

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2017-0138551 (43) 공개일자 2017년12월15일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C07K 16/18 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/46 (2006.01)		(71) 출원인 유씨비 바이오파마 에스피알엘 벨기에 브뤼셀 1070 알레 더 라 러쉴르쉐 60
(52) CPC특허분류 C07K 16/18 (2013.01) C07K 16/2878 (2013.01)		(72) 발명자 헤이우드 샘 필립 영국 에스엘1 3더블유이 버크셔주 슬라우 바스 로드 208 유씨비 셀테크 내
(21) 출원번호	10-2017-7033852	와일드 가빈 배리 영국 에스엘1 3더블유이 버크셔주 슬라우 바스 로드 208 유씨비 셀테크 내 (뒷면에 계속)
(22) 출원일자(국제)	2016년04월22일	(74) 대리인 김진희, 김태홍
심사청구일자	없음	
(85) 번역문제출일자	2017년11월22일	
(86) 국제출원번호	PCT/EP2016/059050	
(87) 국제공개번호	WO 2016/170137	
국제공개일자	2016년10월27일	
(30) 우선권주장		
1506869.5	2015년04월22일	영국(GB)

전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 **Fab-dsFv 다량체 중에서 단량체 항체의 백분율을 증가시키는 방법**

(57) 요약

본 발명은, 재조합으로 발현된 항체 분자의 조성물 중 단량체의 백분율을 증가시키는 방법으로서, 상기 항체 분자는 관심 항원에 대해 특이성을 가지면서 하나의 VH 및 하나의 VL을 포함하는 적어도 하나의 Fv를 포함하며, 상기 VH와 VL은 하나 이상의 링커를 통해 직접적으로 또는 간접적으로 연결되고 그들 사이의 디설파이드 결합에 의해 안정화되며, 상기 방법은

- 상기 항체 분자를 포함하는 조성물을 30 내지 60℃ 범위의 온도에서 적어도 1시간의 기간 동안 유지하는 열적 전환 단계를 포함하고,
- 상기 단계 a)를 환원제의 존재 하에 또는 환원제에 의한 처리 후에 수행하는 것을 특징으로 하는, 재조합으로 발현된 항체 분자의 조성물 중 단량체의 백분율을 증가시키는 방법을 제공한다.

(52) CPC특허분류

C07K 16/468 (2013.01)

C07K 2317/14 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/55 (2013.01)

C07K 2317/624 (2013.01)

C07K 2317/66 (2013.01)

(72) 발명자

하니프 라즈완

영국 에스엘1 3더블유이 버크셔주 슬라우 바스 로드 208 유씨비 셀테크 내

르 페이지 크리스토퍼 존

영국 에스엘1 3더블유이 버크셔주 슬라우 바스 로드 208 유씨비 셀테크 내

명세서

청구범위

청구항 1

제조합으로 발현된 항체 분자의 조성물 중 단량체의 백분율을 증가시키는 방법으로서, 상기 항체 분자는 관심 항원에 대해 특이성을 가지면서 하나의 VH 및 하나의 VL을 포함하는 적어도 하나의 Fv를 포함하며, 상기 VH와 VL은 하나 이상의 링커를 통해 직접적으로 또는 간접적으로 연결되고 그들 사이의 디설파이드 결합에 의해 안정화되며, 상기 방법은

- 상기 항체 분자를 포함하는 조성물을 30 내지 60℃ 범위의 온도에서 적어도 1시간의 기간 동안 유지하는 열적 전환 단계를 포함하고,
- 상기 단계 a)를 환원제의 존재 하에 또는 환원제에 의한 처리 후에 수행하는 것을 특징으로 하는, 제조합으로 발현된 항체 분자의 조성물 중 단량체의 백분율을 증가시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 온도가 45 내지 55℃, 예를 들어 50 내지 55℃ 범위인 방법.

청구항 3

제3항에 있어서, 온도가 50℃인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 환원제가 글루타티온(GSH), 에틸설파이트, 2-머캅토에탄올(BME), 2-머캅토에틸아민(BMEA), 시스테인-HCl 및 디티오프레이톨(DTT)을 포함하는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 환원제가 2-머캅토에탄올(BME) 및 2-머캅토에틸아민(BMEA), 특히 2-머캅토에틸아민으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 환원제의 농도가 1 mM 내지 100 mM, 예를 들어 30 내지 90 mM, 60 내지 90 mM 또는 70 내지 80 mM 범위인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 기간이 1 내지 70시간, 예를 들어 3 내지 10시간, 예컨대 4 내지 6시간의 범위 내, 특히 5시간인 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 단계 a)를 45 내지 55℃ 범위의 온도에서, 4 내지 6시간의 기간 동안 수행하고, 단계 b)에서 환원제는 BMEA 또는 BME이고 60 내지 90 mM 범위의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 단계 a)를 50℃의 온도에서, 5시간의 기간 동안 수행하고, 단계 b)에서 환원제는 BMEA 또는 BME이고 70 내지 80 mM, 예를 들어 75 mM 범위의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 환원제는 아미노산의 존재 하에 이용되는 것인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 아미노산이 아르기닌, 리신 및 프롤린으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 아미노산의 농도가 0.01 내지 1.0 M 범위, 예를 들어 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 M인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 항체가 조성물 중 0.5 g/L 내지 5 g/L, 예를 들어 2 내지 3 g/L 범위의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 하나의 항에 있어서, 열적 단계를 교반을 병행하면서 수행하는 것인 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 교반이 100 내지 1200 rpm 범위인 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 있어서, 온도가 40 내지 60℃ 범위로 상승하기 전에 재조합 항체 조성물에 환원제를 첨가하는 것인 방법.

청구항 17

제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 있어서, 온도가 40 내지 60℃가 된 후 재조합 항체 조성물에 환원제를 첨가하는 것인 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 하나의 항에 있어서, 다운스트림 정제의 추가 단계를 포함하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 다운스트림 공정이 크로마토그래피 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 크로마토그래피가 소수성 상호작용 크로마토그래피인 방법.

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 크로마토그래피가 이온 교환 크로마토그래피인 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 하나의 항에 있어서, 하나 이상의 링커를 통해 직접적으로 또는 간접적으로 연결되고 그들 사이의 디설파이드 결합에 의해 안정화되는 VH와 VL은 항원 결합 부위를 형성하는 상보성 VH/VL 쌍인 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 하나의 항에 있어서, VH와 VL은 링커를 통해 직접적으로 연결되는 것인 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 항체가 dsscFv, Fab-2xdsscFv, Fab-dsscFv-dsFv, Fab-dsscFv-sdAb, Fab-dsscFv-scFv 및 Fab-dsscFv로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 25

제1항 내지 제22항 중 어느 하나의 항에 있어서, VH 및 VL 각각은 제2 항체를 통해 VH와 VL을 간접적으로 연결하는 링커를 포함하는 것인 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 항체가 Fab-dsFv인 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 항체는, 인간 OX40 및 인간 혈청 알부민에 결합하는 이중 특이적 항체 융합 단백질로서, N-말단으로부터 순서대로, 제1 중쇄 가변 도메인(V_H1), C_H1 도메인 및 제2 중쇄 가변 도메인(V_H2)을 포함하는 중쇄,

N-말단으로부터 순서대로, 제1 경쇄 가변 도메인(V_L1), C_L 도메인 및 제2 경쇄 가변 도메인(V_L2)을 포함하는 경쇄

를 포함하고,

상기 중쇄와 경쇄는 V_H1 과 V_L1 이 제1 항원 결합 부위를 형성하고 V_H2 와 V_L2 가 제2 항원 결합 부위를 형성하도록 정렬되고,

제1 항원 결합 부위에 의해 결합된 항원은 인간 OX40이고 제2 항원 결합 부위에 의해 결합된 항원은 인간 혈청 알부민인 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 중쇄의 제1 가변 도메인(V_H1)은 CDR-H1에 대해 서열 번호 1에 제시된 서열, CDR-H2에 대해 서열 번호 2에 제시된 서열 및 CDR-H3에 대해 서열 번호 3에 제시된 서열을 포함하고, 상기 경쇄의 제1 가변 도메인(V_L1)은 CDR-L1에 대해 서열 번호 4에 제시된 서열, CDR-L2에 대해 서열 번호 5에 제시된 서열 및 CDR-L3에 대해 서열 번호 6에 제시된 서열을 포함하고,

제2 중쇄 가변 도메인(V_H2)은 서열 번호 11에 제시된 서열을 가지고 제2 경쇄 가변 도메인(V_L2)은 서열 번호 12에 제시된 서열을 가지며,

제2 중쇄 가변 도메인(V_H2)과 제2 경쇄 가변 도메인(V_L2)은 디설파이드 결합에 의해 연결되는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시는 재조합으로 발현된 항체 분자의 조성물 중의 단량체의 양을 증가시키는 방법 및 본원에 기재된 방법으로부터 얻은 또는 얻을 수 있는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 치료용 단클론 항체는 치료제의 매우 중요한 부류가 되었다. W02010/019493호에 개시된 바와 같이 상기 항체 분자의 정제 및 제제는 도전과제를 제시한다. 그러나 매우 중요한 것은 최고 품질의 물질만이 치료 용도에 이용된다는 것이다. 이는 신규의 복잡한 항체 구조물이 치료제, 예를 들어 이중 특이적 포맷으로 생산되고 있기 때문에 더 어려워졌다.

[0003] 신규 항체 포맷은 대개 경쇄 가변 도메인(VL) 및 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함하는 적어도 하나의 Fv 영역의 존재를 요구하며, 여기서 가변 도메인은 경쇄 불변 도메인(CL) 또는 중쇄 불변 도메인(CH1)의 C-말단에 연결되어 있는 이들의 천연 상태가 아니다. 자연에 존재하는 전체 항체 분자에서, CL 및 CH1 도메인의 존재는 VL과 VH의 쌍 형성(pairing)을 안정화하는 역할을 한다. 따라서, CL 및 CH1 도메인이 없을 경우, 가변 도메인은 인접한 분자의 가변 도메인과 동적인 교환을 하기 쉽다. 이러한 동적인 과정을 방지하는 한 가지 방법은 V_H 와 V_L 사이에

디설파이드 결합의 도입에 의하며, 이는 v-영역 쌍 형성을 제재하고 동적인 교환을 방지한다. 그러나 디설파이드 결합의 존재는 또한 항체의 원하지 않는 다량체를 안정화하는 역할을 할 수 있다.

[0004] 또한, 신규 항체 포맷은 대개 링커를 포함한다. 그러나 링커의 존재는 결과적으로 한 분자 내의 가변 도메인이 또 다른 분자 내 가변 도메인과 쌍을 형성함으로써 두 분자가 서로 연결될 때 원하지 않는 다량체를 형성할 수 있다. 이때 Fv 내 디설파이드 결합의 존재는 다량체 종을 안정화하는 역할을 한다.

[0005] 공지된 이중 특이적 항체 포맷의 예는 W02010/035012호 및 W02011/036460호에 상세히 기재된 바와 같은 Fab-dsFv이다. 상기 항체 포맷은 [도 27]에 나타낸 바와 같이 2개 이상의 단량체를 포함하는 다량체를 형성하는 경향을 갖는다. 유사한 다량체 종은 또한 디설파이드 결합된 scFv 분자를 포함하는 조성물에 존재하며, 여기서 한 scFv의 VH가 별개의 scFv의 VL과 쌍을 형성하여 두 scFv 분자를 서로 연결하는 디설파이드 안정화된 Fv 쌍을 형성하여 결과적으로 두 scFv의 이량체를 만든다. 별개의 분자 내 가변 도메인의 추가적인 쌍 형성은 더 큰 다량체 종을 생성할 수 있다.

[0006] 공지된 정제 방법, 예를 들어 크로마토그래피는 더 작은 단량체 종과 큰 다량체 종을 분리할 수 있지만 이는 불가피하게 항체의 전체 수율을 떨어뜨리게 된다. 따라서, 이중 특이적 항체 포맷에 대해 항체의 조성물 중의 원하지 않는 다량체 종의 문제를 해결하는 방법이 크게 요구된다.

발명의 내용

[0007] 본 개시의 방법은 항체 분자를 포함하는 조성물 내 다량체의 양을 감소시켜 상기 문제의 해결책을 제공한다. 본 개시는 인간 용도에 적합한 단량체 단클론 항체 분자의 조성물을 제공하는데 특히 유용하다.

[0008] 따라서, 재조합으로 발현된 항체 분자의 조성물 중 단량체의 백분율을 증가시키는 방법으로서, 상기 항체 분자는 관심 항원에 대해 특이성을 가지면서 하나의 VH 및 하나의 VL을 포함하는 적어도 하나의 Fv를 포함하며, 상기 VH와 VL은 하나 이상의 링커를 통해 직접적으로 또는 간접적으로 연결되고 그들 사이의 디설파이드 결합에 의해 안정화되며, 상기 방법은

[0009] a) 상기 항체 분자를 포함하는 조성물을 30 내지 60℃ 범위의 온도에서 적어도 1시간의 기간 동안 유지하는 열적 전환 단계를 포함하고,

[0010] b) 상기 단계 a)를 환원제의 존재 하에 또는 환원제에 의한 처리 후에 수행하는 것인 단계

[0011] 를 포함하는, 재조합으로 발현된 항체 분자의 조성물 중 단량체의 백분율을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0012] 재조합으로 발현된 항체에 본원에 기재된 공정을 이용하는 것은 유리하게는 조성물 내 단량체의 양을 증가시킨다. 유리하게는, 본원의 방법은 상업적인 규모로 용이하고 비용 효율적으로 이용될 수 있다.

[0013] 본 발명의 방법은 다량체 종을 단량체로 전환함으로써 단량체의 비율을 증가시킬 수 있다. 전환 단계는 유리하게는 환원제가 VH와 VL 사이의 디설파이드 결합을 환원시키고 다량체 종이 부분적으로 변성하도록 함으로써 다량체를 분해한다. 또한, 방법은 VH와 VL 도메인이 단일 항체 분자 내에서 Fv 쌍을 형성하도록 하고, VH와 VL 사이의 안정화된 디설파이드 결합의 재형성을 허용하여 결과적으로 단량체를 만든다. 본 발명자들은 놀랍게도 전환 단계 및 환원제가 항체 다량체를 항체를 완전히 변성시키지 않으면서 항체 단량체로 전환하는데 이용될 수 있다는 것을 보였다. 또한, 본 발명의 방법은 유리하게는 정확한 디설파이드 결합이 재형성되도록 하여, 바라는 단량체를 생산한다.

[0014] 한 실시양태에서, 단량체의 농도에서 증가는 2, 3, 4배 이상이다. 본 발명의 방법은 바람직하게는 열적 전환 단계 후 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 75%, 80%, 85% 또는 적어도 90%의 단량체 형태의 항체를 포함하는 재조합 항체 조성물을 제공한다.

[0015] 한 실시양태에서, 본 개시는 본원에 개시된 방법으로부터 얻은 또는 얻을 수 있는 항체 또는 결합 단편에 확장된다.

[0016] 본 발명은 또한 치료에 사용하기 위한 본원에 개시된 방법으로부터 얻은 조성물의 용도를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 50℃에서 50mM 베타-머캅토에탄올로 처리한 단백질 A 정제된 항체 A26 Fab-645dsFv의 비환원 SDS-PAGE를 나타낸다. 즉, 처리는 단백질 A 정제 후에 실시하였다.

도 2는 50℃에서 50mM 베타-머캅토에탄올로 처리한 단백질 A 정제된 항체 A26 Fab-645dsFv의 환원 SDS-PAGE를 나타낸다. 즉, 처리는 단백질 A 정제 후에 실시하였다.

도 3은 37 내지 60℃ 범위의 온도에서 50mM 베타-머캅토에탄올로 처리한 항체 A26 Fab-645dsFv에 대해 얻은 퍼센트 단량체의 SEC-HPLC 분석을 나타낸다.

도 4는 처리 전에 초기 총 표적 단백질 수율의 비율로서 처리 후 얻은 단량체의 예측 수율을 나타낸다. 본원에서 이용되는 예측 수율은 처리 전 출발 수율을 기준으로 하여 퍼센트로서 단량체의 수율이다.

도 5는 37 내지 60℃ 범위의 온도에서 50mM 베타-머캅토에탄올로 처리할 때 시간 경과에 따른 항체 A26 Fab-645dsFv의 순 단량체 회수율의 SEC-HPLC 분석을 나타낸다.

도 6은 50℃의 온도에서 1 내지 50mM 범위의 베타-머캅토에탄올 농도로 처리할 때 시간 경과에 따른 항체 A26 Fab-645dsFv의 순 단량체 회수율의 SEC-HPLC 분석을 나타낸다.

도 7은 처리 전 초기 총 표적 단백질 수율의 퍼센트로서 처리 후 얻은 단량체의 예측 수율을 나타낸다.

도 8은 50℃에서 언급된 bMEA 농도에서 전환 시 A26Fab-645dsFv 순 단량체 회수율을 결정하는 SEC-HPLC(G3000)에 의한 공정 중 분석.

도 9는 본 개시의 방법을 이용하여 처리되지 않은 재조합 항체 A26 Fab-645dsFv의 발현으로부터의 상등액의 단백질 A 정제를 나타내는 SEC-HPLC 크로마토그램을 나타낸다.

도 10은 50℃에서 50mM 베타-머캅토에탄올로 처리한 재조합 항체 A26 Fab-645dsFv의 발현으로부터의 상등액의 단백질 A 정제를 나타내는 SEC-HPLC 크로마토그램을 나타낸다.

도 11은 정화된 상등액을 단백질 A 정제 전에 50℃에서 50mM bMEA로 처리한 A26Fab-645dsFv의 비환원 SDS-PAGE 분석을 나타낸다.

도 12는 정화된 상등액을 50℃에서 50mM bMEA로 처리한 후 단백질 A 정제된 A26Fab-645dsFv의 환원 SDS-PAGE 분석을 나타낸다.

도 13 및 14는 본원에 개시된 방법을 이용하여, 그리고 이를 이용하지 않고 제조된 다운스트림 공정 후 항체 물질에 대한 SEC-HPLC 분석을 나타낸다. 본 도면은 2가지 공정을 이용하여 얻은 물질이 비슷한 물질을 제공한다는 것을 보여준다.

도 15는 여러 부형제로 처리한 A26Fab-645dsFv 항체에 대한 비환원 SDS-PAGE를 나타낸다.

도 16a 및 16b는 다양한 조건 하의 공정 후 A26Fab-645dsFv에 대한 크기 배제 크로마토그래피 데이터를 나타낸다.

도 17a는 실온에서 환원제에 의한 처리 후 퍼센트 단량체를 나타낸다.

도 17b는 50℃에서 2시간 동안 환원제에 의한 처리 후 퍼센트 단량체를 나타낸다.

도 18a는 실온에서 환원제로 처리 후 SE-HPLC에 의해 분석한 퍼센트 단량체를 나타낸다.

도 18b는 50℃에서 2시간 동안 환원제로 처리 후 SE-HPLC에 의해 분석한 퍼센트 단량체를 나타낸다.

도 19 내지 26은 여러 항체 분자 서열 및 이의 구성요소를 나타낸다.

도 27은 단량체 Fab-dsFv 및 다량체 형태의 Fab-dsFv를 나타낸다.

도 28은 예시 항체 포맷을 나타낸다.

도 29는 예시 항체 포맷을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본원에서 사용되는 용어 다량체 또는 다량체 형태는 모든 도메인이 정확하게 접히거나 쌍을 형성하는 2개 이상의 항체 단량체로부터의 도메인으로 이루어진 항체 형태를 언급한다. 예로서, 다량체는 2개 이상의 항체 단량체로부터 형성될 수 있으며, 여기서 각 VH 도메인은 VL 도메인과 쌍을 형성하여 [도 27]에서 Fab-dsFv에 대해 나타낸 바와 같이 상보성 Fv 영역을 형성한다.

- [0019] 한 실시양태에서, 본원에서 이용되는 단량체의 비율을 증가시킨다는 것은 본 개시의 공정이 적용되기 전에 얻은 단량체 항체 분자 비율과 비교하여 총 표적 단백질 수율 중 더 높은 비율인 단량체 항체 분자의 수치를 얻는 것을 언급한다. 예를 들어 퍼센트 단량체는 항체 분자의 초기 수율의 30%일 수 있고 본 공정을 적용한 후에 퍼센트 단량체는 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85% 또는 적어도 90%일 수 있다. 한 실시양태에서, 절대적인 수치, 즉 단리된 단량체의 수율이 본 개시의 공정을 실시한 후에 더 높다.
- [0020] 본원에서 이용되는 수율 또는 총 단백질은 본문에 달리 명시하지 않는다면 조성물 내 항체 분자 종의 합한 값을 언급한다. 한 실시양태에서, 이용되는 수율의 값은 본 개시에 따른 공정 전의 값이다.
- [0021] 한 실시양태에서, 이용되는 수율의 값은 본 개시에 따른 공정을 실시한 후에 회수한 총 단백질(항체 분자 종)의 양이다.
- [0022] 본 개시의 공정을 실시한 후에 회수한 총 단백질(항체 분자 종)은 불가피하게는 공정이 결과적으로 약간의 손실을 가져오기 때문에 감소될 것이다.
- [0023] 표적 단백질은 발현되는 재조합 항체 분자를 언급한다.
- [0024] 재조합 단백질은 재조합 기술을 이용하여 발현되는 단백질, 예를 들어 항체분자이다.
- [0025] 본문에 달리 명시하지 않는다면, 공급물 농도로도 언급되는 본원에서 이용되는 항체 농도는 표적 단백질 및 이의 다량체를 포함하는 물질, 단량체 및 다량체를 포함하는 모든 항체 종의 농도를 언급한다. 한 실시양태에서, 항체 농도는 조성물로부터 불순물을 제거하기 위한 단백질 A 정제 단계 후 조성물 내 항체의 농도이다.
- [0026] 본 발명의 방법의 단계 a)에서 열적 전환은 30 내지 60℃ 범위의 온도에서 수행된다. 한 실시양태에서, 온도는 35 내지 60℃, 40 내지 60℃, 45 내지 55℃, 45 내지 50℃, 50 내지 55℃, 48 내지 52℃, 49 내지 51℃ 범위, 예를 들어 46℃, 47℃, 48℃, 49℃, 50℃, 50.5℃, 51℃, 51.5℃, 52℃, 52.5℃, 53℃, 53.5℃, 54℃, 54.5℃ 및 55℃이다. 한 실시양태에서, 단계 a)에서 온도는 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 또는 55℃, 예를 들어 약 50℃에서 실시된다.
- [0027] 본원에서 이용되는 범위의 온도는 반드시 조성물이 공정 내내 동일한 온도로 유지된다는 것을 의미하지는 않지만, 조성물은 일반적으로 방법의 해당 단계가 수행되는 기간 중에 언급된 범위에서 하나 이상의 온도로 유지된다. 처리 공정 중에 온도가 범위 밖으로 움직이거나 또는 바뀌는 경우, 제어 장치가 조성물을 바라는 범위 내가 되게 하는 조치를 취할 것이다.
- [0028] 항체 조성물이 본 개시에 따른 범위의 온도로 유지되는 기간은, 한 실시양태에서, 1 내지 70시간, 예를 들어 2 내지 60시간, 예를 들어 3 내지 50시간, 3 내지 10시간, 4 내지 6시간, 4.5 내지 5.5시간 범위, 특히 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25시간이다. 한 실시양태에서, 기간은 대략 5시간이다.
- [0029] 본원에서 이용되는 환원제는 문제의 분자, 예를 들어 항체 내에 디설파이드 결합을 환원시킬 수 있는 환원제를 언급한다. 하나 이상의 디설파이드 결합을 포함하는 항체가 존재할 때 환원제는 적합한 조건 하에서 디설파이드 결합을 환원시키는 능력, 예를 들어 -SH를 형성하는 능력을 갖는다. 한 실시양태에서, 환원제 자체는 단일 티올기, 2개의 티올기 또는 3개 이상의 티올기를 포함한다. 대안적으로, 환원제는 티올기 자체를 포함하지 않는다.
- [0030] 본원에서 이용되는 티올은 -SH 존재를 포함하는 기를 언급한다.
- [0031] 한 실시양태에서, 환원제는 글루타티온(GSH), 에틸렌 설파이트, 2-머캅토에탄올(BME), 또는 염산과 같은 2-머캅토에틸아민 염을 포함하는 2-머캅토에틸아민(BMEA, bMEA 또는 B-mea, β -mea 또는 β mea로도 언급됨), 시스테인, 예를 들어 시스테인-HCl, 아인산 및 디티오프레이톨(DTT), TCEP(트리스(2-카복시에틸)포스핀), THP(트리스(히드록시프로필)포스핀)를 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0032] 한 실시양태에서, 환원제는 단일 티올 기를 포함한다. 유리하게는 단일 티올을 포함하는 환원제가 이용될 경우, 단량체의 가변 영역 사이에 바라는 디설파이드 결합은 자연적으로, 즉 특정 산화 단계의 실시를 필요로 하면서, 형성된다. 단일 티올 기를 포함하는 환원제의 예는 글루타티온, 머캅토에탄올(예를 들어 2-머캅토에탄올), 머캅토에틸아민(예를 들어, 2-머캅토에틸아민) 및 시스테인(예를 들어, 시스테인-HCl)을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 한 실시양태에서, 티올 환원제는 머캅토에탄올(예를 들어, 2-머캅토에탄올), 머캅토에틸아민(예를 들어, 2-머캅

토에틸아민), 및 특히 2-머캅토에틸아민(BMEA, bMEA 또는 B-mea, β -mea 또는 β mea로도 언급됨)이다.

- [0034] 한 실시양태에서, 환원제는 항체 조성물이 본 개시의 온도 범위가 되기 전에 첨가된다. 한 실시양태에서, 단계 a)는 환원제에 의한 처리 후에 실시되며, 특히 환원제는 가열하기 전에 제거된다. 환원제가 강할수록 전처리 단계에 사용하기에 적합하고 단계 a) 전에 제거되어야 할 가능성이 더 크다. 따라서, 환원제가 아인산, DDT, TCEP 및 THP로부터 선택되는 한 실시양태에서, 환원제는 단계 a) 전에 제거된다. 필요한 경우, 환원제는 투석 여과(diafiltration) 등을 포함한 통상의 기술에 의해 가열하기 전에 제거될 수 있다. TCEP의 사용은 최종 항체 분자에서 바라는 디설파이드 결합을 재도입하는 산화 단계를 필요로 할 수 있다.
- [0035] 한 실시양태에서, 환원제는 온도가 30 내지 60°C 범위가 되기 전에 제거되지 않는다. 환원제가 단계 a)에서 가열 공정 중에 조성물에 남아있는 실시양태는 글루타티온, 머캅토에탄올(예를 들어, 2-머캅토에탄올), 머캅토에틸아민(예를 들어, 2-머캅토에틸아민) 및 시스테인(예를 들어, 시스테인-HCl)으로부터 선택된 환원제와 같이 단일 티올 기를 포함하는 환원제에 특히 유익하다.
- [0036] 환원제가 중간 세기이고 열적 전환 단계 a)에서 유지되는 DTT 또는 아인산이면, a), 범위의 하위 말단의 온도, 예를 들어 30 내지 45°C 범위가 이용될 수 있다. 게다가, 일부 분자에서 온도와 결합된 상기 시약의 사용은 항체 단량체 분자에서 바라는 디설파이드 결합의 일부 또는 전부를 재형성하는 산화 단계를 필요로 할 수 있다.
- [0037] 한 실시양태에서, 환원제는 항체 조성물이 본 개시의 온도 범위가 된 후에 첨가된다. 한 실시양태에서, 환원제는 항체 조성물이 본 개시의 온도 범위에 들어갈 때 첨가된다. 한 실시양태에서, 환원제는 여러 경우에, 예를 들어 온도가 바라는 범위가 되기 전에 그리고/또는 조성물이 언급된 온도 범위가 된 후에 첨가된다. 한 실시양태에서, 환원제는 공정 중에 2회 이상 첨가된다.
- [0038] 환원제가 단계 a)에서 가열 전에 첨가되고 단계 a)에서 가열 중에 조성물에 남아 있거나 항체 조성물이 온도 범위에 들어갈 때 또는 항체 조성물이 본 개시의 온도 범위가 된 후에 첨가되는 상기 실시양태에서, 환원제는 투석 여과 등을 포함하는 통상의 기술에 의해 가열 단계 중이나 후에 제거될 수 있다.
- [0039] 한 실시양태에서, 방법은 항체 내 하나 이상의 디설파이드 결합을 재형성하기 위해서 단계 a) 후에 조성물이 산화 조건을 거치는 추가의 단계를 포함한다. 이 실시양태는 아인산, DDT, TCEP 또는 THP와 같은 환원제가 사용될 경우 유익할 수 있다. 대안적으로, 방법은 단계 a) 후에 조성물이 산화 조건을 거치는 단계를 포함하지 않는다. 산화 단계는 특히 단일 티올 기를 포함하는 환원제, 예를 들어 글루타티온, 머캅토에탄올(예를 들어, 2-머캅토에탄올), 머캅토에틸아민(예를 들어, 2-머캅토에틸아민) 및 시스테인(예를 들어, 시스테인-HCl)이 사용될 때 요구되지 않는다.
- [0040] 본 개시에 따른 방법의 또 다른 이점은 이용되는 조건에 의해 항체 분자가 완전히 풀리지 않는다는 것이다. 다시 말해 풀림으로 인한 비활성화가 최소화되고 항체를 다시 접을 필요를 피한다. 항체가 여러 디설파이드 결합을 포함하는 한 실시양태에서, 항체 내 모든 디설파이드 결합이 환원되는 것은 아니다. 따라서, 소위 Fab-dsFv와 같은 분자에서, 항체 분자의 Fab 단편 및 Fv 내쇄 내 디설파이드 결합은 본 발명의 방법에 의해 환원되지 않는다. β -mea는 Fab-dsFv 분자에 특히 유리하다.
- [0041] 환원제의 농도는 일반적으로 1mM 내지 100mM, 예를 들어 10 내지 90mM, 예를 들어 30 내지 90mM, 60 내지 90mM, 70 내지 90mM, 70 내지 80mM, 80 내지 90mM, 30 내지 50mM 또는 20 내지 50mM 범위이다. 한 실시양태에서, 환원제의 농도는 15mM, 20mM, 25mM, 30mM 35mM, 40mM, 45mM, 50mM, 55mM, 60mM, 65mM, 70mM, 75mM, 80mM, 83mM, 85mM, 90mM 및 100mM로부터 선택된다.
- [0042] 한 실시양태에서, 환원제는 아미노산, 예를 들어 소수성 아미노산, 극성 아미노산 또는 전하를 띤 아미노산의 존재 하에 사용된다. 이론에 얽매이지 바라지 않더라도, 아미노산의 존재는 열적 전환 단계 중에 재조합 항체 분자의 분자 구조를 안정화하는 역할을 함으로써 열 변성으로부터 보호하고, 따라서 전체 수율을 향상시킨다고 생각된다. 한 실시양태에서, 아미노산은 아르기닌, 리신, 알라닌, 프롤린, 세린 및 글리신으로부터 선택된다.
- [0043] 한 실시양태에서, 아미노산의 농도는 0.01 내지 1.0M, 예를 들어 0.01 내지 0.8M, 0.2 내지 0.8M 또는 0.7 내지 0.8M 범위이다. 한 실시양태에서, 아미노산의 농도는 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 또는 0.9M로부터 선택된다.
- [0044] 한 실시양태에서, 아미노산은 프롤린, 알라닌 또는 리신이다. 한 실시양태에서, 이용되는 프롤린, 알라닌 또는 리신의 농도는 10mM 내지 800mM 범위, 예를 들어 20, 55, 110, 280, 555 또는 777mM이다.

