(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0100453
(43) 공개일자 2024년07월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/30 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/30 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2024-7020170
(22) 출원일자(국제) 2021년11월19일
심사청구일자 2024년06월17일
(85) 번역문제출일자 2024년06월17일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2021/131804
(87) 국제공개번호 WO 2023/087255
국제공개일자 2023년05월25일

(71) 출원인
우한 이지 바이오파마 씨오., 엘티디.
중국 430075 후베이, 우한, 동후 뉴 테크놀로지 디벨롭멘트 존, 가오씬 로드 넘버 666, C2-1, 바이오레이크
(72) 발명자
팡, 리주안
중국, 후베이 430075, 우한 동후 뉴 테크놀로지 디벨롭먼트 존, 가오씬 로드 넘버666, 씨2-1, 바이오레이크
장, 징
중국, 후베이 430075, 우한 동후 뉴 테크놀로지 디벨롭먼트 존, 가오씬 로드 넘버666, 씨2-1, 바이오레이크
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인이룸리온

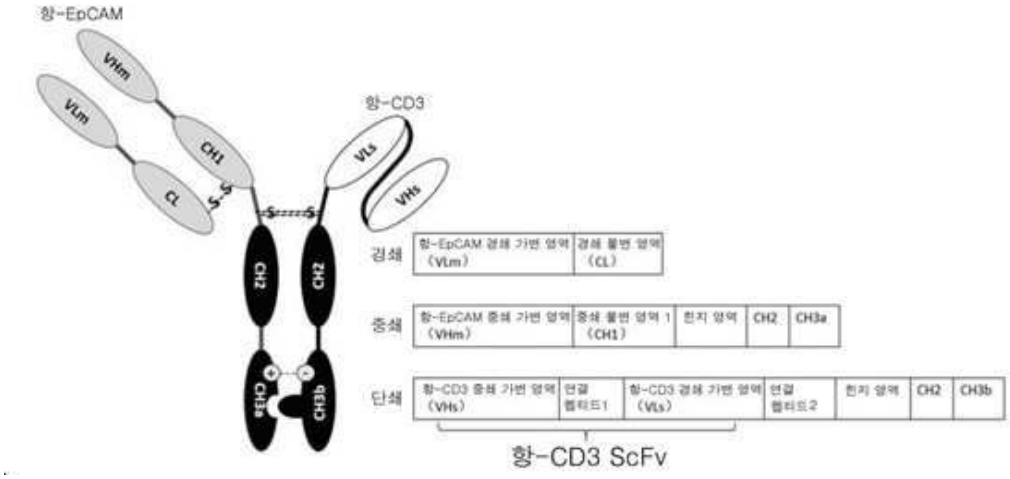
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **이중 특이적 항체 및 이의 응용**

(57) 요 약

본 발명은 이중 특이적 항체 및 이의 응용에 관한 것이고, 상기 이중 특이적 항체는 (i) 서열번호 14 또는 서열번호 16으로 표시되는 중쇄 가변 영역에 포함된 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3, 및 (ii) 서열번호 13 또는 서열번호 15로 표시되는 경쇄 가변 영역에 포함된 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3을 포함하고; 및 (1) 서열번호 50 또는 서열번호 58로 표시되는 중쇄 가변 영역에 포함된 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3, 및 (2) 서열번호 51 또는 서열번호 59로 표시되는 경쇄 가변 영역에 포함된 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3을 더 포함한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C07K 16/2809 (2013.01)
A61K 2039/507 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
(72) 발명자
후아, 샨
중국, 후베이 430075, 우한 동후 뉴 테크놀로지 디벨롭먼트 존, 가오씬 로드 넘버666, 씨2-1, 바이오레이크
조우, 펑페이
중국, 후베이 430075, 우한 동후 뉴 테크놀로지 디벨롭먼트 존, 가오씬 로드 넘버666, 씨2-1, 바이오레이크

명 세 서

청구범위

청구항 1

이중 특이적 항체로서,

EpCAM에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인 및 CD3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하고,

상기 EpCAM에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인은 다음 1) 및 2)로 이루어진 군으로부터 선택되되,

1) 다음의 CDRs 또는 이의 변이체를 포함하는 EpCAM에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인:

(i) 서열번호 14로 표시되는 중쇄 가변 영역에 포함된 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3, 및

(ii) 서열번호 13으로 표시되는 경쇄 가변 영역에 포함된 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3,

바람직하게는, Kabat 서열 넘버링 시스템에 따라, CDRL1의 서열은 서열번호 32로 표시되고, CDRL2의 서열은 서열번호 33으로 표시되며, CDRL3의 서열은 서열번호 34로 표시되고, CDRH1의 서열은 서열번호 35로 표시되며, CDRH2의 서열은 서열번호 36으로 표시되고, CDRH3의 서열은 서열번호 37로 표시되며; 또는

2) 다음의 CDRs 또는 이의 변이체를 포함하는 EpCAM에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인:

(i) 서열번호 16으로 표시되는 중쇄 가변 영역에 포함된 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3, 및

(ii) 서열번호 15로 표시되는 경쇄 가변 영역에 포함된 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3,

바람직하게는, Kabat 서열 넘버링 시스템 및 CDR 정의 시스템에 따라, CDRL1의 서열은 서열번호 38로 표시되고, CDRL2의 서열은 서열번호 39로 표시되며, CDRL3의 서열은 서열번호 40으로 표시되고, CDRH1의 서열은 서열번호 41로 표시되며, CDRH2의 서열은 서열번호 42로 표시되고, 및 CDRH3의 서열은 서열번호 43으로 표시되며,

상기 CD3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인은 다음 1) 및 2)로 이루어진 군으로부터 선택되되,

1) 다음의 CDRs 또는 이의 변이체를 포함하는 CD3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인:

서열번호 50으로 표시되는 중쇄 가변 영역에 포함된 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3; 및 서열번호 51로 표시되는 경쇄 가변 영역에 포함된 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3,

바람직하게는, Kabat 서열 넘버링 시스템에 따라, CDRH1의 서열은 서열번호 44로 표시되고, CDRH2의 서열은 서열번호 45로 표시되며, 및 CDRH3의 서열은 서열번호 46으로 표시되고, CDRL1의 서열은 서열번호 47로 표시되며, CDRL2의 서열은 서열번호 48로 표시되고, CDRL3의 서열은 서열번호 49로 표시되며; 또는

2) 다음의 CDRs 또는 이의 변이체를 포함하는 CD3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인:

서열번호 58로 표시되는 중쇄 가변 영역에 포함된 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3; 및 서열번호 59로 표시되는 경쇄 가변 영역에 포함된 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3,

바람직하게는, Kabat 서열 넘버링 시스템에 따라, CDRH1의 서열은 서열번호 52로 표시되고, CDRH2의 서열은 서열번호 53으로 표시되며, 및 CDRH3의 서열은 서열번호 54로 표시되고, CDRL1의 서열은 서열번호 55로 표시되며, CDRL2의 서열은 서열번호 56으로 표시되고, CDRL3의 서열은 서열번호 57로 표시되며; 상기 CDRs의 변이체는 대응되는 CDRs와 각각 3개, 2개 또는 1개의 아미노산 차이가 있거나 각각 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖고,

바람직하게는, EpCAM에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인은 Fab 단편 형태이고, CD3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인은 ScFv 형태인 것을 특징으로 하는 이중 특이적 항체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 EpCAM에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인은 다음의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역(또는 이의 변

이체)을 포함하고,

(i) 서열번호 14로 표시되는 중쇄 가변 영역, 서열번호 13으로 표시되는 경쇄 가변 영역; 또는

(ii) 서열번호 16으로 표시되는 중쇄 가변 영역, 서열번호 15로 표시되는 경쇄 가변 영역;

상기 CD3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인은 다음의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역(또는 이의 변이체)을 포함하며,

(1) 서열번호 50으로 표시되는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 51로 표시되는 경쇄 가변 영역, 또는

(2) 서열번호 58로 표시되는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 59로 표시되는 경쇄 가변 영역;

바람직하게는,

상기 EpCAM에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인은 다음의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역(또는 이의 변이체)을 포함하고,

(i) 서열번호 14로 표시되는 중쇄 가변 영역, 서열번호 13으로 표시되는 경쇄 가변 영역;

상기 CD3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인은,

(1) 서열번호 18로 표시되는 ScFv 또는 이의 변이체,

(2) 서열번호 19로 표시되는 ScFv 또는 이의 변이체로 이루어진 군으로부터 선택되며,

상기 변이체는 상기 대응되는 가변 영역 또는 ScFv와 각각 3개, 2개 또는 1개의 아미노산 차이가 있거나 각각 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 이중 특이적 항체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 이중 특이적 항체는 EpCAM에 특이적으로 결합하는 경쇄-중쇄 쌍 및 CD3에 특이적으로 결합하는 융합 펩티드를 포함하되,

(1) 상기 EpCAM에 특이적으로 결합하는 경쇄-중쇄 쌍에서, 상기 경쇄-중쇄 쌍은 경쇄 및 중쇄를 포함하거나 이들로 구성되고, 상기 경쇄는 경쇄 가변 영역 및 경쇄 불변 영역(바람직하게는, 서열은 서열번호 1, 60-65 중 어느 하나로 표시됨)을 포함하며, 상기 중쇄는 중쇄 가변 영역, CH1(바람직하게는, 서열은 서열번호 2로 표시됨) 및 제1 Fc 단편을 포함하고; 바람직하게는, 상기 제1 Fc 단편은 힌지 영역(바람직하게는, 서열은 서열번호 3으로 표시됨), CH2(바람직하게는, 서열은 서열번호 6, 7, 66-71 중 어느 하나로 표시됨) 및 CH3a를 포함하고;

(2) 상기 CD3에 특이적으로 결합하는 융합 펩티드에서, 상기 융합 펩티드는 CD3에 특이적으로 결합하는 ScFv 및 제2 Fc 단편을 포함하거나 이들로 구성되고; 바람직하게는, 상기 ScFv는 N-말단에서 C-말단까지 순차적으로 중쇄 가변 영역, 연결 펩티드(바람직하게는, 서열은 서열번호 4로 표시됨) 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 제2 Fc 단편은 N-말단에서 C-말단까지 순차적으로 힌지 영역(바람직하게는, 서열은 서열번호 3으로 표시됨), CH2(바람직하게는, 서열은 서열번호 6, 7, 66-71 중 어느 하나로 표시됨) 및 CH3b를 포함하며, 바람직하게는, 상기 경쇄 가변 영역의 C-말단과 상기 제2 Fc 단편의 힌지 영역은 연결 펩티드(바람직하게는, 서열은 서열번호 5로 표시됨)를 통해 연결되고;

바람직하게는, 상기 제1 Fc 단편 및 제2 Fc 단편은 인간 또는 인간화 Fc 단편, 예를 들어 인간 IgG Fc 단편, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgG5 Fc 단편이고;

바람직하게는, 상기 제1 Fc 단편 및/또는 제2 Fc 단편은 야생형 항체에 비해 상기 중쇄와 융합 펩티드 사이에 knobs-into-holes 구조 쌍을 형성하는 하나 이상의 치환을 포함하고, 예를 들어 하나의 CH3 도메인에서의 T366은 티로신(Y) 또는 트립토판(W)과 같은 상대적으로 큰 아미노산 잔기에 의해 치환되고, 다른 CH3 도메인에서의 Y407은 트레오닌(T), 알라닌(A) 또는 발린(V)과 같은 상대적으로 작은 아미노산 잔기에 의해 치환되며, 예를 들어 표 6의 하나 이상의 치환을 포함하며;

바람직하게는, 상기 제1 Fc 단편 및/또는 제2 Fc 단편은 하나 이상의 치환을 포함하되, 1) 상기 치환은 상기 중쇄와 융합 펩티드 사이에 염-다리 쌍을 형성하는데, 예를 들어 하나의 CH3 도메인은 하나 이상의 치환을 포함하고, 생리학적 조건에서 양전하를 띠는 아미노산 잔기에 의해 치환되며, 다른 CH3 도메인은 하나 이상의 치환을

포함하고, 생리학적 조건에서 음전하를 띠는 하나 이상의 아미노산 잔기에 의해 치환되며, 예를 들어 상기 양전하를 띠는 아미노산 잔기는 아르기닌(R), 히스티딘(H) 또는 라이신(K)이고, 예를 들어 상기 음전하를 띤 아미노산 잔기는 아스파르트산(D) 또는 글루탐산(E)일 수 있으며, 예를 들어 치환된 아미노산 잔기는 D356, L368, K392, D399 및 K409 중 하나 이상을 포함하는데, 예를 들어 표 7의 하나 이상의 치환이며, 2) 상기 치환은 상기 중쇄와 융합 펩티드 사이에 이황화 결합을 형성하는데, 예를 들어 표 8의 치환이고, 및/또는 3) 상기 치환은 Fc와 단백질 A 사이의 결합 능력을 현저히 감소시키고, 예를 들어 하나의 CH3 도메인에서의 H435 및 Y436은 표 9에 나타낸 바와 같이 각각 아르기닌 및 페닐알라닌으로 치환되며,

바람직하게는,

a) 융합 펩티드의 CH3b와 중쇄의 CH3a는 knobs-into-holes 구조를 형성하는 치환 쌍을 갖고;

b) 융합 펩티드의 CH3b와 중쇄의 CH3a는 이온 결합을 형성하는 치환 쌍을 가지며;

c) 융합 펩티드의 CH3b와 중쇄의 CH3a는 이황화 결합을 형성하는 치환 쌍을 갖고; 및/또는

d) 융합 펩티드의 CH3b와 중쇄의 CH3a는 단백질 A와의 결합 능력을 감소시키는 치환을 가지며,

바람직하게는, CH1은 서열번호 2의 서열을 포함하고; 및/또는 CL은 서열번호 1, 60-65 중 어느 하나로부터 선택되는 서열을 포함하며;

바람직하게는, 상기 제1 Fc 단편 및/또는 제2 Fc 단편은 서열번호 6, 7, 66-71 중 어느 하나로부터 선택되는 서열의 CH2 및/또는 서열번호 8, 9, 11, 12, 72-76 중 어느 하나로부터 선택되는 서열의 CH3을 포함하고;

바람직하게는, CH3a 및 CH3b의 서열은,

(1) 하나는 서열번호 8로 표시되고, 다른 하나는 서열번호 11로 표시되는 서열;

(2) 하나는 서열번호 9로 표시되고, 다른 하나는 서열번호 12로 표시되는 서열;

(3) 하나는 서열번호 72로 표시되고, 다른 하나는 서열번호 74로 표시되는 서열;

(4) 하나는 서열번호 9로 표시되고, 다른 하나는 서열번호 75로 표시되는 서열;

(5) 하나는 서열번호 73으로 표시되고, 다른 하나는 서열번호 76으로 표시되는 서열로 이루어진 군으로부터 선택되고,

바람직하게는, 상기 이중 특이적 항체는,

(1) 융합 펩티드, 중쇄 및 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되되, 상기 융합 펩티드는 서열번호 18, 서열번호 5, 서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 11을 포함하거나 이들로 구성되고; 상기 중쇄는 서열번호 14, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 8을 포함하거나 이들로 구성되며; 상기 경쇄는 서열번호 13 및 서열번호 1을 포함하거나 이들로 구성되는 이중 특이적 항체;

(2) 융합 펩티드, 중쇄 및 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되되, 상기 융합 펩티드는 서열번호 19, 서열번호 5, 서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 11을 포함하거나 이들로 구성되고; 상기 중쇄는 서열번호 14, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 8을 포함하거나 이들로 구성되며; 상기 경쇄는 서열번호 13 및 서열번호 1을 포함하거나 이들로 구성되는 이중 특이적 항체;

(3) 융합 펩티드, 중쇄 및 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되되, 상기 융합 펩티드는 서열번호 18, 서열번호 5, 서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 11을 포함하거나 이들로 구성되고; 상기 중쇄는 서열번호 16, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 8을 포함하거나 이들로 구성되며; 상기 경쇄는 서열번호 15 및 서열번호 1을 포함하거나 이들로 구성되는 이중 특이적 항체;

(4) 융합 펩티드, 중쇄 및 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되되, 상기 융합 펩티드는 서열번호 19, 서열번호 5, 서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 11을 포함하거나 이들로 구성되고; 상기 중쇄는 서열번호 16, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 8을 포함하거나 이들로 구성되며; 상기 경쇄는 서열번호 15 및 서열번호 1을 포함하거나 이들로 구성되는 이중 특이적 항체;

