유형의 N-글리칸인 항체만이 유의한 보체 의존적 세포독성을 유도할 수 있다(Ferrara et al., Biotechn Bioeng 93, 851-861 (2006)). ADCC 활성의 증가를 위한 중요한 인자는 IgG Fc 도메인과 Fc γ RIIIa의 결합을 개선하는, 올리고사카라이드 코어의 가장 안쪽에 있는 N-아세틸글루코사아민 잔기로부터의 푸코스의 제거인 듯하다(Shinkawa et al., J Biol Chem 278, 3466-3473 (2003)). 감소된 푸코실화를 갖는 항체의 추가 제조 방법은 예를 들면, α (1,6)-푸코실트랜스퍼라제 결핍 숙주 세포에서의 발현을 포함한다(Yamane-Ohnuki et al., Biotech Bioeng 87, 614-622 (2004); Niwa et al., J Immunol Methods 306, 151-160 (2006)).

[0005] 자유 사이토카인, 면역접합체 또는 조작된 항체의 사용에 의해 항암 면역치료에서 달성된 성공에도 불구하고, 암 치료에서 효과적이고 안전한 신규 치료 방법에 대한 계속된 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0006] 본 발명자들은 국소 면역 세포 활성화를 위한 이들 2종의 방법들의 조합, 즉 사이토카인 면역접합체 및 증가된 효과기 기능을 갖도록 조작된 항체에 의한 효과기 세포의 동시적인 자극이 항암 면역치료의 효능을 크게 개선한다는 것을 발견하였다.

[0007] 따라서, 본 발명은 질환의 치료를 필요로 하는 개체에서 질환을 치료하는데 사용되는, (a) 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제1 항체 및 효과기 잔기를 포함하는 면역접합체와 (b) 증가된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제2 항체의 조합물을 제공한다. 한 실시양태에서, 효과기 잔기는 사이토카인이다. 한 실시양태에서, 사이토카인은 IL-2, GM-CSF, IFN- α 및 IL-12로 구성된 군으로부터 선택된다. 구체적인 실시양태에서, 효과기 기능은 IL-12이다. 또 다른 실시양태에서, 효과기 잔기는 IL-12이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, IL-2 효과기 잔기는 비-돌연변이된 IL-2 효과기 잔기와 비교시 IL-2 수용체의 α -서브유닛에 대한 돌연변이체 IL-2 효과기 잔기의 친화성을 감소시키거나 제거하나 중간 친화성 IL-2 수용체에 대한 돌연변이체 IL-2 효과기 잔기의 친화성을 보존하는 하나 이상의 아미노산 돌연변이, 특히 아미노산 치환을 포함하는 돌연변이체 IL-2 효과기 잔기이다. 구체적인 실시양태에서, 돌연변이체 IL-2 효과기 잔기는 인간 IL-2(서열번호 1)의 잔기 42, 45 및 72에 상응하는 위치들로부터 선택된 1개, 2개 또는 3개의 위치(들)에서 1개, 2개 또는 3개의 아미노산 치환을 포함한다. 보다 구체적인 실시양태에서, 돌연변이체 IL-2 효과기 잔기는 인간 IL-2의 잔기 42, 45 및 72에 상응하는 위치들에서 3개의 아미노산 치환을 포함한다. 훨씬 더 구체적인 실시양태에서, 돌연변이체 IL-2 효과기 잔기는 아미노산 치환 F42A, Y45A 및 L72G를 포함하는 인간 IL-2이다. 특정 실시양태에서, 돌연변이체 IL-2 효과기 잔기는 인간 IL-2의 위치 3에 상응하는 위치에서 IL-2의 O-글리코실화 부위를 제거하는 아미노산 돌연변이를 추가로 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 돌연변이체 IL-2 효과기 잔기는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 효과기 잔기는 단일쇄 효과기 잔기이다.

[0008] 한 실시양태에서, 제1 항체는 전장 IgG 클래스 항체, 특히 전장 IgG₁ 서브클래스 항체이다. 한 실시양태에서, 효과기 잔기는 제1 항체와 아미노-말단 또는 카복시-말단 펩티드 결합을 공유한다. 한 실시양태에서, 효과기 잔기는 제1 항체와 아미노-말단 펩티드 결합을 공유한다. 한 실시양태에서, 효과기 잔기는 그의 N-말단에서 제1 항체의 중쇄들 중 한 중쇄의 C-말단에 융합된다. 구체적인 실시양태에서, 면역접합체는 1개 이하의 효과기 잔기를 포함한다. 한 실시양태에서, 면역접합체는 본질적으로 하나 이상의 펩티드 연결체에 의해 연결된 효과기 잔기 및 제1 항체로 구성된다. 구체적인 실시양태에서, 면역접합체는 효과기 잔기, 특히 단일쇄 효과기 잔기, 및 제1 항체, 특히 전장 IgG 클래스 항체를 포함하고, 이때 효과기 잔기는 그의 아미노-말단 아미노산에서 임의적으로 펩티드 연결체를 통해 제1 항체의 중쇄들 중 한 중쇄의 카복시-말단에 융합된다. 특정 실시양태에서, 제1 항체는 2개의 동일하지 않은 면역글로불린 중쇄들의 이중이량체화를 촉진하는 변경을 Fc 영역 내에 포

함한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 변경은 면역글로불린 중쇄들 중 한 중쇄 내에 knob 변경 및 2개의 면역글로불린 중쇄들 중 나머지 한 중쇄 내에 hole 변경을 포함하는 knob-into-hole 변경이다. 한 실시양태에서, 제1 항체는 CH3 도메인 내의 2개 면역글로불린 중쇄들 사이의 계면 내에 변경을 포함하고, 이때 i) 한 중쇄의 CH3 도메인에서 아미노산 잔기가 보다 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 교체됨으로써, 다른 중쇄의 CH3 도메인의 계면 내의 캐비티(cavity)("홀")에 위치할 수 있는 돌출부("놈")를 한 중쇄의 CH3 도메인의 계면 내에서 발생시키고, ii) 다른 중쇄의 CH3 도메인에서 아미노산 잔기가 보다 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 교체됨으로써, 제1 CH3 도메인의 계면 내의 돌출부("놈")가 위치할 수 있는 캐비티("홀")를 제2 CH3 도메인의 계면 내에서 발생시킨다. 한 실시양태에서, 제1 항체는 면역글로불린 중쇄들 중 한 중쇄 내에 아미노산 치환 T366W 및 임의적으로 아미노산 치환 S354C를 포함하고, 면역글로불린 중쇄들 중 나머지 한 중쇄 내에 아미노산 치환 T366S, L368A 및 Y407V, 및 임의적으로 Y349C를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 효과기 잔기는 knob 변경을 포함하는 면역글로불린 중쇄의 아미노-말단 또는 카복시-말단 아미노산에 융합된다.

[0009] 한 실시양태에서, 제1 항체의 감소된 효과기 기능은 활성화 Fc 수용체와의 감소된 결합, 감소된 ADCC, 감소된 ADCP, 감소된 CDC 및 감소된 사이토카인 분비로 구성된 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 감소된 효과기 기능은 활성화 Fc 수용체와의 감소된 결합이다. 한 실시양태에서, 활성화 Fc 수용체는 인간 수용체이다. 한 실시양태에서, 활성화 Fc 수용체는 Fc γ 수용체이다. 구체적인 실시양태에서, 활성화 Fc 수용체는 Fc γ RIIIa, Fc γ RI 및 FcR γ IIa로 구성된 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 활성화 Fc 수용체는 Fc γ RIIIa, 특히 인간 Fc γ RIIIa이다. 한 실시양태에서, 감소된 효과기 기능은 감소된 ADCC이다. 한 실시양태에서, 감소된 효과기 기능은 활성화 Fc 수용체와의 감소된 결합 및 감소된 ADCC이다.

[0010] 한 실시양태에서, 제1 항체는 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 Fc 영역 내로 도입함으로써 조작된다. 구체적인 실시양태에서, 아미노산 돌연변이는 아미노산 치환이다. 구체적인 실시양태에서, 제1 항체, 특히 인간 전장 IgG₁ 서브클래스 항체는 면역글로불린 중쇄의 위치 P329(카바트(Kabat) 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함한다. 보다 구체적인 실시양태에서, 아미노산 치환은 P329A 또는 P329G, 특히 P329G이다. 한 실시양태에서, 항체는 면역글로불린 중쇄의 S228, E233, L234, L235, N297 및 P331로부터 선택된 위치에서 추가 아미노산 치환을 포함한다. 보다 구체적인 실시양태에서, 추가 아미노산 치환은 S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D 또는 P331S이다. 구체적인 실시양태에서, 항체는 면역글로불린 중쇄의 위치 P329, L234 및 L235(카바트 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함한다. 보다 구체적인 실시양태에서, 항체는 면역글로불린 중쇄 내에 아미노산 치환 L234A, L235A 및 P329G(LALA P329G)를 포함한다.

[0011] 특정 실시양태에서, 제1 항체는 종양 세포 상에서 또는 종양 세포 환경에서 제시된 항원에 대해 유도된다. 구체적인 실시양태에서, 제1 항체는 섬유모세포 활성화 단백질(FAP), 테나신-C의 A1 도메인(TNC A1), 테나신-C의 A2 도메인(TNC A2), 피브로넥틴의 엑스트라 도메인 B(EDB), 암배아 항원(CEA) 및 흑색종 관련 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸(MCSP)으로 구성된 군으로부터 선택된 항원에 대해 유도된다. 구체적인 실시양태에서, 제1 항체는 CEA에 대해 유도된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제1 항체는 FAP에 대해 유도된다.

[0012] 한 실시양태에서, 제2 항체의 증가된 효과기 기능은 활성화 Fc 수용체와의 증가된 결합, 증가된 ADCC, 증가된 ADCP, 증가된 CDC 및 증가된 사이토카인 분비로 구성된 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 증가된 효과기 기능은 활성화 Fc 수용체와의 증가된 결합이다. 구체적인 실시양태에서, 활성화 Fc 수용체는 Fc γ RIIIa, Fc γ RI 및 FcR γ IIa로 구성된 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 활성화 Fc 수용체는 Fc γ RIIIa이다. 한 실시양태에서, 증가된 효과기 기능은 증가된 ADCC이다. 한 실시양태에서, 증가된 효과기 기능은 활성화 Fc 수용체와의 증가된 결합 및 증가된 ADCC이다.

[0013] 한 실시양태에서, 제2 항체는 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 Fc 영역 내로 도입함으로써 조작된다. 구체적인 실시양태에서, 아미노산 돌연변이는 아미노산 치환이다. 한 실시양태에서, 제2 항체는 Fc 영역에서의 글리코실화의 변경에 의해 조작된다. 구체적인 실시양태에서, Fc 영역에서의 글리코실화의 변경은 비-조작된 항체와 비교시 Fc 영역 내의 증가된 비율의 비-푸코실화된 올리고사카라이드이다. 훨씬 더 구체적인 실시양태에서, Fc 영역 내의 증가된 비율의 비-푸코실화된 올리고사카라이드는 Fc 영역 내의 20% 이상, 바람직하게는 50% 이상, 가장 바람직하게는 70% 이상의 비-푸코실화된 올리고사카라이드이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, Fc 영역 내의 글리코실화의 변경은 비-조작된 항체와 비교시 Fc 영역 내의 증가된 비율의 이등분된 올리고사카라이드이다. 훨씬 더 구체적인 실시양태에서, Fc 영역 내의 증가된 비율의 이등분된 올리고사카라이드는 Fc 영역 내의 약 20% 이상, 바람직하게는 50% 이상, 가장 바람직하게는 70% 이상의 이등분된 올리고사카라이드이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, Fc 영역 내의 글리코실화의 변경은 비-조작된 항체와 비교시 Fc 영역 내의 증

가된 비율의 이등분된 비-푸코실화된 올리고사카라이드이다. 바람직하게는, 제2 항체는 Fc 영역 내에 약 25% 이상, 약 35% 이상 또는 약 50% 이상의 이등분된 비-푸코실화된 올리고사카라이드를 갖는다. 구체적인 실시양태에서, 제2 항체는 비-조작된 항체와 비교시 Fc 영역에서 증가된 비율의 비-푸코실화된 올리고사카라이드를 갖도록 조작된다. 항체의 Fc 영역 내의 증가된 비율의 비-푸코실화된 올리고사카라이드는 증가된 효과기 기능, 특히 증가된 ADCC를 갖는 항체를 발생시킨다. 구체적인 실시양태에서, 비-푸코실화된 올리고사카라이드는 이등분된 비-푸코실화된 올리고사카라이드이다.

[0014] 한 실시양태에서, 제2 항체는 전장 IgG 클래스 항체, 특히 전장 IgG₁ 서브클래스 항체이다. 특정 실시양태에서, 제2 항체는 종양 세포 상에서 제시된 항원에 대해 유도된다. 구체적인 실시양태에서, 제2 항체는 CD20, 표피 성장인자 수용체(EGFR), HER2, HER3, 인슐린-유사 성장인자 1 수용체(IGF-1R), c-Met, CUB 도메인 함유 단백질-1(CDCP1), 암배아 항원(CEA) 및 흑색종 관련 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸(MCSP)으로 구성된 군으로부터 선택된 항원에 대해 유도된다.

[0015] 구체적인 실시양태에서, 제2 항체는 비-조작된 항체와 비교시 Fc 영역에서 증가된 비율의 비-푸코실화된 올리고사카라이드를 갖도록 조작된 항-CD20 항체이다. 적합한 항-CD20 항체는 온전히 그대로 본원에 참고로 도입되는 국제 특허출원 공개 제WO 2005/044859호에 기재되어 있다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제2 항체는 비-조작된 항체와 비교시 Fc 영역에서 증가된 비율의 비-푸코실화된 올리고사카라이드를 갖도록 조작된 항-EGFR 항체이다. 적합한 항-EGFR 항체는 온전히 그대로 본원에 참고로 도입되는 국제 특허출원 공개 제WO 2006/082515호 및 국제 특허출원 공개 제WO 2008/017963호에 기재되어 있다. 추가 구체적인 실시양태에서, 제2 항체는 비-조작된 항체와 비교시 Fc 영역에서 증가된 비율의 비-푸코실화된 올리고사카라이드를 갖도록 조작된 항-IGF-1R 항체이다. 적합한 항-IGF-1R 항체는 온전히 그대로 본원에 참고로 도입되는 국제 특허출원 공개 제WO 2008/077546호에 기재되어 있다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제2 항체는 비-조작된 항체와 비교시 Fc 영역에서 증가된 비율의 비-푸코실화된 올리고사카라이드를 갖도록 조작된 항-CEA 항체이다. 적합한 항-CEA 항체는 온전히 그대로 본원에 참고로 도입되는 국제 특허출원 공개 제WO 2011/023787호에 기재되어 있다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제2 항체는 비-조작된 항체와 비교시 Fc 영역에서 증가된 비율의 비-푸코실화된 올리고사카라이드를 갖도록 조작된 항-HER3 항체이다. 적합한 항-HER3 항체는 온전히 그대로 본원에 참고로 도입되는 국제 특허출원 공개 제WO 2011/076683호에 기재되어 있다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제2 항체는 비-조작된 항체와 비교시 Fc 영역에서 증가된 비율의 비-푸코실화된 올리고사카라이드를 갖도록 조작된 항-CDCP1 항체이다. 적합한 항-CDCP1 항체는 온전히 그대로 본원에 참고로 도입되는 국제 특허출원 공개 제WO 2011/023389호에 기재되어 있다. 한 실시양태에서, 제2 항체는 하나 이상의 글리코실트랜스퍼라제의 변경된 활성을 갖는 숙주 세포에서 항체를 제조함으로써 비-조작된 항체와 비교시 Fc 영역에서 변경된 글리코실화를 갖도록 조작된다.

[0016] 한 실시양태에서, 제2 항체는 증가된 β (1,4)-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III(GnTIII) 활성을 갖는 숙주 세포에서 항체를 제조함으로써 비-조작된 항체와 비교시 Fc 영역에서 증가된 비율의 비-푸코실화된 올리고사카라이드를 갖도록 조작된다. 구체적인 실시양태에서, 숙주 세포는 증가된 α -만노시다제 II(ManII) 활성을 추가로 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 제2 항체는 감소된 α (1,6)-푸코실트랜스퍼라제 활성을 갖는 숙주 세포에서 항체를 제조함으로써 비-조작된 항체와 비교시 Fc 영역에서 증가된 비율의 비-푸코실화된 올리고사카라이드를 갖도록 조작된다.

[0017] 한 실시양태에서, 질환은 효과기 세포 기능의 자극에 의해 치료될 수 있는 장애이다. 한 실시양태에서, 질환은 세포 증식 장애이다. 구체적인 실시양태에서, 질환은 암이다. 구체적인 실시양태에서, 암은 폐암, 대장암, 신장암, 전립선암, 유방암, 두경부암, 난소암, 뇌암, 림프종, 백혈병 및 피부암으로 구성된 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 개체는 포유동물이다. 구체적인 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0018] 구체적인 실시양태에서, 본 발명은 질환의 치료를 필요로 하는 개체에서 질환을 치료하는데 사용되는, 하기 (a)의 면역접합체와 하기 (b)의 항체의 조합물을 제공한다:

[0019] (a) 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 Fc 영역 내로 도입함으로써 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제1 전장 IgG 클래스 항체, 및 사이토카인을 포함하는 면역접합체로서, 이때 효과기 잔기가 그의 아미노-말단 아미노산에서 임의적으로 펩티드 연결체를 통해 제1 항체의 중쇄들 중 한 중쇄의 카복시-말단에 융합되어 있는, 면역접합체, 및

[0020] (b) Fc 영역에서의 글리코실화의 변경에 의해 증가된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제2 전장 IgG 클래스 항체. 또 다른 양태에서, 본 발명은 약학적으로 허용가능한 담체 중에 (a) 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제1

항체 및 효과기 잔기를 포함하는 면역접합체 및 (b) 증가된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제2 항체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 개체에서 질환을 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 (a) 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제1 항체 및 효과기 잔기를 포함하는 면역접합체 및 (b) 증가된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제2 항체의 용도를 포괄한다.

[0022] 본 발명은 (a) 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제1 항체 및 효과기 잔기를 포함하는 면역접합체와 (b) 증가된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제2 항체의 조합물을 치료 유효량으로 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 질환을 치료하는 방법을 추가로 제공한다.

[0023] 본 발명은 (a) 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제1 항체 및 효과기 잔기를 포함하는 면역접합체와 (b) 증가된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제2 항체의 조합물을, 효과기 세포 기능을 자극하기에 효과적인 양으로 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 효과기 세포 기능을 자극하는 방법도 제공한다.

[0024] 추가 양태에서, 본 발명은 (a) 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제1 항체 및 효과기 잔기를 포함하는 면역접합체, (b) 증가된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제2 항체, 및 (c) 임의적으로 질환을 치료하는 방법으로서 조합 치료의 사용을 지시하는 인쇄된 설명서를 포함하는 포장 삽입물을 동일한 또는 별개의 용기 내에 포함하는, 질환의 치료를 위한 키트를 제공한다.

[0025] 본 발명에 따른 약학 조성물, 용도, 방법 및 키트에서 사용되는 면역접합체 및 제2 항체는 본 발명에 유용한 제2 항체 및 면역접합체에 관한 이전 단락들에 기재된 특징들 중 임의의 특징을 단독으로 또는 조합으로 도입할 수 있다는 것이 이해된다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 CD25와의 결합을 결여하는 IL-2 사중 돌연변이체(qm)를 포함하는 FAP-표적화된 28H1 IgG-IL2 면역접합체(도 1a) 또는 비-표적화된 DP47GS IgG-IL2 면역접합체(도 1b), 및 항-EGFR 글리코맵(GlycoMab)을 SCID 마우스 내로 설내로 주입된 인간 두경부암종 세포주 FaDu에서 시험한 결과를 나타낸다. 데이터는 28H1 IgG-IL2 qm 면역접합체와 항-EGFR 글리코맵의 조합물이 향상된 평균 생존을 면에서 상기 면역접합체 또는 항-EGFR 글리코맵 단독보다 더 우수한 효능을 매개하는 반면, DP47GS IgG-IL2 qm 면역접합체는 그러하지 않다는 것을 보여준다(실시예 1 참조).

도 2는 상이한 농도의 항-EGFR 글리코맵의 존재 하에서 0.57 nM(도 2a) 또는 5.7 nM(도 2b)의 FAP-표적화된 28H1 IgG-IL2 qm 면역접합체 또는 IL-2(프로류킨(Proleukin))로 전처리되거나 전처리되지 않은 PBMC들에 의한 전체 A549 종양 세포 사멸(E:T = 10:1, 4시간)을 나타낸다.

도 3은 CD25와의 결합을 결여하는 IL-2 사중 돌연변이체(qm)를 포함하는 CEA-표적화된 CH1A1A IgG-IL2 면역접합체, 및 항-EGFR 글리코맵(도 3a) 또는 세톡시맵(도 3b)을 SCID Fc γ RIII 형질전환 마우스 내로 비장내로 주입된 인간 대장암종 세포주 LS174T에서 시험한 결과를 나타낸다. 데이터는 CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체와 항-EGFR 글리코맵의 조합물이 향상된 평균 생존을 및 전체 생존을 면에서 면역접합체, 항-EGFR 글리코맵 또는 세톡시맵 단독, 및 CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체와 세톡시맵의 조합물보다 더 우수한 효능을 매개한다는 것을 보여준다(실시예 3 참조).

도 4는 CD25와의 결합을 결여하는 IL-2 사중 돌연변이체(qm)를 포함하는 CEA-표적화된 CH1A1A IgG-IL2 면역접합체, 및 항-EGFR 글리코맵(도 4a) 또는 세톡시맵(도 4b)을 SCID Fc γ RIII 형질전환 마우스 내로 정맥내로 주입된 인간 폐암종 세포주 A549에서 시험한 결과를 나타낸다. 데이터는 CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체와 항-EGFR 글리코맵의 조합물이 향상된 평균 생존을 및 전체 생존을 면에서 면역접합체 또는 항-EGFR 글리코맵 단독, 및 CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체와 세톡시맵의 조합물보다 더 우수한 효능을 매개한다는 것을 보여준다(실시예 4 참조).

도 5는 CD25와의 결합을 결여하는 IL-2 사중 돌연변이체(qm)를 포함하는 CEA-표적화된 CH1A1A IgG-IL2 면역접합체 및 항-Her3 글리코맵을 SCID Fc γ RIII 형질전환 마우스 내로 비장내로 주입된 인간 대장암종 세포주 LS174T에서 시험한 결과를 나타낸다. 데이터는 CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체와 항-Her3 글리코맵의 조합물이 향상된 평균 생존을 면에서 면역접합체 또는 항-Her3 글리코맵 단독보다 더 우수한 효능을 매개한다는 것을 보여준다(실시예 5 참조).

도 6은 CD25와의 결합을 결여하는 IL-2 사중 돌연변이체(qm)를 포함하는 FAP-표적화된 28H1 IgG-IL2 면역접합체, 및 항-EGFR 글리코맵을 SCID FcγRIII 형질전환 마우스 내로 신장내로 주입된 인간 신장암종 세포주 ACHN에서 시험한 결과를 나타낸다. 데이터는 CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체와 항-EGFR 글리코맵의 조합물이 향상된 평균 생존율 및 전체 생존율 면에서 항-EGFR 글리코맵 단독, 또는 프로류킨[®]과 조합된 항-EGFR 글리코맵보다 더 우수한 효능을 매개한다는 것을 보여준다(실시예 6 참조).

도 7은 항-Her3 글리코맵 단독(좌측 패널), CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체 단독(우측 패널), 또는 CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체와 항-Her3 글리코맵의 조합물(우측 패널)로 처리하였을 때, PBMC들에 의한 전체 LS174T 세포 사멸을 나타낸다.

도 8은 항-Her3 글리코맵 단독(좌측 패널), CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체 단독(우측 패널), 또는 CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체와 항-Her3 글리코맵의 조합물(우측 패널)로 처리하였을 때, NK 세포 상에서의 CD25(도 8a) 또는 CD69(도 8b)의 발현을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 제1 양태에서, 본 발명은 질환의 치료를 필요로 하는 개체에서 질환을 치료하는데 사용되는, (a) 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제1 항체 및 효과기 잔기를 포함하는 면역접합체와 (b) 증가된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제2 항체의 조합물을 제공한다.
- [0028] 본 발명은 (a) 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제1 항체 및 효과기 잔기를 포함하는 면역접합체와 (b) 증가된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제2 항체의 조합물을 치료 유효량으로 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 질환을 치료하는 방법을 추가로 제공한다.
- [0029] 본 발명은 (a) 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제1 항체 및 효과기 잔기를 포함하는 면역접합체와 (b) 증가된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제2 항체의 조합물을, 효과기 세포 기능을 자극하기에 효과적인 양으로 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 효과기 세포 기능을 자극하는 방법도 제공한다.
- [0030] 정의
- [0031] 용어들은, 이하에서 달리 정의되어 있지 않은 한, 당분야에서 일반적으로 사용되는 바와 같이 본원에서 사용된다.
- [0032] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "면역접합체"는 하나 이상의 효과기 잔기 및 항체를 포함하는 폴리펩티드 분자를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 면역접합체는 1개 이하의 효과기 잔기를 포함한다. 본 발명에 따른 구체적인 면역접합체는 본질적으로 하나 이상의 펩티드 연결체에 의해 연결된 1개의 효과기 잔기 및 항체로 구성된다. 본 발명에 따른 구체적인 면역접합체는 융합 단백질이다(즉, 면역접합체의 성분들은 펩티드 결합에 의해 연결된다).
- [0033] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "조절 항체"는 효과기 잔기를 갖지 않은 상태로 존재하는 항체를 지칭한다. 예를 들면, 본원에 기재된 IgG-IL2 면역접합체와 대조군 항체를 비교할 때, 대조군 항체는 자유 IgG이고, 이때 IgG-IL2 면역접합체 및 자유 IgG 분자는 둘다 동일한 항원성 결정인자에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0034] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "항원성 결정인자"는 "항원" 및 "에피토프"와 동의어이고, 항체가 결합하여 항체-항원 복합체를 형성하는 폴리펩티드 거대분자 상의 부위(예를 들면, 아미노산들의 인접 스트레치, 또는 비-인접 아미노산들의 상이한 영역들로 구성된 입체구조적 배열)를 지칭한다. 유용한 항원성 결정인자는 예를 들면, 종양 세포의 표면, 바이러스-감염된 세포의 표면 또는 다른 병든 세포의 표면 상에서 발견될 수 있고/있거나, 혈액 혈청에서 자유로운 상태로 발견될 수 있고/있거나, 세포의 매트릭스(ECM)에서 발견될 수 있다.
- [0035] "특이적으로 결합한다"는 결합이 항원에 대해 선택적이고 원치않는 또는 비-특이적 상호작용으로부터 구별될 수 있다는 것을 의미한다. 항체가 특이적 항원성 결정인자에 결합하는 능력은 효소-연결된 면역흡착 분석(ELISA) 또는 당업자에게 공지된 다른 기법, 예를 들면, (비아코어(BIAcore) 기계 상에서 분석된) 표면 플라즈몬 공명 기법(Liljeblad et al., Glyco J 17, 323-329 (2000)), 및 전통적인 결합 분석(Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002))을 통해 측정될 수 있다.
- [0036] 용어 "항-[항원] 항체" 및 "[항원]에 결합하는 항체"는 항체가 항원을 표적화하는 데에 있어서 진단제 및/또는 치료제로서 유용할 정도로 충분한 친화성으로 각각의 항원과 결합할 수 있는 항체를 지칭한다. 한 실시양태에

서, 항-[항원]-항체와 무관한 단백질의 결합 정도는 예를 들면, 방사면역분석(RIA)에 의해 측정될 때 항체와 항원의 결합의 약 10% 미만이다. 특정 실시양태에서, [항원]에 결합하는 항체는 $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0.1 \text{ nM}$, $\leq 0.01 \text{ nM}$ 또는 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (예를 들면, 10^{-8} M 이하, 예를 들면, 10^{-8} M 내지 10^{-13} M , 예를 들면, 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수(K_D)를 갖는다.

[0037] "친화성"은 분자(예를 들면, 항체)의 단일 결합 부위와 그의 결합 파트너(예를 들면, 항원) 사이의 비-공유 상호작용의 총 합계 강도를 지칭한다. 달리 표시되어 있지 않은 한, 본원에서 사용된 바와 같이, "결합 친화성"은 결합 쌍의 구성원들(예를 들면, 항체와 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 고유 결합 친화성을 지칭한다. 그의 파트너 Y에 대한 분자 X의 친화성은 일반적으로 해리 속도 상수 및 결합 속도 상수(각각 k_{off} 및 k_{on})의 비인 해리 상수(K_D)로 표시될 수 있다. 따라서, 상기 속도 상수들의 비가 동일하게 유지되는 한, 동등한 친화성은 상이한 속도 상수를 포함할 수 있다. 친화성은 본원에 기재된 방법을 포함하는, 당분야에서 공지되어 있는 잘 확립된 방법에 의해 측정될 수 있다. 친화성을 측정하는 구체적인 방법은 표면 플라스몬 공명(SPR)이다.

[0038] 한 실시양태에 따라, CM5 칩 상에 고정된 리간드(예를 들면, 효과기 잔기 수용체, Fc 수용체 또는 표적 항원)와 함께 25°C에서 비아코어® T100 기계(지이 헬스케어(GE healthcare))를 이용하여 표면 플라스몬 공명으로 K_D 를 측정한다. 요약하건대, 카복시메틸화된 텍스트란 바이오센서 칩(CM5, 지이 헬스케어)을 공급자의 설명서에 따라 N-에틸-N'-(3-다이메틸아미노프로필)-카보다이이미드 하이드로클로라이드(EDC) 및 N-하이드록시석신이미드(NHS)로 활성화시킨다. 약 100 내지 5000 반응 유닛(RU)의 커플링된 단백질을 달성하기 위해 10 μl /분의 유속으로 주입하기 전에 재조합 리간드를 10 mM 나트륨 아세테이트(pH 5.5)로 0.5 내지 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 희석한다. 리간드의 주입 후, 1 M 에탄올아민을 주입하여 비-반응된 기를 차단한다. 동역학적 측정을 위해, HBS-EP+(지이 헬스케어, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% 계면활성제 P20, pH 7.4) 중의 3배 내지 5배 연속면역접합체 희석물(약 0.01 내지 300 nM의 범위)을 25°C에서 약 30 내지 50 μl /분의 유속으로 주입한다. 결합 센서그램 및 해리 센서그램을 동시에 피팅함으로써 단순 1-대-1 랭뮤어 결합 모델(비아코어® T100 평가 소프트웨어 버전 1.1.1)을 이용하여 결합 속도(k_{on}) 및 해리 속도(k_{off})를 계산한다. 평형 해리 상수(K_D)를 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 로 계산한다. 예를 들면, 문헌(Chen et al., J Mol Biol 293, 865-881 (1999))을 참조한다.

[0039] "감소된 결합", 예를 들면, Fc 수용체 또는 CD25와의 감소된 결합은 예를 들면, SPR에 의해 측정되었을 때 각각의 상호작용에 대한 친화성의 감소를 지칭한다. 명료함을 위해, 상기 용어는 친화성이 0(또는 분석 방법의 검출 한계 미만)까지 감소하는 것, 즉 상호작용의 완전한 제거도 포함한다. 대조적으로, "증가된 결합"은 각각의 상호작용에 대한 결합 친화성의 증가를 지칭한다.

[0040] 본원에서 사용된 바와 같이, 항체, 효과기 잔기 등과 관련하여 용어 "제1" 및 "제2"는 하나 초과와 각각의 유형의 잔기가 존재할 때 구별의 편의를 위해 사용된다. 달리 명시되어 있지 않은 한, 이들 용어들의 사용은 면역접합체의 특정 순서 또는 배향을 부여하기 위한 것이 아니다.