- [0045] 아미노산은 온도가 적절한 범위 예를 들어 30 내지 60℃, 특히 본원에 기재된 범위 또는 특정 온도가 되기 전이나 후에 재조합 항체 조성물에 첨가될 수 있다. 한 실시양태에서, 아미노산은 온도가 30 내지 60℃의 범위로 상승되기 전에 첨가된다.
- [0046] 한 실시양태에서, 염기성 염, 예를 들어 시트르산염, 황산염 또는 탄산염, 예를 들어 시트르산염 또는 황산염이 첨가된다.
- [0047] 한 실시양태에서, 바라는 범위의 온도를 유지하는 기간은 약 1 내지 70시간, 예를 들어 2 내지 60시간, 예를 들어 3 내지 50시간, 3 내지 10시간, 4 내지 6시간, 특히 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25시간이다.
- [0048] 한 실시양태에서, 열적 단계는 수반되는 교반, 예를 들어 100 내지 1200 rpm, 예를 들어 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 또는 1200 rpm 범위의 교반의 존재하에서 실시된다.
- [0049] 한 실시양태에서, 조성물 내 항체의 농도는 1.5g/L 내지 5g/L, 예를 들어 2 g/L 내지 4g/L 예를 들어 2g/L 내지 3g/L 범위이다.
- [0050] 한 실시양태에서, 방법은 아미노산을 이용하지 않고 1.5g/L 내지 5g/L 범위의 항체 분자 농도를 이용하고, 50 내지 90mM의 환원제 예를 들어 BMEA 또는 BME, 특히 BMEA의 존재하에 약 50℃의 온도에서 약 5시간 동안 실시된다. 유리하게는 수율은 90%로 높을 수 있고 이 중 60% 이상이 단량체이다.
- [0051] 본 발명의 방법의 한 실시양태에서, 하기 반응 조건을 이용한다: 환원제는 BMEA이고, 아미노산은 리신이고, 온도는 50℃이고, 기간은 약 5시간이다.
- [0052] 한 실시양태에서, 열적 전환 단계는 45 내지 55℃ 범위, 예를 들어 50℃의 온도에서, 50 내지 90mM, 예를 들어 50mM 또는 75mM의 환원제, 예를 들어 BMEA 또는 BME, 특히 BMEA의 존재하에서, 4 내지 6시간, 예를 들어 5시간 동안 실시된다. 본 실시양태에서, 항체 농도는 2 내지 3g/L 범위가 바람직하다. 한 실시양태에서, 단계 a)는 50℃의 온도에서 5시간 동안 수행되고, 단계 b)에서 환원제는 BMEA 또는 BME이고 70 내지 80mM, 예를 들어 75mM의 농도이다. 상기 실시양태에서, 열적 전환 단계는 바람직하게는 0.01 내지 0.8M, 예를 들어 0.7 내지 0.8M 범위 농도의 프롤린, 알라닌 또는 리신으로부터 선택된 아미노산의 존재하에서 수행된다.
- [0053] 본 개시의 방법의 또 다른 실시양태에서, 하기 반응 조건이 열적 전환 단계에서 이용된다: 환원제는 75mM 농도의 BMEA이고, 아미노산은 0.7 내지 0.8M 농도의 리신이고, 온도는 50℃이고 기간은 약 5시간이고 항체 농도는 2 내지 3 g/L, 예를 들어 2.75 g/L이다. 유리하게는 수율은 최대 82%일 수 있으며 이 중 79% 이상이 단량체이다.
- [0054] 본원에서 이용되는 항체 분자는 항체(즉, 전항체) 또는 이의 결합 단편을 언급한다.
- [0055] 용어 '항체'는 완전(전체) 항체, 즉 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄의 인자를 포함하는 항체, 전항체 또는 이의 결합 단편을 포함하는 분자에 관한 것이다. 본원에서 이용되는 결합 단편은 1, 2, 또는 3개 이상의 결합 부위를 포함하는 항체 유사 분자로, 분자가 "전항체"의 전체 길이의 중쇄 또는 경쇄를 포함하지 않는 것인 분자를 언급한다. 한 실시양태에서, 결합 단편은 C_H2 및/또는 C_H3 도메인(들)을 포함하지 않는다. 항체의 결합 단편은 단일쇄 항체(즉, 전장의 중쇄 및 경쇄); Fab, 변형된 Fab, Fab', 변형된 Fab', F(ab')₂, Fv, Fab-Fv, Fab-dsFv, 단일 도메인 항체(예를 들어, VH 또는 VL 또는 VHH), scFv, 2가, 3가 또는 4가 항체, 비스-scFv, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디 및 상기 중 어느 하나의 에피토프 결합 단편(예를 들어 문헌(Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217) 참조), 예를 들어 W02009/040562호에 개시된 FabFv 포맷 및 W02010/035012호에 개시된 이들의 디설파이드 안정화된 형태를 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "Fab 단편"은 경쇄의 VL(경쇄 가변) 도메인 및 불변 도메인(CL)을 포함하는 경쇄 단편, 및 중쇄의 VH(중쇄 가변) 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인(CH1)을 포함하는 항체 단편을 언급한다.
- [0056] 항체 단편의 생성 및 제조 방법은 당 업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, 문헌(Verma *et al.*, 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181) 참조). 본 개시에 사용하기 위한 기타 항체 단편은 W02005/003169호, W02005/003170호 및 W02005/003171호에 기재된 Fab 및 Fab' 단편을 포함한다.
- [0057] 전형적인 Fab' 분자는 중쇄가 가변 영역 V_H, 불변 도메인 C_H1 및 힌지 영역을 포함하고 경쇄가 가변 영역 V_L 및 불변 도메인 C_L을 포함하는 중쇄와 경쇄 쌍을 포함한다. Fab'의 이량체가 제공되는 한 실시양태에서, 예를 들어 이량체화는 힌지를 통해 이루어질 수 있다.

- [0058] 한 실시양태에서, 재조합으로 발현된 항체 분자는 다중 특이적 항체 분자, 예를 들어 이중 특이적 또는 삼중 특이적 항체이다. 본원에서 이용되는 "이중 특이적 분자"는 동일하거나 상이한 항원에 결합할 수 있는 2개의 항원 결합 부위를 가진 분자를 언급한다. 본원에서 이용되는 "삼중 특이적 분자"는 동일하거나 상이한 항원에 결합할 수 있는 3개의 항원 결합 부위를 가진 분자를 언급한다. 본원에서 이용되는 "다중 특이적 항체"는 2개 이상의 결합 도메인, 예를 들어 2 또는 3개의 결합 도메인을 가진 본원에 기재된 항체 분자를 언급한다. 한 실시양태에서, 도메인 모두는 동일한 항원에 결합하며, 이는 항원 상의 동일한 에피토프에 결합하거나 항원 상의 상이한 에피토프에 결합하는 것을 포함한다.
- [0059] 본원에서 이용되는 "항원 결합 부위"는 표적 항원과 특이적으로 상호작용하는 가변 영역의 쌍, 특히 동족 쌍을 포함하는 분자의 일부분을 언급한다. 결합 부위, 항원 결합 부위, 결합 도메인, 항원 결합 도메인은 본문에서 달리 명시되지 않는다면 본원에서 호환적으로 이용된다.
- [0060] 따라서, 한 실시양태에서, 항체 분자는 결합 도메인을 포함한다. 결합 도메인은 일반적으로 6개 CDR, 중쇄부터 3개 및 경쇄로부터 3개를 포함할 것이다. 한 실시양태에서, 각 쇠의 3개 CDR은 한 골격 안에 있으며 그 골격과 함께 이들은 가변 영역을 형성한다. 따라서, 한 실시양태에서, 항체 분자는 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하는 항원에 특이적인 결합 도메인을 포함한다. 본원에서 이용되는 활성 단편은 결합 단편과 동의어이다.
- [0061] 본원에서 이용되는 "특이적으로"는 오로지 특이적인 항원을 인식하는 항원 결합 부위 또는 비특이적인 항원에 대한 친화도와 비교하여 특이적인 항원에 대해 상당히 더 높은 결합 친화도, 예를 들어 5, 6, 7, 8, 9, 10배 더 높은 결합 친화도를 갖는 결합 부위를 언급하고자 한다. 결합 친화도는 표준 분석법, 예를 들어 표면 플라즈몬 공명, 예를 들어 바이아코어(BIAcore)에 의해 측정될 수 있다.
- [0062] 항체 가변 도메인 내 잔기는 통상적으로 카밧 연구자들(Kabat et al.)에 의해 고안된 체계에 따라 번호 매겨진다. 상기 체계는 문헌(Kabat et al., 1987, in Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA(이후로 "Kabat et al.(상기)")에 개시되어 있다. 달리 명시되는 경우를 제외하고는 본 명세서에서 상기 번호 매김 체계가 사용된다.
- [0063] 카밧 잔기 지정은 항상 아미노산 잔기의 선형 번호 매김에 전적으로 일치하지는 않는다. 실제 선형 아미노산 서열은 기본 가변 도메인 구조의 골격 또는 상보성 결정 영역(CDR: complementarity determining region)이든간에 구조적인 구성요소의 단축 또는 이로의 삽입에 상응하여, 엄격한 카밧 번호 매김에서보다 더 적거나 추가의 아미노산을 포함할 수 있다. 잔기의 정확한 카밧 번호 매김은 "표준" 카밧으로 번호 매겨진 서열과 항체의 서열 내 상동성의 잔기를 정렬하여 주어진 항체에 대해 결정될 수 있다.
- [0064] 중쇄 가변 도메인의 CDR은 카밧 번호 매김 체계에 따르면 잔기 31-35(CDR-H1), 잔기 50-65(CDR-H2) 및 잔기 95-102(CDR-H3)에 위치한다. 그러나 코티아(Chothia)(Chothia, C. and Lesk, A.M. J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987))에 따르면, CDR-H1에 상응하는 루프는 잔기 26 내지 잔기 32에 걸쳐있다. 따라서, 달리 명시되지 않는다면, 본원에서 이용되는 'CDR-H1'은 카밧 번호 매김 체계와 코티아 위상적인 루프 정의의 조합에 의해 기재되는 잔기 26 내지 35를 언급한다.
- [0065] 경쇄 가변 도메인의 CDR은 카밧 번호 매김 체계에 따르면 잔기 24-34(CDR-L1), 잔기 50-56(CDR-L2) 및 잔기 89-97(CDR-L3)에 위치한다.
- [0066] 본 발명의 방법에서 항체는 관심 항원에 대해 특이성을 갖는 적어도 하나의 Fv(VH/VL 쌍)을 포함하고, 상기 VH와 VL은 하나 이상의 링커를 통해 직접적으로 또는 간접적으로 연결되고 이들 사이의 디설파이드 결합에 의해 안정화된다.
- [0067] 한 실시양태에서, 항체 또는 이의 결합 단편은 예를 들어 디설파이드가 중쇄와 경쇄 사이 및/또는 2개의 중쇄 사이의 힌지 영역 내에서도와 같은 쇠간 디설파이드 결합인 추가의 디설파이드 결합을 포함한다.
- [0068] 한 실시양태에서, 재조합으로 발현된 항체 분자는 하나 이상, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 디설파이드 결합을 포함한다. 한 실시양태에서, 디설파이드는 자연적으로 존재한다. 한 실시양태에서, 하나 이상의 디설파이드는 특정 부위에 존재하도록 조작된다. 한 실시양태에서, 자연적으로 존재하는 적어도 하나의 디설파이드 결합 및 조작된 적어도 하나의 디설파이드 결합이 존재한다. 본원에 이용되는 조작된 디설파이드 결합은 디설파이드 결합 내 하나 또는 두 개 모든 황이 재조합 유전자 공학 기술에 의해 도입되는 경우를 언급한다.
- [0069] VH와 VL 사이의 디설파이드 결합의 위치는 제한되지 않는다. 가변 도메인 내 디설파이드 결합의 위치의 예는 하

기를 포함하는 군으로부터 선택된 위치를 포함하나 이에 제한되지 않는다:

- [0070] · V_H37 + V_L95C 예를 들어 문헌(Protein Science 6, 781-788 Zhu *et al* (1997)) 참조;
- [0071] · V_H44 + V_L100 예를 들어 문헌(Biochemistry 33 5451-5459 Reiter *et al* (1994); 또는 Journal of Biological Chemistry Vol. 269 No. 28 pp.18327-18331 Reiter *et al* (1994); 또는 Protein Engineering, vol.10 no.12 pp.1453-1459 Rajagopal *et al* (1997)) 참조;
- [0072] · V_H44 + V_L105 예를 들어 문헌(J Biochem. 118, 825-831 Luo *et al* (1995)) 참조;
- [0073] · V_H45 + V_L87 예를 들어 문헌(Protein Science 6, 781-788 Zhu *et al* (1997)) 참조;
- [0074] · V_H55 + V_L101 예를 들어 문헌(FEBS Letters 377 135-139 Young *et al* (1995)) 참조;
- [0075] · V_H100 + V_L50 예를 들어 문헌(Biochemistry 29 1362-1367 Glockshuber *et al* (1990)) 참조;
- [0076] · V_H100b + V_L49;
- [0077] · V_H98 + V_L46 예를 들어 문헌(Protein Science 6, 781-788 Zhu *et al* (1997)) 참조;
- [0078] · V_H101 + V_L46;
- [0079] · V_H105 + V_L43 예를 들어 문헌(Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 90 pp.7538-7542 Brinkmann *et al* (1993); 또는 Proteins 19, 35-47 Jung *et al* (1994)) 참조;
- [0080] · V_H106 + V_L57 예를 들어 문헌(FEBS Letters 377 135-139 Young *et al* (1995)) 참조;
- [0081] 및 분자 내에 위치하는 가변 영역 쌍 안에 이들에 상응하는 위치 또는 위치들.
- [0082] 따라서 한 실시양태에서, 본 발명의 가변 도메인 쌍(VH/VL)은 VH 내에 하나 및 VL 내 하나, 2개의 시스테인 잔기 사이에 디설파이드 결합에 의해 연결될 수 있고, 시스테인 잔기 쌍의 위치는 VH37과 VL95, VH44와 VL100, VH44와 VL105, VH45와 VL87, VH100과 VL50, VH100b와 VL49, VH98과 VL46, VH101과 VL46, VH105와 VL43 및 VH106과 VL57로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 디설파이드 결합은 위치 VH44와 VL100 사이에 형성된다.
- [0083] 상기에 열거된 아미노산 쌍은 디설파이드 결합이 형성될 수 있도록 시스테인에 의한 치환에 도움되는 위치에 있다. 시스테인은 공지된 기술에 의해 상기 바라는 위치로 조작될 수 있다. 그러므로 한 실시양태에서, 본 개시에 따라 조작된 시스테인은 주어진 아미노산 위치에서 자연에 존재하는 잔기가 시스테인 잔기로 치환되는 경우를 언급한다.
- [0084] 조작된 시스테인의 도입은 당 업계에 공지된 임의의 방법을 이용하여 실시될 수 있다. 상기 방법은 PCR 신장 증폭 돌연변이 유발법, 위치지정 돌연변이 유발법 또는 카세트 돌연변이 유발법(일반적으로 문헌(Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989; Ausbel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing & Wiley-Interscience, NY, 1993)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 위치지정 돌연변이 유발 키트, 예를 들어 퀵체인지(QuikChange)® 위치지정 돌연변이 유발 키트(Stratagen, 캘리포니아주 라졸라 소재)가 시판되고 있다. 카세트 돌연변이 유발은 문헌(Wells *et al.*, 1985, Gene, 34:315-323)을 기초로 하여 실시될 수 있다. 대안적으로, 돌연변이체는 어닐링, 절찰 및 PCR 증폭 및 중복 올리고뉴클레오타이드의 클로닝에 의한 전체 유전자 합성에 의해 만들어 질 수 있다.
- [0085] 일반적으로 VH와 VL이 하나 이상의 링커를 통해 직접적으로 또는 간접적으로 연결되고 그들 사이의 디설파이드 결합에 의해 안정화되는 VH/VL 쌍은 항원 결합 부위를 형성하고 항원에 협동적으로 결합하는 상보성 VH/VL 쌍, 즉, 동일한 항원에 대해 친화도를 가지고 항원에 협동적으로 결합하는 상보성 VH/VL 쌍이다. 전형적으로 이들은 동일한 항체, 예를 들어 숙주에 의해 생체 내에서 생성된 항체로부터 유래한 VH/VL 쌍일 것이다. 본원에서 이용되는 바와 같이 항원에 협동적으로 결합한다는 가변 영역들이 함께 표적 항원에 특이적으로 결합한다는 것을 언급한다.
- [0086] 한 실시양태에서, 항체는 VH가 C-말단에서 중쇄 불변 도메인 CH1에 융합되지 않고 VL이 C-말단에서 경쇄 불변

영역 CL(C 카파 또는 C 람다)에 융합되지 않은 적어도 하나의 Fv를 포함한다.

[0087] VH와 VL 도메인은 상호작용을 형성할 수 있고, 이는 결과적으로 다른 항체 분자 내 VH 또는 VL 도메인과의 상호작용을 통해 다량체 형성을 일으킨다.

[0088] Fv에서 VH와 VL 도메인은 링커를 통해 서로 직접 연결되거나 링커를 통해 하나 이상의 추가의 분자에 간접적으로 연결될 수 있다. VH와 VL 사이의 연결은 주어진 VH와 VL 쌍 사이의 관계를 "고정"하거나 한정하여 상기 VH가 또 다른 분자 내 VL과 쌍을 형성할 경우 본래 VH와 VL 사이의 관계가 연결이 존재함으로써 유지되기 때문에 다량체가 형성된다.

[0089] 반면, VH와 VL 도메인이 하나 이상의 링커에 의해 연결되지 않는 Fv에서, VH와 VL 도메인은 "분리될" 수 있고 ("브리딩(breathing)"으로도 언급됨) 가변 도메인 중 하나가 본래 쌍 형성으로부터 유래하지 않는다면(그러나 이것이 대체하는 본래 가변 영역과 동일한 서열을 갖는다면) 이들이 다시 쌍을 형성할 때 분자는 오로지 단량체로서 재형성될 것이다.

[0090] 본 발명에서 언급된 링커는 바람직하게는 디설파이드 결합이 아니다. 항체에 사용하기에 적합한 링커는 당 업계에 잘 알려져 있다. 링커는 하나 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 링커는 2 내지 40개 아미노산, 예를 들어 2 내지 30개, 2 내지 20개 또는 2 내지 10개 아미노산을 포함하는 펩티드 링커이다. 펩티드 링커의 예는 하기에 개시된 것들을 포함한다.

[0091] 한 실시양태에서, 링커는 서열 39 내지 90에 제시된 서열로부터 선택된다.

힌지 링커 서열

서열 번호	서열
39	DKTHTCAA
40	DKHTCPCPA
41	DKHTCPCPCATCPCPA
42	DKHTCPCPCATCPCPCATCPCPA
43	DKHTCPCPCAGKPTLYNSLVMSDTAGTCY
44	DKHTCPCPCAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY
45	DKHTCCVECPCPA
46	DKHTCPCRCPEPKSCDTPPCPCPA
47	DKHTCPCSCPA

[0092]

가요성 링커 서열

서열 번호	서열
48	SGGGGSE
49	DKTHTS
50	(S)GGGGS
51	(S)GGGSGGGGS
52	(S)GGGSGGGGSGGGGS
53	(S)GGGSGGGGSGGGGSGGGGS
54	(S)GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
55	AAAGSG-GASAS
56	AAAGSG-XGGGS-GASAS
57	AAAGSG-XGGGSXGGGS -GASAS
58	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGS -GASAS
59	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGSXGGGS-GASAS
60	AAAGSG-XS-GASAS
61	PGGNRGTTRRPATTTGSSPGPTQSHY
62	ATTTGSSPGPT
63	ATTTGS
-	GS
64	EPSGPISTINSPPSKESHKSP
65	GTVAAPSVFIFPPSD
66	GGGGIAPSMVGGGGS
67	GGGGKVEGAGGGGGS
68	GGGGSMKSHDGGGGS

69	GGGGNLITIVGGGGS
70	GGGGVVPSLPGGGGS
71	GGEKSIPGGGGS
72	RPLSYRPPFPFGFPSVRP
73	YPRSIYIRRRHPSPSLTT
74	TPSHLSHILPSFGLPTFN
75	RPVSPFTFPRLSNSWLPA
76	SPA AHFPRSIPRPGPIRT
77	APGPSAPSHRSLPSRAFG
78	PRNSIHFLHPLLVA PLGA
79	MPSLSGVLQVRYLSPPDL
80	SPQYPSPLTLTLPPHPSL
81	NPSLNPPSYLHRAPSRIS
82	LPWRTSLPSLPLRRRP
83	PPLFAKGPVGLLSRSFPP
84	VPPAPVVSLRSAHARPPY
85	LRPTPPRVSRYTCCPTP-
86	PNVAHVLP LLTVPWDNLR
87	CNPLLPLCARSPAVRTFP
88	GGGGSGGGGTGGGGS

(S)는 서열 번호 50 내지 54 에서 선택적이다.

[0094]

[0095]

강성 링커의 예는 펩티드 서열 GAPAPAAPAPA(서열 번호 89), PPPP(서열 번호 90) 및 PPP를 포함한다.

[0096]

본 발명의 한 측면에서, Fv는 단일 링커에 의해 직접 연결된 VH 도메인과 VL 도메인을 포함한다. VH 도메인과 VL 도메인을 직접 연결하는데 적합한 링커는 상기에 기재되어 있다.

[0097]

한 실시양태에서, VH와 VL은 V_H 와 V_L 가변 도메인 사이에 펩티드 링커 및 상기 V_H 와 V_L 사이에 도메인간 디선파이

드 결합을 가진 단일쇄 가변 단편인 분자인, dsscFv로도 언급되는 디섀파이드 안정화된 단일쇄 가변 단편을 형성한다.

- [0098] 상기 실시양태에서, dsscFv 분자는 하나 이상의 추가의 분자, 바람직하게는 제2 항체 또는 이의 결합 단편에 융합되어 2가, 3가 또는 4가 항체를 형성할 수 있다. dsscFv는 VH 도메인, VL 도메인 또는 VH와 VL 둘 다에 배치될 수 있는 하나 이상의 링커를 통해 하나 이상의 추가의 분자에 융합된다. 예를 들어, 하나 이상의 dsscFv 분자는 전항체 또는 이의 결합 단편의 하나 이상의 쇄의 C-말단 또는 N-말단에 융합될 수 있다. 예를 들어, 2개 이상의 dsscFv 분자는 서로 융합되어 디아바디, 일련의 scFv(비스-dsscFv) 또는 미니바디를 형성할 수 있다.
- [0099] Fv 영역을 통해 다량체를 형성하는 경향을 가질 수 있는 항체 포맷은 scFv, 디아바디, 일련의 scFv, 일련의 scFv-Fc, scFv-Fc, scFv-Fc-scFv, Fab-scFv, sc디아바디, sc디아바디-Fc, sc디아바디CH3, IgG-scFv, scFv-IgG, 투-인-원 IgG, 이중 V 도메인 IgG, IgG-V 및 V-Ig를 포함한다. 디섀파이드 결합이 Fv 또는 scFv에 이들의 구조물을 안정화하기 위해 이용될 때, 획득되는 다량체의 수율을 향상시키는 본 발명을 이용하는 것이 유익할 수 있다.
- [0100] 본 발명의 또 다른 측면에서, VH 및 VL은 각각 제2 분자를 통해 VH와 VL을 간접적으로 연결하는 링커를 포함한다. 상기 측면에서, VH 도메인과 VL 도메인은 별개의 링커를 통해 제2 분자에 결합된다. 각 가변 도메인을 제2 분자에 결합시키기에 적합한 링커는 상기에 기재되어 있다. 제2 분자는 VH와 VL 사이에 간접적인 연결을 제공한다. VL 및 VH 각각은 VH와 VL 도메인이 표적 항원에 협동적으로 결합하도록 하기 위해 적합한 위치에서 제2 분자에 결합된다. VH 도메인과 VL 도메인은 펩티드 결합 또는 펩티드 링커에 의해 서로 직접 연결되지 않는다.
- [0101] 상기 측면에서, 제2 분자는 바람직하게는 2가, 3가 또는 4가 항체를 형성하는 제2 항체 또는 이의 결합 단편이다. 한 실시양태에서, VH와 VL 도메인은 전항체 또는 Fab, 변형된 Fab, Fab', 변형된 Fab' 또는 F(ab')₂를 통해 간접적으로 결합된다. 예를 들어, 제2 항체가 Fab일 때, VH 도메인은 제2 항체의 중쇄 불변 영역, 예를 들어 CH1의 C-말단에 융합될 수 있고, VL 단일 도메인 항체는 제2 항체의 경쇄 불변 영역(C 카파 또는 C 람다)의 C-말단에 융합될 수 있고, 이로써 Fab-dsFv를 형성할 수 있다. Fab-dsFv 항체는 W02010/035012호 및 W02011/036460호에 상세하게 기재되어 있으며, 이들 둘 다 본원에 참고로 포함된다.
- [0102] 항체는 추가의 결합 도메인 예를 들어 W02011/117653호에 개시된 디섀파이드 안정화된 DVD-Ig 분자에 따른 결합 도메인, 또는 W02011/030107호에 기재된 소위 (FabFv)₂Fc를 포함할 수 있으며, 상기 각각은 본원에 참고로 포함된다. 따라서, 본원에서 이용되는 항체는 2가, 3가 또는 4가 항체를 포함한다.
- [0103] 본 발명의 방법에 이용될 수 있는 기타 적합한 항체 포맷은 FabFvFc 및 (FabFv)₂Fc 항체를 개시하는 W02011/030107호, PEG에 접합된 Fab-dsFv 항체를 개시하는 W02011/061492호, 및 Fab-dsFv-dsFv를 개시하는 W02011/086091호에 기재되어 있으며, 이들 각각은 본원에서 참고로 포함되며, 여기서 디섀파이드 결합은 Fv 또는 scFv에 이용된다.
- [0104] 다량체 수율을 향상시키는 본 발명의 방법에 이용될 수 있는 기타 적합한 항체 포맷은 하기를 포함하거나 이들로 이루어진 다중 특이적 항체 분자를 개시하는 W02015/197772호에 기재되어 있으며, 이는 본원에 참고로 포함된다:
- [0105] a) 화학식 (I)의 폴리펩티드 쇄:
- [0106] $V_H-CH_1-X-V_L$; 및
- [0107] b) 화학식 (II)의 폴리펩티드 쇄:
- [0108] $V_L-C_L-Y-V_2$;
- [0109] 상기 식에서,
- [0110] V_H 는 중쇄 가변 도메인을 나타내고;
- [0111] CH_1 는 중쇄 불변 영역의 도메인, 예를 들어 이의 도메인 1을 나타내고;
- [0112] X 는 결합 또는 링커를 나타내고;
- [0113] Y 는 결합 또는 링커를 나타내고;