(5) 융합 펩티드, 중쇄 및 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되되, 상기 융합 펩티드는 서열번호 18, 서열번호 5, 서열번호 3, 서열번호 7 및 서열번호 12를 포함하거나 이들로 구성되고; 상기 중쇄는 서열번호 14, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 7 및 서열번호 9를 포함하거나 이들로 구성되며; 상기 경쇄는 서열번호 13 및 서열번호 1

을 포함하거나 이들로 구성되는 이중 특이적 항체;

(6) 융합 펩티드, 중쇄 및 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되되, 상기 융합 펩티드는 서열번호 19, 서열번호 5, 서열번호 3, 서열번호 7 및 서열번호 12를 포함하거나 이들로 구성되고; 상기 중쇄는 서열번호 14, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 7 및 서열번호 9를 포함하거나 이들로 구성되며; 상기 경쇄는 서열번호 13 및 서열번호 1을 포함하거나 이들로 구성되는 이중 특이적 항체; 이중 특이적 항체;

(7) 융합 펩티드, 중쇄 및 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되되, 상기 융합 펩티드는 서열번호 18, 서열번호 5, 서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 8을 포함하거나 이들로 구성되고; 상기 중쇄는 서열번호 14, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 11을 포함하거나 이들로 구성되며; 상기 경쇄는 서열번호 13 및 서열번호 1을 포함하거나 이들로 구성되는 이중 특이적 항체;

(8) 융합 펩티드, 중쇄 및 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되되, 상기 융합 펩티드는 서열번호 19, 서열번호 5, 서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 8을 포함하거나 이들로 구성되고; 상기 중쇄는 서열번호 14, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 11을 포함하거나 이들로 구성되며; 상기 경쇄는 서열번호 13 및 서열번호 1을 포함하거나 이들로 구성되는 이중 특이적 항체;

(9) 융합 펩티드, 중쇄 및 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되되, 상기 융합 펩티드는 서열번호 18, 서열번호 5, 서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 8을 포함하거나 이들로 구성되고; 상기 중쇄는 서열번호 16, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 11을 포함하거나 이들로 구성되며; 상기 경쇄는 서열번호 15 및 서열번호 1을 포함하거나 이들로 구성되는 이중 특이적 항체;

(10) 융합 펩티드, 중쇄 및 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되되, 상기 융합 펩티드는 서열번호 19, 서열번호 5, 서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 8을 포함하거나 이들로 구성되고; 상기 중쇄는 서열번호 16, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 11을 포함하거나 이들로 구성되며; 상기 경쇄는 서열번호 15 및 서열번호 1을 포함하거나 이들로 구성되는 이중 특이적 항체;

(11) 융합 펩티드, 중쇄 및 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되되, 상기 융합 펩티드는 서열번호 18, 서열번호 5, 서열번호 3, 서열번호 7 및 서열번호 9를 포함하거나 이들로 구성되고; 상기 중쇄는 서열번호 14, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 7 및 서열번호 12를 포함하거나 이들로 구성되며; 상기 경쇄는 서열번호 13 및 서열번호 1을 포함하거나 이들로 구성되는 이중 특이적 항체;

(12) 융합 펩티드, 중쇄 및 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되되, 상기 융합 펩티드는 서열번호 19, 서열번호 5, 서열번호 3, 서열번호 7 및 서열번호 9를 포함하거나 이들로 구성되고; 상기 중쇄는 서열번호 14, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 7 및 서열번호 12를 포함하거나 이들로 구성되며; 상기 경쇄는 서열번호 13 및 서열번호 1을 포함하거나 이들로 구성되는 이중 특이적 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 이중 특이적 항체.

청구항 4

핵산 조성물로서,

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 이중 특이적 항체를 코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 바람직하게는,

핵산 조성물은,

a) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 정의된 EpCAM에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인 또는 경쇄-중쇄 쌍을 코딩하는 제1 핵산을 포함하는 제1 발현 벡터; 및

b) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 정의된 CD3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인 또는 융합 펩티드를 코딩하는 제2 핵산을 포함하는 제2 발현 벡터를 포함하는 핵산 조성물.

청구항 5

제4항에 따른 핵산 조성물을 포함하는 발현 벡터.

청구항 6

제5항에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 7

약학적 조성물로서,

상기 약학적 조성물은 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 이중 특이적 항체 및 약제학적 담체를 포함하고, 선택적으로 암(EpCAM 양성 종양, 예를 들어 결장직장암, 위암, 유방암, 난소암, 폐암(예를 들어, 비소세포폐암), 전립선암, 췌장암, 간암, 망막모세포종, 식도암, 신장암, 신장투명세포종, 피부 편평세포암종, 피부 기저세포암종, 육종, 비강내신경교종, 두개인두종, 갑상선암, 담관세포종, 방광암, 두경부종양, 자궁경부암 또는 구강암 등) 및/또는 악성 복수, 악성 삼출, 악성흉막삼출 등의 치료를 위한 약물(예를 들어, 저분자 약물 또는 고분자 약물)을 포함하며, 바람직하게는, 상기 약학적 조성물의 제형은 경구 투여 제형 또는 비경구 투여 제형을 포함하고; 더 바람직하게는, 상기 약학적 조성물의 제형은 정맥 주사, 정맥 점적 주사, 피하 주사, 국소 주사, 근육 주사, 종양내 주사, 복강내 주사, 두개내 주사 또는 강내 주사를 포함하는 주사제인 약학적 조성물.

청구항 8

접합체 또는 융합 단백질로서,

상기 접합체 또는 융합 단백질은 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 이중 특이적 항체를 포함하고, 바람직하게는, 상기 이중 특이적 항체에 접합 또는 융합된 물질 A를 포함하며, 상기 물질 A는 치료제, 전구약물, 단백질(예를 들어, 효소), 바이러스, 지질, 생물학적 반응 조절제(예를 들어, 면역 조절제), PEG, 호르몬, 올리고뉴클레오티드, 진단제, 약물 또는 독소가 될 수 있는 세포독성제, 초음파 강화제, 비 방사성 마커, 화학 발광물질로 표지된 화합물(예를 들어, 루미놀, 이소루미놀, 열성 아크리디늄 에스테르, 이미다졸, 아크리디늄염 및 옥살산에스테르)과 같은 검출 가능한 마커, 또는 형광 발광 금속(예를 들어, 152Eu, 또는 란탄족 마커)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 접합체 또는 융합 단백질.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 이중 특이적 항체를 포함하고, 선택적으로, 암(EpCAM 양성 종양, 예를 들어 결장직장암, 위암, 유방암, 난소암, 폐암(예를 들어, 비소세포폐암), 전립선암, 췌장암, 간암, 망막모세포종, 식도암, 신장암, 신장투명세포종, 피부 편평세포암종, 피부 기저세포암종, 육종, 비강내신경교종, 두개인두종, 갑상선암, 담관세포종, 방광암, 두경부종양, 자궁경부암 또는 구강암 등) 및/또는 악성 복수, 악성 삼출, 악성흉막삼출 등의 치료를 위한 약물(예를 들어, 저분자 약물 또는 고분자 약물)을 포함하는 키트.

청구항 10

암의 치료, 또는 암 및/또는 악성 복수, 악성 삼출, 악성흉막삼출 등의 치료를 위한 약물 또는 키트의 제조에 있어서의 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 이중 특이적 항체의 응용으로서,

상기 암은 예를 들어 EpCAM 양성 종양, 예를 들어 결장직장암, 위암, 유방암, 난소암, 폐암(예를 들어, 비소세포폐암), 전립선암, 췌장암, 간암, 망막모세포종, 식도암, 신장암, 신장투명세포종, 피부 편평세포암종, 피부 기저세포암종, 육종, 비강내신경교종, 두개인두종, 갑상선암, 담관세포종, 방광암, 두경부종양, 자궁경부암 또는 구강암인 응용.

청구항 11

암 및/또는 악성 복수, 악성 삼출, 악성흉막삼출의 치료 방법으로서,

치료적 유효량의 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 이중 특이적 항체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 상기 암은 EpCAM 양성 종양, 예를 들어 결장직장암, 위암, 유방암, 난소암, 폐암(예를 들어, 비소세포폐암), 전립선암, 췌장암, 간암, 망막모세포종, 식도암, 신장암, 신장투명세포종, 피부 편평세포암종, 피부 기저세포암종, 육종, 비강내신경교종, 두개인두종, 갑상선암, 담관세포종, 방광암, 두경부종양, 자궁경부암 또는 구강암인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 면역학 기술분야에 관한 것이다. 구체적으로, 항-EpCAM 및 항-CD3 이중 특이적 항체 및 이의 응용에

관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 이중표적항체라고도 알려진 이중 특이적 항체(bi-specific antibody, BsAb)는 두 가지 상이한 항원 또는 에피토프를 동시에 인식하고 결합할 수 있으며 두 가지 상이한 신호 전달 경로를 차단하여 그 작용을 발휘할 수 있다. 단일 항원을 인식하는 단클론 항체(monoclonal Ab, mAb)와 비교하면, 이중 항체는 다음과 같은 많은 장점을 갖는다. ① 특이적 면역 이펙터 세포를 인접한 종양 세포로 리디렉션하여 종양의 살상을 강화할 수 있는데, 이는 mAb 치료 전략의 조합을 통해 구현할 수 없는 것이고; ② 두 가지 상이한 세포 표면 항원의 상호작용을 통해 결합 특이성을 증가시키며; ③ 병용요법의 단일 항체 약물 개발과 비교하면, 개발 비용, 임상 시험, 규제 검토 예산이 절감될 수 있고; ④ 병용요법의 단일 항체 약물과 비교하면, 발병기전에서 독특하거나 중복되는 기능을 발휘하는 두 가지 다른 경로를 동시에 차단할 수 있다.

[0003] 암 및 기타 질환은 모두 다양한 요인에 의해 발생되고, 병원학적으로 수많은 신호 전달 경로가 있으며, 단일 표적의 면역 치료는 표적 세포를 효과적으로 죽일 수 없다. 단일클론항체(mAb) 치료를 받은 환자는 항약성이 생기거나 치료에 응답하지 않을 수 있다. 따라서, 이중 항체는 암, 염증, 바이러스 감염 및 자가면역질환 등 수많은 질환의 주요 치료 옵션이 되었다. 그러나, 이중 항체는 자연환경에 존재하지 않고, 재조합 DNA, 세포융합 또는 화학적 결합 기술을 통해 구현되어야 하며, 그 중 현재 BsAb의 제조에서 가장 일반적으로 사용되는 기술은 재조합 DNA 기술이나 BsAb 발현의 어려움, 낮은 수율, 정제의 어려움, 안정성 저하 등 많은 난관에 연전히 직면해 있으므로, 이를 극복할 수 있는 새로운 이중 특이적 항체를 구축하고 상응한 면역 살상 동물모델의 구축하는 것은 매우 필요하다. 본 발명은 신규 이중 특이적 항체를 제공하고, 이의 약효학 연구 방법 및 결과를 설명한다.

발명의 내용

[0004] 본 발명은 EpCAM에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인 및 CD3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 새로운 이중 특이적 항체 및 이의 응용을 개발한다.

[0005] 구체적으로, 본 발명은 다음의 몇 개의 양태에 관한 것이다.

[0006] 1. 이중 특이적 항체로서, EpCAM에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인 및 CD3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하고,

[0007] 상기 EpCAM에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인은 다음 1) 및 2)로 이루어진 군으로부터 선택되되,

[0008] 1) 다음의 CDRs 또는 이의 변이체를 포함하는 EpCAM에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인:

[0009] (i) 서열번호 14로 표시되는 중쇄 가변 영역에 포함된 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3, 및

[0010] (ii) 서열번호 13으로 표시되는 경쇄 가변 영역에 포함된 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3,

[0011] 바람직하게는, Kabat 서열 넘버링 시스템에 따라, CDRL1의 서열은 서열번호 32로 표시되고, CDRL2의 서열은 서열번호 33으로 표시되며, CDRL3의 서열은 서열번호 34로 표시되고, CDRH1의 서열은 서열번호 35로 표시되며, CDRH2의 서열은 서열번호 36으로 표시되고, CDRH3의 서열은 서열번호 37로 표시되며; 또는

[0012] 2) 다음의 CDRs 또는 이의 변이체를 포함하는 EpCAM에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인:

[0013] (i) 서열번호 16으로 표시되는 중쇄 가변 영역에 포함된 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3, 및

[0014] (ii) 서열번호 15로 표시되는 경쇄 가변 영역에 포함된 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3,

[0015] 바람직하게는, Kabat 서열 넘버링 시스템 및 CDR 정의 시스템에 따라, CDRL1의 서열은 서열번호 38로 표시되고, CDRL2의 서열은 서열번호 39로 표시되며, CDRL3의 서열은 서열번호 40으로 표시되고, CDRH1의 서열은 서열번호 41로 표시되며, CDRH2의 서열은 서열번호 42로 표시되고, 및 CDRH3의 서열은 서열번호 43으로 표시되며;

[0016] 상기 CD3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인은 다음 1) 및 2)로 이루어진 군으로부터 선택되되,

[0017] 1)다음의 CDRs 또는 이의 변이체를 포함하는 CD3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인:

[0018] 서열번호 50으로 표시되는 중쇄 가변 영역에 포함된 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3; 및 서열번호 51로 표시되는 경쇄 가변 영역에 포함된 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3,

[0019] 바람직하게는, Kabat 서열 넘버링 시스템에 따라, CDRH1의 서열은 서열번호 44로 표시되고, CDRH2의 서열은 서

열번호 45로 표시되며, 및 CDRH3의 서열은 서열번호 46으로 표시되고, CDRL1의 서열은 서열번호 47로 표시되며, CDRL2의 서열은 서열번호 48로 표시되고, CDRL3의 서열은 서열번호 49로 표시되며; 또는

[0020] 2) 다음의 CDRs 또는 이의 변이체를 포함하는 CD3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인:

[0021] 서열번호 58로 표시되는 중쇄 가변 영역에 포함된 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3; 및 서열번호 59로 표시되는 경쇄 가변 영역에 포함된 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3,

[0022] 바람직하게는, Kabat 서열 넘버링 시스템에 따라, CDRH1의 서열은 서열번호 52로 표시되고, CDRH2의 서열은 서열번호 53으로 표시되며, 및 CDRH3의 서열은 서열번호 54로 표시되고, CDRL1의 서열은 서열번호 55로 표시되며, CDRL2의 서열은 서열번호 56으로 표시되고, CDRL3의 서열은 서열번호 57로 표시되며; 상기 CDRs의 변이체는 대응되는 CDRs와 각각 3개, 2개 또는 1개의 아미노산 차이가 있거나 각각 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 것을 특징으로 하는 이중 특이적 항체.

[0023] 2. 항목 1에 있어서, 상기 EpCAM에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인은 다음의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역(또는 이의 변이체)을 포함하고,

[0024] (i) 서열번호 14로 표시되는 중쇄 가변 영역, 서열번호 13으로 표시되는 경쇄 가변 영역; 또는

[0025] (ii) 서열번호 16으로 표시되는 중쇄 가변 영역, 서열번호 15로 표시되는 경쇄 가변 영역;

[0026] 상기 CD3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인은 다음의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역(또는 이의 변이체)을 포함하며,

[0027] (1) 서열번호 50으로 표시되는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 51로 표시되는 경쇄 가변 영역, 또는

[0028] (2) 서열번호 58로 표시되는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 59로 표시되는 경쇄 가변 영역;

[0029] 바람직하게는, EpCAM에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인은 Fab 단편 형태이고, CD3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인은 ScFv 형태이고,

[0030] 바람직하게는, 상기 EpCAM에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인은 다음의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역(또는 이의 변이체)을 포함하고,

[0031] (i) 서열번호 14로 표시되는 중쇄 가변 영역, 서열번호 13으로 표시되는 경쇄 가변 영역;

[0032] 상기 CD3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인은,

[0033] (1) 서열번호 18로 표시되는 ScFv 또는 이의 변이체,

[0034] (2) 서열번호 19로 표시되는 ScFv 또는 이의 변이체로 이루어진 군으로부터 선택되며,

[0035] 상기 변이체는 상기 대응되는 가변 영역 또는 ScFv와 각각 3개, 2개 또는 1개의 아미노산 차이가 있거나 각각 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 이중 특이적 항체.