[0041] 본원에서 사용될 때, 용어 "효과기 잔기"는 예를 들면, 신호 전달도입 또는 다른 세포 경로를 통해 세포 활성화에 영향을 미치는 폴리펩티드, 예를 들면, 단백질 또는 당단백질을 지칭한다. 따라서, 본 발명의 효과기 잔기는 효과기 잔기에 대한 하나 이상의 수용체를 보유하는 세포에서 반응을 조절하도록 세포막의 외부로부터 신호를 전달하는 수용체-매개된 신호전달과 관련될 수 있다. 한 실시양태에서, 효과기 잔기는 효과기 잔기에 대한 하나 이상의 수용체를 보유하는 세포에서 세포독성 반응을 이끌어낼 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 효과기 잔기는 효과기 잔기에 대한 하나 이상의 수용체를 보유하는 세포에서 증식 반응을 이끌어낼 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 효과기 잔기는 효과기 잔기에 대한 수용체를 보유하는 세포에서 분화를 이끌어낼 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 효과기 잔기는 효과기 잔기에 대한 수용체를 보유하는 세포에서 내생성 세포 단백질의 발현을 조절할 수 있다(즉, 상향조절할 수 있거나 하향조절할 수 있다). 효과기 잔기의 비-한정적 예에는 사이토카인, 성장인자, 호르몬, 효소, 기질 및 보조인자가 포함된다. 효과기 잔기는 다양한 배열로 항체와 회합되어 면역접합체를 형성할 수 있다.

[0042] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "사이토카인"은 생물학적 또는 세포 기능 또는 과정(예를 들면, 면역, 염증 및 조절)을 매개하고/하거나 조절하는 분자를 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "사이토카인"은 "림포카인", "케모카인", "모노카인" 및 "인터류킨"을 포함한다. 유용한 사이토카인의 예에는 GM-CSF, IL-1 α ,

IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , TGF- β , TNF- α 및 TNF- β 가 포함되나 이들로 한정되지 않는다. 구체적인 사이토카인은 IL-2 및 IL-12이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "사이토카인"은 상응하는 야생형 사이토카인의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 포함하는 사이토카인 변이체, 예를 들면, 문헌(Sauve et al., Proc Natl Acad Sci USA 88, 4636-40 (1991)), 문헌(Hu et al., Blood 101, 4853-4861 (2003)), 미국 특허출원 공개 제 2003/0124678호, 문헌(Shanafelt et al., Nature Biotechnol 18, 1197-1202 (2000)), 문헌(Heaton et al., Cancer Res 53, 2597-602 (1993)), 미국 특허 제5,229,109호, 미국 특허출원 공개 제2007/0036752호, 국제 특허출원 공개 제WO 2008/0034473호 및 국제 특허출원 공개 제WO 2009/061853호에 기재된 IL-2 변이체도 포함하기 위한 것이다.

[0043] 본원에서 사용될 때, 용어 "단일쇄"는 펩티드 결합에 의해 선형으로 연결된 아미노산 단량체들을 포함하는 분자를 지칭한다. 한 실시양태에서, 효과기 잔기는 단일쇄 효과기 잔기이다. 단일쇄 효과기 잔기의 비-한정적 예에는 사이토카인, 성장인자, 호르몬, 효소, 기질 및 보조인자가 포함된다. 효과기 잔기가 사이토카인이고 관심있는 사이토카인이 통상적으로 천연 상태에서 다량체로서 발견될 때, 다량체 사이토카인의 각각의 서브유닛은 효과기 잔기의 단일쇄에 의해 순차적으로 코딩된다. 따라서, 유용한 단일쇄 효과기 잔기의 비-한정적 예에는 GM-CSF, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , TGF- β , TNF- α 및 TNF- β 가 포함된다.

[0044] 본원에서 사용될 때, 용어 "대조군 효과기 잔기"는 비-접합된 효과기 잔기를 지칭한다. 예를 들면, 본원에 기재된 IL-2 면역접합체와 대조군 효과기 잔기를 비교할 때, 대조군 효과기 잔기는 자유 비-접합된 IL-2이다. 마찬가지로, 예를 들면, IL-12 면역접합체를 대조군 효과기 잔기와 비교할 때, 대조군 효과기 잔기는 자유 비-접합된 IL-12(예를 들면, p40 서브유닛과 p35 서브유닛이 1개의 다이설파이드 결합에 의해 공유되어 있는 이중량체 단백질로서 존재함)이다.

[0045] 본원에서 사용될 때, 용어 "효과기 잔기 수용체"는 효과기 잔기에 특이적으로 결합할 수 있는 폴리펩티드 분자를 지칭한다. 예를 들면, IL-2가 효과기 잔기인 경우, IL-2 분자(예를 들면, IL-2를 포함하는 면역접합체)에 결합하는 효과기 잔기 수용체는 IL-2 수용체이다. 유사하게, 예를 들면, IL-12가 면역접합체의 효과기 잔기인 경우, 효과기 잔기 수용체는 IL-12 수용체이다. 효과기 잔기가 하나 초과인 수용체에 특이적으로 결합하는 경우, 효과기 잔기에 특이적으로 결합하는 모든 수용체들은 그 효과기 잔기에 대한 "효과기 잔기 수용체"이다.

[0046] 본원에서 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 원하는 항원 결합 활성을 나타내고 Fc 영역 또는 면역글로불린의 Fc 영역과 동등한 영역을 포함하는 한, 단일클론 항체, 다중클론 항체, 다중특이적 항체(예를 들면, 이중특이적 항체) 및 항체 단편을 포함하나 이들로 한정되지 않는 다양한 항체 구조물들을 포괄한다.

[0047] 용어 "전장 항체", "온전한 항체" 및 "전체 항체"는 천연 면역글로불린 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖는 항체를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

[0048] 용어 "면역글로불린"은 천연 발생 항체의 구조를 갖는 단백질을 지칭한다. 예를 들면, IgG 클래스의 면역글로불린은 다이설파이드 결합에 의해 결합된 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄로 구성된 약 150,000 달톤의 이중사량체 단백질이다. N-말단부터 C-말단까지 각각의 중쇄는 가변 중쇄 도메인 또는 중쇄 가변 도메인으로서도 지칭되는 가변 영역(VH)에 이어서, 중쇄 불변 영역으로서도 지칭되는 3개의 불변 도메인(CH1, CH2 및 CH3)을 갖는다. 유사하게, N-말단부터 C-말단까지, 각각의 경쇄는 가변 경쇄 도메인 또는 경쇄 가변 도메인으로서도 지칭되는 가변 영역(VL)에 이어서, 경쇄 불변 영역으로서도 지칭되는 불변 경쇄(CL) 도메인을 갖는다. 면역글로불린의 중쇄는 α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG) 또는 μ (IgM)로서 지칭되는 5종의 유형들 중 하나로 배정될 수 있고, 이들 유형들 중 일부는 하위유형, 예를 들면, γ_1 (IgG₁), γ_2 (IgG₂), γ_3 (IgG₃), γ_4 (IgG₄), α_1 (IgA₁) 및 α_2 (IgA₂)로 더 나누어질 수 있다. 면역글로불린의 경쇄는 그의 불변 도메인의 아미노산 서열에 근거하여 카파(κ) 및 람다(λ)로서 지칭되는 2종의 유형들 중 하나로 배정될 수 있다. 면역글로불린은 본질적으로 면역글로불린 힌지 영역을 통해 연결된 2개의 Fab 분자들 및 1개의 Fc 도메인으로 구성된다.

[0049] "항체 단편"은 온전한 항체가 결합하는 항원에 결합하는 온전한 항체의 일부를 포함하는, 온전한 항체 이외의 분자를 지칭한다. 항체 단편의 예에는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, 다이아바디, 선형 항체, 단일쇄 항체 분자(예를 들면, scFv), 단일 도메인 항체, 및 항체 단편들로부터 형성된 다중특이적 항체가 포함되나 이들로 한정되지 않는다. 일부 항체 단편의 검토를 위해서는 문헌(Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003))을 참조한다. scFv 단편의 검토를 위해서는 예를 들면, 문헌(Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal

Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994))을 참조하고, 국제 특허출원 공개 제WO 93/16185호, 미국 특허 제5,571,894호 및 미국 특허 제5,587,458호도 참조한다. 살비지 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하고 증가된 생체내 반감기를 갖는 Fab 및 F(ab')₂ 단편의 논의에 대해서는 미국 특허 제5,869,046호를 참조한다. 다이아바디는 2가일 수 있거나 이중특이적일 수 있는 2개의 항원 결합 부위를 갖는 항체 단편이다. 예를 들면, 유럽 특허 제404,097호; 국제 특허출원 공개 제WO 1993/01161호; 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 테트라바디도 문헌(Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003))에 기재되어 있다. 단일 도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부, 또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 항체 단편이다. 특정 실시양태에서, 단일 도메인 항체는 인간 단일 도메인 항체(도만티스 인코포레이티드(Domantis, Inc.), 미국 매사추세츠주 왈섬 소재; 예를 들면, 미국 특허 제6,248,516 B1호 참조)이다. 항체 단편은 본원에 기재된 바와 같이 온전한 항체의 단백질용해성 분해 및 재조합 숙주 세포(예를 들면, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 또는 파지)에 의한 제조를 포함하나 이들로 한정되지 않는 다양한 기법들에 의해 제조될 수 있다.

[0050] 용어 "항원 결합 도메인"은 항원의 일부 또는 전체에 특이적으로 결합하고 상보적인 영역을 포함하는 항체의 일부를 지칭한다. 항원 결합 도메인은 예를 들면, 하나 이상의 항체 가변 도메인(항체 가변 영역으로서도 지칭됨)에 의해 제공될 수 있다. 특히, 항원 결합 도메인은 항체 경쇄 가변 영역(VL) 및 항체 중쇄 가변 영역(VH)을 포함한다.

[0051] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체와 항원의 결합에 관여하는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 천연 항체의 중쇄 및 경쇄(각각 VH 및 VL)의 가변 도메인은 일반적으로 유사한 구조를 갖고, 이때 각각의 도메인은 4개의 보존된 골격 영역(FR) 및 3개의 초가변 영역(HVR)을 포함한다. 예를 들면, 문헌(Kindt et al., Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007))을 참조한다. 단일 VH 또는 VL 도메인은 항원 결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다.

[0052] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "초가변 영역" 또는 "HVR"은 서열 면에서 초가변성을 갖고/갖거나 구조적으로 정의된 루프("초가변 루프")를 형성하는 항체 가변 도메인의 영역들 각각을 지칭한다. 일반적으로, 천연 4쇄 항체는 6개의 HVR(VH 내의 3개 HVR(H1, H2 및 H3) 및 VL 내의 3개 HVR(L1, L2 및 L3))을 포함한다. HVR은 일반적으로 초가변 루프 및/또는 상보성 결정 영역(CDR)의 아미노산 잔기를 포함하고, 이때 후자는 가장 높은 서열 가변성을 갖고/갖거나 항원 인식에 관여한다. VH 내의 CDR1을 제외하고, CDR은 일반적으로 초가변 루프를 형성하는 아미노산 잔기를 포함한다. 초가변 영역(HVR)은 "상보성 결정 영역"(CDR)으로서도 지칭되고, 이들 용어들은 항원 결합 영역을 형성하는 가변 영역의 일부를 언급하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 이 특정 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 기재되어 있고, 이때 정의는 서로에 대해 비교되었을 때 아미노산 잔기들의 중첩 또는 서브세트를 포함한다. 그럼에도 불구하고, 항체 또는 이의 변이체의 CDR을 지칭하기 위한 어느 한 정의의 적용은 본원에서 정의되고 사용된 용어의 범위 내에 있기 위한 것이다. 상기 인용된 참고문헌들 각각에 의해 정의된 CDR을 구성하는 적절한 아미노산 잔기는 비교로서 하기 표 1에 기재되어 있다. 특정 CDR을 구성하는 정확한 잔기 수는 상기 CDR의 서열 및 크기에 따라 달라질 것이다. 당업자는 항체의 가변 영역 아미노산 서열이 주어졌을 때 어떤 잔기가 특정 CDR을 구성하는지를 상용적으로 확인할 수 있다.

[0053] [표 1]

CDR 정의¹

CDR	카바트	초티아	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 1에서 모든 CDR 정의의 넘버링은 카바트의 문헌(하기 참조)에 기재된 넘버링 약정에 따른다.

² 표 1에서 사용된 바와 같이 소문자 "b"를 갖는 "AbM"은 옥스포드 몰레큘라(Oxford Molecular)의 "AbM" 항체 모델링 소프트웨어에 의해 정의된 CDR을 지칭한다.

[0054]

[0055]

카바트의 문헌은 임의의 항체에 적용될 수 있는 가변 영역 서열에 대한 넘버링 시스템도 정의하였다. 당업자는 서열 자체 이외의 임의의 실험 데이터에 의존하지 않으면서 이 "카바트 넘버링" 시스템을 임의의 가변 영역 서열에 명확히 배정할 수 있다. 본원에서 사용된 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 기재된 넘버링 시스템을 지칭한다. 달리 특정되어 있지 않은 한, 항체 가변 영역 내의 특정 아미노산 잔기 위치의 넘버링에 대한 언급은 카바트 넘버링 시스템에 따른다.

[0056]

서열목록(즉, 서열번호 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 등)의 폴리펩티드 서열은 카바트 넘버링 시스템에 따라 넘버링되어 있지 않다. 그러나, 서열목록의 서열의 넘버링을 카바트 넘버링으로 전환시키는 것은 당업자의 통상의 기술 범위 내에 있다.

[0057]

"골격" 또는 "FR"은 초가변 영역(HVR) 잔기 이외의 가변 도메인 잔기를 지칭한다. 가변 도메인의 FR은 일반적으로 하기 4개의 FR 도메인들로 구성된다: FR1, FR2, FR3 및 FR4. 따라서, HVR 및 FR 서열들은 일반적으로 VH(또는 VL)에서 하기 순서로 나타난다: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

[0058]

항체의 "클래스"는 그의 중쇄에 의해 보유된 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을 지칭한다. 항체의 5종의 주요 클래스, 즉 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 이들 중 몇몇은 서브클래스(동종형), 예를 들면, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂로 더 나누어질 수 있다. 면역글로불린의 상이한 클래스들에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α, δ, ε, γ 및 μ로서 지칭된다.

[0059]

본원에서 용어 "Fc 영역" 또는 "Fc 도메인"은 불변 영역의 적어도 일부를 함유하는 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하기 위해 사용된다. 상기 용어는 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함한다. IgG 중쇄의 Fc 영역의 경계가 약간 달라질 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 통상적으로 Cys226 또는 Pro230부터 중쇄의 카복실-말단까지 걸쳐 있는 것으로 정의된다. 그러나, Fc 영역의 C-말단 라이신(Lys447)은 존재할 수 있거나 존재하지 않을 수 있다. 본원에서 달리 특정되어 있지 않은 한, Fc 영역 또는 불변 영역 내의 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 같이 EU 지수로서도 지칭되는 EU 넘버링 시스템에 따른다.

[0060]

"면역글로불린의 Fc 영역과 동등한 영역"은 면역글로불린의 Fc 영역의 천연 대립형질 변이체뿐만 아니라 치환, 추가 또는 결실을 생성하되 면역글로불린이 효과기 기능(예컨대, 항체 의존적 세포-매개된 세포독성)을 매개하는 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 변형을 갖는 변이체도 포함하기 위한 것이다. 예를 들면, 하나 이상의 아미노산이 생물학적 기능의 실질적 손실 없이 면역글로불린의 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단으로부터 결실될 수 있다. 이러한 변이체는 활성에 대한 최소한의 효과를 갖도록 당분야에서 공지되어 있는 일반적인 규칙에 따라 선택될 수 있다(예를 들면, 문헌(Bowie et al., Science 247, 1306-10 (1990)) 참조).

[0061]

"이종이량체화를 촉진하는 변경"은 폴리펩티드가 동일한 폴리펩티드와 회합하여 동종이량체를 형성하는 것을 감소시키거나 방해하는, 폴리펩티드, 예를 들면, 면역글로불린 중쇄의 펩티드 골격 조작 또는 후-번역 변경이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 이종이량체화를 촉진하는 변경은 특히 이량체를 형성하고자 하는 2개의 폴리펩티드

들 각각에 대해 만들어진 별개의 변경을 포함하고, 이때 상기 변경은 상기 2개의 폴리펩티드들의 회합을 촉진하도록 서로에 대해 상보적이다. 예를 들면, 이중이량체화를 촉진하는 변경은 이량체를 형성하고자 하는 상기 폴리펩티드들 중 하나 또는 둘다의 구조 또는 전하를 변경시킴으로써 그들의 회합을 입체적으로 또는 정전기적으로 유리하게 만들 수 있다. 이중이량체화는 동일하지 않은 2개의 폴리펩티드들, 예컨대, 2개의 면역글로불린 중쇄들 사이에 일어나고, 이때 각각의 중쇄에 융합된 추가 면역접합체 성분(예를 들면, 효과기 잔기)은 동일하지 않다. 본 발명의 면역접합체에서, 이중이량체화를 촉진하는 변경은 면역글로불린의 중쇄(들), 특히 Fc 영역에 존재한다. 일부 실시양태에서, 이중이량체화를 촉진하는 변경은 아미노산 돌연변이, 특히 아미노산 치환을 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 이중이량체화를 촉진하는 변경은 2개의 면역글로불린 중쇄들 각각에서의 별개의 아미노산 돌연변이, 특히 아미노산 치환을 포함한다.

[0062] 항체와 관련하여 사용될 때 용어 "효과기 기능"은 항체 동종형에 따라 달라지는, 항체의 Fc 영역에 기인할 수 있는 생물학적 활성을 지칭한다. 항체 효과기 기능의 예에는 C1q 결합 및 보체 의존적 세포독성(CDC), Fc 수용체 결합, 항체 의존적 세포-매개된 세포독성(ADCC), 항체 의존적 세포성 식세포작용(ADCP), 사이토카인 분비, 항원 제시 세포에 의한 면역 복합체-매개된 항원 섭취, 세포 표면 수용체(예를 들면, B 세포 수용체)의 하향조절 및 B 세포 활성화가 포함된다.

[0063] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "효과기 세포"는 효과기 잔기, 예를 들면, 사이토카인, 및/또는 항체의 Fc 영역에 결합되는 효과기 잔기 수용체, 예를 들면, 사이토카인 수용체 및/또는 Fc 수용체를 그의 표면 상에서 디스플레이하고 표적 세포, 예를 들면, 종양 세포의 파괴에 기여하는 림프구의 집단을 지칭한다. 효과기 세포는 예를 들면, 세포독성 또는 식세포작용 효과를 매개할 수 있다. 효과기 세포는 효과기 T 세포, 예컨대, CD8⁺ 세포독성 T 세포, CD4⁺ 헬퍼 T 세포, $\gamma \delta$ T 세포, NK 세포, 림포카인-활성화된 살해(LAK) 세포 및 대식세포/단핵세포를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 그들의 수용체 발현 패턴에 따라 상이한 효과기 세포 서브세트들, 즉 (a) 특정 효과기 잔기에 대한 수용체를 발현하되 Fc 수용체를 발현하지 않고 본 발명의 면역접합체에 의해 자극되되 본 발명의 항체에 의해서는 자극되지 않는 세포(예를 들면, IL-2 수용체를 발현하는 T 세포); (b) Fc 수용체를 발현하되 특정 효과기 잔기에 대한 수용체를 발현하지 않고 본 발명의 항체에 의해 자극되되 본 발명의 면역접합체에 의해서는 자극되지 않는 세포; 및 (c) Fc 수용체 및 특정 효과기 잔기에 대한 수용체 둘다를 발현하고 본 발명의 항체 및 면역접합체에 의해 동시에 자극되는 세포(예를 들면, Fc γ III 수용체 및 IL-2 수용체를 발현하는 NK 세포)가 존재할 수 있다.

[0064] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "조작한다", "조작된" 및 "조작"은 천연 또는 재조합 폴리펩티드 또는 이의 단편의 임의의 펩티드 골격 조작 또는 번역 후 변경을 포함하는 것으로 간주된다. 조작은 아미노산 서열, 글리코실화 패턴 또는 개별 아미노산의 측쇄 기의 변경뿐만 아니라 이들 방법들의 조합도 포함한다. 특히, 접두어 "당"으로 수식된 "조작"뿐만 아니라 용어 "글리코실화 조작"도 세포에서 발현된 당단백질의 변경된 글리코실화를 달성하기 위한 세포의 글리코실화 기구의 대사 조작(올리고사카라이드 합성 경로의 유전적 조작을 포함함)을 포함한다. 나아가, 글리코실화 조작은 글리코실화에 대한 돌연변이 및 세포 환경의 효과를 포함한다. 한 실시양태에서, 글리코실화 조작은 글리코실트랜스퍼라제 활성의 변경이다. 구체적인 실시양태에서, 조작은 변경된 글루코사아미닐트랜스퍼라제 활성 및/또는 푸코실트랜스퍼라제 활성을 발생시킨다. 글리코실화 조작은 "증가된 GnTIII 활성을 갖는 숙주 세포"(예를 들면, β (1,4)-N-아세틸글루코사아미닐트랜스퍼라제 III(GnTIII) 활성을 갖는 하나 이상의 폴리펩티드를 증가된 수준으로 발현하도록 조작되어 있는 숙주 세포), "증가된 ManII 활성을 갖는 숙주 세포"(예를 들면, α -만노시다제 II(ManII) 활성을 갖는 하나 이상의 폴리펩티드를 증가된 수준으로 발현하도록 조작되어 있는 숙주 세포), 또는 "감소된 α (1,6) 푸코실트랜스퍼라제 활성을 갖는 숙주 세포"(예를 들면, α (1,6) 푸코실트랜스퍼라제를 감소된 수준으로 발현하도록 조작되어 있는 숙주 세포)를 수득하는 데에 이용될 수 있다.

[0065] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "아미노산 돌연변이"는 아미노산 치환, 결실, 삽입 및 변경을 포괄하기 위한 것이다. 최종 구축물이 원하는 특성, 예를 들면, Fc 수용체와의 감소된 결합을 보유하는 한, 최종 구축물에 도달하기 위해 치환, 결실, 삽입 및 변경의 임의의 조합을 만들 수 있다. 아미노산 서열 결실 및 삽입은 아미노산의 아미노-말단 및/또는 카복시-말단 결실 및 삽입을 포함한다. 구체적인 아미노산 돌연변이는 아미노산 치환이다. 예를 들면, Fc 영역의 결합 특성을 변경시키기 위한 목적으로, 비-보존적 아미노산 치환, 즉 한 아미노산을 상이한 구조적 및/또는 화학적 성질을 갖는 또 다른 아미노산으로 교체하는 것이 특히 바람직하다. 아미노산 치환은 비-천연 아미노산에 의한 교체 또는 20종의 표준 아미노산의 천연 아미노산 유도체(예를 들면, 4-하이드록시프롤린, 3-메틸히스티딘, 오르니틴, 호모세린, 5-하이드록시라이신)에 의한 교체를 포함한다. 당

분야에서 잘 공지되어 있는 유전적 또는 화학적 방법을 이용하여 아미노산 돌연변이를 발생시킬 수 있다. 유전적 방법은 부위-지정된 돌연변이유발, PCR, 유전자 합성 등을 포함할 수 있다. 아미노산의 측쇄 기를 유전적 조작 이외의 방법, 예컨대, 화학적 변경으로 변경시키는 방법도 유용할 수 있다고 생각된다. 동일한 아미노산 돌연변이를 표시하기 위해 다양한 표기들이 본원에서 사용될 수 있다. 예를 들면, Fc 영역의 위치 329에서 프롤린을 글리신으로 치환시키는 것은 329G, G329, G₃₂₉, P329G 또는 Pro329Gly로서 표시될 수 있다.

[0066] 기준 폴리펩티드 서열에 대하여 "퍼센트(%) 아미노산 서열 동일성"은 서열들을 정렬하고 필요하다면 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해 갭을 도입하고 임의의 보존적 치환을 서열 동일성의 일부로서 간주하지 않은 후 기준 폴리펩티드 서열의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 퍼센트 아미노산 서열 동일성을 결정하기 위한 정렬은 당분야의 기술 내에 있는 다양한 방식, 예를 들면, 공개적으로 입수가 가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대, BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어를 이용함으로써 달성될 수 있다. 당업자는 비교되는 서열들의 전장에 걸쳐 최대 정렬을 달성하기 위해 필요한 임의의 알고리즘을 포함하는, 서열 정렬을 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적상 % 아미노산 서열 동일성 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2의 이용을 통해 발생된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제넨테크 인코포레이티드(Genentech, Inc.)에 의해 만들어졌고, 소스 코드는 미국 저작권 협회(U.S. Copyright Office, 미국 워싱턴 디씨 20559 소재)에 사용자 문서로 출원되었고, 상기 미국 저작권 협회에서 상기 코드는 미국 저작권 등록 번호 TXU510087 하에 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 제넨테크 인코포레이티드(미국 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 소재)로부터 공개적으로 입수될 수 있거나 상기 소스 코드로부터 편집될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 디지털 UNIX V4.0D를 포함하는 UNIX 작동 시스템 상에서 사용을 위해 편집되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터들은 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되고 변경되지 않는다. ALIGN-2가 아미노산 서열 비교를 위해 사용되는 경우, 주어진 아미노산 서열 B에 대한 주어진 아미노산 서열 A의 % 아미노산 서열 동일성(대안적으로, 주어진 아미노산 서열 B에 대한 특정 % 아미노산 서열 동일성을 갖거나 포함하는 주어진 아미노산 서열 A로서 표현될 수 있음)은 하기 수학적 1과 같이 계산된다:

[0067] [수학적 1]

[0068] 100 곱하기 분율 X/Y

[0069] 상기 식에서,

[0070] X는 A 및 B의 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2 정렬에서 상기 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의해 동일한 일치(match)로서 기록되는 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B에 존재하는 아미노산 잔기의 총 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동등하지 않은 경우, B에 대한 A의 % 아미노산 서열 동일성은 A에 대한 B의 % 아미노산 서열 동일성과 동등하지 않을 것이 인식될 것이다. 달리 구체적으로 명시되어 있지 않은 한, 본원에서 사용된 모든 % 아미노산 서열 동일성 값들은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램의 이용을 통해 바로 이전 단락에 기재된 바와 같이 수득된다.

[0071] 용어 "숙주 세포", "숙주 세포주" 및 "숙주 세포 배양물"은 상호교환적으로 사용되고, 외래 핵산이 도입되어 있는 세포(이러한 세포의 자손을 포함함)를 지칭한다. 숙주 세포는 일차 형질전환된 세포 및 계대배양의 수와 관계없이 이로부터 유래된 자손을 포함하는 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"를 포함한다. 자손은 핵산 함량 면에서 모 세포와 완전히 동일하지 않을 수 있으나 돌연변이를 함유할 수 있다. 원래의 형질전환된 세포에서 스크리닝되거나 선별된 기능 또는 생물학적 활성과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이체 자손이 여기에 포함된다. 숙주 세포는 본 발명을 위해 사용되는 항체 및 면역접합체를 발생시키는 데에 사용될 수 있는 임의의 유형의 세포 시스템이다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 변경된 올리고사카라이드를 갖는 항체를 생성하도록 조작된다. 특정 실시양태에서, 숙주 세포는 β (1,4)-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III(GnTIII) 활성을 갖는 하나 이상의 폴리펩티드를 증가된 수준으로 발현하도록 조작되어 있다. 특정 실시양태에서, 숙주 세포는 α -만노시다제 II(ManII) 활성을 갖는 하나 이상의 폴리펩티드를 증가된 수준으로 발현하도록 더 조작되어 있다. 숙주 세포는 배양된 세포, 예를 들면, 배양된 포유동물 세포, 예컨대, 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 세포뿐만 아니라, 형질전환 동물, 형질전환 식물 또는 배양된 식물 또는 동물 조직 내에 포함된 세포도 포함한다.

[0072] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드"는 N-아세틸글루코사민(GlcNAc) 잔기를 N-연결된 올리고사카라이드의 트라이만노실 코어의 β -연결된 만노사이드에 β -1,4 연결로 추가하는 것을 촉매작용할 수 있는 폴리펩티드를 지칭한다. 이것은 용량 의존성을 갖거나 갖지 않으면서 특정 생물학적 분석에서 측

정될 때 국제 생화학 및 분자생물학 명명위원회(NC-IUBMB)에 따라 β -1,4-만노실-당단백질 4- β -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제(EC 2.4.1.144)로서도 공지되어 있는 β (1,4)-N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III의 활성과 유사한(그러나, 반드시 동일하지는 않는) 효소 활성을 나타내는 융합 폴리펩티드를 포함한다. 용량 의존성이 존재하는 경우, 이 용량 의존성은 GnTIII의 용량 의존성과 동일할 필요는 없고 오히려 GnTIII과 비교시 주어진 활성에서의 용량 의존성과 실질적으로 유사하다(즉, 후보 폴리펩티드는 GnTIII에 비해 상대적으로 보다 더 큰 활성 또는 약 25배 이하, 바람직하게는 약 10배 이하의 활성, 가장 바람직하게는 약 3배 이하의 활성을 나타낼 것이다). 특정 실시양태에서, GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드는 GnTIII의 촉매 도메인 및 이종 골지(Golgi) 체류 폴리펩티드의 골지 편재화 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드이다. 특히, 골지 편재화 도메인은 만노시다제 II 또는 GnTI의 편재화 도메인, 가장 특히 만노시다제 II의 편재화 도메인이다. 대안적으로, 골지 편재화 도메인은 만노시다제 I의 편재화 도메인, GnTII의 편재화 도메인 및 α 1,6 코어 푸코실트랜스퍼라제의 편재화 도메인으로 구성된 군으로부터 선택된다. 이러한 융합 폴리펩티드를 발생시키는 방법 및 증가된 효과기 기능을 갖는 항체를 제조하기 위해 이러한 융합 폴리펩티드를 사용하는 방법은 국제 특허출원 공개 제WO 2004/065540호, 미국 특허출원 제60/495,142호 및 미국 특허출원 공개 제2004/0241817호(이들의 전체 내용은 명백히 본원에 참고로 도입됨)에 개시되어 있다.

[0073] 본원에서 사용된 바와 같이, "골지 편재화 도메인"은 폴리펩티드를 골지 복합체 내의 위치에 고착시키는 것을 담당하는 골지 체류 폴리펩티드의 아미노산 서열을 지칭한다. 일반적으로, 편재화 도메인은 효소의 아미노-말단 "꼬리"를 포함한다.

[0074] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "ManII 활성을 갖는 폴리펩티드"는 N-연결된 올리고사카라이드의 분지된 GlcNAcMan₅GlcNAc₂ 만노스 중간체에서 말단 1,3-연결된 α -D-만노스 잔기 및 1,6-연결된 α -D-만노스 잔기의 가수분해를 촉매작용할 수 있는 폴리펩티드를 지칭한다. 이것은 국제 생화학 및 분자생물학 명명위원회(NC-IUBMB)에 따라 만노실 올리고사카라이드 1,3-1,6- α -만노시다제 II(EC 3.2.1.114)로서도 공지되어 있는 골지 α -만노시다제 II의 활성과 유사한(그러나, 반드시 동일하지는 않는) 효소 활성을 나타내는 폴리펩티드를 포함한다.

[0075] "활성화 Fc 수용체"는 항체의 Fc 영역에 의한 개입 후 효과기 기능을 수행하도록 수용체 보유 세포를 자극하는 신호전달 사건을 이끌어내는 Fc 수용체이다. 활성화 Fc 수용체는 Fc γ RIIIa(CD16a), Fc γ RI(CD64), Fc γ RIIa(CD32) 및 Fc α RI(CD89)를 포함한다.