- [0114] V_1 은 dsFv, sdAb, scFv 또는 dsscFv를 나타내고;
- [0115] V_L 은 경쇄 가변 도메인을 나타내고;
- [0116] C_L 은 경쇄 불변 영역의 도메인, 예를 들어 C카파를 나타내고;
- [0117] V_2 는 dsFv, sdAb, scFv 또는 dsscFv를 나타내고,
- [0118] 여기서, V_1 및 V_2 중 적어도 하나는 dsscFv이다.
- [0119] 본원에서 이용되는 "단일쇄 가변 단편" 또는 "scFv"는 중쇄 가변 도메인(V_H) 및 경쇄 가변 도메인(V_L)을 포함하거나 이들로 이루어지며 V_H 와 V_L 가변 도메인 사이의 펩티드 링커에 의해 안정화된 단일쇄 가변 단편을 언급한다. V_H 및 V_L 가변 도메인은 임의의 적합한 방향에 있을 수 있으며, 예를 들어 V_H 의 C-말단이 V_L 의 N-말단에 결합될 수 있거나 V_L 의 C-말단이 V_H 의 N-말단에 결합될 수 있다.
- [0120] 본원에서 이용되는 "디선파이드 안정화된 단일쇄 가변 단편" 또는 "dsscFv"는 V_H 와 V_L 가변 도메인 사이의 펩티드 링커에 의해 안정화된 단일쇄 가변 단편을 언급하고, V_H 와 V_L 사이에 도메인간 디선파이드 결합을 또한 포함한다.
- [0121] 본원에서 이용되는 "디선파이드 안정화된 가변 단편" 또는 "dsFv"는 V_H 와 V_L 가변 도메인 사이에 펩티드 링커를 포함하지 않고 대신에 V_H 와 V_L 사이에 도메인간 디선파이드 결합에 의해 안정화된 단일쇄 가변 단편을 언급한다.
- [0122] 본원에서 이용되는 "단일 도메인 항체" 또는 "sdAb"는 단일 단량체 가변 항체 도메인, 예를 들어 V_H 또는 V_L 또는 V_{HH} 로 이루어진 항체 단편을 언급한다.
- [0123] 항체 포맷의 예는 [도 28]에 나타낸다.
- [0124] 한 실시양태에서, V_1 및 V_2 둘 다 dsscFv이며 이들 항체 포맷은 또한 본원에서 Fab-2xdsscFv로도 언급될 수 있다. V_H 및 V_L 가변 도메인은 임의의 적합한 방향에 있을 수 있으며, 예를 들어 V_H 의 C-말단이 V_L 의 N-말단에 결합될 수 있거나 V_L 의 C-말단이 V_H 의 N-말단에 결합될 수 있다.
- [0125] 단량체 수율을 향상시키는 본 발명의 방법에 이용될 수 있는 기타 적합한 항체 포맷은 Fab-dsscFv 항체 포맷을 개시하는 W02013/068571호의 실시예 4에 기재되어 있으며, 이는 본원에서 참고로 포함된다. 항체 포맷의 예는 [도 29]에 나타낸다.
- [0126] 한 실시양태에서, 항체는 C_H2 및/또는 C_H3 도메인을 포함하지 않는다.
- [0127] 한 실시양태에서, 항체 단편은, 예를 들어 각각이 본원에서 참고로 포함된 W02010/035012호 및 W02011/036460호에 개시된 바와 같이, 소위 Fab-dsFv 포맷이다.
- [0128] 한 실시양태에서, 항체는 W02011/117648호에 개시된 디선파이드 안정화된 Fab이다.
- [0129] 한 실시양태에서, 항체는 W02011/117648호에 개시된 디선파이드 안정화된 Fab가 아니다.
- [0130] 한 실시양태에서, 항체는 OX40에 특이적인 결합 도메인을 포함한다.
- [0131] 한 실시양태에서, 항체는 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인을 포함한다.
- [0132] 한 실시양태에서, 항체는 OX40에 특이적인 결합 도메인 및 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인, 특히 Fab-dsFv 포맷, 예를 들어 혈청 알부민 결합 도메인이 Fv 일부분인 Fab-dsFv 포맷을 포함하며, 특히 본원에 참고로 포함된 W02013/068563호에 개시된 OX40 및 인간 혈청 알부민에 특이적인 이중 특이적 구조물을 포함한다.
- [0133] 본 개시는 인간 OX40 및 인간 혈청 알부민에 결합하는 이중 특이적 항체 융합 단백질로,
- [0134] N-말단으로부터 순서대로, 제1 중쇄 가변 도메인(V_{H1}), C_H1 도메인 및 제2 중쇄 가변 도메인(V_{H2})을 포함하는 중쇄,
- [0135] N-말단으로부터 순서대로, 제1 경쇄 가변 도메인(V_{L1}), C_L 도메인 및 제2 경쇄 가변 도메인(V_{L2})을 포함하는 경

쇄를 포함하고,

- [0136] 상기 중쇄와 경쇄는 V_H1 과 V_L1 이 제1 항원 결합 부위를 형성하고 V_H2 와 V_L2 가 제2 항원 결합 부위를 형성하도록 정렬되고,
- [0137] 제1 항원 결합 부위에 의해 결합된 항원은 인간 OX40이고 제2 항원 결합 부위에 의해 결합된 항원은 인간 혈청 알부민이고, 특히
- [0138] 중쇄의 제1 가변 도메인(V_H1)은 CDR-H1에 대해 서열 번호 1에 제시된 서열, CDR-H2에 대해 서열 번호 2에 제시된 서열 및 CDR-H3에 대해 서열 번호 3에 제시된 서열을 포함하고 경쇄의 제1 가변 도메인(V_L1)은 CDR-L1에 대해 서열 번호 4에 제시된 서열, CDR-L2에 대해 서열 번호 5에 제시된 서열 및 CDR-L3에 대해 서열 번호 6에 제시된 서열을 포함하고,
- [0139] 제2 중쇄 가변 도메인(V_H2)은 서열 번호 11에 제시된 서열을 가지고 제2 경쇄 가변 도메인(V_L2)은 서열 번호 12에 제시된 서열을 가지고, 제2 중쇄 가변 도메인(V_H2)과 제2 경쇄 가변 도메인(V_L2)은 디설파이드 결합에 의해 연결되는 것인 이중 특이적 항체 융합 단백질을 제공한다.
- [0140] 한 실시양태에서, CH1 도메인과 제2 중쇄 가변 도메인(V_H2) 사이에 펩티드 링커가 있다. 한 실시양태에서, CL 도메인과 제2 경쇄 가변 도메인(V_L1) 사이에 펩티드 링커가 있다. 한 실시양태에서, 제1 중쇄 가변 도메인(V_H1)은 서열 번호 8에 제시된 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 제1 경쇄 가변 도메인(V_L1)은 서열 번호 7에 제시된 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 중쇄는 서열 번호 15에 제시된 서열을 포함하거나 이로 이루어진다. 한 실시양태에서, 경쇄는 서열 번호 16에 제시된 서열을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0141] 한 실시양태에서, 항체 분자는 혈청 알부민 결합 도메인, 예를 들어 서열 번호 29 또는 30에 나타난 가변 영역의 1, 2, 또는 3개의 중쇄 CDR, 및 서열 번호 31 또는 32에 나타난 가변 영역의 1, 2, 또는 3개의 경쇄 CDR을 포함하는 혈청 알부민 도메인, 특히 서열 번호 29 또는 30에 나타난 가변 영역의 3개의 중쇄 CDR, 예를 들어 CDRH1에 CDRH1, CDH2에 CDRH2, CDH3에 CDRH3, 및 서열 번호 31 또는 32에 나타난 가변 영역의 3개의 경쇄 CDR, 예를 들어 CDRL1에 CDRL1, CDL2에 CDRL2, CDL3에 CDRL3을 포함하는 혈청 알부민 결합 도메인을 포함한다.
- [0142] 한 실시양태에서, 항체 분자는 서열 번호 30에 나타난 중쇄 가변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체 분자는 서열 번호 32에 나타난 경쇄 가변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체 분자는 서열 번호 30에 나타난 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 32에 나타난 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0143] 한 실시양태에서, 중쇄는 서열 번호 15 또는 19를 포함하거나 이로 이루어진다. 한 실시양태에서, 경쇄는 서열 번호 16 또는 20을 포함하거나 이로 이루어진다. 한 실시양태에서, 결합 단편 항체 분자는 서열 번호 15 및 16, 15 및 20, 16 및 19 또는 19 및 20을 포함한다. 따라서 한 실시양태에서, 서열 번호 15에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 16에 제시된 서열을 포함하는 경쇄를 가지고, 인간 OX40 및 인간 혈청 알부민에 결합하는 이중 특이적 항체 융합 단백질이 제공된다.
- [0144] 한 실시양태에서, 항체 분자, 예를 들어 Fab-dsFv 포맷은 본원에 참고로 포함된 W02014/019727호에 개시된 것이다.
- [0145] 한 실시양태에서, 항체 분자는 인간 혈청 알부민에 특이적인 결합 도메인, 특히 본원에 참고로 포함된 W02013/068571호에 개시된 CDR 또는 가변 영역을 갖는 결합 도메인을 포함한다.
- [0146] 한 실시양태에서, 본 개시에 따른 항체 또는 단편은 단클론이다. 단클론 항체는 당 업계에 공지된 임의의 방법, 예를 들어 하이브리도마 기술(Kohler & Milstein, *Nature*, 1975, 256, 495-497), 트리오마 기술, 인간 B-세포 하이브리도마 기술(Kozbor *et al.*, *Immunology Today*, 1983, 4, 72) 및 EBV-하이브리도마 기술(Cole *et al.*, "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985)에 의해 제조될 수 있다.
- [0147] 또한, 본 개시의 방법에 이용되는 항체 분자는, 예를 들어, 문헌(Babcook, J. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93(15), 7843-7848), W092/02551호, W02004/051268호 및 W02004/106377호에 기재된 방법에 의한 특정 항체의 생산을 위해 선택된 단일 림프구로부터 생성된 면역글로불린 가변 영역 cDNA의 클로닝 및 발현에 의한 단일 림프구 항체 방법을 이용하여 생성될 수 있다.
- [0148] 인간화 항체 분자는 비인간 종의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR) 및 경우에 따라 비인간 종의 하나 이상의

공여자 잔기를 포함하는 인간 면역글로불린 분자의 골격 영역을 갖는 비인간 종의 항체 분자이다(예를 들어, US5,585,089호 참조). 한 실시양태에서, 본 개시의 방법의 대상인 항체 또는 결합 단편은 인간화된다.

[0149] 또한, 본 발명의 방법에 이용되는 항체는 당 업계에 공지된 여러 파아지 디스플레이 방법을 이용하여 생성될 수 있으며 문헌(Brinkman *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 1995, 182, 41-50; Ames *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 1995, 184, 177-186; Kettleborough *et al.* *Eur. J. Immunol.*, 1994, 24, 952-958; Persic *et al.*, *Gene*, 1997 187, 9-18; 및 Burton *et al.*, *Advances in Immunology*, 1994, 57, 191-280); W090/02809호; W091/10737호; W092/01047호; W092/18619호; W093/11236호; W095/15982호; 및 W095/20401호; 및 US5,698,426호; US5,223,409호; US5,403,484호; US5,580,717호; US5,427,908호; US5,750,753호; US5,821,047호; US5,571,698호; US5,427,908호; US5,516,637호; US5,780,225호; US5,658,727호; US5,733,743호; 및 US5,969,108호에 개시된 것들을 포함한다.

[0150] 또한, 기타 포유동물들을 포함한 형질전환 생쥐, 또는 기타 생물체가 예를 들어 파아지 기술을 이용하여, 인간화 항체를 생성하는데 사용될 수 있다.

[0151] 완전 인간 항체는 중쇄 및 경쇄 둘 다의 가변 영역 및 불변 영역(존재할 경우)가 반드시 동일한 항체로부터 유래하는 것은 아니나 모두 인간 기원이거나 인간 기원의 서열과 실질적으로 동일한 항체이다. 완전 인간 항체의 예는 예를 들어 상기에 기재된 파아지 디스플레이 방법에 의해 생산된 항체 및, 예를 들어 EP0546073호, US5,545,806호, US5,569,825호, US5,625,126호, US5,633,425호, US5,661,016호, US5,770,429호, EP 0438474호 및 EP0463151호에 일반적인 방식으로 기재된 바와 같이, 쥐와 면역 글로불린 가변 및/또는 불변 영역 유전자가 이들의 인간 대응물로 대체된 생쥐에서 생산된 항체를 포함할 수 있다.

[0152] 본 발명의 방법에 사용하기 위한 항체 물질은 항체 가변 및 불변 영역(들)을 코딩하는 DNA의 조작 및 재발현을 수반하는 재조합 DNA 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 표준 분자 생물학 기술을 이용하여 바라는 바에 따라 아미노산 또는 도메인을 변형하거나, 첨가하거나 결실시킬 수 있다. 가변 또는 불변 영역에 임의의 변화는 본원에서 사용되는 용어 '가변' 및 '불변' 영역에 의해 여전히 포함된다.

[0153] 항체 출발 물질은 예를 들어 생쥐, 쥐, 토끼, 햄스터, 낙타, 라마, 염소 또는 인간을 포함한 임의의 종으로부터 얻을 수 있다. 항체의 일부분은 여러 종으로부터 얻을 수 있으며, 예를 들어 항체는 키메라일 수 있다. 일례로, 불변 영역은 한 종으로부터 유래하고 가변 영역은 또 다른 종으로부터 유래한다. 또한, 항체 출발 물질은 변형될 수 있다. 또 다른 예로, 항체의 가변 영역은 재조합 DNA 공학 기술을 이용하여 생성되었다. 이렇게 조작된 형태는 예를 들어 천연 항체의 아미노산 서열에 삽입, 결실 또는 변화에 의해 천연 항체 가변 영역으로부터 생성된 것들을 포함한다. 상기 유형의 구체적인 예는 한 항체로부터의 적어도 하나의 CDR 및, 경우에 따라 하나 이상의 골격 아미노산 및 제2 항체로부터의 가변 영역 도메인의 나머지를 포함하는 조작된 가변 영역 도메인을 포함한다. 상기 항체의 생성 및 제조 방법은 당 업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, US4,816,397호(Boss et al.); US6,331,415호(Cabilly et al.); WO92/02551호(Shrader et al.); 문헌(Ward et al., 1989, Nature, 341, 544; Orlandi et al., 1989, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 86, 3833; Riechmann et al., 1988, Nature, 322, 323; Bird et al, 1988, Science, 242, 423); US 5,585,089호(Queen et al.); WO91/09967호(Adair); 문헌(Mountain and Adair, 1992, Biotechnol. Genet. Eng. Rev, 10, 1-142; Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181)을 참조).

[0154] 한 실시양태에서, 항체는 결합 도메인을 형성하는 가변 도메인 쌍(동족 쌍)을 포함한다. 본원에서 이용되는 동족 쌍은 즉 단일 항체 또는 항체를 발현하는 세포로부터 단리된 가변 도메인의 천연 쌍을 언급하고자 한다. 가변 도메인은 최적화되고/거나 인간화되었을 수 있다. 동족 쌍으로부터 유래한 최적화/인간화 가변 도메인은 최적화/인간화 후에도 여전히 동족 쌍으로 생각될 것이다.

[0155] 따라서, 본 개시는 인간, 인간화 또는 키메라 항체 분자가 본원에 개시된 방법을 거치는 단계로 확장된다.

[0156] 항체는 임의의 표적 항원에 특이적일 수 있다. 항원은 세포에 결합된 단백질, 예를 들어 세균 세포, 효모 세포, T 세포, 내피세포 또는 종양 세포와 같은 세포에서 세포 표면 단백질일 수 있거나, 이는 가용성 단백질일 수 있다. 또한, 관심 항체는 임의의 의학적으로 적절한 단백질, 예를 들어 질환 또는 감염 중에 상승 조절되는 단백질, 예를 들어 수용체 및/또는 이들의 상응하는 리간드일 수 있다. 세포 표면 단백질의 구체적인 예는 부착 분자, 예를 들어 $\beta 1$ 인테그린과 같은 인테그린 예를 들어, VLA-4, E-셀렉틴, P 셀렉틴 또는 L-셀렉틴, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD23, CD25, CD33, CD38, CD40, CD40L, CD45, CDW52, CD69, CD134(OX40), ICOS, BCMP7, CD137, CD27L, CDPC1, CSF1 또는 CSF1-수용체, DPCR1, DPCR1, 두들린2,

FLJ20584, FLJ40787, HEK2, KIAA0634, KIAA0659, KIAA1246, KIAA1455, LTBP2, LTK, MAL2, MRP2, 넥틴 유사2, NKCC1, PTK7, RAIG1, TCAM1, SC6, BCMP101, BCMP84, BCMP11, DTD, 암배아 항원(CEA: carcinoembryonic antigen), 인간 유지방 글로불린(HMFG1 및 2), MHC I형 및 MHC II형 항원, KDR 및 VEGF, PD-1, DC-SIGN, TL1A, DR3, IL-7 수용체 A 및 적합한 경우, 이들의 수용체를 포함한다.

[0157] 가용성 항원은 인터류킨 예를 들어 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-13, IL-14, IL-16 또는 IL-17, 예를 들어 IL17A 및/또는 IL17F, 바이러스 항원, 예를 들어 호흡기 세포융합 바이러스 또는 거대세포 바이러스 항원, 면역글로불린, 예를 들어 IgE, 인터페론 예를 들어 인터페론 α , 인터페론 β 또는 인터페론 γ , 종양 괴사 인자 TNF(tumor necrosis factor)(이전에 종양 괴사 인자- α 로 공지되고 본원에서 TNF 또는 TNF α 로 언급됨), 종양 괴사 인자- β , 세포 집락 자극 인자 예를 들어 G-CSF 또는 GM-CSF, 및 혈소판 유래 성장 인자 예를 들어 PDGF- α , 및 PDGF- β , WISP-1 및 적합한 경우 이들의 수용체를 포함한다. 기타 항원은 세균 세포 표면 항원, 세포 독소, 바이러스, 예를 들어 인플루엔자, EBV, HepA, B 및 C, 생물 테러 제제, 방사성 핵종, 및 중금속, 및 뱀과 거미의 독 및 독소를 포함한다.

[0158] 한 실시양태에서, 방법은 항체 분자를 인간에게 투여하기에 적합한 표준 물질로 정제하고 그 후 상기를 제제화하는 추가의 단계를 포함한다.

[0159] 본원에 기재된 방법을 이용하여 정제된 항체 분자는 높은 결합 친화도, 특히, 나노몰 또는 피코몰의 친화도를 갖는다.

[0160] 친화도는 바이아코어®를 포함하여 당 업계에 공지된 임의의 적합한 방법을 이용하여 측정될 수 있다. 한 실시양태에서, 항체 또는 결합 단편은 약 100 pM 이상 우수한, 예를 들어 약 50pM 이상 우수한, 예를 들어 약 40pM 이상 우수한, 특히 30pM 이상 우수한 결합 친화도를 갖는다. 한 실시양태에서, 항체 또는 결합 단편은 완전 인간이거나 인간화되고 약 100pM 이상 우수한 결합 친화도를 갖는다.

[0161] 본원에서 이용되는 자연에 존재하는 도메인의 유도체는, 예를 들어 도메인의 특성을 최적화하기 위해서 예를 들어 바람직하지 않은 특성을 제거하지만 도메인의 특징적인 특성(들)은 유지함으로써, 자연에 존재하는 서열에서 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산이 치환되거나 결실되는 경우를 언급하고자 한다.

[0162] 또한, 당업자는 항체가 다양한 번역 후 변형을 거칠 수 있다는 것을 이해할 것이다. 이러한 변형의 유형 및 정도는 대개 분자를 발현하는데 사용되는 숙주 세포주 및 배양 조건에 따라 결정된다. 이러한 변형은 글리코실화, 메티오닌 산화, 디케토피페라진 형성, 아스파테이트 이성질체화 및 아스파라긴 탈아미드화에서의 변화를 포함할 수 있다. 빈번한 변형은 카복시펩티다아제의 작용으로 인해 카복시 말단의 염기성 잔기(예를 들어, 리신 또는 아르기닌)의 손실이다(문헌(Harris, RJ. *Journal of Chromatography* 705:129-134, 1995)에 기재됨). 상기 번역 후 변화는 분자의 특성에 영향을 주어서 다운스트림 공정에 영향을 줄 수 있다.

[0163] 한 실시양태에서, 본 개시의 방법에 이용되는 항체 조성물은 아세트산나트륨을, 예를 들어 25mM 농도로, 포함하지 않는다. 한 실시양태에서, 본 개시의 방법에 이용되는 항체 조성물은 염화나트륨을, 예를 들어 25mM 농도로, 포함하지 않는다.

[0164] 소수성 아미노산의 예는 알라닌, 이소류신, 류신, 페닐알라닌, 프롤린 글리신, 예를 들어 알라닌, 프롤린 또는 글리신을 포함한다. 극성 아미노산의 예는 아스파라긴, 히스티딘, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 메티오닌, 및 트립토판, 예를 들어 세린을 포함한다. 전하를 띠는 아미노산의 예는 아르기닌, 리신, 아스파르트산 및 글루탐산, 예를 들어 아르기닌 또는 리신, 특히 리신을 포함한다.

[0165] 시트르산염의 예는 나트륨, 칼륨, 칼슘 및 마그네슘, 예를 들어 나트륨 또는 칼륨, 특히 나트륨을 포함한다. 황산염의 예는 암모늄, 칼슘 및 마그네슘, 예를 들어 암모늄을 포함한다. 탄산염(중탄산염 포함)의 예는 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘 및 이의 상응하는 중탄산 형태를 포함한다.

[0166] 한 실시양태에서, 염은 0.5 내 5mM, 예를 들어 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 또는 5mM의 농도이다. 한 실시양태에서, 황산암모늄은 4mM의 농도이다. 한 실시양태에서, 시트르산나트륨은 1.5mM의 농도이다.

[0167] 한 실시양태에서, 본 개시에 따른 열적 전환 단계는 정화된 상등액에 실시된다. 상등액은 임의의 적합한 방법, 예를 들어 원심분리, 여과 등에 의해 정화될 수 있다. 한 실시양태에서, 상등액은 0.22 마이크론 여과를 이용하여 정화된다.

[0168] 한 실시양태에서, 단백질 A 크로마토그래피의 단계는 열적 전환 단계 전에 상등액에 수행된다. 단백질 A 정제는

본원에 개시된 항체 분자(특히 $C_{H2}C_{H3}$ 도메인을 포함하지 않는 것들)의 유형과 관련하여 특히 유리한데, 그 이유는 상기 기술이 다량체가 단량체로부터 분리되도록 하기 때문이다.

- [0169] 단백질 A 크로마토그래피의 용도는 단량체 형태의 Fc 영역을 포함하지 않는 인간 VH3 도메인 포함 항체를 회수하는데 이용될 수 있다. 결합활성 효과는 인간 VH3 도메인과 단백질 A의 결합 사이에서 관찰되었다. 이 결과는 Fc 영역과 단백질 A 사이에 상호작용에 대해 기재된 적이 없다는 것을 고려하면 놀라우며 항체의 단량체 및 다량체 형태를 포함하는 혼합물로부터 단량체 인간 VH3 도메인 포함 항체의 회수를 가능하게 한다.
- [0170] 따라서, 단백질 A 정제의 단계는 a) 단량체 및 다량체 형태의 인간 VH3 도메인 포함 항체를 포함하는 혼합물을 단백질 A 크로마토그래피 물질에 적용하는 단계로, 상기 단백질 A는 상기 항체의 단백질 A와의 결합을 허용하는 조건 하에서 도메인 D 및/또는 E를 포함하는 것인 단계, 및 b) 단량체 형태의 인간 VH3 도메인 포함 항체를 회수하는 단계를 포함할 수 있고, 인간 VH3 도메인 포함 항체는 Fc 영역을 포함하지 않는다. 대안적으로, 단백질 A 정제의 단계는 a) 단량체 및 다량체 형태의 인간 VH3 도메인 포함 항체를 포함하는 혼합물을 단백질 A 크로마토그래피 물질에 적용하는 단계로, 상기 단백질 A는 도메인 D 및/또는 E를 포함하는 것인 단계, 및 b) 상기 항체의 단백질 A와의 결합을 허용하는 단계, c) 단량체 형태의 항체의 결합을 선택적으로 파괴하는 용리 완충액을 적용하는 단계, d) 결과 용리액을 회수하는 단계, 및 경우에 따라 e) 다량체 형태의 항체의 결합을 파괴하는 제 2 용리 완충액을 적용하고 상기 제 2 용리액을 회수하는 단계를 포함하고, 인간 VH3 도메인 포함 항체는 Fc 영역을 포함하지 않는다. 항체가 W02013/068563호에 개시된 OX40 및 인간 혈청 알부민에 특이적인 항체 A26Fab-645dsFv인 한 실시양태에서, 단백질 A 정제는 상기와 같이 실시되며, 단계 c)에서 용리 완충액은 단량체의 결합을 파괴하는 pH 3.5 내지 pH 4.2, 바람직하게는, pH 3.6 내지 pH 4.1, pH 3.7 내지 pH 4.0, 바람직하게는 pH 3.8 내지 pH 3.9 또는 pH 3를 가지고 경우에 따른 단계 e)에서 용리 완충액은 다량체 형태의 항체의 결합을 파괴하는 pH 3.5 미만, 바람직하게는 pH 3.4 미만, 바람직하게는 pH 2.8 내지 pH 3.2, 바람직하게는 pH 2.9 내지 pH 3.1, 바람직하게는 pH 3.0을 갖는다.
- [0171] 대안적으로, 단백질 A 정제의 단계는 a) 단량체 및 다량체 형태의 인간 VH3 도메인 포함 항체를 포함하는 혼합물을 단백질 A 크로마토그래피 물질에 적용하는 단계로, 상기 단백질 A는 도메인 D 및/또는 E를 포함하는 것인 단계, 및 b) 다량체 형태의 항체의 결합을 허용하는 단계, c) 통과액 내 단량체 형태의 항체를 회수하는 단계, 및 경우에 따라 d) 다량체 형태의 항체의 결합을 선택적으로 파괴하는 용리 완충액을 적용하는 단계, 및 e) d)로부터 생성된 용리액을 회수하는 단계를 포함하며, 인간 VH3 도메인 포함 항체는 Fc 영역을 포함하지 않는다.
- [0172] 또 다른 실시양태에서, 단백질 A 크로마토그래피는 열적 전환 단계 전에 수행되지 않는다.
- [0173] 한 실시양태에서, 방법은 추가의 다운스트림 공정 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 방법은 다운스트림 정제의 추가의 단계를 포함하며, 예를 들어 다운스트림 공정은 크로마토그래피 단계, 예를 들어 소수성 상호작용 크로마토그래피 또는 이온 교환 크로마토그래피를 포함한다.
- [0174] 본원에서 이용되는 다운스트림 공정 단계는 항체를 추가로 정제하기 위해서 단계 a) 다음에 이용되는 적어도 하나의 단계를 언급한다. 다운스트림 공정의 예는 하나 이상의 크로마토그래피 단계, 예를 들어 크기 배제 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피(예를 들어, 음이온 교환 크로마토그래피 및/또는 양이온 교환 크로마토그래피), 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 예를 들어 단백질 A 크로마토그래피(예를 들어, 맵셀렉트(MabSelect) 컬럼)를 포함한다. 폴리펩티드 및 단백질의 다운스트림 공정에 이용되는 기술은 당업자에게 잘 알려져 있다.
- [0175] 한 실시양태에서, 다운스트림 공정은 적어도 하나의 크로마토그래피 단계, 특히 이온 교환 크로마토그래피를 포함한다. 한 실시양태에서, 방법은 음이온 교환 크로마토그래피 단계 후에 양이온 교환 크로마토그래피 단계 또는 그 반대를 포함한다. 한 실시양태에서, 소수성 상호작용 크로마토그래피가 이용된다. 한 실시양태에서, 혼합 방식의 크로마토그래피가 이용된다. 한 실시양태에서, 여러 크로마토그래피 단계가 이용된다.
- [0176] 한 실시양태에서, 방법은 바이러스 불활성화 단계, 예를 들어 단백질을 포함하는 조성물을 정해진 pH, 예를 들어 낮은 pH에서 정해진 기간 동안 유지하는 단계를 포함한다.
- [0177] 한 실시양태에서, 최종의 다운스트림 공정 단계는 단백질을 위한 최종 저장 완충액 및 농도를 제공하는 투석 여과 단계 및 완충액 교환이다.
- [0178] 한 실시양태에서, 열적 전환 단계 후 다운스트림 공정은 열적 전환 단계 전에 상기에 기재된 바와 같이, 단백질 A(예를 들어, 맵셀렉트 컬럼) 정제를 포함한다.