[0036] 3. 항목 1 또는 항목 2에 있어서, 상기 이중 특이적 항체는 EpCAM에 특이적으로 결합하는 경쇄-중쇄 쌍 및 CD3에 특이적으로 결합하는 융합 펩티드를 포함하되,

[0037] (1) 상기 EpCAM에 특이적으로 결합하는 경쇄-중쇄 쌍에서, 상기 경쇄-중쇄 쌍은 경쇄 및 중쇄를 포함하거나 이들로 구성되고, 상기 경쇄는 경쇄 가변 영역 및 경쇄 불변 영역(바람직하게는, 서열은 서열번호 1, 60-65 중 어느 하나로 표시됨)을 포함하며, 상기 중쇄는 중쇄 가변 영역, CH1(바람직하게는, 서열은 서열번호 2로 표시됨) 및 제1 Fc 단편을 포함하고; 바람직하게는, 상기 제1 Fc 단편은 힌지 영역(바람직하게는, 서열은 서열번호 3으로 표시됨), CH2(바람직하게는, 서열은 서열번호 6, 7, 66-71 중 어느 하나로 표시됨) 및 CH3a를 포함하고;

[0038] (2) 상기 CD3에 특이적으로 결합하는 융합 펩티드에서, 상기 융합 펩티드는 CD3에 특이적으로 결합하는 ScFv 및 제2 Fc 단편을 포함하거나 이들로 구성되고; 바람직하게는, 상기 ScFv는 N-말단에서 C-말단까지 순차적으로 중쇄 가변 영역, 연결 펩티드(바람직하게는, 서열은 서열번호 4로 표시됨) 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 제2 Fc 단편은 N-말단에서 C-말단까지 순차적으로 힌지 영역(바람직하게는, 서열은 서열번호 3으로 표시됨), CH2(바람직하게는, 서열은 서열번호 6, 7, 66-71 중 어느 하나로 표시됨) 및 CH3b를 포함하며, 바람직하게는, 상기 경쇄 가변 영역의 C-말단과 상기 제2 Fc 단편의 힌지 영역은 연결 펩티드(바람직하게는, 서열은 서열번호 5로 표시됨)를 통해 연결되고;

[0039] 바람직하게는, 상기 제1 Fc 단편 및 제2 Fc 단편은 인간 또는 인간화 Fc 단편, 예를 들어 인간 IgG Fc 단편, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgG5 Fc 단편이고;

[0040] 바람직하게는, 상기 제1 Fc 단편 및/또는 제2 Fc 단편은 야생형 항체에 비해 상기 중쇄와 융합 펩티드 사이에 knobs-into-holes 구조 쌍을 형성하는 하나 이상의 치환을 포함하고, 예를 들어 하나의 CH3 도메인에서의 T366은 티로신(Y) 또는 트립토판(W)과 같은 상대적으로 큰 아미노산 잔기에 의해 치환되고, 다른 CH3 도메인에서의 Y407은 트레오닌(T), 알라닌(A) 또는 발린(V)과 같은 상대적으로 작은 아미노산 잔기에 의해 치환되며, 예를 들어 표 6의 하나 이상의 치환을 포함하며;

[0041] 바람직하게는, 상기 제1 Fc 단편 및/또는 제2 Fc 단편은 하나 이상의 치환을 포함하되, 1)상기 치환은 상기 중쇄와 융합 펩티드 사이에 염-다리 쌍을 형성하는데, 예를 들어 하나의 CH3 도메인은 하나 이상의 치환을 포함하고, 생리학적 조건에서 양전하를 띠는 아미노산 잔기에 의해 치환되며, 다른 CH3 도메인은 하나 이상의 치환을 포함하고, 생리학적 조건에서 음전하를 띠는 하나 이상의 아미노산 잔기에 의해 치환되며, 예를 들어 상기 양전하를 띠는 아미노산 잔기는 아르기닌(R), 히스티딘(H) 또는 라이신(K)이고, 예를 들어 상기 음전하를 띤 아미노산 잔기는 아스파르트산(D) 또는 글루탐산(E)일 수 있으며, 예를 들어 치환된 아미노산 잔기는 D356, L368, K392, D399 및 K409 중 하나 이상을 포함하는데, 예를 들어 표 7의 하나 이상의 치환이며, 2)상기 치환은 상기 중쇄와 융합 펩티드 사이에 이황화 결합을 형성하는데, 예를 들어 표 8의 치환이고, 및/또는 3)상기 치환은 Fc와 단백질 A 사이의 결합 능력을 현저히 감소시키고, 예를 들어 하나의 CH3 도메인에서의 H435 및 Y436은 표 9에 나타낸 바와 같이 각각 아르기닌 및 페닐알라닌으로 치환되며,

[0042] 바람직하게는,

[0043] a) 융합 펩티드의 CH3b와 중쇄의 CH3a는 knobs-into-holes 구조를 형성하는 치환 쌍을 갖고;

[0044] b) 융합 펩티드의 CH3b와 중쇄의 CH3a는 이온 결합을 형성하는 치환 쌍을 가지며;

[0045] c) 융합 펩티드의 CH3b와 중쇄의 CH3a는 이황화 결합을 형성하는 치환 쌍을 갖고; 및/또는

[0046] d) 융합 펩티드의 CH3b와 중쇄의 CH3a는 단백질 A와의 결합 능력을 감소시키는 치환을 가지며,

[0047] 바람직하게는, CH1은 서열번호 2의 서열을 포함하고; 및/또는 CL은 서열번호 1, 60-65 중 어느 하나로부터 선택되는 서열을 포함하며;

[0048] 바람직하게는, 상기 제1 Fc 단편 및/또는 제2 Fc 단편은 서열번호 6, 7, 66-71 중 어느 하나로부터 선택되는 서열의 CH2 및/또는 서열번호 8, 9, 11, 12, 72-76 중 어느 하나로부터 선택되는 서열의 CH3을 포함하고;

[0049] 바람직하게는, CH3a 및 CH3b의 서열은,

[0050] (1) 하나는 서열번호 8로 표시되고, 다른 하나는 서열번호 11로 표시되는 서열;

[0051] (2) 하나는 서열번호 9로 표시되고, 다른 하나는 서열번호 12로 표시되는 서열;

[0052] (3) 하나는 서열번호 72로 표시되고, 다른 하나는 서열번호 74로 표시되는 서열;

[0053] (4) 하나는 서열번호 9로 표시되고, 다른 하나는 서열번호 75로 표시되는 서열;

[0054] (5) 서열 중 하나는 서열번호 73으로 표시되고, 다른 하나는 서열번호 76으로 표시되는 서열로 이루어진 군으로부터 선택되고,

[0055] 바람직하게는, 상기 이중 특이적 항체는,

[0056] (1) 융합 펩티드, 중쇄 및 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되되, 상기 융합 펩티드는 서열번호 18, 서열번호 5, 서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 11을 포함하거나 이들로 구성되고; 상기 중쇄는 서열번호 14, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 8을 포함하거나 이들로 구성되며; 상기 경쇄는 서열번호 13 및 서열번호 1을 포함하거나 이들로 구성되는 이중 특이적 항체;

[0057] (2) 융합 펩티드, 중쇄 및 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되되, 상기 융합 펩티드는 서열번호 19, 서열번호 5, 서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 11을 포함하거나 이들로 구성되고; 상기 중쇄는 서열번호 14, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 8을 포함하거나 이들로 구성되며; 상기 경쇄는 서열번호 13 및 서열번호 1을 포함하거나 이들로 구성되는 이중 특이적 항체;

[0058] (3) 융합 펩티드, 중쇄 및 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되되, 상기 융합 펩티드는 서열번호 18, 서열번호 5,

서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 11을 포함하거나 이들로 구성되고; 상기 중쇄는 서열번호 16, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 8을 포함하거나 이들로 구성되며; 상기 경쇄는 서열번호 15 및 서열번호 1을 포함하거나 이들로 구성되는 이중 특이적 항체;

[0059] (4) 융합 펩티드, 중쇄 및 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되되, 상기 융합 펩티드는 서열번호 19, 서열번호 5, 서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 11을 포함하거나 이들로 구성되고; 상기 중쇄는 서열번호 16, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 8을 포함하거나 이들로 구성되며; 상기 경쇄는 서열번호 15 및 서열번호 1을 포함하거나 이들로 구성되는 이중 특이적 항체;

[0060] (5) 융합 펩티드, 중쇄 및 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되되, 상기 융합 펩티드는 서열번호 18, 서열번호 5, 서열번호 3, 서열번호 7 및 서열번호 12를 포함하거나 이들로 구성되며; 상기 중쇄는 서열번호 14, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 7 및 서열번호 9를 포함하거나 이들로 구성되며; 상기 경쇄는 서열번호 13 및 서열번호 1을 포함하거나 이들로 구성되는 이중 특이적 항체;

[0061] (6) 융합 펩티드, 중쇄 및 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되되, 상기 융합 펩티드는 서열번호 19, 서열번호 5, 서열번호 3, 서열번호 7 및 서열번호 12를 포함하거나 이들로 구성되고; 상기 중쇄는 서열번호 14, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 7 및 서열번호 9를 포함하거나 이들로 구성되며; 상기 경쇄는 서열번호 13 및 서열번호 1을 포함하거나 이들로 구성되는 이중 특이적 항체; 이중 특이적 항체;

[0062] (7) 융합 펩티드, 중쇄 및 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되되, 상기 융합 펩티드는 서열번호 18, 서열번호 5, 서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 8을 포함하거나 이들로 구성되고; 상기 중쇄는 서열번호 14, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 11을 포함하거나 이들로 구성되며; 상기 경쇄는 서열번호 13 및 서열번호 1을 포함하거나 이들로 구성되는 이중 특이적 항체;

[0063] (8) 융합 펩티드, 중쇄 및 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되되, 상기 융합 펩티드는 서열번호 19, 서열번호 5, 서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 8을 포함하거나 이들로 구성되고; 상기 중쇄는 서열번호 14, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 11을 포함하거나 이들로 구성되며; 상기 경쇄는 서열번호 13 및 서열번호 1을 포함하거나 이들로 구성되는 이중 특이적 항체;

[0064] (9) 융합 펩티드, 중쇄 및 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되되, 상기 융합 펩티드는 서열번호 18, 서열번호 5, 서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 8을 포함하거나 이들로 구성되고; 상기 중쇄는 서열번호 16, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 11을 포함하거나 이들로 구성되며; 상기 경쇄는 서열번호 15 및 서열번호 1을 포함하거나 이들로 구성되는 이중 특이적 항체;

[0065] (10) 융합 펩티드, 중쇄 및 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되되, 상기 융합 펩티드는 서열번호 19, 서열번호 5, 서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 8을 포함하거나 이들로 구성되고; 상기 중쇄는 서열번호 16, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 6 및 서열번호 11을 포함하거나 이들로 구성되며; 상기 경쇄는 서열번호 15 및 서열번호 1을 포함하거나 이들로 구성되는 이중 특이적 항체;

[0066] (11) 융합 펩티드, 중쇄 및 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되되, 상기 융합 펩티드는 서열번호 18, 서열번호 5, 서열번호 3, 서열번호 7 및 서열번호 9를 포함하거나 이들로 구성되고; 상기 중쇄는 서열번호 14, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 7 및 서열번호 12를 포함하거나 이들로 구성되며; 상기 경쇄는 서열번호 13 및 서열번호 1을 포함하거나 이들로 구성되는 이중 특이적 항체;

[0067] (12) 융합 펩티드, 중쇄 및 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되되, 상기 융합 펩티드는 서열번호 19, 서열번호 5, 서열번호 3, 서열번호 7 및 서열번호 9를 포함하거나 이들로 구성되고; 상기 중쇄는 서열번호 14, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 7 및 서열번호 12를 포함하거나 이들로 구성되며; 상기 경쇄는 서열번호 13 및 서열번호 1을 포함하거나 이들로 구성되는 이중 특이적 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 이중 특이적 항체.

[0068] 4. 핵산 조성물로서, 항목 1 내지 항목 3 중 어느 한 항목에 따른 이중 특이적 항체를 코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 바람직하게는,

[0069] 핵산 조성물은,

[0070] a) 항목 1 내지 항목 3 중 어느 한 항목에 정의된 EpCAM에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인 또는 경쇄-중쇄 쌍을 코딩하는 제1 핵산을 포함하는 제1 발현 벡터;

[0071] b) 항목 1 내지 항목 3 중 어느 한 항목에 정의된 CD3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인 또는 융합 펩티

드를 코딩하는 제2 핵산을 포함하는 제2 발현 벡터를 포함하는 핵산 조성물.

[0072] 5. 항목 4에 따른 핵산 조성물을 포함하는 발현 벡터.

[0073] 6. 항목 5에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

[0074] 7. 약학적 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 항목 1 내지 항목 3 중 어느 한 항목에 따른 이중 특이적 항체 및 약제학적 담체를 포함하고, 선택적으로 암(EpCAM 양성 종양, 예를 들어 결장직장암, 위암, 유방암, 난소암, 폐암(예를 들어, 비소세포폐암), 전립선암, 췌장암, 간암, 망막모세포종, 식도암, 신장암, 신장투명세포종, 피부 편평세포암종, 피부 기저세포암종, 육종, 비강내신경교종, 두개인두종, 갑상선암, 담관세포종, 방광암, 두경부종양, 자궁경부암 또는 구강암 등) 및/또는 악성 복수, 악성 삼출, 악성흉막삼출 등의 치료를 위한 약물(예를 들어, 저분자 약물 또는 고분자 약물)을 포함하며, 바람직하게는, 상기 약학적 조성물의 제형은 경구 투여 제형 또는 비경구 투여 제형을 포함하고; 더 바람직하게는, 상기 약학적 조성물의 제형은 정맥 주사, 정맥 점적 주사, 피하 주사, 국소 주사, 근육 주사, 종양내 주사, 복강내 주사, 두개내 주사 또는 강내 주사를 포함하는 주사제인 약학적 조성물.

[0075] 8. 접합체 또는 융합 단백질로서, 항목 1 내지 항목 3 중 어느 한 항목에 따른 이중 특이적 항체를 포함하고, 바람직하게는, 상기 이중 특이적 항체에 접합 또는 융합된 물질 A를 포함하며, 상기 물질 A는 치료제, 전구약물, 단백질(예를 들어, 효소), 바이러스, 지질, 생물학적 반응 조절제(예를 들어, 면역 조절제), PEG, 호르몬, 올리고뉴클레오티드, 진단제, 약물 또는 독소가 될 수 있는 세포독성제, 초음파 강화제, 비 방사성 마커, 화학 발광물질로 표지된 화합물(예를 들어, 루미놀, 이소루미놀, 열성 아크리디늄 에스테르(Thermal acridinium ester), 이미다졸, 아크리디늄염(Acridinium salt) 및 옥살산에스테르)과 같은 검출 가능한 마커, 또는 형광 발광 금속(예를 들어, 152Eu, 또는 란탄족 마커)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 접합체 또는 융합 단백질.

[0076] 9. 항목 1 내지 항목 3 중 어느 한 항목에 따른 이중 특이적 항체를 포함하고, 선택적으로, 암(EpCAM 양성 종양, 예를 들어 결장직장암, 위암, 유방암, 난소암, 폐암(예를 들어, 비소세포폐암), 전립선암, 췌장암, 간암, 망막모세포종, 식도암, 신장암, 신장투명세포종, 피부 편평세포암종, 피부 기저세포암종, 육종, 비강내신경교종, 두개인두종, 갑상선암, 담관세포종, 방광암, 두경부종양, 자궁경부암 또는 구강암 등) 및/또는 악성 복수, 악성 삼출, 악성흉막삼출 등의 치료를 위한 약물(예를 들어, 저분자 약물 또는 고분자 약물)을 포함하는 키트.

[0077] 10. 암의 치료, 또는 암 및/또는 악성 복수, 악성 삼출, 악성흉막삼출 등의 치료를 위한 약물 또는 키트의 제조에 있어서의 항목 1 내지 항목 3 중 어느 한 항목에 따른 이중 특이적 항체의 응용, 상기 암은 예를 들어 EpCAM 양성 종양, 예를 들어 결장직장암, 위암, 유방암, 난소암, 폐암(예를 들어, 비소세포폐암), 전립선암, 췌장암, 간암, 망막모세포종, 식도암, 신장암, 신장투명세포종, 피부 편평세포암종, 피부 기저세포암종, 육종, 비강내신경교종, 두개인두종, 갑상선암, 담관세포종, 방광암, 두경부종양, 자궁경부암 또는 구강암인 응용.

[0078] 11. 암 및/또는 악성 복수, 악성 삼출, 악성흉막삼출의 치료 방법으로서, 치료적 유효량의 항목 1 내지 항목 3 중 어느 한 항목에 따른 이중 특이적 항체를 대상체에 투여하는 단계를 포함하고, 상기 암은 EpCAM 양성 종양, 예를 들어 결장직장암, 위암, 유방암, 난소암, 폐암(예를 들어, 비소세포폐암), 전립선암, 췌장암, 간암, 망막모세포종, 식도암, 신장암, 신장투명세포종, 피부 편평세포암종, 피부 기저세포암종, 육종, 비강내신경교종, 두개인두종, 갑상선암, 담관세포종, 방광암, 두경부종양, 자궁경부암 또는 구강암인 방법.