[0076] 항체 의존적 세포-매개된 세포독성(ADCC)은 면역 효과기 세포에 의한 항체-코팅된 표적 세포의 용해를 유발하는 면역 기작이다. 표적 세포는 Fc 영역을 포함하는 항체 또는 이의 단편이 일반적으로 Fc 영역의 N-말단에 위치하는 단백질 부분을 통해 특이적으로 결합하는 세포이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "증가된/감소된 ADCC"는 상기 정의된 ADCC의 기작에 의해 표적 세포를 둘러싸는 매질 중의 항체의 주어진 농도에서 주어진 시간 이내에 용해되는 표적 세포 수의 증가/감소, 및/또는 ADCC의 기작에 의해 주어진 시간 이내에 주어진 수의 표적 세포의 용해를 달성하는 데에 요구되는, 표적 세포를 둘러싸는 매질 중의 항체의 농도의 감소/증가로서 정의된다. ADCC의 증가/감소는 동일한 표준 제조, 정제, 제제화 및 저장 방법(당업자에게 공지되어 있음)을 이용함으로써 동일한 유형의 숙주 세포에 의해 제조되었으나 조작되어 있지 않은 동일한 항체에 의해 매개된 ADCC에 비해 상대적인 증가/감소이다. 예를 들면, 본원에 기재된 방법에 의해 변경된 글리코실화 패턴을 갖도록(예를 들면, 글리코실트랜스퍼라제인 GnTIII 또는 다른 글리코실트랜스퍼라제를 발현하도록) 조작된 숙주 세포에 의해 생성된 항체에 의해 매개된 ADCC의 증가는 동일한 유형의 비-조작된 숙주 세포에 의해 생성된 동일한 항체에 의해 매개된 ADCC에 비해 상대적인 증가이다.

[0077] "증가된/감소된 항체 의존적 세포-매개된 세포독성(ADCC)을 갖는 항체"는 당업자에게 공지되어 있는 임의의 적합한 방법에 의해 측정될 때 증가된/감소된 ADCC를 갖는 항체를 의미한다. 하나의 허용된 시험관내 ADCC 분석은 다음과 같다:

[0078] 1) 상기 분석은 항체의 항원 결합 영역에 의해 인식되는 표적 항원을 발현하는 것으로 공지되어 있는 표적 세포를 사용하고;

[0079] 2) 상기 분석은 무작위적으로 선택된 건강한 공여자의 혈액으로부터 단리된 인간 말초 혈액 단핵세포(PBMC)를 효과기 세포로서 사용하고;

[0080] 3) 상기 분석은 하기 프로토콜에 따라 수행되고:

- [0081] i) 표준 밀도 원심분리 절차를 이용하여 PBMC를 분리하고 RPMI 세포 배양 배지에 5×10^6 개 세포/ml의 밀도로 현탁하고,
- [0082] ii) 표적 세포를 표준 조직 배양 방법으로 성장시키고, 90% 초과와 생존율을 갖는 대수 성장기로부터 수거하고, RPMI 세포 배양 배지로 세척하고, 100 마이크로큐리의 ^{51}Cr 로 표지하고, 세포 배양 배지로 2회 세척하고, 10^5 개 세포/ml의 밀도로 세포 배양 배지에 재현탁하고,
- [0083] iii) 100 μl 의 상기 최종 표적 세포 현탁액을 96웰 마이크로타이터 플레이트의 각각의 웰로 옮기고,
- [0084] iv) 항체를 세포 배양 배지로 4000 ng/ml부터 0.04 ng/ml까지 연속 희석하고, 상기 전체 농도 범위를 커버하는 다양한 항체 농도로 3회 반복 시험하도록 50 μl 의 발생된 항체 용액을 96웰 마이크로타이터 플레이트 내의 표적 세포에 첨가하고,
- [0085] v) 최대 방출(MR) 대조군을 위해, 표지된 표적 세포를 함유하는 상기 플레이트의 3개 추가 웰은 항체 용액(상기 iv) 대신에 50 μl 의 2%(부피/부피) 비-이온성 세제 수용액(노니데트(Nonidet), 시그마(Sigma), 미국 세인트 루이스 소재)을 제공받고,
- [0086] v) 자발적 방출(SR) 대조군을 위해, 표지된 표적 세포를 함유하는 상기 플레이트의 3개 추가 웰은 항체 용액(상기 iv) 대신에 50 μl 의 RPMI 세포 배양 배지를 제공받고,
- [0087] vii) 96웰 마이크로타이터 플레이트를 1분 동안 $50 \times g$ 에서 원심분리하고 4°C에서 1시간 동안 항온처리하고,
- [0088] viii) 50 μl 의 PBMC 현탁액(상기 i)을 각각의 웰에 첨가하여 25:1의 효과기:표적 세포 비를 발생시키고, 플레이트를 37°C에서 4시간 동안 5% CO_2 대기 하에서 항온처리에 넣고,
- [0089] ix) 각각의 웰로부터 세포 무함유 상청액을 수거하고 감마 카운터를 이용하여 실험적으로 방출된 방사성(ER)을 정량하고,
- [0090] x) 수학적 $(\text{ER}-\text{MR})/(\text{MR}-\text{SR}) \times 100$ 에 따라 각각의 항체 농도에 대해 특이적 용해의 백분율을 계산하는데, 이때 ER은 그 항체 농도에 대해 정량된 평균 방사성이고(상기 ix 참조), MR은 MR 대조군(상기 v 참조)에 대해 정량된 평균 방사성(상기 ix 참조)이고, SR은 SR 대조군(상기 vi 참조)에 대해 정량된 평균 방사성(상기 ix 참조)이고;
- [0091] 4) "증가된/감소된 ADCC"는 상기 시험된 항체 농도 범위 내에서 관찰된 특이적 용해의 최대 백분율의 증가/감소, 및/또는 상기 시험된 항체 농도 범위 내에서 관찰된 특이적 용해의 최대 백분율의 절반을 달성하는데에 요구되는 항체의 농도의 감소/증가로서 정의된다. ADCC의 증가/감소는 당업자에게 공지되어 있는 동일한 표준 제조, 정제, 제제화 및 저장 방법을 이용함으로써 동일한 종류의 숙주 세포에 의해 생성되었으나 조작되어 있지 않은 동일한 항체에 의해 매개된, 상기 분석으로 측정된 ADCC에 비해 상대적인 증가/감소이다.
- [0092] 본원에서 사용된 바와 같이, "조합"(및 이의 문법적 어미변화, 예컨대, "조합한다" 또는 "조합하는")은 본 발명에 따른 면역접합체와 항체의 조합을 포괄하고, 이때 상기 면역접합체 및 항체가 체내에서 그들의 생물학적 효과를 동시에 발휘할 수 있는, 즉 동시에 효과기 세포를 자극할 수 있는 한, 상기 면역접합체 및 항체는 동일한 또는 상이한 약학 제제로 동일한 또는 상이한 용기에 존재하고, 함께 투여되거나 동시에 또는 임의의 순서로 순차적으로 별도로 투여되고 동일한 또는 상이한 경로에 의해 투여된다. 예를 들면, 본 발명에 따른 면역접합체와 항체의 "조합"은 특정 약학 제제 중의 면역접합체를 먼저 투여한 후 또 다른 약학 제제 중의 항체를 투여하는 것, 또는 특정 약학 제제 중의 항체를 먼저 투여한 후 또 다른 약학 제제 중의 면역접합체를 투여하는 것을 의미할 수 있다.
- [0093] 약제의 "유효량"은 이 약제가 투여되는 세포 또는 조직에서 생리학적 변화를 발생시키기 위해 필요한 양을 지칭한다.
- [0094] 약제, 예를 들면, 약학 조성물의 "치료 유효량"은 필요한 시간 동안 필요한 용량에서 원하는 치료 또는 예방 결과를 달성하기에 효과적인 양을 지칭한다. 치료 유효량의 약제는 예를 들면, 질환의 불리한 효과를 제거하거나, 감소시키거나, 지연시키거나, 최소화하거나 방지한다. 여러 활성 성분들의 조합물의 치료 유효량은 활성 성분 각각의 치료 유효량일 수 있다. 대안적으로, 치료에 의해 야기된 부작용을 감소시키기 위해, 여러 활성 성분들의 조합물의 치료 유효량은 추가적, 부가적 또는 상승작용적 효과를 생성하기에 효과적이고 조합될 때 치료적으로 효과적이지만 이들이 단독으로 사용되는 경우 1개 또는 수개의 활성 성분의 치료량보다 적은 치료량일 수 있는 개별 활성 성분의 양일 수 있다.

- [0095] "개체" 또는 "대상체"는 포유동물이다. 포유동물은 사육 동물(예를 들면, 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류(예를 들면, 인간 및 비-인간 영장류, 예컨대, 원숭이), 토끼 및 설치류(예를 들면, 마우스 및 래트)를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 특히, 개체 또는 대상체는 인간이다.
- [0096] 용어 "약학 조성물"은 내부에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적이게 하는 형태로 존재하고 제제가 투여될 대상체에게 허용불가능한 독성을 나타내는 추가 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다.
- [0097] 용어 "약학적으로 허용가능한 담체"는 대상체에게 독성을 나타내지 않는, 약학 제제 중의 활성 성분 이외의 성분을 지칭한다. 약학적으로 허용가능한 담체는 완충제, 부형제, 안정화제 또는 보존제를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0098] 본원에서 사용된 바와 같이, "치료"(및 이의 문법적 어미변화, 예컨대, "치료한다" 또는 "치료하는")는 치료되는 개체에서의 질환의 자연 경과를 변경시키기 위한 시도에서의 임상 시술을 지칭하고, 예방을 위해 또는 임상 병리의 과정 동안 수행될 수 있다. 바람직한 치료 효과는 질환의 발생 또는 재발의 예방, 증상의 완화, 질환의 임의의 직접적인 또는 간접적인 병리학적 결과의 감소, 전이의 예방, 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 호전 또는 경감, 및 관해 또는 개선된 예후를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 조합물은 질환의 발달을 지연시키거나 질환의 진행을 늦추기 위해 사용된다.
- [0099] 용어 "포장 삽입물"은 치료 제품의 상업적 포장물 내에 통상적으로 포함되는 설명서로서, 증상, 용법, 용량, 투여, 병용 치료, 사용금지사유, 및/또는 이러한 치료 제품의 사용에 관한 경고에 대한 정보를 함유하는 설명서를 지칭하기 위해 사용된다.
- [0100] **면역접합체**
- [0101] 본 발명에서 유용한 면역접합체는 상응하는 비-조작된 항체와 비교시 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된 항체 및 효과기 잔기를 포함하는 폴리펩티드 분자이다.
- [0102] 상기 면역접합체는 효과기 잔기를 항체에 화학적으로 접합시키거나 효과기 잔기 및 항체를 융합 단백질로서 발현시킴으로써 제조될 수 있다(예를 들면, 문헌(Nakamura and Kubo, Cancer 80, 2650-2655 (1997)) 및 문헌(Becker et al., Proc Natl Acad Sci USA 93, 7826-7831 (1996)) 참조). 본 발명에서 사용되기 위해, 융합 단백질로서 발현된 면역접합체가 일반적으로 바람직하다. 따라서, 특정 실시양태에서, 효과기 잔기는 항체와 아미노-말단 또는 카복시-말단 펩티드 결합을 공유한다(즉, 면역접합체는 융합 단백질이다). 이러한 면역접합체에서, 효과기 잔기는 예를 들면, 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄에 융합될 수 있다. 전장 IgG 클래스 항체, 특히 전장 IgG₁ 서브클래스 항체를 포함하는 면역접합체가 본 발명에 특히 유용하다.
- [0103] 한 실시양태에서, 효과기 잔기는 단일 쇠 효과기 잔기이다. 한 실시양태에서, 효과기 잔기는 사이토카인이다. 면역접합체의 항체 및 효과기 잔기는 본원에 상세히 기술된 또는 후술된 항체 및 효과기 잔기를 포함한다. 면역접합체의 항체는 다양한 표적 분자들(예를 들면, 종양 세포 또는 종양 간질 상에서 발현된 단백질 분자 상의 항원성 결정인자)에 대해 유도될 수 있다. 항체의 비-한정적 예는 본원에 기재되어 있다. 본원에 기재된 특히 유용한 면역접합체는 전형적으로 하기 성질들 중 하나 이상의 성질을 나타낸다: 특히 동일한 항원성 결정인자를 표적화하고 동일한 효과기 잔기를 보유하는 상이한 배열의 면역접합체와 비교시 높은 작용 특이성, 감소된 독성, 우수한 제조가능성 및/또는 개선된 안정성. 본 발명에서 사용되는 구체적인 면역접합체는 국제 특허출원 공개 제WO 2012/146628호(이의 전체 내용은 본원에 참고로 도입됨)에 더 기재되어 있다.
- [0104] **면역접합체 포맷**
- [0105] 국제 특허출원 공개 제WO 2012/146628호에 기재된 면역접합체는 1개 이하의 효과기 잔기를 포함한다. 따라서, 구체적인 실시양태에서, 본 발명에서 사용되는 면역접합체는 1개 이하의 효과기 잔기를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 효과기 잔기는 단일 쇠 효과기 잔기이다. 본 발명에 따른 면역접합체에 포함되는 항체는 특히 전장 IgG 클래스 항체, 보다 특히 전장 IgG₁ 서브클래스 항체이다. 한 실시양태에서, 항체는 인간 항체이다. 다른 실시양태에서, 항체는 인간화된 또는 키메라 항체이다. 한 실시양태에서, 항체는 인간 Fc 영역, 보다 특히 인간 IgG Fc 영역, 가장 특히 인간 IgG₁ Fc 영역을 포함한다. 본 발명에 유용한 항체는 서열번호 124에 기재된 인간 Ig γ -1 중쇄 불변 영역을 포함할 수 있다(즉, 상기 항체는 인간 IgG₁ 서브클래스의 항체이다).
- [0106] 한 실시양태에서, 효과기 잔기는 항체와 아미노-말단 또는 카복시-말단 펩티드 결합을 공유한다. 한 실시양태에서, 면역접합체는 본질적으로 하나 이상의 펩티드 연결체에 의해 연결된 효과기 잔기 및 항체, 특히 IgG 클레

스 항체, 보다 특히 IgG₁ 서브클래스 항체로 구성된다. 구체적인 실시양태에서, 효과기 잔기는 그의 아미노-말단 아미노산에서 임의적으로 펩티드 연결제를 통해 면역글로불린 중쇄들 중 한 중쇄의 카복시-말단 아미노산에 융합된다.

[0107] 특정 실시양태에서, 특히 면역접합체가 단일 효과기 잔기만을 포함하는 경우, 항체는 동일하지 않은 2개의 면역글로불린 중쇄들의 이중이량체화를 촉진하는 변형을 Fc 영역 내에 포함한다. 인간 IgG Fc 영역의 2개 폴리펩티드 쇠들 사이의 가장 광범위한 단백질-단백질 상호작용 부위는 Fc 영역의 CH3 도메인에 존재한다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 변형은 Fc 영역의 CH3 도메인에 존재한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 변형은 면역글로불린 중쇄들 중 한 중쇄 내에 놓 변형을 포함하고 면역글로불린 중쇄들 중 나머지 한 중쇄 내에 홀 변형을 포함하는 놓-인투-홀 변형이다. 놓-인투-홀 기술은 예를 들면, 미국 특허 제5,731,168호, 미국 특허 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 돌출부가 캐비티에 위치하여 이중이량체 형성을 촉진하고 동중이량체 형성을 방해하도록 돌출부("놓")를 제1 폴리펩티드의 계면에서 도입하고 상응하는 캐비티("홀")를 제2 폴리펩티드의 계면에서 도입하는 것을 포함한다. 돌출부는 제1 폴리펩티드의 계면의 작은 아미노산 측쇄를 보다 큰 측쇄(예를 들면, 티로신 또는 트립토판)로 교체함으로써 구축된다. 돌출부와 동일한 또는 유사한 크기의 보상 캐비티는 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 아미노산 측쇄(예를 들면, 알라닌 또는 스레오닌)로 교체함으로써 제2 폴리펩티드의 계면에서 생성된다. 돌출부 및 캐비티는 예를 들면, 부위 특이적 돌연변이유발 또는 펩티드 합성으로 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 변형시킴으로써 만들어질 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 놓 변형은 2개의 면역글로불린 중쇄들 중 한 중쇄 내의 아미노산 치환 T366W를 포함하고, 홀 변형은 2개의 면역글로불린 중쇄들 중 나머지 한 중쇄 내의 아미노산 치환 T366S, L368A 및 Y407V를 포함한다(카바트 넘버링). 추가 구체적인 실시양태에서, 놓 변형을 포함하는 면역글로불린 중쇄는 아미노산 치환 S354C를 추가로 포함하고, 홀 변형을 포함하는 면역글로불린 중쇄는 아미노산 치환 Y349C를 추가로 포함한다. 이들 2개의 시스템인 잔기들의 도입은 이량체를 더 안정화시키는, 2개의 중쇄들 사이의 다이설파이드 가교의 형성을 야기한다(Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).

[0108] 구체적인 실시양태에서, 효과기 잔기는 놓 변형을 포함하는 면역글로불린 중쇄의 카복시-말단 아미노산에 연결된다.

[0109] 대안적 실시양태에서, 동일하지 않은 2개의 폴리펩티드 쇠들의 이중이량체화를 촉진하는 변형은 예를 들면, 국제 특허출원 공개 제WO 2009/089004호에 기재된 바와 같은, 정전기 조종 효과를 매개하는 변형을 포함한다. 일반적으로, 이 방법은 동중이량체 형성이 정전기적으로 불리하게 되는 반면, 이중이량체화가 정전기적으로 유리하게 되도록 2개의 폴리펩티드 쇠들의 계면에서 하나 이상의 아미노산 잔기를 하전된 아미노산 잔기로 교체하는 것을 포함한다.

[0110] Fc 영역은 표적 조직에서의 우수한 축적 및 유리한 조직-혈액 분포 비에 기여하는 긴 혈청 반감기를 비롯한 유리한 약동학적 성질을 면역접합체에게 부여한다. 그러나, 동시에 Fc 영역은 바람직하지 않은 표적화를 초래할 수 있다. 나아가, Fc 수용체 신호전달 경로의 동시활성화는 전신 투여 시 면역접합체의 효과기 잔기 및 긴 반감기와 함께 사이토카인 수용체의 과도한 활성화 및 심각한 부작용을 초래하는 사이토카인 방출을 유발할 수 있다. 이것과 일치하여, 통상적인 IgG-IL2 면역접합체는 주입 반응과 관련되어 있는 것으로 기재되어 있다(예를 들면, 문헌(King et al., J Clin Oncol 22, 4463-4473 (2004)) 참조).

[0111] 따라서, 면역접합체에 포함된 항체는 상응하는 비-조작된 항체와 비교시 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된다. 구체적인 실시양태에서, 감소된 효과기 기능은 활성화 Fc 수용체와의 감소된 결합이다. 이러한 한 실시양태에서, 항체는 활성화 Fc 수용체에 대한 면역접합체의 결합 친화성을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 그의 Fc 영역 내에 포함한다. 전형적으로, 동일한 하나 이상의 아미노산 돌연변이는 2개의 면역글로불린 중쇄 각각에 존재한다. 한 실시양태에서, 상기 아미노산 돌연변이는 활성화 Fc 수용체에 대한 면역접합체의 결합 친화성을 2배 이상, 5배 이상 또는 10배 이상까지 감소시킨다. 활성화 Fc 수용체에 대한 면역접합체의 결합 친화성을 감소시키는 하나 초과인 아미노산 돌연변이가 존재하는 실시양태에서, 이들 아미노산 돌연변이들의 조합은 활성화 Fc 수용체에 대한 면역접합체의 결합 친화성을 10배 이상, 20배 이상 또는 심지어 50배 이상까지 감소시킬 수 있다. 한 실시양태에서, 조작된 항체를 포함하는 면역접합체는 비-조작된 항체를 포함하는 면역접합체와 비교시 활성화 Fc 수용체에 대한 20% 미만, 특히 10% 미만, 보다 특히 5% 미만의 결합 친화성을 나타낸다. 구체적인 실시양태에서, 활성화 Fc 수용체는 Fc γ 수용체, 보다 특히 Fc γ RIIIa, Fc γ RI 또는 Fc

γ RIIa 수용체이다. 바람직하게는, 이들 수용체 각각과의 결합이 감소된다. 일부 실시양태에서, 보체 성분에 대한 결합 친화성, 특히 C1q에 대한 결합 친화성도 감소된다. 한 실시양태에서, 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 결합 친화성은 감소되지 않는다. FcRn과의 실질적으로 유사한 결합, 즉 상기 수용체에 대한 항체의 결합 친화성의 보존은 항체(또는 상기 항체를 포함하는 면역접합체)가 FcRn에 대한 비-조작된 형태의 항체(또는 상기 비-조작된 형태의 항체를 포함하는 면역접합체)의 결합 친화성의 약 70%보다 더 큰 결합 친화성을 나타낼 때 달성된다. 항체 또는 상기 항체를 포함하는 면역접합체는 이러한 친화성의 약 80%보다 더 큰, 심지어 약 90%보다 더 큰 친화성을 나타낼 수 있다. 한 실시양태에서, 아미노산 돌연변이는 아미노산 치환이다. 한 실시양태에서, 항체, 특히 인간 IgG₁ 서브클래스 항체는 면역글로불린 중쇄의 위치 P329에서 아미노산 치환을 포함한다(카바트 넘버링). 보다 구체적인 실시양태에서, 아미노산 치환은 P329A 또는 P329G, 특히 P329G이다. 한 실시양태에서, 항체는 면역글로불린 중쇄의 S228, E233, L234, L235, N297 및 P331로부터 선택된 위치에서 추가 아미노산 치환을 포함한다. 보다 구체적인 실시양태에서, 추가 아미노산 치환은 S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D 또는 P331S이다. 구체적인 실시양태에서, 항체는 면역글로불린 중쇄의 위치 P329, L234 및 L235에서 아미노산 치환을 포함한다(카바트 넘버링). 보다 구체적인 실시양태에서, 항체는 면역글로불린 중쇄 내에 아미노산 치환 L234A, L235A 및 P329G(LALA P329G)를 포함한다. 아미노산 치환들의 이 조합은 거의 특히 인간 IgG 분자의 Fc γ 수용체 결합을 효과적으로 제거하므로, 온전히 그대로 본원에 참고로 도입되는 국제 특허출원 공개 제WO 2012/130831호에 기재된 바와 같이 항체 의존적 세포-매개된 세포독성(ADCC)을 비롯한 효과기 기능을 감소시킨다. 국제 특허출원 공개 제WO 2012/130831호에는 이러한 돌연변이체 항체를 제조하는 방법, 및 그의 성질, 예컨대, Fc 수용체 결합 또는 효과기 기능을 측정하는 방법도 기재되어 있다.

[0112] 돌연변이체 항체는 당분야에서 잘 공지되어 있는 유전적 또는 화학적 방법을 이용한 아미노산 결실, 치환, 삽입 또는 변경에 의해 제조될 수 있다. 유전적 방법은 코딩 DNA 서열의 부위 특이적 돌연변이유발, PCR, 유전자 합성 등을 포함할 수 있다. 정확한 뉴클레오타이드 변화는 예를 들면, 서열결정에 의해 검증될 수 있다.

[0113] Fc 수용체와의 결합은 예를 들면, ELISA에 의해, 또는 표준 기계, 예컨대, 비아코어 기계(지이 헬쓰케어)를 이용한 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 용이하게 측정될 수 있고, Fc 수용체는 예컨대, 재조합 발현에 의해 수득될 수 있다. 적합한 이러한 결합 분석은 본원에 기재되어 있다. 대안적으로, 특정 Fc 수용체를 발현하는 것으로 공지되어 있는 세포주, 예컨대, Fc γ IIIa 수용체를 발현하는 NK 세포를 사용하여 Fc 수용체에 대한 항체 또는 항체를 포함하는 면역접합체의 결합 친화성을 평가할 수 있다.

[0114] 일부 실시양태에서, 면역접합체의 항체는 비-조작된 항체와 비교시 감소된 효과기 기능, 특히 감소된 ADCC를 갖도록 조작된다. 항체 또는 항체를 포함하는 면역접합체의 효과기 기능은 당분야에서 공지되어 있는 방법에 의해 측정될 수 있다. ADCC를 측정하기에 적합한 분석은 본원에 기재되어 있다. 관심 있는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 분석의 다른 예는 미국 특허 제5,500,362호, 문헌(Hellstrom et al. Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986)), 문헌(Hellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985)), 미국 특허 제5,821,337호 및 문헌(Bruggemann et al., J Exp Med 166, 1351-1361 (1987))에 기재되어 있다. 대안적으로, 비-방사성 분석 방법이 이용될 수 있다(예를 들면, 유동세포측정을 위한 ACT1™ 비-방사성 세포독성 분석(셀테크놀로지 인코포레이티드(CellTechnology, Inc.), 미국 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재), 및 사이토독스(CytoTox) 96® 비-방사성 세포독성 분석(프로메가(Promega), 미국 위스콘신주 매디슨 소재) 참조). 이러한 분석을 위한 유용한 효과기 세포는 말초 혈액 단핵세포(PBMC) 및 천연 살해(NK) 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 관심 있는 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예를 들면, 동물 모델, 예컨대, 문헌(Clynes et al., Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998))에 개시된 동물 모델에서 평가될 수 있다.

[0115] 일부 실시양태에서, 항체와 보체 성분, 특히 C1q의 결합이 변경된다. 따라서, 항체가 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작되어 있는 일부 실시양태에서, 상기 감소된 효과기 기능은 감소된 CDC를 포함한다. C1q 결합 분석은 면역접합체가 C1q에 결합하여 CDC 활성을 가질 수 있는지를 확인하기 위해 수행될 수 있다. 예를 들면, 국제 특허출원 공개 제WO 2006/029879호 및 국제 특허출원 공개 제WO 2005/100402호에 기재된 C1q 및 C3c 결합 ELISA를 참조한다. 보체 활성화를 평가하기 위해, CDC 분석을 수행할 수 있다(예를 들면, 문헌(Gazzano-Santoro et al., J Immunol Methods 202, 163 (1996)), 문헌(Cragg et al., Blood 101, 1045-1052 (2003)) 및 문헌(Cragg and Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004)) 참조).

[0116] 일부 실시양태에서, 면역접합체는 효과기 잔기와 항체 사이에 위치한 하나 이상의 단백질을 해설 절단 부위를 포함한다. 면역접합체의 성분들은 직접적으로 연결될 수 있거나, 다양한 연결제, 특히 본원에 기재되어 있거나 당분야에서 공지되어 있는 하나 이상의 아미노산, 전형적으로 약 2개 내지 20개의 아미노산을 포함하는 펩티드

연결제를 통해 연결될 수 있다. 적합한 비-면역원성 펩티드 연결제는 예를 들면, $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$ 또는 $G_4(SG_4)_n$ (이때, n 은 일반적으로 1 내지 10, 전형적으로 2 내지 4의 수임) 펩티드 연결제를 포함한다.

[0117] 면역접합체의 항체

[0118] 본 발명의 면역접합체의 항체는 일반적으로 특이적 항원성 결정인자에 결합하고 그 자신에 부착된 물질(예를 들면, 효과기 잔기)를 표적 부위, 예를 들면, 상기 항원성 결정인자를 보유하는 특정 유형의 종양 세포 또는 종양 간질로 향하게 할 수 있는 면역글로불린 분자이다. 면역접합체는 예를 들면, 종양 세포의 표면, 바이러스-감염된 세포의 표면 또는 다른 병든 세포의 표면 상에서 발견된 항원성 결정인자, 혈액 혈청에 자유로운 상태로 존재하는 항원성 결정인자 및/또는 세포외 매트릭스(ECM)에 존재하는 항원성 결정인자에 결합할 수 있다. 종양 항원의 비-한정적 예에는 하기 항원들이 포함된다: MAGE, MART-1/Melan-A, gp100, 다이펩티드 펩티다제 IV(DPPIV), 아데노신 데아미나제 결합 단백질(ADAbp), 사이클로필린 b, 대장 관련 항원(CRC)-C017-1A/GA733, 암배아 항원(CEA) 및 그의 면역원성 에피토프 CAP-1 및 CAP-2, etv6, aml1, 전립선 특이적 항원(PSA) 및 그의 면역원성 에피토프 PSA-1, PSA-2 및 PSA-3, 전립선 특이적 막 항원(PSMA), T 세포 수용체/CD3-제타 쌍, 종양 항원의 MAGE-패밀리(예를 들면, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2(MAGE-B2), MAGE-Xp3(MAGE-B3), MAGE-Xp4(MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), 종양 항원의 GAGE-패밀리(예를 들면, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, 티로시나제, p53, MUC 패밀리, HER2/neu, p21ras, RCAS1, α -테아단백질, E-캐드헤린(cadherin), α -카테닌(catenin), β -카테닌 및 γ -카테닌, p120ctn, gp100 Pmel117, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, 선종성 결장 용종증 단백질(APC), 포드린(fodrin), 콘넥신(Connexin) 37, Ig-이디오타입(idiotype), p15, gp75, GM2 및 GD2 ganglioside, 바이러스 생성물, 예컨대, 인간 유두종 바이러스 단백질, 종양 항원의 Smad 패밀리, Imp-1, P1A, EBV-코딩된 핵 항원(EBNA)-1, 뇌 글리코겐 포스포릴라제, SSX-1, SSX-2(HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 및 CT-7, 및 c-erbB-2. 바이러스 항원의 비-한정적 예에는 인플루엔자 바이러스 핵 구성요소, 엡스테인-바 바이러스 LMP-1, C형 간염 바이러스 E2 당단백질, HIV gp160, 및 HIV gp120이 포함된다. ECM 항원의 비-한정적 예에는 신데칸(syndecan), 헤파라나제(heparanase), 인테그린(integrin), 오스테오펀틴(osteopontin), 링크(link), 캐드헤린, 라미닌(laminin), 라미닌 유형 EGF, 렉틴(lectin), 피브로넥틴(fibronectin), 노취(notch), 테나신(tenascin), 및 매트릭신(matrixin)이 포함된다. 본 발명의 면역접합체는 세포 표면 항원의 하기 구체적인 비-한정적 예에 결합할 수 있다: FAP, Her2, EGFR, IGF-1R, CD2(T 세포 표면 항원), CD3(TCR과 관련된 이종다량체), CD22(B 세포 수용체), CD23(저친화성 IgE 수용체), CD25(IL-2 수용체 α 쌍), CD30(사이토카인 수용체), CD33(골수 세포 표면 항원), CD40(종양 괴사 인자 수용체), IL-6R(IL6 수용체), CD20, MCSP, c-Met, CUB 도메인 함유 단백질-1(CDCP1), 및 PDGF β R (β 혈소판 유래의 성장인자 수용체).

[0119] 특정 실시양태에서, 항체는 종양 세포 상에서 또는 종양 세포 환경에서 제시된 항원에 대해 유도된다. 구체적인 실시양태에서, 항체는 섬유모세포 활성화 단백질(FAP), 테나신-C의 A1 도메인(TNC A1), 테나신-C의 A2 도메인(TNC A2), 피브로넥틴의 엑스트라 도메인 B(EDB), 암배아 항원(CEA) 및 흑색종 관련 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸(MCSP)으로 구성된 군으로부터 선택된 항원에 대해 유도된다.

[0120] 항체는 항원성 결정인자와의 특이적 결합을 보유하고 Fc 영역을 포함하는 임의의 유형의 항체 또는 이의 단편일 수 있다. 한 실시양태에서, 항체는 전장 항체이다. 특히 바람직한 항체는 IgG 클래스, 특히 IgG₁ 서브클래스의 면역글로불린이다.

[0121] 한 실시양태에서, 면역접합체는 테나신의 A1 도메인 및/또는 A4 도메인(TNC-A1, TNC-A4 또는 TNC-A1/A4)에 대한 특이성을 나타내는 항체를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 면역접합체의 항체는 서열번호 8 또는 서열번호 9와 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 중쇄 가변 영역 서열, 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 면역접합체의 항체는 서열번호 6 또는 서열번호 7과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 경쇄 가변 영역 서열, 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체를 포함한다. 보다 구체적인 실시양태에서, 면역접합체의 항체는 서열번호 8 또는 서열번호 9와 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 중쇄 가변 영역 서열, 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체; 및 서열번호 6 또는 서열번호 7과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 경쇄 가변 영역 서열, 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체를 포함한다.