- [0179] 한 실시양태에서, 다운스트림 공정은 바이러스 불활성화 단계, 이어서 한외여과 및 완충액 교환, 차례로 이어서 음이온 교환 크로마토그래피 및 후속적인 양이온 교환 크로마토그래피 및 바이러스 여과 단계를 더 포함한다.
- [0180] 한 실시양태에서, 열적 전환 단계 후 다운스트림 공정은 바이러스 불활성화 단계, 이어서 한외여과 및 완충액 교환, 차례로 이어서 음이온 교환 크로마토그래피 및 후속적인 양이온 교환 크로마토그래피 및 바이러스 여과 단계를 포함한다.
- [0181] 한 실시양태에서, 다운스트림 공정은 바이러스 불활성화 단계, 이어서 한외여과 및 완충액 교환, 차례로 이어서 양이온 교환 크로마토그래피 및 후속적인 음이온 교환 크로마토그래피 및 바이러스 여과 단계를 더 포함한다.
- [0182] 한 실시양태에서, 열적 전환 단계 후 다운스트림 공정은 바이러스 불활성화 단계, 이어서 한외여과 및 완충액 교환, 차례로 이어서 양이온 교환 크로마토그래피 및 후속적인 음이온 교환 크로마토그래피 및 바이러스 여과 단계를 포함한다.
- [0183] 기타 다운스트림 공정 단계는 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC: hydrophobic interaction chromatography) 또는 혼합 방식의 크로마토그래피를 포함한다.
- [0184] 한 실시양태에서, 최종의 다운스트림 공정 단계는 단백질을 위한 최종 저장 완충액 및 농도를 제공하는 투석 여과 단계 및 완충액 교환이다.
- [0185] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 방법은 정제된 단량체 항체 분자를 하나 이상의 이펙터 분자에 접합하는 추가의 단계를 제공하였다. 이펙터 분자는 항체 분자에 부착될 수 있는 단일 모이어티를 형성하도록 결합된 단일 이펙터 분자 또는 2개 이상의 상기 분자를 포함할 수 있다.
- [0186] 이펙터 분자에 결합된 항체를 획득하는 것이 바람직할 경우, 이는 항체가 이펙터 분자에 직접 또는 커플링제를 통해 결합되는 표준 화학 또는 재조합 DNA 절차에 의해 제조될 수 있다. 상기 이펙터 분자를 항체에 접합하기 위한 기술은 당 업계에 잘 알려져 있다(문헌(Hellstrom *et al.*, Controlled Drug Delivery, 2nd Ed., Robinson *et al.*, eds., 1987, pp. 623-53; Thorpe *et al.*, 1982, Immunol. Rev., 62:119-58 및 Dubowchik *et al.*, 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123) 참조). 구체적인 화학 절차는, 예를 들어, W093/06231호, W092/22583호, W089/00195호, W089/01476호 및 W003031581호에 개시된 것들을 포함한다. 대안적으로, 이펙터 분자가 단백질 또는 폴리펩티드일 경우, 결합은, 예를 들어 W086/01533호 및 EP0392745호에 기재된 바와 같은, 재조합 DNA 절차를 이용하여 달성될 수 있다.
- [0187] 본원에 사용되는 용어 이펙터 분자는, 예를 들어, 항신생물제, 약물, 독소, 생물 활성 단백질, 예를 들어 효소, 기타 항체 또는 항체 단편, 합성 또는 자연에 존재하는 중합체, 핵산 및 이의 단편, 예를 들어, DNA, RNA 및 이의 단편, 방사성 핵종, 특히 방사성 요오드화물, 방사성 동위원소, 킬레이트된 금속, 나노입자, 및 리포터 기, 예를 들어 형광 화합물 또는 NMR 또는 ESR 분광법에 의해 검출될 수 있는 화합물을 포함한다.
- [0188] 이펙터 분자의 예는 세포에 해로운(예를 들어, 세포를 사멸시키는) 임의의 제제를 포함하는 세포 독소 또는 세포 독성제를 포함할 수 있다. 예는 콤프레스타틴, 돌라스타틴, 에포틸론, 스타우로스포린, 메이탄시노이드, 스폰지스타틴, 리족신, 할리콘드린, 로리딘, 헤미아스틸린, 택솔, 시토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티디움 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드로록신 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-디히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 및 퓨로마이신 및 이들의 유사체 또는 상동체를 포함한다.
- [0189] 이펙터 분자는 또한 대사길항제(예를 들어, 메토크세이트, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 데카바진), 알킬화제(예를 들어, 메클로르에타민, 티오에프, 클로람부실, 멜팔란, 카무스틴(BSNU) 및 로무스틴(CCNU), 시클로토스파미드, 부설판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 및 시스-디클로로디아민 백금(II)(DDP), 시스플라틴), 안트라사이클린(예를 들어, 다우노루비신(이전에 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제(예를 들어, 악티노마이신(이전에 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신, 안트라마이신(AMC), 칼리케아미신 또는 두오카마이신), 및 유사분열 억제제(예를 들어, 빈크리스틴 및 빈블라스틴)를 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0190] 기타 이펙터 분자는 킬레이트된 방사성 핵종 예를 들어 ^{111}In 및 ^{90}Y , ^{177}Lu , 비스무트 ^{213} , 칼리포르늄 ^{252} , 이리듐 ^{192} 및 텅스텐 ^{188} /레늄 ^{188} ; 또는 약물 예를 들어, 그러나 이에 제한되지 않는, 알킬포스포콜린, 토포이소머라아제 I

억제제, 텍소이드 및 수라민을 포함할 수 있다.

- [0191] 기타 이펙터 분자는 단백질, 펩티드 및 효소를 포함한다. 관심 효소는 단백질 분해 효소, 히드롤라아제, 라이아제, 이소머라아제, 트랜스퍼라아제를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 관심의 단백질, 폴리펩티드 및 펩티드는 면역글로불린, 독소, 예를 들어 아브린, 리신 A, 슈도모나스 외독소, 또는 디프테리아 독소, 단백질, 예를 들어 인슐린, 중앙 피사 인자, α -인터페론, β -인터페론, 신경 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 또는 조직 플라스미노겐 활성화 인자, 혈전증 제제 또는 항신생혈관계, 예를 들어 안지오프로테아제 또는 엔도스타틴 또는 생체반응 조절 인자, 예를 들어 림포카인, 인터류킨-1(IL-1), 인터류킨-2(IL-2), 과립구 대식구 집락 자극 인자(GM-CSF: granulocyte macrophage colony stimulating factor), 과립구 집락 자극 인자(G-CSF: granulocyte colony stimulating factor), 신경 성장 인자(NGF: nerve growth factor) 또는 기타 성장 인자 및 면역글로불린을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0192] 기타 이펙터 분자는, 예를 들어 진단에, 유용한 검출 가능한 물질을 포함할 수 있다. 검출 가능한 물질의 예는 여러 효소, 보결 분자단, 형광 물질, 발광 물질, 생물 발광 물질, 방사성 핵종, 양전자 방사 금속(양전자 방사 단층 촬영용), 및 비방사성 상자성 금속 이온을 포함한다. 일반적으로 진단법으로 사용하기 위한 항체에 접합될 수 있는 금속에 대해 US4,741,900호를 참조한다. 적합한 효소는 거자무 페록시다아제, 알칼리 포스파타아제, 베타-갈락토시다아제, 또는 아세틸콜린에스테라아제를 포함하고; 적합한 보결 분자단은 스트렙타비딘, 아비딘 및 비오틴을 포함하고; 적합한 형광 물질은 옴벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트라이아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 및 피코에리트린을 포함하고; 적합한 발광 물질은 루미놀을 포함하고; 적합한 생물 발광 물질은 루시페라아제, 루시페린, 및 에쿠오린을 포함하고; 적합한 방사성 핵종은 ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In 및 ^{99}Tc 를 포함한다.
- [0193] 또 다른 예로, 이펙터 분자는 생체 내에서 항체의 반감기를 증가시키고/거나 항체의 면역원성을 감소시키고/거나 상피 장벽을 통과하여 면역계의 항체 전달을 향상시킬 수 있다. 상기 유형의 적합한 이펙터 분자의 예는 중합체, 알부민, 알부민 결합 단백질 또는 알부민 결합 화합물, 예를 들어 W005/117984호에 기재된 것들을 포함한다.
- [0194] 이펙터 분자가 중합체일 경우, 이는 일반적으로 합성 또는 자연에 존재하는 중합체, 예를 들어 경우에 따라 치환된 직쇄 또는 분지쇄 폴리알킬렌, 폴리알케닐렌 또는 폴리옥시알킬렌 중합체 또는 분지형 또는 비분지형 다당류, 예를 들어 호모- 또는 헤테로-다당류일 수 있다.
- [0195] 상기에 언급된 합성 중합체에 존재할 수 있는 경우에 따른 구체적인 치환기는 하나 이상의 히드록시, 메틸, 또는 메톡시 기를 포함한다.
- [0196] 합성 중합체의 구체적인 예는 경우에 따라 치환된 직쇄 또는 분지쇄 폴리(에틸렌글리콜), 폴리(프로필렌글리콜), 폴리(비닐알코올) 또는 이들의 유도체, 특히 경우에 따라 치환된 폴리(에틸렌글리콜) 예를 들어 메톡시폴리(에틸렌글리콜) 또는 이들의 유도체를 포함한다. 자연에 존재하는 구체적인 중합체는 락토오스, 아밀로오스, 텍스트란, 글리코젠 또는 이들의 유도체를 포함한다.
- [0197] 본원에서 사용되는 "유도체"는 반응성 유도체, 예를 들어 티올 선택적인 반응성 기, 예를 들어 말레이미드 등을 포함하고자 한다. 반응성 기는 중합체에 직접 또는 링커 분절을 통해 결합될 수 있다. 상기 기의 잔기는 일부 경우에 본 개시의 항체와 중합체 사이에 연결 기로서 산물의 일부를 형성할 것이라는 것을 이해할 것이다.
- [0198] 중합체의 크기는 바라는 바에 따라 달라질 수 있으나, 일반적으로 500Da 내지 50000Da, 예를 들어 5000 내지 40000Da 예를 들어 20000 내지 40000Da의 평균 분자량 범위에 있을 것이다. 중합체 크기는 특히 산물의 의도되는 용도, 예를 들어 종양과 같은 특정 조직에 국소화하거나 순환 반감기를 연장하는 능력을 기준으로 하여 선택될 수 있다(리뷰를 위해 문헌(Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 531-545) 참조). 따라서, 예를 들어, 산물이, 예를 들어 종양 치료에 사용하기 위해, 순환을 떠나 조직에 침투하고자 하는 경우, 분자량이 적은 중합체, 예를 들어 대략 5000Da의 분자량을 갖는 중합체를 사용하는 것이 유리할 수 있다. 산물이 순환에 남아 있는 용도일 경우, 고분자량 중합체, 예를 들어 20000Da 내지 40000Da 범위의 분자량을 갖는 중합체를 사용하는 것이 유리할 수 있다.
- [0199] 적합한 중합체는 폴리알킬렌 중합체, 예를 들어 폴리(에틸렌글리콜) 또는, 특히, 메톡시폴리(에틸렌글리콜) 또는 이들의 유도체, 특히 약 15000Da 내지 약 40000Da 범위의 분자량을 갖는 것들을 포함한다.
- [0200] 일례로, 본 발명에 사용하기 위한 항체는 폴리(에틸렌글리콜)(PEG) 모이어티에 부착된다. 구체적인 일례로, PEG

분자는 항체에 위치한 임의의 이용 가능한 아미노산 측쇄 또는 말단 작용기, 예를 들어 임의의 유리 아미노, 이미노, 티올, 히드록실 또는 카복실 기를 통해 부착될 수 있다. 상기 아미노산은 항체에 자연적으로 존재할 수 있거나 재조합 DNA 방법을 이용하여 항체에 조작될 수 있다(예를 들어 US5,219,996호; US5,667,425호; WO98/25971호 참조). 일례로, 본 발명의 분자는 변형된 항체이며, 이때 변형은 이펙터 분자의 부착을 가능하게 하는 이의 중쇄의 C-말단에 하나 이상의 아미노산의 첨가이다. 여러 부위를 이용하여 2개 이상의 PEG 분자를 부착할 수 있다. 한 실시양태에서, PEG 분자는 경쇄의 시스테인 171에 결합되며, 예를 들어 본원에 참고로 포함된 WO2008/038024호를 참조한다.

- [0201] 적합하게는, PEG 분자는 항체에 위치한 적어도 하나의 시스테인 잔기의 티올 기를 통해 공유적으로 결합된다. 변형된 항체에 부착된 각 중합체 분자는 항체에 위치한 시스테인 잔기의 황 원자에 공유적으로 결합될 수 있다. 공유 결합은 일반적으로 디설파이드 결합 또는, 특히, 황-탄소 결합일 것이다. 티올 기가 부착 지점으로서 사용될 경우, 적합하게 활성화된 이펙터 분자, 예를 들어 티올 선택적인 유도체, 예를 들어 말레이미드 및 시스테인 유도체가 사용될 수 있다. 활성화된 중합체는 상기에 기재된 중합체 변형된 항체의 제조에서 출발 물질로서 사용될 수 있다. 활성화된 중합체는 티올 반응성 기를 포함하는 임의의 중합체, 예를 들어 α-할로카복실 산 또는 에스테르, 예를 들어 요오도아세타미드, 이미드, 예를 들어, 말레이미드, 비닐 설폰 또는 디설파이드일 수 있다. 이러한 출발 물질은 시중에서 구입할 수 있거나(예를 들어 이전에 쉐어 워터 폴리머스(Shearwater Polymers Inc., 미국 알라바마주 헨츠빌 소재)인 넥타(Nektar)로부터) 통상의 화학 절차를 이용하여 시판되는 출발 물질로부터 제조될 수 있다. 구체적인 PEG 분자는 20K 메톡시-PEG-아민(이전에 쉐어워터인 넥타; 랩 폴리머(Rapp Polymere); 및 선바이오(SunBio)로부터 구입 가능) 및 M-PEG-SPA(이전에 쉐어워터인 넥타로부터 구입 가능)를 포함한다.
- [0202] 한 실시양태에서, 방법은 인간에 사용하기에 적합한 약학 제제로서 항체 또는 결합 단편을 비롯한 이의 접합된 형태를 제제화하기 위한 추가의 단계를 포함한다.
- [0203] 따라서 본 개시는 또한 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 부형제, 희석제 또는 담체와 함께 본 개시의 공정으로부터 얻은 항체 분자를 첨가 및 혼합하는 단계를 포함하는 약학 또는 진단 조성물의 제조를 위한 공정 단계를 제공한다.
- [0204] 항체 분자는 약학 또는 진단 조성물 내 유일한 활성 성분일 수 있거나 기타 항체 성분, 예를 들어 항-TNF, 항-IL-1β, 항-T 세포, 항-IFNγ 또는 항-LPS 항체, 또는 크산틴과 같은 비-항체 성분을 포함한 기타 활성 성분을 수반할 수 있다. 기타 적합한 활성 성분은 관용(tolerance)을 유도할 수 있는 항체, 예를 들어, 항-CD3 또는 항-CD4 항체를 포함한다.
- [0205] 또 다른 실시양태에서, 본 개시에 따른 항체 분자 또는 조성물은 추가의 약학 활성제, 예를 들어 코르티코스테로이드(예를 들어, 플루티카소나아제 프로피오네이트) 및/또는 베타-2-작용제(예를 들어, 살부타몰, 살메테롤 또는 포르모테롤) 또는 세포 성장 및 증식의 억제제(예를 들어, 라파마이신, 시클로포스파미드, 메토트렉세이트) 또는 그 밖에 CD28 및/또는 CD40 억제제와 함께 이용된다. 한 실시양태에서, 억제제는 소분자이다. 또 다른 실시양태에서, 억제제는 표적에 특이적인 항체이다.
- [0206] 약학 조성물은 적합하게는 치료 유효량의 항체 분자를 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "치료 유효량"은 표적화된 질환 또는 병태를 치료, 개선 또는 예방하거나 검출 가능한 치료 또는 예방 효과를 나타내는데 필요한 치료제의 양을 언급한다. 치료 유효량은 처음에 세포 배양 분석 또는 동물모델, 대개는 설치류, 토끼, 개, 돼지 또는 영장류에서 평가될 수 있다. 또한, 동물 모델은 적합한 농도 범위 및 투여 경로를 결정하는데 사용될 수 있다. 그 후 상기 정보는 인간에서 투여하기에 유용한 용량 및 경로를 결정하는데 이용될 수 있다.
- [0207] 인간 피험체에 정확한 치료 유효량은 질환 상태의 중증도, 피험체의 일반적인 건강, 피험체의 나이, 체중 및 성별, 식습관, 투여 시간 및 빈도, 약물 조합(들), 반응 민감도 및 요법에 대한 관용/반응에 따라 결정될 것이다. 상기 양은 통상적인 실험에 의해 결정될 수 있고, 임상치의 판단 안에 있다. 일반적으로 치료 유효량은 0.01 mg/kg 내지 50 mg/kg, 예를 들어 0.1 mg/kg 내지 20 mg/kg일 것이다. 약학 조성물은 투여당 본 발명의 활성제의 예정된 양을 포함하는 단위 제형으로 편리하게 제공될 수 있다.
- [0208] 조성물은 환자에게 개별적으로 투여될 수 있거나 기타 제제, 약물 또는 호르몬과 함께(동시에, 순차적으로 또는 별개로) 투여될 수 있다.
- [0209] 항체 분자가 투여되는 용량은 치료되는 병태의 특성, 예를 들어 존재하는 질환/염증의 정도 및 분자가 예방적으로 또는 기존의 병태를 치료하는데 사용되고 있는지에 따라 결정된다.

- [0210] 투여 빈도는 항체 분자의 반감기 및 이의 효과 기간에 따라 결정될 것이다. 항체가 짧은 반감기(예를 들어, 2 내지 10시간)를 가질 경우 하루에 1회 이상의 투여를 제공하는 것이 필요할 수 있다. 대안적으로, 항체가 긴 반감기(예를 들어, 2 내지 15일)를 가질 경우 단지 하루에 1회, 1주에 1회 또는 심지어 1 또는 2개월 마다 1회 투여를 제공하는 것이 필요할 수 있다.
- [0211] 약학적으로 허용 가능한 담체는 그 자체가 조성물을 받은 개체에게 해로운 항체의 생산을 유도해서는 안 되며 독성이 없어야 한다. 적합한 담체는 크고, 서서히 대사되는 거대 분자, 예를 들어 단백질, 폴리펩티드, 리포솜, 다당류, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 중합체 아미노산, 아미노산 공중합체 및 불활성 바이러스 입자일 수 있다.
- [0212] 약학적으로 허용 가능한 염, 예를 들어 무기산 염, 예를 들어 염산염, 브롬화수소산염, 인산염 및 황산염 또는 유기산 염, 예를 들어 아세트산염, 프로피온산염, 말론산염 및 벤조산염이 사용될 수 있다.
- [0213] 치료 조성물 내 약학적으로 허용 가능한 담체는 추가로 액체, 예를 들어 물, 식염수, 글리세롤 및 에탄올을 포함할 수 있다. 추가로, 보조 성분, 예를 들어 습윤제 또는 유화제 또는 pH 완충 성분이 상기 조성물에 존재할 수 있다. 상기 담체는 약학조성물이 인간의 섭취용 정제, 환제, 드라제, 캡슐, 액체, 젤, 시럽, 슬러리 및 현탁액으로 제제화되도록 할 수 있다.
- [0214] 투여에 적합한 형태는, 예를 들어, 주사 또는 주입, 예를 들어 볼러스 주사 또는 연속 주입에 의한, 비경구 투여에 적합한 형태를 포함한다. 산물이 주사 또는 주입용일 경우, 이는 유성 또는 수성 비히클 내 현탁액, 용액, 또는 유탁액의 형태를 취할 수 있고 이는 제제화 제제, 예를 들어 현탁제, 방부제, 안정화제, 및/또는 분산제를 포함할 수 있다. 대안적으로, 본 개시의 분자는 적합한 멸균 액체와 사용 전에 재구성을 위한 건조 형태일 수 있다.
- [0215] 일단 제제화되면, 본 발명의 조성물은 피험체에 직접 투여될 수 있다. 치료받는 피험체는 동물일 수 있다. 그러나 하나 이상의 실시양태에서, 조성물은 인간 피험체에 투여하기에 적합하다.
- [0216] 본 개시에 따른 제제에서 적합하게는, 최종 제제의 pH는 항체의 등전점 값과 유사하지 않다. 예를 들어 제제의 pH가 7이면, pI는 8-9 이상이 적합할 수 있다. 이론에 얽매이지 않는 것이 아니더라도, 이는 궁극적으로 안정성이 향상된, 예를 들어 항체가 용액에 남아 있는, 최종 제제를 제공할 수 있다고 생각된다.
- [0217] 본 개시의 약학 조성물은 경구, 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 척수 내, 경막 내, 뇌실 내, 피부통과, 경피(예를 들어, W098/20734호 참조), 피하, 복강 내, 비 내, 장관, 국소, 설하, 질 내 또는 직장 경로를 포함하는, 그러나 이에 제한되지 않는, 여러 경로에 의해 투여될 수 있다. 또한, 하이포스프레이(Hypospray)가 본 발명의 약학 조성물을 투여하는데 사용될 수 있다. 전형적으로, 치료 조성물은 액체 용액 또는 현탁액으로서 주사 가능하게 제조될 수 있다. 또한, 주사 전에 액체 비히클 내 용액 또는 현탁액에 적합한 고체 형태가 제조될 수 있다.
- [0218] 조성물의 직접 전달은 일반적으로 피하, 복강 내, 정맥 내, 또는 근육 내 투여에 의해 수행되거나 조직의 간질 공간에 전달될 것이다. 또한, 조성물은 병변에 투여될 수 있다. 투여 치료는 단일 투여 일정 또는 다회 투여 일정일 수 있다.
- [0219] 조성물 내 활성 성분이 항체 분자일 것임을 인정할 것이다. 그래서 이는 위장관에서 분해되기 쉬울 것이다. 따라서, 조성물이 위장관을 이용한 경로에 의해 투여되어야 하는 경우, 조성물은 분해로부터 항체 분자를 보호하지만 일단 위장관으로부터 흡수되면 항체를 방출하는 제제를 포함할 필요가 있을 것이다.
- [0220] 약학적으로 허용 가능한 담체에 대한 완전한 논의는 문헌(Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Publishing Company, 뉴저지주 소재. 1991))에서 이용 가능하다.
- [0221] 한 실시양태에서, 제제는 흡입을 포함한 국소 투여용 제제로서 제공된다.
- [0222] 적합한 흡입 가능한 제제는 흡입 가능한 분말, 압축가스를 포함한 계량 에어로졸 또는 압축가스가 없는 흡입 가능한 용액을 포함한다. 활성 성분을 포함하는 본 개시에 따른 흡입 가능한 분말은 상기에 언급한 활성 성분만으로 이루어지거나 생리학적으로 허용 가능한 부형제와 상기 언급한 활성 성분의 혼합물로 이루어질 수 있다.
- [0223] 상기 흡입 가능한 분말은 단당류(예를 들어, 글루코오스 또는 아리비노오스), 이당류(예를 들어, 락토오스, 사카로오스, 말토오스), 올리고당류 및 다당류(예를 들어, 텍스트란), 다가알코올(예를 들어, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨), 염(예를 들어, 염화나트륨, 탄산칼슘) 또는 이들 서로의 혼합물을 포함할 수 있다. 단당류 또는 이당류가 적합하게 사용되며, 락토오스 또는 글루코오스는 특히 그러나 비독점적으로 이들의 수화물 형태로 사용될 수 있다.

- [0224] 폐에서 침착을 위한 입자는 10 마이크론 미만, 예를 들어 1-9 마이크론, 예를 들어 0.1 내지 5 μm , 특히 1 내지 5 μm 의 입자 크기를 필요로 한다. 활성 성분(예를 들어 항체)의 입자 크기가 가장 중요하다.
- [0225] 흡입 가능한 에어로졸을 제조하는데 사용될 수 있는 압축가스는 당 업계에 공지되어 있다. 적합한 압축가스는 탄화수소, 예를 들어 n-프로판, n-부탄 또는 이소부탄 및 할로탄화수소, 예를 들어 메탄, 에탄, 프로판, 부탄, 시클로프로판 또는 시클로부탄의 염소화 및/또는 플루오르화 유도체 중에서 선택된다. 상기에 언급된 압축가스는 이들 자신 또는 이들의 혼합물로 사용될 수 있다.
- [0226] 특히 적합한 압축가스는 TG 11, TG 12, TG 134a 및 TG227 중에서 선택된 할로겐화 알칸 유도체이다. 상기에 언급된 할로겐화 탄화수소 중에서, TG134a(1,1,1,2-테트라플루오로에탄) 및 TG227(1,1,1,2,3,3,3-헵타플루오로프로판) 및 이들의 혼합물이 특히 적합하다.
- [0227] 압축가스를 포함한 흡입 가능한 에어로졸은 또한 기타 성분, 예를 들어 보조 용매, 안정화제, 표면 활성제(계면 활성제), 향산화제, 윤활제 및 pH 조절을 위한 수단을 포함할 수 있다. 상기 모든 성분은 당업계에 공지되어 있다.
- [0228] 본 발명에 따른 압축가스를 포함한 흡입 가능한 에어로졸은 활성 성분의 5 중량%까지 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 에어로졸은, 예를 들어, 활성 성분의 0.002 내지 5 중량%, 0.01 내지 3 중량%, 0.015 내지 2 중량%, 0.1 내지 2 중량%, 0.5 내지 2 중량% 또는 0.5 내지 1 중량%를 포함한다.
- [0229] 대안적으로, 폐에 국소 투여는 또한, 예를 들어 장치, 예를 들어 네블라이저, 예를 들어 압축기가 연결된 네블라이저(예를 들어, 파리 레스피레이토리 이큅먼트(Pari Respiratory Equipment, Inc., 버지니아주 리치몬드 소재)가 제조한 파리 마스터(Pari Master)(R) 압축기에 연결된 파리 LC-젯 플러스(Pari LC-Jet Plus)(R) 네블라이저)를 이용한, 액체 용액 또는 현탁액 제제의 투여에 의해 이루어질 수 있다.
- [0230] 본원의 방법으로부터 얻은 항체 또는 결합 단편은 용매에, 예를 들어 용액 또는 현탁액의 형태로 분산되어 전달될 수 있다. 이는 적합한 생리용액, 예를 들어, 식염수 또는 기타 약학적으로 허용 가능한 용매 또는 완충액에 현탁될 수 있다. 당 업계에 공지된 완충액은 물 1mL당 0.05 mg 내지 0.15 mg 에데테이트 이나트륨, 8.0 mg 내지 9.0 mg NaCl, 0.15 mg 내지 0.25 mg 폴리소르베이트, 0.25 mg 내지 0.30 mg 무수 시트르산, 및 0.45 mg 내지 0.55 mg 시트르산 나트륨을 포함하여 약 4.0 내지 5.0의 pH를 달성할 수 있다. 현탁액은 예를 들어 동결건조된 분자를 이용할 수 있다.
- [0231] 또한, 치료 현탁액 또는 용액 제제는 하나 이상의 부형제를 포함할 수 있다. 부형제는 당 업계에 잘 알려져 있으며 완충제(예를 들어, 시트르산 완충제, 인산 완충제, 아세트산 완충제, 및 중탄산 완충제), 아미노산, 요소, 알코올, 아스코르브산, 인지질, 단백질(예를 들어, 혈청 알부민), EDTA, 염화나트륨, 리포솜, 만니톨, 소르비톨, 및 글리세롤을 포함한다. 용액 또는 현탁액은 리포솜 또는 생체 분해성 미세소구에 캡슐화될 수 있다. 제제는 일반적으로 멸균 제조 공정을 이용하여 실질적으로 멸균 형태로 제공될 것이다.
- [0232] 이는 당 업자에게 익숙한 방법에 의해서, 생산, 및 제제에 사용되는 완충 용매/용액의 여과에 의한 멸균, 멸균 완충 용매 용액에 분자의 무균 현탁, 및 멸균 용기에 제제의 분산을 포함한다.
- [0233] 본 개시에 따른 네블라이저 이용 가능한 제제는 예를 들어 포일 봉투에 포장된 단일 투여 단위(예를 들어, 밀봉된 플라스틱 용기 또는 바이알)로 제공될 수 있다. 각 바이알은 부피, 예를 들어, 2 mL의 용매/용액 완충액에 단위 용량을 포함한다.
- [0234] 본 명세서의 문맥에서 포함(Comprising)은 포함(including)을 의미하고자 한다. 기술적으로 적절한 경우, 본 발명의 실시양태가 조합될 수 있다. 본원에서 긍정적으로 나열된 임의의 실시양태는 부정적인 권리포기의 근거로서 이용될 수 있다.
- [0235] 본 발명은 하기 실시예를 참고로 하여 기재될 것이며, 이는 단지 예시적이며 어떤 식으로 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.
- [0236] **실시예 1: 단백질 A 정제된 Fab-dsFv 다량체 중의 열적 전환**
- [0237] **A26Fab-dsFv의 CHO 발현 및 정화**
- [0238] 경쇄 서열 A26 Fab Light-(3xG4S)-645dsFv(gL4)(서열 번호 16) 및 중쇄 서열 A26 Fab Heavy-(G4S,G4T,G4S)-645dsFv(gH5)(서열 번호 15)를 가지며 인간 OX40 및 혈청 알부민에 결합하는 구조물을 안정한 디히드로엽산 환원효소(DHFR: dihydrofolate reductase) 결핍 중국 햄스터 난소 세포주(CHO DG44)에서 발현하였다. 이는 선택

마커로서 DHFR의 유전자 및 산물을 코딩하는 유전자 둘 다를 포함하는 플라스미드 벡터로 뉴클레오펙터(Nucleofector)(Lonza)를 이용하여 제조사의 설명에 따라 형질감염시켜 생성하였다. 형질감염된 세포는 히포크산틴 및 티미딘이 결여된 배지에서 DHFR 억제제 메토틱세이트의 존재하에서 선별하였다.

[0239] 세포주는 접종 단계 전체에 걸쳐 20nM 메토틱세이트를 포함하는 배지에서 배양하였다. 그 후 세포는 메토틱세이트 없이 배양한다. 최종 배양 단계 경우, 세포는 80L 스테인레스 스틸 생물반응기에서 메토틱세이트 없는 배지에서 14일간 배양하였다. 상등액의 정화는 원심분리(4000 x g, 60분간, 실온)한 후 침층(depth) 멸균 여과를 통해 수행하였다.

[0240] 포유동물 발현된 A26Fab-645dsFv의 단백질 A 정제

[0241] 정화된 CHO 상등액은 돌베코(Delbeccos) 인산 완충 식염수(PBS: Phosphate Buffered Saline) pH 7.4에 평형화된 9.4 ml 하이스크린(HiScreen)(연속 2개 컬럼) 맵셀렉트(GE Healthcare)에 적용하였다. 컬럼은 PBS로 세척하고 결합된 물질은 0.1M 시트르산염 pH 3.5로 용리하였다. 수집된 용리 피크는 pH를 2M 트리스/HCl pH 8.5를 이용하여 ~pH 7로 조정하였다. pH 조정된 용리물은 10kDa 분자량 컷오프 원심분리 농축기를 이용하여 PBS pH 7.4로 완충액을 교환하였다.

[0242] A26Fab-645dsFv의 일반적인 방법을 이용한 비환원 SDS-PAGE 분석

[0243] 샘플은 50 μ l의 최종 부피에 필요에 따라 1.0mg/ml로 희석한 후 5 μ l의 100mM NEM을 첨가하였다. 그 후 샘플은 50 μ l의 노벡스(Novex) 트리스-글리신 SDS 샘플 완충액(2x)으로 희석하고 볼텍스한 후 95 $^{\circ}$ C에서 3분간 인큐베이션하였다. 제조된 샘플은 4-20% 아크릴아민 트리스/글리신 SDS 겔에 웰당 5 μ g으로 로딩하고 150V에서 일정한 전압으로 120분간 이동시켰다.