[0079] 본 발명의 범위 내에서 본 발명의 상기 각 기술특징과 아래(예를 들어, 실시예)에서 구체적으로 설명되는 각 기술특징은 서로 조합되어 새롭거나 바람직한 기술적 해결수단을 구성할 수 있음을 이해해야 할 것이다. 편폭의 제한으로, 여기서 더 이상 일일이 반복하지 않는다.

[0080] 본 발명에서 사용된 용어는 당업자에 의해 이해되는 일반적인 의미를 갖는다. 본 기술분야에서 사용 및/또는 허용 가능한 상황에서, 하나의 용어는 2개 또는 2개 이상의 정의를 가질 경우, 본문에서 사용된 용어의 정의는 모든 의미를 포함한다.

[0081] 당업자는 항체의 CDR 영역이 항원에 대한 항체의 결합 특이성을 담당한다는 것을 이해할 것이다. 항체 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 서열을 알고 있는 경우, 현재 Kabat, IMGT, Chothia 및 AbM 넘버링 시스템을 포함하여 항체 CDR 영역을 결정하는 여러가지 유형의 방법이 있다. 그러나, 항체 또는 이의 변이체에 관한 각 유형의 CDR의 정의의 응용은 모두 본문에서 정의 및 사용된 용어의 범위 내에 속할 것이다. 만약 상기 항체의 가변 영역 아미노산 서열이 주어지면, 당업자는 일반적으로 상기 서열 자체 이외의 임의의 실험 데이터에 의존하지 않고 특정

CDR을 결정할 수 있다.

[0082] 본문에서 사용된 "항체" 또는 "항원 결합 단편"은 항원을 특이적으로 식별하고 이에 결합하는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 복합체를 의미한다. 용어 "항체"는 넓은 의미로 사용되며 면역 글로블린 또는 단클론 또는 다클론 인간 항체, 인간화 항체, 복합 항체, 키메라 항체 및 항체 단편을 포함하는 항체 분자를 포함한다. 따라서, 용어 "항체"는 특정 분자를 함유한 임의의 단백질 또는 펩티드를 포함하고, 상기 특정 분자는 적어도 일부분의 면역 글로불린 분자를 함유하며, 상기 면역 글로불린 분자는 항원에 결합하는 생물학적 활성을 갖는다. 이러한 경우의 구현예는 중쇄 또는 경쇄 또는 이의 리간드 결합 부분의 상보성 결정 영역(CDR), 중쇄 또는 경쇄 가변 영역, 중쇄 또는 경쇄 불변 영역, 프레임워크(FR) 영역 또는 이의 임의의 부분, 또는 결합 단백질의 적어도 일부분을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 본 발명에서, 항체에는 당업자가 잘 알고 있는 기술을 사용하여 제조된 쥐의 항체, 키메라 항체, 인간화 항체 또는 완전 인간 항체가 포함된다. 인간 및 비인간 부분을 포함하는 키메라 및 인간화 단클론 항체와 같은 재조합 항체는 본 분야에 잘 알려진 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 본 발명의 면역 글로블린 분자 또는 항체 분자는 임의의 유형(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 면역 글로블린 분자의 임의의 유형(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 아형일 수 있다.

[0083] 용어 "항체 단편" 또는 "항원 결합 단편"은, F(ab')2, F(ab)2, Fab', Fab, Fv, Fd, dAb, Fab/c, 상보성 결정 영역(CDR) 단편, 단쇄 Fvs(ScFv), dsFv(Disulfide-stabilized Fv fragment), (dsFv)2, 이중 특이적 dsFv(dsFv-dsFv'), 이중항체(Diabody), 이황화 결합이 안정한 이중항체(ds-Diabody), ScFv 다량체(예를 들어, ScFv 이량체, ScFv 삼량체), 하나 이상의 CDR을 포함하는 항체의 일부로 형성된 다중 특이적 항체, 나노항체, 단일 도메인 항체(sdab), 도메인 항체, 2가 도메인 항체, 또는 항원에 결합하지만 완전한 항체 구조를 포함하지 않는 임의의 기타 항체 단편을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 구조와 관계없이, 항원 결합 단편은 모항체 또는 모항체 단편과 결합한 동일한 항원에 결합할 수 있는 임의의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 복합체를 포함한다. 용어 "항체 단편"은 압타머(aptamer), 스피겔머(spiegelmers) 및 디아바디(diabodies)를 포함한다. 용어 "항체 단편"은 임의의 합성되거나 유전자 변형된 단백질도 포함하고, 이들은 항체처럼 특정된 항원에 결합되어 복합체를 형성할 수 있다. 일반적으로, 항체 단편은 본 발명의 항체의 적어도 약 50개의 연속 아미노산, 바람직하게는 적어도 약 50개의 연속 아미노산, 보다 바람직하게는 적어도 약 80개의 연속 아미노산, 가장 바람직하게는 적어도 약 100개의 연속 아미노산을 갖는다.

[0084] "단쇄 가변 단편" 또는 "scFv"는 면역 글로불린의 중쇄(VH) 및 경쇄(VL)의 가변 영역의 융합 단백질을 의미한다. 일부 양태에서, 이들 영역은 10개 내지 약 25개의 아미노산의 짧은 링커 펩티드로 연결된다. 상기 링커는 글리신이 풍부하여 유연성이 있고, 세린 또는 트레오닌을 함유하여 가용성이 있으며, VH의 N-말단을 VL의 C-말단에 연결시킬 수 있고, 반대로도 마찬가지이다. 상기 단백질은 불변 영역을 제거하고 링커를 도입한 것 뿐이고 원래의 면역 글로불린의 특성을 유지한다. ScFv 분자는 본 기술분야에서 공지된 것으로, 예를 들어 미국 특허 5,892,019에 설명되어 있다.

[0085] EpCAM과 CD3을 결합하는 항원 결합 도메인은 Fab, 또는 ScFv, 또는 중쇄 가변 영역(VH)-경쇄 가변 영역(VL) 사이 비공유 결합 쌍(Fv)이다. 임의의 상기 항체 또는 폴리펩티드는 추가적인 폴리펩티드를 더 포함할 수 있고, 예를 들어 분비를 가이드하기 위한 항체 N-말단의 신호 펩티드, 또는 정제용 6XHis 태그와 같은 본문에 따른 기타 이종 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 본 발명은 완전한 항체를 포함할 뿐만 아니라, 면역 활성을 갖는 항체의 단편 또는 항체와 기타 서열로 형성된 융합 단백질을 더 포함한다. 본 발명은 본 발명의 항체를 갖는 기타 단백질 또는 융합 발현 산물을 더 제공한다. 구체적으로, 본 발명은 가변 영역을 포함하는 중쇄 및 경쇄를 갖는 임의의 단백질 또는 단백질 접합체 및 융합 발현 산물(즉 면역 접합체 및 융합 발현 산물)을 포함하며, 상기 가변 영역은 본 발명의 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역과 동일하거나 적어도 90% 상동성, 바람직하게는 적어도 95% 상동성, 가장 바람직하게는 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 상동성을 가지기만 하면 된다. 따라서, 본 발명은 CDR이 본 발명의 CDR과 90% 이상(바람직하게는 95% 이상, 가장 바람직하게는 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상)의 상동성을 갖는 한, CDR을 갖는 단클론 항체 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 갖는 분자를 포함한다.

[0086] 본 발명은 상기 항체의 단편, 변이체, 유도체 및 유사체를 더 포함한다. 본 발명의 항체, 항원 결합 단편, 이들의 변이체 또는 유도체는 다클론 항체, 단클론 항체, 다중 특이적 항체(예를 들어, 이중 특이적 항체, 삼중 특이적 항체 등), 인간 항체, 동물 유래 항체, 인간화 항체, 영장류화(primatized) 항체, 또는 키메라 항체, CDR 이식 및/또는 변형 항체, 단쇄 항체(예를 들어, ScFv), 이중항체, 항원에피토프결합 단편, 예를 들어, Fab, Fab' 및 F(ab')2, Fd, Fv, 단쇄 Fv(ScFv), 단쇄 항체, dsFv, VL도메인 또는 VH 도메인을 포함한 단편, Fab발현 라이브러리에 의해 생성된 단편, 항-개별특이형(idiotypic)(항-Id) 항체를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 항체 단편, 항원 결합 단편, 유도체 또는 유사체는 (i) 하나 이상의 보존적 또는 비보존적 아미노산 잔기(바람직하게는, 보존적 아미노산 잔기)가 치환된 폴리펩티드일 수 있고, 이러한 치환된 아미노산 잔기는 유전자 코드에 의해 코딩되거나 코딩되지 않은 것일 수도 있으며, 또는 (ii) 하나 이상의 아미노산 잔기에 치환기가 있는 폴리펩티드, 또는 (iii) 성숙한 폴리펩티드와 다른 화합물(예를 들어, 폴리에틸렌글리콜과 같은 폴리펩티드의 반감기를 연장시키는 화합물)의 융합에 의해 형성된 폴리펩티드, 또는 (iv) 부가적인 아미노산 서열을 해당 폴리펩티드 서열에 융합하여 형성된 폴리펩티드(예를 들어, 리더 서열 또는 분비 서열 또는 해당 폴리펩티드를 정제하기 위한 서열 또는 단백질 서열, 또는 6XHis 태그와 형성된 융합 단백질)일 수 있다. 본문의 교시에 따르면, 이러한 단편, 유도체 및 유사체는 당업자에게 공지된 범위에 속한다.

[0087] 본 발명의 항체는 인간 EpCAM 및 CD3 결합 활성을 가지며, 상기 CDR 영역을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다. 상기 용어는 본 발명의 항체와 동일한 기능을 가지며, 상기 CDR 영역을 포함하는 폴리펩티드의 변이 형태도 포함한다. 이러한 변이 형태는 하나 이상(통상적으로 1~50개, 바람직하게는 1~30개, 보다 바람직하게는 1~20개, 가장 바람직하게는 1~10개)의 아미노산의 결실, 삽입 및/또는 치환, 및 C-말단 및/또는 N-말단에 대한 하나 이상(통상적으로 20개 이내, 바람직하게는 10개 이내, 보다 바람직하게는 5개 이내)의 아미노산의 추가를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 본 분야에서, 성능이 비슷하거나 유사한 아미노산으로 치환할 경우, 일반적으로 단백질의 기능은 변경되지 않는다. 또한, 예를 들어, C-말단 및/또는 N-말단에 하나 이상의 아미노산을 추가하여도 단백질의 기능은 일반적으로 변경되지 않는다. 상기 폴리펩티드의 변이 형태는 상동성 서열, 보존적 변이체, 대립유전자 변이체, 천연 돌연변이체, 유도 돌연변이체, 높거나 낮은 엄격한 조건에서 본 발명의 항체의 코딩 DNA와 혼성화될 수 있는 DNA에 의해 코딩된 단백질 및 본 발명의 항체에 대한 항혈청을 이용하여 얻은 폴리펩티드 또는 단백질을 포함한다.

[0088] 본 발명의 항체는 (i) 하나 이상의 보존적 또는 비보존적 아미노산 잔기(바람직하게는, 보존적 아미노산 잔기)가 치환된 폴리펩티드일 수 있고, 또는 (ii) 하나 이상의 아미노산 잔기에 치환기가 있는 폴리펩티드, 또는 (iii) 성숙한 폴리펩티드와 다른 화합물(예를 들어, 폴리에틸렌글리콜과 같은 폴리펩티드의 반감기를 연장시키는 화합물)의 융합에 의해 형성된 폴리펩티드, 또는 (iv) 부가적인 아미노산 서열을 해당 폴리펩티드 서열에 융합하여 형성된 폴리펩티드(예를 들어, 리더 서열 또는 분비 서열 또는 해당 폴리펩티드를 정제하기 위한 서열 또는 단백질 서열, 또는 6His 태그와 형성된 융합 단백질)일 수 있다. 본문의 교시에 따르면, 이러한 단편, 유도체 및 유사체는 당업자에게 공지된 범위에 속한다.

[0089] “보존적 아미노산 치환”은 그 중 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기에 의해 치환됨을 의미한다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 패밀리는 본 기술분야에서 이미 정의되었으며, 이는 염기성 측쇄(예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 전하를 띠지 않은 극성 측쇄(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), β-분지쇄의 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 포함한다. 따라서, 면역 글로불린 폴리펩티드의 비필수 아미노산 잔기는 바람직하게는, 동일한 측쇄 패밀리로부터 유래된 다른 아미노산 잔기에 의해 치환된다. 다른 일부 실시형태에서, 한 꿰미의 아미노산은 구조적으로 유사한 아미노산에 의해 치환될 수 있고, 후자는 순서적 및/또는 측쇄 패밀리의 구성적으로 상이하다.

[0090] 하기 표에서 보존적 아미노산 치환의 비제한적인 구현예를 제공하고, 여기서 유사성 점수가 0이거나 더 높으면 이 2개의 아미노산 사이에 보존적 치환이 있음을 의미한다.

[0091]

	C	G	P	S	A	T	D	E	N	Q	H	K	R	V	M	I	L	F	Y	W
W	-8	-7	-6	-2	-6	-5	-7	-7	-4	-5	-3	-3	2	-6	-4	-5	-2	0	0	17
Y	0	-5	-5	-3	-3	-3	-4	-4	-2	-4	0	-4	-5	-2	-2	-1	-1	7	10	
F	-4	-5	-5	-3	-4	-3	-6	-5	-4	-5	-2	-5	-4	-1	0	1	2	9		
L	-6	-4	-3	-3	-2	-2	-4	-3	-3	-2	-2	-3	-3	2	4	2	6			
I	-2	-3	-2	-1	-1	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4	2	5				
M	-5	-3	-2	-2	-1	-1	-3	-2	0	-1	-2	0	0	2	6					
V	-2	-1	-1	-1	0	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4						
R	-4	-3	0	0	-2	-1	-1	-1	0	1	2	3	6							
K	-5	-2	-1	0	-1	0	0	0	1	1	0	5								
H	-3	-2	0	-1	-1	-1	1	1	2	3	6									
Q	-5	-1	0	-1	0	-1	2	2	1	4										
N	-4	0	-1	1	0	0	2	1	2											
E	-5	0	-1	0	0	0	3	4												
D	-5	1	-1	0	0	0	4													
T	-2	0	0	1	1	3														
A	-2	1	1	1	2															
S	0	1	1	1																
P	-3	-1	6																	
G	-3	5																		
C	12																			

[0092] 일부 실시형태에서, 상기 보존적 치환은 바람직하게는 다음 그룹 (a)-(e)의 하나의 아미노산이 동일한 그룹에서의 다른 아미노산 잔기에 의해 치환되는 치환이다. (a) 작은 지방족, 비극성 또는 약한 극성 잔기: Ala, Ser, Thr, Pro 및 Gly; (b) 극성, 음전하를 띠는 잔기 및 이들의(전하를 띠지 않은) 아미드: Asp, Asn, Glu 및 Gln; (c) 극성, 양전하를 띠는 잔기: His, Arg 및 Lys; (d) 큰 지방족, 비극성 잔기: Met, Leu, Ile, Val 및 Cys; 및 (e) 방향족 잔기: Phe, Tyr 및 Trp.

[0093] 특히 바람직하게는, 보존적 치환은 다음과 같다. Ala가 Gly로 치환되거나 Ser로 치환되고; Arg가 Lys로 치환되며; Asn이 Gln으로 치환되거나 His로 치환되고; Asp가 Glu로 치환되며; Cys가 Ser로 치환되고; Gln이 Asn으로 치환되며; Glu가 Asp로 치환되고; Gly가 Ala로 치환되거나 Pro로 치환되며; His가 Asn으로 치환되거나 Gln으로 치환되고; Ile가 Leu로 치환되거나 Val로 치환되며; Leu가 Ile로 치환되거나 Val로 치환되고; Lys가 Arg, Gln으로 치환되거나 Glu로 치환되며; Met가 Leu, Tyr 또는 Ile로 치환되고; Phe가 Met, Leu 또는 Tyr로 치환되며; Ser가 Thr로 치환되고; Thr가 Ser로 치환되며; Trp가 Tyr로 치환되고; Tyr이 Trp로 치환되며; 및/또는 Phe가 Val, Ile 또는 Leu로 치환된다.

[0094] Fc 아미노산 번호은 Kabat 넘버링을 따른다. "Kabat 넘버링"은 Kabat 등에 의해 설명된 넘버링 시스템을 의미하고, 그 내용은 미국 보건 복지부, "Sequence of Proteins of Immunological Interest"(1983)에 기재되어 있다. 구체적인 번호는 하기 표와 같다.

