



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0070249
(43) 공개일자 2022년05월30일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
A61P 25/28 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7013335
(22) 출원일자(국제) 2020년09월28일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년04월21일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/053064
(87) 국제공개번호 WO 2021/062361
국제공개일자 2021년04월01일
- (30) 우선권주장
62/907,275 2019년09월27일 미국(US)
62/989,327 2020년03월13일 미국(US)

- (71) 출원인
베이징 스타맵 바이오메드 테크놀로지 리미티드
중국 (우편번호: 102206) 베이징 창펑 디스트릭트
헝밍유안 로드 넘버 29 빌딩 1 룸 비213
- (72) 발명자
리양 안빈
미국 캘리포니아주 92618 어바인 바랑카 파크웨이
15375 지104-105
- (74) 대리인
특허법인명신

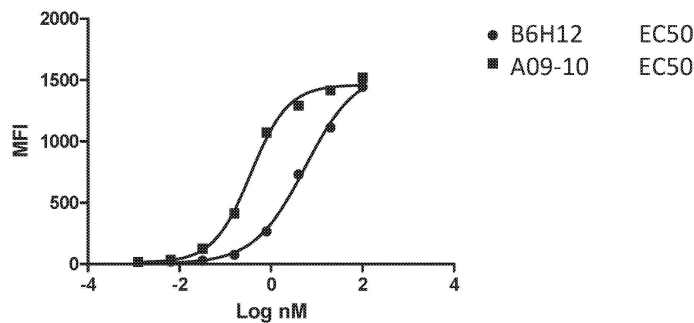
전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 단일특이적 및 다중특이적 항체

(57) 요약

CD47, PD-L1, HSA, CD33, LAG3, 및 CD16 중 하나 이상에 대해 특이성을 갖는 단일특이성 및 다중특이성 단일 사슬 항체가 본원에 개시되어 있다.

대표도 - 도1



	B6H12	A09
가장 적합한 값		
logECF	0.7478	-0.4402
HillSlope	0.7792	1.063
F	= 50.00	= 50.00
Bottom	2.834	13.05
Top	1579	1462
ECF	5.594	0.3629

(52) CPC특허분류

A61P 27/02 (2018.01)

C07K 16/18 (2013.01)

C07K 16/2827 (2013.01)

C07K 16/283 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/33 (2013.01)

C07K 2317/569 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) VHH 도메인이 서열번호 2-29 또는 223 중 하나의 아미노산 서열을 갖는 CD47;
- (b) VHH 영역이 서열번호 31-38 중 하나의 아미노산 서열을 갖는 PD-L1;
- (c) 인간 혈청 알부민(HSA), 여기서 VHH 도메인은 서열번호 40-48 중 하나의 아미노산 서열을 가짐;
- (d) VHH 도메인이 서열번호 50-78 중 하나의 아미노산 서열을 갖는 CD33;
- (e) VHH 도메인이 서열번호 80-93 중 하나의 아미노산 서열을 갖는 LAG3; 또는
- (f) VHH 도메인이 서열번호 96-99 중 하나의 아미노산 서열을 갖는 CD16, 중 하나에 대한 항원 결합 특이성을 갖는 가변 중쇄(VHH) 도메인.

청구항 2

제1항의 VHH 도메인을 포함하는 중쇄 전용 항체(HCAb).

청구항 3

제1 결합 특이성을 갖는 항체 결합 도메인 및 제1 결합 특이성과 상이한 제2 결합 특이성을 갖는 제2 항체 결합 도메인을 포함하는 다중특이적 항체에 있어서,

상기 제1 결합 특이성은 CD47, PD-L1, HSA, CD33, LAG3 또는 CD16이고;

- (a) CD47 결합 특이성은 서열번호 2-29 또는 223 중 하나의 아미노산 서열로 표시되고;
- (b) PD-L1 결합 특이성은 서열번호 31-38 중 하나의 아미노산 서열로 표시되고;
- (c) HSA 결합 특이성이 서열번호 40-48 중 하나의 아미노산 서열로 표시됨;
- (d) CD33 결합 특이성은 서열번호 50-78 중 하나의 아미노산 서열로 표시되고;
- (e) LAG3 결합 특이성은 서열번호 80-93 중 하나의 아미노산 서열로 표시되고; 및
- (f) CD16 결합 특이성은 서열번호 96-99 중 하나의 아미노산 서열로 표시되는, 다중특이적 항체.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 제2 항체 결합 도메인이 CD47, PD-L1, HSA, CD33, LAG3, 또는 CD16에 특이적이고;

- (a) CD47 결합 특이성은 서열번호 2-29 또는 223 중 하나의 아미노산 서열로 표시되고;
- (b) PD-L1 결합 특이성은 서열번호 31-38 중 하나의 아미노산 서열로 표시되고;
- (c) HSA 결합 특이성이 서열번호 40-48 중 하나의 아미노산 서열로 표시되고;
- (d) CD33 결합 특이성은 서열번호 50-78 중 하나의 아미노산 서열로 표시되고;
- (e) LAG3 결합 특이성은 서열번호 80-93 중 하나의 아미노산 서열로 표시되고; 및
- (f) CD16 결합 특이성은 서열번호 96-99 중 하나의 아미노산 서열로 표시되는, 다중특이적 항체.

청구항 5

제3항에 있어서,

1 내지 5개의 추가 항체 결합 도메인을 추가로 포함하고, 여기서 각각의 추가 항체 결합 도메인은 CD47, PD-L1,

HSA, CD33, LAG3, 또는 CD16에 대해 개별적으로 특이적이며;

- (a) CD47 결합 특이성은 서열번호 2-29 또는 223 중 하나의 아미노산 서열로 표시되고;
- (b) PD-L1 결합 특이성은 서열번호 31-38 중 하나의 아미노산 서열로 표시되고;
- (c) HSA 결합 특이성이 서열번호 40-48 중 하나의 아미노산 서열로 표시되고;
- (d) CD33 결합 특이성은 서열번호 50-78 중 하나의 아미노산 서열로 표시되고;
- (e) LAG3 결합 특이성은 서열번호 80-93 중 하나의 아미노산 서열로 표시되고; 및
- (f) CD16 결합 특이성은 서열번호 96-99 중 하나의 아미노산 서열로 표시되는, 다중특이적 항체.

청구항 6

제4항에 있어서,

1 내지 4개의 추가 항체 결합 도메인을 추가로 포함하고, 여기서 각각의 추가 항체 결합 도메인은 CD47, PD-L1, HSA, CD33, LAG3, 또는 CD16에 특이적이며;

- (a) CD47 결합 특이성은 서열번호 2-29 또는 223 중 하나의 아미노산 서열로 표시되고;
- (b) PD-L1 결합 특이성은 서열번호 31-38 중 하나의 아미노산 서열로 표시되고;
- (c) HSA 결합 특이성이 서열번호 40-48 중 하나의 아미노산 서열로 표시되고;
- (d) CD33 결합 특이성은 서열번호 50-78 중 하나의 아미노산 서열로 표시되고;
- (e) LAG3 결합 특이성은 서열번호 80-93 중 하나의 아미노산 서열로 표시되고; 그리고
- (f) CD16 결합 특이성은 서열번호 96-99 중 하나의 아미노산 서열로 표시되는, 다중특이적 항체.

청구항 7

제3항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체는 다중특이적 단일 사슬 항체(MVSCA)인, 다중특이적 항체.

청구항 8

제3항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

링커 L1(서열번호 100), L2(서열번호 101), 또는 L4(서열번호 103)가 하나 이상의 동일하지 않은 항체 결합 도메인 쌍 사이에 개재된, 다중특이적 항체.

청구항 9

제3항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

동일한 특이성을 갖는 적어도 한 쌍의 항체 결합 도메인을 포함하는, 다중특이적 항체.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 동일한 특이성을 갖는 적어도 한 쌍의 항체 결합 도메인은 서로 인접하고 이들 사이에 개재된 링커 L3(서열번호 102)을 갖는, 다중특이적 항체.

청구항 11

제3항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

HSA에 특이적인 N- 또는 C-말단에 위치한 항체 결합 도메인을 포함하고, 절단 가능한 링커가 HSA와 이에 인접한 항체 결합 도메인 사이에 개재되는, 다중특이적 항체.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 절단 가능한 링커는 L11^{*}3(서열번호 104), L11^{*}4(서열번호 105), L11^{*}5(서열번호 106), L11^{*}6(서열번호 107), L11^{*}7(서열번호 108), L11^{*}8(서열번호 109), L11^{*}9(서열번호 110), L11^{*}10(서열번호 111), L11^{*}11(서열번호 112), L11^{*}12(서열번호 113), L11^{*}13(서열번호 114), L11^{*}14(서열번호 115), L11^{*}15(서열번호 116), L11^{*}16(서열번호 117), L11^{*}17(서열번호 118), 또는 L11^{*}18(서열번호 119)인, 다중특이적 항체.

청구항 13

제3항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체 결합 도메인들 모두는 VHH 도메인인, 다중특이적 항체.

청구항 14

제3항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

HSA, CD47, 및 PD-L1을 인식하는 항체 결합 도메인을 포함하는, 다중특이적 항체.

청구항 15

제3항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

HSA, CD47, 및 CD33을 인식하는 항체 결합 도메인을 포함하는, 다중특이적 항체.

청구항 16

제3항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

HSA, LAG3, 및 PD-L1을 인식하는 항체 결합 도메인을 포함하는, 다중특이적 항체.

청구항 17

제3항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

HSA, LAG3, 및 CD33을 인식하는 항체 결합 도메인을 포함하는, 다중특이적 항체.

청구항 18

제3항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

CD16, HSA, 및 PD-L1을 인식하는 항체 결합 도메인을 포함하는, 다중특이적 항체.

청구항 19

제3항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

CD16, HSA, 및 CD33을 인식하는 항체 결합 도메인을 포함하는, 다중특이적 항체.

청구항 20

제3항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

CD16, HSA, CD47, 및 PD-L1을 인식하는 항체 결합 도메인을 포함하는, 다중특이적 항체.

청구항 21

제3항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

CD16, HSA, CD47, 및 CD33을 인식하는 항체 결합 도메인을 포함하는, 다중특이적 항체.

청구항 22

CD33에 대해 특이성을 갖는 한 쌍의 항체 결합 도메인을 포함하는 다중특이적 항체.

청구항 23

제22항에 있어서,

HSA 또는 FC5 나노바디(서열번호 222), 또는 둘 다에 대해 특이성을 갖는 항체 결합 도메인을 추가로 포함하는, 다중특이적 항체.

청구항 24

제1항의 VHH 도메인, 제2항의 HCAb, 또는 제3항 내지 제21항 중 어느 한 항의 다중특이적 항체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 25

암의 치료를 필요로 하는 환자에게 제24항의 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는 암의 치료 방법.

청구항 26

제22항 내지 제23항 중 어느 한 항의 다중특이적 항체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 27

제24항의 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 알츠하이머 질환 또는 망막 질환의 치료 방법.

청구항 28

제27항에 있어서,

상기 망막 질환은 건성 연령 관련 황반 변성인, 알츠하이머병 또는 망막 질환의 치료 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2019년 9월 27일에 출원된 미국 가특허 출원 62/907,275 및 2020년 3월 13일에 출원된 62/989,327의 이익을 주장하며, 이들 둘 모두의 전체 내용은 그 전체가 여기에 참조로 포함된다.

배경 기술

[0002] CD47, 인간 혈청 알부민(HSA), PD-L1, CD33, CD16, 및 LAG3에 대한 특이성을 갖는 단일특이성 중쇄 단독 항체(HCAb), 및 이들 항원 중 하나 이상에 대한 특이성을 갖는 둘 이상의 HCAb 가변 도메인을 포함하는 다가 단일쇄 항체가 본원에 개시된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 일부 실시양태는 낙타류 항체의 VHH 도메인을 독점적으로 또는 주로 포함하는 단일 도메인 항체이다. 이러한 구체에는 단일특이성 및 1가이다.

과제의 해결 수단

[0004] 일부 실시양태는 HCAb이거나 통상적인 항체, 예를 들어 인간 IgG 항체의 Fc 영역으로부터의 하나 이상의 불변 도메인에 융합된 VHH 도메인을 포함한다. 이러한 구체에는 단일특이적이지만 일반적으로 2가이다. 예를 들어, 불변 도메인의 선택에 따라 다른 원자가가 가능하다. IgA 및 IgM의 Fc 영역은 더 높은 원자가를 부여할 수 있다.

- [0005] 일부 실시양태는 단일 아미노산 사슬(다가 단일 사슬 항체)에 연결된 동일한 항원에 대해 특이성을 갖는 2개의 VHH 도메인을 포함한다. 이들 구체예에는 또한 단일특이성 및 2가이다. 더 높은 원자가를 위해 추가 VHH 도메인을 결합할 수 있다.
- [0006] 일부 실시양태는 2개(또는 그 이상)의 VHH 도메인을 포함하며, 여기서 각각의 VHH 도메인은 단일 아미노산 사슬(다가, 다중특이적 단일 사슬 항체)에 연결된 별개의 항원에 대한 특이성을 갖는다. 이러한 구체예에는 다가 및 다중특이적이다. 3개 이상의 VHH 도메인을 포함하는 추가 실시양태에서, 2개 이상의 VHH 도메인은 동일한 항원에 대한 특이성을 가질 수 있는 반면, 하나 이상의 다른 VHH 도메인은 별개의 항원에 대한 특이성을 가질 수 있다. 그러한 구성은 특이성보다 더 높은 차수의 원자가를 가진다.
- [0007] 단일특이성 실시양태 각각은 CD47, HSA, PD-L1, CD33, CD16, 또는 LAG3에 대한 특이성일 것이다. 다중특이적 구체예의 각각은 CD47, HSA, PD-L1, CD33, CD16, 및 LAG3 중 하나 이상에 대한 특이성을 갖지만, 또한 하나 이상의 다른 항원에 대한 특이성을 가질 수 있다.
- [0008] 일부 실시양태는 HSA 및 하나 이상의 다른 항원에 대한 특이성을 갖는다. 이들 구체예의 한 측면에서, HSA-특이적 도메인은 체내에서 연장된 반감기를 부여하는 반면, 다른 도메인은 치료 효과를 제공한다. 이들 구현예의 또 다른 측면에서, HSA-특이적 도메인은 인접 도메인의 결합 활성을 부분적으로 또는 완전히 억제할 수 있다. HSA-특이적 도메인은 예를 들어 종양에서 의도된 작용 시야에 존재하는 프로테아제에 의해 절단되는 절단 가능한 링커에 의해 연결될 수 있으므로 절단은 인접 도메인의 억제를 완화시킨다. 일부 다중특이적 실시양태는 삼중특이적이다.
- [0009] 다중 항원 결합 도메인을 포함하는 일부 실시양태에서, 통상적인 VL-VH 쌍으로부터 유래된 항원 결합 도메인이 상기 실시양태에서 VHH 도메인 중 하나 이상(전부는 아님) 대신에 사용될 수 있다.
- [0010] 특정 항원에 대해 특이성을 갖는 본원에 개시된 항원 결합 도메인은 항원을 결합하기 위한 수단으로 지칭될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0011] 도 1은 CD47-과발현 세포주에 대한 항-CD47 HCab A09-10 및 B6H12의 결합 친화성의 유세포 분석을 도시한다.
- 도 2는 CD47에 대한 결합 특이성을 갖는 다중-특이성 항체 1511(서열번호(SEQ ID NO) 156) 및 3321(서열번호 157)의 경쟁적 ELISA 결합 분석을 도시한다.
- 도 3은 Jurkat 세포주에서 유세포 분석을 사용한 CD47-결합 다중특이적 분자 1511 및 3321의 경쟁적 결합 분석을 도시한다.
- 도 4a는 CD47-결합 다중특이적 분자 1511 및 3321을 사용한 인간 적혈구(RBC) 혈구응집 분석을 도시한다. Hu5F9를 대조군으로 사용하였다. 도 4b는 HL-60 세포 및 인간 RBC에 대한 1511 및 3321의 결합을 도시한다.
- 도 5는 Raja-Luc 이종이식된 마우스에서 CD47-결합 다중특이적 분자 3321의 항종양 활성을 도시한다.
- 도 6은 PD-L1 과발현 CHO 세포에 대한 항-PD-L1 HCab, PL14 및 PL16의 유세포 분석 결합 분석을 도시한 것이다. 아테졸리주맵을 대조군으로 사용하였다.
- 도 7은 PD-L1 및 대조군으로서 아테졸리주맵에 대한 결합 특이성을 갖는 다중특이적 분자 1511의 세포 기반 기능 분석이다.
- 도 8은 PD-L1-결합 다중특이적 분자 1518(서열번호 135)에 의한 B-hPD-L1 마우스에서의 MC38-hPD-L1 종양 성장의 억제를 도시한다.
- 도 9는 항-HSA VHH 항체의 Octet® 결합 분석을 도시한다.
- 도 10a, 10b는 항-CD33 VHH 항체의 Octet® 결합 친화도 분석을 도시한다.
- 도 11a, 11b는 ant-CD16A VHH 분자 CD16F1(도 11a) 및 CD16E11(도 11b)의 Octet® 결합 분석을 도시한다.
- 도 12는 대조군으로서 IgG1 B6H12 및 IgG4 B6H12를 사용하는 Jurkat NFAT CD16 리포터 검정(ADCC 검정)에서 다중특이적 분자 1511 및 3321의 세포 기반 기능 검정을 도시한다.
- 도 13a-13c는 HSA 및 CD47-결합 도메인을 갖는 분자(도 13a), HSA- 및 LAG3-결합 도메인을 갖는 분자(도 13b),

및 HSA- 및 CD16-결합 도메인을 갖는 분자(도 13c)의 삼중-특이적 분자 형식을 도시한다.

도 14a, 14b는 삼중-특이적 분자 형식(도 14a) 및 중앙 프로테아제에 의해 활성화된 pro-CD47의 SDS-PAGE 분석(도 14b)을 도시한다.

도 15는 PD-L1/pro-CD47 대 PD-L1/활성-CD47의 실시간 동역학 Octet® 결합 분석을 도시한다.

도 16은 다중특이적 분자의 포맷을 도시한다. Mon = 1가 결합 도메인; BiV = 2개의 동일한 1가 결합 도메인을 포함하는 2가 결합 도메인.

도 17a-d는 쿼드바디에 대한 형식을 묘사한다(4개의 특이성, 도 14a-b). 2개의 VHH3는 상이한 에피토프에 결합하는 동일한 항원에 대해 동일한 VHH 또는 상이한 VHH일 수 있다. 2개의 VHH4는 상이한 에피토프에 결합하는 동일한 항원에 대해 동일한 VHH 또는 상이한 VHH일 수 있다. 일부 실시양태에서, VHH2는 항상 HSA-결합 도메인이다. 일부 실시양태에서, VHH1은 CD16A 작용제 VHH와 같은 페이로드이다. 도 17c 및 17d는 전구약물 형식의 쿼드바디를 나타낸다.

도 18은 HL60 세포주 상의 CD47-결합 다중특이적 분자 1518-HS5(서열번호 173) 및 1518-HS5-GS15(서열번호 184)의 유세포 분석 결합 분석을 도시한다.

도 19는 다중특이적 분자 1511의 Octet® 결합 분석을 도시한다.

도 20은 다중특이적 분자 3321의 Octet® 결합 분석을 도시한다.

도 21은 항-CD47 VHH 서열의 아미노산 서열 정렬을 도시한다.

도 22는 항-PD-L1 VHH 서열의 아미노산 서열 정렬을 도시한다.

도 23은 항-HSA VHH 서열의 아미노산 서열 정렬을 도시한다.

도 24a, 24b는 항-CD33 VHH 서열의 아미노산 서열 정렬을 도시한다.

도 25는 항-LAG3 VHH 서열의 아미노산 서열 정렬을 도시한다.

도 26은 항-CD16A VHH 서열의 아미노산 서열 정렬을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] CD47, 인간 혈청 알부민(HSA), PD-L1, CD33, CD16 및 LAG3, 및 다가 단쇄 항체(MVSCA)에 대한 특이성을 갖고, 2개 이상의 HCAb의 가변 도메인을 통합하고, 이들 항원 중 하나 이상에 대한 특이성을 갖는, 단일특이성 중쇄 전용 항체(HCAb), 또는 이의 가변 도메인(VHH 단일 도메인 항체[sdAb]라고 함)이 본원에 개시되어 있다.
- [0013] 일부 실시양태에서 MVSCA는 동일한 항원에 대해 특이성을 갖는 2개 이상의 HCAb 가변 도메인을 포함한다. 즉, MVSCA는 다가이지만 항원에 관해서는 단일특이적이다. 이들 실시양태 중 일부에서 MVSCA는 동일한 에피토프에 대해 각각 특이성을 갖는 동일한 HCAb 가변 도메인 또는 다중 HCAb 가변 도메인의 2회 이상의 반복을 포함한다. 즉, 이들은 다가이지만 에피토프에 관해서는 단일특이적이다. 이러한 MVSCA는 항원 단량체의 단일 부위에만 결합하지만 단량체의 여러 사본을 가교할 수 있다. 이들 실시양태 중 다른 것에서 MVSCA는 동일한 항원의 상이한 에피토프에 대해 각각 특이성을 갖는 2개 이상의 HCAb 가변 도메인을 포함한다. 즉, 이들은 다가이지만 에피토프와 관련하여 다중특이적이다. 이러한 MVSCA는 항원 단량체의 여러 부위에 결합하거나 단량체의 여러 사본을 가교할 수 있다.
- [0014] 일부 실시양태에서 MVSCA는 별개의 항원에 대해 특이성을 갖는 2개 이상의 HCAb 가변 도메인을 포함하며, 즉, 항원에 대해 다가 및 다중특이적이다. 추가 실시양태에서, MVSCA는 다중 HCAb 가변 도메인을 포함하고, 여기서 추가 가변 도메인은 제1 HCAb 가변 도메인과 동일하고, 추가 HCAb 가변 도메인은 제1 HCAb 가변 도메인과 다르지만 동일한 항원 상의 상이한 에피토프에 특이적이다. 또는 여기서 추가적인 HCAb 가변 도메인은 제1 HCAb 가변 도메인과 상이하지만 임의의 조합에서 상이한 항원에 대해 특이적이다.
- [0015] 2개 이상의 HCAb 가변 도메인을 포함하는 MVSCA는 HCAb 불변 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, C-말단 HCAb 가변 도메인은 원래의 HCAb 불변 도메인에 대한 부착을 유지할 수 있다. 대안적으로, C-말단 HCAb 가변 도메인은 보다 통상적인 항체, 예를 들어 인간 항체, 예컨대 인간 IgG 항체의 불변 도메인 또는 Fc 영역에 부착될 수 있다. 일부 실시양태에서 불변 도메인 또는 완전한 Fc 영역은 당업자에게 친숙한 바와 같이 특정 기능을

부여할 수 있다. 다른 실시양태에서, 2개 이상의 HCAb 가변 도메인을 포함하는 MVSCA는 HCAb 불변 도메인을 추가로 포함할 수 있고, 여기서 HCAb 불변 도메인은 HCAb 가변 도메인에 대해 C-말단에 위치하는 대신에, 또는 이에 더하여 HCAb 가변 도메인 사이에 또는 N-말단에 HCAb 가변 도메인에 위치된다.

[0016] 항원

[0017] 인테그린 관련 단백질(IAP) 이라고도 알려진 CD47(D 분화 47 클러스터)은 인간에서 CD47 유전자에 의해 암호화되는 50KDa 막관통 단백질이다. CD47은 면역글로불린 슈퍼패밀리에 속한다. 막 인테그린과 파트너이며 리간드 트롬보스폰딘-1(TSP-1) 및 신호 조절 단백질 알파(SIRP α)에도 결합한다. 트롬보스폰딘-1은 혈관 발달과 혈관신생에 역할을 하는 분비된 당단백질이며, 이 이후의 능력에서 TSP1-CD47 상호작용은 혈관 세포의 여러 수준에서 산화질소 신호전달을 억제한다. CD47에 대한 TSP-1의 결합은 세포 이동 및 부착, 세포 증식 또는 세포자멸사를 비롯한 여러 기본적인 세포 기능에 영향을 미치고, 혈관신생 및 염증의 조절에 역할을 한다. 신호 조절 단백질 알파는 골수 세포에 존재하는 막형단 수용체이다. CD47/SIRP α 상호작용은 양방향 신호전달을 유도하여 식균작용 억제, 세포-세포 융합 자극 및 T-세포 활성화를 비롯한 다양한 세포-세포 반응을 유발한다. CD47은 일부 암에서 잠재적인 치료 표적이 된 면역계의 대식세포에 "나를 먹지 마세요(*don't eat me*)" 신호로 작용한다.

[0018] CD279라고도 하는 프로그램된 세포 사멸 1(PD-1)은 PDCD1 유전자에 의해 인간에서 암호화되는 유형 I 막 단백질이다. PD-L1과 PD-L2의 두 가지 리간드가 있다. CD274 또는 B7 상동체 1(B7-H1)이라고도 하는 PD-L1은 CD274 유전자에 의해 인간에서 코딩되는 40kDa 유형 I 막관통 단백질이다. PD-1은 활성화된 T 세포의 표면에서 발현되고 PD-L1은 수지상 세포 및 대식세포와 같은 항원 제시 세포(APC)의 표면에서 발현된다. PD-L1은 또한 유방, 폐, 방광, 두경부 및 기타 암을 포함한 여러 종양에서 과발현된다. PD-L1 또는 PD-L2가 PD-1에 결합하면 억제 신호가 T 세포로 전달되어 사이토카인 생성을 감소시키고 T 세포 증식을 억제한다.

[0019] PD-1 경로는 T 세포 고갈의 주요 면역 억제 매개체이다. PD-1은 자가면역을 제한하기 위해 감염에 대한 염증 반응 동안 말초에서 이미 활성화된 T 세포의 활성을 제한하는 기능을 한다. 이 경로의 차단은 T-세포 활성화, 확장 및 향상된 효과기 기능으로 이어질 수 있다. 이와 같이 PD-1은 T 세포 반응을 부정적으로 조절한다. PD-1은 만성 질환 상태에서 소진된 T 세포의 마커로 확인되었으며 PD-1:PD-L1 상호작용의 차단은 T 세포 기능을 부분적으로 회복시키는 것으로 나타났다. (Sakuishi et al., JEM, 207:2187-2194, 2010). PD-1 경로를 억제함으로써 지속성 감염 및 암을 치료하기 위한 방법 및 조성물은 WO 2006/133396에 개시되어 있다. PD-L1에 대한 인간 모노클로날 항체는 WO 2007/005874, US2011/209230, US 8,217,149 및 WO2014/055897에 기재되어 있다.

[0020] 인간 혈청 알부민(HSA)은 인간 혈장에서 가장 풍부한 단백질이다. 그것은 혈청 단백질의 약 절반을 구성한다. 알부민은 호르몬, 지방산 및 기타 화합물을 운반하고 pH를 완충하며 종양압을 유지하는 등 다른 기능을 한다. 알부민은 초기 단백질이 거친 소포체에서 방출되기 전에 제거되는 N-말단 펩티드가 있는 프리프로알부민으로 간에서 합성된다. 생성물인 프로알부민은 차례로 골지 소포에서 절단되어 분비된 알부민을 생성한다. 혈청 반감기는 약 20일이다. 알부민의 긴 혈청 반감기는 신장을 통한 제거를 방지하는 크기와 신생아 Fc 수용체(FcRn)와의 상호작용에 의해 부분적으로 달성된다. 항-알부민 sdAb(단일 도메인 항체)에 대한 융합은 항종양 단일 사슬 항체의 반감기를 1-2시간에서 약 10일로 증가시키는 데 사용되었다.

[0021] CD33 또는 Siglec-3(시알산 결합 Ig-유사 렉틴 3, SIGLEC3, SIGLEC-3, gp67, p67)은 골수 계통의 세포에서 발현되는 막관통 수용체이다. 이것은 일반적으로 골수에 특이적인 것으로 간주되지만 일부 림프구 세포에서도 발견될 수 있다. 시알산과 결합하므로 렉틴의 SIGLEC 계열에 속한다. 이 수용체의 세포의 부분은 2개의 면역글로불린 도메인(1개 IgV 및 1개 IgC2 도메인)을 포함하여 면역글로불린 슈퍼패밀리 내에 CD33을 배치한다. CD33의 세포내 부분에는 세포 활성 억제와 관련된 면역수용체 티로신 기반 억제 모티프(ITIM)가 포함되어 있다. CD33을 표적화하여 치료할 수 있는 질병에는 알츠하이머병 및 망막 질환, 예를 들어 황반 부종(예: 당뇨병성 황반 부종) 및 연령 관련 황반 변성(AMD)(예: 건성 AMD 및 습성 AMD)이 포함되지만 이에 국한되지는 않는다.

[0022] CD33은 급성 골수성 백혈병 환자의 치료를 위한 항체-약물 접합체(ADC)인 gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg®; Pfizer/Wyeth-Ayerst Laboratories)의 표적이다. CD33은 또한 이 회사의 ADC 기술을 활용하여 시애틀 제네틱스(Seattle Genetics)에서 개발 중인 새로운 항체-약물 접합체인 vadastuximab talirine(SGN-CD33A)의 표적이다.

[0023] 503개 아미노산의 막형단 단백질인 림프구 활성화 유전자 3(LAG-3)은 이펙터 T 세포 및 조절 T 세포(Treg)의 세포 표면에서 발현되는 면역 관문 수용체 단백질이며 T 세포 반응, 활성화 및 성장. LAG3는 면역글로불린(Ig) 슈퍼패밀리의 구성원이다. MHC 클래스 II 분자에 결합하는 LAG3는 LAG3 발현 세포에 음성 신호를 전달하고 항원

의존적 CD4 및 CD8 T 세포 반응을 하향 조절한다. LAG3는 T 세포의 증식, 사이토카인 생성 및 표적 세포 용해 능력을 부정적으로 조절하며, 이를 T 세포의 '소진'이라고 한다. LAG3는 종양 면역 및 감염 면역에서 중요한 역할을 하기 때문에 면역 요법의 이상적인 표적이다. 단클론 항체를 포함한 길항제로 LAG3를 차단하는 것은 암 및 만성 바이러스 감염의 치료에서 연구되었다.

[0024] Fc γ RIII라고도 알려진 CD16은 자연 살해 세포, 호중구, 단핵구 및 대식세포의 표면에서 발견되는 분화 분자 클러스터이다. Fc 수용체로 확인된 CD16은 별도의 유전자에 의해 암호화된 두 가지 형태로 존재한다: 막형단 단백질인 Fc γ RIIIa(CD16a); 및 GPI 고정 단백질인 Fc γ RIIIb(CD16b); 그리고 신호 전달에 참여한다. NK 세포에 의한 용해를 유발하는 것과 관련된 가장 잘 연구된 막 수용체인 CD16은 항체 의존성 세포 세포독성(ADCC)과 관련된 면역글로불린 슈퍼패밀리(IgSF)의 분자이다. CD16에 대한 항체를 사용하여 형광 활성화 세포 분류(FACS) 또는 자기 활성화 세포 분류를 통해 특정 면역 세포의 집단을 분리하는 데 사용할 수 있다. 이 수용체는 IgG 항체의 Fc 부분에 결합하여 인간 NK 세포에서 항체 의존성 세포 세포독성(ADCC)을 활성화한다. CD16은 인간 단핵구가 수행하는 ADCC 과정에 필요하다. 인간에서 CD16을 발현하는 단핵구는 특정 항체의 존재하에 다양한 ADCC 능력을 가지며, 원발성 백혈병 세포, 암 세포주 및 B형 간염 바이러스에 감염된 세포를 죽일 수 있다. 또한, CD16은 바이러스에 감염된 일부 세포와 항체가 없는 암세포의 직접적인 사멸을 증대할 수 있다. IgG 항체의 보존 섹션과 같은 리간드에 결합한 후, 인간 NK 세포의 CD16은 IL-2-R(CD25) 및 IFN-감마 및 TNF와 같은 염증성 사이토카인과 같은 표면 활성화 분자의 유전자 전사를 유도한다. NK 세포에서 사이토카인 mRNA의 CD16 유도 발현은 다양한 사이토카인의 전사를 조절하는 사이클로스포린 A(CsA) 민감 인자인 활성화된 T 세포(NFATp)의 핵 인자에 의해 매개된다. 특정 사이토카인 유전자의 상향 조절된 발현은 CsA 민감성 및 칼슘 의존성 메커니즘을 통해 발생한다.

[0025] CD16은 백신 접종 후 자연 살해(NK) 세포의 조기 활성화에 중요한 역할을 한다. 또한, CD16 하향조절은 NK 세포 반응을 조절하고 T 세포 및 항체 의존적 신호 전달 경로 모두에서 면역 항상성을 유지하는 가능한 방법을 나타낸다. 정상적이고 건강한 개인에서 면역 복합체에 의한 CD16(Fc γ RIII)의 가교는 NK 세포에서 항체 의존성 세포 독성(ADCC)을 유도한다. 그러나 이 경로는 면역 요법에 의해 암 또는 병든 세포에서도 표적이 될 수 있다. 인플루엔자 백신접종 후, CD16 하향조절은 인플루엔자 특이적 혈장 항체의 상당한 상향조절과 연관되었고, NK 세포의 탈과립화와 양의 상관관계가 있다.

[0026] CD16은 종종 인간 면역 세포의 다른 하위 집합을 안정적으로 식별하기 위한 추가 마커로 사용된다. CD11b 및 CD33과 같은 여러 다른 CD 분자는 전통적으로 인간 골수 유래 억제 세포(MDSC)의 마커로 사용된다. 그러나 이러한 마커는 NK 세포 및 골수 세포에서 유래한 다른 모든 세포에서도 발현되기 때문에 CD14 및 CD15와 같은 다른 마커가 필요하다. 호중구는 CD14가 낮고 CD15가 높은 반면 단핵구는 CD14가 높고 CD15가 낮다. 이 두 마커는 호중구와 단핵구를 구별하기에 충분하지만 호산구는 호중구와 유사한 CD15 발현을 보인다. 따라서 CD16은 호중구를 식별하는 추가 마커로 사용된다. 성숙한 호중구는 CD16이 높고 호산구와 단핵구는 모두 CD16이 낮다. CD16은 이 두 가지 유형의 과립구를 구분할 수 있다. 또한, CD16 발현은 호중구 발달의 여러 단계 사이에서 다양하다. 분화 능력이 있는 호중구 전구체는 CD16이 낮고, 각각 후골수 세포, 줄무늬 및 성숙한 호중구에서 CD16의 발현이 증가한다.

[0027] 호중구에 대한 발현으로 CD16은 암 면역 요법에서 가능한 표적을 나타낸다. Margetuximab은 유방암, 방광암 및 기타 고형 종양의 종양 세포에서 발현되는 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2)를 인식하는 Fc 최적화 단일클론 항체로 CD16B보다 우선적으로 CD16A를 표적으로 한다. 또한 CD16은 항체 표적 암 치료법에서 역할을 할 수 있다. 항-CD19 /CD16 과 같은 이중특이적 항체 단편은 암 세포에 대한 면역치료 약물의 표적화를 가능하게 한다. 항-CD19 /CD16 디아바딘은 B 세포 림프종에 대한 자연 살해 세포 반응을 향상시키는 것으로 나타났다. 또한 FasL 또는 TRAIL 과 같은 외부 요인을 종양 세포 표면으로 표적화하면 사멸 수용체가 유발되어 자가분비 및 측분비 과정 모두에 의해 세포자멸사를 유도한다.

[0028] 항체

[0029] 항체, 및 질병 치료를 위한 이의 용도는 당업계에 잘 알려져 있다. 본원에 사용된 용어 "항체"는 항원 결합 부위를 포함하는 하나 이상의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 단량체 또는 다량체 단백질을 지칭한다. 항체는 항원에 특이적으로 결합하고 항원의 생물학적 활성을 조절할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "항체"는 "전장 항체" 및 "항체 단편"을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 용어 "결합 부위" 또는 "항원 결합 부위"는 리간드가 실제로 결합하는 항체 분자의 영역(들)을 나타낸다. 용어 "항원 결합 부위"는 항체 중쇄 가변 도메인(VH) 및 항체 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함하거나, 중쇄 단독 항체의 경우 항체 중쇄 가변 영역을 포함한다.