[0244] A26Fab-645dsFv의 일반적인 방법을 이용한 환원 SDS-PAGE 분석

[0245] 샘플은 최종 부피 50 μ l의 환원제에 필요에 따라 1.0mg/ml로 희석하였다. 그 후 샘플은 50 μ l의 노벡스 트리스-글리신 SDS 샘플 완충액(2x)으로 희석하고 볼텍스한 후 95 $^{\circ}$ C에서 3분간 인큐베이션하였다. 제조된 샘플은 4-20% 아크릴아민 트리스/글리신 SDS 겔에 웰당 5 μ g 단백질로 로딩하고 150V에서 일정한 전압으로 120분간 이동시켰다. 겔은 쿠마시 블루(Coomassie Blue) 단백질 염료로 염색하였으며, [도 2 및 12]를 참조한다.

[0246] A26Fab-645dsFv의 G3000 SEC-HPLC 분석을 위한 일반적인 방법

[0247] 50 μ g 샘플은 TSK 겔 G3000SWXL, 7.8x300mm, 컬럼(Tosoh)에 주입하고 200mM 인산염 pH 7.0의 등용매 구배로 분당 1ml로 전개하였다. 신호 검출은 280nm에서의 흡광도에 의하였으며, [도 9, 10, 13 및 14]를 참조한다. SEC-HPLC 분석을 이용하여 % 단량체(A26Fab-645dsFv 단량체는 9분가량의 체류 시간을 가짐)뿐 아니라 전환 공정의 수율을 예측하는 방법을 둘 다 결정하였다. 전환 공정에 예측된 수율은 임의의 특정 시점에서 총 피크 면적을 T=0에서 총 피크 면적의 퍼센트로서 표현하여 계산하였다.

[0248] 일정한 환원제 농도에서의 단백질 A 정제된 A26Fab-645dsFv의 열적 전환

[0249] ~5mg/ml의 단백질 A 정제된 A26Fab-645dsFv는 PBS/100mM bMEA(β -머캅토에틸아민)의 전환 완충액에 1:1로 희석하여 결과적으로 50mM의 최종 bMEA 농도를 얻었다. 희석 후, 샘플은 정해진 온도에서 인큐베이션하였다. 시간 경과 중에 취한 샘플은 얼음에 놓고 온도를 낮추고 전환 공정을 정지시킨 후 분석하였다. 분석은 SEC-HPLC에 의하였으며 단량체 수준 및 수율 예측 값을 결정하였다.

[0250] 단량체 수준은 상승된 모든 온도에서 증가하는 것으로 나타났지만 전환율은 더 높은 온도에서 상당히 더 빨랐다. 온도가 증가했을 때와 대조적으로 예측 수율은 감소하는 것으로 나타났다. 단량체의 총 수율(순 회수율)을 계산하기 위해서 퍼센트 단량체 수준을 100으로 나누고 예측 수율을 곱하였다. 데이터는 [도 3, 4, 및 5] 및 표 1-3에 요약한다.

[0251] $\geq 55^{\circ}$ C의 인큐베이션 온도에서 순 회수율은 상대적으로 짧은 인큐베이션 시간 후에 감소된다. $\leq 50^{\circ}$ C에서 순 회수율은 전체 평가된 시간 경과에 걸쳐 계속하여 증가한다. 순 회수율은 50° C가 50mM bMEA에서 최적으로 보이면서 $45-50^{\circ}$ C에서 상당히 더 높다.

표 1

총 단량체 - 50mM bMEA 로 전환

	시간(hr)								
	0	0.5	1	2	3	4	5	20	44
37°C	27.6	28.37	29.49	30.85	31.98	32.86	33.63	40.09	
45°C	27.6	29.46	31.12	33.51	35.62	37.39	39.11	53.00	61.01
50°C	27.6	31.48	35.95	42.18	47.2	50.6	52.98	70.84	74.29
55°C	27.6	35.94	44.49	56.76	64.04	68.71	72.68	85.74	
60°C	27.6	72.03	78.79	81.92					

[0252]

표 2

예측 수율 - 50mM bMEA 로 전환

	시간(hr)								
	0	0.5	1	2	3	4	5	20	44
37°C	100.0	100.1	100.3	100.0	99.3	99.4	99.9	100.8	
45°C	100.0	99.5	99.4	100.7	100.1	99.7	101.0	99.6	99.3
50°C	100.0	99.8	98.5	97.5	95.7	94.7	95.4	86.8	87.0
55°C	100.0	100.4	95.6	86.3	80.0	76.1	72.9	55.8	
60°C	100.0	57.3	50.6	44.1					

[0253]

표 3

순 회수율 - 50mM bMEA 로 전환

	시간(hr)								
	0	0.5	1	2	3	4	5	20	44
37°C	27.6	28.4	29.6	30.9	31.8	32.7	33.6	40.4	
45°C	27.6	29.3	30.9	33.7	35.7	37.3	39.5	52.8	60.6
50°C	27.6	31.41	35.41	41.14	45.16	47.94	50.52	61.5	64.7
55°C	27.6	36.08	42.52	48.97	51.3	52.27	52.99	47.86	
60°C	27.6	41.3	39.85	36.14					

[0254]

[0255] 일정한 온도에서의 단백질 A 정제된 A26Fab-645dsFv의 열적 전환

[0256] ~5mg/ml의 단백질 A 정제된 A26Fab-645dsFv는 PBS 중에 언급한 bMEA 농도(1, 5, 10, 20, & 50mM)의 2x 저장액 인 전환 완충액에 1:1로 희석하였다. 희석 후, 샘플은 50°C에서 인큐베이션하였다. 시간 경과 중에 취한 샘플은 얼음에 놓고 온도를 낮추고 전환 공정을 정지시킨 후 분석하였다. 분석은 SEC-HPLC에 의하였으며 단량체 수준 및 수율 예측 값을 결정하였다. 데이터는 [도 6, 7, 및 8] 및 표 4, 5, 및 6에 요약한다.

[0257] 전환율은 bMEA의 농도 증가에 따라 증가하였다. 순 회수율은 ≥20시간에서 ~65% 단량체로 정체기를 이루었다. 감소된 농도의 bMEA는 시간 경과에 따라 단량체 수준에서 더 점진적인 증가를 보였으며, 1mM bMEA에서는 증가가 거의 또는 전혀 관찰되지 않았다.

표 4

총 단량체 - 50°C 및 언급된 bMEA 농도에서 전환

	시간(hr)					
	0	1.5	5	21	28	47
1mM bMEA	27.6	27.8	28.2	30.1	30.3	31.0
5mM bMEA	27.6	29.7	33.4	40.0	41.4	42.8
10mM bMEA	27.6	32.3	39.2	49.2	51.1	54.2
20mM bMEA	27.6	35.3	44.0	59.1	61.7	66.1
50mM bMEA	27.6	41.1	52.9	74.7	76.7	79.4

[0258]

표 5

예측 수율- 50°C 및 언급된 bMEA 농도에서 전환

	시간(hr)					
	0	1.5	5	21	28	47
1mM bMEA	100.0	99.8	99.4	99.3	98.6	98.7
5mM bMEA	100.0	99.8	98.9	97.8	98.4	100.4
10mM bMEA	100.0	99.3	98.4	96.3	95.0	95.2
20mM bMEA	100.0	97.6	95.8	93.3	92.3	91.0
50mM bMEA	100.0	98.0	93.8	85.4	84.7	81.9

[0259]

표 6

순 회수율- 50°C 및 언급된 bMEA 농도에서 전환

	시간(hr)					
	0	1.5	5	21	28	47
1mM bMEA	27.6	27.7	28.0	29.9	29.9	30.6
5mM bMEA	27.6	29.6	33.1	39.1	40.7	42.9
10mM bMEA	27.6	32.1	38.6	47.4	48.6	51.6
20mM bMEA	27.6	34.5	42.2	55.1	57.0	60.2
50mM bMEA	27.6	40.2	49.6	63.8	65.0	65.0

[0260]

[0261] 실시예 2: 정화된 포유동물 세포 배양 상등액 중의 Fab-dsFv 다량체 중의 열적 전환

[0262] 포유동물 세포 배양 상등액에서 A26Fab-645dsFv의 열적 전환

[0263] 정화된 세포 배양 상등액은 10kDa 분자량 컷오프 원심분리 농축기를 이용하여 본래 부피의 절반으로 농축하였다. 그 후 농축된 상등액은 PBS/100mM bMEA를 이용하여 본래 부피로 희석하여 50mM의 최종 bMEA 농도를 얻었다. 그 후 상등액을 50°C에서 하룻밤(14.5시간) 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 상등액은 얼음에 놓고 온도를 낮추고 전환 공정을 정지시켰다.

[0264] 열적 전환 후 포유동물 세포 배양 상등액으로부터의 A26Fab-645dsFv의 단백질 A 정제

[0265] 열적 전환된 CHO 상등액은 둘베코 인산 완충 식염수(PBS) pH 7.4에서 평형화된 9.4 ml 하이스크린(연속 2개 컬럼) 맵셀렉트(GE Healthcare)에 적용하였다. 컬럼은 PBS로 세척하고 결합된 물질은 0.1M 시트르산염 pH 3.5로 용리하였다. 용리 피크를 수집하고 pH를 2M 트리스/HCl pH 8.5를 이용하여 ~pH 7로 조정하였다. 대조군으로서 전환되지 않은 CHO를 이용하여 정제를 반복하였다. pH 중화된 단백질 A 용리물은 G3000-HPLC(표 7) 및 비환원 및 환원 조건 하의 SDS-PAGE에 의해 분석하였다(도 11 및 12). 용리 pH는 다량체 종이 컬럼에 결합된 채 남아 있으면서 FabFv 단량체의 용리를 가능하게 한다고 확인되었다. 상등액 전환 공정을 반복하고 9.4ml 하이스크린

컬럼에 적용하고 용리 조건(0.1M 시트르산염 pH 3.8)을 이용하여 용리하였다. 또한, 동일한 로딩 용량으로 로딩된 전환되지 않은 상등액의 대조군 이동을 수행하였다. 용리 피크를 수집하고 pH를 2M 트리스/HCl pH 8.5를 이용하여 ~pH 7로 조정하였다. pH 중화된 단백질 A 용리물은 G3000-HPLC(도 13 및 14) 분석 및 A280(표 8)에 의해 분석하였다. pH 3.5에서 용리될 때 비슷한 회수율을 보인 전환된 물질로부터 상당히 더 높은 단량체 수준이 관찰되었다. SEC-HPLC에 의해 분석할 때 전환되거나 되지 않은 상등액 둘 다로부터의 산물 품질은 pH 3.8 용리와 비슷하지만 전환 후에 단백질의 양의 상당한 증가가 관찰되었다.

표 7

샘플	% 단량체	단백질 (mg)
단백질 A 용리 - 전환 후	67.1	14.1
단백질 A 용리 - 전환하지 않음	38.6	14.9

[0266]

표 8

샘플	% 단량체	단백질 (mg)
pH 3.8 에서 단백질 A 용리 - 전환 후	97.9	9.0
pH 3.8 에서 단백질 A 용리 - 전환하지 않음	98.5	4.9

[0267]

실시예 3: 여러 매개변수의 효과에 대한 조사

본 실험에 사용된 공급 항체는 A26Fab-645dsFv였다. 모든 실험은 단백질 A 정제된 물질에 실시하였다. A26Fab-645dsFv 세포 배양액은 단백질 A 컬럼(맙셀렉트, GE Healthcare)을 이용하여 정제하였다. 물질은 표적 분자가 결합되어 있으면서 대부분의 불순물이 통과하는 pH 7.4에서 로딩하였다. 그 후 컬럼은 시트르산나트륨 완충액을 이용하여 pH 3.4에서 용리하였다. 이는 다량체 종과 함께 단량체 종을 용리하였다. 용리 수집물을 13 g/L로 농축하고 pH 7.4에서 PBS 완충액 안으로 투석 여과하였다. 공급 항체 A26Fab-645dsFv는 전환 전에 대략 15% 단량체를 포함하였다. 하기 표 9에 나타난 바와 같이 항체의 농도(공급물 농도 g/L), pH, bMEA 환원제 농도, 전환 단계의 온도 및 혼합 속도 모두를 평가하였다. 단량체, 이량체, 삼량체, 사량체 및 HMWS %는 컬럼 BEH200 SEC 1.7 μ m를 이용하여 월터스(Walter)에 의해 제작된 기계를 이용하는 SE-UPLC에 의해 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7 및 23시간에 측정하고 5시간에 대해 표 10에 나타낸다.

[0268]

[0269]

표 9

실험 N1 내지 N35의 실험 매개변수

실험 명칭	공급물 농도(g/L)	pH	환원제 농도(mM)	온도 (°C)	혼합 (rpm)
N1	0.50	5.4	5	40	100
N2	5.00	5.4	5	40	100
N3	0.50	8.6	5	40	100
N4	5.00	8.6	5	40	100
N5	0.50	5.4	100	40	100
N6	5.00	5.4	100	40	100
N7	0.50	8.6	100	40	100
N8	5.00	8.6	100	40	100
N9	0.50	5.4	5	55	100
N10	5.00	5.4	5	55	100
N11	0.50	8.6	5	55	100
N12	5.00	8.6	5	55	100
N13	0.50	5.4	100	55	100
N14	5.00	5.4	100	55	100
N15	0.50	8.6	100	55	100
N16	5.00	8.6	100	55	100
N17	0.50	5.4	5	40	1200
N18	5.00	5.4	5	40	1200
N19	0.50	8.6	5	40	1200
N20	5.00	8.6	5	40	1200
N21	0.50	5.4	100	40	1200
N22	5.00	5.4	100	40	1200
N23	0.50	8.6	100	40	1200
N24	5.00	8.6	100	40	1200
N25	0.50	5.4	5	55	1200
N26	5.00	5.4	5	55	1200
N27	0.50	8.6	5	55	1200
N28	5.00	8.6	5	55	1200
N29	0.50	5.4	100	55	1200
N30	5.00	5.4	100	55	1200
N31	0.50	8.6	100	55	1200
N32	5.00	8.6	100	55	1200
N33	2.75	6.9	52.5	47.5	650
N34	2.75	6.9	52.5	47.5	650
N35	2.75	6.9	52.5	47.5	650

[0270]

표 10

5 시간에서 상기 표 9의 결과

실험 명칭	공급물 농도 (g/L)	pH	환원제 농도(mM)	온도 (°C)	혼합 (rpm)	HMWS	사량체	삼량체	이량체	단량체
N1	0.50	5.4	5	40	100	11.1	13.0	22.8	28.2	24.6
N2	5.00	5.4	5	40	100	18.7	16.2	22.7	24.6	17.9
N3	0.50	8.6	5	40	100	11.4	14.3	22.2	27.4	24.8
N4	5.00	8.6	5	40	100	22.3	16.0	21.9	23.1	16.7
N5	0.50	5.4	100	40	100	3.6	6.0	17.5	33.5	39.5
N6	5.00	5.4	100	40	100	12.9	11.1	17.4	29.2	29.5
N7	0.50	8.6	100	40	100	2.7	6.1	16.9	34.2	40.2
N8	5.00	8.6	100	40	100	17.4	12.5	16.8	25.2	28.1
N9	0.50	5.4	5	55	100	0.0	1.0	6.6	30.0	62.4
N10	5.00	5.4	5	55	100	0.0	6.7	17.2	36.1	40.0
N11	0.50	8.6	5	55	100	0.0	0.0	7.9	31.0	61.1
N12	5.00	8.6	5	55	100	2.7	5.7	18.1	34.3	38.8
N13	0.50	5.4	100	55	100	0.0	0.0	0.3	3.5	95.7
N14	5.00	5.4	100	55	100	0.0	0.0	0.7	10.8	88.6
N15	0.50	8.6	100	55	100	0.0	0.0	0.1	3.5	96.5
N16	5.00	8.6	100	55	100	0.0	0.8	1.6	13.9	83.6
N17	0.50	5.4	5	40	1200	7.7	10.0	19.2	31.2	32.0
N18	5.00	5.4	5	40	1200	13.9	15.1	23.6	27.1	20.3
N19	0.50	8.6	5	40	1200	8.4	11.1	21.3	30.8	28.5
N20	5.00	8.6	5	40	1200	20.0	15.2	22.5	24.4	18.0
N21	0.50	5.4	100	40	1200	0.0	5.6	15.9	36.2	42.3
N22	5.00	5.4	100	40	1200	12.6	10.3	16.4	30.0	30.8
N23	0.50	8.6	100	40	1200	2.2	5.5	17.3	35.1	39.9
N24	5.00	8.6	100	40	1200	14.4	11.7	16.7	26.6	30.6
N25	0.50	5.4	5	55	1200	0.0	0.0	6.7	32.0	61.3
N26	5.00	5.4	5	55	1200	2.1	5.7	18.7	36.2	37.3
N27	0.50	8.6	5	55	1200	0.0	1.1	8.1	31.6	59.2
N28	5.00	8.6	5	55	1200	1.7	4.9	17.2	35.6	40.7
N29	0.50	5.4	100	55	1200	0.0	0.0	2.4	11.6	86.0
N30	5.00	5.4	100	55	1200	0.0	0.0	1.6	13.1	75.5
N31	0.50	8.6	100	55	1200	0.0	0.0	0.0	3.9	96.1
N32	5.00	8.6	100	55	1200	0.0	0.0	1.3	14.9	83.9
N33	2.75	6.9	52.5	47.5	650	1.4	2.7	9.6	30.6	55.6
N34	2.75	6.9	52.5	47.5	650	2.8	3.6	11.6	30.5	51.6
N35	2.75	6.9	52.5	47.5	650	2.4	3.4	11.0	30.3	53.0

[0271]

[0272]

전환 단계의 목적은 % 단량체 비율을 최대화하는 것이다. 조사된 범위에 걸쳐 % 단량체에 대해 모델에서 가장 중용한 인자는 환원 농도 및 온도이다. 더 높은 환원제 농도 및 더 높은 온도에서 % 단량체가 증가하였다.

[0273]

온도의 증가와 침전의 정도 사이의 관계가 있다는 경향이 관찰되었다.

[0274]

실시예 4: 여러 부형제의 효과에 대한 조사

[0275]

실험에서 조사한 부형제 및 농도는 하기 표 11에 제공한다.

표 11

글리신 mM	세린 mM	프롤린 mM	알라닌 mM	리신 mM	아르기닌 mM	폴리소르 베이트 80 (2% v/v)	폴리소르 베이트 20 (2% v/v)	황산암모늄 (4 M)	시트르산 나트륨 (1.5 M)
0	0	0	0	0.0	0	0	0	0	0
11	11	11	17	11	17	0.4	0.4	667	167
22	22	22	33	22	33	0.7	0.7	778	250
56	56	56	83	56	83	0.9	0.9	889	333
111	111	111	167	111	167	0.1	0.1	1000	417
278	278	278	333	278	333	0.2	0.2	1111	500
556	556	556	583	556	583	0.6	0.6	1222	667
778	778	778	833	778	833	1.1	1.1	1556	833

[0276]

[0277]

농도는 퍼센트 v/v로 나타낸 폴리소르베이트 20 및 80을 제외하고 mM로 나타낸다. 실험은 2 mL 깊은 웰 플레이트에서 실시하였고 중복하여 완료하였다. 사용된 조건은 0.5 g/L A26Fab-dsFv, 100mM β-meal, 표 11에 열거된 부형제 및 55℃의 온도였다. 또한, 10개의 대조군 샘플은 부형제 없이 0.5 g/L A26Fab-dsFv, 100mM β-meal, 55℃를 이용하여 실시하였다. 추가의 6개 대조군은 환원제 없이 그리고 부형제 없이 0.5 g/L의 A26Fab-dsFv, 55℃의 온도로 실시하였다.

[0278]

시간 경과 샘플은 규칙적인 간격으로 취하였다. 브래드포드(Bradford) 분석을 이용하여 수율을 모니터하였다. 브래드포드 단백질 분석은 용액 내 단백질의 농도를 측정하는데 사용되는 분석 절차이다. β-meal은 595 nm에서 흡수하지 않는다는 것이 확인되었다. 따라서, 본 방법을 이용하여 총 단백질 농도를 측정해서 단계 수율을 결정하였다. 총 단백질 농도는 테칸 프리덤(Tecan Freedom) EVO 200(Tecan, 영국 레딩 소재) 액체 처리 로봇을 이용하여 액체 이동을 실시하면서 96웰 포맷으로 브래드포드 단백질 분석 키트를 사용하여 측정하였다. 분석은 정제된 A26Fab-645dsFv 물질로 보정하고, A280 nm에 의해 직교하여 검사하였다. 샘플은 제조사의 설명에 따라 제조하고 분석하였다. 그 후 미지의 농도는 선형 회귀에 의한 곡선으로부터 내삽하여 결정하였다.

[0279]

높은 수율을 보인 모든 실험은 계속하여 SE-UPLC 및 SDS PAGE에 의해 분석하였다. 아미노산은 대조군에 비해 수율을 증가시켰기 때문에 침전을 감소시키는 것처럼 보였다. 폴리소르베이트 경우, SDS PAGE에 의해 추가 분석을 실시하여 이들의 효과를 분석하고(도 15), 샘플은 0.5 g/L 공급물, 100mM βMEA를 이용하여, 55℃에서, 5h 후에 2차 스크리닝으로부터 얻었다. [도 16a 및 16b]는 상이한 조건 하에서 여러 부형제에 대해 크기 배제 데이터를 나타낸다.

[0280]

실시예 5: 리신과 병용한 매개변수의 조사

[0281]

0.7M 리신이 존재할 때와 리신이 존재하지 않을 때에 항체 공급 농도 g/L, bMEA 농도 및 온도 매개변수를 조사하였다. 실험은 2 mL 깊은 웰 플레이트에서 실시하고 중복하여 완료하였다. 2mL 에펜도르프(Eppendorf) 튜브를 사용하고 각 전환 단계는 수조에서 5시간 동안 수행하였다.

표 12

인자, 범위 및 반응을 조사하기 위한 또 다른 실험 설계

실험 명칭	공급물 농도(g/L)	β -mea 농도 (mM)	온도 (°C)
N1	0.50	50	50
N2	5.00	50	50
N3	0.50	100	50
N4	5.00	100	50
N5	0.50	50	55
N6	5.00	50	55
N7	0.50	100	55
N8	5.00	100	55
N9	0.50	75	53
N10	5.00	75	53
N11	2.75	50	53
N12	2.75	100	53
N13	2.75	75	50
N14	2.75	75	55
N15	2.75	75	53
N16	2.75	75	53
N17	2.75	75	53

[0282]

표 13

리신이 존재하지 않을 때 상기 표 12의 결과

실험 명칭	공급물 농도 (g/L)	β -mea 농도 (mM)	온도 (°C)	% 단량체	% 수율	% 단량체 수율
N1	0.50	50	50.0	74.2	80.2	59.5
N2	5.00	50	50.0	69.0	78.2	53.9
N3	0.50	100	50.0	85.8	71.6	61.4
N4	5.00	100	50.0	75.7	61.1	46.2
N5	0.50	50	55.0	90.0	27.1	24.4
N6	5.00	50	55.0	81.8	5.8	4.7
N7	0.50	100	55.0	83.3	7.8	6.5
N8	5.00	100	55.0	69.6	1.4	1.0
N9	0.50	75	52.5	92.7	42.4	39.3
N10	5.00	75	52.5	82.9	14.4	12.0
N11	2.75	50	52.5	85.7	42.8	36.7
N12	2.75	100	52.5	85.5	13.9	11.9
N13	2.75	75	50.0	78.8	82.3	64.9
N14	2.75	75	55.0	77.2	3.8	2.9
N15	2.75	75	52.5	86.9	24.3	21.1
N16	2.75	75	52.5	86.8	24.3	21.1
N17	2.75	75	52.5	86.1	25.3	21.8

[0283]

표 14

0.7M 리신이 존재할 때 표 12의 결과

실험 명칭	공급물 농도 (g/L)	β -mea 농도 (mM)	온도 (°C)	% 단량체	% 수율	% 단량체 수율
N1	0.50	50.00	50.00	47.7	86.0	41.0
N2	5.00	50.00	50.00	58.6	91.7	53.7
N3	0.50	100.00	50.00	59.7	82.6	49.3
N4	5.00	100.00	50.00	67.4	84.5	57.0
N5	0.50	50.00	55.00	87.9	50.4	44.3
N6	5.00	50.00	55.00	82.3	29.7	24.4
N7	0.50	100.00	55.00	92.7	23.5	21.8
N8	5.00	100.00	55.00	87.4	9.8	8.6
N9	0.50	75.00	52.50	80.6	64.3	51.8
N10	5.00	75.00	52.50	78.6	51.1	40.2
N11	2.75	50.00	52.50	76.2	76.5	58.3
N12	2.75	100.00	52.50	84.3	48.6	41.0
N13	2.75	75.00	50.00	63.9	99.0	63.2
N14	2.75	75.00	55.00	88.4	22.0	19.5
N15	2.75	75.00	52.50	81.5	61.9	50.5
N16	2.75	75.00	52.50	81.4	61.0	49.7
N17	2.75	75.00	52.50	82.4	60.3	49.7

[0284]

[0285] 0.7M 리신이 존재할 때, 온도가 % 단량체에 대해 가장 강한 효과를 보였으며, 더 높은 온도에서 더 컸다.

[0286] 실시예 6: 다양한 환원제의 조사

[0287] 초기 환원제 스크리닝 실험을 위해, 본 발명자들은 분자를 개방하는데 50°C의 온도를 이용하였다. 공급물은 정제된 A26Fab-dsFv, 농도 1 g/L 및 15% 단량체였다. 실험은 1 mL의 공급물 부피로 에펜도르프에서 실시하였다. 스크리닝된 환원제 농도는 10, 50 및 100mM였다(표 15).

[0288] 샘플을 가열하고 서모 사이언티픽(Thermo Scientific)의 볼템프(Vortemp) 장치를 이용하여 혼합하였다. 환원제의 첨가 후 그러나 가열 전과 50°C에서 2h 가열 후에 샘플을 채취하였다. β -mea를 본 실험의 대조 환원제로 사용하였다.

표 15

조사된 초기 환원제 및 조건

환원제	테스트된 농도 mM	온도 °C	공급물 농도	혼합 속도
TCEP	10, 50 및 100	50	1 g/L	1200 rpm
DTT	10, 50 및 100	50	1 g/L	1200 rpm
아인산	10, 50 및 100	50	1 g/L	1200 rpm
아스코르브산	10, 50 및 100	50	1 g/L	1200 rpm
메틸 설페이트 나트륨	10, 50 및 100	50	1 g/L	1200 rpm
에틸렌 설파이트	10, 50 및 100	50	1 g/L	1200 rpm

[0289]

[0290] 수율은 SE UPLC 분석에서 피크 면적을 이용하여 계산하였다. 샘플의 총 피크 면적을 공급물의 총 피크 면적으로 나누었다. 단량체 수율은 퍼센트 단량체를 총 수율로 곱하여 계산하였다. [도 17a]는 실온에서 처리를 실시하였을 때 % 단량체를 나타내고 [도 17b]는 50°C에서 실시한 상응하는 실험에 대해 2시간 후의 결과를 나타낸다.

[0291] [도 18a 및 18b]는 SE-HPLC에 의해 실시한 상응하는 분석의 결과를 나타낸다.

[0292] **실시예 7: 2 L 규모에서의 전환**

[0293] A26Fab-645dsFv의 CHO 발현 및 정화는 실시예 1에서와 같이 수행하여 2 L 규모 실험을 위한 공급물로서 정화된 배양액을 제공하였다. 열적 전환 실험은 2 L의 전환 부피를 이용하여 2 L 발효 용기에서 실시하였다. 실험을 위한 공급물은 정화된 세포 배양액(CCF: clarified cell culture fluid)이었고, 산물의 농도는 2.2 g/L였고, 이중 30%가 단량체였다. 실험 조건은 표 16에 나타내며, 전환 단계는 모든 실험에서 17 h 동안 실시하였다. 실험은 SE UPLC에 의해 분석하였다.

표 16

2L 전환 실험의 실험 조건

pH	가열 (°C)	β -mea 농도 (mM)
7	50	50

[0294]

표 17

2L 전환 실험의 실험 결과

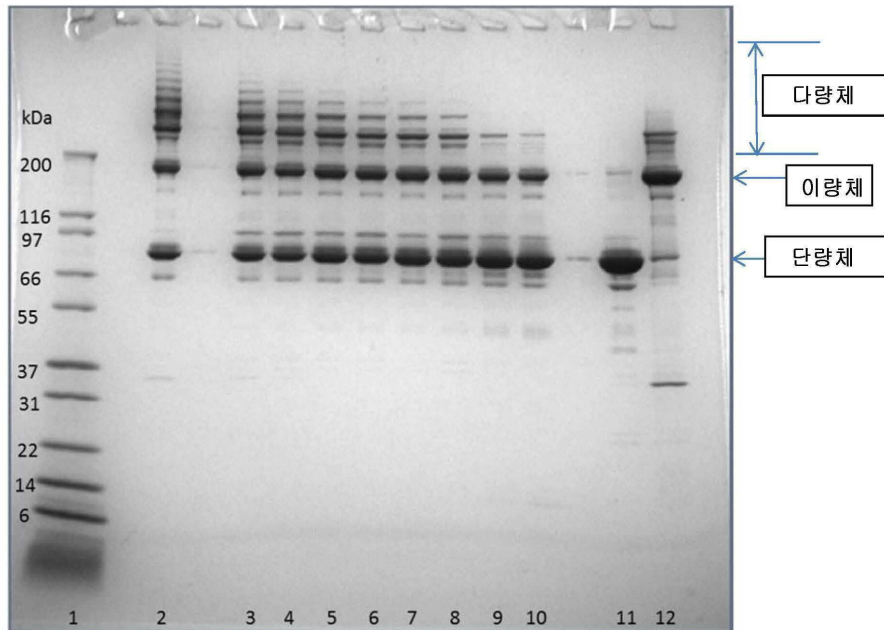
전환 전 CCF 중량				전환 후 CCF					
역가 (g/L)	Ab 중량 (g)	% 단량체	단량체 중량 (g)	역가 (g/L)	회수된 Ab (g)	Ab 수율 (%)	% 단량체	회수된 단량체 (g)	단량체 수율 (%)
2.04	4.40	30.2	1.33	1.73	3.73	84.8	50.9	1.90	142.9

[0295]

[0296] 전환 단계를 제조 규모에서 사용되는 것들을 대표하는 용기에서 2 L 규모로 확대하는 것이 가능하였다. 단계에 걸쳐 단량체 양을 상당히 증가시키는 것이 가능하였다.