[0122] 한 실시양태에서, 면역접합체는 테나신의 A2 도메인(TNC-A2)에 대한 특이성을 나타내는 항체를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 면역접합체의 항체는 서열번호 5, 서열번호 71, 서열번호 73, 서열번호 75, 서열번호 77,

서열번호 79, 서열번호 81, 서열번호 83 및 서열번호 85로 구성된 군으로부터 선택된 서열과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 중쇄 가변 영역 서열, 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 면역접합체의 항체는 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 70, 서열번호 72, 서열번호 74, 서열번호 76, 서열번호 78, 서열번호 80, 서열번호 82 및 서열번호 84로 구성된 군으로부터 선택된 서열과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 경쇄 가변 영역 서열, 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체를 포함한다. 보다 구체적인 실시양태에서, 면역접합체의 항체는 서열번호 5, 서열번호 71, 서열번호 73, 서열번호 75, 서열번호 77, 서열번호 79, 서열번호 81, 서열번호 83 및 서열번호 85로 구성된 군으로부터 선택된 서열과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 중쇄 가변 영역 서열, 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체; 및 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 70, 서열번호 72, 서열번호 74, 서열번호 76, 서열번호 78, 서열번호 80, 서열번호 82 및 서열번호 84로 구성된 군으로부터 선택된 서열과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 경쇄 가변 영역 서열, 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체를 포함한다.

[0123]

한 실시양태에서, 면역접합체는 섬유모세포-활성화된 단백질(FAP)에 대한 특이성을 나타내는 항체를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 면역접합체의 항체는 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 17, 서열번호 19, 서열번호 21, 서열번호 23, 서열번호 25, 서열번호 27, 서열번호 29, 서열번호 31, 서열번호 33, 서열번호 35, 서열번호 37, 서열번호 39, 서열번호 41, 서열번호 43, 서열번호 45, 서열번호 47, 서열번호 49, 서열번호 51, 서열번호 53, 서열번호 55, 서열번호 57, 서열번호 59, 서열번호 61, 서열번호 63, 서열번호 65, 서열번호 67 및 서열번호 69로 구성된 군으로부터 선택된 서열과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 중쇄 가변 영역 서열, 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 면역접합체의 항체는 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 13, 서열번호 16, 서열번호 18, 서열번호 20, 서열번호 22, 서열번호 24, 서열번호 26, 서열번호 28, 서열번호 30, 서열번호 32, 서열번호 34, 서열번호 36, 서열번호 38, 서열번호 40, 서열번호 42, 서열번호 44, 서열번호 46, 서열번호 48, 서열번호 50, 서열번호 52, 서열번호 54, 서열번호 56, 서열번호 58, 서열번호 60, 서열번호 62, 서열번호 64, 서열번호 66 및 서열번호 68로 구성된 군으로부터 선택된 서열과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 경쇄 가변 영역 서열, 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체를 포함한다. 보다 구체적인 실시양태에서, 면역접합체의 항체는 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 17, 서열번호 19, 서열번호 21, 서열번호 23, 서열번호 25, 서열번호 27, 서열번호 29, 서열번호 31, 서열번호 33, 서열번호 35, 서열번호 37, 서열번호 39, 서열번호 41, 서열번호 43, 서열번호 45, 서열번호 47, 서열번호 49, 서열번호 51, 서열번호 53, 서열번호 55, 서열번호 57, 서열번호 59, 서열번호 61, 서열번호 63, 서열번호 65, 서열번호 67 및 서열번호 69로 구성된 군으로부터 선택된 서열과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 중쇄 가변 영역 서열, 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체; 및 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 13, 서열번호 16, 서열번호 18, 서열번호 20, 서열번호 22, 서열번호 24, 서열번호 26, 서열번호 28, 서열번호 30, 서열번호 32, 서열번호 34, 서열번호 36, 서열번호 38, 서열번호 40, 서열번호 42, 서열번호 44, 서열번호 46, 서열번호 48, 서열번호 50, 서열번호 52, 서열번호 54, 서열번호 56, 서열번호 58, 서열번호 60, 서열번호 62, 서열번호 64, 서열번호 66 및 서열번호 68로 구성된 군으로부터 선택된 서열과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 경쇄 가변 영역 서열, 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 면역접합체의 항체는 서열번호 12의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열번호 11의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 면역접합체의 항체는 서열번호 17의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열번호 16의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 면역접합체의 항체는 서열번호 47의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열번호 46의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 면역접합체의 항체는 서열번호 63의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열번호 62의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 면역접합체의 항체는 서열번호 67의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열번호 66의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본 발명의 면역접합체는 서열번호 125와 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 폴리펩티드 서열 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체, 서열번호 126과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 폴리펩티드 서열 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체, 및 서열번호 129와 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 폴리펩티드 서열 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본 발명의 면역접합체는 서열번호 127과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 폴리펩티드 서열 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체, 서열번호 128과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 폴리펩티드 서열 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체,

및 서열번호 129와 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 폴리펩티드 서열 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본 발명의 면역접합체는 서열번호 130과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 폴리펩티드 서열 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체, 서열번호 131과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 폴리펩티드 서열 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체, 및 서열번호 132와 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 폴리펩티드 서열 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체를 포함한다.

[0124] 한 실시양태에서, 면역접합체는 흑색종 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸(MCSP)에 대한 특이성을 나타내는 항체를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 면역접합체의 항체는 서열번호 86 또는 서열번호 122의 서열과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 중쇄 가변 영역 서열 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 면역접합체의 항체는 서열번호 87 또는 서열번호 123의 서열과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 중쇄 가변 영역 서열 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체를 포함한다. 보다 구체적인 실시양태에서, 면역접합체의 항체는 서열번호 86 또는 서열번호 122의 서열과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 중쇄 가변 영역 서열 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체; 및 서열번호 87 또는 서열번호 123의 서열과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 경쇄 가변 영역 서열 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체를 포함한다. 보다 구체적인 실시양태에서, 면역접합체의 항체는 서열번호 86의 서열과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 중쇄 가변 영역 서열; 및 서열번호 87의 서열과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 면역접합체의 항체는 서열번호 122의 서열과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 중쇄 가변 영역 서열; 및 서열번호 123의 서열과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0125] 한 실시양태에서, 면역접합체는 암배아 항원(CEA)에 대한 특이성을 나타내는 항체를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 면역접합체의 항체는 서열번호 114의 서열과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 중쇄 가변 영역 서열 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 면역접합체의 항체는 서열번호 115의 서열과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 경쇄 가변 영역 서열 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체를 포함한다. 보다 구체적인 실시양태에서, 면역접합체의 항체는 서열번호 114의 서열과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 중쇄 가변 영역 서열 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체; 및 서열번호 115의 서열과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 경쇄 가변 영역 서열 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본 발명의 면역접합체는 서열번호 136과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 폴리펩티드 서열 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체, 서열번호 137과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 폴리펩티드 서열 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체, 및 서열번호 138과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 폴리펩티드 서열 또는 기능성을 보유하는 이의 변이체를 포함한다.

[0126] 본 발명에 따른 면역접합체는 서열번호 3 내지 서열번호 87, 서열번호 108 내지 서열번호 132 및 서열번호 136 내지 서열번호 138에 기재된 서열들과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 서열(이의 기능성 단편 또는 변이체를 포함함)을 포함하는 면역접합체를 포함한다. 본 발명에 따른 면역접합체는 보존적 아미노산 치환을 갖는 서열번호 3 내지 서열번호 127의 서열을 포함하는 항체도 포괄한다. 서열번호 126, 서열번호 128, 서열번호 131, 서열번호 134 및 서열번호 137의 서열에서 본원에 기재된 돌연변이체 IL-2의 서열(서열번호 2 참조)은 인간 IL-2의 서열(서열번호 1 참조)로 교체될 수 있다.

[0127] 면역접합체의 효과기 잔기

[0128] 본 발명에서 사용되는 효과기 잔기는 일반적으로 예를 들면, 신호 전달도입 경로를 통해 세포 활성화에 영향을 미치는 폴리펩티드이다. 따라서, 본 발명에 유용한 면역접합체의 효과기 잔기는 세포 내의 반응을 조절하기 위해 세포막의 외부로부터 신호를 전달하는 수용체-매개된 신호전달과 관련될 수 있다. 예를 들면, 면역접합체의 효과기 잔기는 사이토카인일 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 효과기 잔기는 본원에서 정의된 단일쇄 효과기 잔기이다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 면역접합체의 효과기 잔기, 전형적으로 단일쇄 효과기 잔기는 IL-2, GM-CSF, IFN- α 및 IL-12로 구성된 군으로부터 선택된 사이토카인이다. 한 실시양태에서, 효과기 잔기는 IL-2이다. 또 다른 실시양태에서, 면역접합체의 단일쇄 효과기 잔기는 IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β 및 TGF- β 로

구성된 군으로부터 선택된 사이토카인이다.

[0129] 한 실시양태에서, 면역접합체의 효과기 잔기, 전형적으로 단일쇄 효과기 잔기는 IL-2이다. 구체적인 실시양태에서, IL-2 효과기 잔기는 하기 세포 반응들로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 세포 반응을 유발할 수 있다: 활성화된 T 림프구 세포의 증식, 활성화된 T 림프구 세포의 분화, 세포독성 T 세포(CTL) 활성화, 활성화된 B 세포의 증식, 활성화된 B 세포의 분화, 천연 살해(NK) 세포의 증식, NK 세포의 분화, 활성화된 T 세포 또는 NK 세포에 의한 사이토카인 분비, 및 NK/림프구-활성화된 살해(LAK) 항-종양 세포독성. 특정 실시양태에서, IL-2 효과기 잔기는 비-돌연변이된 IL-2 효과기 잔기와 비교시 IL-2 수용체(CD25로서도 공지되어 있음)의 α -서브유닛에 대한 돌연변이체 IL-2 효과기 잔기의 친화성을 감소시키거나 제거하나 중간체 친화성 IL-2 수용체(IL-2 수용체의 β -서브유닛 및 γ -서브유닛으로 구성됨)에 대한 돌연변이체 IL-2 효과기 잔기의 친화성을 보존하는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 돌연변이체 IL-2 효과기 잔기이다. 한 실시양태에서, 아미노산 돌연변이는 아미노산 치환이다. 구체적인 실시양태에서, 돌연변이체 IL-2 효과기 잔기는 인간 IL-2(서열번호 1)의 잔기 42, 45 및 72에 상응하는 위치로부터 선택된 1개, 2개 또는 3개의 위치(들)에서 1개, 2개 또는 3개의 아미노산 치환을 포함한다. 보다 구체적인 실시양태에서, 돌연변이체 IL-2 효과기 잔기는 인간 IL-2의 잔기 42, 45 및 72에 상응하는 위치에서 3개의 아미노산 치환을 포함한다. 훨씬 더 구체적인 실시양태에서, 돌연변이체 IL-2 효과기 잔기는 아미노산 치환 F42A, Y45A 및 L72G를 포함하는 인간 IL-2이다. 한 실시양태에서, 돌연변이체 IL-2 효과기 잔기는 인간 IL-2의 위치 3에 상응하는 위치에서 IL-2의 O-글리코실화 부위를 제거하는 아미노산 돌연변이를 추가로 포함한다. 특히, 상기 추가 아미노산 돌연변이는 쓰레오닌 잔기를 알라닌 잔기로 교체하는 아미노산 치환이다. 아미노산 치환 T3A, F42A, Y45A 및 L72G를 포함하는 사중 돌연변이체(QM) IL-2의 서열은 서열번호 2로 제시되어 있다. 적합한 돌연변이체 IL-2 분자는 국제 특허출원 공개 제WO 2012/107417호에 더 상세히 기재되어 있다.

[0130] 면역접합체에서 효과기 잔기로서 유용한 돌연변이체 IL-2 분자는 당분야에서 잘 공지되어 있는 유전적 또는 화학적 방법을 이용한 결실, 치환, 삽입 또는 변경에 의해 제조될 수 있다. 유전적 방법은 코딩 DNA 서열의 부위 특이적 돌연변이유발, PCR, 유전자 합성 등을 포함할 수 있다. 정확한 뉴클레오타이드 변화는 예를 들면, 서열결정에 의해 검증될 수 있다. 이와 관련하여, 천연 IL-2의 뉴클레오타이드 서열은 문헌(Taniguchi et al., Nature 302, 305-10 (1983))에 기재되어 있고, 인간 IL-2를 코딩하는 핵산은 공공 수탁기관, 예컨대, 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection)(미국 메릴랜드주 록빌 소재)으로부터 입수될 수 있다. 인간 IL-2의 예시적인 서열은 서열번호 1로 제시되어 있다. 치환 또는 삽입은 천연 아미노산 잔기뿐만 아니라 비-천연 아미노산 잔기도 수반할 수 있다. 아미노산 변경은 잘 공지되어 있는 화학적 변경 방법, 예컨대, 글리코실화 부위의 추가 또는 제거, 또는 탄수화물 부착 등을 포함한다.

[0131] 한 실시양태에서, 면역접합체의 효과기 잔기, 특히 단일쇄 효과기 잔기는 GM-CSF이다. 구체적인 실시양태에서, GM-CSF 효과기 잔기는 파립세포, 단핵세포 또는 수지상세포에서 증식 및/또는 분화를 유발할 수 있다. 한 실시양태에서, 면역접합체의 효과기 잔기, 특히 단일쇄 효과기 잔기는 IFN- α 이다. 구체적인 실시양태에서, IFN- α 효과기 잔기는 하기 세포 반응들로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 세포 반응을 유발할 수 있다: 바이러스-감염된 세포에서의 바이러스 복제의 억제, 및 구조적적합성 복합체 I(MHC I)의 발현의 상향조절. 또 다른 구체적인 실시양태에서, IFN- α 효과기 잔기는 종양 세포에서 증식을 억제할 수 있다. 한 실시양태에서, 면역접합체의 효과기 잔기, 특히 단일쇄 효과기 잔기는 IL-12이다. 구체적인 실시양태에서, IL-12 효과기 잔기는 하기 세포 반응들로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 세포 반응을 유발할 수 있다: NK 세포의 증식, NK 세포의 분화, T 세포의 증식 및 T 세포의 분화. 한 실시양태에서, 면역접합체의 효과기 잔기, 특히 단일쇄 효과기 잔기는 IL-8이다. 구체적인 실시양태에서, IL-8 효과기 잔기는 호중구에서 화학주성을 유발할 수 있다. 한 실시양태에서, 면역접합체의 효과기 잔기, 특히 단일쇄 효과기 잔기는 MIP-1 α 이다. 구체적인 실시양태에서, MIP-1 α 효과기 잔기는 단핵세포 및 T 림프구 세포에서 화학주성을 유발할 수 있다. 한 실시양태에서, 면역접합체의 효과기 잔기, 특히 단일쇄 효과기 잔기는 MIP-1 β 이다. 구체적인 실시양태에서, MIP-1 β 효과기 잔기는 단핵세포 및 T 림프구 세포에서 화학주성을 유발할 수 있다. 한 실시양태에서, 면역접합체의 효과기 잔기, 특히 단일쇄 효과기 잔기는 TGF- β 이다. 구체적인 실시양태에서, TGF- β 효과기 잔기는 하기 세포 반응들로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 세포 반응을 유발할 수 있다: 단핵세포의 화학주성, 대식세포의 화학주성, 활성화된 대식세포의 IL-1 발현의 상향조절, 및 활성화된 B 세포의 IgA 발현의 상향조절.

[0132] **면역접합체와 조합될 항체**

[0133] 본 발명에 따라, 면역접합체와 조합될 항체는 증가된 효과기 기능을 갖도록 조작된다. 면역접합체와 조합될, 본 발명에 유용한 항체는 특이적 항원성 결정인자, 예를 들면, 특이적 종양 세포 항원에 결합하고 Fc 영역을 포

함하는 항체 또는 항체 단편을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 종양 세포 상에서 제시된 항원에 대해 유도된다. 본 발명에 유용한 항체의 구체적인 표적 항원은 세포 표면 수용체, 예컨대, 표피 성장인자 수용체(EGFR), 인슐린-유사 성장인자 수용체(IGF-1R) 및 혈소판 유래의 성장인자 수용체(PDGFR), 전립선 특이적 막 항원(PSEA), 암배아 항원(CEA), 다이펩티딜 펩티다제 IV(CD26, DPPIV), FAP, HER2/neu, HER-3, E-카드헤린, CD20, 흑색종 관련 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸(MCSP), c-Met, CUB 도메인 함유 단백질-1(CDCP1), 및 편평세포암종 항원(SCCA)을 포함하나 이들로 한정되지 않는, 종양 세포의 표면 상에서 발현되는 항원들을 포함한다.

[0134] 구체적 실시양태에서, 항체는 CD20, 표피 성장인자 수용체(EGFR), HER2, HER3, 인슐린-유사 성장인자 1 수용체(IGF-1R), 암배아 항원(CEA), c-Met, CUB 도메인 함유 단백질-1(CDCP1), 및 흑색종 관련 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸(MCSP)으로 구성된 군으로부터 선택된 항원에 대해 유도된다. 한 실시양태에서, 항체는 CD20, 표피 성장인자 수용체(EGFR), HER2, HER3, 인슐린-유사 성장인자 1 수용체(IGF-1R), 암배아 항원(CEA), c-Met, CUB 도메인 함유 단백질-1(CDCP1) 및 흑색종 관련 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸(MCSP)으로 구성된 군으로부터 선택된 2개 이상의 항원에 대해 유도된 다중특이적 항체이다.

[0135] 본 발명에 유용한 구체적 항-CD20 항체는 뮤린 B-Ly1 항체(Poppema and Visser, Biotest Bulletin 3, 131-139 (1987))의 결합 특이성을 갖는 인간화된 IgG 클래스 유형 II 항-CD20 항체이다. a) 서열번호 88의 CDR1, 서열번호 89의 CDR2 및 서열번호 90의 CDR3을 중쇄 가변 도메인 내에 포함하고, b) 서열번호 91의 CDR1, 서열번호 92의 CDR2 및 서열번호 93의 CDR3을 경쇄 가변 도메인 내에 포함하는 인간화된 IgG 클래스 II형 항-CD20 항체가 특히 유용하다.

[0136] 특히, 상기 항체의 중쇄 가변 영역 골격 영역(FR)인 FR1, FR2 및 FR3은 VH1_10 인간 생식세포주 서열에 의해 코딩된 인간 FR 서열이고, 상기 항체의 중쇄 가변 영역 FR4는 JH4 인간 생식세포주 서열에 의해 코딩된 인간 FR 서열이고, 상기 항체의 경쇄 가변 영역 FR인 FR1, FR2 및 FR3은 VK_2_40 인간 생식세포주 서열에 의해 코딩된 인간 FR 서열이고, 상기 항체의 경쇄 가변 영역 FR4는 JK4 인간 생식세포주 서열에 의해 코딩된 인간 FR 서열이다.

[0137] 본 발명에 유용한 보다 구체적 항-CD20 항체는 서열번호 94의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 95의 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0138] 이러한 항-CD20 항체는 온전히 그대로 본원에 참고로 도입되는 국제 특허출원 공개 제WO 2005/044859호에 기재되어 있다.

[0139] 본 발명에 유용한 구체적 항-EGFR 항체는 래트 ICR62 항체(Modjtahedi et al., Br J Cancer 67, 247-253 (1993))의 결합 특이성을 갖는 인간화된 IgG 클래스 항체이다. a) 서열번호 96의 CDR1, 서열번호 97의 CDR2 및 서열번호 98의 CDR3을 중쇄 가변 도메인 내에 포함하고, b) 서열번호 99의 CDR1, 서열번호 100의 CDR2 및 서열번호 101의 CDR3을 경쇄 가변 도메인 내에 포함하는 인간화된 IgG 클래스 항-EGFR 항체가 특히 유용하다.

[0140] 본 발명에 유용한 보다 구체적 항-EGFR 항체는 서열번호 102의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 103의 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0141] 이러한 항-EGFR 항체는 온전히 그대로 본원에 참고로 도입되는 국제 특허출원 공개 제WO 2006/082515호 및 국제 특허출원 공개 제WO 2008/017963호에 기재되어 있다.

[0142] 본 발명에 유용한 다른 적합한 인간화된 IgG 클래스 항-EGFR 항체는 세록시맵/IMC-C225(에르비투스(Erbix)[®], 문헌(Goldstein et al., Clin Cancer Res 1, 1311-1318 (1995))에 기재됨), 파니투무맵/ABX-EGF(벡티빅스(Vectibix)[®], 문헌(Yang et al., Cancer Res 59, 1236-1243 (1999)) 및 문헌(Yang et al., Critical Reviews in Oncology/Hematology 38, 17-23 (2001))에 기재됨), 니모투주맵/h-R3(쉴라심(TheraCim)[®], 문헌(Mateo et al., Immunotechnology 3, 71-81 (1997)), 문헌(Crombet-Ramos et al., Int J Cancer 101, 567-575 (2002)), 및 문헌(Boland & Bebb, Expert Opin Biol Ther 9, 1199-1206 (2009))에 기재됨), 마투주맵/EMD 72000(문헌(Bier et al., Cancer Immunol Immunother 46, 167-173 (1998)) 및 문헌(Kim, Curr Opin Mol Ther 6, 96-103 (2004))에 기재됨), 및 잘루투무맵/2F8(문헌(Bleeker et al., J Immunol 173, 4699-4707 (2004)), 및 문헌(Lammerts van Bueren, PNAS 105, 6109-6114 (2008))에 기재됨)을 포함한다.

[0143] 본 발명에 유용한 구체적 항-IGF-1R 항체는 국제 특허출원 공개 제WO 2005/005635호 및 국제 특허출원 공개 제WO 2008/077546호(이들 각각의 전체 내용은 본원에 참고로 도입됨)에 기재되어 있고, 인슐린-유사 성장인자-

1(IGF-1) 및 인슐린-유사 성장인자-2(IGF-2)와 인슐린-유사 성장인자-1 수용체(IGF-1R)의 결합을 억제한다.

[0144] 본 발명에 유용한 항-IGF-1R 항체는 바람직하게는 단일클론 항체, 및 추가로 키메라 항체(인간 불변 도메인), 인간화된 항체, 특히 바람직하게는 전체 인간 항체이다. 본 발명에 유용한 구체적인 항-IGF-1R 항체는 항체 18과 경쟁하면서 인간 IGF-1R에 결합한다(즉, 상기 항-IGF-1R 항체는 국제 특허출원 공개 제WO 2005/005635호에 기재된 항체 18이 결합하는 IGF-1R 에피토프와 동일한 IGF-1R 에피토프에 결합한다). 구체적인 항-IGF-1R 항체는 추가로 IGF-1R에 대한 10^{-8} M(K_D) 이하, 특히 약 10^{-9} 내지 10^{-13} M의 친화성을 특징으로 하고, 바람직하게는 인슐린 수용체에 결합하는 인슐린의 검출가능한 농도 의존적 억제를 보이지 않는다.

[0145] 본 발명에 유용한 구체적인 항-IGF-1R 항체는 하기 서열을 갖는 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다:

[0146] a) 서열번호 104 또는 서열번호 106의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 CDR로서 포함하는 항체 중쇄;

[0147] b) 서열번호 105 또는 서열번호 107의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 CDR로서 포함하는 항체 경쇄.

[0148] 특히, 본 발명에 유용한 항-IGF-1R 항체는 서열번호 104의 항체 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열 및 서열번호 105의 항체 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열, 또는 서열번호 106의 항체 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열 및 서열번호 107의 항체 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열을 포함한다.

[0149] 본 발명에 유용한 구체적인 항-IGF-1R 항체는 DSMZ 게임베하(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)(독일 소재)에 각각 기탁번호 DSM ACC 2587 및 DSM ACC 2594로서 기탁된 하이브리도마 세포주 <IGF-1R> HUMAB-클론 18 및 <IGF-1R> HUMAB-클론 22로부터 입수될 수 있다.

[0150] 본 발명에 유용한 다른 적합한 항-IGF-1R 항체는 예를 들면, 전체 인간 IgG₁ mAb 식수투무맙/IMC-A12(문헌(Burtrum et al., Cancer Res 63, 8912-21 (2003)) 및 문헌(Rowinsky et al., Clin Cancer Res 13, 5549s-5555s (2007))에 기재됨), 전체 인간 IgG₁ mAb AMG-479(문헌(Beltran et al., Mol Cancer Ther 8, 1095-1105 (2009) 및 문헌(Tolcher et al., J Clin Oncol 27, 5800-7 (2009))에 기재됨), 인간화된 IgG₁ mAb MK-0646/h7C10(문헌(Goetsch et al., Int J Cancer 113, 316-28 (2005)), 문헌(Broussas et al., Int J Cancer 124, 2281-93 (2009)), 문헌(Hidalgo et al., J Clin Oncol 26, abstract 3520 (2008)) 및 문헌(Atzori et al., J Clin Oncol 26, abstract 3519 (2008))에 기재됨), 인간화된 IgG₁ mAb AVE1642(문헌(Descamps et al., Br J Cancer 100, 366-9 (2009)), 문헌(Tolcher et al., J Clin Oncol 26, abstract 3582 (2008)), 문헌(Moreau et al., Blood 110, abstract 1166 (2007)) 및 문헌(Maloney et al., Cancer Res 63, 5073-83 (2003))에 기재됨), 전체 인간 IgG₂ mAb 피기투무맙/CP-751,871(문헌(Cohen et al., Clin Cancer Res 11, 2063-73 (2005)), 문헌(Haluska et al., Clin Cancer Res 13, 5834-40 (2007)), 문헌(Lacy et al., J Clin Oncol 26, 3196-203 (2008)) 및 문헌(Gualberto & Karp, Clin Lung Cancer 10, 273-80 (2009)), 전체 인간 IgG₁ mAb SCH-717454(국제 특허출원 공개 제WO 2008/076257호 또는 문헌(Kolb et al., Pediatr Blood Cancer 50, 1190-7 (2008))에 기재됨), 2.13.2. mAb(미국 특허 제7,037,498호(국제 특허출원 공개 제WO 2002/053596호)에 기재됨) 또는 전체 인간 IgG₄ mAb BIIB022이다.

[0151] 본 발명에서 유용한 구체적인 항-CEA 항체는 뮤린 PR1A3 항체(Richman and Bodmer, Int J Cancer 39, 317-328 (1987))의 결합 특이성을 갖는 인간화된 IgG 클래스 항체이다. a) 서열번호 108의 CDR1, 서열번호 109의 CDR2 및 서열번호 110의 CDR3을 중쇄 가변 도메인 내에 포함하고 b) 서열번호 111의 CDR1, 서열번호 112의 CDR2 및 서열번호 113의 CDR3을 경쇄 가변 도메인 내에 포함하는 인간화된 IgG 클래스 항-CEA 항체가 특히 유용하다.

[0152] 본 발명에 유용한 보다 구체적인 항-CEA 항체는 서열번호 114의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 115의 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0153] 이러한 항-CEA 항체는 온전히 그대로 본원에 참고로 도입되는 국제 특허출원 공개 제WO 2011/023787호에 기재되어 있다.

[0154] 본 발명에 유용한 구체적인 항-HER3 항체는 인간화된 IgG 클래스 항체, 예컨대, 국제 특허출원 공개 제WO 2011/076683호에 기재된 Mab 205.10.1, Mab 205.10.2 및 Mab 205.10.3, 특히 Mab 205.10.2이다. a) 서열번호 139의 CDR1, 서열번호 140의 CDR2 및 서열번호 141의 CDR3을 중쇄 가변 도메인 내에 포함하고 b) 서열번호 143의 CDR1, 서열번호 144의 CDR2 및 서열번호 145의 CDR3을 경쇄 가변 도메인 내에 포함하는 인간화된 IgG 클래스

항-HER3 항체가 특히 유용하다.

- [0155] 본 발명에 유용한 보다 구체적인 항-HER3 항체는 서열번호 142의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 146의 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0156] 본 발명에 유용한 구체적인 항-CDCP1 항체는 국제 특허출원 공개 제WO 2011/023389호에 기재된 CUB4 항체(기탁번호 DSM ACC 2551(DSMZ))로부터 유래된 인간화된 IgG 클래스 항체이다.
- [0157] 본 발명에서 사용될 수 있는 예시적인 항-MCSP 항체는 예를 들면, 유럽 특허출원 제11178393.2호에 기재되어 있다. a) 서열번호 116의 CDR1, 서열번호 117의 CDR2 및 서열번호 118의 CDR3을 중쇄 가변 도메인 내에 포함하고 b) 서열번호 119의 CDR1, 서열번호 120의 CDR2 및 서열번호 121의 CDR3을 경쇄 가변 도메인 내에 포함하는 인간화된 IgG 클래스 항-MCSP 항체가 특히 유용하다.
- [0158] 본 발명에 유용한 보다 구체적인 항-MCSP 항체는 서열번호 122의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 123의 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0159] 한 실시양태에서, 항체는 IgG 클래스의 전장 항체이다. 구체적인 실시양태에서, 항체는 IgG₁ 항체이다. 한 실시양태에서, 항체는 인간 Fc 영역, 보다 특히 인간 IgG Fc 영역, 가장 특히 인간 IgG₁ Fc 영역을 포함한다. 본 발명에 유용한 항체, 예컨대, 전술된 항-IGF-1R, 항-EGFR 및 항-CD20 항체는 서열번호 124에 기재된 인간 Ig γ -1 중쇄 불변 영역을 포함할 수 있다(즉, 항체는 인간 IgG₁ 클래스의 항체이다).
- [0160] 본 발명에 유용한 항체는 상응하는 비-조작된 항체와 비교시 증가된 효과기 기능을 갖도록 조작된다. 한 실시양태에서, 증가된 효과기 기능을 갖도록 조작된 항체는 상응하는 비-조작된 항체와 비교시 2배 이상, 10배 이상 또는 심지어 100배 이상 증가된 효과기 기능을 갖는다. 증가된 효과기 기능은 하기 기능들 중 하나 이상의 기능을 포함할 수 있으나 이들로 한정되지 않는다: 증가된 Fc 수용체 결합, 증가된 C1q 결합 및 보체 의존적 세포독성(CDC), 증가된 항체 의존적 세포-매개된 세포독성(ADCC), 증가된 항체 의존적 세포성 식세포작용(ADCP), 증가된 사이토카인 분비, 항원 제시 세포에 의한 증가된 면역 복합체-매개된 항원 섭취, NK 세포와의 증가된 결합, 대식세포와의 증가된 결합, 단핵세포와의 증가된 결합, 다형핵세포와의 증가된 결합, 세포 자멸을 유도하는 증가된 직접적인 신호전달, 표적-결합된 항체의 증가된 가교연결, 증가된 수지상세포 성숙 또는 증가된 T 세포 프라이밍.
- [0161] 한 실시양태에서, 증가된 효과기 기능은 증가된 Fc 수용체 결합, 증가된 CDC, 증가된 ADCC, 증가된 ADCP 및 증가된 사이토카인 분비로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 증가된 효과기 기능이다. 한 실시양태에서, 증가된 효과기 기능은 활성화 Fc 수용체와의 증가된 결합이다. 한 이러한 실시양태에서, 활성화 Fc 수용체에 대한 결합 친화성은 상응하는 비-조작된 항체의 결합 친화성과 비교시 2배 이상, 특히 10배 이상 증가된다. 구체적인 실시양태에서, 활성화 Fc 수용체는 Fc γ RIIIa, Fc γ RI 및 Fc γ RIIa로 구성된 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 활성화 Fc 수용체는 Fc γ RIIIa, 특히 인간 Fc γ RIIIa이다. 또 다른 실시양태에서, 증가된 효과기 기능은 증가된 ADCC이다. 한 이러한 실시양태에서, ADCC는 상응하는 비-조작된 항체에 의해 매개된 ADCC와 비교시 10배 이상, 특히 100배 이상 증가된다. 또 다른 실시양태에서, 증가된 효과기 기능은 활성화 Fc 수용체와의 증가된 결합 및 증가된 ADCC이다.
- [0162] 증가된 효과기 기능은 당분야에서 공지되어 있는 방법에 의해 측정될 수 있다. ADCC를 측정하는 적합한 분석은 본원에 기재되어 있다. 관심 있는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 분석의 다른 예는 미국 특허 제 5,500,362호, 문헌(Hellstrom et al. Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986)), 문헌(Hellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985)), 미국 특허 제 5,821,337호 및 문헌(Bruggemann et al., J Exp Med 166, 1351-1361 (1987))에 기재되어 있다. 대안적으로, 비-방사성 분석 방법이 이용될 수 있다(예를 들면, 유동세포측정을 위한 ACTI™ 비-방사성 세포독성 분석(셀테크놀로지 인코포레이티드, 미국 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재), 및 사이토독스 96® 비-방사성 세포독성 분석(프로메가, 미국 위스콘신주 매디슨 소재) 참조). 이러한 분석에 유용한 효과기 세포는 말초 혈액 단핵세포(PBMC) 및 천연 살해(NK) 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 관심 있는 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예를 들면, 동물 모델, 예컨대, 문헌(Clynes et al., Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998))에 개시된 동물 모델에서 평가될 수 있다. Fc 수용체와의 결합은 예를 들면, ELISA에 의해, 또는 표준 기계, 예컨대, 비아코어 기계(지이 헬쓰케어)를 이용한 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 용이하게 측정될 수 있고, Fc 수용체는 예컨대, 재조합 발현에 의해 수득될 수 있다. 구체적인 실시양태에 따라, 활성화 Fc 수용체에 대한 결합 친화성을 25℃에서 비아코어® T100 기계(지이 헬쓰케어

어)를 이용하여 표면 플라스몬 공명으로 측정한다. 대안적으로, 특정 Fc 수용체를 발현하는 것으로 공지되어 있는 세포주, 예컨대, Fc γ IIIa 수용체를 발현하는 NK 세포를 사용하여 Fc 수용체 대한 항체의 결합 친화성을 평가할 수 있다. 항체가 C1q에 결합하여 CDC 활성을 가질 수 있는지를 확인하기 위해 C1q 결합 분석을 수행할 수도 있다. 예를 들면, 국제 특허출원 공개 제WO 2006/029879호 및 국제 특허출원 공개 제WO 2005/100402호에 기재된 C1q 및 C3c 결합 ELISA를 참조한다. 보체 활성화를 평가하기 위해, CDC 분석을 수행할 수 있다(예를 들면, 문헌(Gazzano-Santoro et al., J Immunol Methods 202, 163 (1996)), 문헌(Cragg et al., Blood 101, 1045-1052 (2003)) 및 문헌(Cragg and Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004)) 참조).