- [0030] 항체 특이성은 항원의 특정 에피토프에 대한 항체의 선택적 인식을 의미한다. 예를 들어, 천연 항체는 단일특이성이다. 본원에 사용된 용어 "단일특이성" 항체는 각각이 동일한 항원의 동일한 에피토프에 결합하는 하나 이상의 결합 부위를 갖는 항체를 나타낸다. 본원에 개시된 단일특이적 항체는 CD47, HSA, PD-L1, CD33, CD16 또는 LAG3에 특이적이다. 일부 실시양태에서, 단일특이적 항체는 중쇄-단독 항체(HCAb)이다. 다른 실시양태에서, 단일특이적 항체는 예를 들어 인간 Fc 영역을 포함하는 하나 이상의 단백질 도메인에 융합된 VHH 도메인을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 단일특이적 항체는 VHH를 유일한 완전한 단백질 도메인, 즉 단일 도메인 항체로서 포함한다. 일부 실시양태에서, 단일 도메인 항체는 His-태그와 같은 짧은 펩티드를 추가로 포함할 수 있다. 용어 "VHH 도메인" 및 "HCAb 가변 도메인"은 상호교환적으로 사용된다. VHH 도메인은 특정 표적(예: CD47, HSA, PD-L1, CD33, CD16 또는 LAG3)에 결합하기 위한 수단으로 지칭될 수 있다. 따라서 VHH 도메인을 함유하거나 VHH 도메인을 함유하도록 구성된 본원에 개시된 다양한 항체 구조, 형식 또는 작제물은 지시된 표적에 결합하기 위한 수단을 포함하는 항체를 지칭할 수 있다. 일부 실시양태는 구체적으로 하나 이상의 특정 항체 구조, 형식 또는 작제물을 포함할 수 있다. 다른 실시양태는 하나 이상의 특정 항체 구조, 형식 또는 작제물을 구체적으로 배제할 수 있다.
- [0031] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "에 대한 특이성을 갖는 항체", "인식하는 항체", "에 대한 친화성을 갖는 항체", "~에 대한 결합 부위를 갖는 항체" 및 유사한 구성은 상호교환가능하게 사용될 수 있다.
- [0032] "다중-특이성 항체"는 2개 이상의 항원-결합 특이성을 갖는 항체를 지칭한다. 본원에 개시된 다중특이적 항체는 CD47, HSA, PD-L1, CD33, CD16, 및 LAG3 중 적어도 2개, 또는 상기 특이성 중 적어도 하나 및 적어도 제2 특이성에 대해 특이적이다. 일부 실시양태에서, 본원의 다중특이적 항체 개시내용은 항원에 결합할 수 있는 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 도메인을 포함할 수 있다. 또한, 다중특이적 항체는 다중특이적 항체가 CD47, HSA, PD-L1, CD33, CD16, 및 LAG3 중 적어도 하나 및 적어도 하나의 제2 항원. 일부 실시양태에서 다중특이적 항체(MVSCA)는 CD47, HSA, PD-L1, CD33, CD16, 및 LAG3 중 적어도 2개에 대한 특이성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 다중특이적 항체는 단일 사슬 항체이다. 따라서, 일부 다중특이적 항체는 제1 표적에 결합하기 위한 수단 및 제2 표적에 결합하기 위한 수단 등을 포함하는 항체로 지칭될 수 있다.
- [0033] "이중특이적 항체"는 2개의 상이한 항원-결합 특이성을 갖는 항체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 이중특이적 항체는 CD47, HSA, PD-L1, CD33, CD16, 및 LAG3 중 2개에 특이적이다. 이중특이적 항체의 항원 결합 부분을 코딩하는 아미노산 서열은 다양한 구성으로 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 이중특이적 항체의 항체-결합 부분을 코딩하는 아미노산 서열은 본원에 개시된 바와 같은 링커에 의해 연결된다.
- [0034] "삼중특이적 항체"는 3가지 상이한 항원 결합 특이성을 갖는 항체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 삼중-특이적 항체는 CD47, HSA, PD-L1, CD33, CD16, 및 LAG3 중 3개에 특이적이다. 삼중특이적 항체의 항원 결합 부분을 코딩하는 아미노산 서열은 다양한 구성으로 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 삼중특이적 항체의 항체-결합 부분을 코딩하는 아미노산 서열은 본원에 개시된 바와 같은 링커에 의해 연결된다. 일부 실시양태에서, 동일하거나 상이할 수 있는 2개의 링커가 사용된다.
- [0035] "쿼드바디"는 4가지 상이한 항원 결합 특이성을 갖는 항체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 쿼드바디는 CD47, HSA, PD-L1, CD33, CD16, 및 LAG3 중 4개에 대해 특이적이다. 쿼드바디의 항원 결합 부분을 암호화하는 아미노산 서열은 다양한 구성으로 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 쿼드바디의 항체-결합 부분을 코딩하는 아미노산 서열은 본원에 개시된 바와 같은 링커에 의해 연결된다. 일부 실시양태에서, 동일하거나 상이할 수 있는 2개의 링커가 사용된다.
- [0036] 본원에 사용된 용어 "가(valent)"는 항체 분자에서 특정 수의 결합 부위의 존재를 나타낸다. 이와 같이 용어 "2가", "3가", "4가", "5가", "6가", "7가" 및 "8가"는 2개의 결합 부위, 3개의 결합 부위, 4개의 결합 부위, 5개의 결합 부위, 항체 분자에서 각각 6개의 결합 부위, 7개의 결합 부위 및 8개의 결합 부위. 본원에 개시된 이중특이적 항체는 "2가"이다. 본원에 개시된 삼중-특이적 항체는 "3가"이다. 본 명세서에 개시된 쿼드바디는 "4가"이다. 그러나, 단일특이성 다가 항체, 예를 들어, 2가, 3가 및 4가 항체는 다수의 항원 결합 부위가 동일한 항원에 결합하는 본 개시내용의 범위 내에 있다. 단일특이성 2가 및 3가(또는 더 높은 원자가) 항체의 항원 결합 부위는 항원의 동일한 에피토프 또는 다른 에피토프에 결합할 수 있다. 유사하게, 다중 단일특이성 결합 부위를 하나 이상의 다른 특이성에 대한 결합 부위와 조합함으로써, 원자가가 다중특이성보다 더 높은 차수의 항체, 예를 들어 3가, 이중특이적 항체를 작제할 수 있다.
- [0037] 본원에서 "전장 항체"는 가변 및 불변 영역을 포함하는 항체의 천연 생물학적 형태를 구성하는 구조를 의미한다. 예를 들어, 인간과 마우스를 포함한 대부분의 포유동물에서, IgG 부류의 전장 항체는 사량체이고 2개

의 면역글로불린 사슬의 2개의 동일한 쌍으로 구성되며, 각 쌍은 1개의 경쇄 및 1개의 중쇄를 가지며, 각 경쇄는 면역글로불린 도메인을 포함한다 VL 및 CL, 및 면역글로불린 도메인 VH, CH1, CH2 및 CH3을 포함하는 각각의 중쇄. 일부 포유동물, 예를 들어 낙타 및 라마에서, IgG 항체는 또한 2개의 중쇄(HCAb)로 구성될 수 있으며, 각각의 중쇄는 Fc 영역(CH2 및 CH3 도메인)에 부착된 가변 도메인을 포함한다.

[0038] 4량체 항체는 일반적으로 2개의 동일한 폴리펩타이드 사슬 쌍으로 구성되며, 각 쌍은 하나의 "경쇄"(전형적으로 약 25kDa의 분자량을 가짐) 및 하나의 "중쇄"(전형적으로 약 50-70kDa의 분자량을 가짐)를 가진다. 각각의 경쇄 및 중쇄는 가변 및 불변 영역으로 지칭되는 2개의 별개의 영역으로 구성된다. 면역글로불린의 IgG 부류의 경우, 중쇄는 중쇄 가변 도메인, 중쇄 불변 도메인 1, 중쇄를 참조하여 VH-CH1-CH2-CH3의 순서로 N-말단에서 C-말단으로 연결된 4개의 면역글로불린 도메인으로 구성된다. 사슬 불변 도메인 2 및 중쇄 불변 도메인 3(VH-C γ 1-C γ 2-C γ 3으로도 지칭됨, 각각 중쇄 가변 도메인, 불변 감마 1 도메인, 불변 감마 2 도메인, 및 불변 감마 3 도메인). IgG 경쇄는 각각 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 지칭하는 VL-CL 순서로 N-말단에서 C-말단으로 연결된 2개의 면역글로불린 도메인으로 구성된다. 불변 영역은 서열 다양성이 적고 중요한 생화학적 사건을 유도하기 위해 다수의 천연 단백질을 결합하는 역할을 한다.

[0039] 항체의 가변 영역은 분자의 항원 결합 결정자를 포함하므로 표적 항원에 대한 항체의 특이성을 결정한다. 가변 영역은 동일한 클래스 내의 다른 항체와 서열이 가장 다르기 때문에 그렇게 명명되었다. 가변영역에서 중쇄 및 경쇄의 V 도메인 각각에 대해 3개의 루프가 모여 항원 결합 부위를 형성한다. 각각의 루프는 아미노산 서열의 변이가 가장 큰 상보성 결정 영역(이하 "CDR"이라 함)으로 지칭된다. VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3으로 지정된 중쇄 및 경쇄당 각각 3개씩 총 6개의 CDR이 있다. CDR 외부의 가변 영역을 프레임 워크(FR) 영역이라고 한다. CDR만큼 다양하지는 않지만, 서열 가변성은 상이한 항체 사이의 FR 영역에서 발생한다. 전반적으로, 항체의 이러한 특징적인 구조는 광범위한 항원에 대한 특이성을 얻기 위해 면역 시스템에 의해 상당한 항원 결합 다양성(CDR)이 탐색될 수 있는 안정적인 스캐폴드(FR 영역)를 제공한다.

[0040] 면역글로불린 유전자좌를 암호화하는 유전자는 "D" 및 "J"로 명명된 더 짧은 뉴클레오타이드 서열과 함께 다중 V 영역 서열을 포함하며 VH 다양성을 발생시키는 V, D 및 J 뉴클레오타이드 서열의 조합이다.

[0041] 항체는 불변 영역에 의해 유전적으로 결정되는 부류로, 또한 이소타입이라고도 함, 그룹화된다. 인간 불변 경쇄는 카파(C κ) 및 람다(C λ) 경쇄로 분류된다. 중쇄는 뮤(μ), 델타(δ), 감마(γ), 알파(α) 또는 엡실론(ϵ)으로 분류되며 항체의 이소타입은 각각 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE로 정의된다. IgG 클래스는 치료 목적으로 가장 일반적으로 사용된다. 인간에서 이 부류는 하위 부류 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다. 마우스에서 이 클래스는 하위 클래스 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3을 포함한다. IgM에는 IgM1 및 IgM2를 포함하지만 이에 국한되지 않는 하위 클래스가 있다. IgA에는 IgA1 및 IgA2를 포함하지만 이에 국한되지 않는 여러 하위 클래스가 있다. 따라서, 본원에 사용된 "아이소타입(isotype)"은 면역글로불린의 불변 영역의 화학적 및 항원 특성에 의해 정의되는 면역글로불린의 임의의 부류 또는 하위부류를 의미한다. 알려진 인간 면역글로불린 아이소타입(isotype)은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD 및 IgE이다. 개시된 HCAb 항체, 이중특이적 및 다중특이성 항체는 상기 기술된 아이소타입(isotype)의 전부 또는 일부를 포함하는 불변 영역을 가질 수 있다.

[0042] 또한, 본 개시내용의 범위 내에는 하기를 포함하나 이에 제한되지 않는 항체 단편이 있다:(i) VL, CL, VH 및 CH1 도메인을 포함하는 Fab 단편, (ii) VH 및 CH1 도메인을 포함하는 Fd 단편, (iii) 단일 항체의 VL 및 VH 도메인을 포함하는 Fv 단편; (iv) 단일 가변 영역을 포함하는 dAb 단편, (v) 단리된 CDR 영역, (vi) F(ab')₂ 단편, 2개의 연결된 Fab 단편을 포함하는 2가 단편, 및 (vii) VH 도메인 및 VL 도메인이 2개의 도메인이 결합하여 항원 결합 부위를 형성하도록 하는 펩티드 링커에 의해 연결되는 단일 사슬 Fv 분자(scFv). 3가지 상이한 특이성을 갖고 절단가능 또는 절단불가능 링커에 의해 연결된 가변 도메인을 포함하는 3가 또는 4가 항체 단편이 또한 개시된다. 특정 실시양태에서, 항체는 재조합 DNA 기술에 의해 생산된다. 추가 실시양태에서, 항체는 천연 발생 항체의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 생성된다.

[0043] 본원에 사용된 "단일쇄 항체"는 일반적으로 링커 펩티드에 의해 연결된 항체의 항원 결합 부분(즉, 가변 영역)의 융합 단백질을 의미한다. 다가 단일- 및 다중특이적 단일 사슬 항체가 본원에 개시되어 있다. 단일특이성 다가 항체는 CD47, HSA, PD-L1, CD33, CD16, 및 LAG3 중 적어도 하나에 대한 특이성을 갖는다. 다중특이적 단일 사슬 항체는 CD47, HSA, PD-L1, CD33, CD16, 및 LAG3 중 적어도 하나에 대한 특이성과 적어도 하나의 추가 특이성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 다중특이적 단일 사슬 항체는 CD47, HSA, PD-L1, CD33, CD16, 및 LAG3 중 적어도 2개에 대한 특이성을 갖는다.

[0044] 본원에 사용된 "인간화" 항체는 인간 프레임워크 영역(FR) 및 비인간 항체로부터의 하나 이상의 상보성 결정 영

역(CDR)을 포함하는 항체를 의미한다. CDR을 제공하는 비인간 항체를 "공여자"라고 하고 프레임워크를 제공하는 인간 면역글로불린을 "수용체"라고 한다. 특정 실시양태에서, 인간화는 주로 수용체(인간) VL 또는 VH 프레임워크 상에 공여자 CDR의 접목에 의존한다. 이 전략을 "CDR 접목"이라고 한다. 상응하는 기준자 잔기에 대한 선택된 수용체 프레임워크 잔기의 "역돌연변이"는 종종 초기 이식된 구성에서 손실된 친화도를 회복하는 데 필요하다. 인간화 항체는 또한 최적으로 면역글로불린 불변 영역의 적어도 일부는, 전형적으로 인간 면역글로불린의 불변 영역을 포함할 것이고, 종종 전형적으로 인간 Fc 영역을 포함할 것이다. 인간화 또는 비인간 항체 가변 영역의 면역원성을 감소시키는 다른 방법은 재표면화 방법을 포함할 수 있다. 일 실시양태에서, 선택 기반 방법을 사용하여 항체 가변 영역을 인간화 및/또는 친화도 성숙화, 즉 그의 표적 항원에 대한 가변 영역의 친화도를 증가시킬 수 있다. 다른 인간화 방법은 CDR 이식과 관련하여 개시된 모든 내용에 대해 본원에 참조로 포함된 US 6,797,492에 기재된 방법을 포함하나 이에 제한되지 않는 CDR의 일부만의 이식을 수반할 수 있다. 예를 들어, 인간화 및 친화성 성숙에 관해 개시하는 모든 내용에 대해 본원에 참조로 포함되는 US 7,117,096에 기재된 바와 같이 인간화 및 친화성 성숙을 위해 구조 기반 방법을 사용할 수 있다.

[0045] 본원의 다양한 실시양태에서, 항체는 중쇄 전용 항체(HCAb)이다. 낙타과(낙타, 단봉낙타, 라마)에는 기존의 중쇄 및 경쇄 항체(1개의 항체에 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄) 외에 2쇄 항체(변형 중쇄만 포함)가 포함되어 있다. 이량체 항체는 VHH 유전자라고 하는 별개의 VH 세그먼트 세트에 의해 코딩된다. VH와 VHH는 게놈에 산재해 있다(즉, 서로 섞여 있는 것처럼 보인다). VH 및 VHH cDNA에서 동일한 D 세그먼트의 식별은 VH 및 VHH에 대한 D 세그먼트의 공통 사용을 시사한다. 천연 VHH 함유 항체에는 중쇄 불변 영역의 전체 CH1 도메인이 없다. CH1 도메인을 코딩하는 엑손은 게놈에 존재하지만 CH1 엑손의 5' 쪽에 있는 기능적 스플라이스 수용체 서열의 손실로 인해 스플라이싱된다. 결과적으로 VDJ 영역은 CH2 엑손에 접합된다. 이러한 불변영역(CH2, CH3)에 VHH가 재조합되면, 반쪽 항체가 경쇄/중쇄 쌍이 아닌 단일쇄인 항체(즉, 경쇄의 상호 작용이 없는 2개의 중쇄의 항체)가 생성된다. 항원의 결합은 기존의 항체와 다르지만, 가변영역의 과돌연변이 및 이러한 고친화성 항체를 발현하는 세포의 선별을 통해 동일한 방식으로 고친화성을 달성한다.

[0046] 예시적인 일 실시양태에서, 개시된 HCAb는 내인성 무린 항체 발현이 제거되고 낙타류 트랜스진이 도입된 트랜스제닉 마우스를 면역화함으로써 생산된다. HCAb 마우스는 US8,883,150, US8,921,524, US8,921,522, US8,507,748, US8,502,014, US 2014/03576908, US2014/0356908, US2014/0032161/03,033335, US2014/09에 개시되어 있다. US2011/0118444 및 US2009/0307787에 기재되어 있으며, 이들 모두는 중쇄 단독 항체 및 트랜스제닉 마우스에서의 이들의 생산과 관련하여 개시하는 모든 것에 대해 참조로서 본원에 포함된다. HCAb 마우스를 면역화하고 생성된 프라이밍된 비장 세포를 무린 골수종 세포와 융합하여 하이브리도마를 형성한다.

[0047] 다른 실시양태에서, HCAb는 라마를 원하는 항원으로 면역화하고 생성된 항원 결합 항체의 VHH 영역을 코딩하는 서열을 분리함으로써 생산된다. 일 실시양태에서, VHH는 파지 디스플레이 라이브러리를 사용하여 단리된다. 예를 들어, WO 91/17271; WO 92/01047; 및 WO 92/06204(이들 각각은 파지 라이브러리를 만드는 것에 대한 설명을 위해 그 전체가 참고로 포함됨)를 참조한다.

[0048] 또한 2개 이상의 항원 결합 도메인이 단일 융합 단백질에 연결된 다중특이적 또는 다가 항체가 본원에 개시된다. 다중특이적 항체는 (i) 다중특이적 Fv 단편; (ii) 제2 특이성을 갖는 제2 VH 도메인과 회합된(또는 이에 융합된) 제1 특이성의 중쇄; (iii) 제2 특이성을 갖는 제2 VH 도메인과 회합된 제1 특이성을 갖는 사량체성 모노클로날 항체(여기서, 제2 VH 도메인은 제1 VH 도메인과 회합됨); (iv) 제2 특이성을 갖는 제2 VH 도메인과 회합된 제1 특이성의 Fab 단편(VH-CH1/VL-CL); 을 포함한 다양한 형태를 취할 수 있다. 예시적인 Fab 단편은 제2 특이성을 갖는 제2 VH 서열이 제1 VH 도메인의 C-말단 또는 N-말단, 또는 제1 CH1 또는 제1 CL 도메인의 C-말단 또는 N-말단과 회합된 것을 포함한다. 추가 실시양태에서, 제2 및/또는 제3 특이성(또는 그 이상)을 갖는 VH 서열은 제1 VH 도메인의 C-말단 또는 N-말단, 또는 C-말단 또는 첫 번째 CH1 또는 제1 CL 도메인의 N-말단과 연관(또는 융합)될 수 있다. 다양한 실시양태에서, 이들 형식 중 임의의 것은 본원에 개시된 HCAb 가변 도메인 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[0049] 다중특이적 또는 다가 항체는 특정 항원 결합 도메인(예: VH 또는 VHH)을 다른 항원 결합 도메인에 연결하고 원하는 3차원 입체 구조 및 및 항원 결합 프로파일을 생성하기 위해 아미노산 서열의 적절한 폴딩을 허용하는 링커 서열을 포함할 수 있다. 일반적으로 링커 서열은 도메인이 적절하게 접힐 수 있도록 도메인 사이에 충분한 공간과 유연성을 제공하는 짧은 아미노산 서열일 것이다. 링커는 또한 각 도메인의 표적에 대한 결합을 용이하게 하기 위해 입체 장애를 일으킬 수 있다. 적합한 링커는 표 15의 링커(서열번호 100-119), EPKSCD(서열번호 224), 및 ASTKGP(서열번호 225)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 추가 링커는 당업자에게 공지되어 있을 것

이다.

[0050] 또한 본 개시내용의 범위 내에 본 명세서에 개시된 단일특이성 또는 다중특이성 항체의 아미노산 서열 변이체가 있다. 아미노산 서열 변이체는 항체를 코딩하는 DNA에 적절한 뉴클레오타이드 변화를 도입하거나 펩타이드 합성을 통해 준비한다. 이러한 변이체는 예를 들어, 본원 실시예의 항체의 아미노산 서열 내의 잔기로부터의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 최종 구조가 원하는 특성을 갖는다면 최종 구조에 도달하기 위해 삭제, 삽입 및 치환의 모든 조합이 이루어진다. 아미노산 변화는 또한 글리코실화 부위의 수 또는 위치를 변경하는 것과 같은 인간화 또는 변이체 항체의 번역 후 과정을 변경할 수 있다.

[0051] 돌연변이 유발에 선호되는 위치인 항체의 특정 잔기 또는 영역을 식별하는 유용한 방법은 "알라닌 스캐닝 돌연변이 유발"이라고 한다. 잔기 또는 표적 잔기 그룹이 식별되고(예: Arg, Asp, His, Lys 및 Glu와 같은 하전된 잔기) 항원과 아미노산의 상호 작용에 영향을 미치기 위해 중성 아미노산(가장 바람직하게는 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체된다. 그런 다음, 치환에 대한 기능적 민감성을 나타내는 아미노산 위치는 치환 부위에 또는 치환 부위에 대한 추가 또는 다른 변이체를 도입함으로써 정제된다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하는 부위는 미리 정해져 있지만, 돌연변이 자체의 성질은 미리 정해져 있을 필요는 없다. 예를 들어, 주어진 부위에서 돌연변이의 성능을 분석하기 위해, 알라닌 스캐닝 또는 무작위 돌연변이유발이 표적 코돈 또는 영역에서 수행되고 발현된 항체 변이체가 원하는 활성에 대해 스크리닝된다.

[0052] 아미노산 서열 삽입은 1개 잔기에서 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드에 이르는 길이 범위의 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합, 뿐만 아니라 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 본원에 개시된 항체 또는 에피토프 태그에 융합된 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 효소 또는 폴리펩티드의 항체의 N- 또는 C-말단에 대한 융합을 포함한다.

[0053] 또 다른 유형의 변이체는 아미노산 치환 변이체이다. 이러한 변이체는 제거된 항체 분자에서 하나 이상의 아미노산 잔기가 있고 그 자리에 다른 잔기가 삽입되어 있다. 치환 돌연변이유발에 대한 가장 큰 관심 부위는 초가변 영역을 포함하지만, FR 변경도 고려된다. 보존적 치환은 "선호하는 치환"이라는 표제 아래 표 1에 제시되어 있다. 이러한 치환이 생물학적 활성의 변화를 초래하는 경우, 표 1에서 "예시적 치환"으로 명명된 또는 아미노산 부류와 관련하여 아래에 추가로 설명된 바와 같이 보다 실질적인 변화가 도입되고 제품이 스크리닝될 수 있다.

표 1

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

[0055] 항체의 생물학적 특성의 실질적인 변형은 (a) 예를 들어 시트 또는 나선 형태와 같은 치환 영역에서 폴리펩티드

골격의 구조, (b) 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 벌크 를 유지하는 것에 대한 효과가 유의하게 다른 치환을 선택함으로써 달성된다. 자연적으로 발생하는 잔기는 공통 측쇄 특성에 따라 그룹으로 나뉜다.

[0056] (1) 소수성: Norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0057] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr;

[0058] (3) 산성: Asp, Glu;

[0059] (4) 염기성: Asn, Gln, His, Lys, Arg;

[0060] (5) 사슬 방향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro; 그리고

[0061] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[0062] 비보수적 치환은 이러한 클래스 중 하나의 구성원을 다른 클래스로 교환하는 것을 수반한다.

[0063] 단일특이성 또는 다중특이성 항체의 적절한 형태를 유지하는 데 관여하지 않는 임의의 시스테인 잔기는 또한 일반적으로 세린으로 치환되어 분자의 산화 안정성을 개선하고 비정상적인 가교를 방지할 수 있다. 반대로, 시스테인 결합(들)은 항체의 안정성(특히 항체가 Fv 단편과 같은 항체 단편인 경우)을 향상시키기 위해 항체에 추가될 수 있다.

[0064] 다른 유형의 치환 변이체는 모 항체(예를 들어, 인간화 또는 낙타류 항체)의 하나 이상의 초가변 영역 잔기를 치환하는 것을 포함한다. 일반적으로, 추가 개발을 위해 선택된 생성된 변이체(들)는 이들이 생성되는 모 항체에 비해 개선된 생물학적 특성을 가질 것이다. 이러한 치환 변이체를 생성하는 편리한 방법은 파지 디스플레이를 사용한 친화성 성숙이다. 간략하게, 여러 초가변 영역 부위(예: 6-7 부위)가 돌연변이되어 각 부위에서 가능한 모든 아미노 치환이 생성된다. 이렇게 생성된 항체 변이체는 각 입자 내에 패키징된 M13의 유전자 III 생성물에 대한 융합체로서 사상 파지 입자로부터 1가 방식으로 표시된다. 파지-디스플레이된 변이체는 이어서 본원에 개시된 바와 같은 생물학적 활성(예를 들어, 결합 친화도)에 대해 스크리닝된다. 변형을 위한 후보 초가변 영역 부위를 확인하기 위해, 항원 결합에 크게 기여하는 확인된 초가변 영역 잔기에 알려진 스캐닝 돌연변이 유발을 수행할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하여 항체와 항원 사이의 접촉점을 확인하는 것이 유리할 수 있다. 이러한 접촉 잔기 및 이웃하는 잔기는 본원에 기술된 기술에 따른 치환 후보이다. 일단 그러한 변이체가 생성되면, 변이체 패널은 본원에 기재된 바와 같이 스크리닝되고 하나 이상의 관련 검정에서 우수한 특성을 갖는 항체가 추가 개발을 위해 선택될 수 있다.

[0065] 항체의 또 다른 유형의 아미노산 변이체는 항체의 원래 글리코실화 패턴을 변경한다. 변경은 항체에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 모이어티를 결실시키고/시키거나 항체에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위를 추가하는 것을 의미한다.

[0066] 항체의 글리코실화는 일반적으로 N-연결 또는 O-연결이다. N-연결은 탄수화물 부분이 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착되는 것을 의미한다. 트리펩티드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌(여기서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 아스파라긴 측쇄에 대한 탄수화물 모이어티의 효소적 부착에 대한 인식 서열이다. 따라서, 폴리펩타이드에서 이러한 트리펩타이드 서열 중 하나의 존재는 잠재적인 글리코실화 부위를 생성한다. O-연결된 글리코실화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토오스 또는 자일로오스 중 하나가 하이드록시아미노산, 가장 일반적으로 세린 또는 트레오닌에 부착되는 것을 의미하지만, 5-하이드록시프롤린 또는 5-하이드록시리신도 사용할 수 있다.

[0067] 항체에 대한 글리코실화 부위의 추가는 아미노산 서열을 변경하여 상기 기술된 트리펩티드 서열(N-연결 글리코실화 부위의 경우) 중 하나 이상을 함유하도록 편리하게 달성된다. 변경은 원래 항체의 서열에 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 추가하거나 치환함으로써 이루어질 수도 있다(O-연결된 글리코실화 부위의 경우).

[0068] 단일특이성 또는 다중특이성 항체의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산 분자는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제조된다. 이들 방법은 천연 공급원으로부터의 단리(자연 발생 아미노산 서열 변이체의 경우) 또는 올리고뉴클레오타이드-매개(또는 사이트 지정) 돌연변이유발, PCR 돌연변이유발, 및 본원에 개시된 항체의 이전에 제조된 변이체 또는 비-변이체 버전의 카세트 돌연변이유발에 의한 제제를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0069] 단일특이성 또는 다중특이성 항체의 다른 변형이 고려된다. 예를 들어, 질병 치료에서 항체의 유효성을 향상시키기 위해 이펙터 기능과 관련하여 항체를 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 시스테인 잔기(들)은

Fc 영역에 도입되어 이 영역에서 사슬간 이황화 결합 형성을 허용할 수 있다. 이렇게 생성된 동종이량체 항체는 개선된 내재화 능력 및/또는 증가된 보체 매개 세포 사멸 및 항체 의존성 세포 독성(ADCC)을 가질 수 있다. 향상된 항종양 활성을 갖는 동종이량체 항체는 또한 이중작용성 가교결합제를 사용하여 제조될 수 있다. 대안적으로, 이중 Fc 영역을 갖고 이에 의해 향상된 보체 용해 및 ADCC 능력을 가질 수 있는 항체가 조작될 수 있다.

[0070] 또 다른 실시양태에서, 항체는 항체-수용체 접합체가 환자에게 투여되는 사전 표적화에서의 이용을 위해 "수용체"(예: 스트렙타비딘)에 접합될 수 있고, 그 다음 정화제를 사용하여 순환에서 결합되지 않은 접합체를 제거한 다음 세포독성제(예: 방사성 핵종)에 접합된 "리간드"(예: 아비딘)를 투여한다.

[0071] 단일특이성 또는 다중특이성 항체의 공유 변형도 본 개시내용의 범위 내에 포함된다. 그것들은 화학적 합성에 의해, 또는 적용 가능한 경우 항체의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 만들어질 수 있다. 항체의 다른 유형의 공유 변형은 항체의 표적 아미노산 잔기를 선택된 측쇄 또는 N- 또는 C-말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화제와 반응시켜 분자 내로 도입된다. 폴리펩티드의 예시적인 공유 변형은 US5,534,615에 기재되어 있으며, 폴리펩티드의 공유 변형과 관련하여 개시되어 있는 모든 것에 대해 본원에 참고로 구체적으로 포함된다. 항체의 공유 변형의 예시적인 유형은 US4,640,835, US4,496,689, US4,301,144, US4,670,417, US4,791,192 또는 US4,179,337 에 기재된 방식으로 항체를 다양한 비단백질성 중합체, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 또는 폴리옥시알킬렌 중 하나에 연결하는 것을 포함한다.

[0072] 본원에 개시된 단일특이성 또는 다중특이성 항체는 재조합 수단에 의해 생산될 수 있다. 따라서, 항체를 코딩하는 핵산, 항체를 코딩하는 핵산을 함유하는 발현 벡터, 및 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포가 본원에 개시된다. 재조합 생산 방법은 당업계에 널리 공지되어 있으며 원핵 및 진핵 세포에서의 단백질 발현 및 후속적인 항체 분리 및 일반적으로 제약상 허용되는 순도로 정제하는 것을 포함한다. 숙주 세포에서 전술한 바와 같은 항체의 발현을 위해, 항체 서열을 코딩하는 핵산이 표준 방법에 의해 발현 벡터에 삽입된다. 발현은 CHO 세포, NSO 세포, SP2/0 세포, HEK293 세포, COS 세포, PER.C6 세포, 효모 또는 *E. coli* 세포와 같은 적절한 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 수행되고 항체는 세포에서 회수된다(상층액 또는 용해 후 세포). 임의의 재조합적으로 발현된 단백질은 사용된 발현 시스템 및 단백질이 세포질에서 발현되는지 분비되는지에 따라 N-말단에서 개시 메티오닌(또는 포르밀-메티오닌) 또는 신호 서열을 필요로 한다는 것을 이해해야 한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 단백질 서열은 N-말단에서 이러한 추가 아미노산으로 변형된다. 일부 실시양태에서 이러한 N-말단 서열은 완전히 성숙한 서열로부터 (전체 또는 부분적으로) 절단되는 반면, 다른 실시양태에서는 이들이 유지된다.

[0073] 따라서, 본원에 개시된 특정 실시양태는 a) 항체를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 적어도 하나의 발현 벡터로 숙주 세포를 형질전환시키는 단계; b) 항체 분자의 합성을 허용하는 조건 하에 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 c) 배양물로부터 상기 항체 분자를 회수하는 단계 를 포함한다.

[0074] 항체는 예를 들어 단백질 A-세파로스, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화성 크로마토그래피와 같은 통상적인 면역글로불린 정제 절차에 의해 배양 배지로부터 적합하게 분리된다.

[0075] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "세포", "세포주" 및 "세포 배양물"이라는 표현은 상호교환적으로 사용되며 이러한 모든 명칭은 자손을 포함한다. 따라서, "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"라는 단어는 전달 횟수와 상관 없이 1차 대상 세포 및 이로부터 유래된 배양물을 포함한다. 또한 모든 자손은 고의적이거나 우발적인 돌연변이로 인해 DNA 함량이 정확히 동일하지 않을 수 있음을 이해한다. 원래 형질전환된 세포에서 스크리닝된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 변이 자손이 포함된다. 별개의 명칭이 의도된 경우, 문맥에서 명확해질 것이다.

[0076] 본원에서 사용된 용어 "형질전환"은 벡터/핵산을 숙주 세포로 전달하는 과정을 의미한다. 강력한 세포벽 장벽이 없는 세포를 숙주 세포로 사용하는 경우, 예를 들어 인산칼슘 침전법에 의해 형질감염을 수행할 수 있다. 그러나, 핵 주입 또는 원형질체 융합과 같은 세포 내로 DNA를 도입하는 다른 방법도 사용할 수 있다. 원핵 세포 또는 상당한 세포벽 구조를 포함하는 세포가 사용되는 경우, 예를 들어 형질감염의 한 방법은 염화칼슘을 사용한 갈슘 처리이다.

[0077] 본원에 사용된 "발현"은 핵산이 mRNA로 전사되는 과정 및/또는 전사된 mRNA(전사체로도 지칭됨)가 후속적으로 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질로 번역되는 과정을 지칭한다. 전사체 및 암호화된 폴리펩타이드는 집합적으로 유전자 산물로 지칭된다. 폴리뉴클레오타이드가 게놈 DNA로부터 유래된 경우, 진핵 세포에서의 발현은 mRNA의 스플라이싱을 포함할 수 있다.

- [0078] "벡터"는 삽입된 핵산 분자를 숙주 세포 내로 및/또는 숙주 세포 사이에 전달하는 핵산 분자, 특히 자가 복제이다. 이 용어는 DNA 또는 RNA를 세포 내로 삽입하기 위해 주로 기능하는 벡터(예: 염색체 통합), DNA 또는 RNA의 복제를 위해 주로 기능하는 벡터의 복제, 및 DNA 또는 RNA. 설명된 기능 중 하나 이상을 제공하는 벡터도 포함된다.
- [0079] "발현 벡터"는 적절한 숙주 세포에 도입될 때 폴리펩타이드로 전사 및 번역될 수 있는 폴리뉴클레오타이드이다. "발현 시스템"은 일반적으로 원하는 발현 생성물을 생성하도록 기능할 수 있는 발현 벡터로 구성된 적합한 숙주 세포를 지칭한다.
- [0080] 본원에 사용된 용어 "숙주 세포"는 본원에 개시된 항체를 생성하도록 조작될 수 있는 임의의 종류의 세포 시스템을 나타낸다. 한 실시양태에서 HEK293 세포 및 CHO 세포가 숙주 세포로서 사용된다.
- [0081] 예를 들어, 원핵생물에 적합한 조절 서열은 프로모터, 선택적으로 오퍼레이터 서열, 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵 세포는 프로모터, 인핸서 및 폴리아데닐화 신호를 이용하는 것으로 알려져 있다.
- [0082] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계에 있을 때 "작동 가능하게 연결"된다. 예를 들어, 프리-서열 또는 분비 리더에 대한 DNA는 그것이 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 프리-단백질로서 발현된다면 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 미치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되고; 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 위치하는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로 "작동 가능하게 연결된"은 연결되는 DNA 서열이 인접하고, 분비 리더의 경우 인접하고 관독 프레임에 있음을 의미한다. 그러나 인핸서는 인접할 필요가 없다. 연결은 편리한 제한 부위에서 결합함으로써 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커가 통상적인 관행에 따라 사용된다.
- [0083] 또한 단일특이성 또는 다중특이성 항체를 암호화하는 단리된 핵산, 핵산을 포함하는 벡터 및 숙주 세포, 및 항체의 생산을 위한 재조합 기술이 개시된다.
- [0084] 항체의 재조합 생산을 위해, 이를 코딩하는 핵산이 분리되어 추가 클로닝(DNA 증폭) 또는 발현을 위해 복제 가능한 벡터에 삽입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 예를 들어 항체 생산과 관련하여 개시되는 모든 것에 대해 본원에 참조로 구체적으로 포함되는 US 5,204,244에 기재된 바와 같이 상동 재조합에 의해 생산될 수 있다. 항체를 코딩하는 DNA는 (예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 통상적인 절차를 사용하여 쉽게 단리되고 서열결정된다. 많은 벡터를 사용할 수 있다. 벡터 성분은 일반적으로 다음 중 하나 이상을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다: 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열, 예를 들어 US 5,534,615에 기술되어 있고, 단백질 발현과 관련하여 개시하는 모든 내용에 대해 구체적으로 참고로 본 명세서에 포함된다.
- [0085] 본원의 벡터에서 DNA를 클로닝하거나 발현시키기에 적합한 숙주 세포는 상기 기재된 원핵생물, 효모 또는 고등 진핵생물 세포이다. 이러한 목적에 적합한 원핵생물은 진균, 예를 들어 그람-음성 또는 그람-양성 유기체, 예를 들어 *장내세균과*, 예를 들어, *대장균*, *엔테로박터*, *에르위니아*, *클렙시엘라*, *프로테우스*, *살모넬라*, 예를 들어, *살모넬라 티피무리움*, *세라티아*를 포함한다. 예를 들어, *Serratia marcescans* 및 *Shigella*, 뿐만 아니라 *B. subtilis* 및 *B. licheniformis*와 같은 *Bacilli*, *P. aeruginosa* 와 같은 *Pseudomonas* 및 *Streptomyces*. *E. coli* 복제 숙주 중 하나는 *E. coli* 294 (ATCC 31,446)이지만 *E. coli* B, *E. coli* X1776(ATCC 31,537) 및 *E. coli* W3110(ATCC 27,325)과 같은 다른 균주도 적합하다. 이러한 예는 제한적인 것이 아니라 예시적인 것이다.
- [0086] 원핵생물에 더하여, 사상균 또는 효모와 같은 진핵생물 미생물은 단일특이성 또는 다중특이성 항체-인코딩 벡터에 대한 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다.
- [0087] 사카로미케스 케레비시아이(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 일반적인 빵 효모는 하등 진핵 숙주 미생물 중에서 가장 일반적으로 사용된다. 그러나, 많은 다른 속, 종 및 균주가 여기에서 일반적으로 사용 가능하고 유용하며, 예를 들면, 분열효모(*Schizosaccharomyces pombe*); *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilum* (ATCC 36,906), *K. 쉼모틀레란스*, 및 *K. 마르시아누스*와 같은 *클루이베로 마이세스* 숙주(*Kluyveromyces* hosts); *야로위아*(EP 402,226); *피치아 파스토리스* (EP 183,070); *칸디다*; *트리코터마 레시아*(EP 244,234); *뉴로스포라 크라사*; *Schwanniomyces occidentalis* 와 같은 *Schwanniomyces*; 및 사상 진균, 예를 들어 *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyopcladium* 그리고, *A. nidulans* 및 *A. niger* 와 같은 *Aspergillus* 숙주를 포함한다.