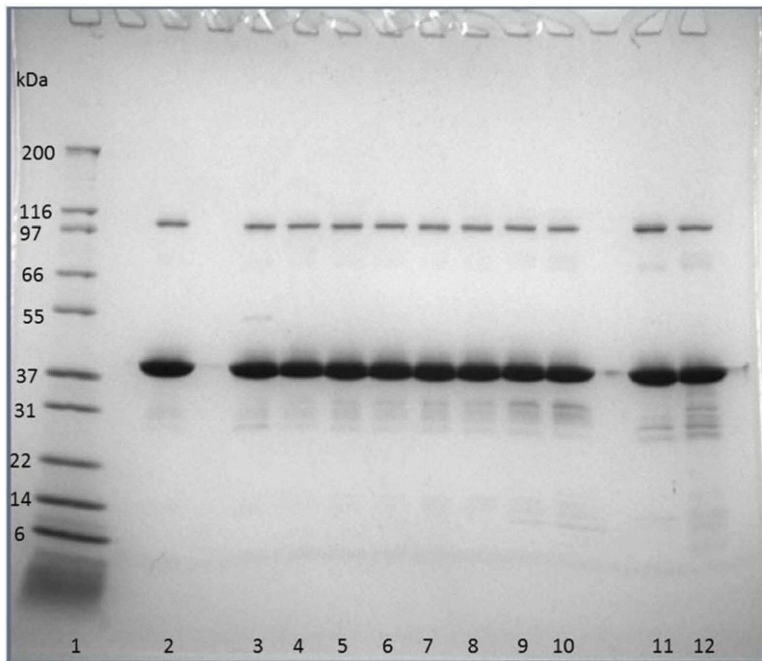
도면

도면1



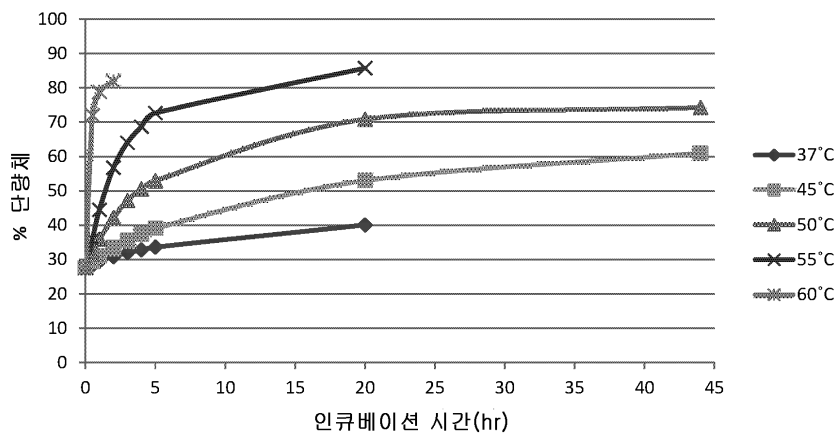
레인	샘플
1	Novex Mark 12 분자량 마커
2	단백질 A 정제 후 A26Fab-645dsFv
3	시간 00:30에서 A26Fab-645dsFv 전환
4	시간 01:00에서 A26Fab-645dsFv 전환
5	시간 02:00에서 A26Fab-645dsFv 전환
6	시간 03:00에서 A26Fab-645dsFv 전환
7	시간 04:00에서 A26Fab-645dsFv 전환
8	시간 05:00에서 A26Fab-645dsFv 전환
9	시간 20:20에서 A26Fab-645dsFv 전환
10	시간 44:14에서 A26Fab-645dsFv 전환
11	A26Fab-645dsFv 단량체 기준 물질
12	A26Fab-645dsFv 다량체 기준 물질

도면2

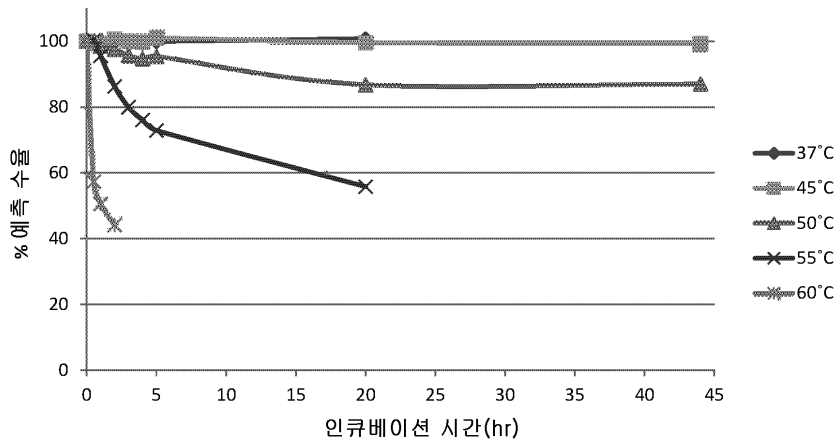


레인	샘플
1	Novex Mark 12 분자량 마커
2	단백질 A 정제 후 A26Fab-645dsFv
3	시간 00:30에서 A26Fab-645dsFv 전환
4	시간 01:00에서 A26Fab-645dsFv 전환
5	시간 02:00에서 A26Fab-645dsFv 전환
6	시간 03:00에서 A26Fab-645dsFv 전환
7	시간 04:00에서 A26Fab-645dsFv 전환
8	시간 05:00에서 A26Fab-645dsFv 전환
9	시간 20:20에서 A26Fab-645dsFv 전환
10	시간 44:14에서 A26Fab-645dsFv 전환
11	A26Fab-645dsFv 단량체 기준 물질
12	A26Fab-645dsFv 다량체 기준 물질

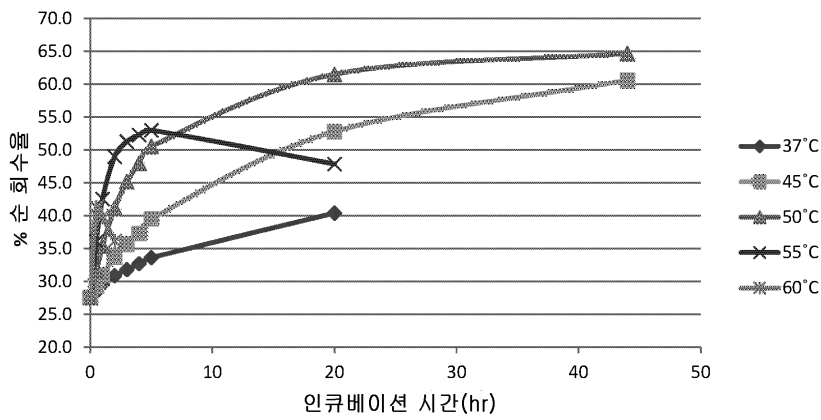
도면3



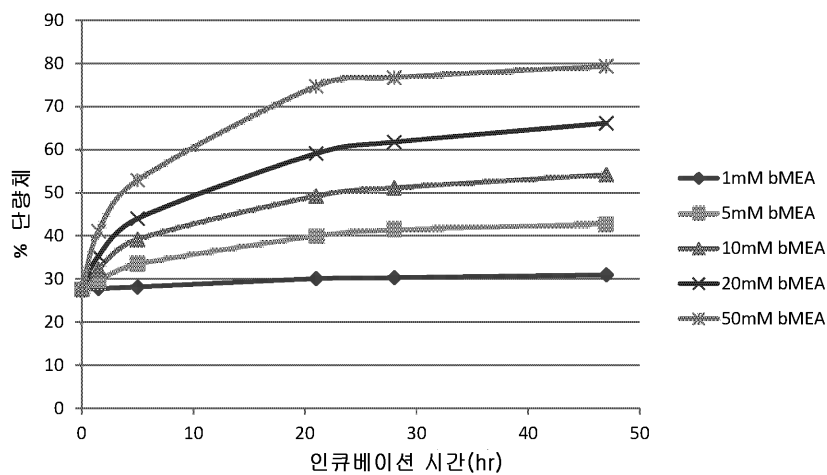
도면4



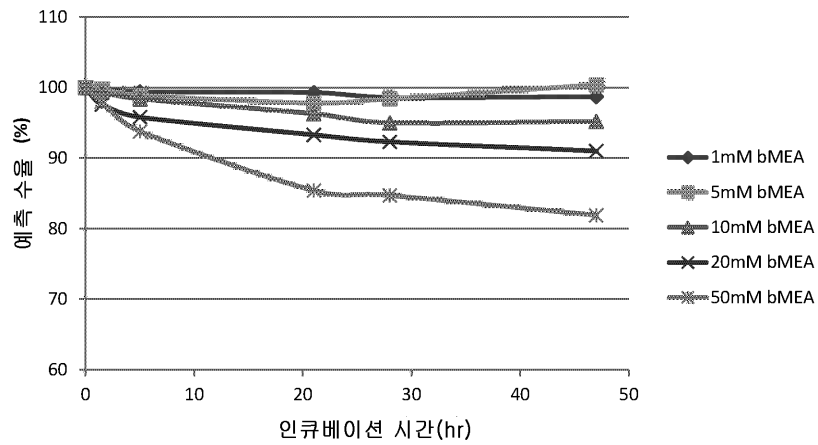
도면5



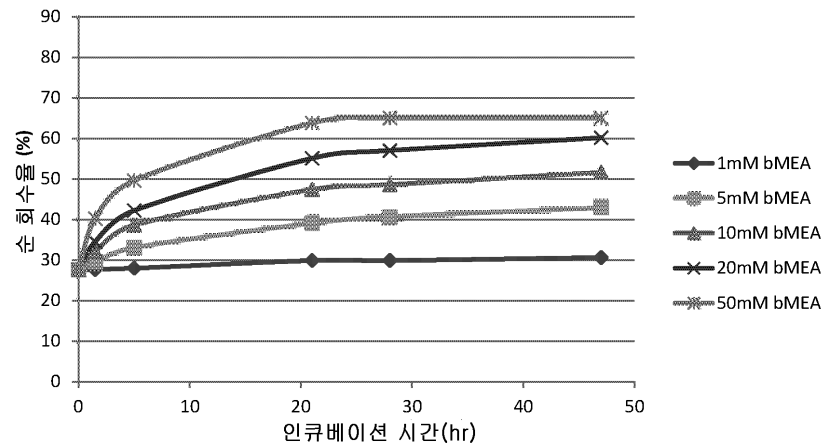
도면6



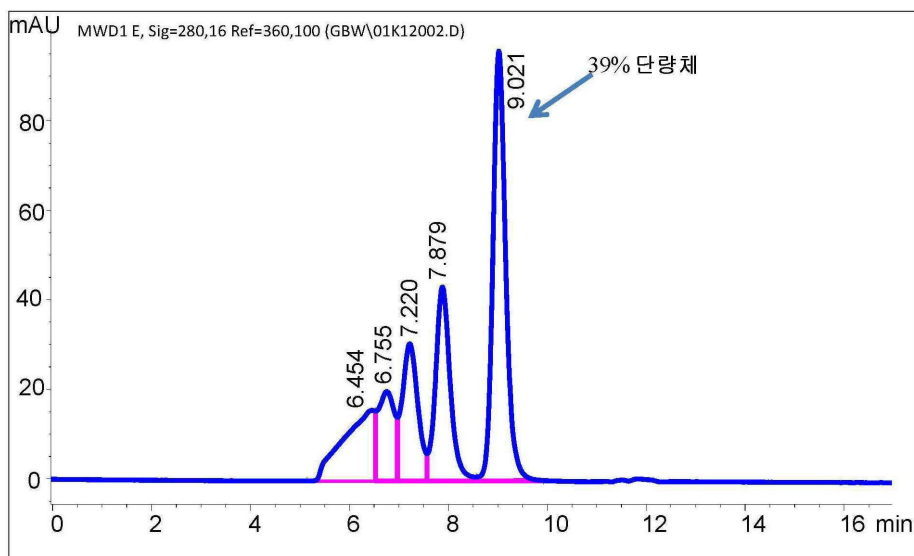
도면7



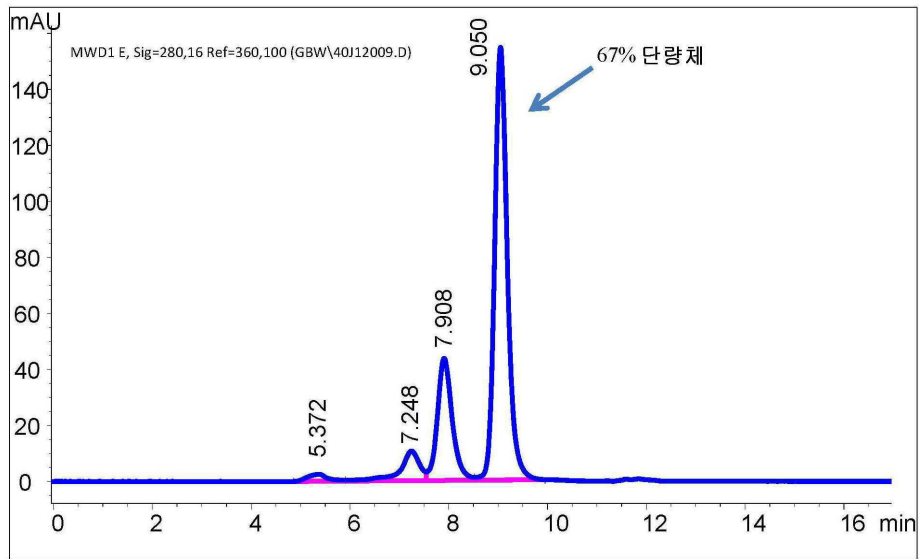
도면8



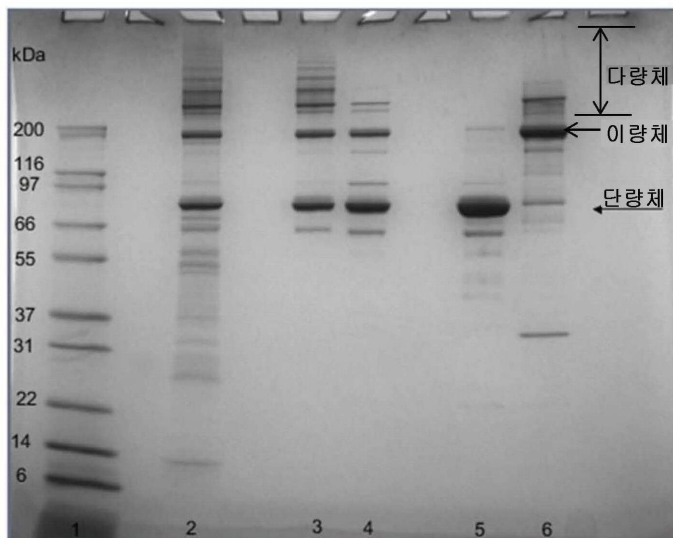
도면9



도면10



도면11

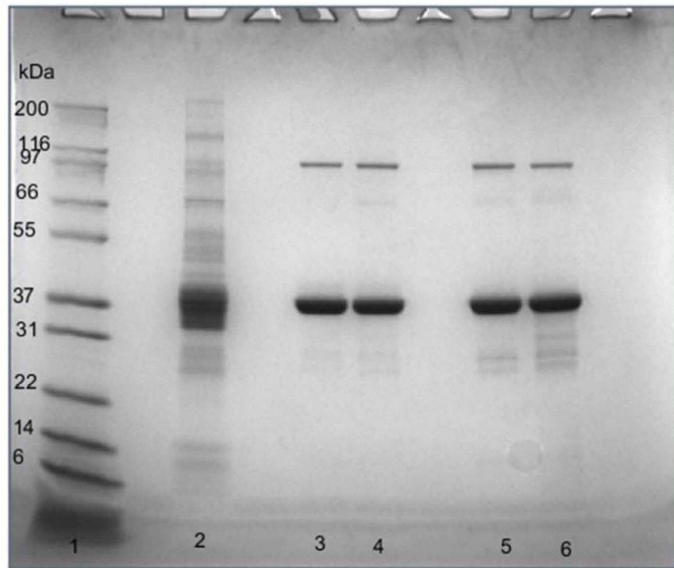


레인

샘플

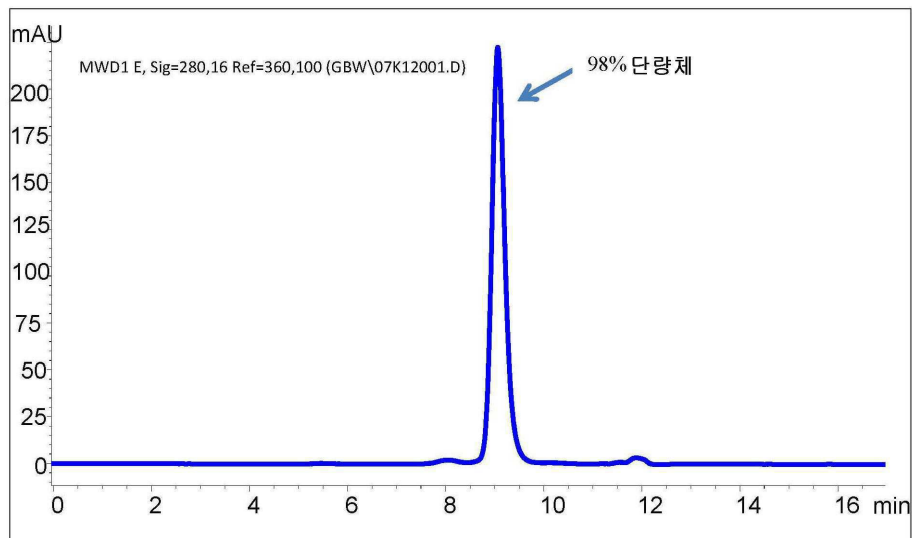
- | | |
|---|--|
| 1 | Novex Mark 12 분자량 마커 |
| 2 | A26Fab-645dsFv 정화된 세포 배양 상등액 |
| 3 | pH 3.5에서 A26Fab-645dsFv MabSelect 용리(전환 없음) |
| 4 | pH 3.5에서 A26Fab-645dsFv MabSelect 용리(상등액 전환) |
| 5 | A26Fab-645dsFv 단량체 기준 |
| 6 | A26FabFv-645Fv 다량체 기준 |

도면12

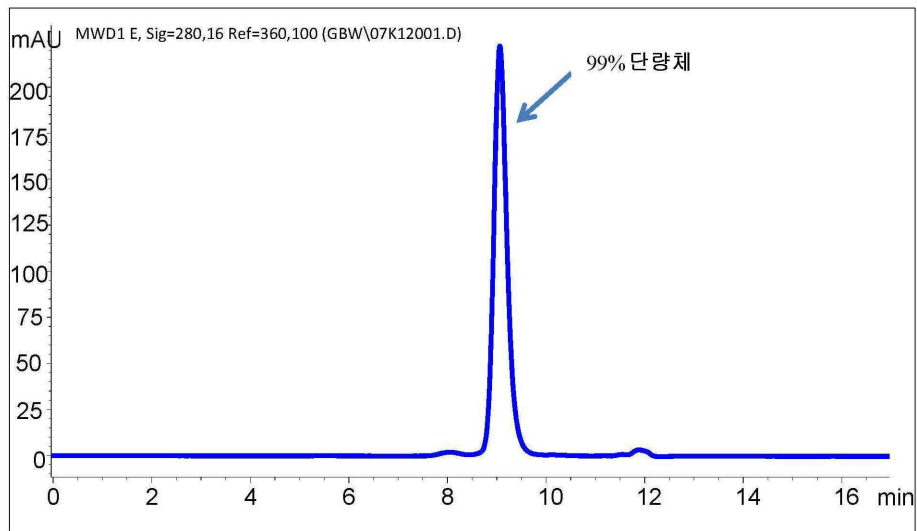


레인	샘플
1	Novex Mark 12 분자량 마커
2	A26Fab-645dsFv 정화된 세포 배양 상등액
3	pH 3.5에서 A26Fab-645dsFv MabSelect 용리(전환 없음)
4	pH 3.5에서 A26Fab-645dsFv MabSelect 용리(상등액 전환)
5	A26Fab-645dsFv 단량체 기준
6	A26Fab-645dsFv 다량체 기준

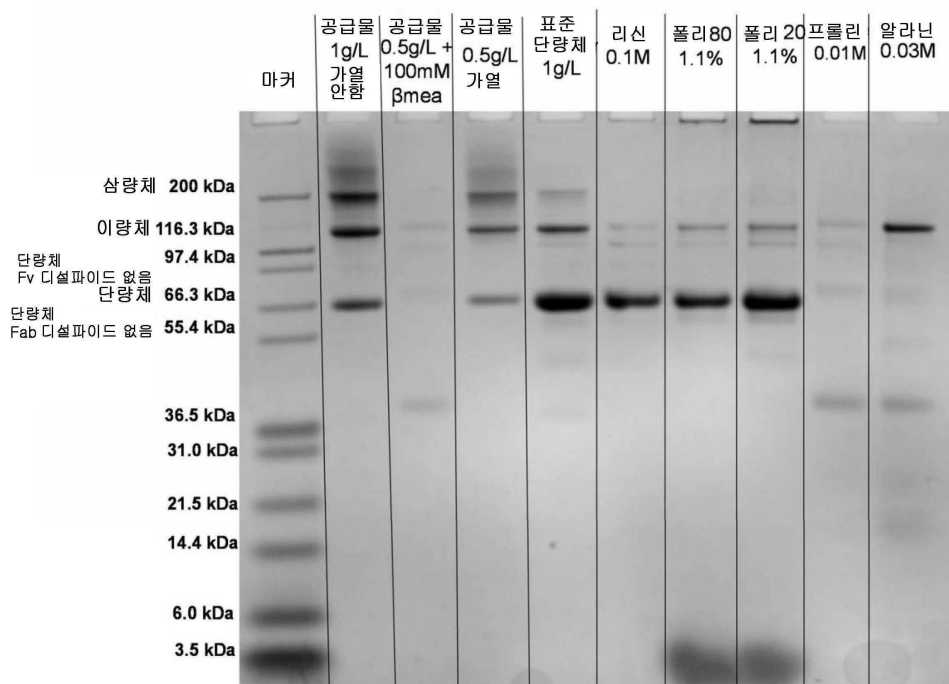
도면13



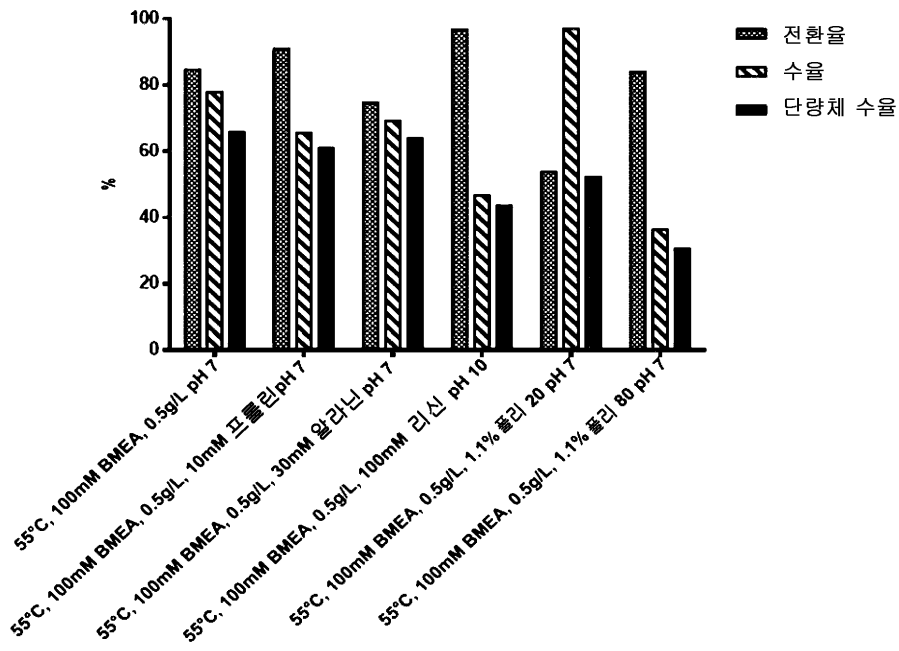
도면14



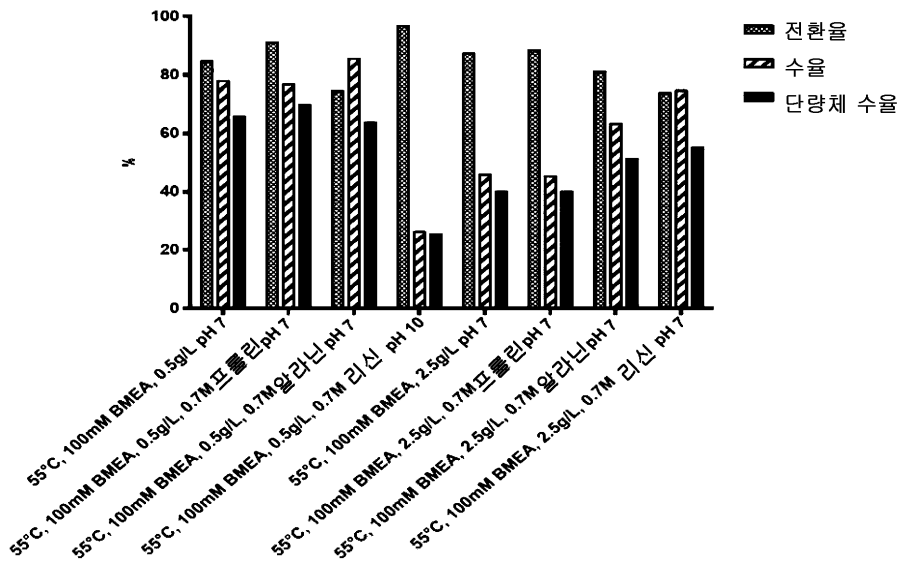
도면15



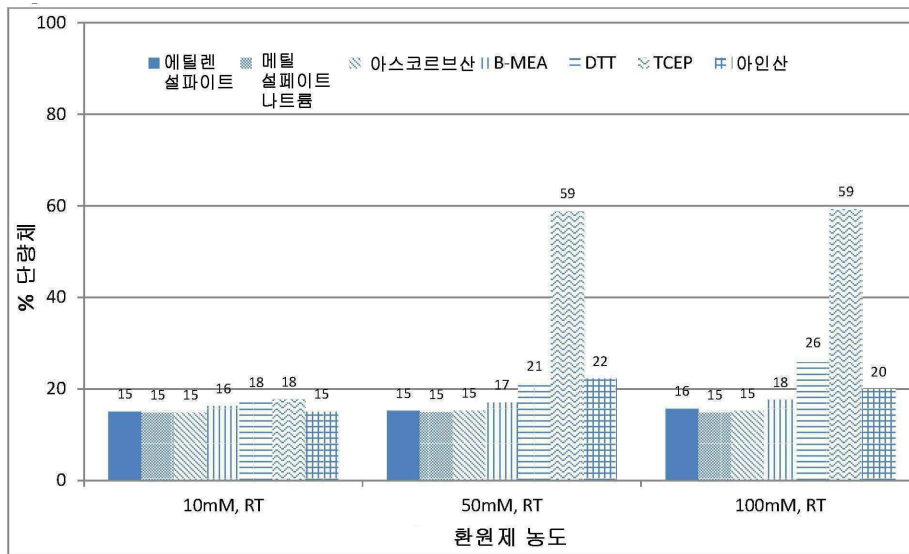
도면16a



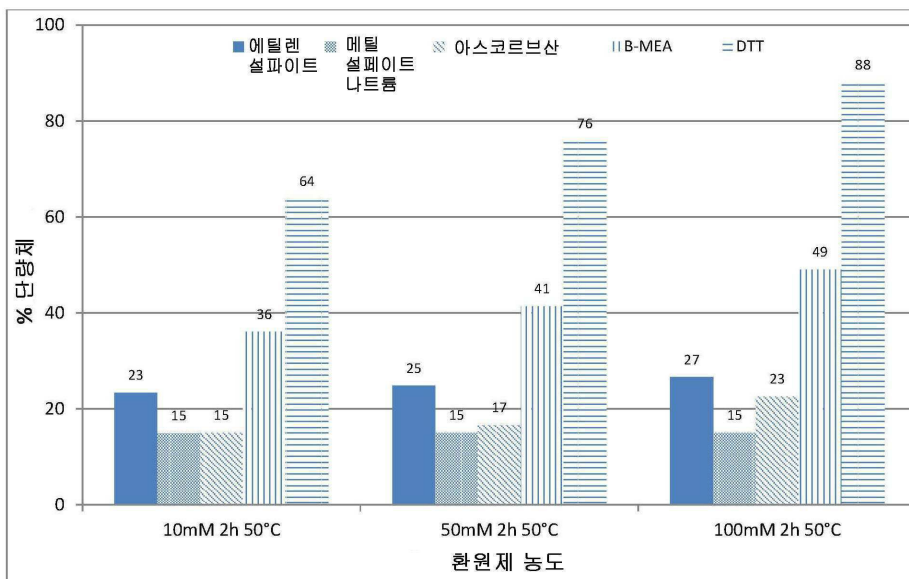
도면16b



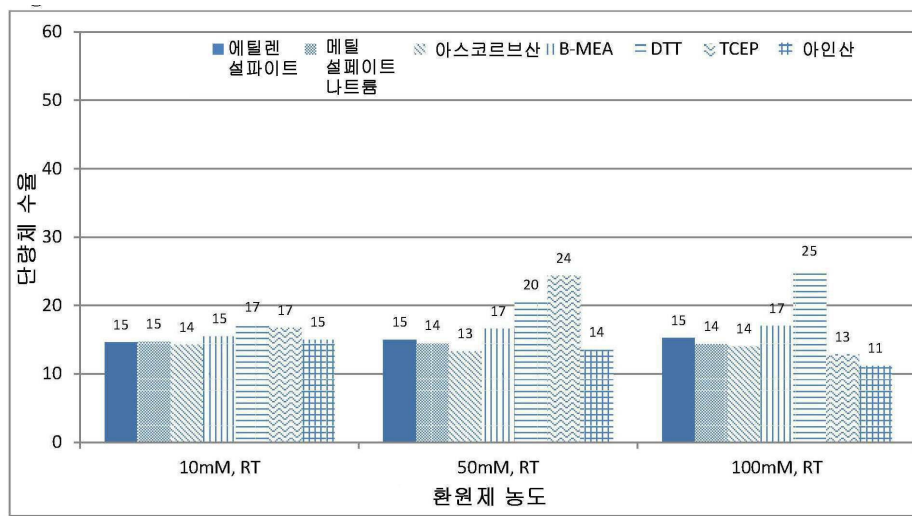
도면17a



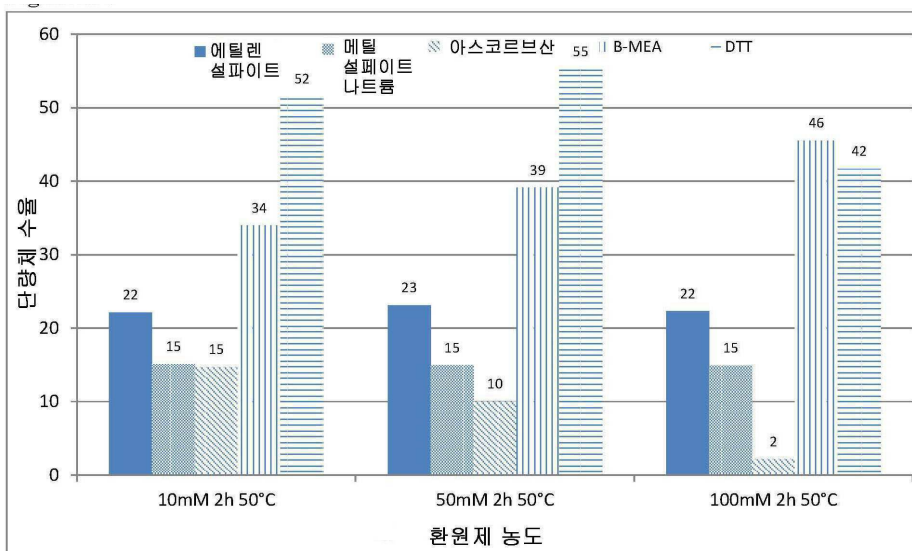
도면17b



도면18a



도면18b



도면19

(a) OX40에 특이적인 항체 A26의 경쇄 가변 영역(서열 번호 7)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPS
 RFSASGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKR

(b) OX40에 특이적인 항체 A26의 중쇄 가변 영역(서열 번호 8)
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTY
 YRDSVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEIGFDYWGQGLTVTVSS

(c)
 CDRH1: NYGIH (서열 번호 1)
 CDRH2: SISPSGGLTYRDSVKG (서열 번호 2)
 CDRH3: GGEIGFDY (서열 번호 3)
 CDRL1: RATQSIYNALA (서열 번호 4)
 CDRL2: NANTLHT (서열 번호 5)
 CDRL3: QQYYDYPLT (서열 번호 6)

(d) 항-OX40 항체 Fab 성분의 경쇄(서열 번호 9)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPS
 RFSASGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
 DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTL
 TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(e) 항-OX40 항체 Fab 성분의 중쇄(서열 번호 10)
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTY
 YRDSVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEIGFDYWGQGLTVTVSS
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTQSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

도면20

(a) 항- 항체 Fv 성분의 중쇄(서열 번호 11)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTFYA
TWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGTLV
TVSS

(b) 항- 항체 Fv 성분의 경쇄(서열 번호 12)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCGGGYSSISDTTFGCGTKVEIKRT

(c) 링커 1 (서열 번호 13)

SGGGSGGGGTGGGS

(d) 링커 2 (서열 번호 14)

GGGGSGGGSGGGGS

(e) A26 Fab 중쇄 -(G4S,G4T,G4S)-645dsFv(gH5) (서열 번호 15)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTY
YRDSVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCSGGGSGGGGTGGGS
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTFYA
TWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGTLV
TVSS

(f) A26 Fab 경쇄 -(3xG4S)-645dsFv(gL4) (서열 번호 16)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPS
RFSASGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQYYDYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSP
SSVSASVGDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISLQPEDFATYYCGGGYSSISDTTFGCGTKVEIKRT

도면21

(a) 645gH1 중쇄 가변 도메인(서열 번호 17)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIHWASGTTFYA
TWAKGRFTISRDSSTTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGTLVTVS
S

(b) 645gL1 경쇄 가변 도메인(서열 번호 18)

DIVMTQSPSSVSASVGDRVITITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVP
SRFKGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGGGYSSISDITTFGCGTKVEIK

(c) A26 Fab 중쇄 -(3xG4S)-645dsFv(gH1) (서열 번호 19)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTY
YRDSVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCSGGGGSGGGGSGGGGS
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIHWASGTTFYA
TWAKGRFTISRDSSTTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGTLVTVS
S

(d) A26 Fab 경쇄 -(3xG4S)-645dsFv(gL1)(서열 번호 20)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPS
RFSASGSGTDSLTISSLQPEDFATYYCQYYDYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTL
TLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQS
PSSVSASVGDRVITITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFKGS
SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGGGYSSISDITTFGCGTKVEIK

도면22

a) 이. 콜라이 OmpA 선도 서열을 포함하는 중쇄 A26-645(gH5)를 코딩하는 DNA(서열 번호 21)

ATGAAGAAGACTGCTATAGCGATCGCAGTGGCGCTAGCTGGTTTCGCCACCGTGGC
GCAAGCTGAAGTTCAGCTGGTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCAGCCTGGAGGGA
 GCCTGCGTCTCTTGTGCAGCAAGCGGTTTCACGTTACCAACTACGGTATCCACT
 GGATTCGTCAGGCACCAGGTAAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCCGTCTG
 GTGGTCTGACGTACTACCGTGA CTCTGTCAAAGGTCGTTTCACCATCTCTCGTGATG
 ACGCGAAAAACTCTCCGTACCTGCAAATGAACTCTCTGCGTGCAGAAAGATACCGCA
 GTGTACTACTGCGTACTGGTGGTGAAGGTATCTTCGACTACTGGGGTCAGGGTACC
 CTGGTAAGTGTCTCGAGCGCTTCTACAAAGGGCCCAAGCGTTTTCCCACTGGCTCCG
 TCCTCTAAATCCACCTCTGGTGGTACGGCTGCACTGGGTTGCCTGGTGAAAGACTAC
 TTCCCAGAACCAGTTACCGTGTCTTGGAACCTCTGGTGCCTGACCTCTGGTGTTTAC
 ACCTTTCCAGCAGTTCTCCAGTCTTCTGGTCTGTACTCCCTGTCTAGCGTGGTTACCG
 TTCCGTCTTCTCTCTGGGTACTCAGACCTACATCTGCAACGTCAACCACAAACCGTC
 CAACACCAAGGTGCAAAAAAAGTCGAGCCGAAATCCTGTAGTGGAGGTGGGGGCT
 CAGGTGGAGGCGGGACCGGTGGAGGTGGCAGCGAGGTCAACTGCTTGAGTCTGGA
 GGAGGCCTAGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTTGTGTCAGTAAGCGGCATC
 GACCTGAGCAATTACGCCATCAACTGGGTGAGACAAGCTCCGGGGAAGTGTTTAGA
 ATGGATCGGTATAATATGGGCCAGTGGGACGACCTTTTATGCTACATGGGCGAAAG
 GAAGGTTTACAATTAGCCGGGACAATAGCAAAAAACACCGTGTATCTCCAAATGAAC
 TCCTTGCGAGCAGAGGACACGGCGGTGTACTATTGTGCTCGCACTGTCCCAGGTTAT
 AGCACTGCACCCCTACTTCGATCTGTGGGGACAAGGGACCCTGGTGACTGTTTCAAGT
 TAA

b) 중쇄 A26-645(gH5)를 코딩하는 DNA(서열 번호 22)

GAAGTTCAGCTGGTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCAGCCTGGAGGGAGCCTGCG
 TCTCTCTTGTGCAGCAAGCGGTTTCACGTTACCAACTACGGTATCCACTGGATTCGT
 CAGGCACCAGGTAAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCCGTCTGGTGGTCTG
 ACGTACTACCGTGA CTCTGTCAAAGGTCGTTTCACCATCTCTCGTGATGACGCGAAA
 AACTCTCCGTACCTGCAAATGAACTCTCTGCGTGCAGAAAGATACCGCAGTGTACTAC
 TGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATCTTCGACTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTAACT
 GTCTCGAGCGCTTCTACAAAGGGCCCAAGCGTTTTCCCACTGGCTCCGTCTCTAAA
 TCCACCTCTGGTGGTACGGCTGCACTGGGTTGCCTGGTGAAAGACTACTTCCCAGAA
 CCAGTTACCGTGTCTTGGAACCTCTGGTGCCTGACCTCTGGTGTTTACACCTTTCCAG
 CAGTCTCCAGTCTTCTGGTCTGTACTCCCTGTCTAGCGTGGTTACCGTTCCGTCTTCT
 TCTCTGGGTACTCAGACCTACATCTGCAACGTCAACCACAAACCGTCCAACACCAAG
 GTCGACAAAAAAGTCGAGCCGAAATCCTGTAGTGGAGGTGGGGGCTCAGGTGGAGG
 CGGGACCGGTGGAGGTGGCAGCGAGGTTCAACTGCTTGAGTCTGGAGGAGGCCTAG
 TCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTTGTGTCAGTAAGCGGCATCGACCTGAGCA
 ATTACGCCATCAACTGGGTGAGACAAGCTCCGGGGAAGTGTTTAGAATGGATCGGT
 ATAATATGGGCCAGTGGGACGACCTTTTATGCTACATGGGCGAAAGGAAGGTTTAC
 AATTAGCCGGGACAATAGCAAAAAACACCGTGTATCTCCAAATGAACTCCTTGCGAG
 CAGAGGACACGGCGGTGTACTATTGTGCTCGCACTGTCCCAGGTTATAGCACTGCAC
 CCTACTTCGATCTGTGGGGACAAGGGACCCTGGTGACTGTTTCAAGTTAA

도면23

a) 이. 콜라이 OmpA 선도 서열을 포함하는 경쇄 A26-645(gL4)를 코딩하는 DNA(서열 번호 23)

ATGAAAAAGACAGCTATCGCAATTGCAGTGGCGTTGGCTGGTTTCGCGACCGTTGCG
CAAGCTGATATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGA
 TCGTGTGACTATTACCTGTCTGTGCAACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTA
 TCAGCAGAAACCGGTAAGCGCCAACTCTGATCTACAACGCGAACACTCTGC
 ATACTGGTGTTCGTCTCGTTTCTCTGCGTCTGGTTCTGGTACGGAAGTCTACTCTGAC
 CATCTCCTCTCTCCAGCCGGAAGATTTCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGA
 TTACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAGTTGAGATCAAACGTACGGTTGCAGC
 TCCATCCGCTTTCATCTTCCACCGTCTGACGAACAGCTCAAATCTGGTACTGCTTCT
 GTCGTTTGCCTCTGAACAACTTCTATCCGCGTGAAGCGAAAGTCCAGTGGAAAGTC
 GACAACGCACTCCAGTCTGGTAAGTCTCAGGAATCTGTGACCGAACAGGACTCCAA
 AGACTCCACCTACTCTCTGTCTAGCACCTGACTCTGTCCAAAGCAGACTACGAGAA
 ACACAAAGTGACGCTTGCGAAGTTACCCATCAGGGTCTGAGCTCTCCGGTTACCAA
 ATCCTTTAATAGAGGGGAGTGTGGTGGCGGTGGCAGTGGTGGTGGAGGTTCCGGAG
 GTGGCGGTTTCAGACATACAAATGACCCAGAGTCTTATCGGTATCCGCGTCCGTTG
 GCGATAGGGTGACTATTACATGTCAAAGCTCTCCTAGCGTCTGGAGCAATTTCTAT
 CCTGGTATCAACAGAAACCGGGGAAGGCTCCAAACTTCTGATTTATGAAGCCTCG
 AAATCACCAGTGGAGTTCGCTCAAGATTCAAGTGGCTCTGGATCAGGGACAGACTTC
 ACGTTGACAATCAGTTCGCTGCAACCAGAGGACTTTGCGACCTACTATTGTGGTGGGA
 GGTTACAGTAGCATAAGTGATACGACATTTGGGTGCGGTACTAAGGTGGAAATCAA
 ACGTACCTAA

b) 경쇄 A26-645(gL4)를 코딩하는 DNA(서열 번호 24)

GATATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGT
 GACTATTACCTGTCTGCAACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCA
 GAAACCGGGTAAAGCGCCAACTCTGATCTACAACGCGAACACTCTGCATACTG
 GTGTTCCGCTCTCGTTTCTCTGCGTCTGGTTCTGGTACGGAAGTCTACTCTGACCATCTC
 CTCTCTCCAGCCGGAAGATTTTCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCC
 ACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAGTTGAGATCAAACGTACGGTTGCAGCTCCATC
 CGTCTTTCATCTTCCACCGTCTGACGAACAGCTCAAATCTGGTACTGCTTCTGTCTGTT
 TGCCTCTGAACAACTTCTATCCGCGTGAAGCGAAAGTCCAGTGGAAAGTCGACAA
 CGCACTCCAGTCTGGTAACTCTCAGGAATCTGTGACCGAACAGGACTCCAAAGACTC
 CACCTACTCTCTGTCTAGCACCTGACTCTGTCCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA
 AGTGTACGCTTGCGAAGTTACCCATCAGGGTCTGAGCTCTCCGGTTACCAAATCCTT
 TAATAGAGGGGAGTGTGGTGGCGGTGGCAGTGGTGGTGGAGGTTCCGGAGGTGGCG
 GTTCAGACATACAAATGACCCAGAGTCTTATCGGTATCCGCGTCCGTTGGCGATA
 GGGTGACTATTACATGTCAAAGCTCTCCTAGCGTCTGGAGCAATTTCTATCCTGGT
 ATCAACAGAAACCGGGGAAGGCTCCAAACTTCTGATTTATGAAGCCTCGAAACTC
 ACCAGTGGAGTTCGTCAGATTCAAGATTCAAGTGGCTCTGGATCAGGGACAGACTTCACGTTG
 ACAATCAGTTCGCTGCAACCAGAGGACTTTGCGACCTACTATTGTGGTGGAGGTTAC
 AGTAGCATAAGTGATACGACATTTGGGTGCGGTACTAAGGTGGAAATCAAACGTAC
 CTAA

도면24

a) B72.3 선도 서열을 포함하는 중쇄 A26-645(gH5)를 코딩하는 DNA(서열 번호 25)

ATGGAATGGTCCCTGGGTCTTCCTGTTTTCCTTCTGTCAACAACCGGGGTGCACAGCG
AGGTGCAGCTCGTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGT
CTCTCTTGTGCAGCAAGCGGTTTACGTTACCAACTACGGTATCCACTGGATTCTGT
AGGCACCAGGTAAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCCGTCTGGTGGTCTGA
CGTACTACCGTGACTCTGTCAAAGGTCTTTCACCATCTCTCGTGATGACGCGAAAA
ACTCTCCGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTGCAGAAAGATAACCGCAGTGTA
GCGCTACTGGTGGTGAAGGTATCTTCGACTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTAACTG
TCTCAAGCGCTTCTACAAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGA
GCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA
CCGGTGACGGTGTCTGTGGAATCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCC
GGCTGTCCTACAGTCTCTGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTC
CAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACA
CCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTTCGGAGGTGGCGGTTCCGGA
GGTGGCGGTACCGGTGGCGGTGGATCCGAAGTCCAGCTGCTTGAATCCGGAGGCGG
ACTCGTGCAGCCCGGAGGCAGTCTTCGCTTGTCTGCGCTGTATCTGGAATCGACCT
GAGCAATTACGCCATCAACTGGGTGAGACAGGCACCTGGGAAATGCCTCGAATGGA
TCGGCATTATATGGGCTAGTGGGACGACCTTTTATGCTACATGGGCGAAGGGTAGAT
TCACAATCTCAGGGGATAATAGTAAGAACACAGTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGC
GAGCAGAGGATAACCGCGTTTACTATTGTGCTCGCACTGTCCCAGGTTATAGCACTG
CACCTACTTTGATCTGTGGGGGCAGGGCACTCTGGTCAACCGTCTCGAGTTGA

b) 중쇄 A26-645(gH5)를 코딩하는 DNA(서열 번호 26)

GAGGTGCAGCTCGTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCG
TCTCTTGTGTGCAGCAAGCGGTTTACGTTACCAACTACGGTATCCACTGGATTCTGT
CAGGCACCAGGTAAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCCGTCTGGTGGTCTG
ACGTACTACCGTGACTCTGTCAAAGGTCTTTCACCATCTCTCGTGATGACGCGAAA
AACTCTCCGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTGCAGAAAGATAACCGCAGTGTA
TGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATCTTCGACTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTAACT
GTCTCAAGCGCTTCTACAAAGGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAG
AGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA
ACCGGTGACGGTGTCTGTGGAATCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCC
CGGCTGTCTACAGTCTCTGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT
CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC
ACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTTCGGAGGTGGCGGTTCCGG
AGGTGGCGGTACCGGTGGCGGTGGATCCGAAGTCCAGCTGCTTGAATCCGGAGGCG
GACTCGTGCAGCCCGGAGGCAGTCTTCGCTTGTCTGCGCTGTATCTGGAATCGACC
TGAGCAATTACGCCATCAACTGGGTGAGACAGGCACCTGGGAAATGCCTCGAATGG
ATCGGCATTATATGGGCTAGTGGGACGACCTTTTATGCTACATGGGCGAAGGGTAGA
TTCACAATCTCAGGGGATAATAGTAAGAACACAGTGTACCTGCAGATGAACTCCCTG
CGAGCAGAGGATAACCGCGTTTACTATTGTGCTCGCACTGTCCCAGGTTATAGCACT
GCACCTACTTTGATCTGTGGGGGCAGGGCACTCTGGTCAACCGTCTCGAGTTGA

도면25

a) B72.3 선도 서열을 포함하는 경쇄 A26-645(gL4)를 코딩하는 DNA(서열 번호 27)

ATGTCAGTTCACACAGGTGCTGGGCCTGCTTCTGTTGTGGCTCACCGATGCTAGG
TGTGATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGT
 GTGACTATTACCTGTCGTGCAACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAG
 CAGAAACCGGGTAAAGCGCCAAAACCTCTGATCTACAACGCGAAGACTCTGCATAC
 CGGTGTTCCGTCTCGTTTCTCTGCGTCTGGTTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATC
 TCCTCTCTGCAGCCGGAAGATTTTCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTAC
 CCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAAGTTGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCA
 TCTGTCTTCATCTTCCCCCATCTGATGAGCAGTTGAAGTCTGGCACTGCCTCTGTTG
 TGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCTAGAGAGGCCAAAGTCCAGTGGAAGGTGGAT
 AACGCCCTTCAATCCGGAAGTCCAGGAGAGTGTCACTGAGCAGGACTCAAAGGA
 CTCCACCTATAGCCTTAGCAGCACACTGACACTGAGCAAGGCTGACTACGAGAAAC
 ACAAGGTCTACGCCTGCGAAGTGACACATCAAGGCCTGAGCTACCCGTGACAAAG
 AGCTTTAACAGGGGAGAGTGTGGTGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGTGGCTCCGGAGG
 CGGAGGAAGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCCTCTGTAAGCGCCAGTGTCTG
 GAGACAGAGTGACTATTACCTGCCAAAGCTCCCTTCAGTCTGGTCCAATTTTCTAT
 CCTGGTACCAGCAAAGCCCGAAAGGCTCCTAAATTGCTGATCTACGAAGCAAGC
 AAACCTACCAGCGGCGTGCCAGCAGGTTACGCGGCAGTGGGTCTGGAAGTGAAGT
 TACCCTGACAATCTCCTCACTCCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTATTACTGCGGTGG
 AGGTTACAGTAGCATAAGTGATACGACATTTGGATGCGGCACTAAAGTGGAATCA
 AGCGTACCTGA

b) 경쇄 A26-645(gL4)를 코딩하는 DNA(서열 번호 28)

GATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGT
 GACTATTACCTGTCGTGCAACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCA
 GAAACCGGGTAAAGCGCCAAAACCTCTGATCTACAACGCGAAGACTCTGCATACCG
 GTGTTCCGTCTCGTTTCTCTGCGTCTGGTTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATCTC
 CTCTCTGCAGCCGGAAGATTTTCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCC
 ACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAAGTTGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATC
 TGTCTTTCATCTTCCCCCATCTGATGAGCAGTTGAAGTCTGGCACTGCCTCTGTTGTG
 TGCCTGCTGAATAACTTCTACCCTAGAGAGGCCAAAGTCCAGTGGAAGGTGGATAA
 CGCCCTTCAATCCGGAAGTCCAGGAGAGTGTCACTGAGCAGGACTCAAAGGACT
 CCACCTATAGCCTTAGCAGCACACTGACACTGAGCAAGGCTGACTACGAGAAACAC
 AAGGTCTACGCCTGCGAAGTGACACATCAAGGCCTGAGCTACCCGTGACAAAGAG
 CTTTAACAGGGGAGAGTGTGGTGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGTGGCTCCGGAGGCG
 GAGGAAGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCCTCTGTAAGCGCCAGTGTGCGA
 GACAGAGTGACTATTACCTGCCAAAGCTCCCTTCAGTCTGGTCCAATTTTCTATCCT
 GGTACCAGCAAAAAGCCCGGAAGGCTCCTAAATTGCTGATCTACGAAGCAAGCAAA
 CTCACCAGCGGCGTGCCAGCAGGTTACGCGGCAGTGGGTCTGGAAGTGAAGTGAAGT
 CTGACAATCTCCTCACTCCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTATTACTGCGGTGGAGGT
 TACAGTAGCATAAGTGATACGACATTTGGATGCGGCACTAAAGTGGAATCAAGCG
 TACCTGA

도면26a

(a) 항-알부민 항체(ds 아님)의 중쇄 가변 도메인(서열 번호 29)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGHIWASGTTFY
ATWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGL
VTVSS

(b) 항-알부민 항체(ds)의 중쇄 가변 도메인(서열 번호 30)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGHIWASGTTFYA
TWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLV
TVSS

(c) 항-알부민 항체(ds 아님)의 경쇄 가변 도메인(서열 번호 31)

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGGGYSSISDTTFGGGTKVEIKRT

(d) 항-알부민 항체(ds)의 경쇄 가변 도메인(서열 번호 32)

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGGGYSSISDTTFGCGTKVEIKRT

(e) 링커 1 (서열 번호 33) SGGGSGGGGTGGGGS

(f) 링커 2 (서열 번호 34) GGGSGGGSGGGGS

알부민에 특이적인 645 gH5gL4(서열 번호 35)

GAGGTTACAGCTGCTGGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCAGCCTGGAGGGAGCCTGCG
TCTCTCTTGTCAGTAAGCGGCATCGACCTGTCCAACTACGCGATTAAGTGGGTACG
TCAGGCACCGGGTAAAGGTCTGGAATGGATCGGCATCATCTGGGCCTCTGGTACGA
CCTTCTACGCTACTTGGGCCAAAGGTCGTTTCACCATCTCCCGTGACAACCTCTAAAA
ACACCGTGTAACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTGCGGAAGACACTGCGGTTTACTATT
GCGCGCGTACCGTTCGGGCTATTCTACTGCACCGTACTTCGACCTGTGGGGTCAGG
GTAATCTGGTTACCGTCTCGAGTGAGGTGGCGGTCTTGCGGTGGCGGTTCGGGTG
GCGGTGGATCGGGAGGTGGCGGTCTGATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGT
GTTTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTATTACCTGTCAGTCCTCTCCGAGCGTTT
GGTCCAACCTTCCTGAGCTGGTACCAGCAGAAACCGGGTAAAGCCCCGAAACTGCTG
ATCTACGAGGCGTCTAAACTGACCTCTGGGTGACCGTCCCGTTTCTCTGGCTCTGGCT
CTGGTACGGAATTCCTCTGACCATCTCTCTCTGACCCGGAAGACTTTGCAACGT
ACTACTGCGGTGGTGGTTACTCTTCCATCTCTGACACCACGTTCCGGTGGAGGCACCA
AAGTTGAAATCAAACGTACGCATCACCATCACCATCACCATCACCATCAC

도면26b

알부민에 특이적인 645 gH5gL4(서열 번호 36)

```
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTTFY
ATWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGT
LVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCQSSPSVWSN
FLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLQPEDFATYY
CGGGYSISDITFGGGTKVEIKRTHHHHHHHHHHH
```

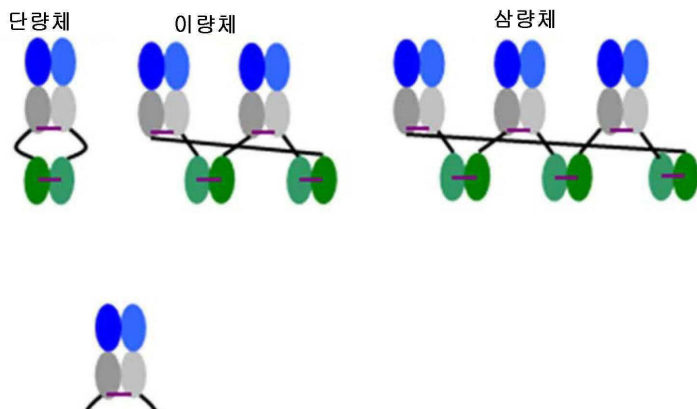
알부민에 특이적인 645 gH5gL4ds(서열 번호 37)

```
GAGGTT CAGCTGCTGGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCAGCCTGGAGGGAGCCTGCG
TCTCTCTTGTCAGTAAGCGGCATCGACCTGTCCAACACGCGATTAAC TGGGTACG
TCAGGCACCGGGTAAATGCCTGGAATGGATCGGCATCATCTGGGCCTCTGGTACGAC
CTTCTACGCTACTTGGGCCAAAGGTCGTTTCACCATCTCCCGTGACAAC TCTAAAA
CACCGTGTACCTGCAGATGAAC TCTCTGCGTGCGGAAGACACTGCGGTTTACTATTG
CGCGCGTACCGTTCCGGGTATTCTACTGCACCGTACTTCGACCTGTGGGGTCAGGG
TACTCTGGTTACCGTCTCGAGTGGAGGTGGCGGTTCTGGCGGTGGCGGTTCCGGTG
CGGTGGATCGGGAGGTGGCGGTTCTGATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTG
TTTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTATTACCTGTCAGTCCTCTCCGAGCGTTTG
GTCCAAC TCTCTGAGCTGGTACCAGCAGAAAACCGGGTAAAGCCCCGAAACTGCTGA
TCTACGAGGCGTCTAAACTGACCTCTGGTGTACCGTCCC GTTTCTCTGGCTCTGGCTC
TGGTACGGA CTCTACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCGGAAGACTTTGCAACGTA
CTACTGCGGTGGTGGTTACTCTTCCATCTCTGACACCACGTTTCGGTTGTGGCACCAA
AGTTGAAATCAAACGTACGCATCACCATCACCATCACCATCACCATCAC
```

알부민에 특이적인 645 gH5gL4ds(서열 번호 38)

```
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTFYA
TWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGT
LVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCQSSPSVWSN
FLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLQPEDFATYY
CGGGYSSISDITFGCGTKVEIKRTHHHHHHHHHHH
```

도면27



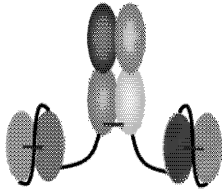
Fab = 중쇄와 경쇄 사이에 디설파이드 결합 및 dsFv에 연결하기
위한 중쇄와 경쇄의 불변 영역의 C-말단에 연결된 링커를 갖는
Fab의 중쇄와 경쇄