[0095] Kabat 넘버링 시스템 기반의 Fc 아미노산 번호

216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241
E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F
242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267
L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S
268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293
H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E
294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319
E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y
320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345
K	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E
346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371
P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	D	E	L	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G
372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397
F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V
398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423
L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F
424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	
S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G	K	-	

[0096]

[0097] 여기서,

[0098] 제221-227위의 아미노산은 힌지(hinge) 도메인이고,

[0099] 제228-340위의 아미노산은 중쇄 제2 불변 영역 CH2 도메인이며,

[0100] 제341-447위의 아미노산은 중쇄 제3 불변 영역 CH3 도메인이다.

[0101] 항체를 변형시켜 이종이량체 페어링 효율을 향상시킬 수 있다. 예를 들어, 일부 양태에서, 상기 일가 유닛 중쇄의 Fc 단편 및/또는 상기 융합 펩티드의 Fc 단편은 야생형 항체 단편에 비해 하나 이상의 치환을 포함하고, 이러한 치환 사이에 knobs-into-holes 구조 쌍을 형성할 수 있다. knobs-into-holes 구조는 본 분야에서 공지된 것이다. 예를 들어 Ridgway 등의 "'Knob-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization," Protein Engineering 9(7):617-21 (1996)을 참조할 수 있다.

[0102] 일 양태에서, 하나의 CH3 도메인에서의 T366은 티로신(Y) 또는 트립토판(W)과 같은 상대적으로 큰 아미노산 잔기에 의해 치환된다. 다음, 다른 CH3 도메인에서의 Y407은 트레오닌(T), 알라닌(A) 또는 발린(V)과 같은 상대적으로 작은 아미노산 잔기에 의해 치환될 수 있다.

[0103] 표 6. 이종이량체 페어링 효율을 향상시키기 위해 Fc 아미노산 치환의 조합이 일가 유닛와 단쇄 유닛 사이에서 knobs-into-holes 구조 쌍을 형성

조합 순번	하나의 CH3 에서의 치환	다른 CH3 에서의 치환
1	T366W	Y407A
2	T366W	Y407V
3	T366Y	Y407A
4	T366Y	Y407V
5	T366W	T366S, L368A, Y407V

[0104]

[0105] 일 양태에서, 상기 CH3 도메인 중 하나는 하나 이상의 치환을 포함하고, 생리학적 조건에서 양전하를 띠는 아미노산 잔기에 의해 치환되며, 다른 CH3 도메인은 하나 이상의 치환을 포함하고, 생리학적 조건에서 음전하를 띠는 하나 이상의 아미노산 잔기에 의해 치환된다. 일 양태에서, 상기 양전하를 띠는 아미노산 잔기는 아르기닌(R), 히스티딘(H) 또는 라이신(K)일 수 있다. 다른 양태에서, 상기 음전하를 띤 아미노산 잔기는 아스파르트산(D) 또는 글루탐산(E)일 수 있다. 치환될 수 있는 아미노산 잔기는 D356, L368, K392, D399 및 K409를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0106] 표 7. 이종이량체 페어링 효율을 향상시키기 위해 CH3 아미노산 치환의 조합이 일가 유닛와 단쇄 유닛 사이에서 이온 결합을 형성

조합 순번	하나의 CH3 에서의 치환	다른 CH3 에서의 치환
1	D356K D399K	K392D K409D
2	L368R D399K	K392D K409D
3	L368K D399K	K392D K409D
4	L368R D399K	K409D
5	L368K D399K	K409D
6	L368R	K409D
7	L368K	K409D

[0107]

[0108] 일 양태에서, 하나의 CH3 도메인에서의 S354는 시스테인으로 치환되고, 다른 CH3 도메인에서의 Y349도 시스테인으로 치환되며, 2개의 치환된 위치의 잔기는 이황화 결합을 형성한다.

[0109] 표 8. 이종이량체 페어링 효율을 향상시키기 위해 CH3 아미노산 치환의 조합이 일가 유닛와 단쇄 유닛 사이에서 이황화 결합을 형성

조합 순번	하나의 CH3 에서의 치환	다른 CH3 에서의 치환
1	S354C	Y349C

[0110]

[0111] 일 양태에서, 하나의 CH3 도메인에서의 H435 및 Y436은 각각 아르기닌 및 페닐알라닌으로 치환되고, 상기 치환은 Fc와 단백질 A 사이의 결합 능력을 현저히 감소시킴으로써, 이종이량체와 동종이량체 사이에 상이한 단백질 A 결합 활성을 가지도록 하며, 친화성 크로마토그래피 과정에서 양자가 쉽게 분리되도록 한다.

[0112] 표 9. 하나의 CH3의 아미노산 치환에 의한 단백질 A에 대한 결합 능력 감소

조합 순번	CH3 에서의 치환
1	H435R, Y436F

[0113]

[0114] 본 발명의 일 바람직한 예에서, 이종이량체를 형성하는 Fc의 CH3 아미노산 서열은 하기 표에 나타낸 바와 같다.

CH3a 아미노산 서열	서열번호	CH3b 아미노산 서열	서열번호
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	72	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	74
GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	9	GQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	12
GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	9	GQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NRFTQKSLSLSPGK	75
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDS DGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	8	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCRVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDG SFFLASKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	11
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDS DGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	73	GQPREPQVYTLPPSRKELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	76
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	74	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	72
GQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	12	GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	9
GQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNRFTQKSLSLSPGK	75	GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	9
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCRVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKS DGSFFLASKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	11	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDG SFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	8
GQPREPQVYTLPPSRKELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	76	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDG SFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	73

[0115]

[0116] 본 발명의 일 실시예는 이종이량체 항체를 제공하고, 상기 항체는 2개의 상이한 항원 결합 폴리펩티드 유닛을 포함한다. 일부 양태에서, 상기 이종이량체는 대응되는 동종이량체와 크기가 다르며, 크기 차이를 이용하여 이종이량체 및 동종이량체의 분리를 촉진할 수 있다.

[0117] 일부 양태에서, 도 1에서와 같이, 이러한 2개의 항원 결합 폴리펩티드 유닛 중 하나는 야생형 항체와 유사한 경쇄-중쇄 쌍을 포함한다. 본 발명 전체에서, 상기 유닛은 "일가 유닛"이라고도 한다. 일부 양태에서, 도 1에서와 같이, 다른 항원 결합 폴리펩티드 유닛은 단쇄 가변 단편(ScFv)을 포함한다. 이러한 ScFv는 항체의 불변 단편(Fc)의 N-말단에 융합될 수 있는데, 이를 융합 펩티드라고 한다. 본 발명 전체에서 당해 융합 펩티드는 "단쇄 유닛"이라고도 한다.

[0118] 임의의 상기 항체 또는 폴리펩티드는 추가적인 폴리펩티드를 더 포함할 수 있고, 예를 들어, 본문에 따른 코딩된 폴리펩티드, 분비를 가이드하기 위한 항체 불변 영역의 신호 펩티드, 또는 본문에 따른 기타 이종 폴리펩티드이다. 본문에 따른 항체는 이들의 아미노산 서열이 천연적으로 존재하는 결합 폴리펩티드와 상이하도록 변형될 수 있고, 이들은 이러한 천연적으로 존재하는 결합 폴리펩티드로부터 획득된다. 예를 들어, 지정된 단백질로부터 유래된 폴리펩티드 또는 아미노산 서열은 개시 서열과 유사할 수 있는데, 예를 들어, 개시 서열과 소정의 백분율의 동일성을 갖고, 예를 들어, 개시 서열과 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성을 가질 수 있다. 이 밖에, "비필수" 아미노산 영역에서 보존적 치환 또는 변경을 진행하도록 뉴클레오티드 또는 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 진행할 수도 있다. 예를 들어, 하나 이상의 독립적인 아미노산의 치환, 삽입 또는 결실, 예를 들어 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 15개, 20개 또는 그 이상의 독

립적인 아미노산의 치환, 삽입 또는 결실을 제외하고 지정된 단백질로부터 유래된 폴리펩티드 또는 아미노산 서열은 작동 순서와 동일하다. 일부 실시예에서, 지정된 단백질로부터 유래된 폴리펩티드 또는 아미노산 서열은 개시 서열에 대해 1개 내지 5개, 1개 내지 10개, 1개 내지 15개 또는 1개 내지 20개의 독립적인 아미노산의 치환, 삽입, 또는 결실이 있다.

[0119] 본문에서 사용된 용어 "검출 가능한 태그"는 직접적으로 또는 간접적으로 검출 가능한 화합물 또는 조성물을 의미하고, 상기 화합물 또는 조성물은 "태그된" 조성물을 얻기 위해 검출될 조성물(예를 들어, 폴리뉴클레오티드 또는 항체와 같은 단백질)에 직접적으로 또는 간접적으로 결합된다. 상기 용어는 상기 폴리뉴클레오티드에 결합하는 서열을 지니고 삽입된 서열의 발현을 통해 신호를 제공하는 녹색형광단백질(GFP)과 같은 것을 포함한다. 상기 태그 자체는 검출(예를 들어, 방사성 동위원소 태그 또는 형광 태그) 가능하거나, 효소 태그의 경우 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변화를 촉매할 수 있으며, 이러한 변화는 검출될 수 있는 것이다. 상기 태그는 소규모 검출에 사용되거나 고속대량스크리닝에 더 적합할 수 있다. 마찬가지로, 적절한 태그는 방사성 동위원소, 형광염료, 화학 발광 화합물, 염료 및 단백질(효소 포함)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 상기 태그는 검출만 할 수도 있고, 정량화 할 수도 있다. 일반적으로 검출만 하는 반응에는 존재 여부만을 입증할 수 있는 반응이 포함되고, 여기서 일반적으로 정량화 할 수 있는 반응에는 강도, 분극 및/또는 기타 성질과 같은 정량화 가능한(예를 들어, 수치적으로 보고 가능한) 값을 갖는 반응이 포함된다. 발광 또는 형광 분석에서, 검출 가능한 반응은 성분 분석과 관련하여 실제적으로 결합에 관한 발광체 또는 형광단(fluorophore)을 직접적으로 사용하거나 다른(예를 들어, 리포터 분자 또는 지시약) 성분에 연결된 발광체 또는 형광단을 간접적으로 사용할 수 있다.

[0120] 일부 실시형태에서, 본 발명 상기 항체는 치료제(예를 들어, 시스플라틴, 카르보플라틴과 같은 화학요법제), 전구약물, 펩티드, 단백질, 효소, 바이러스, 지질, 생물학적 반응 조절제, 약제 또는 PEG에 결합될 수 있다. 본 발명의 항체는 치료제에 연결 또는 융합될 수 있고, 상기 치료제는 검출 가능한 마커, 예를 들어 방사성 마커, 면역 조절제, 호르몬, 효소, 올리고뉴클레오티드, 광활성 치료제 또는 진단제, 약물 또는 독소가 될 수 있는 세포독성제, 초음파 강화제, 비 방사성 마커, 이들의 조합 및 다른 이러한 본 기술분야에서 공지된 성분을 포함할 수 있다.

[0121] 일부 실시예에서, 항원 결합 폴리펩티드는 일반적으로 항체에 결합하지 않는 아미노산 서열 또는 하나 이상의 기를 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 단쇄 Fv 항체 단편은 유연한 링커 서열을 함유할 수 있거나, 관능기(예를 들어, 폴리에틸렌글리콜(PEG), 약물, 독소 또는 마커)를 추가하도록 변형될 수 있다. 본 발명의 항체, 이의 변이체 또는 유도체는 변형된 유도체를 포함하는데, 즉 임의의 유형의 분자가 항체에 공유 결합되고 상기 공유 결합은 항체가 항원 에피토프에 결합하는 것을 방해하지 않는다. 이 밖에, 상기 항체는 하나 이상의 비고전적 아미노산을 포함할 수 있다.

[0122] 실체의 개수를 명확하게 한정하지 않은 것은 하나 이상(종)의 상기 실체를 의미해야 한다는 점에 유의해야 하고; 예를 들어, "다기능성 항체"는 하나 이상(종)의 다기능성 항체를 나타내는 것으로 이해되어야 한다. 마찬가지로, 개수를 명확하게 한정하지 않은 용어 "하나 이상" 및 "적어도 하나"는 본문에서 호환하여 사용할 수 있다.

[0123] 본문에서 사용된 용어 "치료"는 대상체의 암의 진행과 같은 바람직하지 않은 생리적 변화 또는 질환을 예방하거나 늦추는(감소된) 치료적 치료 및 예방 또는 예방 조치를 의미한다. 유익하거나 필요한 임상 결과에는 증상 완화, 질환의 정도 감소, 질환의 상태 안정화(예를 들어, 악화 방지), 질환 진행 지연 또는 완화, 질환 상태 개선 또는 완화, 검출할 수 있는지 여부에 관계없이 (일부 또는 전체)를 완화시키는 것을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. "치료"는 또한 치료를 받지 않을 때 예상되는 생존기에 비해 생존기를 연장하는 것을 의미할 수도 있다. 치료가 필요한 상황에는 병증 또는 증상이 이미 있는 상황 및 병증 또는 증상이 쉽게 있을 수 있는 상황 또는 병증 또는 증상을 예방할 수 있는 상황을 포함한다.

[0124] "대상체" 또는 "개체" 또는 "동물" 또는 "환자" 또는 "포유동물"은 진단, 예후 또는 치료가 필요한 임의의 대상체, 특히 포유동물 대상체를 의미한다. 포유동물 대상체에는 인간, 가축, 농장 동물, 동물원, 운동장, 또는 개, 고양이, 기니피그, 토끼, 래트, 마우스, 쥐, 말, 소, 젖소, 영장류(예를 들어, 인간, 시노몰구스 원숭이, 마카크, 개코원숭이, 및 침팬지와 같은 원숭이 등)와 같은 애완 동물 등이 포함된다.

[0125] 본문에 따른 본 발명의 항원 결합 폴리펩티드, 변이체 또는 유도체는 암 또는 감염병과 관련된 특정 치료 및 진단 방법에 사용될 수 있다. 본 발명은 또한 본문에서 설명된 하나 이상의 질환 또는 상태의 치료를 위해 동물, 포유동물 및 인간과 같은 환자에게 본 발명의 이중 특이적 항체를 투여하는 것을 포함하는 항체 기반 치료에 관

한 것이다. 본 발명의 치료제는 본 발명의 항체(본문에 따른 이들의 변이체 및 유도체 포함) 및 핵산 또는 본 발명의 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(본문에 따른 이들의 변이체 및 유도체 포함)를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 항체는 악성 질환, 병증 또는 이러한 질환 또는 병증과 관련된 상태, 예를 들어 면역반응 관련 질환을 포함하는 질환, 병증 또는 상태를 치료, 억제 또는 예방하는 데 사용될 수도 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 항체는 면역억제제로서 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 항체는 자가면역질환을 치료하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 항원 결합 폴리펩티드, 이의 변이체 또는 유도체는 암, 특히 상기 또는 다음 단락에 나열된 암의 성장, 진행 및/또는 전이를 억제하는데 유용하다.

[0126] 본 발명의 항체 또는 이의 변이체 또는 유도체로 치료, 예방, 진단 및/또는 예상되는 세포 생존 증가와 관련된 다른 질환 또는 상태는, 암 또는 종양을 포함하지만 이에 한정되지 않고, 포함악성 종양의 진행 및/또는 전이, 및 EpCAM 양성 종양과 같은 관련 질환(예를 들어, 악성 복수, 악성흉막삼출, 악성심낭삼출)을 포함한다.

[0127] 항체, 이의 변이체 또는 유도체를 투여하는 방법은 피내, 근육내, 복강내, 정맥내, 피하, 비강내, 경막외 및 경구 경로를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 상기 항체 또는 조성물은 주입 또는 대용량 주사와 같은 임의의 편리한 경로를 통해 투여될 수 있고, 상피 또는 점막 및 피부 내층(예를 들어, 구강 점막, 직장 및 장 점막 등)을 통해 흡수될 수 있으며, 다른 생물학적 활성제와 함께 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명의 항체를 포함하는 약학적 조성물은 경구 투여, 직장 투여, 비경구 투여, 뇌내 투여, 질내 투여, 복강내 투여, 국소 투여(예를 들어, 분말제, 연고, 점적제 또는 경피 패치), 설하 투여 또는 구강 또는 비강 스프레이로 투여될 수 있다. 본 문에서 사용된 용어 "비경구 투여"는 정맥내, 근육내, 복강내, 흉골내, 피하 및 관절내 주사 및 주입을 포함하는 투여 방식을 의미한다. 투여는 전신 또는 국소 투여일 수 있다. 또한 본 발명의 항원 결합 폴리펩티드 또는 조성물을 치료가 필요한 영역에 국소 투여하는 것이 필요할 수 있는데, 예를 들어 수술 과정 중 국소 관류, 국소 적용, 수술 후 상처 드레싱과 결합, 주사, 카테터, 좌약, 또는 주입물을 통해 구현될 수 있지만 이에 한정되지 않으며, 상기 주입물은 다공성, 비다공성 또는 겔상 재료이고, 필름 또는 섬유를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 단백질(항체 포함)을 투여하는 경우 단백질을 흡수하지 않는 재료를 사용하도록 유의해야 한다.