- [0088] 글리코실화된 단일특이성 또는 다중특이성 항체의 발현에 적합한 숙주 세포는 식물 및 곤충 세포와 같은 무척추 동물 세포를 포함하는 다세포 유기체로부터 유래된다. *Spodoptera frugiperda* (애벌레), *Aedes aegypti* (모기), *Aedes albopictus* (모기), *Drosophila melanogaster* (과일파리) 및 *Bombyx mori* 와 같은 숙주로부터의 수많은 바콜로바이러스 균주 및 변이체 및 해당 허용 곤충 숙주 세포가 확인되었다. 형질감염을 위한 다양한 바이러스 균주, 예를 들어 *Autographa californica* NPV의 L-1 변이체 및 *Bombyx mori* NPV의 Bm-5 균주가 공개적으로 이용가능하며, 이러한 바이러스는 본 발명에 따라 특히 본 발명에 따른 바이러스로 사용될 수 있다. *Spodoptera frugiperda* 세포의 형질감염을 위해, 목화, 옥수수, 감자, 대두, 피튜니아, 토마토 및 담배의 식물 세포 배양도 숙주로 사용할 수 있다.
- [0089] 그러나 척추동물 세포에 대한 관심이 가장 높았고 배양(조직 배양)에서 척추동물 세포의 증식이 일상적인 절차가 되었다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주(COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 계통(현탁 배양에서 성장을 위해 서브클로닝된 293 또는 293 세포); 아기 햄스터 신장 세포(BHK, ATCC CCL 10); 차이니스 햄스터 난소 세포/-DHFR(CHO); 마우스 세르톨리 세포(TM4); 원숭이 신장 세포(CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부암 세포(HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포(MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간 세포(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포(W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포(Hep G2, HB 8065); 마우스 유선 종양(MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포; MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간종 계통(Hep G2)가 있다.
- [0090] 숙주 세포는 단일 특이적 또는 다중특이적 항체 생산을 위한 전술한 발현 벡터로 형질전환되고 프로모터 유도, 형질전환체 선택 또는 원하는 서열을 코딩하는 유전자 증폭에 적합하게 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양된다.
- [0091] 단일특이성 또는 다중특이성 항체를 생산하기 위해 사용되는 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 숙주 세포의 배양에는 Ham's F10(Sigma), Minimal Essential Medium((MEM), (Sigma), RPMI-1640(Sigma), Dulbecco's Modified Eagle's Medium((DMEM), Sigma)과 같은 상용 배지가 적합하다. 또한, US4,767,704, US4,657,866, US4,927,762, US4,560,655, US5,122,469, WO 90/03430, WO 87/00195 또는 US Re. 30,985에 기재된 숙주세포의 배지를 배양액으로 사용할 수 있다. 이러한 배지는 필요에 따라 호르몬 및/또는 기타 성장 인자(예: 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자), 염(예: 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 인산염), 완충액(예: HEPES)으로 보충될 수 있다., 뉴클레오타이드(예: 아데노신 및 티미딘), 항생제(예: GENTAMYCIN™), 미량 원소(일반적으로 마이크로몰 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로 정의됨) 및 포도당 또는 동등한 에너지원 기타 필요한 보충물은 또한 해당 분야의 숙련자에게 알려진 적절한 농도로 포함된다. 마름, 온도, pH 등과 같은 배양 조건은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 미리 사용된 조건이며, 당업자에게 자명할 것이다.
- [0092] 제조법 기술을 사용하는 경우, 항체는 세포내, 주변세포질 공간에서 생산되거나 배지로 직접 분비될 수 있다. 항체가 세포 내에서 생성되는 경우 첫 번째 단계로 숙주 세포 또는 용해된 단편인 미립자 파편이 예를 들어 원심분리 또는 환외여과에 의해 제거된다.
- [0093] 세포로부터 제조된 항체 조성물은 예를 들어 히드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 및 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제할 수 있으며, 친화성 크로마토그래피가 바람직한 정제 기술이다. 친화성 리간드로서 단백질 A의 적합성은 항체에 존재하는 면역글로불린 Fc 도메인의 중 및 이소타입에 따라 다르다. 단백질 A는 인간 $\gamma 1$, $\gamma 2$ 또는 $\gamma 4$ 중쇄를 기반으로 하는 항체를 정제하는 데 사용할 수 있지만 단백질 A는 Fc 영역이 없는 항체를 정제하는 데 사용할 수 있다. 단백질 G는 모든 마우스 이소타입 및 인간 $\gamma 3$ 에 유용하다. 친화성 리간드가 부착된 기질은 대부분 아가로스이지만 다른 기질도 사용할 수 있다. 제어된 기공 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠과 같은 기계적으로 안정적인 매트릭스는 아가로스로 달성할 수 있는 것보다 더 빠른 유속과 더 짧은 처리 시간을 허용한다. 항체가 CH3 도메인을 포함하는 경우 Bakerbond ABX™ 수지는 정제에 유용하다. 본원에 개시된 항체 및 항체 단편은 또한 히스티딘 태그 및 금속 친화성 크로마토그래피에 의해 친화성 정제로 합성될 수 있다.
- [0094] 이온 교환 컬럼에서 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 크로마토그래피, 헤파린 크로마토 그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지(예: 폴리아스파르트산 컬럼)에 대한 SEPHAROSE™ 크로마토그래피, 크로마토포커싱과 같은 단백질 정제를 위한 기타 기술, 회수할 항체에 따라 SDS-PAGE, 황산 암모늄(ammonium sulfate) 침전도 가능하다.
- [0095] 임의의 예비 정제 단계(들) 후에, 관심 항체 및 오염물을 포함하는 혼합물은 바람직하게는 낮은 염 농도(예를 들어, 약 0-0.25M 염)에서 수행되는 약 2.5-4.5의 pH에서 용리 완충액을 사용하여 낮은 pH 소수성 상호작용 크

로마토그래피에 적용될 수 있다.

- [0096] 또한 중앙 미세환경에서 절단가능한 다중특이적 단일 사슬 항체가 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, 중앙 표적화 도메인(예: 중앙 항원 결합 도메인) 또는 기타 기능적 도메인(예: 전신 반감기를 연장할 수 있는 항-HSA 도메인)은 일단 다중특이적 단일 사슬이 링커에서 절단된다. 항체는 치료 효과를 가져오는 다른 도메인(들)을 방출하기 위해 중앙에 도달한다. 중앙 미세환경은 본원에 개시된 링커를 절단할 수 있는 다수의 프로테아제를 함유한다. 중앙 프로테아제의 비제한적인 예는 기질 메탈로프로테이나제(예: MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9, MMP12 및 MMP14), ADAM(붕해 및 메탈로프로테이나제, 예를 들어 ADAM10 및 ADAM17), 칼리크레인 관련 펩티다제(예: KLK1, KLK2, KLK3 및 KLK6), 카텝신(예: CTS-B, CTS-L 및 CTS-S), 유로키나제 플라스미노겐 활성화제(uPA), 헤파신(HPN), 마트립타제, 레구메인, 또는 디펩티딜 펩티다제(예: DDP4)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0097] 항체 조성물
- [0098] 또한 CD47, HSA, PD-L1, CD33, CD16, 또는 LAG3을 포함하는 단일특이성 또는 다중특이성 항체를 포함하는 약제학적 조성물이 본원에 개시된다. 또한, 약제학적 조성물의 제조를 위한 본원에 기재된 항체의 용도가 개시된다. 또한, 개시된 항체 및 다양한 질병 및 장애의 치료를 위한 항체를 포함하는 약제학적 조성물을 사용하는 방법이 개시된다.
- [0099] 약제학적 조성물은 인간의 질병 치료를 위해 의도되고 적합한 것이다. 즉, 전반적인 유익한 효과를 제공하고 유익한 효과의 제공과 관련되지 않은 독성 또는 기타 바람직하지 않은 영향을 일으키는 성분 또는 오염 물질의 양을 포함하지 않는다. 약제학적 조성물은 하나 이상의 활성제를 함유할 것이고, 투여, 용해도, 흡수 또는 생체이용률, 및/또는 안정성을 돕기 위해 용매, 완충제, 희석제, 담체 및 기타 부형제, 예를 들면 활성제(들) 또는 전체 조성물 등을 추가로 함유할 수 있다.
- [0100] 본원에 개시된 단일특이성 또는 다중특이성 항체는 또한 리포솜으로 제형화될 수 있다. 항체를 함유하는 리포솜은 US4,485,045, US4,544,545, 및 US5,013,556에 기재된 것과 같은 당업계에 공지된 방법에 의해 제조된다. 특히 유용한 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도체화된 포스파티딜에탄올아민(PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물을 사용한 역상 증발법에 의해 생성될 수 있다. 리포솜은 정의된 기공 크기의 필터를 통해 압출되어 원하는 직경의 리포솜을 생성한다. 항체의 Fab' 단편은 이화화 교환 반응을 통해 리포솜에 접합될 수 있다.
- [0101] 본원에 사용된 "약제학적 담체"는 생리학적으로 양립가능한 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항균제 및 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 바람직하게는, 담체는 정맥내, 근육내, 안구내, 유리체내, 피하, 비경구, 척추 또는 표피 투여(예를 들어, 주사 또는 주입)에 적합하다. 일부 실시양태에서, 담체는 수성이다.
- [0102] 본원에 개시된 조성물은 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 투여될 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 원하는 결과에 따라 달라질 것이다. 개시된 항체를 특정 투여 경로로 투여하기 위해, 불활성화를 방지하기 위해 항체를 물질과 연관시키거나 항체를 물질과 공동 투여할 필요가 있을 수 있다. 예를 들어, 항체는 적절한 담체, 예를 들어 리포솜 또는 희석제에서 대상체에게 투여될 수 있다. 약학적으로 허용되는 희석제는 식염수 및 완충 수용액을 포함한다. 약제학적 담체에는 멸균 주사 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 분말이 포함된다. 약학적 활성 물질에 대한 이러한 매질 및 제제의 용도는 당업계에 공지되어 있다.
- [0103] 본원에 사용된 "비경구 투여" 및 "비경구 투여되는"이라는 문구는 일반적으로 주사에 의한 장관 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 의미하며, 정맥내, 근육내, 동맥내, 척수강내, 피막내, 안와내, 심장내, 안내, 유리체내, 피내, 복강내, 기관내, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0104] 이들 조성물은 또한 방부제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 부형제를 함유할 수 있다. 미생물의 존재 방지는 전술한 살균 절차와 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 등의 포함에 의해 보장될 수 있다. 또한, 당, 염화나트륨 등과 같은 등장화제를 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 주사 가능한 약제학적 형태의 장기간 흡수는 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수를 지연시키는 제제를 포함함으로써 야기될 수 있다.
- [0105] 일부 실시양태에서, 항체를 포함하는 제약 조성물은 동결건조 케이크이다. 동결건조 케이크는 증량제, 완충제 및/또는 염, 또는 본원에 기재된 바와 같은 기타 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 동결건조된 조성물은 환자에

게 투여하기 위해 멸균수 또는 수성 완충액을 첨가함으로써 재구성될 수 있다.

- [0106] 선택된 투여 경로에 관계없이, 적합한 수화된 형태로 사용될 수 있는 개시된 항체 및/또는 항체를 함유하는 제약 조성물은 당업자에게 공지된 통상적인 방법에 의해 제약상 허용되는 투여 형태로 제제화된다 .
- [0107] 약제학적 조성물 중 활성 성분의 실제 투여량 수준은 특정 환자, 조성물 및 투여 방식에 대해, 환자에게 독성이 없이, 원하는 치료 반응을 달성하는 데 효과적인 활성 성분의 양을 얻기 위해 다양할 수 있다. 선택된 투여량 수준은 사용된 본 발명의 특정 조성물의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 특정 화합물의 배설 속도, 투여 기간을 비롯한 다양한 약동학적 인자에 따라 달라질 것이다. 선택된 투여량 수준은 사용된 본 발명의 특정 조성물의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 특정 화합물의 배설 속도, 치료 기간, 조합하여 사용되는 기타 약물, 화합물 및/또는 물질 사용된 특정 조성물, 연령, 성별, 체중, 상태, 일반적인 건강 및 치료되는 환자의 이전 병력, 및 의학 분야에서 잘 알려진 유사 인자를 포함한 다양한 약동학적 요인에 따라 달라진다.
- [0108] 개시된 MVSCA 및 이들의 구성요소 항체 도메인 및 링커의 기능
- [0109] 항HSA VHH
- [0110] MVSCA 내 항-HSA 도메인의 주요 기능은 HSA에 결합하여 신체에서 MVSCA의 반감기를 연장하는 것이다. 항HSA 도메인을 포함하면 반감기가 몇 시간에서 일주일 이상으로 연장될 수 있다. 대부분의 경우 이러한 목적에는 단일 항HSA 도메인이면 충분하다. 따라서, 항-HSA 도메인은 MVSCA 반감기를 연장하기 위한 수단을 구성한다.
- [0111] HSA에 결합함으로써, 항-HSA 도메인은 인접한 결합 도메인의 부분적 또는 완전한 차단을 매개하여 그의 활성(유효 친화도)을 억제하거나 조절할 수 있다. 차단이 실질적으로 완전한지 부분적인지 여부는 두 도메인 사이의 링커의 길이에 따라 달라진다. 링커가 짧을수록 항원 결합의 차단이 더 완전해진다. 부분 차단은 종종 VHH의 항원에 대한 겔보기 또는 효과적인 친화도의 감소로 관찰될 수 있다. 어떤 경우에는 도메인이 친화도가 더 높지만 친화도가 낮은 항원에 대한 상당한 결합을 나타내지 못하는 항원에 계속 결합하기 때문에 VHH의 특이성의 증가로 부분 차단이 관찰된다. 따라서, 항-HSA 도메인은 인접한 결합 도메인의 결합 활성을 억제하기 위한 수단을 구성한다.
- [0112] 블록을 되돌릴 수도 있다. 항-HSA 도메인을 MVSCA의 말단 위치에 배치하고 이를 절단 가능한 링커로 부착함으로써, 항-HSA 도메인이 제거될 수 있고 인접한 결합 도메인의 완전한 결합 활성이 회복될 수 있다. 이러한 항체 작제물은 효과적인 전구약물이다. 예를 들어, 링커가 원하는 작용 부위에서 발견된 프로테아제에 의해 절단되면 MVSCA는 인접한 결합 부위가 비활성화된 상태로 체내를 이동할 수 있지만 작용 부위(예: 종양)에 도달하면 링커는 절단되면 항-HSA 도메인이 방출되고 인접한 도메인의 결합 활성 억제가 역전된다. 따라서, 항-HSA 도메인은 절단 가능한 링커와 쌍을 이룰 때 MVSCA 또는 다중특이적 항체에서 인접한 결합 도메인의 결합 활성을 가역적으로 억제하기 위한 수단을 구성한다.
- [0113] 안티 CD47
- [0114] 항-CD47 도메인의 기능은 종양 세포에서 CD47의 "don't-eat-me" 신호를 억제하여 대식세포에 의해 식균될 수 있도록 하는 것이다. CD47은 광범위하게 발현되며 항-CD47 활성은 정상적인 건강한 세포에 상당한 결합이 있는 경우 문제가 될 수 있다. 이것은 몇 가지 방법으로 피할 수 있다. CD47에는 분명히 여러 형태가 있으며 종양 세포에서 일반적으로 발견되는 형태는 예를 들어 RBC에서 발견되는 형태와 다르다. 실시예 1에 나타난 바와 같이, 본원에 개시된 VHH는 종양 세포 상에서 발현된 바와 같이 CD47에 결합하지만, RBC 상에서 발현되는 바와 같이는 결합하지 않는다. RBC에 대한 결합을 피하는 것도 중요하므로 MVSCA가 혈류에 포착되지 않고 표적에 도달하는 것을 방지할 수 있다.
- [0115] CD47에 대한 MVSCA의 바람직하지 않거나 해로운 결합을 피하는 또 다른 방법은 상기 기재된 바와 같이 CD47에 대한 결합이 감소되거나 방지되는 방식으로 MVSCA를 항-HSA 도메인에 인접하게 배치함으로써 달성될 수 있다. MVSCA가 다른 결합 도메인을 통해 종양 세포에 결합하고 항-HSA 도메인이 국소 프로테아제에 의해 절단되어 방출되면 항-CD47 도메인은 CD47에 결합하여 대식세포와의 식균작용-억제 상호작용을 방지할 수 있다.
- [0116] 따라서, 항-CD47 도메인은 식균 작용의 억제를 감소시키는 수단을 구성한다.
- [0117] 안티 CD16
- [0118] 항-CD16 도메인의 기능은 NK 세포의 ADCC 활성을 상향 조절하는 것이다. CD16B는 조직 분포가 넓은 반면 CD16A는 NK 세포에서 특이적으로 발현된다. CD16A에 특이적인 항체는 원하는 표적인 NK 세포에만 결합하기 때문에 선

호된다. 그러나, CD16A 및 CD16B 둘 다에 결합하는 항체 및 CD16A에만 결합하는 항체는 둘 다 NK 세포의 ADCC 활성을 촉진할 수 있는 작용제이다.

[0119] CD16은 일반적으로 항체의 Fc 부분과 상호작용한다. NK 세포의 CD16A가 항체의 Fc 부분에 의해 결합될 때, NK 세포의 세포용해 활성은 항체의 가변 도메인이 결합한 세포 또는 미생물에 대해 지시된다. 그러나, 다수의 Fc 서열 및 다수의 유형의 Fc 수용체가 존재하여 Fc 영역에 의해 매개되는 다수의 가능한 효과를 야기한다. Fc 영역 대신 항-CD16 도메인을 사용함으로써 MVSCA는 자신이 지닌 다른 특이성의 표적에 대해 NK 매개 ADCC를 특이적으로 모집할 수 있다. 따라서, 항-CD16 도메인은 NK 매개 ADCC를 모집하기 위한 수단을 구성한다.

[0120] *안티 PD-L1*

[0121] 항-PD-L1 도메인은 면역 관문 억제제 및 항종양 항원 항체로 기능한다. 항-PD-L1 도메인은 PD-1 결합 길항제로 작용한다. PD-L1(예: 종양 세포)이 PD-1(예: T 세포)에 결합하는 것을 차단함으로써 항-PD-L1 도메인은 관련 면역 관문을 억제하여 T 세포 매개 면역 반응의 발달을 방출한다. 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체를 사용하는 PD-1 차단은 잘 알려진 암 치료 방식이다. 따라서, 항-PD-L1 도메인은 PD-1 차단을 위한 수단 또는 PD-1 면역 체크포인트를 방출하기 위한 수단을 구성한다.

[0122] 항-종양 항원 항체로서의 항-PD-L1 도메인은 종양 세포에 대한 MVSCA의 결합을 매개할 수 있다. MVSCA가 항-CD16 도메인도 포함하면 NK 매개 ADCC가 촉진된다. MVSCA는 또한 항-CD47 도메인을 포함하며, 대식세포 매개 식균 작용이 촉진된다. 종양 세포에 대한 다가 결합은 결합 친화도와 ADCC를 향상시킨다. 이는 다른 종양 항원을 표적으로 하는 항-PD-L1 도메인 및/또는 하나 이상의 결합 도메인의 다중 사본을 가짐으로써 달성될 수 있다. 따라서 항-PD-L1 도메인은 종양 세포에 결합하기 위한 수단, 종양 항원에 결합하기 위한 수단, 또는 PD-L1 종양 항원에 결합하기 위한 수단을 구성한다.

[0123] *안티 LAG3*

[0124] 항-LAG3 도메인은 면역 관문 억제제로 기능한다. 항-LAG3 도메인은 클래스 II MHC 단백질에 대한 LAG3의 길항제 결합으로 작용한다. T 세포의 LAG3이 종양 세포의 클래스 II MHC에 결합하는 것을 차단함으로써 항-LAG3 도메인은 관련 면역 체크포인트를 억제하여 T 세포 매개 면역 반응의 발달을 방출한다. 따라서, 항-LAG3 도메인은 LAG3 면역 체크포인트를 방출하기 위한 수단을 구성한다.

[0125] *안티 CD33*

[0126] 안티 CD33 도메인은 두 가지 방법으로 사용할 수 있다. 골수 및 일부 림프 세포에서 발견되는 CD33은 급성 골수성 백혈병(AML)과 같은 일부 혈액암에서 발현되므로 종양 항원이다. 항-종양 항원 항체로서의 항-CD33 도메인은 종양 세포에 대한 MVSCA의 결합을 매개할 수 있다. MVSCA가 항-CD16 도메인도 포함하면 NK 매개 ADCC가 촉진된다. MVSCA는 또한 항-CD47 도메인을 포함하며, 대식세포 매개 식균 작용이 촉진된다. 종양 세포에 대한 다가 결합은 결합 친화도와 ADCC를 향상시킨다. 이것은 항-CD33 도메인 및/또는 다른 종양 항원을 표적으로 하는 하나 이상의 결합 도메인의 다중 사본을 가짐으로써 달성될 수 있다. 따라서 항-CD33 도메인은 종양 세포에 결합하기 위한 수단, 종양 항원에 결합하기 위한 수단, 또는 CD33 종양 항원에 결합하기 위한 수단을 구성한다.

[0127] 또한, CD33이 예를 들어 β -아밀로이드 또는 당지질 침착의 다른 당단백질에서 시알산 잔기와 결합할 때, 억제 신호 전달 캐스케이드는 식세포 활성의 억제를 유도한다. 항-CD33 도메인을 포함하는 항체는 CD33 자극의 길항제로서 작용하여 식세포 활성 및 β -아밀로이드 제거를 촉진하여 알츠하이머병을 치료할 수 있다. 건성 연령 관련 황반 변성(AMD)과 같은 망막 질환은 또한 소교세포 식세포 작용에 의해 제거될 수 있는 불용성 침착물을 포함한다. 따라서, 항-CD33 도메인을 포함하는 항체는 또한 건성 AMD 및 기타 망막 질환의 치료에 유용할 수 있다. 따라서, 항-CD33 도메인은 (CD33-발현 세포에서) 식세포 활성을 촉진하기 위한 수단, β -아밀로이드의 제거를 촉진하기 위한 수단, 또는 불용성 침착물을 제거하기 위한 수단을 구성한다.

[0128] 알츠하이머병 및 망막 질환의 치료에 적합한 MVSCA는 바람직하게는 CD33에 대해 2가이고 반감기를 개선하기 위해 항-HSA 도메인을 포함한다. 이들은 또한 인간 혈액-뇌-장벽을 통한 이동을 촉진하기 위해 FC5 나노바디 도메인(Rissiek *et al.*., Front. Cell. Neurosci. 8:344, 2014)을 포함할 수 있다.

[0129] *링커*

[0130] 많은 구체예에서, 개별 결합 도메인은 서로 직접 연결되지 않고, 링커 사이에 개재된 짧은 아미노산 서열을 갖는다. 링커의 예는 표 15에 나와 있다. 링커의 길이와 서열은 MVSCA의 발현 수준, 구조 및 연결된 도메인의 결합 친화도에 실질적인 영향을 미칠 수 있다. 조정 가능한 길이 링커 L2 및 L4(표 15 참조)를 사용하여 이러한

매개변수 측면에서 MVSCA를 최적화할 수 있다. 링커 L1, L2 및 L4는 비절단성 링커 수단, 가요성 링커 수단, 또는 가요성, 비절단성 링커 수단으로 지칭될 수 있다.

[0131] 동일한 VHH 도메인의 두 복사본이 MVSCA에서 서로 인접하게 배치되면 서로 해로운 상호 작용이 자주 발생한다. 이것은 두 복사본 사이에 비교적 짧고 단단한 링커를 삽입하여 피할 수 있다. 일부 실시양태에서, 짧고 단단한 링커는 서열 AAA(표 15의 L3)를 갖는다. 이러한 링커는 짧은 강성 링커 수단 또는 절단 불가능한 짧은 강성 링커 수단으로 지칭될 수 있다.

[0132] 항-HSA 도메인-HSA 복합체가 인접한 결합 도메인의 결합 활성화와 관련하여 전구약물을 생성하는 데 사용되는 경우 절단 가능한 링커가 두 도메인 사이에 삽입되어야 한다. L11^{*}3 ~ L11^{*}18(표 15 참조)은 다양한 길이의 절단 가능한 링커 및 다양한 프로테아제에 의한 절단에 대한 민감성의 예이며, 이는 MVSCA의 발현 수준, 구조, 연결된 도메인의 결합 친화도 측면에서 MVSCA 및 절단 측면에서 MVSCA를 최적화하는 데 사용할 수 있다. 링커 L11^{*}3 내지 L11^{*}18은 절단가능한 링커 수단, 가요성 링커 수단, 또는 가요성, 절단가능한 링커 수단으로 지칭될 수 있다.

[0133] MVSCA

[0134] 본원에 기재된 결합 도메인 및 링커는 조합되어 특정 질병의 치료에 적합한 다기능 MVSCA를 생성할 수 있다. 그들은 또한 다른 결합 도메인과 추가로 결합될 수 있다. MVSCA는 또한 결합 도메인의 각 구성요소 유형과 연관된 다양한 기능을 달성하기 위한 수단을 포함하고/하거나 연관된 기능을 달성하기 위한 링커 수단을 포함하는 것으로 지칭될 수 있다. 예시적인 디자인은 바로 아래에서 간략하게 논의된다.

[0135] HSA/CD47/PD-L1: 이 디자인은 PD-L1 발현 종양 치료에 적합하고, 식균 작용을 촉진하고, PD-1 면역 관문을 방출하고, 순환 반감기를 연장한다. 다양한 실시양태에서, MVSCA는 항-CD47 및/또는 항-PD-L1 결합 도메인(들)에 대해 2가일 수 있다. 사용된 링커에 따라, 항-HSA 도메인(HSA가 결합되면)은 CD47에 대한 결합을 억제하거나 억제하지 않을 것이며, 억제가 존재하는 경우 절단 가능한 링커의 절단에 의해 역전될 수 있다. 일부 실시양태에서, 결합 도메인은 상이한 순서로 배열되지만, 항-HSA 도메인은 절단되는 경우 말단 위치에 있어야 한다. 이 디자인의 MVSCA를 구성 요소의 기능 중 하나 이상을 위한 수단을 포함하는 것으로 설명하는 것 외에도 MVSCA는 PD-L1 발현 종양의 식균 작용을 촉진하는 수단(및 PD-1 방출 면역 체크포인트). 이 설계의 여러 실시예가 실시예 7에 제시되어 있다.

[0136] HSA/LAG3/PD-L1: 이 디자인은 PD-L1 발현 종양 치료에 적합 하고 LAG3 및 PD-1 면역 관문을 방출하며 순환 반감기를 연장한다. 다양한 실시양태에서, MVSCA는 항-LAG3 및/또는 항-PD-L1 결합 도메인(들)에 대해 2가일 수 있다. 일부 실시양태에서, 결합 도메인은 상이한 순서로 배열된다. 이 디자인의 MVSCA를 구성 부분의 기능 중 하나 이상을 위한 수단을 포함하는 것으로 설명하는 것 외에도 MVSCA는 T 효과기 세포를 PD-L1 발현 종양으로 모집(LAG3 방출 및 PD-1 면역 체크포인트)하기 위한 수단으로도 지칭될 수 있다. 이 설계의 여러 실시예가 실시예 7에 제시되어 있다.

[0137] CD16A/HSA/CD47/PD-L1: 이 디자인은 PD-L1 발현 종양 치료에 적합하고, 식균 작용을 촉진하고, ADCC를 매개하기 위해 NK 세포를 모집하고, PD-1 면역 관문을 해제하고, 순환에서 반감기를 연장한다. 다양한 실시양태에서, MVSCA는 항-CD47 및/또는 항-PD-L1 결합 도메인(들)에 대해 2가일 수 있다. 일부 실시양태에서, 결합 도메인은 상이한 순서로 배열되지만, 항-HSA 도메인이 절단되는 경우 말단 위치에 배치되어야 한다. 사용된 링커에 따라, 항-HSA 도메인(HSA가 결합되면)은 CD47에 대한 결합을 억제하거나 억제하지 않을 것이며, 억제가 존재하는 경우 절단 가능한 링커의 절단에 의해 역전될 수 있다. 이 디자인의 MVSCA를 구성 요소 부분의 기능 중 하나 이상을 위한 수단을 포함하는 것으로 설명하는 것 외에도 MVSCA는 PD-L1 발현 종양의 식균 작용을 촉진하고 NK 매개 ADCC를 PD-L1 발현 종양(및 PD-1 면역 체크포인트 해제)으로 모집하기 위한 수단이라고도 할 수 있다. 이 설계의 여러 실시예가 실시예 8에 제시되어 있다.

[0138] CD16A/HSA/CD47/CD33: 이 디자인은 CD33 발현 종양 치료에 적합하고, 식균 작용을 촉진하고, NK 세포를 모집하여 ADCC를 매개하고, 순환 반감기를 연장한다. 다양한 실시양태에서, MVSCA는 항-CD47 및/또는 항-CD33 결합 도메인(들)에 대해 2가일 수 있다. 일부 실시양태에서, 결합 도메인은 상이한 순서로 배열되지만, 항-HSA 도메인이 절단되는 경우 말단 위치에 배치되어야 한다. 사용된 링커에 따라, 항-HSA 도메인(HSA가 결합되면)은 CD47에 대한 결합을 억제하거나 억제하지 않을 것이며, 억제가 존재하는 경우 절단 가능한 링커의 절단에 의해 역전될 수 있다. 이 디자인의 MVSCA를 구성 요소 부분의 기능 중 하나 이상을 위한 수단을 포함하는 것으로 설명하는

것 외에도 MVSCA는 식균 작용을 촉진하고 NK 매개 ADCC를 CD33-발현 종양으로 모집하기 위한 수단이라고도 할 수 있다. 이 설계의 여러 실시예가 실시예 8에 제시되어 있다.

[0139] 2가 항-CD33 MVSCA: 이 디자인은 예를 들어 소교세포에 의한 식균 작용의 억제를 차단하여 불용성 물질의 침착과 관련된 질병을 치료하는 데 적합하다. 이러한 질병에는 알츠하이머병 및 건성 AMD가 포함된다. HSA/CD33/CD33 디자인은 유통 중 반감기가 연장된다. FC5/CD33/CD33 디자인은 혈뇌장벽을 넘을 것이다. FC5/CD33/CD33/HAS 디자인은 둘 다 순환 반감기가 연장되고 혈뇌 장벽을 통과한다. 간단한 CD33/CD33 디자인은 눈이나 뇌에 국소적으로 주입하는 데 적합하며, 이 경우 순환 반감기 연장이나 혈액뇌장벽을 통과하는 능력은 무시할 만하다. 일부 실시양태에서, 결합 도메인은 상이한 순서로 배열된다. 이 디자인의 MVSCA를 구성 요소의 기능 중 하나 이상을 위한 수단을 포함하는 것으로 설명하는 것 외에도 MVSCA는 불용성 침착물의 (미세아교세포) 식균 작용을 촉진하기 위한 수단으로도 지칭될 수 있다. 이 설계의 여러 실시예가 실시예 9에 제시되어 있다.

[0140] 공개된 항체의 사용

[0141] 개시된 항체는 의약에 유용하다. "치료" "치료하는" 등의 용어는 질병, 병리학적 상태 또는 장애를 치료, 개선, 안정화 또는 예방할 목적으로 환자를 의학적으로 관리하는 것을 의미한다. 이 용어는 적극적인 치료, 즉 질병, 병리학적 상태 또는 장애의 개선을 위한 치료를 포함하며, 원인 치료, 즉 관련 질병, 병리학적 상태 또는 장애의 원인을 제거하기 위한 치료도 포함한다. 또한 이 용어에는 완화적 치료, 즉 질병, 병적 상태 또는 장애의 치유가 아니라 증상의 완화를 위해 고안된 치료; 예방 치료, 즉 관련 질병, 병리학적 상태 또는 장애의 발병을 최소화하거나 부분적으로 또는 완전히 억제하는 치료; 및 지지적 치료, 즉 관련 질병, 병리학적 상태 또는 장애의 개선을 지향하는 또 다른 특정 요법을 보완하기 위해 사용되는 치료. 다양한 실시예는 이러한 치료 모드 중 하나 이상을 구체적으로 포함하거나 배제할 수 있다.

[0142] 진단 및 영상화에서 본원에 개시된 항체의 사용이 또한 고려된다.

[0143] 또한, "치료하는" 또는 "치료"의 용어는 인간 또는 다른 동물에서 질병의 진단, 완화 또는 예방을 포함하는 모든 종류의 치료 활동, 또는 다른 방식으로 구조 또는 임의의 동물에 영향을 미치는 모든 활동을 광범위하게 포함한다. 사람이나 다른 동물의 신체 기능. 치료 활동은 특히 의료 전문가, 환자 자신, 또는 임의의 다른 사람에 의해 본원에 개시된 다양한 치료 방법에 따라 본원에 기재된 의약, 투여 형태 및 제약 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함한다. 치료 활동에는 의사, 의사 조수, 개업 간호사 등과 같은 의료 전문가의 지시, 지시 및 조언이 포함되며, 이는 다른 의료 전문가 또는 환자 자신을 포함한 다른 사람에 의해 실행된다. 여기에는 예를 들어 환자가 암 진단 및 병기 결정과 같은 진단 절차를 받거나 수행하도록 임상 실험실에 지시하여 궁극적으로 환자가 적절한 치료를 받을 수 있도록 지시하는 것이 포함된다. 일부 실시양태에서, 치료 활동의 명령, 지시 및 조언 측면은 또한 특정 약물 또는 이들의 조합이 상태의 치료를 위해 선택되도록 장려, 유도 또는 명령하는 것을 포함할 수 있으며, 그 약물은 해당 의약품에 대한 보험 보장 승인, 해당 의약품을 포함한 대체 의약품에 대한 보장 거부 의약품 처방집에서 대체 의약품을 제외하거나 제외하거나 보험 회사 또는 약국 혜택 관리 회사에서 수행할 수 있는 바와 같이 의약품 사용에 대한 재정적 인센티브를 제공하는 등의 행위. 일부 실시양태에서, 치료 활동은 또한 병원, 클리닉, 건강 유지 조직, 의료 행위 또는 의사 그룹 등. 그러한 모든 명령, 지시 및 조언은 지시에 따른 치료의 혜택을 받는 조건으로 간주되어야 한다. 어떤 경우에는 환자가 그러한 명령, 지시 및 조언을 준수함으로써 재정적 혜택을 받기도 한다. 어떤 경우에는 그러한 명령, 지침 및 조언을 준수하는 데 대해 의료 전문가가 재정적 혜택을 받기도 한다.

[0144] 개시된 단일특이성 HCAb 및 CD47, HSA, PD-L1, CD33, CD16, 및 LAG3에 대한 특이성을 갖는 다가 단일쇄 항체는 암 치료에 유용하다. 각 항체는 항체에 포함된 항원 결합 특이성을 기반으로 특정 부류의 암 치료를 위해 설계되었다.

[0145] 본 개시내용은 유효량의 본 명세서에 개시된 항체 또는 상기 항체를 포함하는 약제학적 조성물을 암 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 암 치료 방법을 제공한다.

[0146] 개시된 방법에 의해 치료될 수 있는 암의 예는 급성 림프모구 백혈병; 급성 골수성 백혈병; 부신피질 암종; AIDS 관련 림프종; AIDS 관련 악성종양; 항문암; 성상세포종; 담관암, 방광암; 골암; 뇌간 신경교종; 뇌종양; 유방암; 기관지 선종/유암종; 카르시노이드 종양; 췌장 세포 암종; 미지의 원발성 암종; 중추신경계 림프종; 소뇌 성상세포종; 대뇌 성상세포종/악성 신경교종; 자궁 경부암; 만성 림프구성 백혈병; 만성 골수성 백혈병; 만성 골수증식성 장애; 대장 암; 결장직장암; 피부 T 세포 림프종; 자궁내막암, 뇌실막종; 난소 상피암; 식도암; 유

양의 종양 가족; 두개외 생식 세포 종양; 안내 흑색종; 망막모세포종; 담낭암; 위암; 생식 세포 종양; 임신성 용모성 종양; 모세포 백혈병; 두경부암; 간세포암; 호지킨 림프종; 하인두암; 카포시 육종; 신장암; 후두암; 비소세포폐암; 소세포 폐암; 비호지킨 림프종; 발덴스트롬 마크로글로불린혈증; 악성 중피종; 악성 흉선종; 수모 세포종; 흑색종; 메르켈 세포 암종; 편평 경부암; 다발성 내분비 종양 증후군; 다발성 골수종/형질 세포 신생물; 균상 식육종; 골수이형성 증후군; 비인두암; 신경 모세포종; 구강암; 구인두암; 골육종; 췌장암; 부갑상선암; 음경암; 갈색 세포종; 뇌하수체 종양; 흉막폐모세포종; 전립선암; 직장암; 횡문근육종; 침샘암; 연조직 육종; 세자리 증후군; 피부암; 편평 경부암; 고환암; 흉선종; 갑상선 암; 영양막 종양; 요도암; 자궁암; 질암; 외음부암; 및 Wilms의 종양 을 포함한다.