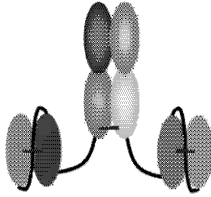
dsFv = 디설파이드 안정화 Fv 및 Fab에 연결하기 위한 링커

도면28

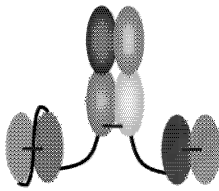
Fab-2x dsscFv 포맷 및 Fab-dsscFv-dsFv 포맷



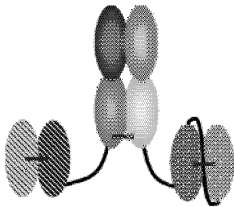
Fab#2-(HC)-dsscFv#3-(LC)-dsscFv#4



Fab#2-(LC)-dsscFv#3-(HC)-dsscFv#4

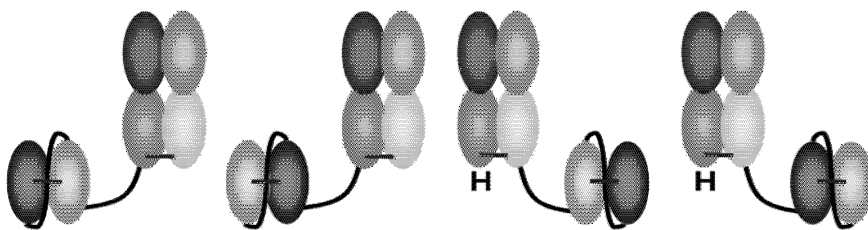


Fab-(HC)dsFv-(LC)dsscFv



Fab-(HC)dsFv-(LC)dsscFv

도면29



Fab(HC)-LHDsscFv

Fab(HC)-HLDsscFv

Fab(LC)-LHDsscFv

Fab(LC)-HLDsscFv

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> UCB Biopharma SPRL

<120> Method

<130> PF0018WO

<150>

<151>

<160> 90

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> CDRH1

<400> 1

Asn Tyr Gly Ile His

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> CDRH2

<400> 2

Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> CDRH3

<400> 3

Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr

1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> CDRL1

<400> 4

Arg Ala Thr Gln Ser Ile Tyr Asn Ala Leu Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> CDRL2

<400> 5

Asn Ala Asn Thr Leu His Thr

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> CDRL3

<400> 6

Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 7

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Light chain variable region of antibody A26

<400> 7

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 Thr Gln Ser Ile Tyr Asn Ala

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

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

100 105

<210> 8

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Heavy chain variable region of antibody A26

<400> 8

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Pro 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 Thr Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 9

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Light chain of anti-0X40 antibody Fab component

<400> 9

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 Thr Gln Ser Ile Tyr Asn Ala

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 10

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Heavy chain of anti-0X40 antibody Fab component

<400> 10

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Ile His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Pro 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 Thr Gly Gly Glu Gly Ile 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
210 215 220

<210> 11

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Heavy chain of anti-albumin Fv component

<400> 11

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 Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr

20 25 30

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
50 55 60

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 12

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Light chain of anti-albumin Fv component

<400> 12

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile

85 90 95

Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr

100 105 110

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker 1

<400> 13

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker 2

<400> 14

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

1 5 10 15

<210> 15

<211> 357

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> A26 Fab Heavy-(G4S,G4T,G4S)-645dsFv(gH5)

<400> 15

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Pro 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 Thr Gly Gly Glu Gly Ile 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 Ser Gly Gly Gly

210 215 220

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu

225 230 235 240

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

245 250 255

Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn Trp

260 265 270

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

275 280 285

Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr

290 295 300

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Val Thr Val Ser Ser

355

<210> 16

<211> 341

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> A26 Fab Light-(3xG4S)-645dsFv(gL4)

<400> 16

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 Thr Gln Ser Ile Tyr Asn Ala

20 25 30

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

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

 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 210 215 220
 Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val

 225 230 235 240
 Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro
 245 250 255
 Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 260 265 270
 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val
 275 280 285

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

290 295 300

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly

305 310 315 320

Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val

325 330 335

Glu Ile Lys Arg Thr

340

<210> 17

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 645gH1 heavy chain variable domain

<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 Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Thr Thr Val Tyr Leu Gln Met

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 18

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 645gL1 light chain variable domain

<400> 18

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

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

<210> 19

<211> 355

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> A26 Fab Heavy-(3xG4S)-645dsFv(gH1)

<400> 19

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Pro 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 Thr Gly Gly Glu Gly Ile 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 Ser Gly Gly Gly

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn Trp

260 265 270

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

275 280 285

Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr

290 295 300

Ile Ser Arg Asp Ser Thr Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg

305						310						315						320
Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Thr	Val	Pro	Gly	Tyr			
					325						330						335	
Ser	Thr	Ala	Pro	Tyr	Phe	Asp	Leu	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr			
					340						345						350	
Val	Ser	Ser																
					355													
<210>	20																	
<211>	340																	
<212>	PRT																	
<213>	Artificial																	
<220><223>	A26 Fab Light-(3xG4S)-645dsFv(gL1)																	
<400>	20																	
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	Thr	Gln	Ser	Ile	Tyr	Asn	Ala			
					20						25						30	
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile			
					35						40						45	
Tyr	Asn	Ala	Asn	Thr	Leu	His	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Ala			
					50						55						60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro			
65					70					75					80			
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Pro	Leu			
					85						90						95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala			
					100						105						110	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly			
					115						120						125	
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala			
					130						135						140	

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly

305 310 315 320

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

325 330 335

Val Glu Ile Lys

340

<210> 21

<211> 1137

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Heavy chain A26-645(gh5) including E.coli OmpA leader

<400> 21

atgaagaaga ctgctatagc gatcgagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa 60
gctgaagttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgctc agcctggagg gaggctgctt 120
ctctcttggt cagcaagcgg ttccacgttc accaactacg gtatccactg gattcgtcag 180
gcaccaggta aaggtctgga atgggtagcc tctatctctc cgtctggtgg tctgacgtac 240
taccgtgact ctgtcaaagg tcgtttcacc atctctcgtg atgacgcgaa aaactctccg 300
tacctgcaaa tgaactctct gcgtgcagaa gataccgcag tgtactactg cgctactggt 360

ggatgaagga tcttcgacta ctgggggtcag ggtaccctgg taactgtctc gagcgcttct 420
acaaagggcc caagcgtttt cccactggct ccgtcctcta aatccacctc tgggtgtacg 480
gctgcactgg gttgcctggt gaaagactac ttcccagaac cagtaccgt gtcttggaac 540
tctggtgcac tgacctctgg tgttcacacc ttccagcag ttctccagtc ttctggtctg 600
tactccctgt ctacgtggtt taccgttccg tcttcttctc tgggtactca gacctacatc 660
tgcaacgtca accacaaacc gtccaacacc aaggtcgaca aaaaagtcga gccgaaatcc 720
tgtagtggag gtgggggctc aggtggaggc gggaccggtg gaggtggcag cgaggttcaa 780

ctgcttaggt ctggaggagg cctagtccag cctggaggga gcctgcgtct ctcttggtca 840
gtaagcggca tcgacctgag caattacgcc atcaactggg tgagacaagc tccggggaag 900
tgtttagaat ggatcggtat aatatgggcc agtgggacga ccttttatgc tacatgggcg 960
aaaggaaggt ttacaattag ccgggacaat agcaaaaaca ccgtgtatct ccaaatgaac 1020
tccttgcgag cagaggacac ggcggtgtac tattgtgctc gcactgtccc aggttatagc 1080
actgcacctt acttcgatct gtggggacaa gggaccctgg tgactgtttc aagttaa 1137

<210> 22

<211> 1074

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Heavy chain A26-645(gH5)

<400> 22

gaagttcagc tggtcgagtc tggaggcggg ctgttcagc ctggaggag cctgcgtctc 60
tcttggtcag caagcgggtt cacgttcacc aactacggtt tccactggat tcgtcaggca 120
ccaggtaaag gtctggaatg ggtagcctct atctctccgt ctggtggtct gacgtactac 180
cgtgactctg tcaaaggtcg ttccaccatc tctcgtgatg acgcgaaaaa ctctccgtac 240
ctgcaaatga actctctcgc tgcagaagat accgcagtgt actactgcgc tactggtggt 300

gaaggatatct tcgactactg gggtcagggt accctggtaa ctgtctcgag cgctttctaca 360

aagggcccaa gcgttttccc actggtccg tcctctaaat ccacctctgg tggtagcgct 420

gcactgggtt gcctggtgaa agactacttc ccagaaccag ttaccgtgtc ttggaactct 480

ggtgcactga cccttggtgt tcacaccttt ccagcagttc tccagtcttc tggctgtac 540

tcctgtctga gcgtgggtac cgttccgtct tcttctctgg gtactcagac ctacatctgc 600

aacgtcaacc acaaaccgtc caacaccaag gtcgacaaaa aagtcgagcc gaaatcctgt 660

agtggagggtg ggggctcagg tggaggcggg accggtggag gtggcagcga ggttcaactg 720

cttgagtctg gaggaggcct agtcacgcct ggaggagacc tgcgtctctc ttgtgcagta 780

agcggcatcg acctgagcaa ttacccatc aactgggtga gacaagctcc ggggaagtgt 840

ttagaatgga tcggtataat atgggccagt gggacgacct tttatgtac atgggcgaaa 900

ggaaggttta caattagccg ggacaatagc aaaaacaccg tgtatctcca aatgaactcc 960

ttgcgagcag aggacacggc ggtgtactat tgtgtcgcga ctgtcccagg ttatagcact 1020

gcaccctact tcgatctgtg gggacaaggg accctgggtga ctgtttcaag ttaa 1074

<210> 23

<211> 1089

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Light chain A26-645(gL4) including E.coli OmpA leader

<

400> 23

atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gcgttggctg gtttcgcgac cgttgcgcaa 60

gctgatatcc agatgaccca gagcccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg 120

actattacct gtcgtgcaac ccagagcatc tacaacgctc tggettggtg tcagcagaaa 180

ccgggtaaaag cgccaaaact cctgatctac aacgcgaaca ctctgcatac tgggtgttccg 240

tctcgtttct ctgcgtctgg ttctgggtacg gactctactc tgaccatctc ctctctccag 300

ccggaagatt tcgcgacctc ctactgccag cagtactacg attaccact gacgtttggt 360

ggtggtacca aagttgagat caaacgtacg gttgcagctc catccgtctt catctttcca 420

ccgtctgacg aacagctcaa atctgggtact gcttctgtcg tttgctcct gaacaacttc 480

tatccgcgtg aagcgaaagt ccagtggaaa gtcgacaacg cactccagtc tggtaactct 540

caggaatctg tgaccgaaca ggactccaaa gactccacct actctctgtc tagcaccctg 600

actctgtcca aagcagacta cgagaaacac aaagtgtacg cttgcgaagt tacccatcag 660

ggtctgagct ctccggttac caaatccttt aatagagggg agtgtggtgg cggtagcagt 720

ggtaggtggag gticcggagg tggcgggttca gacatacaaa tgacccagag tccttcatcg	780
glatccgcgt ccgttggcga tagggtgact attacatgtc aaagctctcc tagcgtctgg	840
agcaattttc tatcctggta tcaacagaaa ccggggaagg ctccaaaact tctgatttat	900
gaagcctcga aactcaccag tggagtccg tcaagattca gtggctctgg atcagggaca	960
gacttcacgt tgacaatcag ttgcctgcaa ccagaggact ttgcgaccta ctatttgtgt	1020
ggaggttaca gtagcataag tgatacgaca ttgggtgcg gtactaaggt ggaaatcaaa	1080
cgtacctaa	1089
<210> 24	
<211> 1026	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Light chain A26-645(gL4)	
<400> 24	
gatatccaga tgacccagag cccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tctgtgact	60
attacctgtc gtgcaacca gagcatctac aacgctctgg cttggtatca gcagaaaccg	120
ggtaaagcgc caaaactcct gatctacaac gcgaacactc tgcatactgg tgttccgtct	180
cgtttctctg cgtctggttc tggtagggac tctactctga ccatctctc tctccagccg	240
gaagatttcg cgacctacta ctgccagcag tactacgatt acccactgac gtttggtggt	300
ggtaccaaag ttgagatcaa acgtacggtt gcagctccat ccgtcttcat ctttccaccg	360
tctgacgaac agctcaaate tggtagtctg tctgtcgttt gcctcctgaa caacttctat	420
ccgcgtgaag cgaaagtcca gtggaaagtc gacaacgcac tccagtctgg taactctcag	480
gaatctgtga ccgaacagga ctccaaagac tccacctact ctctgtctag caccctgact	540
ctgtccaaag cagactacga gaaacacaaa gtgtacgctt gcgaagttac ccatcagggt	600
ctgagctctc cggttaccaa atcctttaat agaggggagt gtggtggcgg tggcagtgg	660
ggtggagggt ccggagggtg cggttcagac atacaaatga cccagagtcc ttcacggta	720
tccgcgtccg ttggcgatag ggtgactatt acatgtcaaa gctctcctag cgtctggagc	780
aattttctat cctggtatca acagaaaccg gggaaggctc caaaacttct gatttatgaa	840
gcctcgaaac tcaccagtgg agttccgtca agattcagtg gctctggatc agggacagac	900
ttcacgttga caatcagttc gctgcaacca gaggactttg cgacctacta ttgtggtgga	960
ggttacagta gcataagtga tacgacattt gggtgcggtg ctaagggtgga aatcaaacgt	1020
acctaa	1026

<210> 25

<211> 1131

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Heavy chain A26-645(gH5) including B72.3 leader sequence

<400> 25

atggaatggt cctgggtctt cctgtttttc ctttctgtca caaccggggt gcacagcgag 60
gtgcagctcg tcgagtcctg aggcgggctt gtccagcctg gagggagcct gcgtctctct 120

tgtgcagcaa gcggtttcac gttcaccaac tacggtatcc actggattcg tcaggcacca 180
ggtaaagggtc tggaaatgggt agcctctatc tctccgtctg gtggtctgac gtactaccgt 240
gactctgtca aaggctgttt caccatctct cgtgatgacg cgaaaaaactc tccgtacctg 300
cagatgaact ctctgcgtgc agaagatacc gcagtgtact actgcgtac tgggtggtgaa 360
ggatatcttcg actactgggg tcagggtacc ctggttaactg tctcaagcgc ttctacaaag 420
ggcccatcgg tcttccccct ggccacctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 480
ctgggctgcc tggtaagga ctactcccc gaaccggtga cgggtctctg gaactcaggc 540

gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctctgg actctactcc 600
ctcagcagcg tggtagccgt gccctccagc agcttgggca cccagacctc catctgcaac 660
gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgttcc 720
ggaggtggcg gttccggagg tggcgggtacc ggtggcgggtg gatccgaagt ccagctgctt 780
gaatccggag gcggactcgt gcagcccga ggaggtcttc gcttgtcctg cgctgtatct 840
ggaatcgacc tgagcaatta cgccatcaac tgggtgagac aggcacctgg gaaatgcctc 900
gaatggatcg gcattatatg ggctagtggg acgacctttt atgctacatg ggcgaagggt 960

agattcacia tctcacggga taatagtaag aacacagtgt acctcagat gaactccctg 1020
cgagcagagg ataccgccgt ttactattgt gctcgactg tcccagggtta tagcactgca 1080
ccctactttg atctgtgggg gcagggcact ctggtcaccg tctcgagttg a 1131

<210> 26

<211> 1074

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Heavy chain A26-645(gH5)

<400> 26

gaggtgcagc tcgtcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggag cctgcgtctc 60

tcttgtgcag caagcggttt cacgttcacc aactacggta tccactggat tcgtcaggca 120
ccaggtaaag gtctggaatg ggtagcctct atctctccgt ctgggtgtct gacgtactac 180

cgtagactctg tcaaaggctg ttccaccatc tctcgtgatg acgcgaaaaa ctctccgtac 240
ctgcagatga acitctctgcg tgcagaagat accgcagtgt actactgcgc tactgggtgt 300
gaaggatatct tcgactactg gggtcagggt accctggtaa ctgtctcaag cgcttctaca 360
aagggcccat cggtcttccc cctggcaccc tctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 420
gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 480
ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggtgtcc tacagtctc tggactctac 540
tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 600

aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 660
tccggagggtg gcggttccgg aggtggcgggt accggtggcg gtggatccga agtccagctg 720
cttgaatccg gaggcggact cgtgcagccc ggaggcagtc ttcgcttgtc ctgcgctgta 780
tctggaatcg acctgagcaa ttacccatc aactgggtga gacaggcacc tgggaaatgc 840
ctcgaatgga tcggcattat atgggctagt gggacgacct tttatgctac atgggcgaag 900
ggtagattca caatctcacg ggataatag tagaacacag tgtacctgca gatgaactcc 960
ctgcgagcag aggataccgc cgtttactat tgtgtctgca ctgtcccagg ttatagcact 1020

gcacctact ttgatctgtg ggggcagggc actctggtca ccgtctcgag ttga 1074

<210> 27

<211> 1086

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Light chain A26-645(gL4) including B72.3 leader sequence

<400> 27

atgtcagttc ccacacaggt gctgggcctg cttctgttgt ggctaccga tgctaggtgt 60
gatatccaga tgacctagag tccaagcagt ctctcccca gcgtaggcga tcgtgtgact 120
attacctgtc gtgcaacca gagcatctac aacgctctgg cttggatatca gcagaaaccg 180
ggtaaagcgc caaaactcct gatctacaac gcgaacactc tgcataccgg tgttccgtct 240

cgtttctctg cgictgggtc tggtagcgac tctactctga ccatctctc tctgcagccg 300
gaagatttcg cgacctacta ctgccagcag tactacgatt acccactgac gtttgggtgt 360
ggtaccaaaag ttgatgcaa acgtacgggtg gctgcacat ctgtcttcat cttccccca 420
tctgatgagc agttgaagtc tggcactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctac 480

cctagagagg ccaaagtcca gtggaagggtg gataacgccc ttcaatccgg aaactcccag	540
gagagtgtca ctgagcagga ctcaaaggac tccacctata gccttagcag cacactgaca	600
ctgagcaagg ctgactacga gaaacacaag gtctacgcct gcgaagtgtac acatcaaggc	660
ctgagctcac ccgtgacaaa gagctttaac aggggagagt gtggtggagg tggctctggc	720
ggtggtggct ccggaggcgg aggaagcgac atccagatga cccagagccc ttcctctgta	780
agcgccagtgt tcggagacag agtgactatt acctgcaaaa gctccccttc agtctggtec	840
aattttctat cctggtacca gcaaaagccc ggaaaggctc ctaaattgct gatctacgaa	900
gcaagcaaac tcaccagcgg cgtgcccgac aggttcagcg gcagtgggtc tggaaactgtac	960
tttaccttga caatctctc actccagccc gaggacttcg ccacctatta ctgcggtgga	1020
ggttacagta gcataagtga tacgacattt ggatgcggca ctaaagtgtga aatcaagcgt	1080
acctga	1086
<210> 28	
<211> 1026	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Light chain A26-645(gL4)	
<400> 28	
gatatccaga tgaccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact	60
attacctgtc gtgcaaccca gagcatctac aacgctctgg cttggtatca gcagaaaccg	120
ggtaaagcgc caaaactcct gatctacaac gcgaacactc tgcataccgg tgttcggtct	180
cgtttctctg cgtctgggtc tggtagcgac tctactctga ccatctctc tctgcagccg	240
gaagatttcg cgacctacta ctgccagcag tactacgatt acccactgtac gtttggtggt	300
ggtaccaaag ttgagatcaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttccccca	360
tctgatgagc agttgaagtc tggcactgcc tctgttgtgt gcctgtgtaa taacttctac	420
cctagagagg ccaaagtcca gtggaagggtg gataacgccc ttcaatccgg aaactcccag	480
gagagtgtca ctgagcagga ctcaaaggac tccacctata gccttagcag cacactgaca	540
ctgagcaagg ctgactacga gaaacacaag gtctacgcct gcgaagtgtac acatcaaggc	600
ctgagctcac ccgtgacaaa gagctttaac aggggagagt gtggtggagg tggctctggc	660
ggtggtggct ccggaggcgg aggaagcgac atccagatga cccagagccc ttcctctgta	720
agcgccagtgt tcggagacag agtgactatt acctgcaaaa gctccccttc agtctggtec	780
aattttctat cctggtacca gcaaaagccc ggaaaggctc ctaaattgct gatctacgaa	840

gcaagcaaac tcaccagcgg cgtgcccagc aggttcagcg gcagtgggtc tggaactgac 900
 ttaccctga caatctcctc actccagccc gaggacttcg ccacctatta ctgcggtgga 960
 ggttacagta gcataagtga tacgacattt ggatgcggca ctaaagtgga aatcaagcgt 1020
 acctga 1026

<210> 29

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Heavy chain variable domain of anti-albumin antibody (no ds)

<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 Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys

50 55 60

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

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

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 30

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Heavy chain variable domain of anti-albumin antibody (ds)

<400> 30

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

Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val 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
 Arg Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 31

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Light chain variable domain of anti-albumin antibody (no ds)

<400> 31

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

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile

85

90

95

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

100

105

110

<210> 32

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Light chain variable domain of anti-albumin antibody (ds)

<400> 32

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

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile

85

90

95

Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr

100

105

110

<210> 33

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker 1

<400> 33

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

10

15

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker 2

<400> 34

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

1 5 10 15

<210> 35

<211> 789

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> 645 gH5gL4

<400> 35

gaggttcagc tgctggagtc tggaggcggg ctgtgccagc ctggaggag cctgcgtctc 60

tcttgtgcag taagcggcat cgacctgtcc aactacgcga ttaactgggt acgtcaggca 120

ccgggtaaag gtctggaatg gatcggcatc atctgggcct ctggtacgac cttctacgct 180

acttgggcca aaggtcggtt caccatctcc cgtgacaact ctaaaaacac cgtgtacctg 240

cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcgggtttact attgcgcgcg taccgttccg 300

ggctattcta ctgcaccgta cttcgacctg tggggtcagg gtactctggt taccgtctcg 360

agtggaggtg gcggttctgg cgggtggcgg tccggtggcg gtggatcggg aggtggcgg 420

tctgatatcc agatgaccca gagtccaagc agtgtttccg ccagcgtagg cgatcgtgtg 480

actattacct gtcagtcctc tccgagcgtt tgggtccaact tcctgagctg gtaccagcag 540

aaaccgggta aagccccgaa actgctgac tacgagcgt ctaaaactgac ctctggtgta 600

ccgtcccgtt tccttggtc tggctctggt acggacttca ctctgacct ctcctctctg 660

cagccggaag actttgcaac gtactactgc ggtggtggtt actcttccat ctctgacacc 720

acgttcggtg gaggcaccaa agttgaaatc aaacgtacgc atcaccatca ccatcaccat 780

caccatcac 789

<210> 36

<211> 263

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 645 gH5gL4

<400> 36

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 Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys

50 55 60

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

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

100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln

130 135 140

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

145 150 155 160

Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225	230	235	240
Thr	Phe	Gly	Gly
Gly	Thr	Lys	Val
Glu	Ile	Lys	Arg
Thr	His	His	His
245	250	255	
His	His	His	His
His	His	His	His
260			
<210>	37		
<211>	789		
<212>	DNA		
<213>	Artificial		
<220><223>	645	gH5gL4ds	
<400>	37		
gaggttcagc	tgctggagtc	tggaggcggg	ctgtgccagc
ctggaggggag	cctgcgtctc		60
tcttgtgcag	taagcggcat	cgacctgtcc	aactacgcga
ttaactgggt	acgtcaggca		120
ccgggtaaat	gcctggaatg	gateggcatc	atctgggcct
ctggtacgac	cttctacgt		180
acttgggcca	aaggtcgttt	caccatctcc	ctgacaact
ctaaaaacac	cggtacctg		240
cagatgaact	ctctgcgtgc	ggaagacact	gcggtttact
attgcgcgcg	taccgttccg		300
ggctattcta	ctgcaccgta	cttcgacctg	tggggtcagg
gtactctggt	taccgtctcg		360
agtggagggtg	gcggttctgg	cgggtggcgg	tccggtggcg
gtggatcggg	aggtggcgg		420
tctgatatcc	agatgaccga	gagtccaagc	agtgtttccg
ccagcgtagg	cgatcgtgtg		480
actattacct	gtcagtcctc	tccgagcggt	tgggtccaact
tctgagctg	gtaccagcag		540
aaaccgggta	aagccccgaa	actgctgata	tacgaggcgt
ctaaactgac	ctctggtgta		600
ccgtcccgtt	tctctggctc	tggctctggt	acggacttca
ctctgacat	ctctctctg		660
cagccggaag	actttgcaac	gtactactgc	gggtgtggtt
actcttccat	ctctgacacc		720
acgttcgggt	gtggcaccaa	agttgaaatc	aaacgtacgc
atcaccatca	ccatcaccat		780
caccatcac			789
<210>	38		
<211>	263		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220><223>	645	gH5gL4ds	
<400>	38		
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 Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val 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
 Arg Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln
 130 135 140

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

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

His His His His His His His

260

<210> 39

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Hinge Linker

<400> 39

Asp Lys Thr His Thr Cys Ala Ala

1 5

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Hinge Linker

<400> 40

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10

<210> 41

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Hinge Linker

<400> 41

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys

1 5 10 15

Pro Ala

<210> 42

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Hinge Linker

<400> 42

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys

1 5 10 15

Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

20 25

<210> 43

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Hinge Linker

<400> 43

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

1 5 10 15

Tyr Asn Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr

20 25 30

<210> 44

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Hinge Linker

<400> 44

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

1 5 10 15

Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly Thr Cys Tyr

20 25 30

<210> 45

<211> 15

<212> PRT

<213>

Artificial

<220><223> Hinge Linker

<400> 45

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

1 5 10 15

<210> 46

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Hinge Linker

<400> 46

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

1 5 10 15

Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala

20 25

<210> 47

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Hinge Linker

<400> 47

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Ser Cys Pro Ala

1 5 10

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 48

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu

1 5

<210> 49

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 49

Asp Lys Thr His Thr Ser

1 5

<210> 50

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 50

Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 51

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 51

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 52

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 52

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

1 5 10 15

<210> 53

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 53

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser

20

<210> 54

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 54

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20 25

<210> 55

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 55

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Gly Ala Ser Ala Ser

1 5 10

<210> 56

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 56

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser

1 5 10 15

<210> 57

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial
 <220><223> Linker
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <400> 57
 Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Gly Ala Ser Ala Ser
 20
 <210> 58
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220><223> Linker
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <400> 58
 Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser
 20 25
 <210> 59

<211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Linker
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <400> 59
 Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser

1	5	10	15
Xaa Gly Gly Gly Ser	Xaa Gly Gly Gly Ser	Gly Ala Ser Ala Ser	
20	25	30	

<210> 60
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Linker
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <400> 60
 Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Ser Gly Ala Ser Ala Ser

1	5	10
<210> 61		

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 61

Pro Gly Gly Asn Arg Gly Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr

1 5 10 15

Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr Gln Ser His Tyr

20 25

<210> 62

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 62

Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr

1 5 10

<210> 63

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 63

Ala Thr Thr Thr Gly Ser

1 5

<210> 64

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 64

Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Ser Pro Pro Ser Lys Glu

1 5 10 15

Ser His Lys Ser Pro

20

<210> 65

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 65

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

1 5 10 15

<210> 66

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 66

Gly Gly Gly Gly Ile Ala Pro Ser Met Val Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 67

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 67

Gly Gly Gly Gly Lys Val Glu Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 68

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 68

Gly Gly Gly Gly Ser Met Lys Ser His Asp Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 69

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 69

Gly Gly Gly Gly Asn Leu Ile Thr Ile Val Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 70

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 70

Gly Gly Gly Gly Val Val Pro Ser Leu Pro Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 71

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 71

Gly Gly Glu Lys Ser Ile Pro Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 72

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 72

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

1 5 10 15

Arg Pro

<210> 73

<211

> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 73

Tyr Pro Arg Ser Ile Tyr Ile Arg Arg Arg His Pro Ser Pro Ser Leu

1 5 10 15

Thr Thr

<210> 74

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 74

Thr Pro Ser His Leu Ser His Ile Leu Pro Ser Phe Gly Leu Pro Thr

1 5 10 15

Phe Asn

<210> 75

<211> 18

<212> PRT

<213

> Artificial

<220><223> Linker

<400> 75

Arg Pro Val Ser Pro Phe Thr Phe Pro Arg Leu Ser Asn Ser Trp Leu

1 5 10 15

Pro Ala

<210> 76

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 76

Ser Pro Ala Ala His Phe Pro Arg Ser Ile Pro Arg Pro Gly Pro Ile

1 5 10 15

Arg Thr

<210> 77

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223>

> Linker

<400> 77

Ala Pro Gly Pro Ser Ala Pro Ser His Arg Ser Leu Pro Ser Arg Ala

1 5 10 15

Phe Gly

<210> 78

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 78

Pro Arg Asn Ser Ile His Phe Leu His Pro Leu Leu Val Ala Pro Leu

1 5 10 15

Gly Ala

<210> 79

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 79

Met Pro Ser Leu Ser Gly Val Leu Gln Val Arg Tyr Leu Ser Pro Pro

1 5 10 15

Asp Leu

<210> 80

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 80

Ser Pro Gln Tyr Pro Ser Pro Leu Thr Leu Thr Leu Pro Pro His Pro

1 5 10 15

Ser Leu

<210> 81

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 81

Asn Pro Ser Leu Asn Pro Pro Ser Tyr Leu His Arg Ala Pro Ser Arg

1 5 10 15

Ile Ser

<210> 82

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 82

Leu Pro Trp Arg Thr Ser Leu Leu Pro Ser Leu Pro Leu Arg Arg Arg

1 5 10 15

Pro

<210> 83

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 83

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

1 5 10 15

Pro Pro

<210> 84

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 84

Val Pro Pro Ala Pro Val Val Ser Leu Arg Ser Ala His Ala Arg Pro

1 5 10 15

Pro Tyr

<210> 85

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 85

Leu Arg Pro Thr Pro Pro Arg Val Arg Ser Tyr Thr Cys Cys Pro Thr

1 5 10 15

Pro

<210> 86

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 86

Pro Asn Val Ala His Val Leu Pro Leu Leu Thr Val Pro Trp Asp Asn

1 5 10 15

Leu Arg

<210> 87

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 87

Cys Asn Pro Leu Leu Pro Leu Cys Ala Arg Ser Pro Ala Val Arg Thr

1 5 10 15

Phe Pro

<210> 88

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400>

> 88

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 89

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> linker

<400> 89

Gly Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala

1 5 10

<210> 90

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> linker

<400> 90

Pro Pro Pro Pro

1