도면의 간단한 설명

[0128] 도 1. YBODY 항체의 구조 모식도.

도 2. 이중 특이적 항체에 의해 매개된 HCT116 및 Jurkat 세포 결합 작용 검출. A부분: HCT116+Jurkat의 항체를 첨가하지 않은 음성 대조군의 유세포 분석 도면, 그 중 Q1은 CFSE로 염색된 Jurkat 세포, Q2는 공동 결합된 Jurkat 및 HCT116 세포, Q3은 PKH26으로 염색된 HCT116 세포, Q4는 염색되지 않은 세포; B부분: HCT116+Jurkat+M701A 10μg/ml의 실험군의 유세포 분석 도면, 각 상한의 특정화 의미는 상기와 같음; C부분: 상이한 항체에 의해 매개된 HCT116 및 Jurkat 세포 결합의 농도 구배 곡선.

도 3. 이중 특이적 항체의 생물학적 활성 검출(리포터 유전자 시스템).

도 4. 이중 특이적 항체에 의해 매개된 체외 살상 작용 검출. A부분: M701A가 B16-EpCAM에 대한 체외 살상; B부분: M701A가 B16에 대한 체외 살상; C부분: M701A가 HCT116에 대한 체외 살상; D부분: M701A가 OVCAR-3에 대한 체외 살상; E부분: 상이한 이중 특이적 항체가 CHO-K1-huEpCAM에 대한 체외 살상; F부분: 상이한 이중 특이적 항체가 HCT116에 대한 체외 살상.

도 5. HCT116 인간 결장암 모델에서 이중 특이적 항체의 체내 약효. A부분: 마우스종양 부피의 성장 변화 상황; B부분: 마우스 체중 변화 상황.

도 6. OVCAR-3 인간 난소암 모델에서 이중 특이적 항체의 체내 약효. A부분: 마우스종양 부피의 성장 변화 상황; B부분: 마우스 체중 변화 상황.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0129] 이하, 도면을 결부하여 본 발명의 방법 및 응용을 설명하며, 인용된 구현예는 본 발명을 설명하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위를 제한하려는 의도는 아니다. 당업자라면 본 발명의 구상을 벗어나지 않는 전제하에 여러가지 간단한 추론이나 대체가 가능하며 이들은 본 발명의 보호범위에 속한다고 간주하여야 할 것이다.

[0130] 실시예 1: 이중 특이적 항체의 발현 벡터 구축

[0131] EpCAM 및 CD3을 표적으로 하는 이중 특이적 항체의 구조는 항-EpCAM 결합 영역 및 항-CD3 결합 영역을 포함하고, 일가 유닛은 항-EpCAM 중쇄와 경쇄에 의해 형성된 쌍이며, 단쇄 유닛은 항-CD3의 ScFv-Fc 형태이고,

YBODY 구조로 정의되며(예를 들어, 도 1), 그 중 항-CD3의 VL은 링커를 통해 힌지 영역과 CH2에 연결된다. 여기서 일가 유닛의 중쇄 Fc와 단쇄 유닛(인간 IgG 중쇄 Fc를 골격으로 함)의 Fc는 아미노산 변이 변형을 거쳐, 각각 동종이량체(homodimer) 형성이 쉽지 않고 이종이량체(heterodimer) 형성이 용이하다. 기존의 플라스미드나 합성 유전자 단편을 주형으로 하여 이중 특이적 항체에 대응하는 각 사슬을 PCR 및 중첩 PCR을 통해 증폭시키고, 각 항체 사슬을 절단 결찰 또는 재조합의 방법을 통해 pcDNA3.1 벡터(Invitrogen Corporation)에 클로닝한다. 항체의 각 사슬의 구체적인 서열 정보는 표 1과 서열목록에 나타낸 바와 같다.

[0132] 표 1. 각 항체 분자에 대응되는 아미노산 서열 정보

이중 항체 번호	항-EpCAM 경쇄 SEQ ID NO		항-EpCAM 중쇄 SEQ ID NO					항-CD3 단쇄 SEQ ID NO				
	VL	CL	VH	CH1	Hinge	CH2	CH3a	ScFv	L2	Hinge	CH2	CH3b
M701	13	1	14	2	3	6	8	17	5	3	6	10
M701A	13		14			6	8	18			6	11
M701B	13		14			6	8	19			6	11
M701C	13		14			6	8	20			6	11
M701D	13		14			6	8	21			6	11
M701E	13		14			6	8	22			6	11
M701F	13		14			6	8	23			6	11
M701G	13		14			6	8	24			6	11
M701H	15		16			6	8	18			6	11
M701I	15		16			6	8	19			6	11
M701J	13		14			7	9	18			7	12
M701K	13		14			7	9	19			7	12

[0133]

[0134] 실시예 2: 이중 특이적 항체의 발현 및 정제

[0135] 플라스미드는 일반적인 플라스미드 추출 방법에 따라 추출되었으며 CHO-S 세포(Gibco에서 제공함)를 화학적으로 형질감염시키는 데 사용하였다. 37℃, 5%의 CO_2의 쉐이커에서 형질감염된 후의 세포를 7~10일 동안 현탁 및 진탕 배양하였다. 3000Xg으로 원심분리하여 상층액을 수확하고 0.22 μm의 멤브레인 필터로 여과하였다. 단백질 A 친화성 크로마토그래피를 통해 예비 정제된 이중 특이적 항체를 얻고, 정제된 단백질 농도는 280 nm에서의 UV 흡광도 및 이에 상응하는 흡광계수를 통해 측정하였으며, 항체의 순도는 고성능 크기 배제 크로마토그래피(HPLC-SEC)를 통해 테스트하였고, 각 단백질에 대응되는 발현량을 계산하였다. 이중 특이적 항체 분자의 발현량은 40 mg/L~91 mg/L이고, 초기 순도는 45%-81%이며, M701A, M701B, M701C, M701D, M701E, M701F, M701G, M701H, M701I, M701J 및 M701K의 발현량과 초기순도는 모두 M701보다 현저히 우수했다. 다음, 양이온 교환 크로마토그래피을 통해 친화성 시료에 대해 정제하여 최종적으로 HPLC-SEC 순도>95%의 이중 특이적 항체를 얻고, 각 이중 특이적 항체의 정제 회수율은 표 2와 같다.

[0136] 표 2. 이중 특이적 항체의 발현량 및 초기 HPLC-SEC 순도

항체 번호	발현량	HPLC-SEC	정제 회수율
M701	47.2 mg/L	45.91%	14%
M701A	90.8 mg/L	81.12%	57%
M701B	84.1 mg/L	78.53%	53%
M701C	54.4 mg/L	64.54%	32%
M701D	65.8 mg/L	58.63%	23%
M701E	49 mg/L	55.76%	22%
M701F	52.4 mg/L	66.32%	30%
M701G	41 mg/L	70.76%	25%
M701H	73.3 mg/L	72.03%	43%
M701I	80.6mg/L	73.21%	45%
M701J	87.7 mg/L	78.21%	47%
M701K	81.3mg/L	74.50%	41%

[0137]

[0138] 실시예 3: 이중 특이적 항체의 열 안정성 검출

[0139] 각 이중 특이적 항체의 정제된 샘플을 완충액(25 mM의 구연산+50 mM의 NaCl, pH6.0)으로 0.5 mg/ml로 희석하고, 100 μL/튜브로 1.5 mL의 EP 튜브에 분리하여 넣었으며, 40℃의 워터배스에 넣어 14일 동안 열 가속 실험을 수

행하고, 순도 및 친화력의 변화 상황을 검출하였다. 40℃의 워터배스에 넣은 당일을 D0로 기록하였고, 14일째를 D14로 기록하였다.

[0140] 아미노 커플링 방법을 사용하여 인간 EpCAM(SB, Cat: 10694-H08H) 및 인간 CD3 항원(SB, Cat: CT038-H2508H)을 각각 CM5 칩에 고정시켰고, 항원 커플링 양은 1500RU이며, 항원 말단 결합 활성을 검출할 때 1XHBS-EP+buffer를 사용하여 샘플을 초기 농도로 희석한 다음 4개의 농도로 2배 구배 희석하고, 컴퓨터로 저농도에서 고농도까지 검출하며, 결합 유속은 30 μL/min, 결합 시간은 120초, 해리 시간은 300초이고; pH1.5의 글리신(Glycine) 용액을 사용하여 칩을 재생하였으며, 재생 유속은 10 μL/min, 재생 시간은 30초였다. 검출이 완료된 후, Biacore T200 Evaluation Software 소프트웨어를 사용하여 1:1 바인딩(Binding) 피팅 방식으로 결과 스펙트럼에 대한 테이터 피팅을 수행하여 해리 평형 상수(KD)를 얻었다.

[0141] 그 결과는 표 3에 나타낸 바와 같고, M701A, M701B, M701H, M701I, M701J, M701K의 열 가속 14일차 순도의 감소는 5% 미만이며, 그 중 M701A, M701B, M701J, M701K의 순도 변화는 2%이고, 양단의 친화력은 기본적으로 변화가 없으며, 이는 M701A, M701B, M701J, M701K는 우수한 열 안정성을 가짐을 나타낸다.

[0142] 표 3. 이중 특이적 항체 열 가속 샘플의 순도 및 친화력 검출

[0143]

항체 번호	HPLC-SEC%		EpCAM-Biacore (K_D, nM)		CD3-Biacore (K_D, nM)	
	D0	D14	D0	D14	D0	D14
M701	95.21%	25.11%	19.17	n.d.	25.44	n.d.
M701A	95.80%	95.78%	17.11	17.28	21.15	21.07
M701B	95.63%	94.26%	20.01	22.61	28.27	31.52
M701C	95.34%	85.10%	18.57	n.d.	37.20	n.d.
M701D	95.87%	86.78%	14.39	n.d.	51.73	n.d.
M701E	96.03%	89.33%	23.14	n.d.	31.46	n.d.
M701F	95.48%	84.48%	17.94	n.d.	61.34	n.d.
M701G	95.22%	80.22%	19.71	n.d.	18.80	n.d.
M701H	95.07%	90.72%	51.56	60.91	95.26	100.4
M701I	95.57%	91.27%	49.78	57.05	40.03	45.56
M701J	95.60%	95.23%	18.23	18.67	23.45	23.56
M701K	95.05%	94.56%	21.05	22.58	28.78	30.63

[0144] 설명: n.d.는 검출되지 않음을 나타낸다.

[0145] 실시예 4: 이중 특이적 항체 EpCAM 말단 세포 친화력 검출

[0146] FACS 방법을 이용하여 인간 결장암 세포 HCT116(중국과학원 상하이 생명연구원)를 세포막 표면에 인간 EpCAM을 발현하는 양성 세포로 사용하여 항체와 세포 표면 인간 EpCAM의 친화력을 검출하였다.

[0147] 원심분리로 HCT116 세포를 수집하고, 완충액(PBS+1%의 FBS)에 재현탁한 다음 웰당 50 μL씩 96웰 플레이트에 2 X 10^5개 세포/웰을 첨가하였다. 그런 다음 350Xg으로 5분 동안 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. 이중 항체를 완충액으로 1000 nM로 희석하고, 구배 희석한 다음 50 μL/웰로 96웰 플레이트에 첨가하며, 재현탁한 후 어둠속에서 1시간 동안 배양하고, 원심분리한 후 상층액을 제거하며, 완충액으로 2회 세척한 다음 희석된 PE 표지 항-인간 IgG Fc항체(Biolegend, 409304)에 재현탁하고, 30분 동안 어둠속에서 배양하며, 완충액으로 2회 세척한 다음 100 μL의 완충액에 재현탁하고, 유세포 분석기(BD Accuri™ C6)를 통해 컴퓨터로 검출하였다.

[0148] 각 이중 특이적 항체는 모두 HCT116 세포와 유의한 결합 작용이 있고, 그 중 M700은 항-EpCAM 말단 단클론 항체 대조군(경쇄 서열번호 25 및 중쇄 서열번호 26)이며, 구체적인 EC50 값은 표 4에 나타낸 바와 같다.

[0149] 표 4. 이중 특이적 항체와 HCT116 세포의 결합 능력

[0150]

항체 번호	M700	M701	M701A	M701B	M701H	M701I	M701J	M701K
EC50(nM)	1.782	10.501	3.565	3.719	7.151	7.086	3.779	5.652

[0151] 실시예 5: 이중 특이적 항체 CD3 말단 친화력 검출(Biacore)

[0152] 아미노 커플링 방법을 사용하여 인간 CD3 항원(SB, Cat: CT038-H2508H)을 CM5 칩에 고정시켰고, 항원 커플링 양은 1500RU이며, CD3 항원 말단 결합 활성을 검출할 때 1XHBS-EP+buffer를 사용하여 샘플을 초기 농도로 희석한

다음 4개의 농도로 2배 구배 희석하고, 컴퓨터로 저농도에서 고농도까지 검출하며, 결합 유속은 30 μL/min, 결합 시간은 120초, 해리 시간은 300초이고; pH1.5의 글리신(Glycine) 용액을 사용하여 칩을 재생하였으며, 재생 유속은 10 μL/min, 재생 시간은 30초였다. 검출이 완료된 후, Biacore T200 Evaluation Software 소프트웨어를 사용하여 1:1 바인딩(Binding) 피팅 방식으로 결과 스펙트럼에 대한 테이터 피팅을 수행하여 해리 평형 상수(KD)를 얻었다. 표 5에 나타낸 바와 같이, 일련의 이중 특이적 항체는 모두 인간 CD3 항원과 결합 작용이 있다. 여기서, M701A 및 M701B의 항-EpCAM 항체 가변 영역의 서열은 동일하고(서열번호 13 및 서열번호 14), 항-CD3 항체 가변 영역의 서열은 각각 서열번호 18 및 서열번호 19이며, 대응하는 친화력은 각각 21.15 nM 및 28.27 nM였다. 그러나 항-EpCAM 항체 가변 영역의 서열은 다른 서열(서열번호 15 및 서열번호 16)로 변경되었고, 항-CD3 항체 가변 영역의 서열은 여전히 서열번호 18 및 서열번호 19이며, 대응되는 이중 특이적 항체 M701H 및 M701I의 친화력은 각각 95.26 nM 및 40.03 nM였다. 이는 상이한 항-EpCAM 항체와 상이한 항-CD3 항체가 조합하여 이중 특이적 항체를 형성하고 친화력 성능이 불규칙함을 설명한다.

[0153] 표 5. 각 이중 특이적 항체와 인간 CD3 항원의 결합 능력에 대한 Biacore검출

[0154]

항체 번호	M701	M701A	M701B	M701H	M701I	M701J	M701K
Kd(nM)	25.44	21.15	28.27	95.26	40.03	23.45	28.78

[0155] 실시예 6: 이중 특이적 항체에 의해 매개된 세포 가교 작용

[0156] EpCAM 양성 세포주인 HCT116은 PKH26으로 염색하고, CD3 양성 세포주인 Jurkat(중국과학원 상하이 생명연구원)은 CFSE로 염색하며, 1:1 비율(1X10^5개의 HCT116 세포: 1X10^5개의 Jurkat 세포)의 염색된 후의 세포에 구배 희석한 테스트할 항체를 첨가한 후 혼합하여 함께 배양하는데, 그 중 M700은 항-EpCAM 단클론 항체 대조군(경쇄 서열번호 25 및 중쇄 서열번호 26)이고, M100은 항-CD3단클론 항체 대조군(경쇄 서열번호 27 및 중쇄 서열번호 28)이며, Mco101은 항-루시퍼라제 및 항-CD3의 이중 특이적 항체이고, 이를 이중 특이적 항체의 CD3 말단 동형 대조군(경쇄 서열번호 29, 중쇄 서열번호 30 및 단쇄 서열번호 31, 구조는 도 1과 동일)으로 한다. 1시간 동안 함께 배양하고, 세척하고 재현탁한 후 유세포 분석기(BD Accuri™ C6)를 이용하여 컴퓨터로 검출하며, CFSE 및 PKH26 이중 양성 세포는 항체에 의해 가교된 HCT116 및 Jurkat 세포였다.