- [0147] 암 치료의 효과는 일반적으로 "반응"의 관점에서 측정된다. 반응을 모니터링하는 기술은 다음과 같은 암 진단에 사용되는 검사와 유사할 수 있지만 이에 국한되지 않는다.
- [0148] · 일부 림프절과 관련된 덩어리 또는 종양은 신체 검사를 통해 외부에서 느끼고 측정할 수 있다.
- [0149] · 일부 내부 암 종양은 엑스레이 또는 CT 스캔에 나타나며 자로 측정할 수 있다.
- [0150] · 장기 기능을 측정하는 것을 포함한 혈액 검사를 수행할 수 있다.
- [0151] · 특정 암에 대해 종양 표지자 검사를 수행할 수 있다.
- [0152] 혈액검사, 세포수 검사, 종양표지자 검사 등 어떤 검사를 사용하든 일정한 간격으로 반복하여 동일한 유형의 이전 검사와 결과를 비교할 수 있다.
- [0153] 암 치료에 대한 반응은 여러 방식으로 정의된다.
- [0154] · 완전한 반응 - 모든 암이나 종양이 사라진다. 질병의 증거가 없다. 종양 표지자의 발현 수준(해당되는 경우)은 정상 범위에 속할 수 있다.
- [0155] · 부분 반응 - 암이 백분율로 줄어들었지만 질병이 남아 있다. 종양 표지자(해당되는 경우)의 수준은 떨어졌을 수 있지만(또는 종양 부담 감소의 표시로서 종양 표지자를 기반으로 증가할 수 있음) 질병의 증거는 남아 있다.
- [0156] · 안정적인 질병 - 암이 커지거나 줄어들지 않았다. 질병의 양은 변하지 않았다. 종양 표지자(해당되는 경우)는 크게 변경되지 않았다.
- [0157] · 질병 진행 - 암이 성장했다. 지금은 치료 전보다 더 많은 질병이 있다. 종양 표지자 검사(해당되는 경우)는 종양 표지자가 상승했음을 보여준다.
- [0158] 암 치료의 효능에 대한 다른 측정에는 전체 생존 기간(즉, 진단 또는 평가 중인 치료 시작부터 측정한 모든 원인으로 인한 사망까지의 시간), 암 없는 생존 기간(즉, 완전 반응 암은 탐지할 수 없는 상태로 유지됨) 및 무진행 생존(즉, 질병 안정화 또는 종양 성장을 재개한 부분 반응 후의 시간 길이는 탐지 불가능함)을 포함한다.
- [0159] 종양 크기(종양 부담)에 대한 고형암 치료 반응의 평가에는 WHO 및 RECIST 표준의 두 가지 표준 방법이 있다. 이러한 방법은 현재 종양을 과거 측정치와 비교하거나 변경 사항을 미래 측정치와 비교하고 치료 요법을 변경하기 위해 고형 종양을 측정한다. WHO 방법에서 고형 종양의 장축과 단축은 이 두 측정의 곱으로 측정된 다음 계산된다. 고형 종양이 여러 개인 경우 모든 제품의 합계가 계산된다. RECIST 방식에서는 장축만 측정한다. 고형 종양이 여러 개 있는 경우 모든 장축 측정값의 합계가 계산된다. 그러나 림프절의 경우 장축 대신 단축이 측정된다.
- [0160] 본 개시내용은 본원에 개시된 이러한 치료 항체를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 안구 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 예시적인 안 장애는 연령 관련 황반 변성(AMD), 예를 들어 습성 AMD 또는 건성 AMD, 또는 황반 부종, 예를 들어 당뇨병성 황반 부종을 포함한다. 일부 실시양태에서, 안구 장애는 망막 장애이다.
- [0161] 본 개시내용은 또한 알츠하이머병, 루이소체 질환, 파킨슨병, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 백혈병, 진행성 핵상 마비, 신경염증, 염증성 탈수초 질환, 치매, 또는 신경병증을 포함하나 이에 제한되지 않는 신경퇴행성 질환의 치료 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 신경퇴행성 질환은 알츠하이머병이다.
- [0162] 하기 실시예, 서열 목록 및 도면은 본 발명의 이해를 돕기 위해 제공되며, 그 진정한 범위는 첨부된 청구범위에 기재되어 있다. 본 발명의 정신을 벗어나지 않고 설명된 절차에서 수정이 이루어질 수 있음이 이해된다.
- [0163] **특정 실시예의 목록**

- [0164] 실시예의 다음 목록은 본 명세서에서 설명된 폭, 조합 및 하위 조합, 발명의 종류 등에 관한 다양한 실시예를 예시하지만, 본 명세서에서 지지를 찾는 모든 실시예의 완전한 열거로 의도되지는 않는다.
- [0165] 실시예 1. CD47에 대한 항원 결합 특이성을 갖는 가변 중쇄(VHH) 도메인.
- [0166] 실시예 2. 서열번호 2-29 또는 223 중 하나의 아미노산 서열을 갖는 실시예 1의 VHH 도메인.
- [0167] 실시예 3. PD-L1에 대한 항원 결합 특이성을 갖는 가변 중쇄(VHH) 도메인.
- [0168] 실시예 4. 서열번호 31-38 중 하나의 아미노산 서열을 갖는 실시예 3의 VHH 도메인.
- [0169] 실시예 5. 인간 혈청 알부민(HSA)에 대한 항원 결합 특이성을 갖는 가변 중쇄(VHH) 도메인.
- [0170] 실시예 6. 서열번호 40-48 중 하나의 아미노산 서열을 갖는 실시예 5의 VHH 도메인.
- [0171] 실시예 7. CD33에 대한 항원 결합 특이성을 갖는 가변 중쇄(VHH) 도메인.
- [0172] 실시예 8. 서열번호 50-78 중 하나의 아미노산 서열을 갖는 실시예 7의 VHH 도메인.
- [0173] 실시예 9. LAG3에 대한 항원-결합 특이성을 갖는 가변 중쇄(VHH) 도메인.
- [0174] 실시예 10. 서열번호 80-93 중 하나의 아미노산 서열을 갖는 실시예 9의 VHH 도메인.
- [0175] 실시예 11. CD16에 대한 항원 결합 특이성을 갖는 가변 중쇄(VHH) 도메인.
- [0176] 실시예 12. 서열번호 96-99 중 하나의 아미노산 서열을 갖는 실시예 11의 VHH 도메인.
- [0177] 실시예 13. 실시예 1-12 중 어느 하나의 VHH 도메인을 포함하는 중쇄 전용 항체(HCAb).
- [0178] 실시예 14. 하나 이상의 불변 도메인 및 CD47, HSA, PD-L1, CD33, CD16 또는 LAG3에 결합하기 위한 수단을 포함하는 항체.
- [0179] 실시예 15. 실시예 1-12의 VHH 도메인 중 하나 이상을 포함하는 다중특이적 항체 또는 CD47, HSA, PD-L1, CD33, CD16, 또는 LAG3에 결합하기 위한 수단.
- [0180] 실시예 16. 실시예 15의 다중특이적 항체로서, 하나 이상의 추가적인 항체 결합 도메인을 추가로 포함한다.
- [0181] 실시예 17. 실시예 16의 다중특이적 항체로서, 추가의 항체 결합 도메인은 FC5(서열번호 222)를 포함한다.
- [0182] 실시예 18. 추가 항체 결합 도메인이 Fv 또는 Fab를 포함하는 것인 실시예 16의 다중특이적 항체.
- [0183] 실시예 19. 다중특이적 단일 사슬 항체(MVSCA)인 실시예 15-17 중 어느 하나의 다중특이적 항체.
- [0184] 실시예 20. 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 항체 결합 도메인을 포함하는 실시예 19의 MVSCA.
- [0185] 실시예 21. 1, 2, 3, 또는 4개의 항체 결합 특이성을 갖는 실시예 20의 MVSCA.
- [0186] 실시예 22. HSA, CD47, 및 PD-L1을 인식하는 항체 결합 도메인을 포함하는, 실시예 19-21 중 어느 하나의 MVSCA.
- [0187] 실시예 23. HSA, CD47, 및 CD33을 인식하는 항체 결합 도메인을 포함하는, 실시예 19-21 중 어느 하나의 MVSCA.
- [0188] 실시예 24. HSA, LAG3, 및 PD-L1을 인식하는 항체 결합 도메인을 포함하는, 실시예 19-21 중 어느 하나의 MVSCA.
- [0189] 실시예 25. HSA, LAG3, 및 CD33을 인식하는 항체 결합 도메인을 포함하는, 실시예 19-21 중 어느 하나의 MVSCA.
- [0190] 실시예 26. CD16, HSA, 및 PD-L1을 인식하는 항체 결합 도메인을 포함하는, 실시예 19-21 중 어느 하나의 MVSCA.
- [0191] 실시예 27. CD16, HSA, 및 CD33을 인식하는 항체 결합 도메인을 포함하는, 실시예 19-21 중 어느 하나의 MVSCA.
- [0192] 실시예 28. CD16, HSA, CD47, 및 PD-L1을 인식하는 항체 결합 도메인을 포함하는, 실시예 19-21 중 어느 하나의 MVSCA.
- [0193] 실시예 29. CD16, HSA, CD47, 및 CD33을 인식하는 항체 결합 도메인을 포함하는, 실시예 19-21 중 어느 하나의 MVSCA.

- [0194] 실시예 30. 실시예 14-21 또는 26-29 중 어느 하나에 있어서, CD16을 인식하는 항실시예 31. 실시예 19-30 중 어느 하나의 MVSCA로서, 동일한 특이성을 갖는 2개의 인접한 항체 결합 도메인을 포함한다.
- [0195] 실시예 32. 실시예 31의 MVSCA에 있어서, 동일한 특이성을 갖는 2개의 인접한 항체 결합 도메인은 그들 사이에 개재된 짧고 단단한 링커 수단을 갖는다.
- [0196] 실시예 33. 실시예 31의 MVSCA에 있어서, 짧고 단단한 링커 수단은 아미노산 서열 AAA(서열번호 102)로 구성된다.
- [0197] 실시예 34. 실시예 31-33 중 어느 하나에 있어서, 2개의 인접한 항체 결합 도메인이 CD33에 결합하는 MVSCA.
- [0198] 실시예 35. HSA를 인식하는 항체 결합 도메인을 추가로 포함하는, 실시예 34의 MVSCA.
- [0199] 실시예 36. FC5를 더 포함하는, 실시예 34 또는 35의 MVSCA.
- [0200] 실시예 37. 실시예 31-33 중 어느 하나에 있어서, 2개의 인접한 항체 결합 도메인이 PD-L1에 결합하는 MVSCA.
- [0201] 실시예 38. 실시예 31-33 중 어느 하나에 있어서, 2개의 인접한 항체 결합 도메인이 LAG3에 결합하는 MVSCA.
- [0202] 실시예 39. 실시예 31-33 중 어느 하나에 있어서, 2개의 인접한 항체 결합 도메인이 CD16에 결합하는 MVSCA.
- [0203] 실시예 40. 실시예 31-33 중 어느 하나에 있어서, 2개의 인접한 항체 결합 도메인이 CD47에 결합하는 MVSCA.
- [0204] 실시예 41. 인접 항체 결합 도메인 사이에 링커를 포함하는, 실시예 19-30 중 어느 하나의 MVSCA.
- [0205] 실시예 42. 실시예 41의 MVSCA로서, 동일하지 않은 항원 결합 도메인 사이에 개재된 링커는 L1(서열번호 100), L2(서열번호 101), 또는 L4(서열번호 103)이다.
- [0206] 실시예 43. 실시예 19-30 중 어느 하나의 MVSCA로서, 동일하지 않은 항원 결합 도메인 사이에 개재된 가요성, 절단 불가능한 링커 수단을 포함한다.
- [0207] 실시예 44. HSA에 결합하는 N- 또는 C-말단에 위치한 항체 결합 도메인을 포함하는, 실시예 19-30 중 어느 하나의 MVSCA.
- [0208] 실시예 45. 실시예 44의 MVSCA에 있어서, HSA에 결합할 때, HSA에 결합하는 항체 결합 도메인에 인접한 항체 결합 도메인은 그의 항원에 결합하는 것이 억제된다.
- [0209] 실시예 46. HSA에 결합하는 항체 결합 도메인에 인접한 항체 결합 도메인이 CD47을 인식하는, 실시예 45의 MVSCA.
- [0210] 실시예 47. 실시예 45 또는 46에 있어서, 절단가능한 링커가 HSA에 결합하는 항체 결합 도메인과 그에 인접한 항체 결합 도메인 사이에 개재되고, 여기서 절단가능한 링커는 L11^{*}3(서열번호 104), L11^{*}4(서열번호 105), L11^{*}5(서열번호 106), L11^{*}6(서열번호 107), L11^{*}7(서열번호 108), L11^{*}8(서열번호 109), L11^{*}9(서열번호 110), L11^{*}10(서열번호 111), L11^{*}11(서열번호 112), L11^{*}12(서열번호 113), L11^{*}13(서열번호 114), L11^{*}14(서열번호 115), L11^{*}15(서열번호 116), L11^{*}16(서열번호 117), L11^{*}17(서열번호 118), 또는 L11^{*}18(서열번호 119)이다.
- [0211] 실시예 48. 실시예 45 또는 46의 MVSCA에 있어서, 절단 가능한 링커 수단은 HSA에 결합하는 항체 결합 도메인과 그에 인접한 항체 결합 도메인 사이에 개재된다.
- [0212] 실시예 49. 모든 항체 결합 도메인이 VHH 도메인인, 실시예 19-48 중 어느 하나의 MVSCA.
- [0213] 실시예 50. 실시예 1-49 중 어느 하나의 VHH 도메인 또는 항체를 포함하는 약제학적 조성물.
- [0214] 실시예 51. HSA에 결합하기 위한 수단, 체내에서 다중특이적 항체 또는 MVSCA 반감기를 연장하기 위한 수단, 인접한 결합 도메인의 결합 활성을 가역적으로 억제하기 위한 수단을 포함하는 제약 조성물.
- [0215] 실시예 52. CD47에 결합하기 위한 수단 또는 식균 작용의 억제를 감소시키기 위한 수단을 포함하는 제약 조성물.
- [0216] 실시예 53. CD16 또는 CD16A에 결합하기 위한 수단, 또는 NK-매개 ADCC를 모집하기 위한 수단을 포함하는 제약 조성물.

- [0217] 실시예 54. PD-L1 결합 수단, PD-L1 종양 항원 결합 수단, PD-1 차단 수단, 또는 PD-1 면역 관문 방출 수단을 포함하는 제약 조성물.
- [0218] 실시예 55. 종양 항원에 결합하기 위한 수단, PD-L1 종양 항원에 결합하기 위한 수단, 또는 CD33 종양 항원에 결합하기 위한 수단을 포함하는 억제학적 조성물.
- [0219] 실시예 56. LAG3에 결합하기 위한 수단 또는 LAG3 면역 체크포인트를 방출하기 위한 수단을 포함하는 억제학적 조성물.
- [0220] 실시예 57. 면역 체크포인트를 방출하기 위한 수단, PD-1 면역 체크포인트를 방출하기 위한 수단, 또는 LAG3 면역 체크포인트를 방출하기 위한 수단을 포함하는 억제학적 조성물.
- [0221] 실시예 58. CD33 결합 수단, CD33 종양 항원 결합 수단, β -아밀로이드 제거 촉진 수단, 또는 불용성 침착물 제거 수단을 포함하는 제약 조성물.
- [0222] 실시예 59. PD-L1-발현 종양의 식균작용을 촉진 하기 위한 수단을 포함하는 제약 조성물.
- [0223] 실시예 60. PD-L1-발현 종양에 T 효과기 세포를 동원하기 위한 수단을 포함하는 제약 조성물 .
- [0224] 실시예 61. PD-L1-발현 종양의 식작용을 촉진하고 NK-매개 ADCC를 모집하기 위한 수단을 포함하는 제약 조성물 .
- [0225] 실시예 62. NK-매개 ADCC를 CD33-발현 종양의 식균작용을 촉진하고 모집하기 위한 수단을 포함하는 제약 조성물 .
- [0226] 실시예 63. 실시예 1-48 중 어느 하나의 항체 또는 실시예 49-61 중 어느 하나의 억제학적 조성물을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 암 치료 방법.
- [0227] 실시예 64. 실시예 7-8, 13-21, 34-36, 또는 48-49 중 어느 하나의 항체를 투여하는 것을 포함하는 알츠하이머 병 또는 망막 질환을 치료하는 방법으로서, 여기서 항체는 CD33 결합 도메인을 포함하거나, 실시예 58의 제약 조성물을 이를 필요로 하는 환자에게 제공한다.
- [0228] 실시예 65. 실시예 64에 있어서, 항체가 CD47, PD-L1, LAG3, 또는 CD16을 인식하는 항체 결합 도메인을 포함하지 않는 방법.
- [0229] 실시예 66. 실시예 64 또는 65에 있어서, 망막 질환은 건성 AMD인 방법.
- [0230] 실시예 63-66 각각에 대해, 치료에 사용하기 위한 조성물, 의약 제조에 사용하기 위한 조성물, 치료에 조성물을 사용, 및 의약 제조에 조성물을 사용하는 상응하는 실시예가 있다.
- [0231] **예시들**
- [0232] **예시 1. 항-CD47 HCAb 항체**
- [0233] **면역화된 라마로부터 항-CD47 HCAb 항체의 단리.**
- [0234] **예방 접종.** 2마리의 라마가 그들의 표준 프로토콜에 따라 Abcore Inc(Ramona, CA)에서 면역화되었다. 재조합 인간 CD47(세포외 도메인 19-139, 서열번호: 1)을 완전 프로인트 아주반트(0일째) 또는 불완전 프로인트 아주반트(면역 후)와 혼합했다(Difco, BD Biosciences). 라마당 6회의 피하 주사를 격주 간격으로 50 μ g/용량으로 수행했다. 45일에, ELISA에 의해 hCD47에 대한 항체 역가를 결정하기 위해 재조합 CD47 단백질로 면역화된 라마로부터 혈청을 수집하였다. ELISA에서 96웰 Maxisorp 플레이트(Nunc)를 100ng/웰 hCD47로 코팅했다. 희석된 혈청 샘플을 차단하고 첨가한 후, 항-CD47 항체의 존재는 양고추냉이 퍼옥시다제(HRP)-접합 염소 항-라마 IgG(H+L) 항체(Invitrogen)를 사용하여 입증되었다.
- [0235] 서열번호: 1 인간 CD47의 세포외 도메인(19-139, Q08722)
- [0236] QLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFTVNMEAQNTTEVYVVKWKFGRDIYTFDGLNKSSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDSKDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIEVKYRVVSWFSP
- [0237] **파지 라이브러리 구성 및 선택.** 제조사의 지침에 따라 Ficoll-Paque Plus(GE Healthcare)를 사용하여 재조합 CD47 단백질로 면역화된 라마의 45일째 혈액 샘플로부터 말초 혈액 단핵 세포를 제조했다. 제조업체 지침에 따라 RNeasy Midi Kit(Qiagen)를 사용하여 말초 혈액 단핵 세포에서 총 RNA를 추출하고 VHH 인코딩 유전자 단편을

증폭하기 위한 RT-PCR의 출발 물질로 사용했다. 이들 단편을 파지미드 벡터에 클로닝하여 헬퍼 파지로 감염시킨 후 재조합 파지 입자를 생성할 수 있게 했으며, 이는 파지 입자 표면에 유전자-III 융합 단백질로서 VHH를 표시한다. 파지는 표준 방법에 따라 제조되었고 추가 사용을 위해 4 °C 에서 필터 멸균 후 보관되었다.

[0238] CD47 결합 파지의 선택을 위해 비오틴화된 CD47을 파지 라이브러리와 함께 인큐베이션한 후 streptavidin Dynabeads(Invitrogen)에서 캡처했다. 광범위한 세척 후, 결합된 파지를 1 mg/ml 트립신으로 용리시켰다. 선택의 결과는 *E. coli* TG1 세포에서 구출되었다. BATJ, Inc.(San Diego, CA)에서 콜로니를 선택하고 시퀀싱했다.

[0239] CD47 결합 VHH를 인코딩하는 cDNA는 Atum(Newark, CA)에서 C-말단 His-tag로 합성되었고, HEK293 세포에서 일시적으로 형질감염되었고, 양성 VHH는 IMAC 크로마토그래피에 의해 정제되었다.

[0240] 면역화된 라마 파지 라이브러리로부터의 CD47-결합 파지 콜로니를 시퀀싱하고, 각각의 VHH에 대해 하기에 열거된 이들의 아미노산 서열(표 2)을 결정하였다. 하기 아미노산 서열에 기초한 cDNA 서열을 인간 Fc와 융합시키고 pJ607 발현 벡터에서 합성하였다. 발현 플라스미드를 HEK293 세포주로 형질감염시켜 재조합 항-CD47 HCab 항체를 생산하였다. 발현된 항-CD47 HCab는 HiTrap 단백질 A 컬럼에 의해 정제되었다.

[0241] A09-10 VHH는 IGHV3-23 인간 생식계열 서열에 기초하여 인간화되었다. 표 2는 라마 항-CD47 VHH 서열을 보여준다.

표 2

[0242] A09-08 (SEQ ID NO:2)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGYGVNSYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSAKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTSS
A09-31 (SEQ ID NO:3)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGYGVNSYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSAKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYIATAIKMYNYWGQGTQVTSS
A09-61 (SEQ ID NO:4)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGYGVNSYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSAKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISFASKMYNYWGQGTQVTSS
A09-004 (SEQ ID NO:5)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGVMWSSALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSAKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTSS
A09-006 (SEQ ID NO:6)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGIRFFGSALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSAKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTSS
A09-10 (SEQ ID NO:7)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSAKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTSS
hA09-10 (SEQ ID NO:8)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTSS
hA09-10-1 (SEQ ID NO:9)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTSS
hA09-10-2 (SEQ ID NO:10)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTSS
hA09-10-3 (SEQ ID NO:11)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTVYLQMSSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTSS
hA09-10-4 (SEQ ID NO:12)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTSS
hA09-10-45 (Biv) [*] (SEQ ID NO:13)	EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNFKNTVYLQMSSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTSSAAAQVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTSS
hA09-10-5 (SEQ ID NO:14)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTSS
hA09-10-55 (Biv) (SEQ ID NO:15)	EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTSSAAAQVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTSS
hA09-10-6 (SEQ ID NO:16)	AAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIDYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTSS

hA09-10-66 (Biv) (SEQ ID NO:17)	EVQLVESGGGLVQPQGSRLRLSCAASGGGRFTSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNFKNTVYL QMSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPQGSRLRLSCAASGGGRFTSNY ALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMQSSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYN YWGGGTQVTVSS
hA09-10-7 (SEQ ID NO:18)	QVQLVESGGGLVQPQGSRLRLSCAASGGGRFTSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMSSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSS
hA09-10-77 (Biv) (SEQ ID NO:19)	EVQLVESGGGLVQPQGSRLRLSCAASGGGRFTSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMSSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPQGSRLRLSCAASGGGRFTSNY ALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLMQSSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYN YWGGGTQVTVSS
hA09-10-8 (SEQ ID NO:20)	QVQLVESGGGLVQPQGSRLRLSCAASGGGRFTSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMSSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSS
hA09-10-88 (Biv) (SEQ ID NO:21)	EVQLVESGGGLVQPQGSRLRLSCAASGGGRFTSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMSSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPQGSRLRLSCAASGGGRFTSNY ALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLMQSSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYN YWGGGTQVTVSS
hA09-10-9 (SEQ ID NO:22)	QVQLVESGGGLVQPQGSRLRLSCAASGGGRFTSNYAMSWVRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMSSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSS
hA09-10-99 (Biv) (SEQ ID NO:23)	EVQLVESGGGLVQPQGSRLRLSCAASGGGRFTSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMSSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPQGSRLRLSCAASGGGRFTSNY AMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLMQSSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYN YWGGGTQVTVSS
hA09-10-10 (SEQ ID NO:24)	QVQLVESGGGLVQPQGSRLRLSCAASGGGRFTSNYAMSWVRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMSSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSS
hA09-10-100 (Biv) (SEQ ID NO:25)	EVQLVESGGGLVQPQGSRLRLSCAASGGGRFTSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMSSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPQGSRLRLSCAASGGGRFTSNY AMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLMQSSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYN YWGGGTQVTVSS
hA09-10-11 (SEQ ID NO:26)	QVQLVESGGGLVQPQGSRLRLSCAASGGGRFTSNYAMSWVRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNKNTVYL QMSSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSS
hA09-10-12 (SEQ ID NO:27)	QVQLVESGGGLVQPQGSRLRLSCAASGGGRFTSNYAMSWVRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMSSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSS
hA09-10-13 (SEQ ID NO:28)	QVQLVESGGGLVQPQGSRLRLSCAASGGGRFTSNYAMSWVRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNKNTVYL QMSSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSS
hA09-10-14 (SEQ ID NO:29)	QVQLVESGGGLVQPQGSRLRLSCAASGGGRFTSNYAMSWVRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMSSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSS
hA09-10-30 (SEQ ID NO:223)	EVQLVESGGGLVQPQGSRLRLSCAASGGGRFTSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNKNTVYL QMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSS

* Biv = 2가

표 2의 VHh는 CD47에 결합하기 위한 수단을 구성한다.

항-CD47 HCAb 분자의 Octet® 결합 분석

무표지 기술인 생물층 간섭계(BLI)를 항-CD47 VHh와 인간 CD47(R&D 시스템)의 결합 동역학을 측정하는 데 사용했다. Anti-Penta-His capture(HIS1K) 바이오센서 팁(ForteBio®)이 장착된 Octet® QKe로 친화도 측정을 수행했다. 분석은 1x PBS 완충액(Gibco®, PBS pH 7.2)에서 30℃에서 수행되었다. 샘플을 1000rpm에서 교반하였다. 분석 전에 센서를 15분 동안 가습했다. 정제된 항-CD47 VHh는 HIS1K 센서 팁과의 결합 능력에 대해 테스트되었다. 팁은 20 µg/ml의 항-CD47 VHh를 사용하여 로드되었다. 로딩은 300초 동안 진행되어 캡처 수준이 1.8~2nm 사이가 되었다. 인간 CD47 항원은 1x PBS에서 100, 150, 250, 350 nM 농도로 희석하여 결합 분석을 위해 준비했다. 결합을 시작하고 200초 동안 모니터링한 후, 해리를 모니터링하기 위해 팁을 1xPBS 완충액(Gibco, PBS pH 7.2)으로 옮겼습니다. 실험 전반에 걸쳐 센서 데이터를 수집하고, Octet® 데이터 분석 소프트웨어 7(ForteBio®)을 사용하여 처리 및 분석했다.

항-CD47 HCAb의 결합 친화도에 대한 Octet® 동역학 분석은 표 3에 나열되어 있다. HCAb A09-04, A09-06, A09-08, 및 A09-10은 pM 결합 친화도를 나타낸다. 표 3은 항-CD47 HCAb의 결합 친화도(K_D)의 Octet® 동역학 분석을 보여준다.

표 3

VHH	K _{on} (1/Ms)	K _{off} (1/s)	K _D (M)
A09-08	3.33E+04	2.10E-06	6.30E-011
A09-31	2.75E+04	5.22E-04	1.90E-08
A09-61	6.21E+04	1.10E-04	1.77E-09
A09-04	1.10+05	2.98E-04	2.71E-011
A09-06	8.70E+04	1.09E-06	1.14E-011
A09-10	4.27E+04	1.14E-06	2.67E-011
hA09-10	3.98E+04	1.10E-06	2.76E-11

[0249] D47 과발현 CHO 세포주에 대한 항-CD47 HCAb의 결합 친화도의 유세포 분석.

[0250] 빙냉 FACS 완충액(PBS, 1%BSA, 0.1% NaN₃)에서 1x10⁶ 세포/ml의 CD47-과발현 CHO 세포를 100 nM ~ 0.00128 nM 으로 만들고 얼음 위에서 45분 동안 인큐베이션한다. 세포를 FACS Buffer로 세척하고 제조사의 지침에 따라 염소 항인간 IgG Fc, FITC 접합체 항체(ThermoFisher)를 첨가한 후 4° C에서 30분 동안 배양하였다. 데이터는 Guava EasyCyte HT 시스템을 사용하여 수집되었다.

[0251] 상기 기재된 유세포 분석 방법에 따라, 항-CD47 HCAb에 대한 결합 친화도를 도 1에 도시된 EC50으로 결정하였다.

[0252] 항-CD47 도메인을 갖는 다중특이적 분자의 경쟁적 ELISA 결합 분석

[0253] 경쟁적 ELISA 결합 분석을 수행하여 CD47-결합 다중특이적 분자 1511(서열번호 156; CD16F-L1-HSA-L1-CD47-L3-CD47-L1-PDL1-L3-PDL1) 및 3321(서열번호 159; CD16F-L1-HSA-L1-CD47-L1-CD33-L3-CD33), 둘 다 그의 수용체 SIRP α 에 대한 CD47 항원 결합을 경쟁적으로 차단하는 항-CD47 VHH A09-10을 함유한다. 다중특이적 항체는 결합 도메인(즉, CD47) 및 결합 도메인을 분리하는 링커(즉, 표 15에서 확인된 L1)에 의해 확인된다. 웰당 100나노그램의 CD47-Fc(R&D 시스템)를 96웰 플레이트에 코팅하고, 10nM 비오틴화된 인간 SIRP α 를 다양한 농도의 다중특이적 분자 1511 및 3321과 함께 사전 인큐베이션한 다음, HRP-접합 스트렙타비딘을 첨가했다. 다중-특이성 분자 1511 및 3321은 도 2에 도시된 EC50에서 그의 수용체 SIRP α 에 결합하는 CD47을 경쟁적으로 차단하였다.

[0254] 항-CD47 도메인을 갖는 다중특이적 분자의 경쟁적 유세포 분석 결합 분석

[0255] 경쟁적 유세포 분석 결합 분석을 수행하여 다중특이적 분자 1511 및 3321이 CD47을 천연적으로 발현하는 세포 표면 상의 그의 수용체 SIRP α 에 결합하는 CD47 항원을 차단함을 확인하였다. 얼음처럼 차가운 FACS 완충액(PBS, 1%BSA, 0.1% NaN₃)에서 Jurkat 세포(ATCC)의 1x10⁶ 세포를 100 nM에서 0.00128 nM 범위의 농도 범위에서 1511 또는 3321과 함께 인큐베이션하고 얼음 위에서 45분 동안 인큐베이션했다. 그런 다음 25 nM SIRP α -Fc(R&D 시스템)를 추가하고 추가 45분 동안 인큐베이션했다. 세포를 FACS 완충액으로 세척하고 제조사의 지침에 따라 염소 항-인간 VHH FITC 접합체 항체(Jackson Immuno Research)를 첨가한 다음 4° C에서 30분 동안 배양했다. 데이터는 Guava EasyCyte HT 시스템을 사용하여 수집되었다. 다중-특이성 분자 1511 및 3321은 도 3에 도시된 EC50에서 Jurkat 세포 표면 상의 그의 수용체 SIRP α 에 대한 CD47 결합을 경쟁적으로 차단하였다.

[0256] 항-CD47 도메인을 갖는 다중특이적 분자의 인간 RBC 혈구응집 분석

[0257] 인간 혈액 샘플은 건강한 기증자에 의해 제공되었다. 전혈을 3000rpm(1800rcf)에서 5분 동안 원심분리하고 혈장 및 버피 코트를 제거했다. 적혈구를 적혈구 부피의 약 2배인 생리 식염수(0.9% NaCl)에 재현탁하고 튜브를 뒤집어서 혼합했다. 적혈구를 추가로 2000rpm에서 20분 동안 원심분리하고 적혈구를 생리 식염수와 혼합하여 6%(v/v) 세포 현탁액을 얻었다. 그런 다음 RBC 세포를 96웰 둥근 바닥 플레이트에 첨가하고 다양한 양의 항체(0 내지 100 μ g/ml)와 혼합하였다. 플레이트를 37에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. Hu5F9 항-CD47 대조군 항체와 달리, 다중-특이성 분자 1511 및 3321은 도 4에 도시된 RBC 응집을 유도하지 않았다.

[0258] CD47을 천연적으로 발현하지만 RBC 세포 표면 CD47은 발현하지 않는 종양 세포 표면에 선택적으로 결합할 수 있는 다중특이적 분자, 1511- 및 3321-함유 항-CD47 VHH를 확인하기 위해 유세포 분석 결합 검정을 수행하였다. 1x10⁶ 세포/ml의 HL60 세포(ATCC) 또는 얼음처럼 차가운 FACS 완충액(PBS, 1% BSA, 0.1% NaN₃)에서 10% 세척된 인간 RBC 세포(Rockland Immunochemicals, Inc)를 1511 또는 3321 농도 범위에서 인큐베이션했다. 500 nM ~ 0.00128 nM, 얼음 위에서 45분 동안 인큐베이션, 세포를 FACS 완충액으로 세척하고 염소 항-인간 VHH FITC 접합

체 항체(Jackson Immuno Research)를 제조업체의 지침에 따라 첨가한 다음, 4° C에서 30분 동안 인큐베이션했다. 데이터는 Guava EasyCyte HT 시스템을 사용하여 수집되었다. 다중특이적 분자 1511 및 3321은 도 4b에 도시된 EC50에서 천연적으로 CD47을 발현하지만 RBC 세포 표면 CD47을 발현하지 않는 종양 세포 표면에 선택적으로 결합하였다.

[0259] 항-CD47 도메인을 갖는 다중특이적 분자의 항종양 활성

[0260] 1E6 Raji-Luc 세포를 NSG 마우스에 정맥내로 접종하였다. 마우스를 10 mg/kg 또는 PBS 대조군에서 다중특이적 분자 3321의 IV 주사로 매일 처리하였다. 치료 시작(0일), 실험 3일 중간 및 실험 종료(7일)에 Raji 종양의 대표적인 생물발광 이미지. 다중특이적 분자 3321은 도 5에 도시된 인간 백혈병으로부터 이종이식된 마우스를 보호하였다.

[0261] 예시 2. 항-PD-L1 HCAb 항체

[0262] 면역화된 라마로부터 항-PD-L1 HCAb 항체의 분리

[0263] 2마리의 라마가 그들의 표준 프로토콜에 따라 Abcore Inc.에서 면역화되었다. 재조합 인간 PD-L1(세포의 도메인 19-238, SED ID NO:30)을 완전 프로인트 아주반트(0일째) 또는 불완전 프로인트 아주반트(면역 후)와 혼합했다. 라마당 6회의 피하 주사를 격주 간격으로 50 μ g/용량으로 수행했다. 45일째에, ELISA에 의해 PD-L1에 대한 항체 역가를 결정하기 위해 재조합 PD-L1 단백질로 면역화된 라마로부터 혈청을 수집하였다. ELISA에서 96웰 Maxisorp 플레이트를 100ng/웰 PD-L1으로 코팅했다. 희석된 혈청 샘플을 차단하고 첨가한 후, 항-PD-L1 항체의 존재는 HRP-접합된 염소 항-라마 IgG(H+L) 항체를 사용하여 입증되었다.

[0264] 서열번호: 30 인간 PD-L1의 세포의 도메인(19-238, Q9NZQ7)

[0265] FTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNI IQFVHGEEDLKVQHSSYRQPARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGG ADYKRITVKVNPYNKINQRILVDPVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSDDHQLVSGKTTTNSKREEKLFNVTSTLRIINTTNEIFYCTFRRLDPEENHTA ELVIPLEPLAHPNER

[0266] 제조사의 지시에 따라 Ficoll-Paque+를 사용하여 재조합 PD-L1 단백질로 면역화된 라마로부터의 45일째 혈액 샘플로부터 말초 혈액 단핵 세포를 제조하였다. 제조업체 지침에 따라 RNeasy Midi Kit를 사용하여 말초 혈액 단핵 세포에서 총 RNA를 추출하고 VHH 인코딩 유전자 단편을 증폭하기 위한 RT-PCR의 출발 물질로 사용했다. 이들 단편을 파지미드 벡터에 클로닝하여 헬퍼 파지로 감염시킨 후 재조합 파지 입자를 생성할 수 있게 했으며, 이는 파지 입자 표면에 유전자-III 융합 단백질로서 VHH를 표시한다. 파지는 표준 방법에 따라 제조되었고 추가 사용을 위해 4° C에서 필터 멸균 후 보관되었다.

[0267] PD-L1-결합 VHH의 선택을 위해, 비오티닐화된 PD-L1을 파지 라이브러리과 함께 인큐베이션한 후 스트랩타비딘 Dynabeads에 포획하였다. 광범위한 세척 후, 결합된 파지를 1 mg/ml 트립신으로 용리시켰다. 선택의 결과는 E. coli TG1 세포에서 구출되었다. BATJ, Inc.에서 콜로니를 선택하고 시퀀싱했다.

[0268] PD-L1-결합 VHH를 코딩하는 cDNA를 C-말단 His-태그로 합성하고 HEK293 세포에서 일시적으로 형질감염시키고, 양성 VHH를 IMAC 크로마토그래피에 의해 정제하였다.

[0269] 면역화된 라마 파지 라이브러리로부터 PD-L1-결합 파지 콜로니를 시퀀싱하였다. 아미노산 서열은 각 VHH에 대해 아래에 나열되어 있다(표 4). 하기 아미노산 서열에 기초한 cDNA 서열을 인간 Fc와 융합시키고 pJ607 발현 벡터에서 합성하였다. 발현 플라스미드를 HEK293 세포주에 형질감염시켜 재조합 항-PD-L1 HCAb 항체를 생산하였다. 발현된 항-PD-L1 HCAb는 HiTrap 단백질 A 컬럼으로 정제되었다. 라마 VHH 중 2개, PL14 및 PL16은 IGHV3-23 인간 생식계열 서열에 기초하여 인간화되었다. 표 4는 라마 항-PD-L1 VHH 서열을 보여준다.

표 4

[0270] PL2 (SEQ ID NO:31)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGLTSLRYTMAWFRQAPGKREFVAAIIRNSVSTFHEESVKGRFTISRDNVKNMMLQMN NTLKPEDTAVYYCATNVGPTGGFSLQSVQRYDAWGQGQTVTVSS
PL11 (SEQ ID NO:32)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTNTYDMGWFRFRAPGKREFVAGIDWYTTNTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMN RSLKPEDTAVYYCAAGIRSTATITGQADYWGQGAQVTVSS
PL14 (SEQ ID NO:33)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTSGIYDMGWYRQAPGKLREVVGIITSGGTTNYADFAKGRFTISRDNKNMMLQMN SLKPEDTAVYYCNIRTRLIIWGQGQTVTVSS
PL16 (SEQ ID NO:34)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAFSGGTFLTSLGWFRQGPGRKREFVASINWSGYMTSYVDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMN NSLKPEDTALYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGAQVTVSS

PL17 (SEQ ID NO:35)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTNTYDMGWFRRTPGKEREFVAGMDWNTINTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQM RSLKPEDTAVYYCAAGIRSTAIITGQADYWGQGTQVTVSS
PL18 (SEQ ID NO:36)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTNIYSMAWFRQAPGKEREFVVRINWNRGTTYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQM SNLKPEDTAVYYCAARGSPSTIGAFTSASHDYWGQGTQVTVSS
hPL14 (SEQ ID NO:37)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTSGIYDMGWYRQAPGKLREVVSVITSGGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCNIRTLIIWGQGTQVTVSS
hPL16 (SEQ ID NO:38)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN NSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS

표 4의 VHH는 PD-L1을 결합하기 위한 수단을 구성한다.