[0163] 증가된 효과기 기능은 예를 들면, Fc 영역의 당조작 또는 항체의 Fc 영역 내로의 아미노산 돌연변이의 도입으로부터 발생될 수 있다. 한 실시양태에서, 항체는 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 Fc 영역 내로 도입함으로써 조작된다. 구체적인 실시양태에서, 아미노산 돌연변이는 아미노산 치환이다. 훨씬 더 구체적인 실시양태에서, 아미노산 치환은 Fc 영역의 위치 298, 333 및/또는 334(잔기의 EU 넘버링)에 존재한다. 추가 적합한 아미노산 돌연변이는 예를 들면, 문헌(Shields et al., J Biol Chem 9(2), 6591-6604 (2001)); 미국 특허 제6,737,056호; 국제 특허출원 공개 제WO 2004/063351호 및 국제 특허출원 공개 제WO 2004/099249호에 기재되어 있다. 돌연변이체 Fc 영역은 당분야에서 잘 공지되어 있는 유전적 또는 화학적 방법을 이용한 아미노산 결실, 치환, 삽입 또는 변경에 의해 제조될 수 있다. 유전적 방법은 코딩 DNA 서열의 부위 특이적 돌연변이유발, PCR, 유전자 합성 등을 포함할 수 있다. 정확한 뉴클레오타이드 변화는 예를 들면, 서열결정에 의해 검증될 수 있다.

[0164] 또 다른 실시양태에서, 항체는 Fc 영역에서의 글리코실화의 변경에 의해 조작된다. 구체적인 실시양태에서, 항체는 비-조작된 항체와 비교시 Fc 영역에서 증가된 비율의 비-푸코실화된 올리고사카라이드를 갖도록 조작된다. 항체의 Fc 영역에서 증가된 비율의 비-푸코실화된 올리고사카라이드는 증가된 효과기 기능, 특히 증가된 ADCC를 갖는 항체를 발생시킨다.

[0165] 보다 구체적인 실시양태에서, 항체의 Fc 영역에서 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95% 또는 약 100% 이상, 바람직하게는 약 50% 이상, 보다 바람직하게는 약 70% 이상의 N-연결된 올리고사카라이드가 비-푸코실화되어 있다. 비-푸코실화된 올리고사카라이드는 하이브리드 또는 복합체 유형의 비-푸코실화된 올리고사카라이드일 수 있다.

[0166] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 항체는 비-조작된 항체와 비교시 Fc 영역에서 증가된 비율의 이등분된 올리고사카라이드를 갖도록 조작된다. 보다 구체적인 실시양태에서, 항체의 Fc 영역에서 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95% 또는 약 100% 이상, 바람직하게는 약 50% 이상, 보다 바람직하게는 약 70% 이상의 N-연결된 올리고사카라이드가 이등분되어 있다. 이등분된 올리고사카라이드는 하이브리드 또는 복합체 유형의 이등분된 올리고사카라이드일 수 있다.

[0167] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 항체는 비-조작된 항체와 비교시 Fc 영역에서 증가된 비율의 이등분된 비-푸코실화된 올리고사카라이드를 갖도록 조작된다. 보다 구체적인 실시양태에서, 항체의 Fc 영역에서 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95% 또는 약 100% 이상, 바람직하게는 약 15% 이상, 보다 바람직하게는 약 25% 이상, 약 30% 이상 또는 약 50% 이상의 N-연결된 올리고사카라이드가 이등분되어 있고 비-푸코실화되어 있다. 이등분된 비-푸코실화된 올리고사카라이드는 하이브리드 또는 복합체 유형의 이등분된 비-푸코실화된 올리고사카라이드일 수 있다.

[0168] 항체 Fc 영역에서 올리고사카라이드 구조물은 당분야에서 잘 공지되어 있는 방법, 예를 들면, 문헌(Umana et al., Nat Biotechnol 17, 176-180 (1999)) 또는 문헌(Ferrara et al., Biotechn Bioeng 93, 851-861 (2006))에 기재된 MALDI TOF 질량 분광측정에 의해 분석될 수 있다. 비-푸코실화된 올리고사카라이드의 백분율은 Asn297에 부착된 모든 올리고사카라이드(예를 들면, 복합체, 하이브리드 및 고만노스 구조물)에 비해 상대적인 푸코스 잔기 결핍 올리고사카라이드의 양이고 N-글리코시다제 F로 처리된 샘플에서 MALDI TOF MS에 의해 확인된다. Asn297은 Fc 영역 내의 약 위치 297(Fc 영역 잔기의 EU 넘버링)에 위치하는 아스파라긴 잔기를 지칭하나, Asn297은 항체의 미미한 서열 변경으로 인해 위치 297로부터 약 $\pm$ 3개 아미노산만큼 상류 또는 하류에, 즉 위치 294와 위치 300 사이에 위치할 수도 있다. 이등분된 올리고사카라이드 또는 이등분된 비-푸코실화된 올리고사카라이드의 백분율은 유사하게 측정된다.

[0169] 한 실시양태에서, 하나 이상의 글리코실트랜스퍼라제의 변경된 활성을 갖는 숙주 세포에서 항체를 제조함으로써

비-조작된 항체와 비교시 Fc 영역에서 변경된 글리코실화를 갖도록 항체를 조작한다. 글리코실트랜스퍼라제는 β (1,4)-N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III(GnTIII), β (1,4)-갈락토실트랜스퍼라제(GalT), β (1,2)-N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 I(GnTI), β (1,2)-N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 II(GnTII) 및 α (1,6)-푸코실트랜스퍼라제를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 항체는 증가된 β (1,4)-N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III(GnTIII) 활성을 갖는 숙주 세포에서 항체를 제조함으로써 비-조작된 항체와 비교시 Fc 영역에서 증가된 비율의 비-푸코실화된 올리고사카라이드를 갖도록 항체를 조작한다. 훨씬 더 구체적인 실시양태에서, 숙주 세포는 증가된 α -만노시다제 II(ManII) 활성을 추가로 갖는다. 본 발명에 유용한 항체의 조작에 이용될 수 있는 당조작 방법은 문헌(Umana et al., Nat Biotechnol 17, 176-180 (1999)); 문헌(Ferrara et al., Biotechn Bioeng 93, 851-861 (2006)); 국제 특허출원 공개 제WO 99/54342호(미국 특허 제6,602,684호; 유럽 특허 제1071700호); 국제 특허출원 공개 제WO 2004/065540호(미국 특허출원 공개 제2004/0241817호; 유럽 특허 제1587921호), 국제 특허출원 공개 제WO 03/011878호(미국 특허출원 공개 제2003/0175884호)(이들 각각의 전체 내용은 온전히 그대로 본원에 참고로 도입됨)에 더 상세히 기재되어 있다. 이 방법을 이용함으로써 당조작된 항체는 본원에서 글리코맵으로서 지칭된다.

[0170] 일반적으로, 본원에서 논의된 세포주들을 비롯한 임의의 유형의 배양된 세포주가 변경된 글리코실화 패턴을 갖는 항-TNC A2 항체의 제조를 위한 세포주를 발생시키는 데에 사용될 수 있다. 구체적인 세포주는 CHO 세포, BHK 세포, NS0 세포, SP2/0 세포, YO 골수종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포 또는 하이브리도마 세포, 및 다른 포유동물 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 숙주 세포는 β (1,4)-N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III(GnTIII) 활성을 갖는 하나 이상의 폴리펩티드를 증가된 수준으로 발현하도록 조작되어 있다. 특정 실시양태에서, 숙주 세포는 α -만노시다제 II(ManII) 활성을 갖는 하나 이상의 폴리펩티드를 증가된 수준으로 발현하도록 더 조작되어 있다. 구체적인 실시양태에서, GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드는 GnTIII의 촉매 도메인 및 이종 골지 체류 폴리펩티드의 골지 편재화 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드이다. 특히, 상기 골지 편재화 도메인은 만노시다제 II의 골지 편재화 도메인이다. 이러한 융합 폴리펩티드를 발생시키는 방법 및 증가된 효과기 기능을 갖는 항체를 생성하기 위해 상기 융합 폴리펩티드를 사용하는 방법은 문헌(Ferrara et al., Biotechn Bioeng 93, 851-861 (2006)) 및 국제 특허출원 공개 제WO 2004/065540호(이들의 전체 내용은 명백히 본원에 참고로 도입됨)에 개시되어 있다.

[0171] 본 발명에 유용한 항체의 코딩 서열 및/또는 글리코실트랜스퍼라제 활성을 갖는 폴리펩티드의 코딩 서열을 함유하고 생물학적 활성 유전자 생성물을 발현하는 숙주 세포는 예를 들면, DNA-DNA 또는 DNA-RNA 혼성화; "마커" 유전자 기능의 존재 또는 부재; 숙주 세포에서 각각의 mRNA 전사체의 발현에 의해 측정된 전사 수준의 평가; 또는 면역분석 또는 그의 생물학적 활성에 의해 측정된 유전자 생성물의 검출(이들 방법들은 당분야에서 잘 공지되어 있음)에 의해 확인될 수 있다. GnTIII 또는 Man II 활성은 예를 들면, 각각 GnTIII 또는 ManII의 생합성 생성물에 결합하는 렉틴을 사용함으로써 검출될 수 있다. 이러한 렉틴에 대한 일례는 이등분 GlcNAc를 함유하는 올리고사카라이드에 우선적으로 결합하는 E₄-PHA 렉틴이다. GnTIII 또는 ManII 활성을 갖는 폴리펩티드의 생합성 생성물(즉, 특이적 올리고사카라이드 구조물)은 상기 폴리펩티드를 발현하는 세포에 의해 제조된 당단백질로부터 방출된 올리고사카라이드의 질량 분광측정 분석에 의해 검출될 수도 있다. 대안적으로, GnTIII 또는 ManII 활성을 갖는 폴리펩티드로 조작된 세포에 의해 제조된 항체에 의해 매개된 증가된 효과기 기능, 예를 들면, 증가된 Fc 수용체 결합을 측정하는 기능 분석이 이용될 수 있다.

[0172] 또 다른 실시양태에서, 감소된 α (1,6)-푸코실트랜스퍼라제 활성을 갖는 숙주 세포에서 항체를 제조함으로써 비-조작된 항체와 비교시 Fc 영역에서 증가된 비율의 비-푸코실화된 올리고사카라이드를 갖도록 항체를 조작한다. 감소된 α (1,6)-푸코실트랜스퍼라제 활성을 갖는 숙주 세포는 α (1,6)-푸코실트랜스퍼라제 유전자가 파괴되어 있거나 달리 불활성화되어 있는, 예를 들면, 녹아있되어 있는 세포일 수 있다(문헌(Yamane-Ohnuki et al., Biotech Bioeng 87, 614 (2004)); 문헌(Kanda et al., Biotechnol Bioeng, 94(4), 680-688 (2006)); 및 문헌(Niwa et al., J Immunol Methods 306, 151-160 (2006)) 참조).

[0173] 비-푸코실화된 항체를 제조할 수 있는 세포주의 다른 예에는 단백질 푸코실화 결핍 Lec13 CHO 세포(문헌(Ripka et al., Arch Biochem Biophys 249, 533-545 (1986)); 미국 특허출원 공개 제2003/0157108호; 및 국제 특허출원 공개 제WO 2004/056312호, 특히 실시예 11)가 포함된다. 대안적으로, 본 발명에 유용한 항체는 유럽 특허출원 제1 176 195 A1호, 국제 특허출원 공개 제WO 03/084570호, 국제 특허출원 공개 제WO 03/085119호, 미국 특허출원 공개 제2003/0115614호, 미국 특허출원 공개 제2004/093621호, 미국 특허출원 공개 제2004/110282호, 미국 특허출원 공개 제2004/110704호, 미국 특허출원 공개 제2004/132140호 및 미국 특허 제6,946,292호(교와(Kyowa))에 개시된 기법에 따라, 예를 들면, 항체 제조를 위해 사용되는 숙주 세포에서 GDP-푸코스 수송자 단백질

질의 활성을 감소시키거나 제거함으로써 Fc 영역에서 감소된 푸코스 잔기를 갖도록 당조작될 수 있다.

[0174] 본 발명에 유용한 당조작된 항체는 변경된 당단백질을 생성하는 발현 시스템, 예컨대, 국제 특허출원 공개 제WO 03/056914호(글리코파이 인코퍼레이티드(GlycoFi, Inc.)) 또는 국제 특허출원 공개 제WO 2004/057002호 및 국제 특허출원 공개 제WO 2004/024927호(그리노베이션(Greenovation))에 교시된 발현 시스템에서 제조될 수도 있다.

[0175] 제조합 방법

[0176] 본 발명에 유용한 항체 및 면역접합체를 제조하는 방법은 당분야에서 잘 공지되어 있고, 국제 특허출원 공개 제WO 2012/146628호, 국제 특허출원 공개 제WO 2005/044859호, 국제 특허출원 공개 제WO 2006/082515호, 국제 특허출원 공개 제WO 2008/017963호, 국제 특허출원 공개 제WO 2005/005635호, 국제 특허출원 공개 제WO 2008/077546호, 국제 특허출원 공개 제WO 2011/023787호, 국제 특허출원 공개 제WO 2011/076683호, 국제 특허출원 공개 제WO 2011/023389호 및 국제 특허출원 공개 제WO 2006/100582호에 기재되어 있다. 다중클론 항체 및 단일클론 항체의 제조를 위한 확립된 방법은 예를 들면, 문헌(Harlow and Lane, "Antibodies, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)에도 기재되어 있다.

[0177] 비-천연 항체 또는 이의 단편은 고체상-펩티드 합성을 이용함으로써 구축될 수 있거나, (예를 들면, 미국 특허 제4,816,567호에 기재된 바와 같이) 제조합적으로 제조될 수 있거나, 또는 예를 들면, 가변 중쇄 및 가변 경쇄를 포함하는 조합 라이브러리를 스크리닝함으로써(예를 들면, 미국 특허 제5,969,108호(McCafferty) 참조) 수득될 수 있다. 본 발명에 유용한 면역접합체 및 항체의 제조합 제조를 위해, 상기 면역접합체 또는 항체를 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드(들)를 분리하고 숙주 세포에서의 추가 클로닝 및/또는 발현을 위해 하나 이상의 벡터 내로 삽입한다. 이러한 폴리뉴클레오티드를 통상적인 절차를 이용하여 용이하게 분리할 수 있고 서열결정할 수 있다. 당업자에게 잘 공지되어 있는 방법을 이용하여, 적절한 전사/번역 조절 신호와 함께 항체 또는 면역접합체의 코딩 서열을 함유하는 발현 벡터를 구축할 수 있다. 이들 방법들은 시험관내 제조합 DNA 기법, 합성 기법 및 생체내 제조합/유전적 제조합을 포함한다. 예를 들면, 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 기법들을 참조한다.

[0178] 본 발명에 유용한 면역접합체는 전체 면역접합체를 코딩하는 단일 폴리뉴클레오티드, 또는 동시발현되는 다수의 (예를 들면, 2개 이상의) 폴리뉴클레오티드들로부터 발현될 수 있다. 동시발현되는 폴리뉴클레오티드들에 의해 코딩된 폴리펩티드는 예를 들면, 다이설파이드 결합 또는 다른 수단을 통해 회합하여 기능성 면역접합체를 형성할 수 있다. 예를 들면, 항체의 경쇄 부분은 항체의 중쇄 부분 및 효과기 잔기를 포함하는 면역접합체의 부분과 별개의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있다. 동시발현되는 경우, 중쇄 폴리펩티드는 경쇄 폴리펩티드와 회합하여 항체를 형성할 것이다.

[0179] 복제 및 제조합 단백질 발현의 뒷받침에 적합한 숙주 세포는 당분야에서 잘 공지되어 있다. 이러한 세포를 적절한 경우 특정 발현 벡터로 형질감염시킬 수 있거나 형질도입할 수 있고, 예를 들면, 임상 적용에 충분한 양의 단백질을 수득하기 위해 다량의 벡터 함유 세포를 대규모 발효기 시딩용으로 생산시킬 수 있다. 적합한 숙주 세포는 원핵 미생물, 예컨대, 에스케리키아 콜라이 또는 다양한 진핵 세포, 예컨대, 중국 햄스터 난소 세포(CHO), 곤충 세포 등을 포함한다. 예를 들면, 특히 글리코실화가 필요하지 않은 경우 제조합 단백질을 세균에서 제조할 수 있다. 발현 후, 상기 단백질을 가용성 분획으로 세균 세포 페이스트로부터 분리할 수 있고 더 정제할 수 있다. 원핵생물 이외에, 진핵 미생물, 예컨대, 글리코실화 경로가 "인간화"되어 있어 부분적으로 또는 전체적으로 인간 글리코실화 패턴을 갖는 단백질의 생성을 야기하는 진균 및 효모 균주를 비롯한 사상 진균 또는 효모가 단백질 코딩 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. (글리코실화된) 단백질의 발현에 적합한 숙주 세포는 다세포 유기체(무척추동물 및 척추동물)로부터도 유래된다. 무척추동물 세포의 예에는 식물 세포 및 곤충 세포가 포함된다. 특히 스포도프테라 프루기페르다(*spodoptera frugiperda*) 세포의 형질감염을 위해 곤충 세포와 함께 사용될 수 있는 다수의 바르코바이러스 균주가 동정되어 있다. 식물 세포 배양물도 숙주로서 사용될 수 있다. 예를 들면, (형질전환 식물에서 항체를 제조하기 위한 플랜티바디스(PLANTIBODIES)™ 기술을 기술하는) 미국 특허 제5,959,177호, 미국 특허 제6,040,498호, 미국 특허 제6,420,548호, 미국 특허 제7,125,978호 및 미국 특허 제6,417,429호를 참조한다. 척추동물 세포도 숙주로서 사용될 수 있다. 예를 들면, 현탁액 중에서 성장하도록 적응된 포유동물 세포주가 유용할 수 있다. 유용한 포유

동물 숙주 세포주의 다른 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주(COS-7), 인간 배아 신장(HEK) 세포주(예를 들면, 문헌(Graham et al., J Gen Virol 36, 59 (1977))에 기재된 293 또는 293T 세포), 새끼 햄스터 신장 세포(BHK), 마우스 세르톨리 세포(예를 들면, 문헌(Mather, Biol Reprod 23, 243-251 (1980))에 기재된 TM4 세포), 원숭이 신장 세포(CV1), 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(VERO-76), 인간 자궁경부암종 세포(HELA), 개 신장 세포(MDCK), 버팔로 래트 간 세포(BRL 3A), 인간 폐 세포(W138), 인간 간 세포(Hep G2), 마우스 유선 종양 세포(MMT 060562), TRI 세포(예를 들면, 문헌(Mather et al., Annals N.Y. Acad Sci 383, 44-68 (1982))에 기재됨), MRC 5 세포 및 FS4 세포이다. 다른 유용한 포유동물 숙주 세포주는 dhfr⁻ CHO 세포(Urlaub et al., Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980))를 비롯한 중국 햄스터 난소(CHO) 세포; 및 골수종 세포주, 예컨대, YO, NSO, P3X63 및 Sp2/0를 포함한다. 단백질 제조에 적합한 특정 포유동물 숙주 세포주의 검토를 위해서는 예를 들면, 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 들면, 포유동물 배양된 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 세균 세포 및 식물 세포뿐만 아니라, 형질전환 동물, 형질전환 식물 또는 배양된 식물 또는 동물 조직 내에 포함된 세포도 포함한다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 진핵 세포, 특히 포유동물 세포, 예컨대, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 인간 배아 신장(HEK) 293 세포 또는 림프계 세포(예를 들면, YO, NSO, Sp20 세포)이다.

[0180] 항체 및 면역접합체를 인간에서 사용하고자 하는 경우, 키메라 형태의 항체가 사용될 수 있고, 이때 항체 불변 영역은 인간으로부터 유래된다. 인간화된 또는 전체 인간 형태의 항체도 당분야에서 잘 공지되어 있는 방법(예를 들면, 미국 특허 제5,565,332호(Winter) 참조)에 따라 제조될 수 있다. 인간화는 (a) 비-인간(예를 들면, 공여자 항체) CDR을, 중요한 골격 잔기(예를 들면, 우수한 항원 결합 친화성 또는 항체 기능을 보유하는 데에 있어서 중요한 골격 잔기)를 보유하거나 보유하지 않는 인간(예를 들면, 수용자 항체) 골격 및 불변 영역에 이식하는 방법, (b) 비-인간 특이성 결정 영역(SDR 또는 a-CDR; 항체-항원 상호작용에 중요한 잔기)만을 인간 골격 및 불변 영역에 이식하는 방법, 또는 (c) 전체 비-인간 가변 도메인들을 이식하되, 표면 잔기의 교체를 통해 이들을 인간-유사 구획으로 "은폐"시키는 방법을 포함하나 이들로 한정되지 않는 다양한 방법에 의해 달성될 수 있다. 인간화된 항체 및 이를 제조하는 방법은 예를 들면, 문헌(Almagro and Fransson, Front Biosci 13, 1619-1633 (2008))에서 검토되어 있고, 예를 들면, 하기 문헌들에 더 기재되어 있다: 문헌(Riechmann et al., Nature 332, 323-329 (1988)); 문헌(Queen et al., Proc Natl Acad Sci USA 86, 10029-10033 (1989)); 미국 특허 제5,821,337호, 미국 특허 제7,527,791호, 미국 특허 제6,982,321호 및 미국 특허 제7,087,409호; 문헌(Jones et al., Nature 321, 522-525 (1986)); 문헌(Morrison et al., Proc Natl Acad Sci 81, 6851-6855 (1984)); 문헌(Morrison and Oi, Adv Immunol 44, 65-92 (1988)); 문헌(Verhoeven et al., Science 239, 1534-1536 (1988)); 문헌(Padlan, Molec Immun 31(3), 169-217 (1994)); 문헌(Kashmiri et al., Methods 36, 25-34 (2005))(SDR(a-CDR) 이식이 기재됨); 문헌(Padlan, Mol Immunol 28, 489-498 (1991))("재표면화"가 기재됨); 문헌(Dall'Acqua et al., Methods 36, 43-60 (2005))("FR 서플링"이 기재됨); 및 문헌(Osbourn et al., Methods 36, 61-68 (2005)) 및 문헌(Klimka et al., Br J Cancer 83, 252-260 (2000))(FR 서플링에 대한 "유도된 선택" 방법이 기재됨). 당분야에서 공지되어 있는 다양한 기법들을 이용하여 인간 항체 및 인간 가변 영역을 제조할 수 있다. 인간 항체는 문헌(van Dijk and van de Winkel, Curr Opin Pharmacol 5, 368-74 (2001)) 및 문헌(Lonberg, Curr Opin Immunol 20, 450-459 (2008))에 일반적으로 기재되어 있다. 인간 가변 영역은 하이드리도마 방법에 의해 제조된 인간 단일클론 항체의 일부를 형성할 수 있고 이러한 인간 단일클론 항체로부터 유래될 수 있다(예를 들면, 문헌(Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)) 참조). 인간 항체 및 인간 가변 영역은 항원 쉘링지에 반응하여 온전한 인간 항체 또는 인간 가변 영역을 갖는 온전한 항체를 생성하도록 변경된 형질전환 동물에게 면역원을 투여함으로써 제조될 수도 있다(예를 들면, 문헌(Lonberg, Nat Biotech 23, 1117-1125 (2005)) 참조). 인간 항체 및 인간 가변 영역은 인간으로부터 유래된 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변 영역 서열을 단리함으로써 발생될 수도 있다(예를 들면, 문헌(Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178, 1-37 (O'Brien et al., ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2001)), 문헌(McCafferty et al., Nature 348, 552-554) 및 문헌(Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991)) 참조). 파지는 전형적으로 단일쇄 Fv(scFv) 단편 또는 Fab 단편으로서 항체 단편을 디스플레이한다.

[0181] 특정 실시양태에서, 본 발명에 유용한 항체는 예를 들면, 전체 내용이 본원에 참고로 도입되는 미국 특허출원 공개 제2004/0132066호에 개시된 방법에 따라 향상된 결합 친화성을 갖도록 조작된다. 본 발명에 유용한 항체가 특이적 항원성 결정인자에 결합하는 능력은 효소-연결된 면역흡착 분석(ELISA) 또는 당업자에게 공지되어 있는 다른 기법, 예를 들면, (비아코어 T100 시스템 상에서 분석되는) 표면 플라즈몬 공명 기법(Liljeblad, et

al., Glyco J 17, 323-329 (2000)) 및 전통적인 결합 분석(Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002))을 통해 측정될 수 있다.

[0182] 본원에 기재된 바와 같이 제조된 항체 및 면역접합체는 당분야에서 공지되어 있는 기법, 예컨대, 고성능 액체 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 겔 전기영동, 친화성 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 등에 의해 정제될 수 있다. 특정 단백질의 정제에 이용되는 실제 조건은 부분적으로 순 전하, 소수성, 친수성 등과 같은 인자에 의해 좌우될 것이고 당업자에게 자명할 것이다.

[0183] 약학 조성물

[0184] 또 다른 양태에서 본 발명은 약학적으로 허용가능한 담체 중에 (a) 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제1 항체 및 효과기 잔기를 포함하는 면역접합체 및 (b) 증가된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제2 항체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 이 약학 조성물은 예를 들면, 후술된 치료 방법들 중 임의의 치료 방법에서 사용될 수 있다.

[0185] 본원에 기재된 바와 같이 면역접합체 및 증가된 효과기 기능을 갖는 항체를 함유하는 약학 조성물은 원하는 순도를 갖는 이러한 면역접합체 및 항체를 하나 이상의 임의적 약학적으로 허용가능한 담체(Remington's Pharmaceutical Sciences 18th edition, Mack Printing Company (1990))와 혼합함으로써 동결건조된 제제 또는 수용액의 형태로 제조된다. 약학적으로 허용가능한 담체는 일반적으로 사용된 용량 및 농도에서 수용자에게 독성을 나타내지 않고, 하기 담체들을 포함하나 이들로 한정되지 않는다: 완충제, 예컨대, 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제(예컨대, 옥타데실다이메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드; 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예컨대, 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 사이클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량(약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대, 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대, 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 라이신; 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함하는 모노사카라이드, 다이사카라이드 및 다른 탄수화물; 킬레이팅제, 예컨대, EDTA; 당, 예컨대, 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염 형성 반대이온, 예컨대, 나트륨; 금속 착물(예를 들면, Zn-단백질 착물); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대, 폴리에틸렌 글리콜(PEG). 본원에서 예시적인 약학적으로 허용가능한 담체는 간질 약물 분산제, 예컨대, 가용성 중성 활성 하이알로니다제 당단백질(sHASEGP), 예를 들면, 인간 가용성 PH-20 하이알루로니다제 당단백질, 예컨대, rHuPH20(하일레넥스(HYLENEX)[®], 박스터 인터내셔널 인코포레이티드(Baxter International, Inc.))을 추가로 포함한다. rHuPH20을 비롯한 특정 예시적인 sHASEGP 및 이의 사용 방법은 미국 특허출원 공개 제2005/0260186호 및 미국 특허출원 공개 제2006/0104968호에 기재되어 있다. 한 양태에서, sHASEGP는 하나 이상의 추가 글리코사미노글리카나제, 예컨대, 콘드로이티나제와 조합된다.

[0186] 예시적인 동결건조된 제제는 미국 특허 제6,267,958호에 기재되어 있다. 수성 제제는 미국 특허 제6,171,586호 및 국제 특허출원 공개 제WO 2006/044908호에 기재된 수성 제제들을 포함한다(후자 제제는 히스티딘-아세테이트 완충제를 포함함).

[0187] 본원의 약학 조성물은 필요한 경우 치료되는 구체적인 증상에 대한 추가 활성 성분들, 바람직하게는 서로 불리하게 영향을 미치지 않는 상보적인 활성을 갖는 추가 활성 성분들도 함유할 수 있다. 예를 들면, 치료되는 질환이 암인 경우, 하나 이상의 항암제, 예를 들면, 화학치료제, 종양 세포 증식 억제제 또는 종양 세포 세포 사멸 활성화제를 추가로 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 활성 성분들은 의도된 목적에 효과적인 양으로 적절하게 함께 존재한다.

[0188] 활성 성분은 예를 들면, 코아세르베이션 기법 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들면, 콜로이드성 약물 전달 시스템(예를 들면, 리포솜, 알부민 마이크로캡슐, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐) 또는 마크로에멀전 중의 각각 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에 포획될 수 있다. 이러한 기법들은 문헌(Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Ed. Mack Printing Company, 1990))에 개시되어 있다.

[0189] 지속 방출 제제가 제조될 수 있다. 지속 방출 제제의 적합한 예에는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스가 포함되고, 상기 매트릭스는 성형된 제품, 예를 들면, 필름 또는 마이크로캡슐의 형태로 존재한다.