[0157] 그 결과는 도 2에 나타낸 바와 같고, Jurkat 및 HCT116 세포를 1:1의 비율로 혼합한 후 hIgG, M700, M100, Mco101을 첨가하여 1시간 동안 작용한 후, HCT116 및 Jurkat 세포는 가교되지 않았으며; 그러나 M701A 및 M701B를 첨가한 후, 가교된 세포는 PKH26 양성 세포 총수의 40% 정도를 차지하고, M701A와 M701B의 작용 활성은 동등하며, 이중 특이적 항체에 의해 매개된 세포 상호작용은 항체 농도와 양의 용량-효과 관계를 보였다.

[0158] 실시예 7: 이중 특이적 항체의 생물학적 활성 검출(리포터 유전자법)

[0159] Jurkat-CD3-NFAT-RE-Luc 세포(Promega)를 이용하여 이중 특이적 항체의 생물학적 활성을 검출하였다. 인간 EpCAM 유전자(NCBI 서열번호: NM_002354.3)를 코딩하는 DNA를 함유하는 pLV-puro(Inovogen Tech. Co., cat. No. VL3001) 벡터를 CHO-K1 세포에 형질감염시켜 인간 EpCAM을 안정적으로 발현하는 세포주 CHO-K1-huEpCAM를 얻고, CHO-K1-huEpCAM을 표적 세포로 수집하여 완충액(PBS+1%FBS)에서 재현탁하며, 올화이트 96웰 배양 플레이트에 4X10^4개 세포/웰을 첨가한 후 37℃, 5%의 CO_2 인큐베이터에 넣어 밤새 18~24시간 동안 배양하고, 플레이트의 배지를 옮겨 웰당 40 μL의 항체 희석액을 첨가하였다. 이펙터 세포인 Jurkat-CD3-NFAT-RE-Luc 세포를 취하고, 세포를 날려 단일 세포 현탁액을 제조하며, 효과세포 대 표적세포 비율 E:T=1.5:1에 따라, 올화이트 96웰 배양 플레이트에 웰당 40 μL, 즉 6X10^4개/웰을 첨가하여 플랭킹(planking)하고, 올화이트 96웰 배양 플레이트를 37℃, 5%의 CO_2 인큐베이터에 넣어 6시간 동안 배양하며, 웰당 80 μL의 Bio-Glo 루시퍼라제 검출용액을 첨가하고, 어둠속에서 실온에서 15분 동안 배양한 후, 다기능 판독기에 넣어 화학 발광을 사용하여 발광값을 판독하였다.

[0160] 그 결과는 도 3에 나타낸 바와 같고, 당해 리포터 유전자 평가 시스템에서는, 이중 특이적 항체 M701, M701A, M701B, M701H, M701I, M701J, M701K는 모두 생물학적 활성을 보였으며, M701A, M701J, M701K의 활성은 M701보다 강했다.

[0161] 실시예 8: 이중 특이적 항체에 의해 매개된 체외 살상 작용 검출

[0162] 분리하여 얻은 PBMC를 이펙터 세포로 사용하고 EpCAM 발현 세포를 표적 세포로 사용하여 이중 특이적 항체에 의

해 매개된 체외 살상 작용을 검출하였다. 인간 EpCAM 유전자(NCBI 서열번호: NM_002354.3)를 코딩하는 DNA를 함유하는 pLV-puro(Inovogen Tech. Co., cat. No. VL3001) 벡터를 마우스 흑색종 세포 B16 세포(중국과학원 상하이 생명연구원)에 형질감염시켜 인간 EpCAM을 안정적으로 발현하는 세포주 B16-EpCAM을 얻었는데, 그 중 B16는 EpCAM을 발현하지 않는 음성 세포이다. 기타 EpCAM 발현 표적 세포는 인간 결장암 세포 HCT116(중국과학원 상하이 생명연구원), 인간 난소암세포 OVCAR-3(CCTCC, China Center for Type Culture Collection) 및 CHO-K1-huEpCAM을 더 포함한다. 세포를 트립신을 사용하여 단일 세포 현탁액으로 소화시키고, 300 g으로 5분 동안 원심분리하여 세포를 수집하며, 세포를 5 μM의 하이드록시플루오레세인 디아세테이트 숙신이미딜 에스테르(5, 6-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester, CFSE)로 염색(37℃, 15분 동안)하고, 완전 배지를 2회 세척한 후 Vi-cell 세포 계수기로 계수한 다음 실험 설계에 따라 웰당 $2X10^4$개 세포/100 μL로 96웰 플레이트에 첨가하였다. 대응 농도의 항체를 50 μL/웰로 첨가하고, Cellometer세포 계수기에서 hPBMC를 계수한 다음 96웰 플레이트(웰당 $2X10^5$개 세포/50 μL, 효과세포 대 표적세포 비율은 10:1임)에 넣었다. 세포 배양 플레이트를 세포 인큐베이터에 넣어 72시간 동안 배양하고, 세포를 단일 세포 현탁액으로 소화시킨 후 최종 농도가 1 μg/mL인 요오드화 프로피듐(Propidium iodide, PI) 용액을 첨가하여 10분 동안 배양한 후 유세포 분석기(BD Accuri™ C6)를 이용하여 컴퓨터로 검출하며, CFSE+양성 세포 중 CFSE+PI+이중 양성 세포의 비율을 분석하였다.

[0163] 도 4의 A부분 및 도 4의 B부분에 도시된 바와 같이, M701A는 EpCAM 발현이 있는 B16-EpCAM 세포에만 살상 작용이 있고, EpCAM 발현이 없는 B16 세포에는 살상 작용이 없는 반면, 대조 항체 Mco101은 어떠한 세포에도 살상 작용이 없어 이중 특이적 항체가 표적 효과가 있음을 설명한다. 도 4의 C부분 및 도 4의 D부분에 도시된 바와 같이, M701A는 HCT116 및 OVCAR-3 세포 모두에 대해 유의한 살상 작용이 있고, 대조군 Mco101보다 강했다. 도 4의 E부분에 도시된 바와 같이, 이중 특이적 항체 M701A, M701B, M701H, M701I는 모두 CHO-K1-huEpCAM 세포에 대해 유의한 살상 작용이 있고, M701A 및 M701B의 작용은 M701H 및 M701I보다 현저히 강했다. 도 4의 F부분에 도시된 바와 같이, 이중 특이적 항체 M701J, M701K는 모두 HCT116 세포에 대해 유의한 살상 작용이 있고, 살상 EC50은 모두 7.814~25.43 ng/ml이며, M701J의 살상 수준은 M701A의 살상 수준과 크게 다르지 않았다. 상기 이중 특이적 항체의 살상 활성은 모두 M701(M701의 EC50은 69.17 ng/ml)보다 현저히 강했다.

[0164] 실시예 9: HCT116 인간 결장암 이소성 이종이식 종양 모델에서 이중 특이적 항체의 체내 약효

[0165] 배양 조건에 따라 충분한 양의 HCT116 세포와 이펙터 세포 CIK(cytokine-induced killer, 시토카인 유도 살상 세포로서, 이는 인간 말초혈액 단핵세포를 다양한 시토카인과 함께 일정 시간 동안 체외에서 배양하여 얻은 이종 세포군이다. 상기 유형의 세포는 CD3+ 및 CD56+의 두 가지 막 단백질 분자를 모두 발현하므로 NK 세포 유사 T 림프구라고도 함)를 배양하고, 세포를 수집하여 계수하였다. 미리 혼합된 HCT116 세포($2X10^6$ 세포/마리)와 CIK($2X10^6$ 세포/마리)를 각 마우스의 우측 등에 0.1 ml/마리의 접종 부피로 접종하여 인간 결장암 HCT116 이종이식 종양 모델을 구축하였다. 접종 후 1시간 후에 투여 및 치료를 시작하였다. 실험은 테스트 약물 2 mg/kg의 M701A군, 1 mg/kg의 M701A 군, 1 mg/kg의 M701군, 단클론 항체 대조군 2 mg/kg의 M700군 및 용매 대조군(생리식염수)으로 나누어 진행하고, 각 군당 8마리의 마우스를 사용하였다. 꼬리 정맥 투여는 접종 후 0, 2, 4일차에 총 3회 투여하였다. 효능은 상대 종양 억제율과 완전 종양 퇴행률을 기준으로 평가하고, 안정성은 동물 체중 변화 및 사망 정황을 통해 평가했다.

[0166] 종양 크기 계산 공식: 종양 부피(mm^3) = 0.5 X (종양의 긴 직경 X 종양의 짧은 직경^2).

[0167] 상대 종양 억제율 TGI(%): TGI = 1 - T/C(%). T와 C는 각각 특정 시간에서의 치료군과 대조군의 종양 부피(TV)이다. 계산 공식은 다음과 같다. T/C% = T_{TV} / C_{TV} X 100%(T_{TV}: 치료군의 평균 종양 부피; C_{TV}: 용매 대조군의 평균 종양 부피).

[0168] 완전 종양 퇴행률(complete regression): 치료과정에서 또는 치료 후 종양의 종양 부피가 $63mm^3$ 미만인 것으로 정의된다. 완전 종양 퇴행률(%) = 한 군에서 완전 퇴행에 도달한 동물 수 / 당해 군의 총 동물 수 X 100%.

[0169] 도 5의 A부분에 도시된 바와 같이, 테스트 약물 M701A(2 mg/kg, 1 mg/kg)는 치료군에서 약물 중단 후 30일째(즉 접종후 33일째)에 모두 현저한 종양 억제 작용을 나타냈으며, 상대 종양 억제율 TGI(%)는 각각 100% 및 93.82%였다. 용매 대조군과 비교하면 통계적으로 모두 현저한 차이가 있었으며(p 값은 모두 <0.001), 두 군에서 M701A(2 mg/kg)군의 모든 종양은 완전 퇴행 기준에 도달했다. 이 두 가지 용량에서 M701A의 약효는 모두 2 mg/kg의 M700(p 값<0.001)보다 현저히 우수하고, 동일한 용량에서 M701A의 약효는 M701(모두 1 mg/kg)보다 현

저히 우수했다. 도 5의 B부분에 도시된 바와 같이, 치료과정에서 동물의 체중은 모두 감소하지 않았으며, 약물 독성을 보이지 않았다.

[0170] 동일한 종양 모델에서 M701B, M701J 및 M701K는 동일한 용량에서 모두 M701A와 유사한 종양 억제 효과를 나타냈으며 체중 감소는 없었다.

[0171] 실시예 10: OVCAR-3 인간 난소암 이소성 이종이식 종양 모델에서 이중 특이적 항체의 체내 약효

[0172] 배양 조건에 따라 충분한 양의 OVCAR-3 세포와 이펙터 세포 CIK를 배양하고, 세포를 수집하여 계수하였다. 미리 혼합된 OVCAR-3 세포($1X10^7$ 세포/마리)와 CIK($1X10^7$ 세포/마리)를 각 마우스의 우측 등에 0.2ml/마리의 접종 부피, 50%(0.1 ml/마우스) 함량의 Matrigel을 접종하여 인간 난소암 OVCAR-3 이종이식 조양 모델을 구축하였다. 접종 후 1시간 후에 투여 및 치료하고, 실험은 테스트 약물 M701A(5 mg/kg), CD3 말단 동형 대조군 Mco101(5 mg/kg), 단클론 항체 대조군 M700(5 mg/kg)군 및 용매 대조군(생리식염수) 으로 나누어 진행하고, 각 군당 8마리의 마우스를 사용하였다. 꼬리 정맥 투여는 접종 후 0, 2, 4일차에 총 3회 투여하였다. 효능은 상대 종양 억제율과 완전 종양 퇴행률을 기준으로 평가하고, 안정성은 동물 체중 변화 및 사망 정황을 평가했다.

[0173] 도 6의 A부분에 도시된 바와 같이, 테스트 약물 M701A(5 mg/kg)는 치료군에서 약물 중단 후 44일째(즉 접종 후 48일째)에 모두 현저한 종양 억제 작용을 나타냈으며, 상대 종양 억제율 TGI(%)는 98.97%였다. 용매 대조군과 비교하면 통계적으로 모두 현저한 차이가 있었으며(p 값은 모두 <0.001), M701A(5 mg/kg)군의 완전 종양 퇴행률은 87.5%이고, 상기 군의 약효는 5 mg/kg의 M700(TGI = 70.42%)(p 값<0.001) 및 5 mg/kg의 Mco101(TGI = 68.87%)(p 값<0.001)보다 현저히 우수했다. 도 6의 B부분에 도시된 바와 같이, 치료과정에서 동물의 체중은 모두 감소하지 않았으며, 약물 독성을 보이지 않았다.

[0174] 동일한 종양 모델에서 M701B, M701J 및 M701K는 동일한 용량에서 모두 M701A와 유사한 종양 억제 효과를 나타냈으며 체중 감소는 없었다.

[0175] 본 발명에서 언급된 모든 문헌은 각 문헌이 단독으로 참조로서 인용된 것처럼 본 발명에 참조로서 인용된다. 이 밖에, 본 발명의 상기 교시 내용을 열독한 후, 당업자는 본 발명에 대해 다양한 변경 또는 수정을 가할 수 있으며, 이러한 등가 형태도 본 발명의 첨부된 특허청구범위에 의해 한정된 범위 내에 속함을 이해해야 한다.

[0176] 서열목록

명칭	아미노산 서열
경쇄 불변 영역 CL 서열번호 1	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
경쇄 불변 영역 CL 서열번호 60	GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
경쇄 불변 영역 CL 서열번호 61	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
경쇄 불변 영역 CL 서열번호 62	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPAKAGVETTTPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
경쇄 불변 영역 CL 서열번호 63	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAWKADGSPVNTGVETTTPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECS
경쇄 불변 영역 CL 서열번호 64	GQPKAAPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAWKADSSPAKAGVETTTPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
경쇄 불변 영역 CL 서열번호 65	GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
중쇄 불변 영역 CH1 서열번호 2	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
힌지 영역 Hinge 서열번호 3	EPKSCDKTHTCPPCP
연결 펩티드 1(L1) 서열번호 4	GGGGSGGGGSGGGGS
연결 펩티드 2(L2) 서열번호 5	GAAA
중쇄 불변 영역 CH2 서열번호 6	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
중쇄 불변 영역 CH2 서열번호 7	APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEAPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK

[0177]

[0178]

중쇄 불변 영역 CH2 서열번호 66	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK
중쇄 불변 영역 CH2 서열번호 67	APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAK
중쇄 불변 영역 CH2 서열번호 68	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
중쇄 불변 영역 CH2 서열번호 69	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
중쇄 불변 영역 CH2 서열번호 70	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
중쇄 불변 영역 CH2 서열번호 71	APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK
중쇄 불변 영역 CH3 서열번호 8	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGS FFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
중쇄 불변 영역 CH3 서열번호 9	GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
중쇄 불변 영역 CH3 서열번호 10	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
중쇄 불변 영역 CH3 서열번호 11	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCRVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGS FFLASKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
중쇄 불변 영역 CH3 서열번호 12	GQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
중쇄 불변 영역 CH3 서열번호 72	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
중쇄 불변 영역 CH3 서열번호 73	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYD TTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK

중쇄 불변 영역 CH3 서열번호 74	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
중쇄 불변 영역 CH3 서열번호 75	GQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK
중쇄 불변 영역 CH3 서열번호 76	GQPREPQVYTLPPSRKELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
항-EpCAM VL(1)	ELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESG VPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLEIK(서열번호 1 3)(밑줄 친 부분은 CDR) CDRL1: KSSQSLLNSGNQKNYLT (서열번호 32) CDRL2: WASTRES (서열번호 33) CDRL3: QNDYSYPLT(서열번호 34)
항-EpCAM VH(1)	EVQLLEQSGAELVRPGTSVKISCKASGYAFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIFPGSGNIHYNE KFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTFEDSAVYFCARLRNWDEPMDYWGQGTTVTVSS(서열 번호 14)(밑줄 친 부분은 CDR) CDRH1: GYAFTNYWLG (서열번호 35) CDRH2: DIFPGSGNIHYNEKFKG (서열번호 36) CDRH3: LRNWDEPMDY (서열번호 37)
항-EpCAM VL(2)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLIIYGASTTASGIPARFS ASGSGTDFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPPAYTFGQGTKLEIK(서열번호 15)(밑 줄 친 부분은 CDR) CDRL1: RASQSVSSNLA (서열번호 38) CDRL2: GASTTAS (서열번호 39) CDRL3: QQYNNWPPAYT (서열번호 40)
항-EpCAM VH(2)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQK FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLLWNYWGQGTLVTVSS(서열번호 1 6)(밑줄 친 부분은 CDR) CDRH1: SYAIS (서열번호 41) CDRH2: GIIPIFGTANYAQKFQG (서열번호 42) CDRH3: GLLWNY (서열번호 43)
항-CD3 ScFv(1)	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQK FKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGG GGSGGGGSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAS GVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINR(서열번호 1 7)(밑줄 친 부분은 CDR)