Octet[®] 동역학적 결합 분석

Octet[®] 동역학적 결합 분석을 실시예 1에서와 같이 수행하였다. 간략하게, 정제된 항-PD-L1 VHH를 HIS1K 센서 팁과의 결합 능력에 대해 시험하였다. 팁(Tips)은 20 µg/ml의 항 PD-L1 VHH를 사용하여 로드되었다. 로딩은 300 초 동안 진행되어 캡처 수준이 1.8 과 2nm 사이가 되었다. 인간 PD-L1 항원은 1x PBS에서 100, 150, 250, 350 nM 농도로 희석하여 결합 분석을 위해 준비했다. 결합을 시작하고 200초 동안 모니터링한 후, 해리를 모니터링 하기 위해 팁을 PD-L1 단백질이 없는 1xPBS 버퍼로 옮겼다.

항-CD47 HCab의 결합 친화도의 Octet174; 동역학 분석은 표 5에 제시되어 있다. 분석은 PL14, PL16 및 PL17이 pM 결합 친화도를 나타낸다는 것을 입증하였다. 표 5는 항-PD-L1 HCab(K_D)의 결합 동역학 분석을 보여준다.

표 5

VHH	K _{on} (1/Ms)	K _{off} (1/s)	K _D (M)
PL2	3.33E+04	2.10E-02	6.30E-07
PL11	2.75E+04	5.22E-04	1.90E-08
PL14	6.21E+04	1.10E-06	1.77E-011
PL16	1.10+05	2.98E-06	2.71E-011
PL17	8.70E+04	1.09E-06	1.14E-011
PL18	4.27E+04	1.14E-04	2.67E-09

항-PD-L1 HCab의 유세포 분석 결합 분석

빙냉 FACS 완충액(PBS, 1%BSA, 0.1% NaN₃) 중 PD-L1 과발현 CHO 세포의 1x10⁶ 개 세포/ml를 100nM 내지 0.00128nM 농도 범위의 항-PD-L1 HCab와 함께 인큐베이션하였다. 그리고 얼음 위에서 45분간 배양하였다. 세포를 FACS 완충액으로 세척하고 염소 항-인간 IgG Fc-FITC 접합체 항체(ThermoFisher)를 첨가한 후, 4℃에서 30 분 동안 인큐베이션하였다. 데이터는 Guava EasyCyte HT 시스템을 사용하여 수집되었습니다. PD-L1-과발현 CHO 세포에 대한 PD-L1에 대한 항-PD-L1 HCab의 결합 친화도는 도 6에 도시된 EC50으로 결정되었다.

PD-L1 결합 도메인을 갖는 다중특이적 분자의 세포 기반 기능 검증

PD-L1-발현 APC/CHO-K1 세포를 96-웰 플레이트에 웰당 100K로 시딩하고 37℃에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 다음으로, 다중특이적 분자 1511 및 대조군 항체 아테졸리주맙을 100 nM에서 시작하여 1:3으로 연속 희석하고 25 µl/웰로 세포 웰에 첨가하였다. 마지막으로, PD-1 효과기 세포(PD-1 및 루시페라제 발현 세포)를 첨가하고 37℃에서 6시간 동안 인큐베이션하였다. 6시간 후, 75µl의 Bio-Glo[™] Luciferase Assay Reagent를 첨가하고 VICTOR Multilabel plate reader를 사용하여 발광성을 측정하였다. 데이터 분석은 GraphPad Prism 소프트웨어로 수행되었다.

세포 기반 기능 데이터는 다중-특이성 분자 1511 및 대조군 항체 아테졸리주맙이 도 7에 도시된 유사한 EC50으로 PD-L1 활성을 완전히 차단함을 나타내었다.

PD-L1 결합 도메인을 갖는 다중특이적 분자의 항종양 활성

류린 결장암 MC38-hPD-L1 세포(BiocytoGen Co., Ltd; 5x10⁵)를 동형 B-hPD-L1 마우스(암컷, 6주령, n=6)에 피

하 이식하였다. 종양 부피가 대략 100 mm^3 에 도달했을 때 마우스를 그룹화하였고, 이때 다중특이적 분자 1518 (서열번호 157; CD16F-L1-HSA-L1-CD47-L3-CD47-L1-PDL1-L3-PDL1)로 처리하였고, 투여량 및 일정은 도 8A에 나타낸 바와 같다. 치료 중 체중 변화를 도 8B에 나타내었다. 도 8A에 도시된 바와 같이, 다중특이적 분자 1518A1은 B-hPD-L1 마우스에서 종양 성장을 조절하는데 효과적이었다. 값은 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다.

[0283] 예시 3. 항-HSA HCAb 항체

[0284] 항-HSA VHH 항체의 단리

[0285] Abcore, Inc.에서 라마를 예시 1에서와 같이 완전 프로인트 아주반트(0일) 또는 불완전 프로인트 아주반트와 혼합된 재조합 인간 HSA(서열번호 39)로 면역화했다.

[0286] 인간 혈청 알부민(서열번호 39)

[0287] MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRDRAHSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQCPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVA TLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLP KLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKY ICENQDSISSKLKECKEP LLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEP QNL IKQNCLEFQLEGEYKFNALLVRYTKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRP CFSALVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AEEGKKLVAASQAALGL

[0288] 항-HSA VHH의 선택을 위해, 비오틴화된 HSA를 파지 라이브러리과 함께 인큐베이션한 다음, 스트랩타비딘 Dynabeads(Invitrogen)에서 포획하였다. 광범위한 세척 후, 결합된 파지를 1 mg/ml 트립신으로 용리시켰다. 선택의 결과는 E. coli TG1 세포에서 구출되었습니다. BATJ, Inc.(캘리포니아주 샌디에고)에서 콜로니를 선택하고 시퀀싱했다.

[0289] HSA-특이적 VHH를 코딩하는 cDNA를 C-말단 His-태그로 합성하고 HEK293 세포에서 일시적으로 형질감염시키고, 양성 VHH를 IMAC 크로마토그래피에 의해 정제하였다.

[0290] 라마 파지 라이브러리로부터의 HSA-결합 파지 콜로니의 서열을 분석하고 아미노산 서열을 각각의 VHH에 대해 아래에 열거하였다(표 6). 하기 아미노산 서열에 기초한 cDNA 서열은 pJ607 발현 벡터에서 합성하였다. 발현 플라스미드를 HEK293 세포주로 형질감염시켜 C-말단 his-태그를 갖는 재조합 단일 도메인 항체(sdAb)를 생성하였다. 발현된 sdAb를 HisTrap HP 컬럼으로 정제하였다.

[0291] 라마 VHH, HS5 및 HS10의 Twp는 IGHV3-23 인간 생식계열 서열에 기초하여 인간화되었다. 표 6은 라마 항-HSA VHH 서열을 보여준다.

표 6

[0292] HS2 (SEQ ID NO:40)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRAFSSYAMGWFRQAPRKEREFVATISLGGYTYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQM NSLKPEDTAVYYCAAGESSSRQDKWYDYWGQGTQVTVSS
HS5 (SEQ ID NO:41)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVATINWGGRTTYADSVKGRFIISRDTGANTVYLQM NSLKPEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSS
HS6 (SEQ ID NO:42)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFHTYAVGWFRQAPGKERESVVIINWSSDHTYVAQSVKGRFTISRDRAKNTFYLMQ NSLKPEDTAVYYCAVRRRLYLRESDFDSWGQGTQVTVSS
HS12 (SEQ ID NO:43)	QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGRFTISFSMGWFRQAPGKEREFVASITNSGSGILYGDVSKGRFTISRDNAKNTMYLMQ NSLKPEDTAVYYCAAGTGAGRYRYASMFYWGQGTQVTVSS
HS22 (SEQ ID NO:44)	EVQLVESGGGLVHAGGSLRLSCAASGPTFSNYFMGWFRQAPGKEREFVAAVKWSGYHTYSDSVKQGFTISRDNAKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAAGGTFSNWYTRPRSGDSYDHWGQGTQVTVSS
HS27 (SEQ ID NO:45)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSPYTMGWFRQASGKERESVAATTWTGSRSYGESVKGRFTISRSTKNTMSLMQ NSLKPEDTAVYYCAAADGAGLYTNRGQDYWGQGTQVTVSS
hHS5 (SEQ ID NO:46)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLMQ NSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSS
HS10 (SEQ ID NO:47)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTDSAYRMGWFRQAPGKEREFVSAINWSDGRITYADSVKGRFTISRDNKNTLYLMQ NSLRAEDTAVYYCAADPDSRLYYTPQNYDYWGQGTQVTVSS
hHS10 (SEQ ID NO:48)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTDSAYRMGWFRQAPGKEREFVSAINWSDGRITYADSVKGRFTISRDNKNTLYLMQ NSLRAEDTAVYYCAADPDSRLYYTPQNYDYWGQGTQVTVSS

[0293] 이들 VHH는 HSA를 결합하기 위한 수단을 구성한다.

[0294] *Octet*[®] 동역학적 결합 분석

[0295] *Octet*[®] 동역학적 결합 분석은 실시예 1에서와 같이 수행되었고 그 결과는 표 7 및 도 9에 제시되어 있다. HS5, HS6, HS12 및 HS27 클론은 HSA에 대한 친화성을 나타낸다. 중간 활성이 확인되었고 표 8에 나열되었다. 표 7은 항-HSA VHH 항체의 결합 친화도(K_D)를 보여주고, 표 8은 HS10 및 HS5 VHH의 중간 결합 친화도를 보여준다.

표 7

[0296]

sdAb	K_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	K_D (M)
HS2	1.72E+04	2.60E-02	1.51E-07
HS5	8.09E+05	7.65E-04	9.46E-10
HS6	1.67E+06	8.29E-04	4.980E-10
HS12	1.03E+06	5.83E-04	5.68E-10
HS22	1.73E+04	9.09E-05	5.25E-08
HS27	7.61E+05	8.65E-04	4.32E-08
HS5-41	4.22E+04	9.17E-05	1.14E-09
HS10	2.77E+04	8.01E-05	2.89E-09

표 8

[0297]

샘플	인간 (K_D)	원숭이 (K_D)	쥐 (K_D)
hHS10	3.18E-09	8.08E-09	4.57E-09
hHS5	8.17E-10	1.16E-08	NA

[0298] 예시 4. 항-CD33 HCAb 항체

[0299] 항-CD33 VHH 항체의 단리

[0300] 라마(Llamas)를 Abcore, Inc.에서 Complete Freund's Adjuvant(0일째) 또는 Incomplete Freund's Adjuvant(면역화 후)와 혼합된 재조합 인간 CD33(서열번호 49) 및 실시예 1에서와 같이 제조된 파지 라이브러리로 면역화시켰다.

[0301] 인간 CD33(서열번호 49, P20138|18-259)

[0302] DPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPYDKNSPVHGYWFREGAII SRDSPVATNKLDQEVQEETQGRFRLGDP SRNCSLSIVDARRRDNGSYFFR MERGSTKYSYKSPQLSVHVTDLTHRPKILIPGTLEPGH SKNLTCVSWACEQGTPIFSWLSAAPTSLGPRTHSSVLIIITPRPDHGTNLTCQVKFAGAGV TTERTIQLNVTYVPQNPTTGIFPGDGSKGQETRAGVVH

[0303] 항-CD33 VHH의 선택을 위해, 비오틀화된 CD33을 파지 라이브러리와 함께 인큐베이션한 다음, 스트렙타비딘 Dynabeads에 포획하였다. 광범위한 세척 후, 결합된 파지를 1 mg/ml 트립신으로 용리시켰다. 선택의 결과는 E. coli TG1 세포에서 추출되었다. BATJ, Inc.에서 콜로니를 선택하고 시퀀싱했다.

[0304] CD33-결합 VHH를 코딩하는 cDNA를 HEK293 세포에서 C-말단 His-태그로 합성하고 HEK293 세포에서 일시적으로 형질감염시키고, 양성 VHH를 IMAC 크로마토그래피에 의해 정제하였다.

[0305] 면역화된 라마 파지 라이브러리로부터의 CD33-결합 파지 콜로니의 서열을 분석하고 아미노산 서열을 각각의 VHH에 대해 아래에 열거하였다(표 9). 하기 아미노산 서열에 기초한 cDNA 서열을 인간 Fc와 융합시키고 pJ607 발현 벡터에서 합성하였다. 발현 플라스미드를 HEK293 세포주로 형질감염시켜 재조합 항-CD33 HCAb 항체를 생산하였다. 발현된 항-CD33 HCAb는 HiTrap 단백질 A 컬럼에 의해 정제되었다. 라마 VHH 중 하나인 33-14는 IGHV3-23 인간 생식계열 서열을 기초로 인간화되었다. 표 9는 라마 항-CD33 VHH 서열을 보여준다.

표 9

[0306]

33-1 (SEQ ID NO:50)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNGDTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNS LKLEDTAVYYCAANLKGASWYSANYDYWGQGTQVTVSS
33-2(SEQ ID NO:51)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASANILRTAPMAWYRQAPGKQREFVALITADGTTDYQESVKGRFTTSRDNAKNTVYLMNSL QSEDTARYFCKVYSYWGQGTQVTVSS
33-4 (SEQ ID NO:52)	QVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCEASGSIFSIAHMGWYRQAPGKQRELVAVSSGGRTNYVDSVKGRFTISRDNAKNTVYLMNSL KAEDTAVYFCNVAVVGGPRFDYWGQGTQVTVSS
33-8 (SEQ ID NO:53)	EVQLMESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTVSTYVMGWFRQAPGKEREFVAGINRIGDTLYNRTSVKGRFTISRDNAKNTVYLMNS LEPEDTAVYSCAARVIGTSTYNYWGQGTQVTVSS
33-13 (SEQ ID NO:54)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSISINSMNWYRQAPGKQREKVAGINSSGDTNYVDSVKGRFTISRDNAERTTYLMNNL KPEDTGLYYCNADPRPWPNDVAFGSWGQGTQVTVSS
33-14 (SEQ ID NO:55)	QVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTSLILAMAWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISKDNTKNMVYLRMDN LGPEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSS
33-24 (SEQ ID NO:56)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCLASGRTSSNSAMGWFRQAPGKEREFVAGITWNGDTLYAYYVKDRFTISRDNAKRMVYLMNS LKPEDTAVYYCAATDKFASSQADSYYTWGQGTQVTVSS
33-A1 (SEQ ID NO:57)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNGDTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNS LKLEDTAVYYCAAKFSGASWYSAQYHSWGQGTQVTVSS
33-A2 (SEQ ID NO:58)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNGDTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNS LKLEDTAVYYCAANFNGASWFAANYHFWGQGTQVTVSS
33-B1 (SEQ ID NO:59)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNGDTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNS LKLEDTAVYYCAAKLKGASWFASHYKSWGQGTQVTVSS
33-B2 (SEQ ID NO:60)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNGDTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNS LKLEDTAVYYCAANINAASWFAAKYDSWGQGTQVTVSS
33-B3 (SEQ ID NO:61)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNGDTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNS LKLEDTAVYYCAANVRGSSWFSSHYDFWGQGTQVTVSS
33-C1 (SEQ ID NO:62)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNGDTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNS LKLEDTAVYYCAANLSGASWFASQYEFWGQGTQVTVSS
33-C2 (SEQ ID NO:63)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNGDTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNS LKLEDTAVYYCAANVKGASWFSANYQSWGQGTQVTVSS
33-C3 (SEQ ID NO:64)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCVASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNGDTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNS LKLEDTAVYYCAANFKGASWFASHYQSWGQGTQVTVSS
33-D1 (SEQ ID NO:65)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNGDTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNS LKLEDTAVYYCAANFNGASWFSSNYEYWGQGTQVTVSS
33-D2 (SEQ ID NO:66)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNGDTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNS LKLEDTAVYYCAANIRGSSWFATHYDSWGQGTQVTVSS
33-D3 (SEQ ID NO:67)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNGDTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNS LKLEDTAVYYCAANLRGASWFAANYKYWGQGTQVTVSS
33-E2 (SEQ ID NO:68)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNGDTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNS LKLEDTAVYYCAAKLRGASWFAANYDSWGQGTQVTVSS
33-E3 (SEQ ID NO:69)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNGDTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNS LKLEDTAVYYCAANISASWYASQYDFWGQGTQVTVSS
33-F1 (SEQ ID NO:70)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNGDTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNS LKLEDTAVYYCAANVSGASWYASHYEFWGQGTQVTVSS
33-F2 (SEQ ID NO:71)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNGDTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNS LKLEDTAVYYCAANVSEASWFAASKYDFWGQGTQVTVSS
33-F3 (SEQ ID NO:72)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNGDTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNS LKLEDTAVYYCAAKISGASWFAAHYKSWGQGTQVTVSS
33-G1 (SEQ ID NO:73)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNGDTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNS LKLEDTAVYYCAAKFRGASWFSSHYNFWGQGTQVTVSS
33-G2 (SEQ ID NO:74)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNGDTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNS LKLEDTAVYYCAANVKGASWFSSNYKYWGQGTQVTVSS
33-G3 (SEQ ID NO:75)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNGDTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNS LKLEDTAVYYCAANIKASSWYSSHYNYWGQGTQVTVSS
33-H1 (SEQ ID NO:76)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNGDTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNS LKLEDTAVYYCAANVRGASWFAAHYNSWGQGTQVTVSS

33-H2 (SEQ ID NO:77)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNGDTLYNTNSVKGRFTISRDNKNTVYLHMNS LKLEDTAVYYCAAKVRAASWFAAQYKFWGQGTQTVTVSS
h33-14 (SEQ ID NO:78)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLMSS LRAEDTAVYYCEADLIGSGRWGQGTQTVTVSS

표 9의 VHH는 CD33에 결합하기 위한 수단을 구성한다.

Octet[®] 동역학적 결합 분석을 실시예 1에서와 같이 수행하였고 K_D 결과를 도 10 및 표 10에 제시하였다. 표 10은 항-CD33 VHH 항체의 결합 친화도를 보여준다.

표 10

VHH	K_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	K_D (M)
33-1	8.0+05	8.10E-04	1.01E-09
33-2	8.0E+05	6.0E-04	7.53E-10
33-4	9.0E+05	9.0E-04	9.95E-10
33-8	1.1E+06	7.0E-04	5.11E-10
33-13	1.0E+06	5E-04	4.09E-10
33-14	8.0E+05	1.09E-04	1.36E-010
33-24	8.0E+05	9E-04	1.13E-010

예시 5. 항-LAG3 VHH

항-LAG3 VHH 항체의 단리

라마(Llamas)는 그들의 표준 프로토콜에 따라 Abcore, Inc.에서 면역화되었다. 재조합 인간 LAG3(세포의 도메인 19-238, 서열번호 79)을 완전 프로인트 아주반트(0 일) 또는 불완전 프로인트 아주반트(면역화 후)와 혼합했다. 라마당 6회의 피하 주사를 격주 간격으로 50 μ g/용량으로 수행했다. 45일째에, ELISA에 의해 인간 LAG3에 대한 항체 역가를 정의하기 위해 재조합 인간 LAG3 단백질로 면역화된 라마로부터 혈청을 수집하였다. ELISA에서 96 웰 Maxisorp 플레이트는 100ng/웰 LAG3로 코팅되었다. 희석된 혈청 샘플을 차단하고 첨가한 후, 항-LAG3 항체의 존재를 ELISA에 의해 결정된 항-혈청의 항체 역가를 사용하여 입증하였다. 96웰 Maxisorp 플레이트를 100ng/웰 hLAG3으로 코팅했습니다. 희석된 혈청 샘플을 차단하고 첨가한 후, 항-LAG3 항체의 존재는 HRP-접합된 염소 항-라마 IgG(H+L) 항체를 사용하여 입증되었다.

인간 LAG3의 세포외 도메인(서열번호 79, P18627, 23-450)

VPVVWAQEGAPALPCSPITPLQDLSSLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGHPAAPSSWGPRPRRYTVLSVGPGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRG
DFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQASMTASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPPHHLAESFLFPQVS
PMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLEPPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVGTRSFSLTAKWTPPGGGPDLLVTGDNGDFTLRLEDVSQAQAGTYTCH
IHLQEQLNATVTLAIITVTPKSFSGPSGLKLLCEVTPVSGQERFVWSSLDTPSQRSFSGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLYQGERLLGAAYVFTELSSPGAQ
RSGRAPGALPAGHL

실시예 1-4에서와 같이 파지 라이브러리를 제조하였다. LAG3-결합 VHH를 인코딩하는 cDNA는 C-말단 His-tag로 합성되었고 HEK293 세포에서 일시적으로 형질감염되었고, LAG3-결합 VHH는 IMAC 크로마토그래피에 의해 정제되었다.

면역화된 라마 파지 라이브러리로부터의 LAG3-결합 파지 콜로니의 서열을 분석하고 아미노산 서열을 각각의 VHH에 대해 아래에 열거하였다(표 11). 하기 아미노산 서열에 기초한 cDNA 서열을 인간 Fc와 융합시키고 pJ607 발현 벡터에서 합성하였다. 발현 플라스미드를 HEK293 세포주로 형질감염시켜 재조합 항-LAG3 HCAb 항체를 생산하였다. 발현된 항-LAG3 HCAb는 HiTrap 단백질 A 컬럼에 의해 정제되었다. 라마 VHH 중 하나인 LG9는 IGHV3-23 인간 생식계열 서열을 기초로 인간화되었다. 표 11은 라마 항-LAG3 VHH 서열을 보여준다.

표 11

LG2 (SEQ ID NO:80)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFISINAMGWYRQAPGKQRELVAIVTFGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLMQNS LKPEDTAVYYCSARNVQSPVQYHLAVWGQGTQTVSS
LG6 (SEQ ID NO:81)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGSIFSI STMGWYRQAPGKQRELVASITARGSDYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLMQSS LKPEDTAVYYCNTDTRSTLYHYSWGQGTQTVSS
LG9 (SEQ ID NO:82)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTITDYPIGWFRQAPGKEREVGVSCIDDSDESTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLMQNS SLKPEDTAVYYCARGAIFMIDGVDVFLTYYYDSWGQGTQTVSS
hLG9 (SEQ ID NO:83)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTITDYPMSWFRQAPGKGREGVAAIDDSDESTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLMQNS SLRAEDTAVYYCARGAIFMIDGVDVFLTYYYDSWGQGTQTVSS
LG19 (SEQ ID NO:84)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREVGVSCISSSDGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLMQNS SLKPEDTAVYYCAADRRGSCRQYDYGWQGTQTVSS
LG22 (SEQ ID NO:85)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREVGVSCINSDDGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLMQNS SLKPEDTAVYYCATDRYSDCRGPYDYGWQGTQTVSS
LG-D8 (SEQ ID NO:86)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGKYAMSWVRQVPDKGLEWVSSISSSGRDTSYADSAKGRFTIFRNNAANTVYLMQMD NLKLEDTGYYCVKCLEVWATREYDYGWQGTQTVSS
LG-E12 (SEQ ID NO:87)	QVQLVESGGGLVHPGGSLNLSVAHGFSLDSDHMGWFRQAPGKEREVGVACIKHRDGRIYILEAVKDRFVISRDNAKNTVYLEMN NLSDEDTAVYHCATASSCSNWWLLIGDAYAGYWGQGTQTVSS
LG15 (SEQ ID NO:88)	EVQLAESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFAFRSYVMSWVRQAPGKGLEWVSTINSDSRTSYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLMQNS LKVEDTAVYYCSKQSPGTSQRGGQGTQTVSS
LG65 (SEQ ID NO:89)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTSATYSIAWFRQAPGKEREVGVSCISTGDGSTYYAPAVKGRFTISSDNAKNTVYLMQNS GLKPEDTAVYYCAKRAGYGSWFCPLDPSLQYDSWGQGTQTVSS
LG99 (SEQ ID NO:90)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTITDYPMSWFRQAPGKGREGVAAIDDSDESTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLMQNS SLRAEDTAVYYCARGALFMIDGVDVFLTYFFEFWGQGTQTVSS
LG-C4 (SEQ ID NO:91)	QVQLVESGGRLVQAGGSLGLSCAASGLAFREYSMGWFRAPGKEREVFAAVDWTG IQYYADSVKGRATISRDTAKSTVFLQMNS LNPEDTAFYYCAAGKKLTGIVLLTRTEYDYGWQGTQTVSS
LG-E5 (SEQ ID NO:92)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAHSGLTLDYYALGWFRQAPGKEREAVVSCISSSDGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLMQNS SLKPEDTAVYYCASTRYGSSCRGGQWDTGSGWQGTQTVSS
LG-H4 (SEQ ID NO:93)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFLDYITIGWFRQAPGKEREAVVSCINRSDGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLMQNS SLKPEDTAVYYCASTTYGTSCRGGQWDTGSGWQGTQTVSS

표 11의 VHH는 LAG3에 결합하기 위한 수단을 구성한다.

항-LAG3 VHH의 Octet174; 결합 분석을 실시예 1-4에서와 같이 수행하였고 결과는 표 12에 나타내었다. 표 12는 항-LAG3 단일 도메인 항체의 결합 친화도(K_D)를 보여준다.

표 12

sdAb	K_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	K_D (M)
LG2	3.33E+04	2.10E-02	6.30E-07
LG6	2.75E+04	5.22E-04	1.90E-08
LG9	6.21E+04	1.10E-04	1.77E-09
LG9H	1.10E+05	2.98E-04	2.71E-09
LG19	8.70E+04	1.09E-05	1.14E-010
LG22	4.27E+04	1.14E-05	2.67E-010
LG-D8	3.30E+04	9.82E-05	2.98E-09
LG-99	3.67E+05	2.91E-05	7.92E-11

예시 6. 항-CD16 VHH

항-CD16 VHH 항체의 단리

라마는 그들의 표준 프로토콜에 따라 Abcore Inc에서 면역화되었다. 재조합 인간 CD16A(서열번호 94)를 완전 프로인트 아주반트(0일) 또는 불완전 프로인트 아주반트(면역화 후)와 혼합하였다. 라마당 6회의 피하 주사를 격주 간격으로 50 μ g/용량으로 수행했다. 45일째에, ELISA에 의해 항체 역가를 정의하기 위해 면역화된 라마로부터

혈청을 수집하였다. ELISA에서 96웰 Maxisorp 플레이트는 100ng/웰 항원으로 코팅되었다. 희석된 혈청 샘플을 차단하고 첨가한 후, HRP-접합 염소 항라마 IgG(H+L) 항체를 사용하여 특정 항체의 존재를 입증하였다.

[0324] 인간 CD16A(서열번호 94)

[0325] MWQLLLPTALLLVLSAGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKQCQAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQL
EVHIGWLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVITYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLFGSKNVSSSETVNITITQGLAVSTISSFFP
PGYQVSFCLVMVLLFAVDITGLYFSVKTNIRSSSTRDWKDHKFKWRKDPQDK

[0326] 인간 CD16B(서열번호 95)

[0327] MWQLLLPTALLLVLSAGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKQCQAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQL
EVHIGWLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVITYLQNGKDRKYFHHNSDFHYPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSSSETVNITITQGLAVSTISSFFP
PGYQVSFCLVMVLLFAVDITGLYFSVKTNIR

[0328] 예시 1에서와 같이 파지 라이브러리를 제조하였다. CD16A-결합 VHH를 코딩하는 cDNA를 C-말단 His-태그로 합성하고, HEK293 세포에서 일시적으로 형질감염시키고, CD16A-결합 VHH를 IMAC 크로마토그래피에 의해 정제하였다.

[0329] 면역화된 라마 파지 라이브러리로부터의 CD16A-결합 파지 콜로니의 서열을 분석하고 아미노산 서열을 각각의 VHH에 대해 아래에 열거하였다(표 13). 하기 아미노산 서열에 기초한 cDNA 서열을 인간 Fc와 융합시키고 pJ607 발현 벡터에서 합성하였다. 발현 플라스미드를 HEK293 세포주로 형질감염시켜 제조항-CD16 HCAb 항체를 생산하였다. 발현된 항-CD16 HCAb는 HiTrap 단백질 A 컬럼에 의해 정제되었다.

[0330] 라마 VHH 중 하나인 CD16F1은 IGHV3-23 인간 생식계열 서열에 기초하여 인간화되었다. 표 13은 항-CD16 VHH 서열을 보여준다.

표 13

[0331] CD16F1 (SEQ ID NO:96)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNRAKRAVYLQMN SLKPEDTAVYYCENVNLYNTGNYWGQGTQVTVSS
hCD16F1-1 (SEQ ID NO:97)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVAITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNRAKRAVYLQMN SLKPEDTAVYYCENVNLYNTGNYWGQGTQVTVSS
hCD16F1-2 (SEQ ID NO:98)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVAITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNRAKRAVYLQMN SLRAEDTAVYYCENVNLYNTGNYWGQGTQVTVSS
CD16E11 (SEQ ID NO:99)	QVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCRASGFTFSNHMSWVRQAPGKLEWVSEISFNHATRYADSLKGRFTISRDNKNTLYLQM NTLKPEDTAVYYCRKGWNPATPQIGERGRGTQVTVSS

[0332] 표 13의 VHH는 CD16에 결합하기 위한 수단을 구성한다.

[0333] 항-CD16 VHH의 Octet174; 결합 분석을 실시예 1에서와 같이 수행하였고 그 결과를 표 14 및 도 11에 나타내었다. 표 14는 항-CD16 VHH 항체의 결합 친화도(K_D)를 보여준다.

표 14

[0334]	sdAb	K_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	K_D (M)
	CD16F1	2.33E+04	1.09E-04	4.68E-09
	CD16E11	1.99E+04	6.00E-05	3.02E-09

[0335] CD16-F1은 CD16A에 대해 선택적인 반면, CD16-E11은 CD16A 및 CD16B 모두에 결합한다.

[0336] CD16F1 및 CD16E11 둘 모두는 Jurkat-Lucia NFAT-CD16 ADCC 리포터 분석(Invivogen)에서 CD16A를 활성화한 작용제 항-CD16 VHH 항체이다.

[0337] Jurkat-Lucia NFAT-CD16 리포터 분석(Invivogen)을 사용한 다중특이적 분자 1511, 3321(항-CD16A VHH CD16F1 함유) 및 대조군 항-CD47 항체, B6H12 IgG1 및 B6H12 IgG4의 기능 분석 및 결과 도 12에 표현된다. CD16F1이 강력한 CD16A 작용제임을 나타내는 데이터이다.

[0338] 예시 7. 삼중특이 단일쇄 항체(HSA/CD47/PD-L1 또는 HSA/LAG3/PD-L1)

[0339]

삼중특이적 단일 사슬 항체, 항-HSA, 항-CD47, 및 항-PD-L1 또는 항-CD33 VHH 서열 또는 항-HSA, 항-LAG3, 및 항-PD-L1 또는 CD33을 구축하기 위해 VHH 서열은 재조합 DNA 기술에 의해 6가지 상이한 방식으로 링커를 통해 함께 융합되었다(도 13). 도 13은 예시적인 삼중특이적 분자 항-HSA/CD47/PD-L1, 항-HSA/CD47/CD33 및 항-HSA/LAG3/PD-L1, 항-HSA/LAG3/CD33 항체의 구조를 도시한다. 예시적인 절단 불가능한 및 절단 가능한 링커 서열이 표 15에 제시되어 있다. 이들은 링커 수단 또는 단백질 도메인을 연결하기 위한 수단을 구성한다. 이러한 평균은 쪼개질 수 있거나 쪼개지지 않는 것으로 추가로 특징지어질 수 있다. 예시적인 삼중특이적 분자의 아미노산 서열은 표 16에 제시되어 있다. 표 16 및 17의 링커 서열은 밑줄이 그어져 있다. 표 15는 절단 불가능한 및 절단 가능한 링커 서열을 보여주고, 표 16은 삼중특이적 분자를 보여준다.

표 15

[0340]

링커 레퍼런스	서열	절단 가능?
L1 (SEQ ID NO:100)	GGGSGGGS	아니오
L2 (SEQ ID NO:101)	(G ₄ S) _n (G ₃ S) _m (n=1-35; m=0-35)	아니오
L3 (SEQ ID NO: 102)	AAA	아니오
L4 (SEQ ID NO:103)	(G ₄ S) _n	아니오
L11*3 (SEQ ID NO:104)	GGRGPLGLAGSRSAFSGS	예
L11*4 (SEQ ID NO:105)	GSPLGLAGS	예
L11*5 (SEQ ID NO:106)	GGSGPLGLAGSRSAFG	예
L11*6 (SEQ ID NO:107)	GPLGLAGSRSAAGSQVQL	예
L11*7 (SEQ ID NO:108)	GGSGPLGLAARSAGGS	예
L11*8 (SEQ ID NO:109)	GGSGPLGLAARSAGGS	예
L11*9 (SEQ ID NO:110)	GGSGRSAPLGLARQARQVGGG	예
L11*10 (SEQ ID NO:111)	GGSGRSAPLGLGRQARGGS	예
L11*11 (SEQ ID NO:112)	GGSPGLARQARGSGRSAGGS	예
L11*12 (SEQ ID NO:113)	GGSGRSAPLGLARQARVGGG	예
L11*13 (SEQ ID NO:114)	GSRQARVVGGS	예
L11*14 (SEQ ID NO:115)	GSRQRRVVGGS	예
L11*15 (SEQ ID NO:116)	GSRQARGS	예
L11*16 (SEQ ID NO:117)	GSRQRRGS	예
L11*17 (SEQ ID NO:118)	GSRQARGGS	예
L11*18 (SEQ ID NO:119)	GSRQRRGGS	예

표 16

[0341]

hHS5-L11*3-hA09-10-2-L1-hPL16 (SEQ ID NO:120)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDGTANTLYLQMSLRAEDTAVYVCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGSPGLAGRSAGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSNGINADSVKGRFTISRDNFKNITTYLQMSSLEPEDTAVYCAAHYLLLPSTSTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFTLYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMSLRAEDTAVYCAAARTAAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hHS5-L11*3-hA09-10-2-L3-A09-10-L1-hPL16 (SEQ ID NO:121)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDGTANTLYLQMSLRAEDTAVYVCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGSPGLAGRSAGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSNGINADSVKGRFTISRDNFKNITTYLQMSSLEPEDTAVYCAAHYLLLPSTSTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSNGINADSVKGRFTISRDNFKNITTYLQMSSLEPEDTAVYCAAHYLLLPSTSTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFTLYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMSLRAEDTAVYCAAARTAAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hHS5-L11*3-hA09-10-2-L3-A09-10-L1-hPL16-L3-hPL16 (SEQ ID NO:122)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDGTANTLYLQMSLRAEDTAVYVCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGSPGLAGRSAGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSNGINADSVKGRFTISRDNFKNITTYLQMSSLEPEDTAVYCAAHYLLLPSTSTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFTLYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMSLRAEDTAVYCAAARTAAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFTLYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMSLRAEDTAVYCAAARTAAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS

hA09 -10-1-L1-hHS5-L1-hPL16 (SEQ ID NO:123)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAAKRSSEFDYWGGGTQVTVSS
hA09-10-2-L3-A09-10-L1-hHS5-L1-hPL16 (SEQ ID NO:124)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAAKRSSEFDYWGGGTQVTVSS
hA09-10-2-L3-A09-10-L1-hHS5-L1-hPL16-L3-hPL16 (SEQ ID NO:125)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAAKRSSEFDYWGGGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAAKRSSEFDYWGGGTQVTVSS
hA09-10-3-L1-hHS5-L1-hPL16-L3-hPL16 (SEQ ID NO:126)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAAKRSSEFDYWGGGTQVTVSS
hHS5-L11*3-hA09-10-3-L1-H33-14 (SEQ ID NO:127)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGSPLGLAGRSFAGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGR IWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGGGTQVTVSS
hHS5-L11*3-hA09-10-2-L3-A09-10-L1-H33-14 (SEQ ID NO:128)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGSPLGLAGRSFAGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGR IWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGGGTQVTVSS
hHS5-L1-hA09-10-2-L3-A09-10-L1-H33-14-L3-H33-14 (SEQ ID NO:129)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGR IWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGGGTQVTVSS
hHS5-L11*3-hA09-10-2-L3-A09-10-L1-H33-14-L3-H3-14 (SEQ ID NO:130)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGR IWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGGGTQVTVSS
hA09-10-3-L1-hHS5-L1-H33-14 (SEQ ID NO:131)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGR IWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGGGTQVTVSS
hA09-10-2-L3-A09-10-L1-hHS5-L1-H33-14 (SEQ ID NO:132)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGR IWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGGGTQVTVSS

hA09-10-L1-hHS5-L1-H33-14-L3-H33-14 (SEQ ID NO:133)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESAGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSS
hA09-10-2-L3-A09-10-L1-hHS5-L1-H33-14-L3-H33-14 (SEQ ID NO:134)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESAGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSS
H33-14-L1-hHS5-L1-CD16F1 (SEQ ID NO:135)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESAGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNAKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSS
H33-14-L1-hHS5-L1-CD16F1-L3-CD16F1(SEQ ID NO:136)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESAGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNAKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSS
H33-14-L3-H33-14-L1-hHS5-L1-CD16F1(SEQ ID NO:137)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESAGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNAKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSS
H33-14-L3-H33-14-L1-hHS5-L1-CD16F1-L3-CD16F1 (SEQ ID NO:138)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESAGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNAKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSS
hPL16-L1-hHS5-L1-CD16F1 (SEQ ID NO:139)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESAGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNAKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSS
hPL16-L3-hPL16-L1-hHS5-L1-CD16F1 (SEQ ID NO:140)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESAGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNAKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSS
hPL16-L1-hHS5-L1-CD16F1-L3-CD16F1 (SEQ ID NO:141)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESAGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESAGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNAKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSS

hPL16-L3-hPL16-L1-hH S5-L1-CD16F1-L3-CD16 F1 (SEQ ID NO:142)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMS WVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGQ GTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRITTYADSV KGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDN AKRAVYLQMNSLKPEDTAVYY CNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVR TDYADSVKGRFTISRDN AKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSS
hLG9-L1-hHS5-L1-hPL1 6 (005R) (SEQ ID NO:143)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTIDDYPMWFRQAPGKREGVAAIDDSDESTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARGAIFMIDGVDVFLTYYYDSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRITTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVR AGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSG YMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hLG9-L3-hLG9-L1-hHS5 -L1-hPL16 (SEQ ID NO:144)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTIDDYPMWFRQAPGKREGVAAIDDSDESTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARGAIFMIDGVDVFLTYYYDSWGQGTQVTVSSAAAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTIDD YPMWFRQAPGKREGVAAIDDSDESTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAIFMIDGVDVFLT YYYSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGR ITTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hLG9-L1-hHS5-L1-hPL1 6-L3-hPL16 (SEQ ID NO:145)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTIDDYPMWFRQAPGKREGVAAIDDSDESTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARGAIFMIDGVDVFLTYYYDSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRITTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVR AGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSG YMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hLG9-L3-hLG9-L1-hHS5 -L1-hPL16-L3-hPL16 (SEQ ID NO:146)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTIDDYPMWFRQAPGKREGVAAIDDSDESTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARGAIFMIDGVDVFLTYYYDSWGQGTQVTVSSAAAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTIDD YPMWFRQAPGKREGVAAIDDSDESTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAIFMIDGVDVFLT YYYSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGR ITTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQA PGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGQGTQV TVSS
hPL16-L1-hHS5-L1-hLG 9 (SEQ ID NO:147)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFT TTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRITTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTT NSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTIDDYPMWFRQAPGKREGVAAIDDSDESTY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAIFMIDGVDVFLTYYYDSWGQGTQVTVSSAAAEVQLLESGG GLVQPGGSLRLSCAASGSTIDDYPMWFRQAPGKREGVAAIDDSDESTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARGAIFMIDGVDVFLTYYYDSWGQGTQVTVSS
hPL16-L1-hHS5-L1-hLG 9-L3-hLG9 (SEQ ID NO:148)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFT TTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRITTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTT NSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTIDDYPMWFRQAPGKREGVAAIDDSDESTY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAIFMIDGVDVFLTYYYDSWGQGTQVTVSSAAAEVQLLESGG GLVQPGGSLRLSCAASGSTIDDYPMWFRQAPGKREGVAAIDDSDESTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARGAIFMIDGVDVFLTYYYDSWGQGTQVTVSS
hPL16-L3-hPL16-L1-hH S5-L1-hLG9 (SEQ ID NO:149)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMS WVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGQ GTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRITTYADSV KGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGSTIDDYPMWFRQAPGKREGVAAIDDSDESTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGAIFMIDGVDVFLTYYYDSWGQGTQVTVSS
hPL16-L3-hPL16-L1-hH S5-L1-hLG9-L3-hLG9 (SEQ ID NO:150)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMS WVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGQ GTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRITTYADSV KGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGSTIDDYPMWFRQAPGKREGVAAIDDSDESTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGAIFMIDGVDVFLTYYYDSWGQGTQVTVSSAAAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTIDDYPMWFRQAPGK REGVAAIDDSDESTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAIFMIDGVDVFLTYYYDSWGQGTQV TVSS

[0342]

항-HSA 도메인은 HSA에 결합함으로써 체내에서 MVSCA의 반감기를 연장할 수 있다. 그것은 또한 다른 도메인의

활동을 방해할 수 있는데, 이는 일부 경우에 신체 전체에 분포된 MVSCA에 바람직할 수 있지만 MVSCA가 의도된 작용 부위(예: 종양)에 있을 때는 바람직하지 않다. 따라서 의도된 작용 부위에서 우선적으로 절단될 수 있는 절단 가능한 링커에 의해 항-HSA 도메인을 다른 항원 결합 도메인(들)에 연결함으로써, 이러한 방식으로 MVSCA는 전구약물 역할을 할 수 있다. 프로테아제 절단 가능한 서열을 함유하는 링커가 있는 이러한 MVSCA 중 하나는 HSA VHH와 CD47 VHH 또는 LAG3 VHH 사이에 사용되었으며 다른 링커는 CD47 VHH를 PD-L1 VHH와 연결하거나 LAG3 VHH를 PD-L1과 연결하는 데 사용되었습니다. 도 13 및 표 9. 도 14b는 도 14a의 항체의 프로테아제 소화 후 SDS-페이지 분석을 보여준다.