- [0190] 생체내 투여를 위해 사용되는 조성물은 일반적으로 멸균성을 나타낸다. 멸균성은 예를 들면, 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성될 수 있다.
- [0191] **치료 방법**
- [0192] 본원에서 제공된, (a) 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제1 항체 및 효과기 잔기를 포함하는 면역접합체와 (b) 증가된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제2 항체의 조합물은 치료 방법에서 사용될 수 있다.
- [0193] 한 양태에서, 약제로서 사용되는, (a) 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제1 항체 및 효과기 잔기를 포함하는 면역접합체와 (b) 증가된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제2 항체의 조합물이 제공된다. 추가 양태에서, 질환의 치료에 사용되는, (a) 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제1 항체 및 효과기 잔기를 포함하는 면역접합체와 (b) 증가된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제2 항체의 조합물이 제공된다. 특정 실시양태에서, 치료 방법에서 사용되는, (a) 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제1 항체 및 효과기 잔기를 포함하는 면역접합체와 (b) 증가된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제2 항체의 조합물이 제공된다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 치료 유효량의 조합물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 질환을 갖는 개체를 치료하는 방법에서 사용되는, (a) 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제1 항체 및 효과기 잔기를 포함하는 면역접합체와 (b) 증가된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제2 항체의 조합물을 제공한다. 이러한 한 실시양태에서, 상기 방법은 예를 들면, 후술된 바와 같은 하나 이상의 추가 치료제를 치료 유효량으로 상기 개체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 추가 실시양태에서, 본 발명은 효과기 세포 기능을 자극하는 데에 사용되는, (a) 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제1 항체 및 효과기 잔기를 포함하는 면역접합체와 (b) 증가된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제2 항체의 조합물을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 유효량의 조합물을 개체에게 투여하여 효과기 세포 기능을 자극하는 단계를 포함하는, 개체에서 효과기 세포 기능을 자극하는 방법에서 사용되는, (a) 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제1 항체 및 효과기 잔기를 포함하는 면역접합체와 (b) 증가된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제2 항체의 조합물을 제공한다. 상기 실시양태들 중 임의의 실시양태에 따른 "개체"는 포유동물, 특히 인간이다. 상기 실시양태들 중 임의의 실시양태에 따른 "질환"은 효과기 세포 기능의 자극에 의해 치료될 수 있는 질환이다. 특정 실시양태에서, 질환은 세포 증식 장애, 특히 암이다.
- [0194] 추가 양태에서, 본 발명은 약제의 제조 또는 조제에 있어서 (a) 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제1 항체 및 효과기 잔기를 포함하는 면역접합체와 (b) 증가된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제2 항체의 조합물의 용도를 제공한다. 한 실시양태에서, 약제는 질환 치료용 약제이다. 추가 실시양태에서, 약제는 치료 유효량의 약제를 질환을 갖는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 질환 치료 방법에서 사용되는 약제이다. 한 이러한 실시양태에서, 상기 방법은 예를 들면, 후술된 바와 같은 하나 이상의 추가 치료제를 치료 유효량으로 개체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 추가 실시양태에서, 약제는 효과기 세포 기능을 자극하기 위한 약제이다. 추가 실시양태에서, 약제는 효과기 세포 기능을 자극하기에 효과적인 양의 약제를 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 효과기 세포 기능을 자극하는 방법에서 사용되는 약제이다. 상기 실시양태들 중 임의의 실시양태에 따른 "개체"는 포유동물, 특히 인간이다. 상기 실시양태들 중 임의의 실시양태에 따른 "질환"은 효과기 세포 기능의 자극에 의해 치료될 수 있는 질환이다. 특정 실시양태에서, 질환은 세포 증식 장애, 특히 암이다.
- [0195] 추가 양태에서, 본 발명은 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 (a) 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제1 항체 및 효과기 잔기를 포함하는 면역접합체와 (b) 증가된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제2 항체의 조합물을 치료 유효량으로 이러한 질환을 갖는 개체에게 투여하는 단계를 포함한다. 한 이러한 실시양태에서, 상기 방법은 예를 들면, 후술된 바와 같은 하나 이상의 추가 치료제를 치료 유효량으로 개체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 상기 실시양태들 중 임의의 실시양태에 따른 "개체"는 포유동물, 특히 인간이다. 상기 실시양태들 중 임의의 실시양태에 따른 "질환"은 효과기 세포 기능의 자극에 의해 치료될 수 있는 질환이다. 특정 실시양태에서, 질환은 세포 증식 장애, 특히 암이다.
- [0196] 추가 양태에서, 본 발명은 개체에서 효과기 세포 기능을 자극하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 (a) 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제1 항체 및 효과기 잔기를 포함하는 면역접합체와 (b) 증가된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제2 항체의 조합물을 유효량으로 상기 개체에게 투여하여 효과기 세포 기능을 자극하는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, "개체"는 포유동물, 특히 인간이다.
- [0197] 추가 양태에서, 본 발명은 예를 들면, 상기 치료 방법들 중 임의의 방법에서 사용되는, 본원에서 제공된 (a) 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제1 항체 및 효과기 잔기를 포함하는 면역접합체와 (b) 증가된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제2 항체의 조합물들 중 임의의 조합물을 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 한 실시양태에서, 약학 조성물은 본원에서 제공된 (a) 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제1 항체 및 효과기 잔기를 포함

하는 면역접합체와 (b) 증가된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제2 항체의 조합물, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 약학 조성물은 본원에서 제공된 조합물들 중 임의의 조합물, 및 예를 들면, 후술된 바와 같은 하나 이상의 추가 치료제를 포함한다.

[0198] 상기 실시양태들 중 임의의 실시양태에 따라, 질환은 효과기 세포 기능의 자극에 의해 치료될 수 있는 장애이다. 본 발명의 조합물은 숙주의 면역 시스템의 자극이 유리한 질환 상태, 특히 향상된 세포 면역 반응이 바람직한 상태를 치료하는데 유용하다. 이들은 숙주 면역 반응이 불충분하거나 결핍되어 있는 질환 상태를 포함할 수 있다. 본 발명의 조합물이 투여될 수 있는 질환 상태는 예를 들면, 세포 면역 반응이 특이적 면역을 위한 중요한 기작일 종양 또는 감염을 포함한다. 본 발명의 조합물이 사용될 수 있는 구체적인 질환 상태는 암, 특히 신장세포암종 또는 흑색종, 면역 결핍, 특히 HIV 양성 환자, 면역억제된 환자, 만성 감염 등을 포함한다. 특정 실시양태에서, 질환은 세포 증식 장애이다. 구체적인 실시양태에서, 질환은 암, 특히 폐암, 대장암, 신장암, 전립선암, 유방암, 두경부암, 난소암, 뇌암, 림프종, 백혈병 및 피부암으로 구성된 군으로부터 선택된 암이다.

[0199] 본 발명의 조합물은 치료에서 단독으로 또는 다른 약제와 함께 사용될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 조합물은 하나 이상의 추가 치료제와 함께 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 추가 치료제는 항암제, 예를 들면, 화학치료제, 종양 세포 증식 억제제 또는 종양 세포 세포 자멸 활성화제이다.

[0200] 본원에서 제공된 조합 치료는 (2종 이상의 치료제가 동일한 또는 별개의 제제에 포함되어 있는 경우) 항체 및 면역접합체를 함께 투여하는 것 및 별도로 투여하는 것을 포괄하고, 어느 경우든 항체의 투여는 면역접합체, 추가 치료제 및/또는 항원보강제의 투여 전에, 투여와 동시에 및/또는 투여 후에 일어날 수 있다. 본 발명의 조합물은 방사선치료와 조합될 수도 있다.

[0201] 본 발명의 조합물(및 임의의 추가 치료제)은 비경구 투여, 폐내 투여 및 비내 투여, 및 원하는 경우 국소 치료를 위한 병변내 투여를 비롯한 임의의 적합한 경로에 의해 투여될 수 있다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 항체 및 면역접합체는 동일한 또는 상이한 경로에 의해 투여될 수 있다. 투약은 부분적으로 투여가 단기간 투여인지 아니면 장기간 투여인지에 따라 임의의 적합한 경로, 예를 들면, 주사, 예컨대, 정맥내 또는 피하 주사에 의해 달성될 수 있다. 1회 투여 또는 다양한 시점에 걸친 다회 투여, 볼루스 투여 및 박동 주입을 포함하나 이들로 한정되지 않는 다양한 투약 일정이 본원에서 고려된다.

[0202] 본 발명의 조합물은 우수한 의학적 관행과 일치하는 방식으로 제제화되고 복용되고 투여될 것이다. 이와 관련하여 고려할 인자는 치료될 구체적인 장애, 치료될 구체적인 포유동물, 개별 환자의 임상 상태, 상기 장애의 원인, 약제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 일정, 및 의사에게 공지되어 있는 다른 인자를 포함한다. 상기 조합물은 임의적으로 해당 장애의 예방 또는 치료를 위해 현재 사용되는 하나 이상의 약제와 함께 제제화되거나 반드시 이러한 약제와 함께 제제화될 필요는 없다. 이러한 다른 약제의 유효량은 제제에 존재하는 항체 및 면역접합체의 양, 장애 또는 치료의 유형, 및 상기 논의된 다른 인자에 의해 좌우된다. 이들은 일반적으로 본원에 기재된 용량 및 투여 경로와 동일한 용량 및 투여 경로로 사용되거나, 본원에 기재된 용량의 약 1% 내지 99%의 용량으로 사용되거나, 적절한 용량 및 경로로서 실험적으로/임상적으로 확인된 임의의 용량 및 임의의 경로로 사용된다.

[0203] 질환의 예방 또는 치료를 위해, (임의적으로 하나 이상의 다른 추가 치료제와 함께 본 발명의 조합물에서 사용될 때) 항체 및 면역접합체의 적절한 용량은 치료되는 질환의 유형, 항체 및 면역접합체의 유형, 질환의 중증도 및 경과, 조합물이 예방 목적으로 투여되는지 아니면 치료 목적으로 투여되는지, 선행 치료, 환자의 임상 병력 및 항체 및/또는 면역접합체에 대한 반응, 및 주치의의 재량에 의해 좌우될 것이다. 항체 및 면역접합체는 한 번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 적절하게 투여된다.

[0204] 질환의 유형 및 중증도에 따라, 약 1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 15 mg/kg (예를 들면, 0.1 mg/kg 내지 10 mg/kg)의 항체가 예를 들면, 1회 이상의 분리 투여에 의해 또는 연속 주입에 의해 환자에게 투여될 초기 후보 용량일 수 있다. 한 전형적인 1일 용량은 상기 언급된 인자들에 따라 약 1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 100 mg/kg 또는 그 이상일 것이다. 수일 또는 이보다 오랜 시간에 걸친 반복된 투여의 경우, 상태에 따라 치료는 일반적으로 질환 증상의 원하는 억제가 일어날 때까지 지속될 것이다. 항체의 한 예시적인 용량은 약 0.05 mg/kg 내지 약 10 mg/kg 의 범위 내에 있을 것이다. 따라서, 약 0.5 mg/kg , 2.0 mg/kg , 4.0 mg/kg 또는 10 mg/kg (또는 이들의 임의의 조합)의 1회 이상의 용량이 환자에게 투여될 수 있다. 이러한 용량은 (예를 들면, 환자가 약 2회 내지 약 20회, 또는 예를 들면, 약 6회 용량의 항체를 제공받도록) 간헐적으로, 예를 들면, 매주 또는 3주마다 투여될 수 있다. 초기 보다 높은 적재 용량에 이어서 1회 이상의 보다 낮은 용량이 투여될 수 있다. 예시적인 투약 요법은 약 4 mg/kg 의 초

기 적재 용량에 이어서 약 2 mg/kg의 매주 유지 용량의 항체를 투여하는 단계를 포함한다. 용량에 대한 동일한 고려사항들이 본 발명에 따른 조합물에서 사용되는 면역접합체에 적용된다. 그러나, 다른 투약 요법이 유용할 수 있다. 이 치료의 진행은 통상적인 기법 및 분석에 의해 용이하게 모니터링된다.

[0205] **제품**

[0206] 본 발명의 또 다른 양태에서, 전술된 장애의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용한 물질을 함유하는 제품이 제공된다. 상기 제품은 하나 이상의 용기; 및 용기 상에 존재하거나 용기와 연결되어 있는 표지 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적합한 용기는 예를 들면, 병, 바이알, 주사기, IV 용액 백 등을 포함한다. 상기 용기는 다양한 물질, 예컨대, 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 상기 용기는 그 자체로 존재하거나 질병의 치료, 예방 및/또는 진단에 효과적인 또 다른 조성물과 조합되어 있는 조성물을 보유하고, 멸균 출입구를 가질 수 있다 (예를 들면, 상기 용기는 피하 주사 바늘에 의해 천공될 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있다). 조성물 중의 하나 이상의 활성 성분은 본 발명의 조합물에서 사용되는 항체이다. 또 다른 활성 성분은 항체와 동일한 조성물 및 용기 내에 존재할 수 있거나 상이한 조성물 및 용기 내에 제공될 수 있는, 본 발명의 조합물에서 사용되는 면역접합체이다. 상기 표지 또는 포장 삽입물은 상기 조성물이 선택된 질병의 치료에 사용된다는 것을 표시한다.

[0207] 한 양태에서, 본 발명은 (a) 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제1 항체 및 효과기 잔기를 포함하는 면역접합체 및 (b) 증가된 효과기 기능을 갖도록 조작된 제2 항체를 동일한 또는 별개의 용개 내에 포함하고 임의적으로 (c) 질환의 치료 방법으로서 조합 치료의 사용을 지시하는 인쇄된 설명서를 포함하는 포장 삽입물을 추가로 포함하는, 질환의 치료를 위한 키트를 제공한다. 나아가, 상기 키트는 (a) 증가된 효과기 기능을 갖도록 조작된 항체를 포함하는 조성물을 내부에 함유하는 제1 용기; (b) 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된 항체 및 효과기 잔기를 포함하는 면역접합체를 포함하는 조성물을 내부에 함유하는 제2 용기; 및 임의적으로 (c) 추가 세포독성제 또는 다른 치료제를 포함하는 조성물을 내부에 함유하는 제3 용기를 포함할 수 있다. 본 발명의 실시양태에서 키트는 조성물이 특정 질병의 치료에 사용될 수 있다는 것을 표시하는 포장 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 키트는 약학적으로 허용가능한 완충제, 예컨대, 정균성 주사용수(BWFI), 포스페이트 완충 식염수, 링거 용액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제3(또는 제4) 용기를 추가로 포함할 수 있다. 상기 키트는 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기를 포함하는, 상업적 관점 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다.

[0208] **실시예**

[0209] 하기 실시예는 본 발명의 방법 및 조성물의 예이다. 상기 제공된 일반적인 설명을 고려할 때, 다양한 다른 실시양태들이 실시될 수 있다는 것이 이해된다.

[0210] **일반적인 방법**

[0211] 항체의 Fc 영역의 당조작은 인간 Fc γ R111 수용체에 대한 증가된 결합 친화성을 발생시키고, 이 증가된 결합 친화성은 향상된 ADCC 유도 및 항-종양 효능으로 해석된다. 인간 Fc γ R111 수용체는 대식세포, 호중구 및 천연 살해(NK) 세포, 수지상세포 및 $\gamma\delta$ T 세포 상에서 발현된다. 마우스에서, 임상전 효능 시험을 위해 가장 널리 사용되는 종인 뮤린 Fc γ R111(인간 Fc γ R111a의 뮤린 상동체)는 대식세포 및 호중구 상에 존재하나 NK 세포 상에는 존재하지 않는다. 따라서, 당조작된 항체의 사용 시 예상된 임의의 개선된 효능이 전체적으로 상기 모델에 반영되어 있지는 않다. 본 발명자들은 혈액, 림프 조직 및 종양에서 뮤린 NK 세포 상에서의 안정한 인간 CD16a 발현을 나타내는, 인간 Fc γ R111a(CD16a)에 대한 형질전환 마우스들을 발생시켰다. 나아가, 이들 형질전환 마우스들의 혈액에서 자극되지 않은 NK 세포 상에서의 인간 CD16a의 발현 수준은 인간에서 발견된 발현 수준을 반영한다. 또한, 본 발명자들은 항체 치료 후 종양 관련 NK 세포 상에서의 인간 Fc γ R111a의 하향조절이 항-종양 활성과 상관관계를 갖는다는 것을 보여주었다. 마지막으로, 본 발명자들은 이 신규 마우스 품종을 사용하여 그들의 인간 CD16 음성 한배 새끼들과 비교할 때 종양 모델에서 당조작된 항체 치료의 유의하게 개선된 효능을 보여주었다.

[0212] **실시예 1**

[0213] **FaDu 두경부암종 이종이식물 모델**

[0214] IL-2 사중 돌연변이체(qm)를 포함하는 FAP-표적화된 28H1 IgG-IL2 및 비-표적화된 DP47GS IgG-IL2 면역접합체 (각각 서열번호 125, 서열번호 126, 서열번호 129, 및 서열번호 133 내지 서열번호 135) 및 항-EGFR 글리코맵 (서열번호 102 및 서열번호 103)을 SCID 마우스 내로 설내로 주입된 인간 두경부암종 세포주 FaDu에서 시험하였

다. 이 종양 모델이 FAP에 대한 양성을 나타낸다는 것을 신선한 동결된 조직에 대한 IHC로 확인하였다. FaDu 세포를 처음에 ATCC(아메리칸 타입 컬처 콜렉션)로부터 입수하여 증폭한 후 글리카트(Glycart) 내부 세포 은행에 기탁하였다. 5% CO₂에서 수-포화된 대기 하에서 37℃에서 10% FCS(김코)를 함유하는 DMEM에서 종양 세포주를 상용적으로 배양하였다. 95.8%의 생존율에서 설내 주입을 위해 시험관내 계대배양 9를 사용하였다. 20 μ l의 세포 현탁액(AimV 배지(김코(Gibco))) 중의 2×10^5 개 FaDu 세포를 설내로 주입하였다. 실험의 시작 시 8주령 내지 9주령인 암컷 SCID 마우스(타코닉스(Taconics), 덴마크 소재)를 약정된 지침(GV-Solas; Felasa; TierschG)에 따라 매일 12시간 명/12시간 암의 주기로 특정 발열원 무함유 조건 하에서 유지하였다. 실험 연구 프로토콜은 지방정부에 의해 검토되었고 승인되었다(P2008016). 도착 후, 새로운 환경에 적응하게 하고 관찰하기 위해 동물을 1주 동안 유지하였다. 계속된 건강 모니터링을 정기적으로 수행하였다. 연구 0일째 날, 2×10^5 개의 FaDu 세포를 마우스에게 설내로 주입하고 상기 마우스를 무작위배정하고 체중을 측정하였다. 종양 세포 주입으로부터 1주 후, 28H1 IgG-IL2 qm 면역접합체, DP47GS IgG-IL2 qm 면역접합체, 항-EGFR 글리코맵, 28H1 IgG-IL2 qm 면역접합체와 항-EGFR 글리코맵의 조합물, 또는 DP47GS IgG-IL2 qm 면역접합체와 항-EGFR 글리코맵의 조합물을 4주 동안 매주 1회 마우스에게 정맥내로 주입하였다. 200 μ l의 적절한 용액을 모든 마우스들에게 정맥내로 주입하였다. 용량은 표 2에 특정되어 있다. PBS를 비히클 군의 마우스에게 주입하고, 28H1 IgG-IL2 qm 면역접합체, DP47GS IgG-IL2 qm 면역접합체, 항-EGFR 글리코맵, 28H1 IgG-IL2 qm 면역접합체와 항-EGFR 글리코맵의 조합물, 또는 DP47GS IgG-IL2 qm 면역접합체와 항-EGFR 글리코맵의 조합물을 치료군의 마우스에게 주입하였다. 200 μ l 당 적절한 양의 면역접합체를 수득하기 위해, 저장 용액을 필요한 경우 PBS로 희석하였다. 도 1a는 FAP-표적화된 28H1 IgG-IL2 qm 면역접합체와 항-EGFR 글리코맵의 조합물만이 향상된 평균 생존율 면에서 28H1 IgG-IL2 qm 면역접합체 또는 항-EGFR 글리코맵 단독보다 더 우수한 효능을 매개하였다는 것을 보여준다. 이와 대조적으로, 비-표적화된 DP47GS IgG-IL2 qm과 항-EGFR 글리코맵의 조합물은 단일 약제 투여에 비해 우수성을 보여주지 않았다(도 1b).

[표 2]

화합물	용량/마우스	제제화 완충제	농도 (mg/ml)
항-EGFR 글리코맵	625 μ g	20 mM His/HisCl 240 mM 트레할로스 0.02% 폴리소르베이트 80 10 mM 메티오닌 pH 5.5	26.65 (= 저장 용액)
FAP 28H1 IgG-IL2 qm	50 μ g	20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl, pH 6.0	3.46 (= 저장 용액)
비-표적화된 DP47GS IgG-IL2 qm	50 μ g	20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl, pH 6.0	5.87 (= 저장 용액)

실시예 2

IL-2 면역접합체에 의한 NK 세포 사멸 성능의 시험관내 증강

NK 세포에 대한 면역접합체의 효과를 확인하기 위해, 본 발명자들은 면역접합체, 특히 효과기 잔기로서 IL-2를 포함하는 면역접합체를 사용한 처리 시 종양 세포의 사멸을 평가하였다. 이를 목적으로, 히스토파크(Histopaque)-1077(시그마 다이아그노스틱스 인코포레이티드(Sigma Diagnostics Inc.), 미국 미조리주 세인트루이스 소재)을 사용하여 표준 절차에 따라 말초 혈액 단핵세포(PBMC)를 분리하였다. 요약하건대, 건강한 자원자로부터 채취된-처리된 주사기로 정맥 혈액을 채취하였다. 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는 PBS로 혈액을 2:1로 희석하고 히스토파크-1077 상에 적층하였다. 구배를 중단 없이 실온(RT)에서 30분 동안 450 x g에서 원심분리하였다. PBMC를 함유하는 중간층을 모아 PBS로 총 3회 세척하였다(실온에서 10분 동안 350 x g에 이어서 300 x g).

단리된 PBMC를 45시간 동안 세포 상청액에 첨가된 IL-2(프로류킨) 또는 IL-2 면역접합체와 함께 항온처리하였다. 그 후, PBMC를 회수하고 4시간 동안 10:1의 E:T에서 A549 세포의 항-EGFR 글리코맵-매개된 ADCC를 위해 사용하였다. 세포 상청액 내의 LDH 방출을 측정하여 표적 세포 사멸을 검출하였다(로슈 세포독성 검출 키트 LDH). 도 2는 상이한 농도의 항-EGFR 글리코맵의 존재 하에서 0.57 nM(도 2a) 또는 5.7 nM(도

2b) FAP-표적화된 28H1 IgG-IL2 qm 면역접합체 또는 IL-2(프로류킨)로 전처리되었거나 전처리되지 않은 PBMC에 의한 총 A549 종양 세포 사멸을 보여준다. 그래프는 효과기 세포의 면역접합체 전처리가 처리되지 않은 효과기 세포와 비교시 글리코막의 농도의 증가에 따라 표적 세포 사멸의 보다 큰 증가를 발생시킨다는 것을 보여준다.

[0221] 실시예 3

[0222] LS174T 대장 이종이식물 모델

[0223] CEA-표적화된 CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체(서열번호 136 내지 서열번호 138), 항-EGFR 글리코막(서열번호 102 및 서열번호 103) 및 세톡시맵을 SCID-인간 FcγRIII 형질전환 마우스 내로 비장내로 주입된 인간 대장 LS174T 세포주에서 시험하였다. 이 종양 모델이 CEA에 대한 양성을 나타낸다는 것을 신선한 동결된 조직에 대한 IHC로 확인하였다. LS174T 세포(인간 결장암종 세포)를 처음에 ECACC(유럽피언 콜렉션 오프 셀 컬처(European Collection of Cell Culture))로부터 입수하여 증폭한 후 글리카트 내부 세포 은행에 기탁하였다. 10% FCS(피에이에이 라보라토리스(PAA Laboratories), 오스트리아 소재), 1% 글루타맥스 및 1% MEM 비-필수 아미노산(시그마)을 함유하는 MEM 이글 배지에서 LS174T를 배양하였다. 상기 세포를 5% CO₂에서 수-포화된 대기 하에서 37℃에서 배양하였다. 99%의 생존율에서 비장내 주입을 위해 시험관내 계대배양 19 또는 23을 사용하였다. 마취된 SCID FcγRIII 형질전환 마우스의 좌측 복부 부위에서 작은 절개를 만들었다. 30 μl의 세포 현탁액(AimV 배지 중의 2 x 10⁶개의 LS174T 세포)을 비장의 피막 바로 아래에서 복부벽을 통해 주입하였다. 클램프 또는 분해가능한 봉합사를 사용하여 피부 상처를 봉합하였다. 실험의 시작 시 8주령 내지 9주령인 암컷 SCID FcγRIII 형질전환 마우스(타코닉스(덴마크 소재)로부터 구입됨)를 약정된 지침(GV-Solas; Felasa; TierschG)에 따라 매일 12시간 명/12시간 암의 주기로 특정 발열원 무함유 조건 하에서 유지하였다. 실험 연구 프로토콜은 지방정부에 의해 검토되었고 승인되었다(P2008016, P2011/128). 도착 후, 새로운 환경에 적응하게 하고 관찰하기 위해 동물을 1주 동안 유지하였다. 계속된 건강 모니터링을 정기적으로 수행하였다. 연구 0일째 날, 2 x 10⁶개의 LS174T 세포를 마우스에게 비장내로 주입하고 상기 마우스를 무작위배정하고 체중을 측정하였다. 종양 세포 주입으로부터 1주 후, CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체, 항-EGFR 글리코막, 세톡시맵, CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체와 항-EGFR 글리코막의 조합물, 또는 CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체와 세톡시맵의 조합물을 3주 동안 매주 1회 마우스에게 정맥내로 주입하였다. 200 μl의 적절한 용액을 모든 마우스들에게 정맥내로 주입하였다. 용량은 표 3에 특정되어 있다. PBS를 비히클 군의 마우스에게 주입하고, CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체, 항-EGFR 글리코막, 세톡시맵, CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체와 항-EGFR 글리코막의 조합물, 또는 CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체와 세톡시맵의 조합물을 치료군의 마우스에게 주입하였다. 200 μl 당 적절한 양의 면역접합체를 수득하기 위해, 저장 용액을 필요한 경우 PBS로 희석하였다. 도 3 및 표 3A 및 3B는 CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체와 항-EGFR 글리코막의 조합물이 향상된 평균 생존율 및 전체 생존율 면에서 CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체 단독, 항-EGFR 글리코막 단독, 세톡시맵 단독, 또는 CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체와 세톡시맵의 조합물보다 더 우수한 효능을 매개하였다는 것을 보여준다.

[표 3]

화합물	용량/마우스	제제화 완충제	농도 (mg/ml)
항-EGFR 글리코막	500 μg	20 mM His/HisCl 240 mM 트레할로스 0.02% 트윈 20 pH 6.0	25.3 (= 저장 용액)
CH1A1A IgG-IL2 qm	40 μg(도 3a) 또는 20 μg(도 3b)	20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl, pH 6.0	4.27 (= 저장 용액)
세톡시맵	500 μg	10 mM Na-시트레이트, NaCl, 글리신, 트윈 80, pH 5.5	4.36 (= 저장 용액)

[0226] [표 3A]

도 3a에 상응하는 생존율 데이터의 요약

처리	평균 생존율(일)	전체 생존율
비히클	24	0/8
CH1A1A IgG-IL2 qm	33	0/8
항-EGFR 글리코맵	40	0/8
CH1A1A IgG-IL2 qm + 항-EGFR 글리코맵	141	3/8

[0227]

[0228] [표 3B]

도 3b에 상응하는 생존율 데이터의 요약

처리	평균 생존율(일)	전체 생존율
비히클	29	0/8
CH1A1A IgG-IL2 qm	35	0/8
세톡시맵	39	0/8
CH1A1A IgG-IL2 qm + 세톡시맵	53(진행중)	2/8(진행중)

[0229]

[0230] 실시예 4

[0231] A549 폐 이종이식물 모델

[0232] CEA-표적화된 CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체(서열번호 136 내지 서열번호 138), 항-EGFR 글리코맵(서열번호 102 및 서열번호 103) 및 세톡시맵을 SCID-인간 Fc γ RIII 형질전환 마우스 내로 정맥내로 주입된 인간 NSCLC 세포주 A549에서 시험하였다.

[0233] A549 비-소세포 폐암종 세포를 처음에 ATCC(CCL-185)로부터 입수하여 증폭한 후 로슈-글리카트 내부 세포 은행에 기탁하였다. 5% CO₂에서 수-포화된 대기 하에서 37°C에서 10% FCS(김코)를 함유하는 DMEM에서 종양 세포주를 상용적으로 배양하였다. 97% 내지 98%의 생존율에서 이식을 위해 계대배양 8을 사용하였다. 200 μ l의 AimV 세포 배양 배지(김코) 중의 (동물 당) 5 x 10⁶개 세포를 꼬리 정맥 내로 정맥내 주입하였다.

[0234] 실험의 시작 시 8주령 내지 9주령인 암컷 SCID-Fc γ RIII 마우스(로슈-글리카트; 스위스 소재)(찰스 리버스(프랑스 리옹 소재)에서 사육됨)를 약정된 지침(GV-Solas; Felasa; TierschG)에 따라 매일 12시간 명/12시간 암의 주기로 특정 발열원 무함유 조건 하에서 유지하였다. 실험 연구 프로토콜은 지방정부에 의해 검토되었고 승인되었다(P2011/128). 도착 후, 새로운 환경에 적응하게 하고 관찰하기 위해 동물을 1주 동안 유지하였다. 계속된 건강 모니터링을 정기적으로 수행하였다.

[0235] 연구 0일째 날, 5 x 10⁶개의 A549 세포를 마우스에게 정맥내로 주입하고 상기 마우스를 무작위배정하고 체중을 측정하였다. 종양 세포 주입으로부터 1주(도 4a) 또는 2주(도 4b) 후, CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체, 항-EGFR 글리코맵, 세톡시맵, CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체와 항-EGFR 글리코맵의 조합물, 또는 CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체와 세톡시맵의 조합물을 3주 동안 매주 1회 마우스에게 정맥내로 주입하였다. 200 μ l의 적절한 용액을 모든 마우스들에게 정맥내로 주입하였다. 용량은 표 4에 특정되어 있다. PBS를 비히클 군의 마우스에게 주입하고, CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체, 항-EGFR 글리코맵, CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체와 항-EGFR 글리코맵의 조합물, 또는 CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체와 세톡시맵의 조합물을 치료군의 마우스에게 주입하였다. 200 μ l 당 적절한 양의 면역접합체를 수득하기 위해, 저장 용액을 필요한 경우 PBS로 희석하였다.

[0236] 도 4 및 표 4A 및 4B는 CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체와 항-EGFR 글리코맵의 조합물이 향상된 평균 생존율 및 전체 생존율 면에서 각각의 면역접합체, 항-EGFR 글리코맵 또는 세톡시맵 단독뿐만 아니라 CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체와 세톡시맵의 조합물보다 더 우수한 효능을 매개한다는 것을 보여준다.

[0237] [표 4]

화합물	용량	제제화 완충제	농도 (mg/ml)
CH1A1A IgG-IL2 qm	20 μ g	20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl, pH 6.0	4.27 (= 저장 용액)
항-EGFR 글리코맵	500 μ g	20 mM His/HisCl, 240 mM 트레할로스, 0.02% 트윈 20, pH 6.0	25.3 (= 저장 용액)
세톡시맵	500 μ g	10 mM Na-시트레이트, NaCl, 글리신, 트윈 80, pH 5.5	4.36 (= 저장 용액)

[0238]

[0239] [표 4A]

도 4a에 상응하는 생존율 데이터의 요약

처리	평균 생존율(일)	전체 생존율
비히클	53	0/9
CH1A1A IgG-IL2 qm	103	0/9
항-EGFR 글리코맵	211	2/9
CH1A1A IgG-IL2 qm + 항-EGFR 글리코맵	도달되지 않음	9/9

[0240]

[0241] [표 4B]

도 4b에 상응하는 생존율 데이터의 요약

처리	평균 생존율(일)	전체 생존율
비히클	49	0/10
CH1A1A IgG-IL2 qm	64	0/10
세톡시맵	68	0/10
CH1A1A IgG-IL2 qm + 세톡시맵	91	0/10

[0242]

[0243] 실시예 5

[0244] LS174T 대장 이중이식물 모델

[0245] CEA-표적화된 CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체(서열번호 136 내지 서열번호 138) 및 항-Her3 글리코맵(서열번호 142 및 서열번호 146)을 SCID-인간 Fc γ RIII 형질전환 마우스 내로 비장내로 주입된 인간 대장 LS174T 세포주에서 시험하였다.