[0343] 프로테아제 분석

[0344] (1) MMP-9 활성 분석. 재조합 인간 MMP-9(rhMMP-9, R&D Systems)를 분석 완충액(50mM Tris, 10mM CaCl₂, 150mM NaCl, 0.05% Brij-35, pH7.5)에서 100 µg/ml로 희석한다. 그런 다음 rhMMP-9는 APMA(p-aminophenylmercuric acetate, Sigma)를 1mM의 최종 농도로 첨가하여 활성화하고 37° C에서 24시간 동안 인큐베이션한다. 활성화된 rhMMP-9는 분석 완충액에서 동일한 부피의 20 µM 항체로 적정하고 실온에서 1시간 동안 배양한다. 생성된 소화 기질을 SDS-PAGE로 분석한다.

[0345] (2) u-플라스미노젠 활성화제(uPA, 유로키나제) 활성 분석. 기질을 분석 완충액(50mM Tris, 0.01% Tween 20, pH8.5)에서 200 µM로 희석하고 분석 완충액에서 동일한 부피의 재조합 인간 u-플라스미노젠 활성화제(rhUPA, R&D Systems)로 적정한다. 반응 혼합물을 실온에서 1-2시간 동안 인큐베이션하고 생성된 소화된 기질을 SDS-PAGE로 분석한다.

[0346] (3) 매트립타제 활성 분석. 기질을 분석 완충액(50mM Tris, 50mM NaCl, 0.01% Tween 20)에서 200 µM으로 희석하고 분석 완충액에서 동일한 부피의 재조합 인간 매트립타제(R&D Systems)로 적정한다. 반응 혼합물을 실온에서 1-2시간 동안 인큐베이션하고 생성된 소화된 기질을 SDS-PAGE로 분석한다.

[0347] 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE). SDS-PAGE 변성은 Invitrogen NuPAGE® 사양에 따라 수행된다. 간단히 말해서, 7.5 µL의 단백질 샘플(3 µg 단백질)을 2.5 µL의 4X LDS 샘플 로딩 버퍼(Invitrogen)와 혼합하고 70 ° C에서 10분 동안 가열한다. 그런 다음 샘플을 프리캐스트 NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris 1.0mm 미니겔(Invitrogen)에 로드한다. 그런 다음 미리 염색된 SDS-PAGE 표준(Bio-Rad) 5 µL을 각 겔 실행에 로드한다. 전기영동은 염료 전면이 60mm 겔의 끝에 도달할 때까지 NuPAGE MOPS SDS 실행 완충액(Invitrogen)의 1X 용액에서 일정한 전압(200V)을 사용하여 실온에서 약 45분 동안 수행된다. 겔은 SimplyBlue SafeStain(Invitrogen)으로 염색된다.

[0348] 도 15는 10 mg/ml HSA의 존재 하에 PD-L1/pro-CD47(HSA-CD47-PD-L1 항체) 대 PD-L1/활성-CD47(HSA 결합 도메인이 절단된 동일한 항체)의 실시간 동역학 결합 분석을 도시한다. PD-L1/pro-CD47은 CD47에 대한 결합이 없거나 훨씬 적은 반면 PD-L1/활성 CD47은 CD47에 대한 강력한 결합을 보여주었다. 이 분석에서 PD-L1 결합에 대한 차이나 영향은 없다.

[0349] 예시 8. CD16A/HSA/CD47/(PD-L1 또는 CD33)을 함유하는 다중특이적 분자

[0350] 다중특이적 분자를 구축하기 위해, ant-CD16A, 항-HSA, 항-CD47, 및 항-PD-L1 또는 CD33 VHH 서열을 재조합 DNA 기술에 의해 8가지 상이한 방식으로 링커를 통해 함께 융합시켰다. 도 16은 항-CD16A, 항-HSA, 항-CD47, 및 항-PD-L1 또는 CD33 VHH의 예시적인 다중특이적 분자의 구조를 도시한다. 하기에 열거된 예시적인 다중특이적 분자의 아미노산 서열(표 17)

[0351] 도 17A는 HL60 세포에 대한 유세포 분석 결합 분석에서 VHH2와 VHH3, G4SG3S(L1, 서열번호 100) 대 (G4S)3(L4, 서열번호 103) 사이의 링커의 길이를 비교하였다. HL60 세포는 CD47을 발현하지만 PD-L1은 발현하지 않으며, 따라서 1518-HS5(서열번호 173) 및 1518-HS5-GS15(서열번호 184)의 결합은 HL60 세포 표면 상의 CD47에 대한 2개의 분자 결합을 나타내었다(도 18). (G4S)3(GS15는 15개 아미노산 링커를 나타냄) 대 G4SG3S(9개 아미노산)와 같은 더 긴 링커는 CD47 결합, EC50 8.4 대 26 nM을 개선했다. 표 17는 다중특이적 분자를 보여준다.

표 17

[0352]

hPL16-L1-hHS5-L1-CD16F1 (SEQ ID NO:151)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTA VYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMG WYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNRAKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGT QVTVSS
CD16F1-L1-hHS10-L1- hA09-10-2-L3-A09-10-L1-hPL16 (015-3) (SEQ ID NO:152)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDN RAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GSTDSAYRMGWFRQAPGKEREFVSAINWSDGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADP DSRLYYTVPQNYDYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFR QAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSAKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGG NINYADSAKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYNYWGQGTQVTVSSGGGG SGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISR DNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hHS10-L11*12-CD16F1-L1-hA0 9-10-2-L3-A09-10-L1-hPL16 (SEQ ID NO:153)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTDSAYRMGWFRQAPGKEREFVSAINWSDGRTYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADPDSRLYYTVPQNYDYWGQGTQVTVSSGGGSGRSAPLGLARQARQVGGSEVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNRAKRAVY LQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGR TFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLL LPSYISTSTNMNYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKER EFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYNYWGQGT QVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTY YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
CD16F1-L1-hHS10-L1- A09-10-L1-hPL16(015-2) (SEQ ID NO:154)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDN RAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GSTDSAYRMGWFRQAPGKEREFVSAINWSDGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADP DSRLYYTVPQNYDYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQ APGKEREFVAAISRSGGNINYADSAKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNM NYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINW SGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hHS10-L11*12-CD16F1-L1-hA0 9-10-2-L3-A09-10-L1-hPL16- L3-hPL16 (SEQ ID NO:155)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTDSAYRMGWFRQAPGKEREFVSAINWSDGRTYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADPDSRLYYTVPQNYDYWGQGTQVTVSSGGGSGRSAPLGLARQARQVGGSEVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNRAKRAVY LQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGR TFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLL LPSYISTSTNMNYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKER EFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYNYWGQGT QVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTY YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
CD16F1-L1-hHS10-L1-hA09-10 -2-L3-A09-10-L1-hPL16-L3-h PL16 (1511) (SEQ ID NO:156)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDN RAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GSTDSAYRMGWFRQAPGKEREFVSAINWSDGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADP DSRLYYTVPQNYDYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQ APGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNM NYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGG NINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYNYWGQGTQVTVSSGGGG GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISR DNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
CD16F1-L1-hHS10-L1-hA09-10 -3-L3-hA09-10-4-L1-hPL16-L 3-hPL16 (1518) (SEQ ID NO:157)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDN RAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GSTDSAYRMGWFRQAPGKEREFVSAINWSDGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADP DSRLYYTVPQNYDYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQ APGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNM NYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGG NINYADSVKGRFTISRDNKNTTYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYNYWGQGTQVTVSSGGGG GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISR DNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS

hHS10-L11*9-CD16F1-L1-hA09-10-2-L3-A09-10-L1-H33-14-L3-H33-14 (SEQ ID NO:158)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTD SAYRMGWFRQAPGKEREFVSAINWSDGRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADPDSRLYYTVPQNYDYWGQGLTVTVSSGGSGRSAPLGLARQARQVGGSEVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDN AKRAVY LQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGR TFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLL LPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKER EFVAAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGT QVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTR YSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGLTVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLAED TAVYYCEADLIGGSRGWGQGLTVTVSS
CD16F1-L1-hHS10-L1-hA09-10-3-L3-hA09-10-4-L1-H33-14-L3-H33-14 (3321) (SEQ ID NO:159)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDN AKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GSTDSAYRMGWFRQAPGKEREFVSAINWSDGRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADP DSRLYYTVPQNYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQ APGKEREFVAAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNFKNTVYLQMSSLAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNM NYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGG NIYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSG GGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISR DNKNTVYLQMSSLAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGLTVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG RTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLAEDTAVYYCEADLIG GSRGWGQGLTVTVSS
hHS10-L11*9-CD16F1-L1-CD16 F1-L1-hA09-10-2-L3-A09-10-L1-hPL-16-L3-hPL-16 (SEQ ID NO:160)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTD SAYRMGWFRQAPGKEREFVSAINWSDGRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADPDSRLYYTVPQNYDYWGQGLTVTVSSGGSGRSAPLGLARQARQVGGSEVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDN AKRAVY LQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLF SARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDN AKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGN YWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGG NIYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSS AAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYADSVKGRFTISR DNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAAARTAAIAKRSEFDYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTY SMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAKR SSEFDYWGQGTQVTVSS
CD16F1-L3-CD16F1-L1-hHS10-L1-hA09-10-2-L3-A09-10-L1-H33-14-L3-H33-14 (SEQ ID NO:161)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDN AKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSA RVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDN AKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYW GQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTD SAYRMGWFRQAPGKEREFVSAINWSDG RTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADPDSRLYYTVPQNYDYWGQGLTVTVSSGGGGSG GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYADSVKGRFTISR DNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAG GSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLEP EDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR TSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLAEDTAVYYCEADLIG GSRGWGQGLTVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDM TRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGLTVTVSS
hHS10-L11*12-CD16F1-L3-CD1 6F1-L1-hA09-10-2-L3-A09-10-L1-H33-14-L3-H33-14 (SEQ ID NO:162)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTD SAYRMGWFRQAPGKEREFVSAINWSDGRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADPDSRLYYTVPQNYDYWGQGLTVTVSSGGSGRSAPLGLARQARQVGGSEVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDN AKRAVY LQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMG WYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDN AKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGT QVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGG NIYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQ LVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNFK NTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLAED TAVYYCEADLIGGSRGWGQGLTVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKER EFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGLTVTVSS

CD16F1-L3-CD16F1-L1-hA09-10-2-L3-A09-10-L1-H33-14-L3-H33-14 (SEQ ID NO:163)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTIISRDNAKRAVYLMQNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGSLFSA RVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTIISRDNAKRAVYLMQNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRS GGNINYADSVKGRFTIISRDNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLLPYSYISTSTNMNYNWGGGTQVTVSSAA AQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTIISR DNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLLPYSYISTSTNMNYNWGGGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTIISRDNAKNTVYLMQSSL RAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTLTVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAP GKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTIISRDNAKNTVYLMQSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTLTVTVS S
H33-14-L3-H33-14-L1-hA09-10-2-L3-A09-10-L1-hHS 10-L1-CD16F1 (SEQ ID NO:164)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTIISRDNA KNTVYLMQSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTLTVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSL ILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTIISRDNAKNTVYLMQSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSR GWGQGTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAIS RSGGNINYADSVKGRFTIISRDNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLLPYSYISTSTNMNYNWGGGTQVTVSS AAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGNINYADSVKGRFTIISR DNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLLPYSYISTSTNMNYNWGGGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGSDTSAYRMGWFRQAPGKEREFVSAINWSDGRTYYADSVKGRFTIISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAADPDSRLYYTPVQNYDYWGQGTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAIVS GSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTIISRDNAKRAVYLMQNSLKPEDTAVYYCNVNL YNTGNYWGQGTQVTVSS
H33-14-L3-H33-14-L1-hA09-10-2-L3-A09-10-L1-hHS 10-L1-CD16F1-L3-CD16F1 (SEQ ID NO:165)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTIISRDNA KNTVYLMQSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTLTVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSL ILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTIISRDNAKNTVYLMQSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSR GWGQGTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAIS RSGGNINYADSVKGRFTIISRDNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLLPYSYISTSTNMNYNWGGGTQVTVSS AAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGNINYADSVKGRFTIISR DNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLLPYSYISTSTNMNYNWGGGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGSDTSAYRMGWFRQAPGKEREFVSAINWSDGRTYYADSVKGRFTIISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAADPDSRLYYTPVQNYDYWGQGTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAIVS GSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTIISRDNAKRAVYLMQNSLKPEDTAVYYCNVNL YNTGNYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVR TDYADSVKGRFTIISRDNAKRAVYLMQNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSS
H33-14-L3-H33-14-L1-hA09-10-2-L3-A09-10-L1-CD1 6F1-L11*9-hHS10 (SEQ ID NO:166)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTIISRDNA KNTVYLMQSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTLTVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSL ILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTIISRDNAKNTVYLMQSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSR GWGQGTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAIS RSGGNINYADSVKGRFTIISRDNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLLPYSYISTSTNMNYNWGGGTQVTVSS AAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGNINYADSVKGRFTIISR DNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLLPYSYISTSTNMNYNWGGGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAIVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTIISRDNAKRAVYLMQNS LKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGSGRSAPLGLARQARQVGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGSDTSAYRMGWFRQAPGKEREFVSAINWSDGRTYYADSVKGRFTIISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA ADPDSRLYYTPVQNYDYWGQGTLTVTVSS
H33-14-L3-H33-14-L1-hA09-1 0-2-L3-A09-10-L1-CD16-F1-L 3-CD16F1-L11*9-hHS10 (SEQ ID NO:167)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTIISRDNA KNTVYLMQSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTLTVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSL ILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTIISRDNAKNTVYLMQSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSR GWGQGTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAIS RSGGNINYADSVKGRFTIISRDNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLLPYSYISTSTNMNYNWGGGTQVTVSS AAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGNINYADSVKGRFTIISR DNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLLPYSYISTSTNMNYNWGGGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAIVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTIISRDNAKRAVYLMQNS LKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGSLFSARVMGWYRQA PGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTIISRDNAKRAVYLMQNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVS SGGSGRSAPLGLARQARQVGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDTSAYRMGWFRQAPGKEREFVSAINW SDGRTYYADSVKGRFTIISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADPDSRLYYTPVQNYDYWGQGTLTVTVSS
CD16F1-L1-hHS5-L1-hA09-10-2-L3-A09-10-L1-hPL 16(015-3-HS5) (SEQ ID NO:168)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTIISRDNAK RAVYLMQNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNL DTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAP GKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTIISRDNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLLPYSYISTSTNMNY NWGGGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIN YADSVKGRFTIISRDNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLLPYSYISTSTNMNYNWGGGTQVTVSSGGGGSGG GSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTIISR D NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS

hHS5-L11*9-CD16F1-L1-hA09-10-2-L3-A09-10-L1-hPL16 (SEQ ID NO:169)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDGTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGSGRSAPLGLARQARQVGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAHYLLPSYISTSTNMNYNWGGGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAHYLLPSYISTSTNMNYNWGGGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAAKRSSEFDYWGGGTQVTVSS
CD16F1-L1-hHS5-L1-A09-10-L1-hPL16(015-2-HS5) (SEQ ID NO:170)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDGTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAHYLLPSYISTSTNMNYNWGGGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAAKRSSEFDYWGGGTQVTVSS
hHS5-L11*9-CD16F1-L1-A09-10-L3-A0910-L1-hPL16-L3-hPL16 (SEQ ID NO:171)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDGTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGSGRSAPLGLARQARQVGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSAKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLKPEDTAVYYCAHYLLPSYISTSTNMNYNWGGGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAAKRSSEFDYWGGGTQVTVSS
CD16F1-L1-hHS5-L1-A09-10-L3-A09-10-L1-hPL16-L3-hPL16(1511-HS5) (SEQ ID NO:172)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDGTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSAKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLKPEDTAVYYCAHYLLPSYISTSTNMNYNWGGGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSAKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLKPEDTAVYYCAHYLLPSYISTSTNMNYNWGGGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAAKRSSEFDYWGGGTQVTVSS
CD16F1-L1-hHS5-L1-hA09-10-3-L3-hA09-10-4-L1-hPL16-L3-hPL16(1518-HS5) (SEQ ID NO:173)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDGTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLRAEDTAVYYCAHYLLPSYISTSTNMNYNWGGGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCAHYLLPSYISTSTNMNYNWGGGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAAKRSSEFDYWGGGTQVTVSS
hHS5-L11*9-CD16F1-L1-hA09-10-2-L3-A09-10-L1-H33-14-L3-H33-14 (SEQ ID NO:174)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDGTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGSGRSAPLGLARQARQVGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAHYLLPSYISTSTNMNYNWGGGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAHYLLPSYISTSTNMNYNWGGGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGGTTLTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGGTTLTVSS

CD16F1-L1-hHS5-L1-hA09-10-3-L3-hA09-10-4-L1-H33-14-L3-H33-14 (3211-HS5) (SEQ ID NO:175)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNINWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNINWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTTYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSS
hHS5-L11*9-CD16F1-L3-CD16F1-L1-hA09-10-2-L3-A09-10-L1-hPL-16-L3-hPL-16 (SEQ ID NO:176)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGSGRSAPLGLARQARQVGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNINWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNINWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFSINWGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
CD16F1-L3-CD16F1-L1-hHS5-L1-hA09-10-2-L3-A09-10-L1-H33-14-L3-H33-14 (SEQ ID NO:177)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNINWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNINWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTTYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSS
hHS5-L11*9-CD16F1-L3-CD16F1-L1-hA09-10-2-L3-A09-10-L1-H33-14-L3-H33-14 (SEQ ID NO:178)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGSGRSAPLGLARQARQVGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNINWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNINWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTTYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSS
H33-14-L3-H33-14-L1-hA09-10-2-L3-A09-10-L1-hHS5-L1-CD16F1 (SEQ ID NO:179)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTTYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNINWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNINWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSS

H33-14-L3-H33-14-L1-hA09-10-2-L3-A09-10-L1-hHS5-L1-CD16F1-L3-CD16F1 (SEQ ID NO:180)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGLTLVTSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGLTLVTSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRRTTYADSVKGRFTISRDTGANTLYLQMNLSRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMNLSKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMNLSKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSS
H33-14-L3-H33-14-L1-hA09-10-2-L3-A09-10-L1-CD16F1-L11*9-hHS5 (SEQ ID NO:181)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGLTLVTSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGLTLVTSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMNLSKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGSGRSAPLGLARQARQVGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRRTTYADSVKGRFTISRDTGANTLYLQMNLSRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSS
H33-14-L3-H33-14-L1-hA09-10-2-L3-A09-10-L1-CD16F1-L3-CD16F1-L11*9-hHS5 (SEQ ID NO:182)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGLTLVTSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGLTLVTSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMNLSKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMNLSKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGSGRSAPLGLARQARQVGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRRTTYADSVKGRFTISRDTGANTLYLQMNLSRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSS
CD16F1-L1-hHS5-L4-hA09-10-3-L3-hA09-10-4-L1-H33-14-L3-H33-14 (3321-HS5-GS15) (SEQ ID NO:183)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMNLSKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRRTTYADSVKGRFTISRDTGANTLYLQMNLSRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNFKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGLTLVTSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGLTLVTSS
CD16F1-L1-hHS5-L1-hA09-10-3-L3-hA09-10-4-L1-hPL16-L3-hPL16 (1518-HS5-GS15) (SEQ ID NO:184)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMNLSKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRRTTYADSVKGRFTISRDTGANTLYLQMNLSRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNFKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hCD16F1-1-L1-hHS5-L4-hA09-10-45-L1-hPL16-L3-hPL16 (SEQ ID NO:185)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMSLEPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRRTTYADSVKGRFTISRDTGANTLYLQMNLSRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVRPGLSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNFKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGVVRPGLSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS

hCD16F1-2-L1-hHS5-L4-hA09-10-45- L1-hPL16-L3-hPL-16 (SEQ ID NO:186)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVS AITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNARAVYLMQSSSLRAEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVRPGLSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNFKNTVYLQMSSSLRAEDTAVYYCAAHYLLLPSTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGVVRPGLSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNFKNTTLYQMSSSLRAEDTAVYYCAAHYLLLPSTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hCD16F1-1-L1-hHS5-L4-hA09-10-55-L1-hPL16-L3-hPL16 (SEQ ID NO:187)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS AITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNARAVYLMQSSLEPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVRPGLSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLLPSTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hCD16F1-2-L1-hHS5-L4-hA09-10-55-L1-hPL16-L3-hP1-16 (SEQ ID NO:188)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS AITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNARAVYLMQSSSLRAEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVRPGLSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLLPSTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGVVRPGLSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLLPSTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hCD16F1-1-L1-hHS5-L4-hA09-10-66- L1-hPL16-L3-hPL-16 (SEQ ID NO:189)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS AITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNARAVYLMQSSLPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSSLRAEDTAVYYCAAHYLLLPSTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hCD16F1-2-L1-hHS5-L4-hA09-10-66- L1-hPL16-L3-hPL-16 (SEQ ID NO:190)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS AITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNARAVYLMQSSSLRAEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSSLRAEDTAVYYCAAHYLLLPSTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hCD16F1-1-L1-hHS5-L4-hA09-10-77- L1-hPL16-L3-hPL-16 (SEQ ID NO:191)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS AITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNARAVYLMQSSLEPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLPEDTAVYYCAAHYLLLPSTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLPEDTAVYYCAAHYLLLPSTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS

hCD16F1-2-L1-hHS5-L4-hA09-10-77- L1-hPL16-L3-hPL-16 (SEQ ID NO:192)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS AITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNARAVY LQMSSLRAEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIIDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSLKPEDTAVYYCAAHYLLLP SYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIIDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSLKPEDTAVYYCAAHYLLLP SYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hCD16F1-1-L1-hHS5-L4-hA09-10-88- L1-hPL16-L3-hPL-16 (SEQ ID NO: 193)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS AITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNARAVY LQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIIDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSLKPEDTAVYYCAAHYLLLP SYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hCD16F1-2-L1-hHS5-L4-hA09-10-88- L1-hPL16-L3-hPL-16 (SEQ ID NO: 194)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS AITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNARAVY LQMNSLRAEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIIDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSLKPEDTAVYYCAAHYLLLP SYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIIDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSLKPEDTAVYYCAAHYLLLP SYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hCD16F1-1-L1-hHS5-L4-hA09-10-99- L1-hPL16-L3-hPL-16 (SEQ ID NO:195)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS AITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNARAVY LQMNSLEPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIIDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSLKPEDTAVYYCAAHYLLLP SYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIIDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSLKPEDTAVYYCAAHYLLLP SYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hCD16F1-2-L1-hHS5-L4-hA09-10-99- L1-hPL16-L3-hPL-16 (SEQ ID NO:196)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS AITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNARAVY LQMNSLRAEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIIDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSLKPEDTAVYYCAAHYLLLP SYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIIDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSLKPEDTAVYYCAAHYLLLP SYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hCD16F1-1-L1-hHS5-L4-hA09-10-100- L1-hPL16-L3-hPL-16 (SEQ ID NO:197)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS AITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNARAVY LQMNSLEPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIIDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLLP SYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIIDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLLP SYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS

hCD16F1-2-L1-hHS5-L4-hA09-10-100-L1-hPL16-L3-hPL-16 (SEQ ID NO:198)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS AITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNARAVYVLMNSLRAEDTAVYYCNVLYNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRFTSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAHYLLLP SYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRFTSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAHYLLLP SYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
CD16F1-L1-hHS5-L4-hA09-10-3-L3-hA09-10-L1-H33-14-L3-H33-14 (3321-HS5-GS15) (SEQ ID NO:199)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWVRQAPGKQRELVA AITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNARAVYVLMNSLPEDTAVYYCNVLYNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVRP GGSRLSCAASGGGRFTSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAHYLLLP SYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWVRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWVRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSS
hCD16F1-1-L1-hHS5-L4-hA09-10-3-L3-hA09-10-4-L1-H33-14-L3-H33-14 (SEQ ID NO:200)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS AITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNARAVYVLMSSLEPEDTAVYYCNVLYNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVRP GGSRLSCAASGGGRFTSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAHYLLLP SYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRFTSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAHYLLLP SYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWVRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWVRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSS
hCD16F1-2-L1-hHS5-L4-hA09-10-3-L3-hA09-10-4-L1-H33-14-L3-H33-14 (SEQ ID NO:201)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS AITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNARAVYVLMSSLEPEDTAVYYCNVLYNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRFTSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAHYLLLP SYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRFTSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAHYLLLP SYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWVRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWVRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSS
hCD16F1-1-L1-hHS5-L4-hA09-10-45- L1-H33-14-L3-H33-14 (SEQ ID NO:202)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS AITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNARAVYVLMSSLEPEDTAVYYCNVLYNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVRP GGSRLSCAASGGGRFTSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAHYLLLP SYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGVVRP GGSRLSCAASGGGRFTSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAHYLLLP SYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWVRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWVRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSS
hCD16F1-2-L1-hHS5-L4-hA09-10-45- L1-H33-14-L3-H33-14 (SEQ ID NO:203)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS AITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNARAVYVLMSSLEPEDTAVYYCNVLYNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVRP GGSRLSCAASGGGRFTSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAHYLLLP SYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGVVRP GGSRLSCAASGGGRFTSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAHYLLLP SYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWVRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWVRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSS

hCD16F1-1-L1-hHS5-L4-hA09-10-55-L1-H33-14-L3-H33-14 (SEQ ID NO:204)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS AITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNARAVYVLMSSLEPEDTAVYYCNVLYNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRITTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVRP GGSRLRLSCAASGGGRFTSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLLPSTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGVVRP GGSRLRLSCAASGGGRFTSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLLPSTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLMSSLAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLMSSLAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSS
hCD16F1-2-L1-hHS5-L4-hA09-10-55-L1-H33-14-L3-H33-14 (SEQ ID NO:205)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS AITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNARAVYVLMSSLAEDTAVYYCNVLYNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRITTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVRP GGSRLRLSCAASGGGRFTSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLLPSTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLMSSLAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLMSSLAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSS
hCD16F1-1-L1-hHS5-L4-hA09-10-77-L1-H33-14-L3-H33-14 (SEQ ID NO:206)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS AITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNARAVYVLMSSLEPEDTAVYYCNVLYNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRITTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRFTSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLLPSTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRFTSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLLPSTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLMSSLAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLMSSLAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSS
hCD16F1-2-L1-hHS5-L4-hA09-10-77-L1-H33-14-L3-H33-14 (SEQ ID NO:207)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS AITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNARAVYVLMSSLAEDTAVYYCNVLYNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRITTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRFTSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLLPSTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLMSSLAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLMSSLAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSS
hCD16F1-1-L1-hHS5-L1-hA09-10-66-L1-H33-14-L3-H33-14 (SEQ ID NO:208)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS AITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNARAVYVLMSSLEPEDTAVYYCNVLYNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRITTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRFTSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLLPSTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRFTSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDN AKNTVYLMSSLAEDTAVYYCAAHYLLLPSTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLMSSLAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLMSSLAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSS
hCD16F1-2-L1-hHS5-L4-hA09-10-66-L1-H33-14-L3-H33-14 (SEQ ID NO:209)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS AITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNARAVYVLMSSLAEDTAVYYCNVLYNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRITTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRFTSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLLPSTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRFTSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDN AKNTVYLMSSLAEDTAVYYCAAHYLLLPSTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLMSSLAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLMSSLAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSS

hCD16F1-1-L1-hHS5-L4-hA09-10-88-L1-H33-14-L3-H33-14 (SEQ ID NO:210)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVSAITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNARAVYVLMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESAGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRITTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRFTSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRFTSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSS
hCD16F1-2-L1-hHS5-L4-hA09-10-88-L1-H33-14-L3-H33-14 (SEQ ID NO:211)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVSAITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNARAVYVLMNSLRAEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESAGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRITTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRFTSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSS
hCD16F1-1-L1-hHS5-L4-hA09-10-99-L1-H33-14-L3-H33-14 (SEQ ID NO:212)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVSAITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNARAVYVLMNSLEPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESAGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRITTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRFTSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRFTSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSS
hCD16F1-2-L1-hHS5-L4-hA09-10-99-L1-H33-14-L3-H33-14 (SEQ ID NO:213)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVSAITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNARAVYVLMNSLRAEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESAGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRITTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRFTSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSS
hCD16F1-1-L1-hHS5-L4-hA09-10-100-L1-H33-14-L3-H33-14 (SEQ ID NO:214)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVSAITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNARAVYVLMNSLEPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESAGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRITTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRFTSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSS
hCD16F1-2-L1-hHS5-L4-hA09-10-100-L1-H33-14-L3-H33-14 (SEQ ID NO:215)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVSAITSGVRTYYADSVKGRFTISRDNARAVYVLMNSLRAEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESAGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRITTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRFTSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSS

CD16F1-L1-hHS10-L4-hA09-10-3-L3-hA09-10-4-L1-H33-14-L3-H33-14 (3321-GS15) (SEQ ID NO:216)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNARAVYVLMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTDSAYRMGWFRQAPGKEREFVSAINWSDGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADPDSRLYYTVPQNYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSS
CD16F1-L1-hHS10-L4-hA09-10-3-L3-hA09-10-4-L1-hPL16-L3-hPL16 (1518-GS15) (SEQ ID NO:217)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNARAVYVLMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTDSAYRMGWFRQAPGKEREFVSAINWSDGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADPDSRLYYTVPQNYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS

- [0353] 다중-특이성 분자의 Octet[®] 결합 분석은 실시예 8에서와 같이 수행되었고 그 결과는 도 17 및 도 18에 나타내었다.
- [0354] 예시 9. 알츠하이머병 및 망막 질환 치료를 위한 항-CD33 도메인을 포함하는 MVSCA
- [0355] 표 18은 항-CD33 VHH^{*}를 포함하는 MVSCA를 보여준다.

표 18

hHS5-L1-H33-14-L3-H33-14 ^{**} (SEQ ID NO:218)	EVQLLESAGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSHHHHHHH
FC5-L1-H33-14-L3-H33-14 (SEQ ID NO:219)	EVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFRQAPGKEREFVSRI TWGGDNTFYNSVSKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTADYYCAAGSTSTATPLRVGYWGKGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSS
FC5-L1-H33-14-L3-H33-14-L1-hHS5 (SEQ ID NO:220)	EVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFRQAPGKEREFVSRI TWGGDNTFYNSVSKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTADYYCAAGSTSTATPLRVGYWGKGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLLESAGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSS
H33-14-L3-H3314 (SEQ ID NO:221)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSS

- [0357] * VHH 도메인 사이에 삽입된 링커 서열은 밑줄이 그어져 있다.
- [0358] ** 이 시퀀스는 선택적 C-말단 His-tag와 함께 표시된다.
- [0359] 표 18의 4개의 MVSCA 각각은 링커 L3(서열 AAA; 서열번호 102)에 의해 연결된 한 쌍의 항-CD33 도메인을 함유한다. 첫 번째 항목은 표 18에 있으며, hHS5-L1-H33-14-L3-H33-14는 체내 반감기를 증가시키는 N-말단 항-HSA 도메인을 포함한다. 표 18의 두 번째 항목인 FC5-L1-H33-14-L3-H33-14는 혈뇌 장벽 통과를 촉진하기 위해 N-말단

FC5 나노바디 도메인을 포함한다. 표 18의 세 번째 항목인 FC5-L1-H33-14-L3-H33-14-L1-hHS5는 혈액-뇌 장벽을 쉽게 통과할 수 있도록 N-말단 FC5 나노바디 도메인과 C-말단 항-HSA 도메인은 체내 반감기를 증가시킨다. 이 세 가지 형식은 일반적으로 정맥내 또는 피하 주사 또는 주입과 같은 전신 투여에 적합하다. 표 18의 네 번째 항목인 H33-14-L3-H3314는 CD33에 대해서만 특이성을 갖는 2가, 단일특이성 MVSCA이다. 크기가 작기 때문에 뇌나 눈에 국소 주사하기에 더 적합하다.

[0360] FC5 나노바디 도메인의 아미노산 서열은 다음과 같다:

[0361] EVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFRRQAPGKEREFVSRITWGDNTFYNSVSKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTADYYCAAGSTSTATPLRVQDYWGKGTQTVSS(서열번호 222).

[0362] 예시 10. 다중 시퀀스 정렬

[0363] 도. 21-26은 Clustal O(1.2.4)에 의한, 각각의 특이성에 대한 본원에 개시된 VHH 서열의 다중 서열 정렬을 제시하여, 동일하고, 보존되고, 고도로 가변적인 위치를 쉽게 볼 수 있게 한다. 정렬의 각 위치 아래에는 기호가 있습니다. 별표는 동일성을 표시하고 콜론은 더 높은 보존 정도를 나타내고 마침표는 낮은 보존 정도를 나타내고 공백은 정렬된 시퀀스에서 일반적으로 보존이 없음을 나타낸다.

[0364] 달리 명시되지 않는 한, 명세서 및 청구범위에 사용된 성분의 양, 분자량과 같은 특성, 반응 조건 등을 나타내는 모든 숫자는 모든 경우에 "약"이라는 용어에 의해 수정되는 것으로 이해되어야 한다. 본원에 사용된 용어 "약" 및 "대략"은 10 내지 15% 이내, 바람직하게는 5 내지 10% 이내를 의미한다. 따라서, 달리 표시되지 않는 한, 명세서 및 첨부된 청구범위에 기재된 수치 매개변수는 본 발명에 의해 얻고자 하는 원하는 특성에 따라 달라질 수 있는 근사치이다. 최소한 청구 범위에 대한 등가 원칙의 적용을 제한하려는 시도가 아니라 각 수치 매개변수는 적어도 보고된 유효 자릿수의 관점에서 그리고 일반적인 반올림 기술을 적용하여 해석되어야 한다. 본 발명의 넓은 범위를 설명하는 수치 범위 및 매개변수가 근사치임에도 불구하고, 특정 실시예에 설명된 수치 값은 가능한 한 정확하게 보고된다. 그러나 모든 수치에는 본질적으로 각각의 테스트 측정에서 발견된 표준 편차에서 필연적으로 발생하는 특정 오류가 포함되어 있다.

[0365] 본 발명을 설명하는 맥락에서(특히 다음 청구범위의 맥락에서) 사용된 용어 "a", "an", "the" 및 유사한 지시 대상은 본 명세서에 달리 나타내거나 문맥상 명백히 모순되지 않는 한 단수 및 복수를 모두 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 여기에서 값의 범위를 언급하는 것은 범위 내에 속하는 각각의 개별 값을 개별적으로 참조하는 속기 방법으로서 역할을 할 뿐이다. 본 명세서에 달리 표시되지 않는 한, 각각의 개별 값은 본 명세서에 개별적으로 인용된 것처럼 명세서에 포함된다. 여기에 설명된 모든 방법은 여기에 달리 표시되지 않거나 문맥상 명백히 모순되지 않는 한 임의의 적절한 순서로 수행될 수 있다. 여기에 제공된 모든 예 또는 예시적인 언어(예: "~와 같은")의 사용은 단지 본 발명을 더 잘 설명하기 위한 것이며 달리 청구된 본 발명의 범위를 제한하지 않는다. 명세서의 어떤 언어도 본 발명의 실행에 필수적인 청구되지 않은 요소를 나타내는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0366] 본 명세서에 개시된 본 발명의 대안적인 요소 또는 실시예의 그룹화는 제한으로 해석되어서는 안 된다. 각 그룹 구성원은 개별적으로 또는 그룹의 다른 구성원 또는 여기에 있는 다른 요소와 조합하여 참조 및 청구될 수 있다. 그룹의 한 명 이상의 구성원이 편의 및/또는 특허성을 이유로 그룹에 포함되거나 그룹에서 삭제될 수 있다. 그러한 포함 또는 삭제가 발생하면 명세서는 수정된 그룹을 포함하는 것으로 간주되어 첨부된 청구범위에 사용된 모든 Markush 그룹의 서면 설명을 충족한다.

[0367] 본 발명을 수행하기 위해 본 발명자들에게 알려진 최상의 모드를 포함하여 본 발명의 특정 실시예가 여기에 설명되어 있다. 물론, 이들 설명된 실시예에 대한 변형은 전술한 설명을 읽을 때 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명자는 숙련된 기술자가 그러한 변형을 적절하게 사용하기를 기대하며, 본 발명자는 본 명세서에 구체적으로 기술된 것과는 다르게 본 발명이 실시되기를 의도한다. 따라서, 본 발명은 적용 가능한 법률이 허용하는 바에 따라 여기에 첨부된 청구범위에 인용된 주제의 모든 수정 및 등가물을 포함합니다. 또한, 본 명세서에서 달리 나타내지 않거나 문맥상 명백히 모순되지 않는 한, 모든 가능한 변형에서 전술한 요소의 임의의 조합은 본 발명에 포함된다.

[0368] 본원에 개시된 특정 실시예는 언어로 구성되거나 본질적으로 구성됨을 사용하는 청구범위에서 추가로 제한될 수 있다. 청구 범위에서 사용될 때, 출원 또는 수정에 따라 추가되었는지 여부에 관계없이 전환 용어 "구성"은 청구 범위에 명시되지 않은 요소, 단계 또는 성분을 배제한다. "본질적으로 구성되는"이라는 전환 용어는 청구 범위를 지정된 재료 또는 단계와 기본적으로 새로운 특성에 실질적으로 영향을 미치지 않는 단계로 제한한다. 그

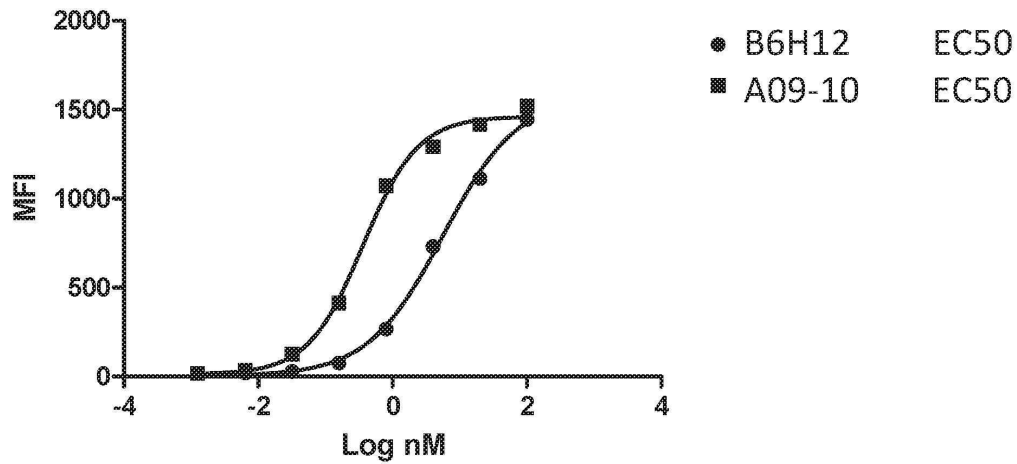
렇게 청구된 본 발명의 실시예는 본 명세서에서 본질적으로 또는 명시적으로 설명되고 가능하다.

[0369] 또한, 본 명세서 전반에 걸쳐 특허 및 인쇄된 간행물에 대한 수많은 참조가 이루어졌다. 상기 인용된 참고 문헌 및 인쇄된 출판물 각각은 그 전체가 참고 문헌으로 여기에 개별적으로 포함된다.

[0370] 끝으로, 여기에 개시된 본 발명의 실시예는 본 발명의 원리를 예시하는 것임을 이해해야 한다. 채용될 수 있는 다른 변형은 본 발명의 범위 내에 있다. 따라서, 제한이 아닌 예로서, 본 발명의 대안적인 구성이 본 명세서의 교시에 따라 이용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 정확히 도시되고 설명된 것으로 제한되지 않는다.

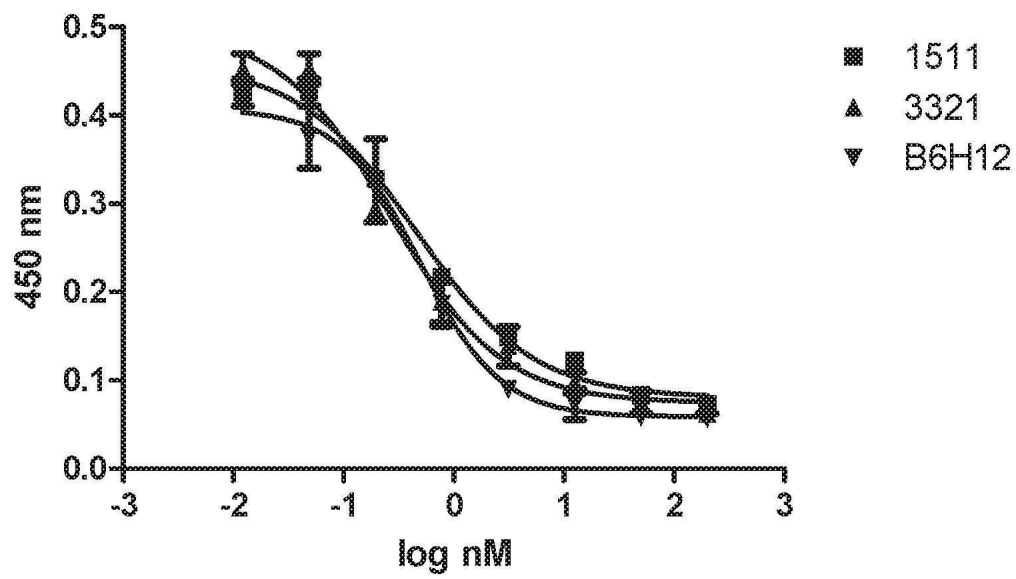
도면

도면1



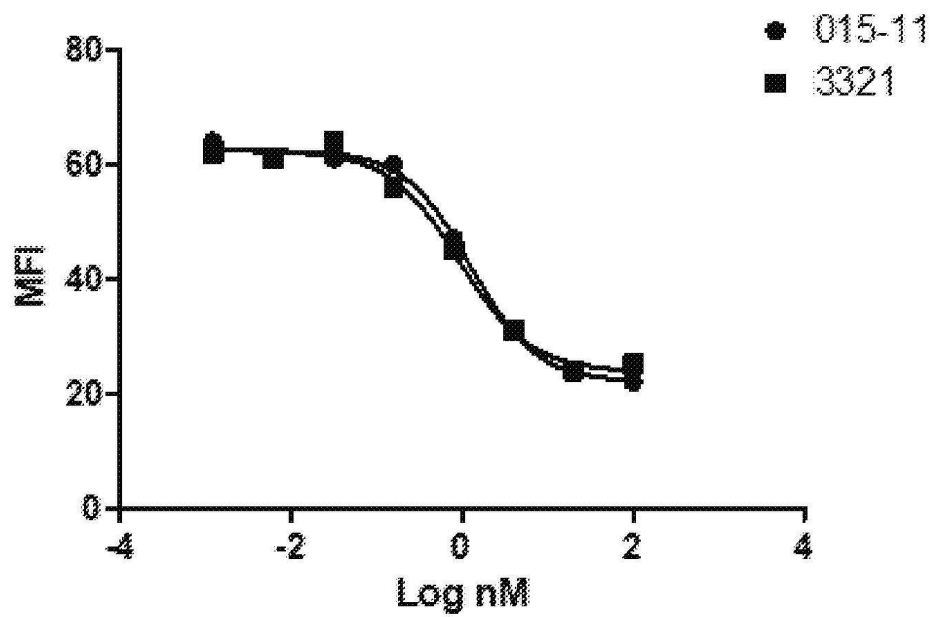
	B6H12	A09
가장 적합한 값		
logECF	0.7478	-0.4402
HillSlope	0.7792	1.063
F	= 50.00	= 50.00
Bottom	2.834	13.05
Top	1579	1462
ECF	5.594	0.3629

도면2



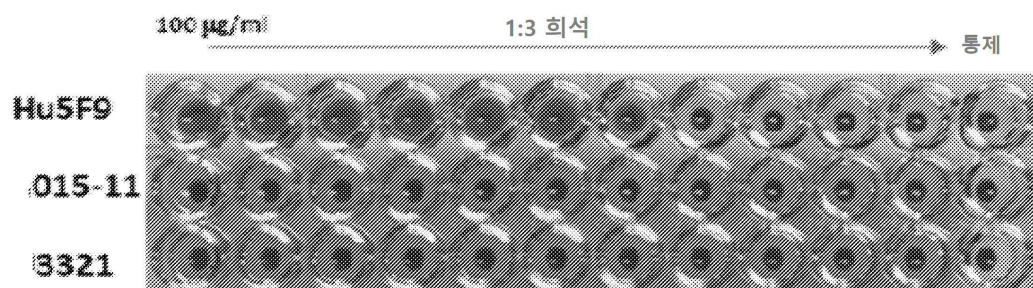
	1511	3321	B6H12
가장 적합한 값			
logECF	-0.3444	-0.5735	-0.3016
HillSlope	-0.8184	-0.8636	-1.192
F	= 50.00	= 50.00	= 50.00
Bottom	0.08027	0.07427	0.05844
Top	0.4579	0.4979	0.4070
ECF	0.4525	0.2670	0.4993

도면3

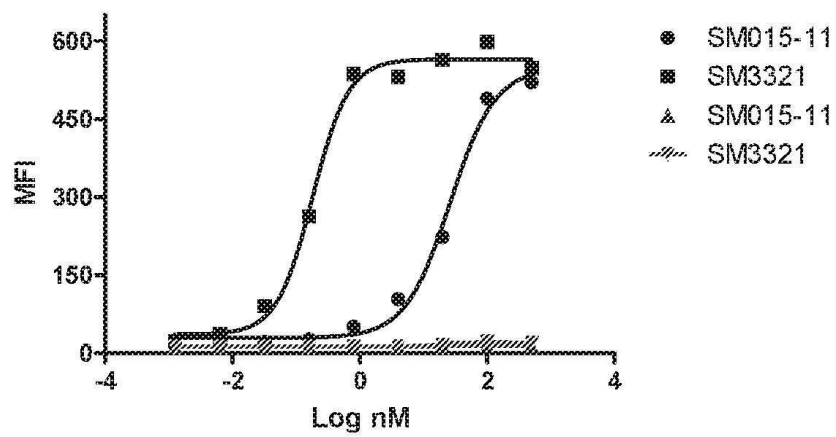


	015-11	3321
가장 적합한 값		
logECF	0.1071	-0.02913
HillSlope	-1.127	-1.054
F	= 50.00	= 50.00
Bottom	22.01	23.80
Top	62.49	62.45
ECF	1.280	0.9351

도면4a

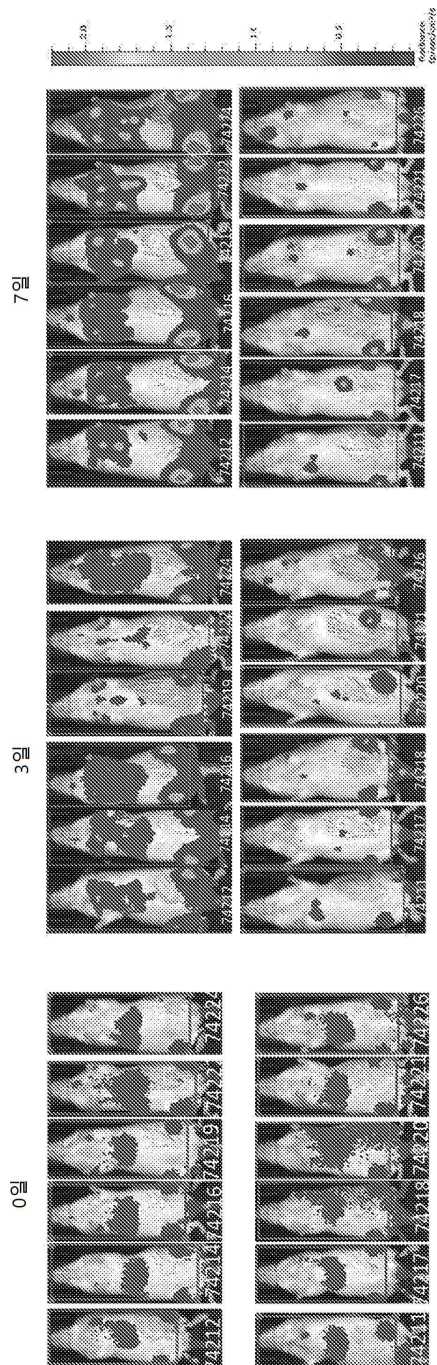


도면4b

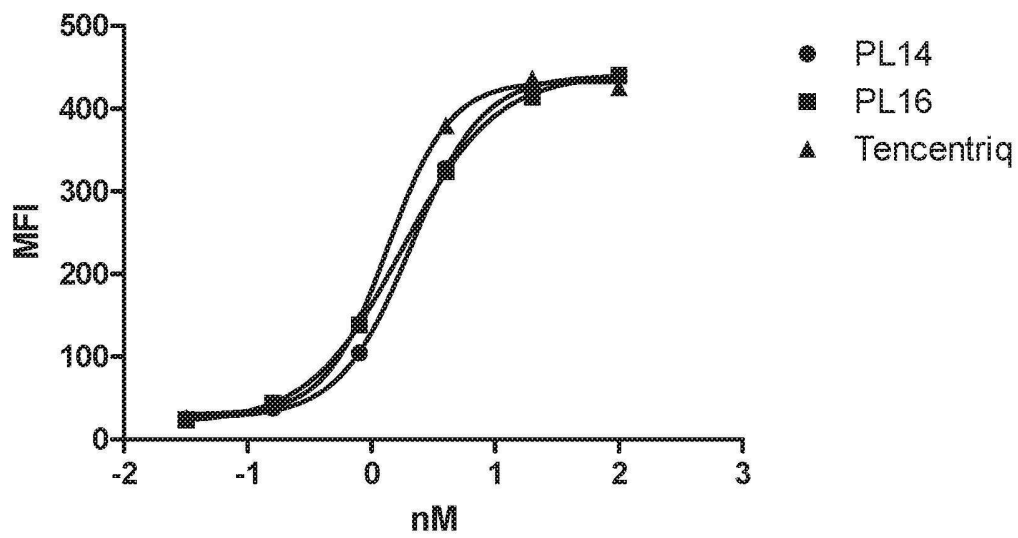


	SM015-11 HL60	SM3321 HL60
logECF	1.418	-0.7389
HillSlope	1.232	1.542
F	= 50.00	= 50.00
Bottom	28.92	35.50
Top	548.1	564.9
ECF	26.19	0.1824
Span	519.1	529.4

도면5

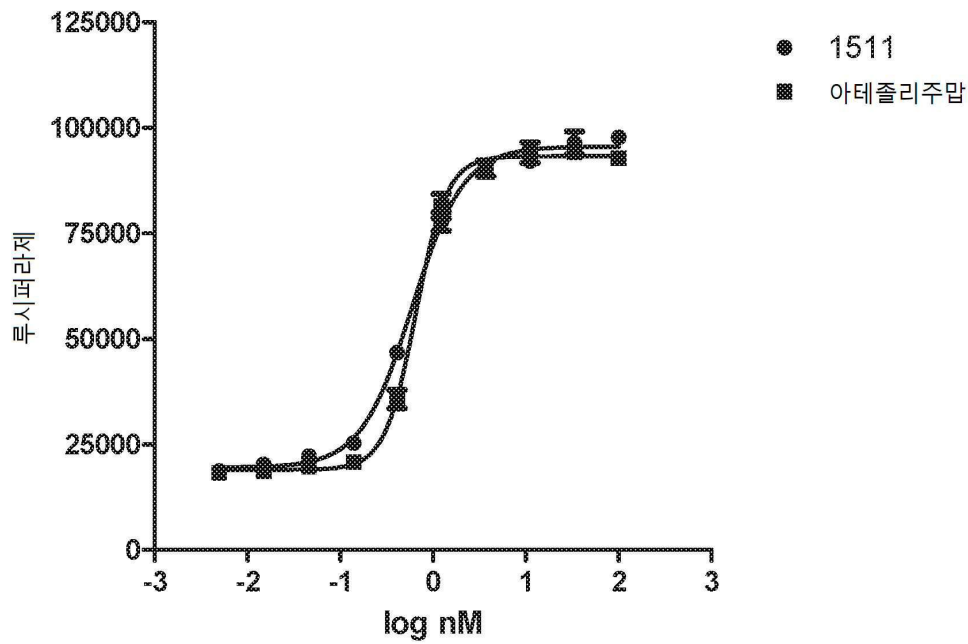


도면6



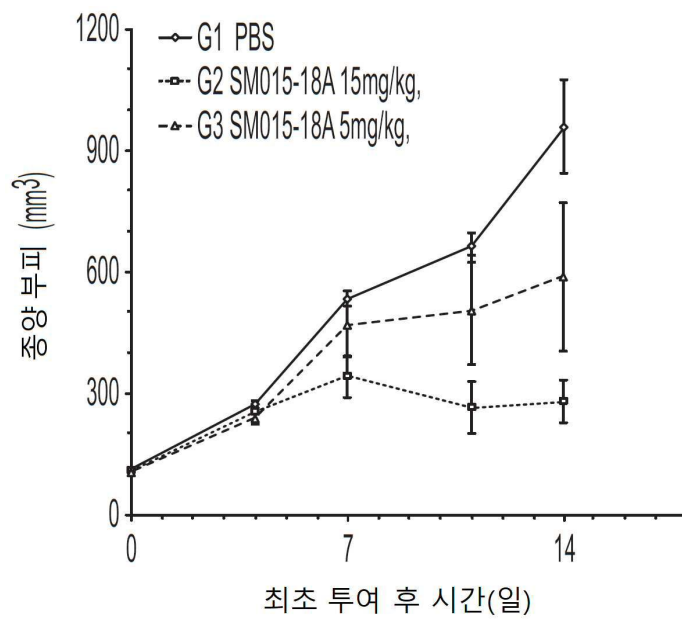
	PL14	PL16	Tencentriq
가장 적합한 값			
logECF	0.3193	0.2509	0.1314
HillSlope	1.502	1.159	1.736
F	= 50.00	= 50.00	= 50.00
Bottom	26.18	19.66	30.15
Top	440.2	441.8	433.0
ECF	2.086	1.782	1.353

도면7

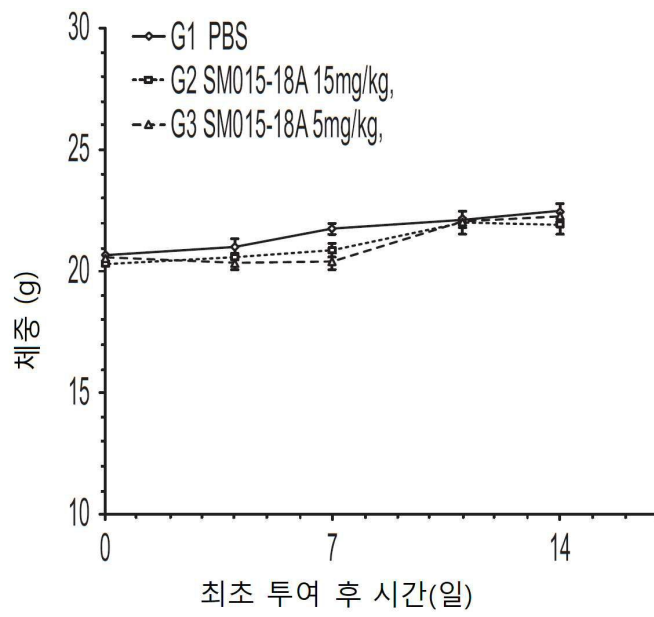


	1511	아테졸리주맙
가장 적합한 값		
logECF	-0.2238	-0.1834
HillSlope	1.570	2.592
F	= 50.00	= 50.00
Bottom	19532	18999
Top	95535	93272
ECF	0.5973	0.6555

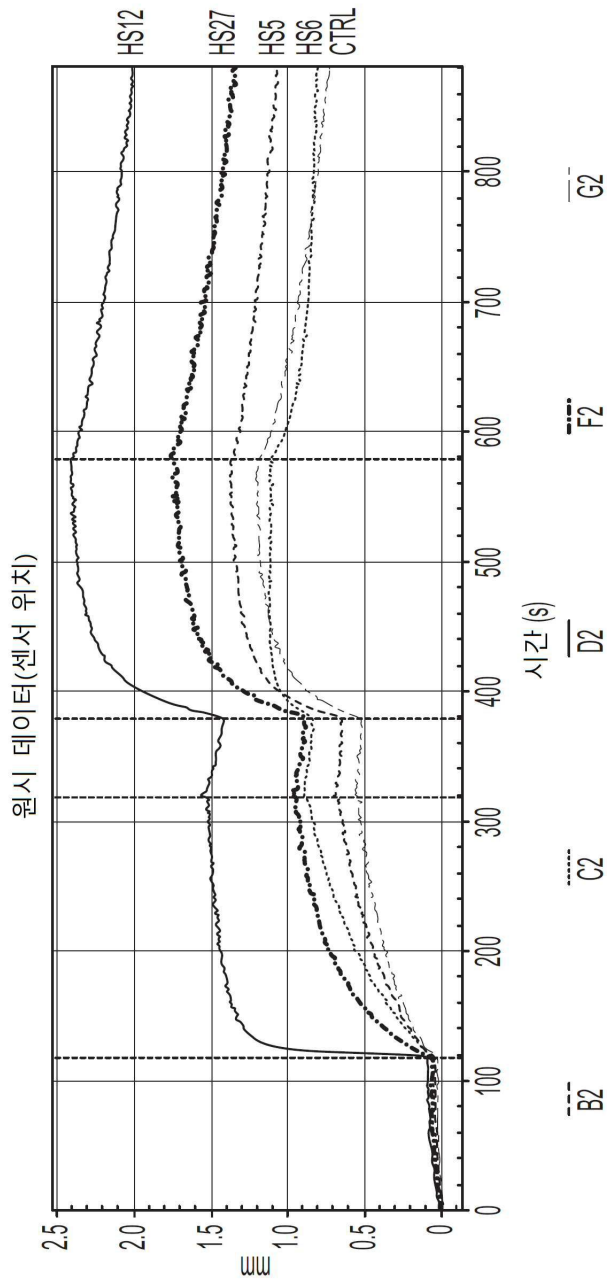
도면8a



도면 8b

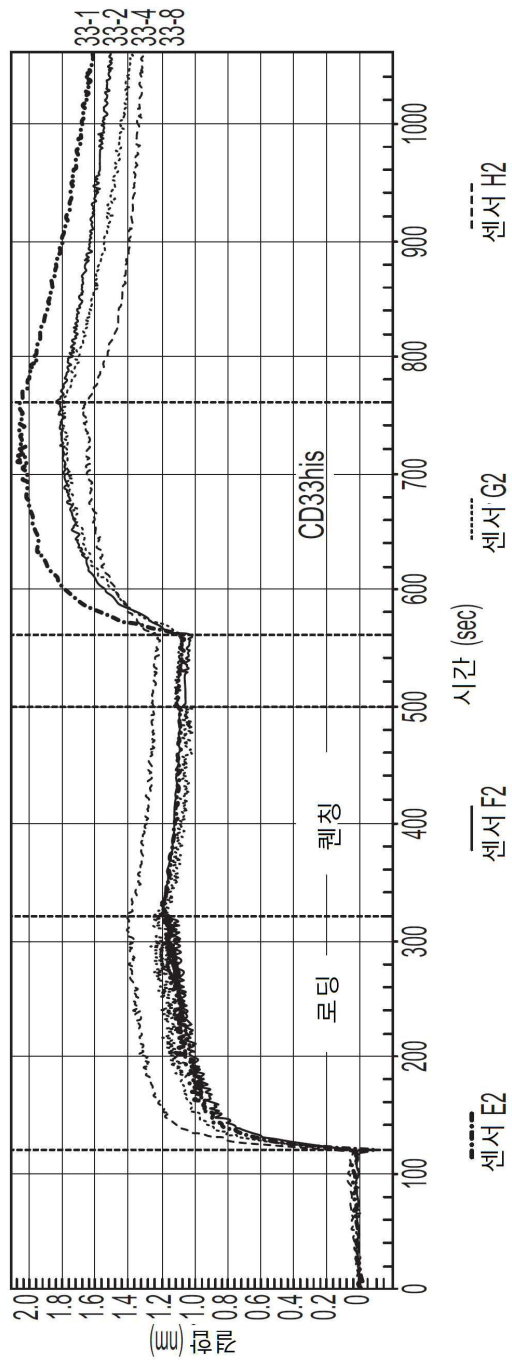


도면9

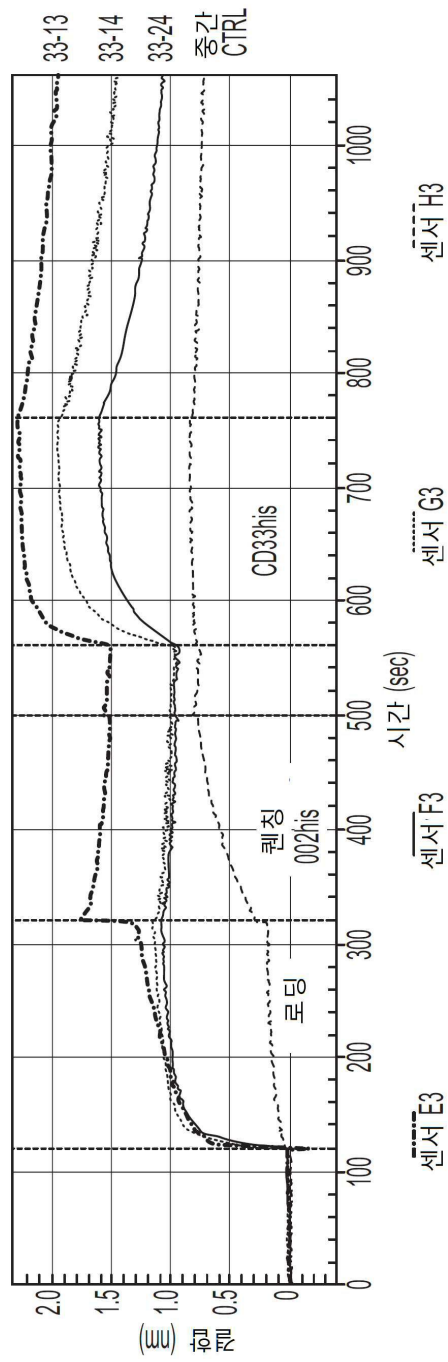


	로딩	시험	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
B	HS5	100mM HSA	9.46E-10	8.09E+05	7.65E-04
C	HS6		4.98E-10	1.67E+06	8.29E-04
D	HS12		5.68E-10	1.03E+06	5.83E-04
F	HS27		1.14E-09	7.61E+05	8.65E-04
G	CTRL ALB 2ug/ml		2.30E-09	6.78E+05	1.56E-03

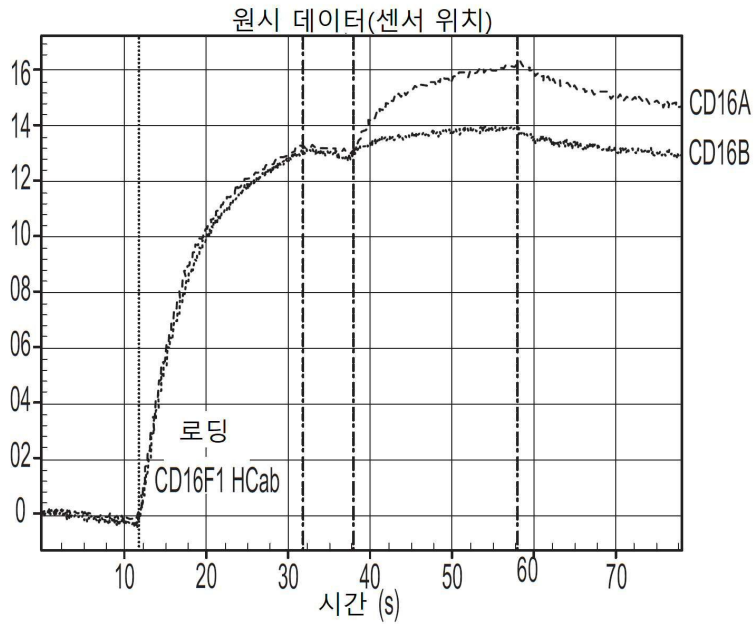
도면10a



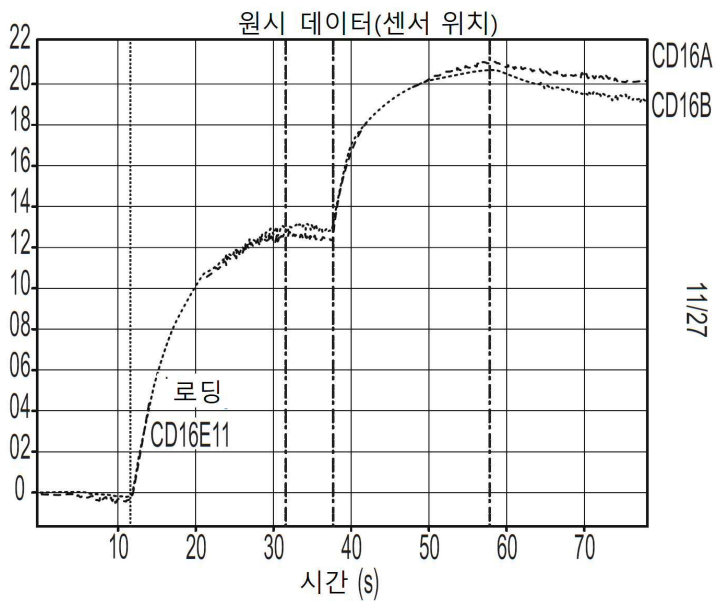
도면10b



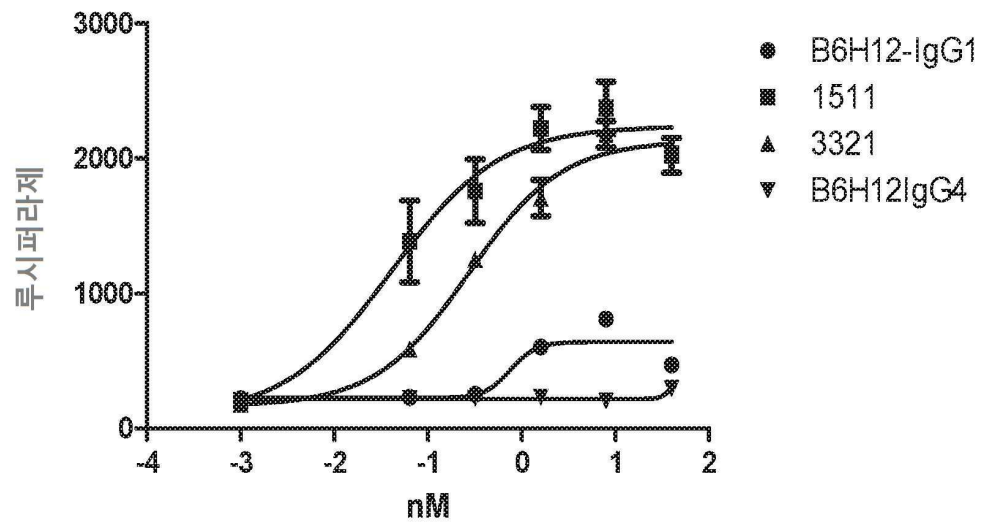
도면11a



도면11b

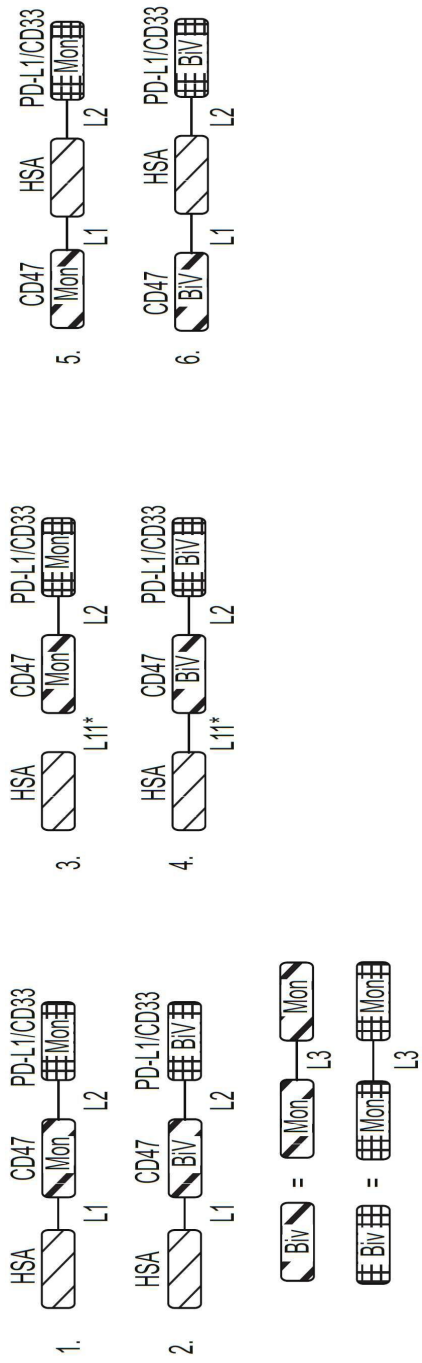


도면12

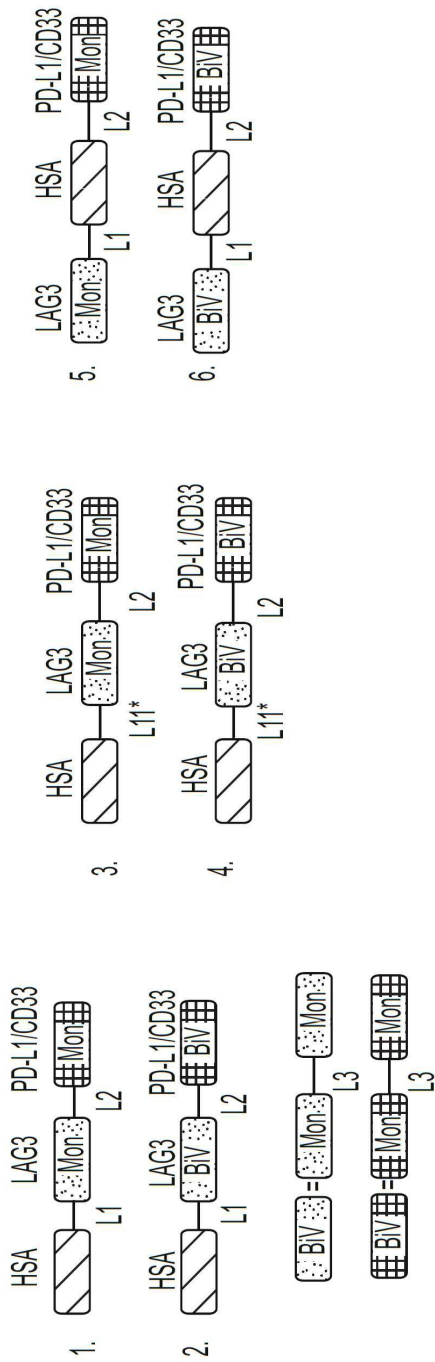


	B6H12-IgG1	1511	3321	B6H12IgG4
가장 적합한 값				
logECF	-0.1186	-1.387	-0.5654	~ 1.582
HillSlope	3.181	0.7676	0.8801	~ 8.947
F	= 50.00	= 50.00	= 50.00	= 50.00
Bottom	226.6	94.56	166.5	219.6
Top	641.0	2239	2131	~ 349.5
ECF	0.7611	0.04097	0.2720	~ 38.16