[0246] LS174T 세포(인간 결장암종 세포)를 처음에 ECACC(유럽피언 콜렉션 오프 셀 컬처)로부터 입수하여 증폭한 후 로슈-글리카트 내부 세포 은행에 기탁하였다. 10% FCS(피에이에이 라보라토리스, 오스트리아 소재), 1% 글루타맥스 및 1% MEM 비-필수 아미노산(시그마)을 함유하는 MEM 이글 배지에서 LS174T를 배양하였다. 상기 세포를 5% CO₂에서 수-포화된 대기 하에서 37°C에서 배양하였다. 97.9%의 생존율에서 비장내 주입을 위해 시험관내 계대 배양 21을 사용하였다. 마취된 SCID-인간 Fc γ RIII 형질전환 마우스의 좌측 복부 부위에서 작은 절개를 만들었다. 30 μ l의 세포 현탁액(AimV 배지 중의 2 x 10⁶개의 LS174T 세포)을 비장의 피막 바로 아래에서 복부벽을 통해 주입하였다. 분해가능한 봉합사를 사용하여 피부 상처를 봉합하였다.

[0247] 실험의 시작 시 8주령 내지 9주령인 암컷 SCID-인간 Fc γ RIII 형질전환 마우스(로슈-글리카트, 스위스 소재)를 약정된 지침(GV-Solas; Felasa; TierschG)에 따라 매일 12시간 명/12시간 암의 주기로 특정 발열원 무함유 조건 하에서 유지하였다. 실험 연구 프로토콜은 지방정부에 의해 검토되었고 승인되었다(P2011/128). 도착 후, 새로운 환경에 적응하게 하고 관찰하기 위해 동물을 1주 동안 유지하였다. 계속된 건강 모니터링을 정기적으로 수행하였다.

[0248] 연구 0일째 날, 2 x 10⁶개의 LS174T 세포를 마우스에게 비장내로 주입하고 상기 마우스를 무작위배정하고 체중을 측정하였다. 종양 세포 주입으로부터 1주 후, CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체, 항-Her3 글리코맵, CH1A1A

IgG-IL2 qm 면역접합체와 항-Her3 글리코마의 조합물을 3주 동안 매주 1회 마우스에게 정맥내로 주입하였다.

200 μ l의 적절한 용액을 모든 마우스들에게 정맥내로 주입하였다. 용량은 표 5에 특정되어 있다. PBS를 비히클 군의 마우스에게 주입하고, CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체, 항-Her3 글리코마, 또는 CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체와 항-Her3 글리코마의 조합물을 치료군의 마우스에게 주입하였다. 200 μ l 당 적절한 양의 면역접합체를 수득하기 위해, 저장 용액을 필요한 경우 PBS로 희석하였다. 도 5 및 표 5A는 CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체와 항-Her3 글리코마의 조합물이 향상된 평균 생존율 면에서 CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체 또는 항-Her3 글리코마 단독보다 더 우수한 효능을 매개하였다는 것을 보여준다.

[표 5]

화합물	용량	제제화 완충제	농도 (mg/ml)
항-Her3 글리코마	200 μ g		10.0 (= 저장 용액)
CH1A1A IgG-IL2 qm	20 μ g	20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl, pH 6.0	13.60 (= 저장 용액)

[표 5A]

도 5에 상응하는 생존율 데이터의 요약

처리	평균 생존율(일)	전체 생존율
비히클	24	0/10
CH1A1A IgG-IL2 qm	25	0/10
항-Her3 글리코마	27	0/10
CH1A1A IgG-IL2 qm + 항-Her3 글리코마	34	0/10

실시예 6

ACHN 신장암종 이종이식물 모델

IL-2 사중 돌연변이체(qm)를 포함하는 FAP-표적화된 28H1 IgG-IL2 면역접합체(서열번호 125, 서열번호 126 및 서열번호 129) 및 항-EGFR 글리코마(서열번호 102 및 서열번호 103)을 SCID-인간 Fc γ RIII 형질전환 마우스 내로 신장내로 주입된 인간 신장세포주 ACHN에서 시험하였다.

ACHN 세포(인간 신장 선암종 세포)를 처음에 ATCC(아메리칸 타입 컬처 콜렉션)로부터 입수하여 증폭한 후 로슈-글리카트 내부 세포 은행에 기탁하였다. 10% FCS를 함유하는 DMEM에서 ACHN을 배양하였다. 상기 세포를 5% CO₂에서 수-포화된 대기 하에서 37°C에서 배양하였다. 96.4%의 생존율에서 신장내 주입을 위해 시험관내 계대 배양 22를 사용하였다. 마취된 SCID-인간 Fc γ RIII 형질전환 마우스의 우측 옆구리 및 복막벽에서 작은 절개(2 cm)를 만들었다. 50 μ l(AimV 배지 중의 1 x 10⁶ 개의 ACHN 세포)의 세포 현탁액을 신장에서 2 mm 피막하로 주입하였다. 분해가능한 봉합사를 사용하여 피부 상처 및 복막벽을 봉합하였다.

실험의 시작 시 8주령 내지 9주령인 암컷 SCID-인간 Fc γ RIII 형질전환 마우스(로슈-글리카트, 스위스 소재)를 약정된 지침(GV-Solas; Felasa; TierschG)에 따라 매일 12시간 명/12시간 암의 주기로 특정 발열원 무함유 조건 하에서 유지하였다. 실험 연구 프로토콜은 지방정부에 의해 검토되었고 승인되었다(P2011/128). 도착 후, 새로운 환경에 적응하게 하고 관찰하기 위해 동물을 1주 동안 유지하였다. 계속된 건강 모니터링을 정기적으로 수행하였다.

연구 0일째 날, 1 x 10⁶ 개의 ACHN 세포를 마우스에게 신장내로 주입하고 상기 마우스를 무작위배정하고 체중을 측정하였다. 종양 세포 주입으로부터 1주 후, 비히클, 항-EGFR 글리코마, 28H1 IgG-IL2 면역접합체와 항-EGFR 글리코마의 조합물, 또는 프로류킨[®]과 항-EGFR 글리코마의 조합물을 마우스에게 정맥내로 주입하였다. 항-EGFR 글리코마 및 28H1 IgG-IL2 면역접합체를 3주 동안 매주 1회 투여하였다. 프로류킨[®]을 3주 동안 월요일부터 금요일까지 매일 주입하였다.

200 μ l의 적절한 용액을 모든 마우스들에게 정맥내로 주입하였다. 용량은 표 6에 특정되어 있다. PBS를 비히

클 군의 마우스에게 주입하고, 항-EGFR 글리코맵, 28H1 IgG-IL2 면역접합체와 항-EGFR 글리코맵의 조합물, 또는 프로류킨[®]과 항-EGFR 글리코맵의 조합물을 치료군의 마우스에게 주입하였다. 200 μ l 당 적절한 양의 면역접합체를 수득하기 위해, 저장 용액을 필요한 경우 PBS로 희석하였다.

도 6 및 표 6A는 28H1 IgG-IL2 면역접합체와 항-EGFR 글리코맵의 조합물이 향상된 평균 생존율 및 전체 생존율 면에서 항-EGFR 글리코맵 단독 및 프로류킨[®]과 항-EGFR 글리코맵의 조합물보다 더 우수한 효능을 매개하였다는 것을 보여준다.

[표 6]

화합물	용량	제제화 완충제	농도 (mg/ml)
항-EGFR-글리코맵	625 μ g	20 mM His/HisCl 240 mM 트레할로스 0.02% 트윈 20, pH 6.0	26.65 (= 저장 용액)
28H1 IgG-IL2	78 μ g	20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl, pH6.0	3.46 (= 저장 용액)
프로류킨 [®]	22.2 μ g		1 (= 저장 용액)

[표 6A]

도 6에 상응하는 생존율 데이터의 요약

처리	평균 생존율(일)	전체 생존율
비히클	59	0/7
항-EGFR 글리코맵	155	0/7
항-EGFR 글리코맵 + 프로류킨 [®]	174	0/7
28H1 IgG-IL2 qm + 항-EGFR 글리코맵	도달되지 않음	7/7

실시예 7

IL-2 면역접합체에 의한 NK 세포 사멸 성능 및 NK 세포 CD25 및 CD69 발현의 시험관내 증강

실시예 2에서와 같이, 본 발명자들은 면역접합체, 특히 효과기 잔기로서 IL-2 및 글리코맵(이 경우, 항-Her3 글리코맵)을 포함하는 면역접합체를 사용한 처리 시 NK 세포에 의한 종양 세포(LS174T)의 사멸을 평가하였다. 세포 상청액 내로의 LDH 방출을 측정함으로써 표적 세포 사멸을 검출하였다.

신선한 혈액으로부터 PBMC를 분리하였다. 요약하건대, 혈액을 PBS로 3:1 희석하였다. 약 30 ml의 혈액/PBS 혼합물을 15 ml의 히스토파크(시그마) 상에 적층하고 중단 없이 30분 동안 450 g에서 원심분리하였다. 5 ml 피펫을 이용하여 림프구를 PBS 함유 50 ml 튜브 내로 모았다. 상기 튜브를 PBS로 50 ml까지 충전시키고 350 g에서 10분 동안 원심분리하였다. 상청액을 따라내고 펠렛을 50 ml PBS에 재현탁하고 300 g에서 10분 동안 원심분리하였다. 세척 단계를 1회 반복하였다. 세포를 카운팅하고, ml 당 1×10^6 개 세포의 밀도로 1% 글루타민 및 10% FCS를 함유하는 미리 가온된 RPMI에 재현탁하였다. 세포를 37°C에서 하룻밤 동안 항온처리하였다. 다음날, 세포를 수거하고 카운팅하였다.

LS174T(ECACC #87060401)는 인간 백인 결장 선암종 세포주이다. 1% 글루타민, 1% 비-필수 아미노산 및 10% FCS를 함유하는 EMEM에서 상기 세포를 배양하고 전면생장에 도달하기 전에 2일 또는 3일마다 분할하였다. 트립신을 사용하여 LS174T 세포를 탈착시켰다. 상기 세포를 카운팅하고 생존율을 조사하였다. 분석 전 세포의 생존율은 99.4%이었다. 상기 세포를 ml 당 0.3×10^6 개의 밀도로 그들 각각의 배지에 재현탁하였다. 100 μ l의 세포 현탁액을 96웰 세포 배양물-처리된 평저 플레이트 내로 시딩하고 37°C에서 하룻밤 동안 항온처리하였다. 다음날, 상청액을 세포로부터 제거하였다. 그 다음, 50 μ l의 희석된 항-Her3 글리코맵(서열번호 142 및 서열번호 146)(1000 ng/ml, 100 ng/ml 및 10 ng/ml) 또는 배지를 각각의 웰에 첨가하였다. 그 다음, 표시된 농도(도 7 참조)의 CEA-표적화된 CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체(서열번호 136 내지 서열번호 138) 또는 배지를 웰 당 50 μ l씩 첨가하였다. 실온에서 10분 동안 항온처리한 후, 100 μ l의 PBMC(ml 당 3×10^6 개 세포) 또는 배지를 웰

당 200 μ l의 최종 부피에 도달하도록 첨가하였다. 상기 세포를 항온처리기 내에서 24시간 동안 항온처리하였다. 항온처리 후, 플레이트를 400 g에서 4분 동안 원심분리하고 상청액을 수집하였다. 웰 당 50 μ l의 상청액을 사용하여 LDH 방출을 측정하였다(로슈 세포독성 검출 키트 LDH). 남은 상청액을 추후 사용할 때까지 -20℃에서 저장하였다. 상기 세포를 FACS 완충제에 재현탁하였고 FACS 염색을 시작하기 전에 4℃에서 저장하였다(하기 참조).

[0271] 도 7은 항-Her3 글리코맵 단독(좌측 패널), CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체 단독(우측 패널), 또는 CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체와 항-Her3 글리코맵의 조합물(우측 패널)을 사용한 처리 시 PBMC에 의한 총 LS174T 세포 사멸을 보여준다.

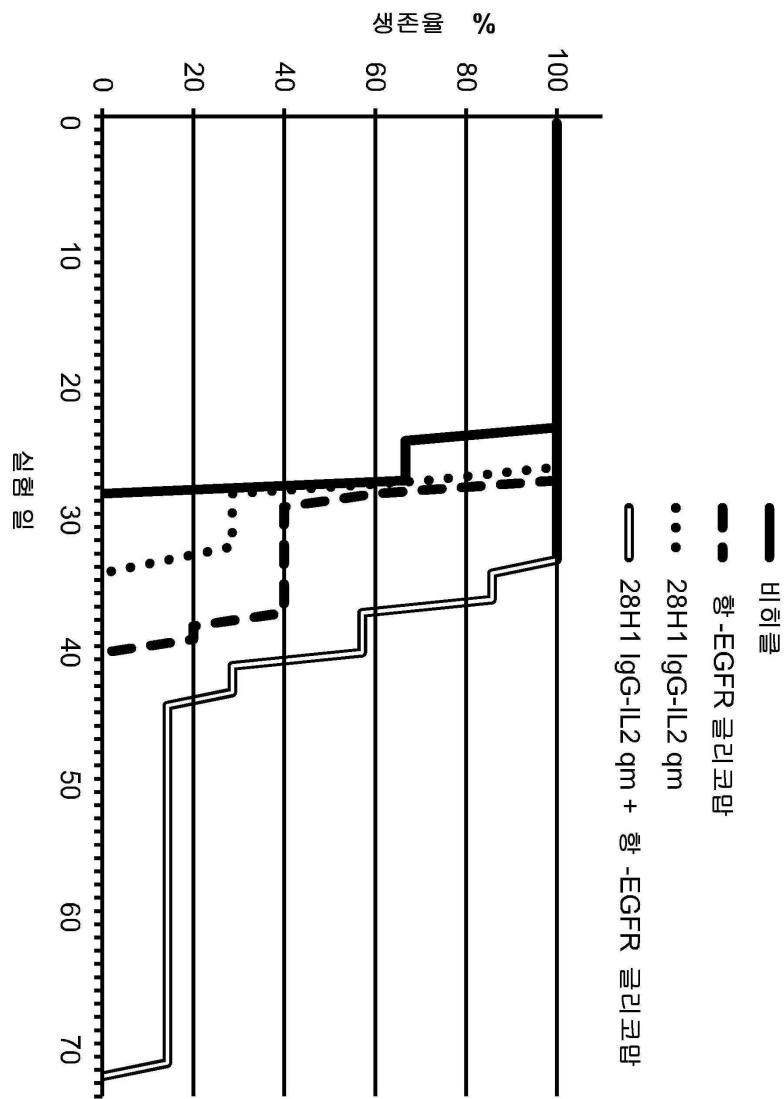
[0272] PBMC를 24시간 후 수거하고 NK 세포 CD25 및 CD69 발현의 FACS 분석을 위해 사용하였다. 상기 세포를 400 g에서 4분 동안 원심분리하고 0.1% BSA를 함유하는 PBS(FACS 완충제)로 1회 세척하였다. 그 다음, 웰 당 20 μ l의 항체 혼합물을 세포에 첨가하였다. 상기 세포를 냉장고에서 30분 동안 항온처리하였다. 그 후, 상기 세포를 FACS 완충제로 2회 세척하고 웰 당 200 μ l의 2% PFA 함유 FACS 완충제에 재현탁하였다. BD FACS 포테사(Fortessa) 및 하기 항체 혼합물을 사용하여 분석을 수행하였다: CD3 PE/Cy7(바이오레전드(BioLegend), #300420; 1:40으로 희석됨), CD56 APC(바이오레전드 #318310; 1:20으로 희석됨), CD69 브릴리언트 바이올렛(Brilliant Violet) 421(바이오레전드 #310929; 1:40으로 희석됨), CD25 PE(비디 바이오사이언스(BD Bioscience) #557138; 1:20으로 희석됨).

[0273] 도 8은 항-Her3 글리코맵 단독(좌측 패널), CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체 단독(우측 패널), 또는 CH1A1A IgG-IL2 qm 면역접합체와 항-Her3 글리코맵의 조합물(우측 패널)을 사용한 처리 시 NK 세포 상에서의 CD25(도 8a) 또는 CD69(도 8b)의 발현을 보여준다.

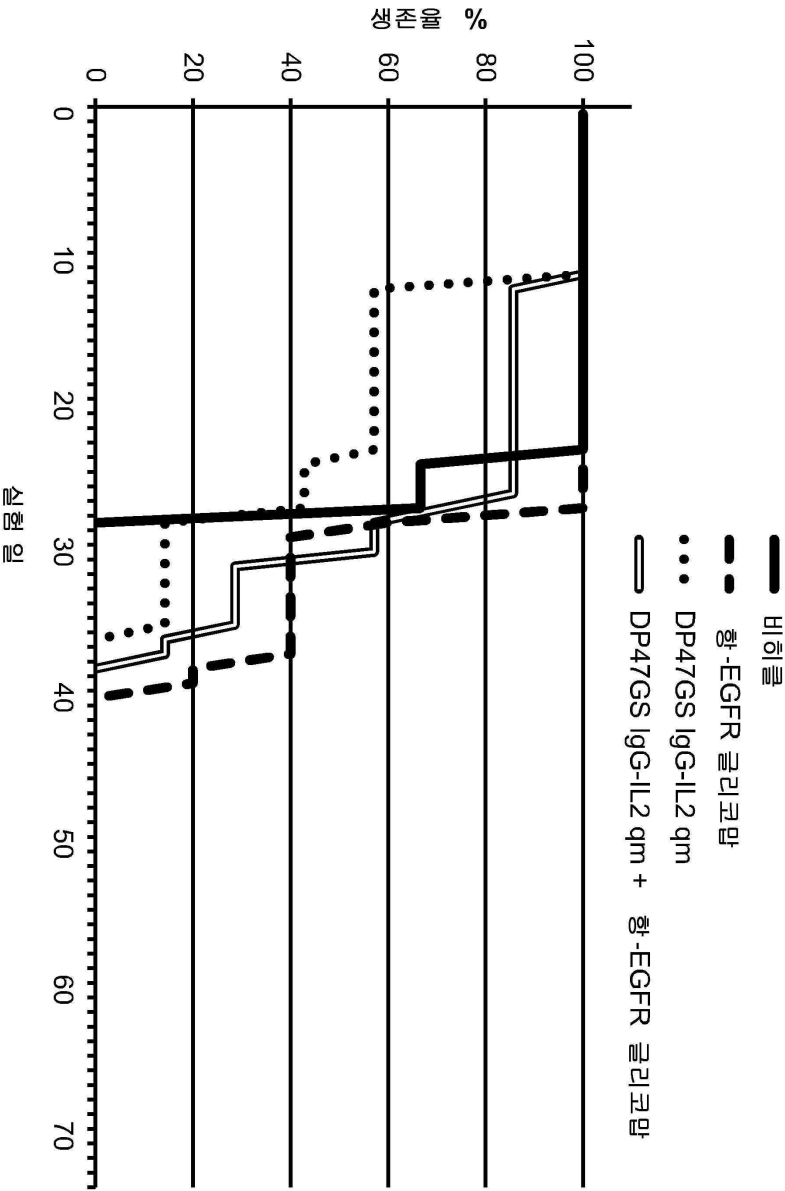
[0274] 상기 발명이 명확한 이해를 목적으로 설명 및 예에 의해 다소 상세히 기재되어 있지만, 설명 및 예는 본 발명의 범위를 한정하는 것으로서 해석되어서는 안된다. 본원에서 인용된 모든 특허 및 과학 문헌들의 개시내용은 온전히 그대로 명확히 참고로 도입된다.