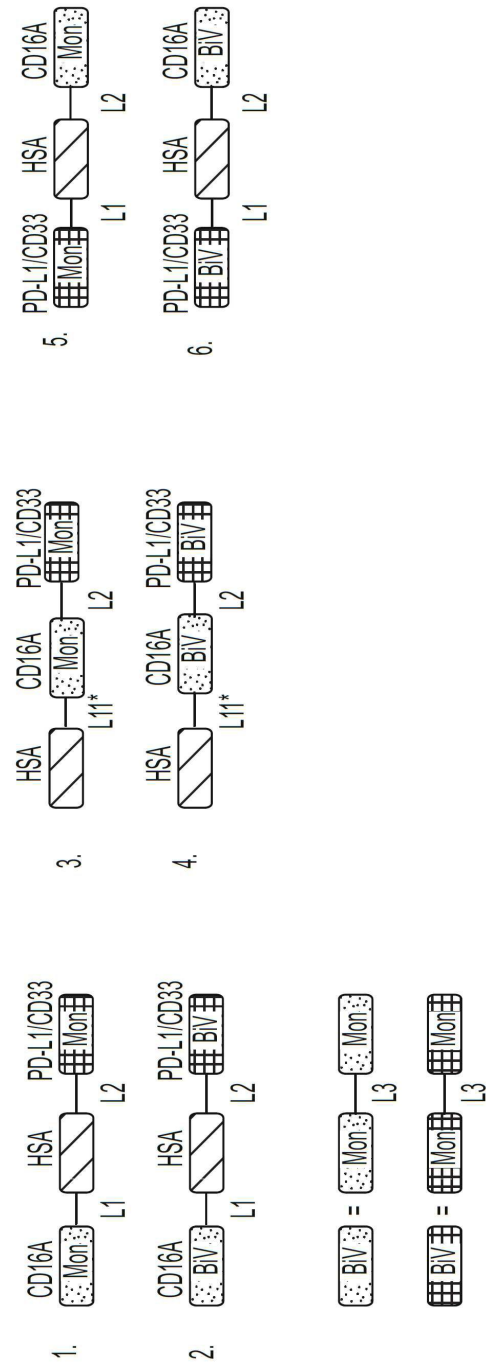
도면13a



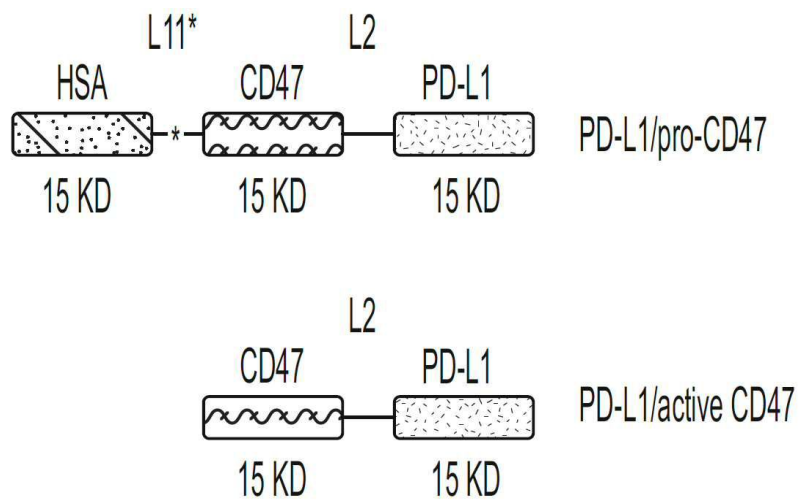
도면13b



도면13c



도면14a



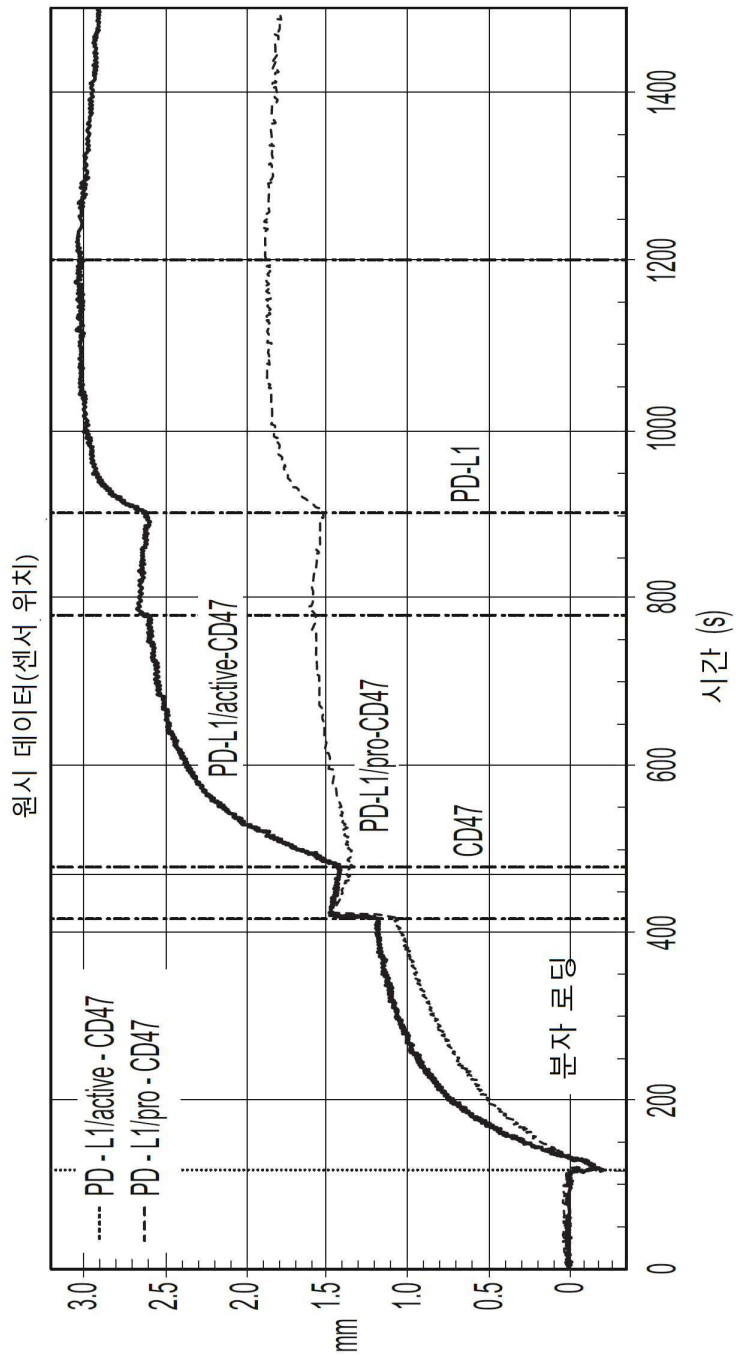
도면14b



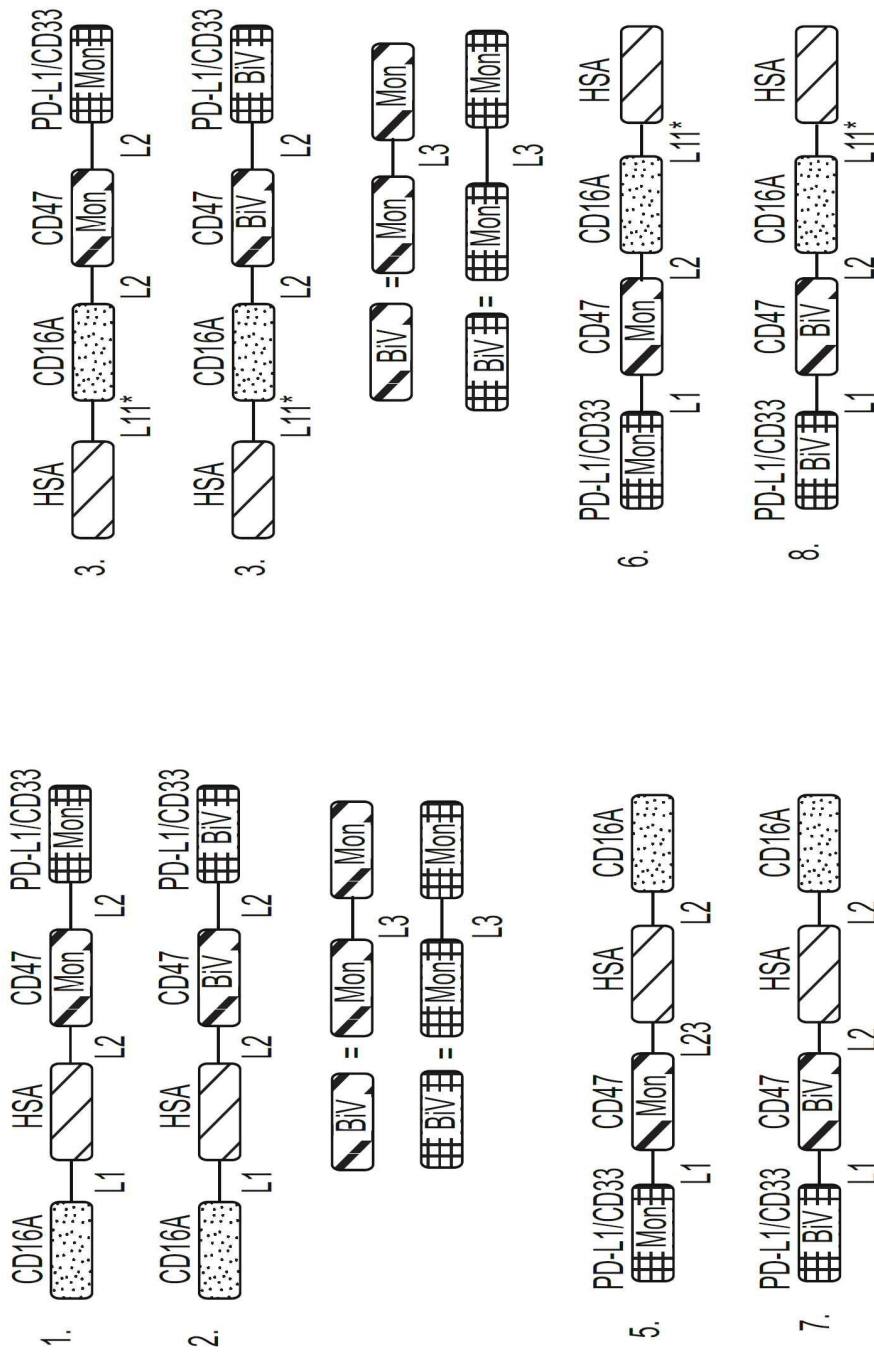
1. 대조군, 2.1X, 3. 2X, 4. 5X

용량-의존적 활성화

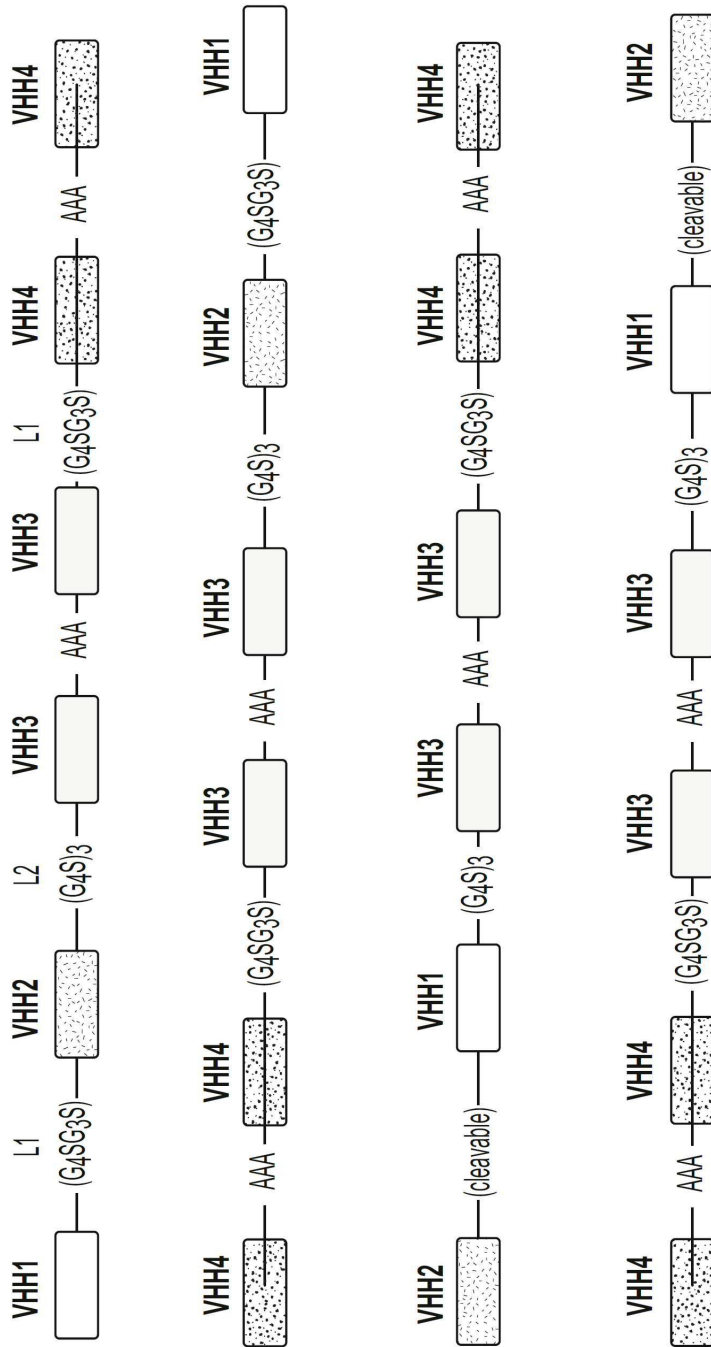
도면15



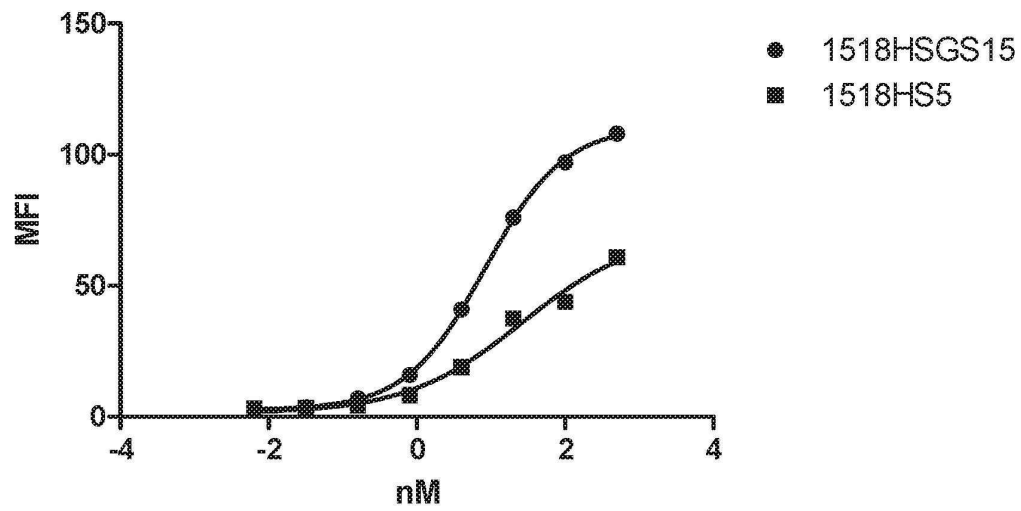
도면16



도면17

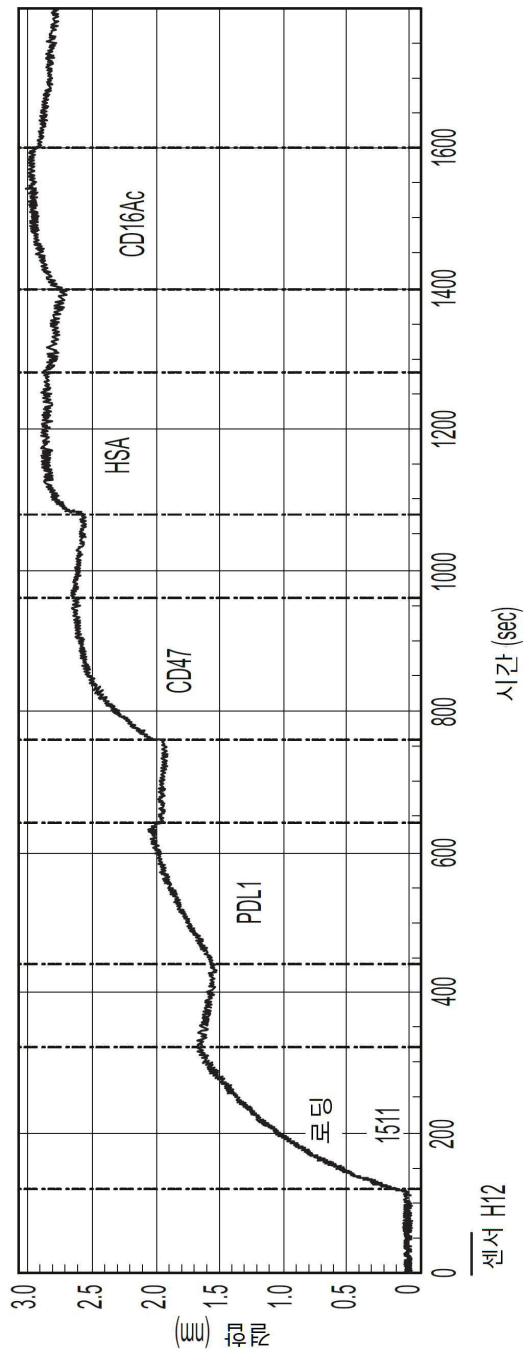


도면18

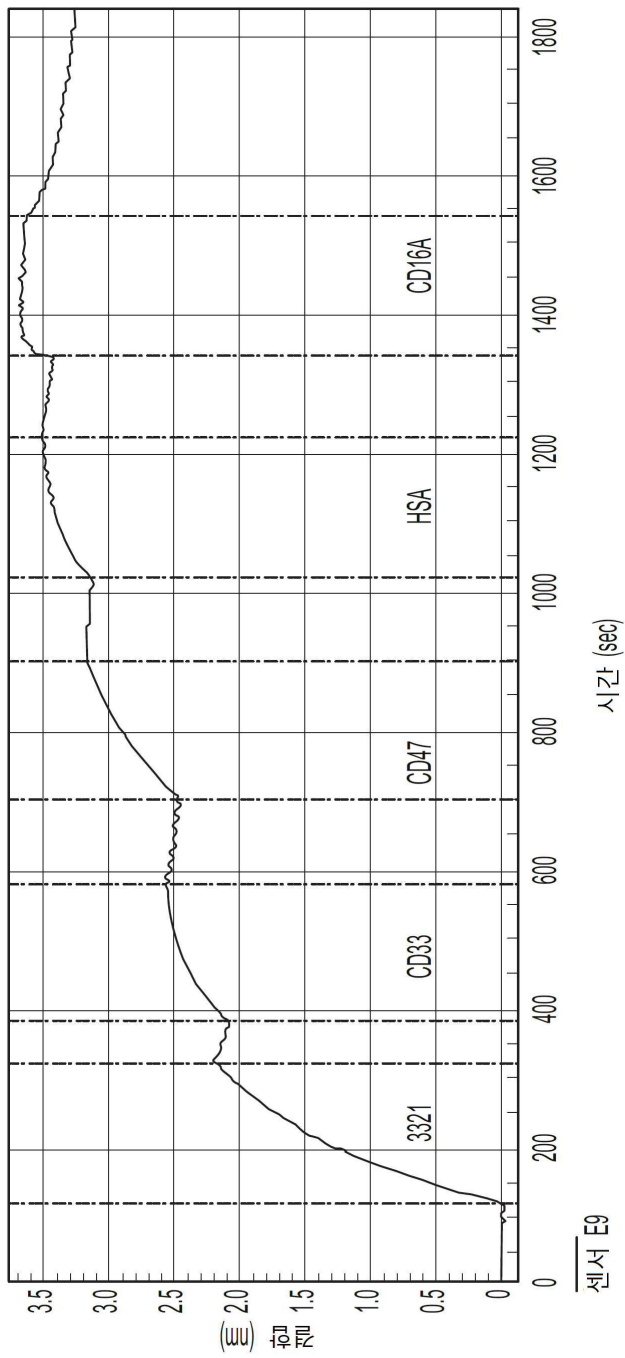


	1518HS5GS15	1518HS5
가장 적합한 값		
logECF	0.9226	1.415
HillSlope	0.8186	0.5561
F	= 50.00	= 50.00
Bottom	2.724	1.393
Top	110.9	70.47
ECF	8.367	26.00

도면19



도면20



도면21

```

A09-10      QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNI 60
A09-006     QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASG--IRFFGSALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNI 58
A09-004     QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASG--GVMWSSALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNI 58
A09-08      QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASG--YGVNSYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNI 58
A09-31      QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASG--YGVNSYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNI 58
A09-61      QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASG--YGVNSYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNI 58
            ***** . . *****

A09-10      NYADSAKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYNWG 120
A09-006     NYADSAKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYNWG 118
A09-004     NYADSAKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYNWG 118
A09-08      NYADSAKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYNWG 118
A09-31      NYADSAKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYIATAIKMNYNWG 118
A09-61      NYADSAKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISFASKMNYNWG 118
            *****: ; :*****

A09-10      QGTQVTVSS 129      SEQ ID NO:7
A09-006     QGTQVTVSS 127      SEQ ID NO:6
A09-004     QGTQVTVSS 127      SEQ ID NO:5
A09-08      QGTQVTVSS 127      SEQ ID NO:2
A09-31      QGTQVTVSS 127      SEQ ID NO:3
A09-61      QGTQVTVSS 127      SEQ ID NO:4
            *****

```

도면22

```

PL2      QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGLTSLRYTMAWFRQAPGKEREFVAAIIRNSVSTFH 60
PL14     EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTSGIYDMGWYRQAPGKLREVVGII-TSGGTTNY 59
hPL14    EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTSGIYDMGWYRQAPGKLREVVSVI-TSGGTTY 59
PL16     QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAFSGGTFLTYSLGWFRQGPGEREFVASINWSGYMTSY 60
hPL16    EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYY 60
PL11     QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFNTYDMGWFRRAPGKEREFVAGIDWYTTNTYY 60
PL17     QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFNTYDMGWFRRTPGKEREFVAGMDWNTINTYY 60
PL18     EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFNISMAWFRQAPGKEREFVVRINWNRGTYY 60
            :***** ***** ** * * :.* *: *** *.* * : * :

PL2      EESVKGRFTISRDNVKNMMLQMNTLKPEDTAVYYCATNVGPTGGFSLQSVQRYDAWGQG 120
PL14     ADFAKGRFTISRDNKNMMLQMNSLKPEDTAVYYCNIRTRL-----IIWGQG 107
hPL14    ADSVKGRFTISRDNKNMMLQMNSLRAEDTAVYYCNIRTRL-----IIWGQG 107
PL16     VDSVKGRFTISRDNKNMMLQMNSLKPEDTAVYYCAAARTAI---AAKRSSEFDYWGQG 117
hPL16    ADSVKGRFTISRDNKNMMLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAI---AAKRSSEFDYWGQG 117
PL11     ADSVKGRFTISRDNKNMMLQMNSLKPEDTAVYYCAAGIRST----ATITGQADYWGQG 116
PL17     ADSVKGRFTISRDNKNMMLQMNSLKPEDTAVYYCAAGIRST----AIITGQADYWGQG 116
PL18     ADSVKGRFTISRDNKNMMLQMNSLKPEDTAVYYCAARGSPSTIGAFTSASHYDYGQG 120
            : .***** ** :**** .*: ****:*** *****

PL2      TQVTVSS 127      SEQ ID NO:31
PL14     TQVTVSS 114      SEQ ID NO:33
hPL14    TLVTVSS 114      SEQ ID NO:37
PL16     AQVTVSS 124      SEQ ID NO:34
hPL16    TQVTVSS 124      SEQ ID NO:38
PL11     AQVTVSS 123      SEQ ID NO:32
PL17     TQVTVSS 123      SEQ ID NO:35
PL18     TQVTVSS 127      SEQ ID NO:36
            : *****

```

도면23

HS10	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTD SAYRMGWFRQAPGKEREFVSAINWSDGRTYY	60
HS27	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSPYTMGWFRQASGKERESVAATTWTGSRSY	60
HS12	QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGRTFISFSMGWFRQAPGKEREFVASITNSGSGILY	60
HS2	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRAFSSYAMGWFRQAPRKEREFVATISLGGYTTY	60
HS22	EVQLVESGGGLVHAGGSLRLSCAASGPTFSNYFMGWFRQAPGKEREFVA AVKWSGYHTYY	60
HS6	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFHTYAVGWFRQAPGKERESVVIINWSSDHTYV	60
HS5	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVATINWGGRTTY	60
	:***:***** *: ***** . :***** **** *	
HS10	ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADPDSRLYYTVP---QNYDYWGQ	117
HS27	GESVKGRFTISR DSTKNTMSLQMNSLKPEDTAVYYCAAADGAGLYT---NRGQYDYWGQ	116
HS12	GDSVKGRFTISR DNAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGTGAGR----YRYASMFDYWGQ	116
HS2	ADSVKGRFTISR DNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGESS-----SRQDKWYDYWGQ	114
HS22	SDSVKGQFTISR DNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGGTF SNWYTRPRSGDSYDHWGQ	120
HS6	AQSVKGRFTISR DRAKNTFYLMNSLKPEDTAVYYCAVRRRLY-----GLRESDFDSWGQ	115
HS5	ADSVKGRFIISR DTGANTVYLQMNSLKPEDTAVYYCASNLDTY-----NVRAGTTNSWGQ	115
	. :****:* **** **, *****: ***** :	
HS10	GTSLTVSS 125	SEQ ID NO:47
HS27	GTQVTVSS 124	SEQ ID NO:45
HS12	GTQVTVSS 124	SEQ ID NO:43
HS2	GTQVTVSS 122	SEQ ID NO:40
HS22	GTQVTVSS 128	SEQ ID NO:44
HS6	GTQVTVSS 123	SEQ ID NO:42
HS5	GTQVTVSS 123	SEQ ID NO:41
	** *****	

도면24a

33-13	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLS	CAASGSISSINSMN	WYRQAPGKQREK	VAGINSSGDTN-Y	59
33-2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLS	CTASANILRTAPMA	WYRQAPGKQREF	VALITADGTTD-Y	59
33-4	QVQLVESGGGVSVPGGSLRLS	CEASGSIFSIAHMG	WYRQAPGKQREL	VAVISSGGRTN-Y	59
33-14	QVQLVESGGGLVQAGDSLKL	SCLASGRTSLILAMA	WWRQAPGKERE	FAGRIWNNDMTRY	60
33-24	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS	CLASGRTSSNSAMG	WFRQAPGKERE	FVGAITWNGDTTLY	60
33-8	EVQLMESGGGLVQAGGSLRLS	CAASGRTVSTYVMG	WFRQAPGKERE	FVAEINRIGDTLYN	60
33-G3	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLS	CAASGGTFTNYAMG	WFREAPGKERE	FVAGINNNGDTLYN	60
33-C1	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLS	CAASGGTFTNYAMG	WFREAPGKERE	FVAGINNNGDTLYN	60
33-F1	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLS	CAASGGTFTNYAMG	WFREAPGKERE	FVAGINNNGDTLYN	60
33-E3	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLS	CAASGGTFTNYAMG	WFREAPGKERE	FVAGINNNGDTLYN	60
33-F2	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLS	CAASGGTFTNYAMG	WFREAPGKERE	FVAGINNNGDTLYN	60
33-H2	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLS	CAASGGTFTNYAMG	WFREAPGKERE	FVAGINNNGDTLYN	60
33-B2	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLS	CAASGGTFTNYAMG	WFREAPGKERE	FVAGINNNGDTLYN	60
33-A1	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLS	CAASGGTFTNYAMG	WFREAPGKERE	FVAGINNNGDTLYN	60
33-G1	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLS	CAASGGTFTNYAMG	WFREAPGKERE	FVAGINNNGDTLYN	60
33-B3	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLS	CAASGGTFTNYAMG	WFREAPGKERE	FVAGINNNGDTLYN	60
33-D2	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLS	CAASGGTFTNYAMG	WFREAPGKERE	FVAGINNNGDTLYN	60
33-C3	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLS	CVASGGTFTNYAMG	WFREAPGKERE	FVAGINNNGDTLYN	60
33-B1	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLS	CAASGGTFTNYAMG	WFREAPGKERE	FVAGINNNGDTLYN	60
33-F3	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLS	CAASGGTFTNYAMG	WFREAPGKERE	FVAGINNNGDTLYN	60
33-D3	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLS	CAASGGTFTNYAMG	WFREAPGKERE	FVAGINNNGDTLYN	60
33-E2	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLS	CAASGGTFTNYAMG	WFREAPGKERE	FVAGINNNGDTLYN	60
33-H1	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLS	CAASGGTFTNYAMG	WFREAPGKERE	FVAGINNNGDTLYN	60
33-A2	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLS	CAASGGTFTNYAMG	WFREAPGKERE	FVAGINNNGDTLYN	60
33-1	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLS	CAASGGTFTNYAMG	WFREAPGKERE	FVAGINNNGDTLYN	60
33-D1	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLS	CAASGGTFTNYAMG	WFREAPGKERE	FVAGINNNGDTLYN	60
33-C2	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLS	CAASGGTFTNYAMG	WFREAPGKERE	FVAGINNNGDTLYN	60
33-G2	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLS	CAASGGTFTNYAMG	WFREAPGKERE	FVAGINNNGDTLYN	60
	:***:***** ** *.**:* ** . * *:***:*** **				
33-13	VDSVKGRFTISRDN	AERTTYLQMN	NLKPEDTGLYYC	NADPRPWP-NDVAFGSWGQGTQVT	118
33-2	QESVKGRFTISRDN	AKNTVYLQMN	SLQSEDTARYFCKV-----	YSYWGQGTQVT	108
33-4	VDSVKGRFTISRDN	AKNTVYLQMN	SLKAEDTAVYFCN	VAVVG---GPRFDYWGQGTQVT	115
33-14	SDSVKGRFTISKDN	TKNMVYLRMD	NLGPEDTAVYYCEAD	LIGGS-----RGWGQGTQVT	114
33-24	AYYVKDRFTISRDN	AKRMVYLRMD	NLKPEDTAVYYCAATDK	FASSQADS YTTWGQGTQVT	120
33-8	RTSVKGRFTISRDN	AKNTVYLQMN	SLPEDETA	VYSCAARVIG---TSTYNYWGQGTQVT	116
33-G3	TNSVKGRFTISRDN	AKNTVYLHMNS	LKLEDTAVYYCAAN	KASSWYSSHYNYWGQGTQVT	120
33-C1	TNSVKGRFTISRDN	AKNTVYLHMNS	LKLEDTAVYYCAAN	LSGASWFASQYEFWGQGTQVT	120
33-F1	TNSVKGRFTISRDN	AKNTVYLHMNS	LKLEDTAVYYCAAN	VS GASWYASHYEFWGQGTQVT	120
33-E3	TNSVKGRFTISRDN	AKNTVYLHMNS	LKLEDTAVYYCAAN	ISAASWYASQYDFWGQGTQVT	120
33-F2	TNSVKGRFTISRDN	AKNTVYLHMNS	LKLEDTAVYYCAAN	VSEASWFASKYDFWGQGTQVT	120
33-H2	TNSVKGRFTISRDN	AKNTVYLHMNS	LKLEDTAVYYCAAK	VRAASWFAAQYKFWGQGTQVT	120
33-B2	TNSVKGRFTISRDN	AKNTVYLHMNS	LKLEDTAVYYCAAN	INAASWFAAKYDSWGQGTQVT	120

도면24b

33-A1 TNSVKGRFTISRDNKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAAKFSGASWYSAQYHSWGQGTQVT 120
 33-G1 TNSVKGRFTISRDNKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAAKFRGASWFSSHYNFWGQGTQVT 120
 33-B3 TNSVKGRFTISRDNKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAANVRGSSWFSSHYDFWGQGTQVT 120
 33-D2 TNSVKGRFTISRDNKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAANIRGSSWFATHYDSWGQGTQVT 120
 33-C3 TNSVKGRFTISRDNKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAANFKGASWFASHYQSWGQGTQVT 120
 33-B1 TNSVKGRFTISRDNKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAAKLKGASWFASHYKSWGQGTQVT 120
 33-F3 TNSVKGRFTISRDNKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAAKISGASWFAAHYKSWGQGTQVT 120
 33-D3 TNSVKGRFTISRDNKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAANLRGASWFAANYKYWGQGTQVT 120
 33-E2 TNSVKGRFTISRDNKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAAKLRGASWFAANYDSWGQGTQVT 120
 33-H1 TNSVKGRFTISRDNKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAANVRGASWFAAHYNSWGQGTQVT 120
 33-A2 TNSVKGRFTISRDNKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAANFNGASWFAANYHFWGQGTQVT 120
 33-1 TNSVKGRFTISRDNKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAANLKGASWYSANYDYWGQGTQVT 120
 33-D1 TNSVKGRFTISRDNKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAANFNGASWFSSNYEYWGQGTQVT 120
 33-C2 TNSVKGRFTISRDNKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAANVKGASWFSSANYQSWGQGTQVT 120
 33-G2 TNSVKGRFTISRDNKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAANVKGASWFSSNYKYWGQGTQVT 120

,* *:***:..,***:*,* ***, * * , *****:**

33-13 VSS 121 SEQ ID NO:54
 33-2 VSS 111 SEQ ID NO:51
 33-4 VSS 118 SEQ ID NO:52
 33-14 VSS 117 SEQ ID NO:55
 33-24 VSS 123 SEQ ID NO:56
 33-8 VSS 119 SEQ ID NO:53
 33-G3 VSS 123 SEQ ID NO:75
 33-C1 VSS 123 SEQ ID NO:62
 33-F1 VSS 123 SEQ ID NO:70
 33-E3 VSS 123 SEQ ID NO:69
 33-F2 VSS 123 SEQ ID NO:71
 33-H2 VSS 123 SEQ ID NO:77
 33-B2 VSS 123 SEQ ID NO:60
 33-A1 VSS 123 SEQ ID NO:57
 33-G1 VSS 123 SEQ ID NO:73
 33-B3 VSS 123 SEQ ID NO:61
 33-D2 VSS 123 SEQ ID NO:66
 33-C3 VSS 123 SEQ ID NO:64
 33-B1 VSS 123 SEQ ID NO:59
 33-F3 VSS 123 SEQ ID NO:72
 33-D3 VSS 123 SEQ ID NO:67
 33-E2 VSS 123 SEQ ID NO:68
 33-H1 VSS 123 SEQ ID NO:76
 33-A2 VSS 123 SEQ ID NO:58
 33-1 VSS 123 SEQ ID NO:50
 33-D1 VSS 123 SEQ ID NO:65
 33-C2 VSS 123 SEQ ID NO:63
 33-G2 VSS 123 SEQ ID NO:74

도면25

LG-C4	QVQLVESGGRLVQAGGSLGLSCAASGLAFREYISMGWFRRAAPGKEREVFAAVD-WTGIQYY	59
LG-E12	QVQLVESGGGLVHPGGSLNLSCHVAGFSLDSHDMGWFRQAPGKEREVVACIKHRDGRYYI	60
LG2	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTIFSNAMGWYRQAPGKQRELVAIVT-FGGSTNY	59
LG6	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGSIFSISTMGWYRQAPGKQRELVASIT-ARGSADY	59
LG-D8	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGKYAMSWVRQVPDKGLEWVSSISSSGRDTSY	60
LG15	EVQLAESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFAFRSYVMSWVRQAPGKGLEWVSTIN-SDSRTSY	59
LG9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTIDDYPGWFRQAPGKEREVSCIDDSDESTYY	60
LG99	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTIDDYPMSWFRQAPGKREGVAAIDDSDESTYY	60
LG9H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTIDDYPMSWFRQAPGKREGVAAIDDSDESTYY	60
LG65	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTSATYSIAWFRQAPGKEREVSCISTGDGSTYY	60
LG-E5	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAHSAGFTLDYYALGWFRQAPGKEREAVSCISSSDGSTYY	60
LG-H4	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLDYYTIGWFRQAPGKEREAVSCINRSDGSTYY	60
LG19	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREVSCISSSDGSTYY	60
LG22	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREVSCINRSDGSTYY	60
	:*** **** **: **** ** . * :.* :.* * * : :	
LG-C4	ADSVKGRATISRDTAKSTVFLQMNSLNPDATFYCAAGKKLTG--IVLLTRRTEYDYWG	117
LG-E12	LEAVKDRFVISRDNAKNTVYLEMNNLSDEDTAVYHCATASSCSDNWLLI-GDAYAGYWG	119
LG2	ADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCSARNVQ-----SPVQYHLAVWG	112
LG6	ADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCNTDTRS-----TLY---HYSWG	109
LG-D8	ADSAKGRFTIFRNNAANTVYLQMDNLKLEDTGYYCVKCLE-----VWATREYDVGW	112
LG15	ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSKVEDTAVYYCSKQSP-----GTSQRG	106
LG9	ADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCARGAIFMIDGV-DVFLTYYYDSWG	119
LG99	ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGALFMDGV-DVFLTYFFEFGW	119
LG9H	ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGAIFMIDGV-DVFLTYYYDSWG	119
LG65	APAVKGRFTISSDNKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAKRAYGSAWFCPLDPSLQYDSWG	120
LG-E5	ADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCASTRY-GSS--C-RGGQWDTGSWG	116
LG-H4	ADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCASTY-GTS--C-RGGQWDTGSWG	116
LG19	ADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAADRR-GS---C-R---QYDYWG	111
LG22	ADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCATDRY-SD---C-RG---PYDYWG	112
	:.*.* .* :.: .*:*:.*.* **.*.*:* *	
LG-C4	QGTQVTVSS 126	SEQ ID NO:91
LG-E12	QGTQVTVSS 128	SEQ ID NO:87
LG2	QGTQVTVSS 121	SEQ ID NO:80
LG6	QGTQVTVSS 118	SEQ ID NO:81
LG-D8	QGTQVTVSS 121	SEQ ID NO:86
LG15	QGTQVTVSS 115	SEQ ID NO:88
LG9	QGTQVTVSS 128	SEQ ID NO:82
LG99	QGTQVTVSS 128	SEQ ID NO:90
LG9H	QGTQVTVSS 128	SEQ ID NO:83
LG65	QGTQVTVSS 129	SEQ ID NO:89
LG-E5	QGTQVTVSS 125	SEQ ID NO:92
LG-H4	QGTQVTVSS 125	SEQ ID NO:93
LG19	QGTQVTVSS 120	SEQ ID NO:84
LG22	QGTQVTVSS 121	SEQ ID NO:85
	*** *****	

도면26

CD16F1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAIT-SGVRTDY	59
CD16E11	QVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCRASGFTFSNHAMSWVRQAPGKGLEWVSEISFNHATRY	60
	:***** ** .** ** :.*.* ***** * *: *: .* * *	
CD16F1	ADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMNLSKPEDTAVYYCNVNLNTGN--YWGQGTQVTVSS	116
CD16E11	ADSLKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSKPEDTAVYYCRKGWNATPQIGERGRGTQVTVSS	119
	:**.:*****:*****.* . * : * :*****	
CD16F1	(SEQ ID NO:96)	
CD16E11	(SEQ ID NO:99)	