도면

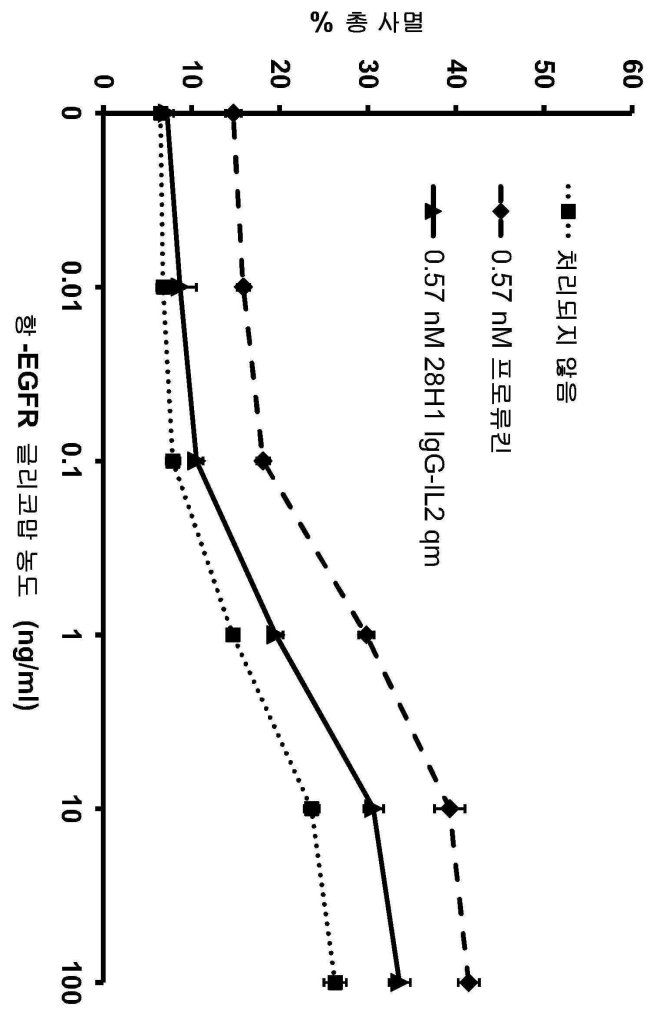
도면1a



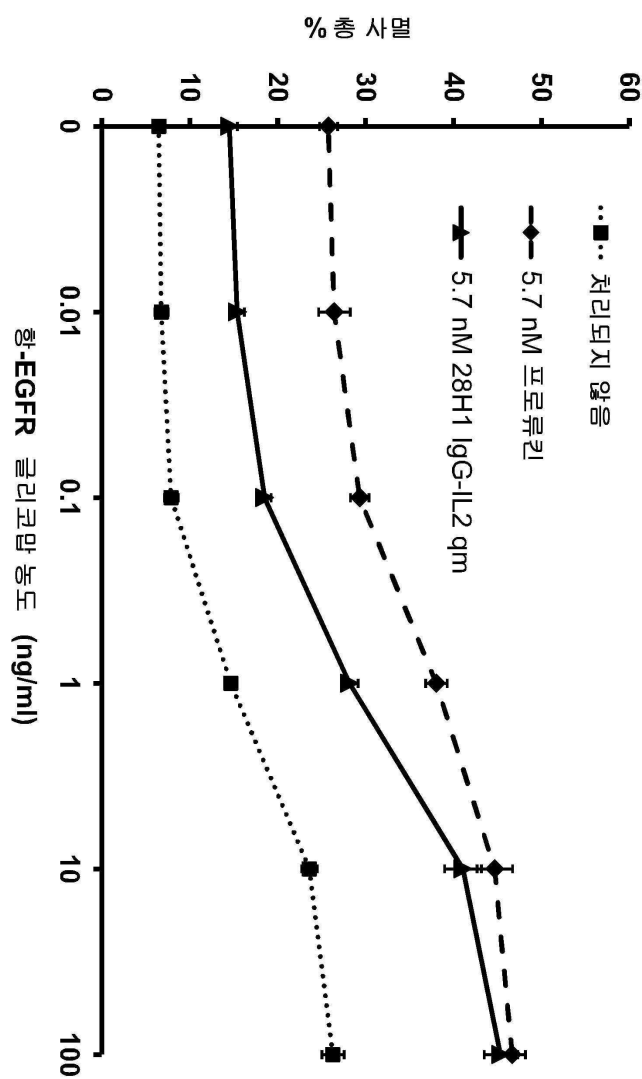
도면1b



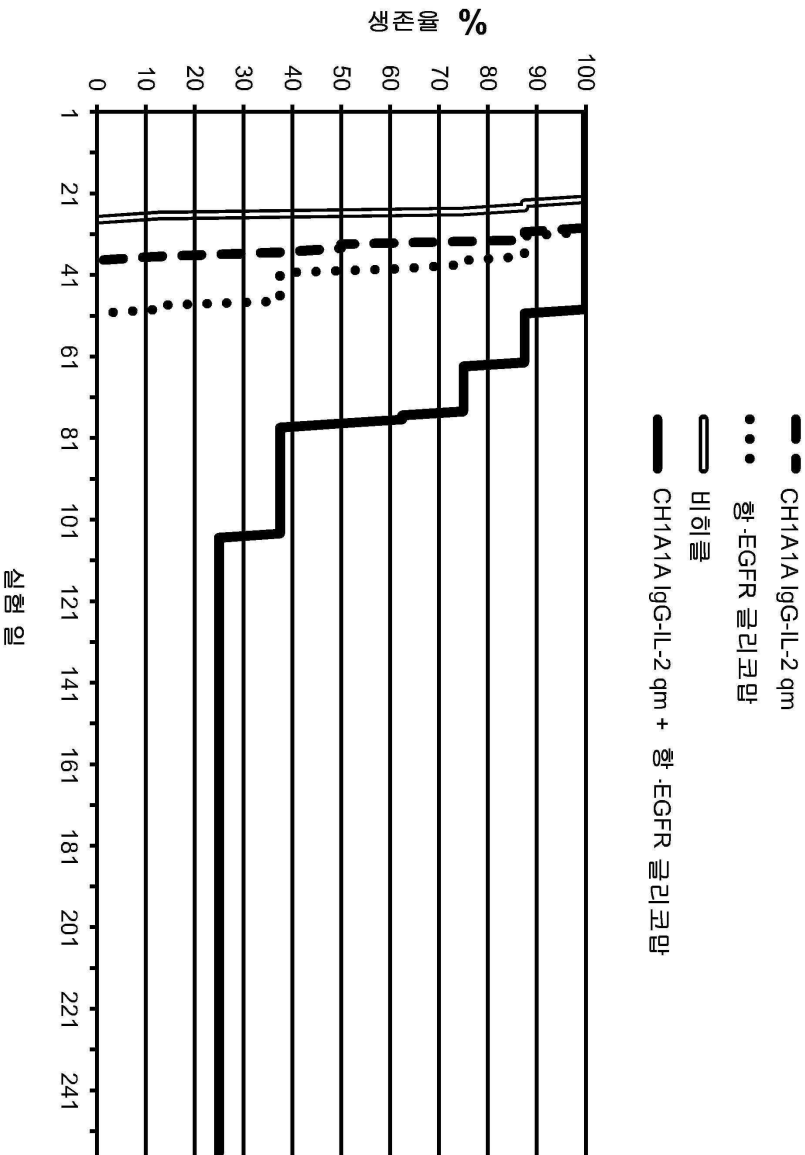
도면2a



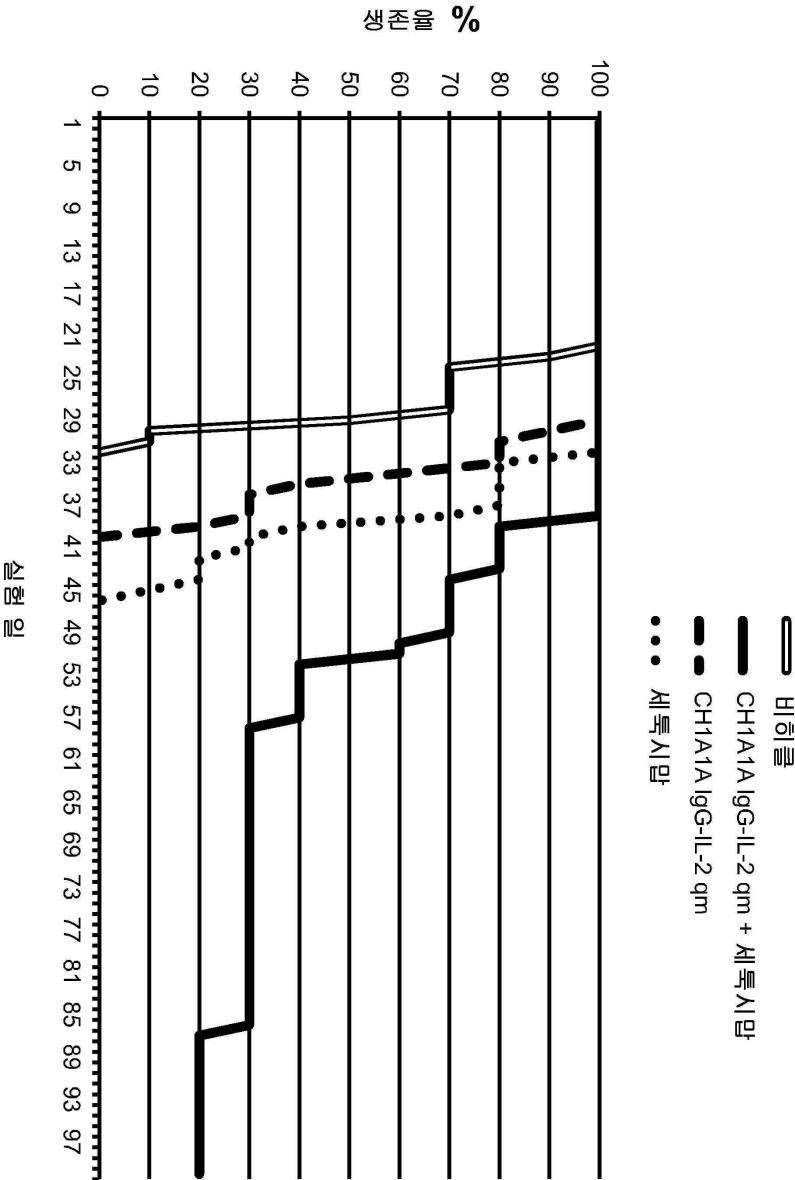
도면2b



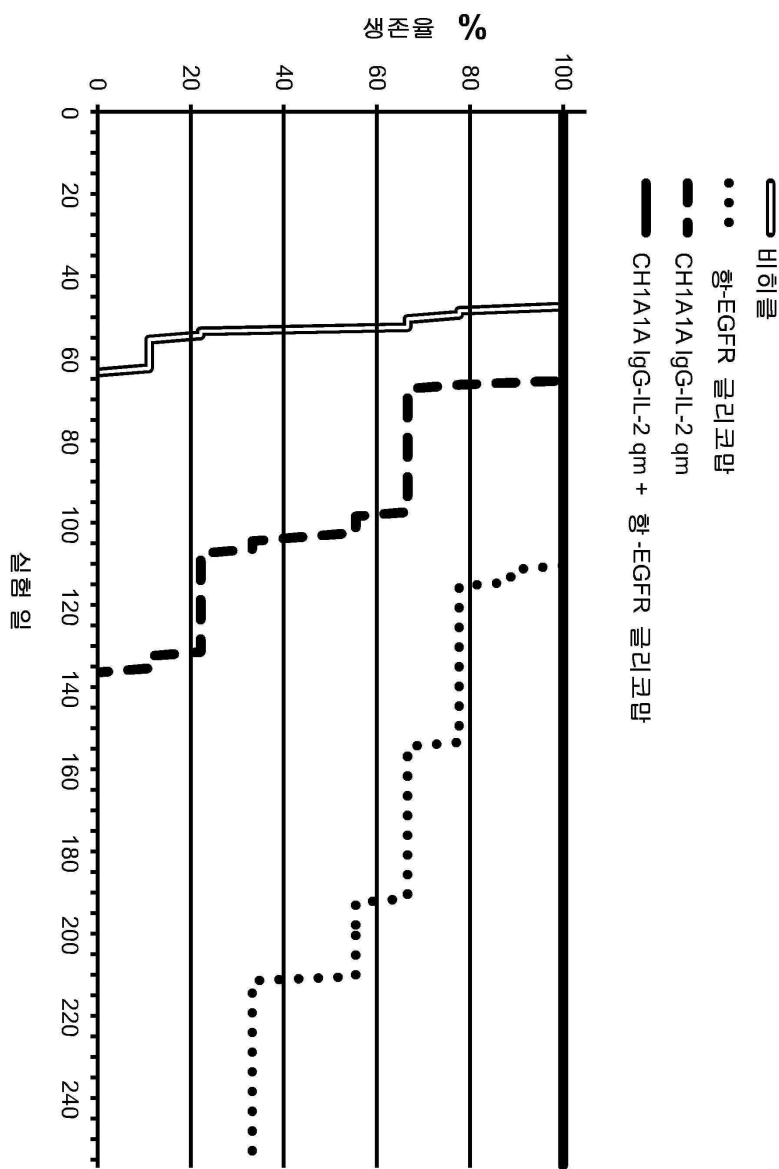
도면3a



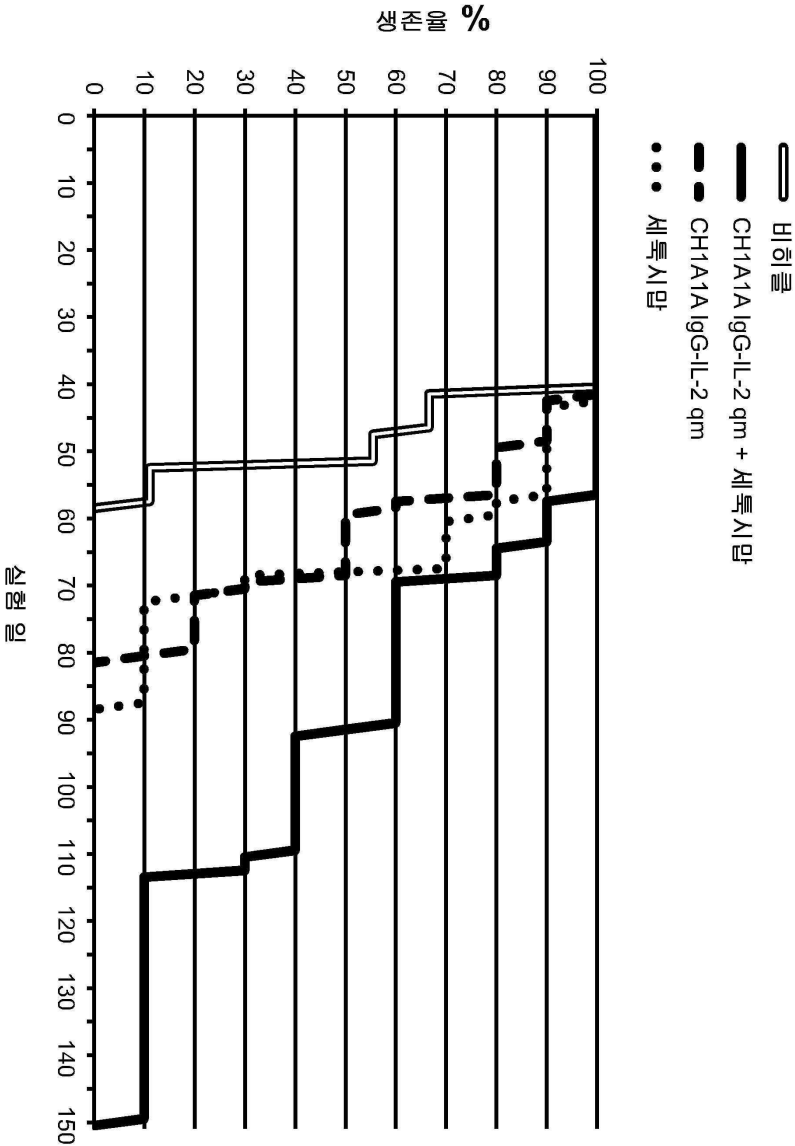
도면3b



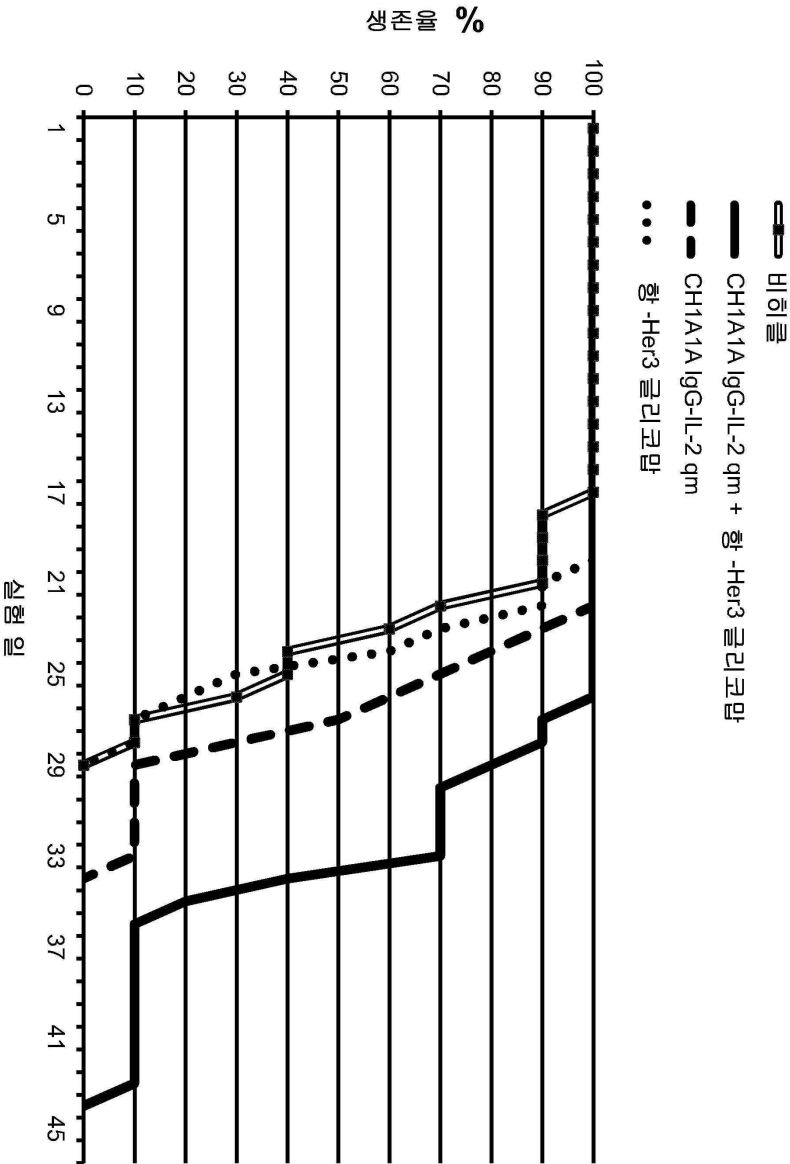
도면4a



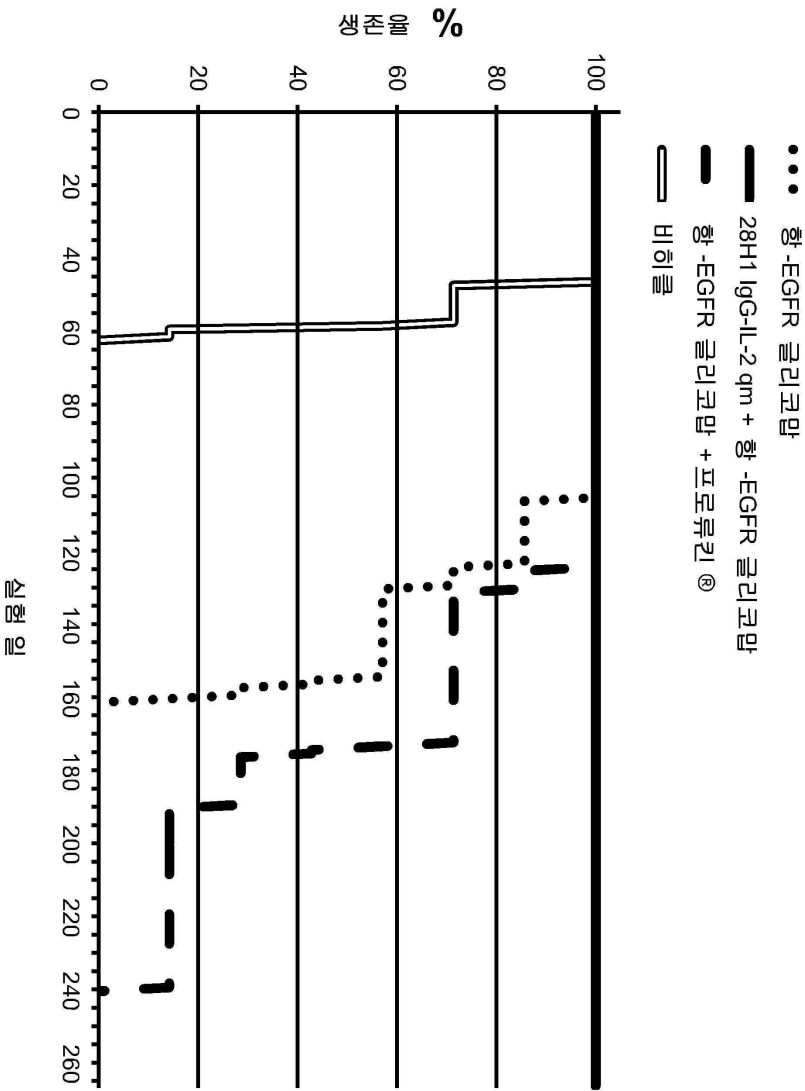
도면4b



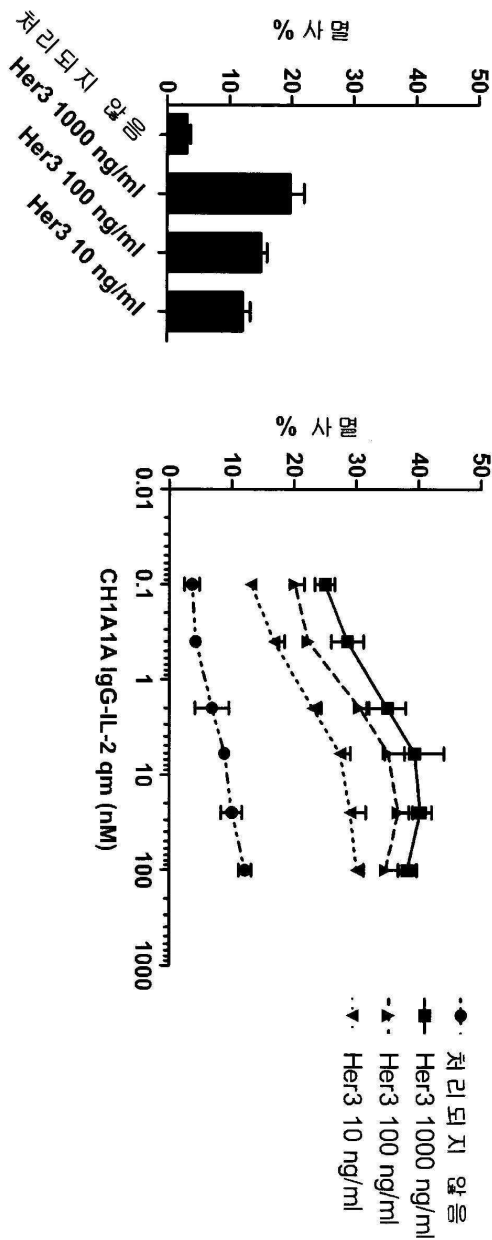
도면5



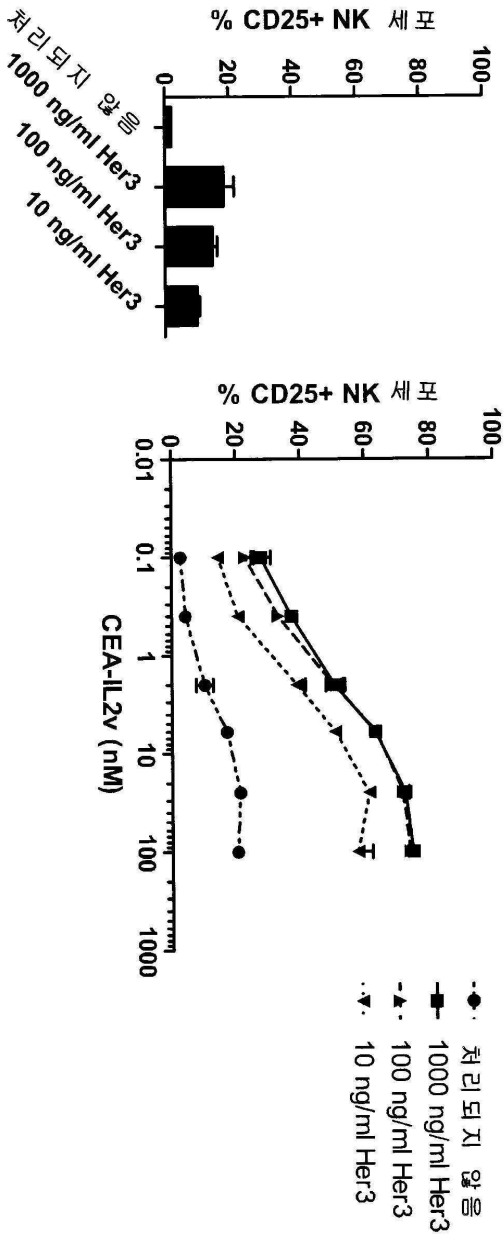
도면6



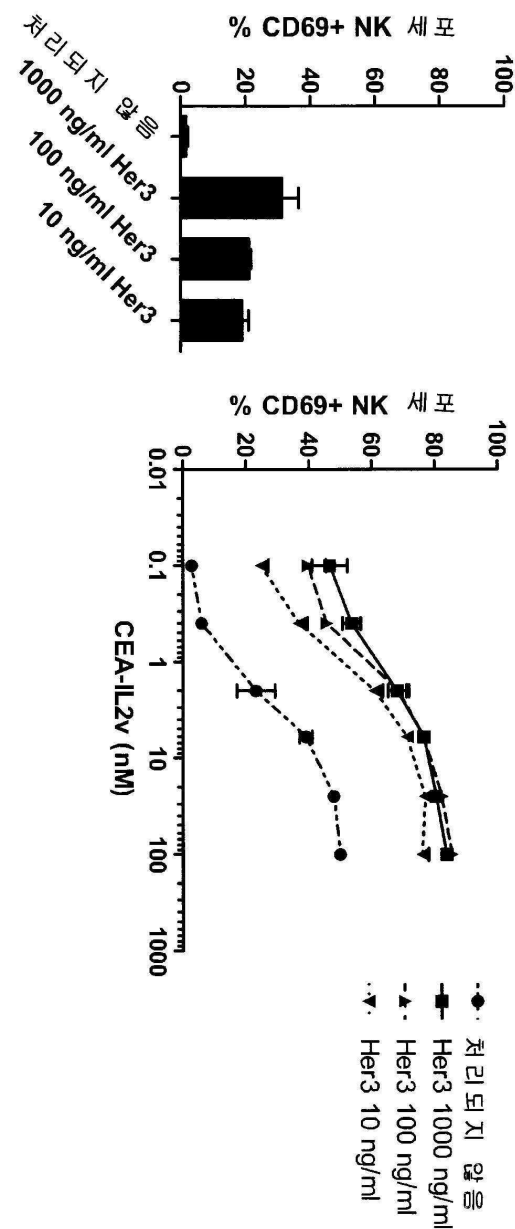
도면7



도면8a



도면8b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Roche Glycart AG
- <120> COMPOSITION COMPRISING TWO ANTIBODIES ENGINEERED TO HAVE REDUCED AND INCREASED EFFECTOR FUNCTION
- <130> 31103
- <140> PCT/EP2013/066351
- <141> 2013-08-05
- <150> EP 12179473.9

<151> 2012-08-07

<160> 146

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 133

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys

35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu

85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile

115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210> 2

<211> 133

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2B10; VL

<400> 3

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 Gly Ile Arg Asn Asp
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45

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

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

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2B10(GS); VL

<400> 4

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 Gly Ile Arg Asn Asp
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Gly Leu Gln Pro Ala
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 5

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2B10; VH

<400> 5

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 Leu Tyr Gly Tyr Ala Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 6

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2F11; VL

<400> 6

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 Val 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 Tyr Thr Pro

85 90 95

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

100 105

<210> 7

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2F11(VI); VL

<400> 7

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 Gly Gln Tyr Thr Pro

85 90 95

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

100 105

<210> 8

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2F11; VH

<400> 8

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 Met Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Trp Arg Trp Met Met Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 9

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2F11(MT); VH

<400> 9

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 Lys Trp Arg Trp Met Met Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 10
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 3F2; VL
<400> 10
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Tyr 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> 11
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 3F2(YS); VL
<400> 11
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> 12

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3F2; VH

<400> 12

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 Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 13

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3D9, VL

<400> 13

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 Gly Gln Leu Ile Pro

85 90 95

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

100 105

<210> 14

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3D9, VH

<400> 14

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 Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
 Ser Ala Ile Gly Val Ser Thr 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 Lys Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 15

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3D9(TA); VH

<400> 15

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 Gly Val Ser Thr 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 Lys Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 16

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4G8; 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> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4G8; VH

<400> 17

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

100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 18

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4B3; VL

<400> 18

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 Asn
 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 Tyr Ile 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> 19

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4B3; VH

<400> 19

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

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 20

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4D6; VL

<400> 20

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 Asn

20 25 30

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

35 40 45
 Ile Gln 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 Gly Gln Val Ile Pro
 85 90 95
 Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 21

<

211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4D6; VH

<400> 21

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 Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210

> 22

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2C6; VL

<400> 22

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 Gly Gln Gln Ile Pro

85 90 95

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

100 105

<210> 23

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2C6; VH

<400> 23

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 Ser 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 Ala Gly Tyr 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 Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 24

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> 5H5; VL

<400> 24

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 Gly Asn Gln Ile Pro

85

90

95

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

100

105

<210> 25

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5H5; VH

<400> 25

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	
Thr	Met	Ser	Trp
Val	Arg	Arg	Ser
Pro	Gly	Lys	Gly
Leu	Glu	Trp	Val
35	40	45	
Ser	Ala	Ile	Ser
Gly	Gly	Gly	Arg
Thr	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	Phe
Thr	Pro	Phe	Asp
Tyr	Trp	Gly	Gln
Gly	Thr	Leu	Val
100	105	110	
Thr	Val	Ser	Ser
115			

<210> 26

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2C4; VL

<400> 26

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	Asn
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	Ile	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 Asn Gln Ile Pro

85 90 95
Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 27

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2C4; VH

<400> 27

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 Lys Gly Trp Phe Thr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 28

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2D9; VL

<400> 28

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 Gly Asn Gln Ile Pro

85 90 95

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

100 105

<210> 29

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2D9; VH

<400> 29

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

[illegible]

115

<210> 30

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4B8; VL

<400> 30

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

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 Gly Gln Val Ile Pro

85 90 95

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

100 105

<210> 31

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4B8; VH

<400> 31

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

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 32

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7A1; VL

<400> 32

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 Gly Gln Gln Ile Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 33

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7A1; VH

<400> 33

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

 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 34

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 13C2; VL

<400> 34

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 Gly Gln Leu Ile Pro

85 90 95

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

100 105

<210> 35

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 13C2; VH

<400> 35

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 Lys Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 36

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 13E8; VL

<400> 36

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 Gly Leu Asn Ile Pro

85 90 95

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

100 105

<210> 37

<

211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 13E8; VH

<400> 37

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 Lys Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210

> 38

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 14C10; VL

<400> 38

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 Gly His Ile Ile Pro

85 90 95
 Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 39
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 14C10; VH

 <400> 39
 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 Lys Ala Trp Met Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 40
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 ><223> 17A11; VL
 <400> 40
 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 Gly Leu Asn Ile Pro
 85 90 95
 Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 41

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 17A11; VH

<400> 41

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 Lys Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 42
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 19G1; VL
<400> 42
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> 43
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 19G1; VH
<400> 43
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 Ser Ser Gly Gly Leu 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 Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 44

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 20G8; VL

<400> 44

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> 45

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 20G8; VH

<400> 45

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 Ser Arg 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 Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 46

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4B9; VL

<400> 46

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> 47

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4B9; VH

<400> 47

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 Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 48

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5B8; VL

<400> 48

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> 49

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5B8; VH

<400> 49

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 Trp Gly Gly Gly Arg 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 Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 50

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5F1; VL

<400> 50

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> 51

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5F1; VH

<400> 51

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 Ser 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 Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 52

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 14B3; VL

<400> 52

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> 53

<

211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 14B3; VH

<400> 53

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 Leu Ala Ser Gly Ala Ile 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 Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210

> 54

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 16F1; VL

<400> 54

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> 55

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 16F1; VH

<400> 55

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 Gly Ile Ile Gly Ser Gly Gly Ile 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 Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 56

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> 16F8; VL

<400> 56

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> 57

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 16F8; VH

<400> 57

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	Leu
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	Lys	Gly	Trp
Phe	Gly	Gly	Phe
Asn	Tyr	Trp	Gly
Gln	Gly	Thr	Leu
100	105	110	
Val	Thr	Val	Ser
Ser			
115			

<210> 58

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 03C9; VL

<400> 58

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> 59

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 03C9; VH

<400> 59

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 Phe
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ser Asn 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 Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 60

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 02D7; VL

<400> 60

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 Thr 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 Ala Ile Met Leu Pro

85 90 95

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

100 105

<210> 61

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 02D7; VH

<400> 61

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

[illegible]

115

<210> 62

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 28H1; VL

<400> 62

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> 63

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 28H1; VH

<400> 63

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 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> 64

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 22A3; VL

<400> 64

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> 65

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 22A3; VH

<400> 65

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 Ser Ile 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 Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 66

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 29B11; VL

<400> 66

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> 67

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 29B11; VH

<400> 67

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 Gly Ile 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 Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 68

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 23C10; VL

<400> 68

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> 69

<

211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 23C10; VH

<400> 69

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 Ser
 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 Thr Asn Gly Asn Tyr 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 Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210

> 70

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2B10_C3B6; VL

<400> 70

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 Gly Ile Arg Asn Asp
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Gly Leu Gln Pro Ala

85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 71
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 2B10_C3B6; VH

 <400> 71
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser 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 Ala Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile 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 Leu Tyr Gly Tyr Ala Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 72
 <211> 107
 <212> PRT

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 2B10_6A12; VL
 <400> 72
 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 Gly Ile Arg Asn Asp
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Gly Leu Gln Pro Ala
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

 100 105

<210> 73

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2B10_6A12; VH

<400> 73

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

1 5 10 15

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

100 105 110
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 74
<211> 107
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><223> 2B10_C3A6; VL
<400> 74
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 Gly Ile Arg Asn Val
20 25 30
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ser Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Gly Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Gly Leu Gln Pro Ala
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 75
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 2B10_C3A6; VH

<400> 75
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 Leu Tyr Gly Tyr Ala Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 76
<211> 107
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2B10_D1A2_wt; VL

<400> 76

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 Gly Ile Arg Asn Val
20 25 30
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Tyr Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

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

100 105

<210> 77

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2B10_D1A2_wt; VH

<400> 77

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 Leu Tyr Gly Tyr Ala Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 78

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2B10_D1A2_VD; 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 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp

20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Tyr Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

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

<210> 79

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2B10_D1A2_VD; VH

<400> 79

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 Leu Tyr Gly Tyr Ala Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 80

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2B10_07D8; VL

<400> 80

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 Ser Ile Arg Asn Val

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Asp Val Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Gly Leu Gln Pro Ala

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 81

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2B10_07D8; VH

<400> 81

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 Leu Tyr Gly Tyr Ala Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 82

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2B10_01F7; VL

<400> 82

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 Gly Ile Arg Asn Val
20 25 30
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

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

<210> 83

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2B10_01F7; VH

<400> 83

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 Leu Tyr Gly Tyr Ala Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 84

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2B10_6H10; VL

<400> 84

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 Gly Ile Arg Asn Val

20 25 30

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

35 40 45
Gln Ala Ala Thr Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60
Gly Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Gly Leu Gln Pro Ala

85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 85

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2B10_6H10; VH

<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 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 Leu Tyr Gly Tyr Ala Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 86

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LC007 VH

<400> 86

```

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

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

```

<210> 87

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LC007 VL

<400> 87

```

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

```

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro

65

70

75

80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 88

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD20 HCDR1

<400> 88

Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr

1

5

<210> 89

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD20 HCDR2

<400> 89

Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp

1

5

<210> 90

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD20 HCDR3

<400> 90

Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr

1

5

10

<210> 91

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD20 LCDR1

<400> 91

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr

1 5 10 15

<210> 92

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD20 LCDR2

<400> 92

Gln Met Ser Asn Leu Val Ser

1 5

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD20 LCDR3

<400> 93

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 94

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD20 VH

<400> 94

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 Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 95

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD20 VL

<400> 95

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

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

115

<210> 96

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-EGFR HCDR1

<400> 96

Asp Tyr Lys Ile His

1 5

<210> 97

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-EGFR HCDR2

<400> 97

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

1 5 10 15

Gly

<210> 98

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-EGFR HCDR3

<400> 98

Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala

1 5 10

<

210> 99

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-EGFR LCDR1

<400> 99

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 100

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-EGFR LCDR2

<400> 100

Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr

1 5

<210> 101

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-EGFR LCDR3

<400> 101

Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr

1 5

<210> 102

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-EGFR VH

<400> 102

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 Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr 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 Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 103

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-EGFR VL

<400> 103

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 Gly Ile Asn Asn Tyr
 20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr 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
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
 85 90 95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105

<210> 104

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-IGF-1R VH (1)

<400> 104

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Arg 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 Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr

100 105 110

Leu Val Ser Val Ser Ser

115

<210> 105

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-IGF-1R VL (1)

<400> 105

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 Lys 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 Arg Ser Lys Trp Pro Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ser Lys
 100 105

<210> 106

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-IGF-1R VH (2)

<400> 106

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

<210> 107

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-IGF-1R VL (2)

<400> 107

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser 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 Arg Ser Lys Trp Pro Pro

85 90 95

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

100 105

<210> 108

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CEA HCDR1

<400> 108

Glu Phe Gly Met Asn

1 5

<210> 109

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CEA HCDR2

<400> 109

Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 110

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CEA HCDR3

<400> 110

Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 111

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CEA LCDR1

<400> 111

Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr Val Ala

1 5 10

<210> 112

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CEA LCDR2

<400> 112

Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg

1 5

<210> 113

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CEA LCDR3

<400> 113

His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu Phe Thr

1 5 10

<210> 114

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CEA VH

<400> 114

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> 115

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CEA VL

<400> 115

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> 116

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-MCSP HCDR1

<400> 116

Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn

1 5 10

<210> 117

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-MCSP HCDR2

<400> 117

Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 118

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-MCSP HCDR3

<400> 118

Phe Asp Tyr

1

<210> 119

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-MCSP LCDR1

<400> 119

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 120

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-MCSP LCDR2

<400> 120

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser

1 5

<210>

> 121

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-MCSP LCDR3

<400> 121

Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 122

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-MCSP VH

<400> 122

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly

20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

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

50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 123

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-MCSP VL

<400> 123

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 Gly Ile Arg Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His 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 Ser Lys Leu Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 124

<211> 328

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 124

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 225 230 235 240
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

 245 250 255
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 260 265 270
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 275 280 285
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 290 295 300
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325
 <210> 125
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 28H1 Fab HC-Fc hole (LALA P329G)
 <400> 125
 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 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 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala

115

120

125

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

130

135

140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe

225

230

235

240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245

250

255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val

260

265

270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275

280

285

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

290

295

300

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

305

310

315

320

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

325

330

335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 126

<211> 593

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 28H1 Fab HC-Fc knob (LALA P329G)-IL-2 qm

<400> 126

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 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 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala			
	115	120	125
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu			
	130	135	140
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly			
145	150	155	160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser			
	165	170	175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu			
	180	185	190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr			
	195	200	205
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr			
	210	215	220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe			
225	230	235	240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro			
	245	250	255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val			
	260	265	270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr			
	275	280	285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val			
	290	295	300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys			
305	310	315	320
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser			
	325	330	335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly
 435 440 445
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala Ser
 450 455 460

 Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp
 465 470 475 480
 Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu
 485 490 495
 Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu
 500 505 510
 Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu
 515 520 525

 Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp
 530 535 540
 Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu
 545 550 555 560
 Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu
 565 570 575
 Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu

580 585 590

Thr

<210> 127

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4G8 Fab HC-Fc hole (LALA P329G)

<400> 127

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

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

420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 128
 <211> 594
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 4G8 Fab HC-Fc knob (LALA P329G)-IL-2 qm
 <400> 128
 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 Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160

 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

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

420 425 430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly
435 440 445
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala
450 455 460
Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu
465 470 475 480

Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys
485 490 495
Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys Lys Ala Thr
500 505 510
Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu
515 520 525
Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg
530 535 540

Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser
545 550 555 560
Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val
565 570 575
Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr
580 585 590
Leu Thr

<210> 129

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4G8 Fab LC

<

400> 129

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 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> 130

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4B9 Fab HC-Fc hole (LALA P329G)

<400> 130

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 Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His

 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro
340 345 350
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
355 360 365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445
<210> 131
<211> 594
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 4B9 Fab HC-Fc knob (LALA P329G)-IL-2 qm
<400> 131
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 Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu			
	100	105	110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu			
	115	120	125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys			
130	135	140	
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser			
145	150	155	160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser			
	165	170	175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser			
	180	185	190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn			
195	200	205	
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His			
210	215	220	
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val			
225	230	235	240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr			
	245	250	255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala

450 455 460

Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu

465 470 475 480

Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys

485 490 495

Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys Lys Ala Thr

500 505 510
Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu

515 520 525
Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg

530 535 540
Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser

545 550 555 560
Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val

565 570 575
Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr

580 585 590
Leu Thr

<210> 132

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3F2 Fab LC

<400> 132

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 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> 133

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DP47 GS Fab HC-Fc hole (LALA P329G)

<400

> 133

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

Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 134

<211> 592

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DP47GS Fab HC-Fc knob (LALA P329G)-IL-2 qm

<400> 134

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 Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

325	330	335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys		
340	345	350
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys		
355	360	365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
370	375	380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		
385	390	395
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
405	410	415
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
420	425	430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly		
435	440	445
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala Ser Ser		
450	455	460
Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu		
465	470	475
Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr		
485	490	495
Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu		
500	505	510
Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val		
515	520	525
Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu		
530	535	540
Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr		
545	550	555
Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe		
565	570	575

Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
580 585 590

<210> 135
<211> 215
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> DP47GS Fab LC
<400> 135

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 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> 136
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CH1A1A Fab HC-Fc hole (LALA P329G)
 <400> 136
 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
		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
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
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> 137
<211> 598
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CH1A1A Fab HC-Fc knob (LALA P329G)-IL-2 qm
<400> 137

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				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												
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser									
355				360				365																
Leu	Trp	Cys	Leu	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 Tyr 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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
450 455 460

Ser Ala Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
465 470 475 480

His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
485 490 495

Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro
500 505 510

Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
515 520 525

Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
530 535 540

Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
545 550 555 560

Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
565 570 575

Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser
580 585 590

Ile Ile Ser Thr Leu Thr
595

<210> 138

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CH1A1A Fab LC

<400> 138

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> 139

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-Her3 HCDR1

<400> 139

Gly Tyr Thr Phe Arg Ser Ser Tyr Ile Ser

1 5 10

<210> 140

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-Her3 HCDR2

<400> 140

Trp Ile Tyr Ala Gly Thr Gly Ser Pro Ser Tyr Asn Gln Lys Leu Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 141

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-Her3 HCDR3

<400> 141

His Arg Asp Tyr Tyr Ser Asn Ser Leu Thr Tyr

1 5 10

<210> 142

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-Her3 VH

<400> 142

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Arg Asp Tyr Tyr Ser Asn Ser Leu Thr Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 143

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-Her3 LCDR1

<400> 143

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

<210> 144

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-Her3 LCDR2

<400> 144

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 145

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-Her3 LCDR3

<400> 145

Gln Ser Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 146

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-Her3 VL

<400> 146

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Asn Ser

20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Ser

85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100 105 110

Lys