[0179]

항-CD3 ScFv(2)	DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQK FKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGG GGSGGGGSDIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVAS GVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK(서열번호 1 8)(밑줄 친 부분은 CDR) CDRH1: GYTFTRYTMH (서열번호 44) CDRH2: YINPSRGYTNYNQKFKD (서열번호 45) CDRH3: YYDDHYCLDY (서열번호 46) CDRL1: RASSSVSYMN (서열번호 47) CDRL2: DTSKVAS (서열번호 48) CDRL3: QQWSSNPLT (서열번호 49) VH: DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTN YNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS (서열번호 50) VL: DIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPY RFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK (서열번호 51)
항-CD3 ScFv(3)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYA DSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGL IGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKVEIK(서 열번호 19)(밑줄 친 부분은 CDR) CDRH1: GFTFSTYAMN (서열번호 52) CDRH2: RIRSKYNNYATYYADSVKD (서열번호 53) CDRH3: HGNFGNSYVSWFAY (서열번호 54) CDRL1: RSSTGAVTTSNYAN (서열번호 55) CDRL2: GTNKRAP (서열번호 56) CDRL3: ALWYSNLWV (서열번호 57) VH: QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYA TYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVT VSS (서열번호 58) VL: QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPG VPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKVEIK (서열번호 5 9)
항-CD3 ScFv(4)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQK VKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGTPVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLAS GVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKVEIKR(서열번호 2 0)(밑줄 친 부분은 CDR)

[0180]

항-CD3 ScFv(5)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFPMAWVRQAPGKGLEWVSTISTSGGRTYYRDS VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKFRQYSGGFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSDIQLTQPNSVSTSLGSTVKLSCTLSSGNIENNYVHWYQLYEGRSPTTMIYDDDKR PDGVPDRFSGSIDRSSNSAFLTIHNVAIEDEAIYFCHSYVSSFNVFGGGTKLTVLRQP(서열 번호 21)(밑줄 친 부분은 CDR)
항-CD3 ScFv(6)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFKFSGYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKKYYVDS VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQMGYWHFDLWGRGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLTFGGGTKVEIKR(서열번호 22)(밑줄 친 부분은 CDR)
항-CD3 ScFv(7)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPRSGYTHYNQK LKDKATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSAYYDYDGFAYWGQGTLVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQKPGKAPKRLIYDTSKLA SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGGGTKVEIKR(서열번호 23)(밑줄 친 부분은 CDR)
항-CD3 ScFv(8)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQK FKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGQGTLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTS RLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIK(서열번 호 24)(밑줄 친 부분은 CDR)

[0181]

[0182]

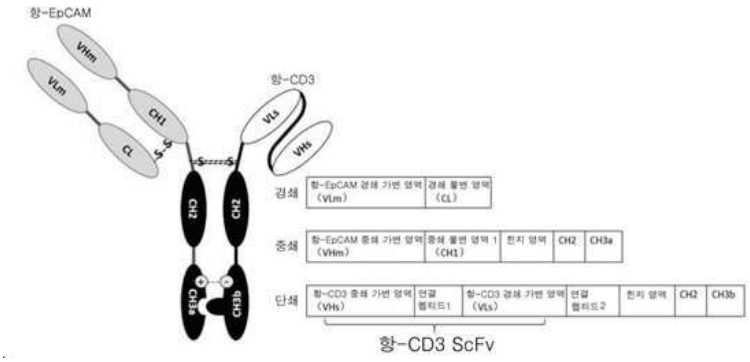
대조 항체 명칭	아미노산 서열
M700 단클론 항체	경쇄(서열번호 25) ELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDR FTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC 중쇄(서열번호 26) EVQLLEQSGAELVRPGTSVKISCKASGYAFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIFPGSGNIHYNEKFKG KATLTADKSSSTAYMQLSSLTFEDSAVYFCARLRNWDEPMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0183]

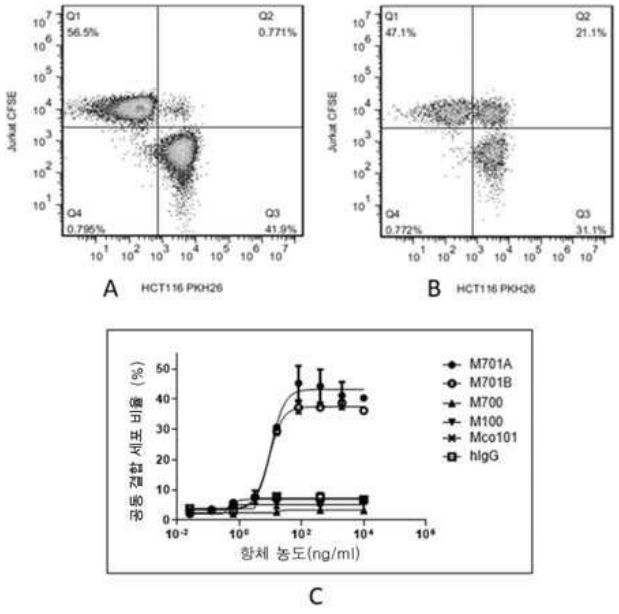
M100 단클론 항체	경쇄(서열번호 27) DIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSG TSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC 중쇄(서열번호 28) DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDK ATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Mco101	경쇄(서열번호 29) DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLRWYLQKPGQSPKVLIYKVSNRFSGVPDRF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC 중쇄(서열번호 30) EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDSVK GRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSD GSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 단쇄(서열번호 31) DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDK ATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGS DIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSG TSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKGAAAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCRVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLASKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK

도면

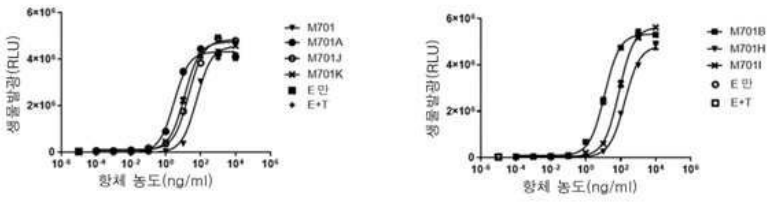
도면1



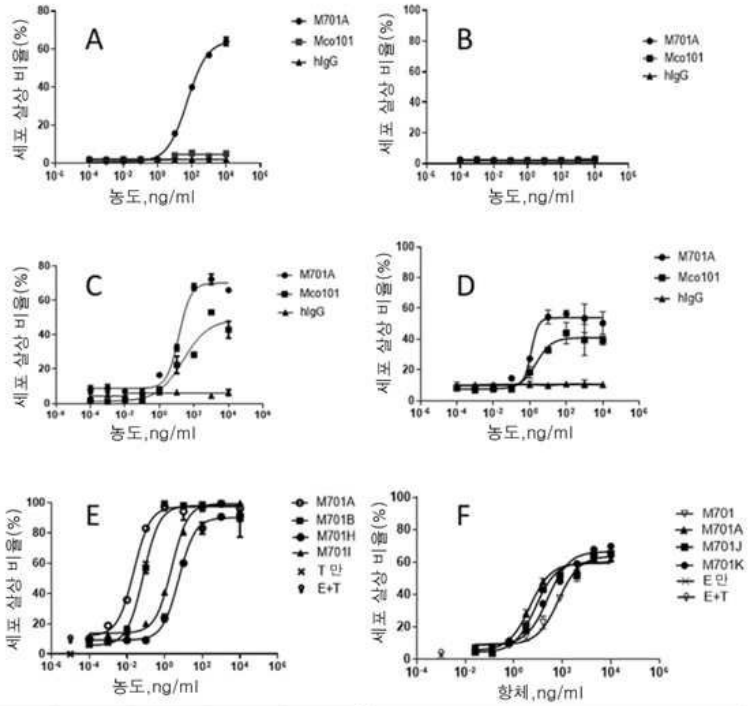
도면2



도면3



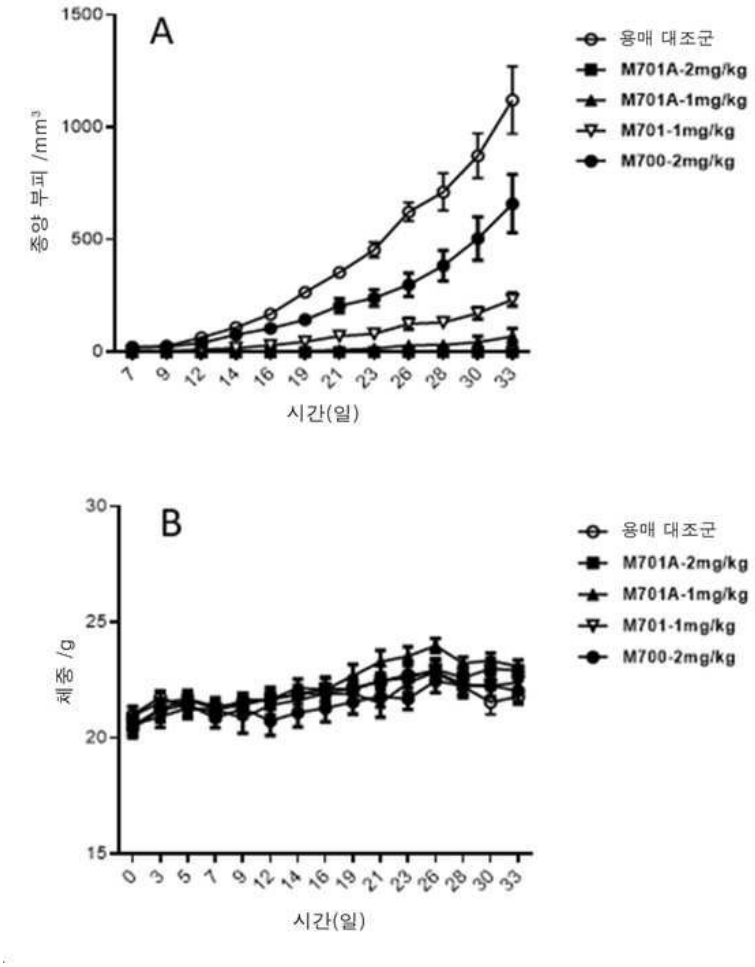
도면4



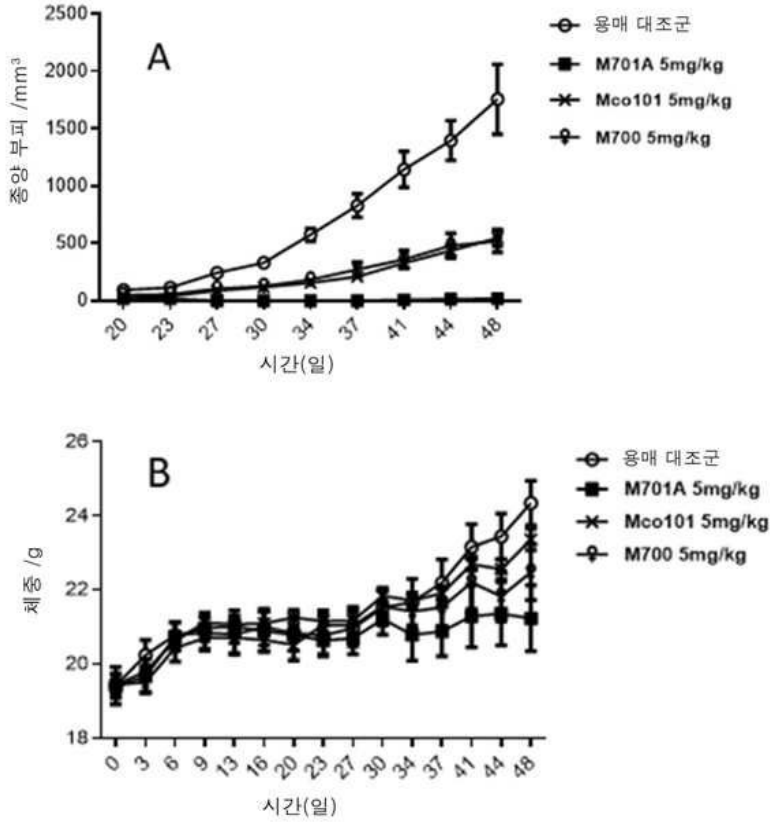
	M701A	M701B	M701H	M701I
EC50	0.02315	0.07447	5.657	2.343

	M701	M701A	M701J	M701K
EC50	69.17	4.561	7.814	25.43

도면5


A
종양 부피 /mm³
1500
1000
500
0
7 9 12 14 16 19 21 23 26 28 30 33
시간(일)
용매 대조군
M701A-2mg/kg
M701A-1mg/kg
M701-1mg/kg
M700-2mg/kg
B
체중 /g
30
25
20
15
0 3 5 7 9 12 14 16 19 21 23 26 28 30 33
시간(일)
용매 대조군
M701A-2mg/kg
M701A-1mg/kg
M701-1mg/kg
M700-2mg/kg

도면6



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Wuhan YZY Biopharma Co., Ltd.

<120> BISPECIFIC ANTIBODY AND USE THEREOF

<130> IP210557

<160> 76

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of light chain constant region CL

<400> 1

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 2

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of heavy chain constant region CH1

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Val

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of hinge region

<400> 3

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

1 5 10 15

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of linker peptide 1

<400> 4

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

1 5 10 15

<210> 5

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of linker peptide 2

<400> 5

Gly Ala Ala Ala

1

<210> 6

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of heavy chain constant region CH2

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100 105 110

<210> 7
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Amino acid sequence of heavy chain constant region CH2
<400> 7
Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
1 5 10 15
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
20 25 30

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

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys
100 105

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of heavy chain constant region CH3

<400> 8

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Asp Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

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

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of heavy chain constant region CH3

<400> 9

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

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

<210> 10
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Amino acid sequence of heavy chain constant region CH3
<400> 10
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105
<210> 11
<211> 107

<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of heavy chain constant region CH3

<400> 11

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

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

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of heavy chain constant region CH3

<400> 12

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

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60
Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

<210> 13
<211> 113

<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Amino acid sequence of anti-EpCAM light chain variable region
<400> 13
Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

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

Lys

<210> 14
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Amino acid sequence of anti-EpCAM heavy chain variable region
<400> 14

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 15
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Amino acid sequence of anti-EpCAM light chain variable region
<400> 15
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Ile Ile

35 40 45
Tyr Gly Ala Ser Thr Thr Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Ala
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Pro

85 90 95

Ala Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 16

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of anti-EpCAM heavy chain variable region

<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Leu Leu Trp Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 17

<211> 241

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of anti-CD3 ScFv

<400> 17

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

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

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

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

225 230 235 240
Arg

<210> 18

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of anti-CD3 ScFv

<400> 18

Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
130 135 140

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
145 150 155 160

Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser
165 170 175

Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro
180 185 190

Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile

195 200 205

Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp

210 215 220

Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

225 230 235 240

<210> 19

<211> 249

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of anti-CD3 ScFv

<400> 19

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe

225 230 235 240

Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

245

<210> 20

<211> 241

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of anti-CD3 ScFv

<400> 20

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Val

50 55 60

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe

65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Arg

<210> 21

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of anti-CD3 ScFv

<400> 21

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Thr Ile Ser Thr Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Phe Arg Gln Tyr Ser Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Pro Asn Ser Val
130 135 140

Ser Thr Ser Leu Gly Ser Thr Val Lys Leu Ser Cys Thr Leu Ser Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ile Glu Asn Asn Tyr Val His Trp Tyr Gln Leu Tyr Glu Gly
165 170 175

Arg Ser Pro Thr Thr Met Ile Tyr Asp Asp Asp Lys Arg Pro Asp Gly
180 185 190

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Asp Arg Ser Ser Asn Ser Ala
195 200 205

Phe Leu Thr Ile His Asn Val Ala Ile Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe
210 215 220

Cys His Ser Tyr Val Ser Ser Phe Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

Leu Thr Val Leu Arg Gln Pro
245

<210> 22

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of anti-CD3 ScFv

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gln Met Gly Tyr Trp His Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg

210 215 220

Ser Asn Trp Pro Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile

225 230 235 240

Lys Arg

<210> 23

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of anti-CD3 ScFv

<400> 23

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Gly Tyr Thr His Tyr Asn Gln Lys Leu
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser
130 135 140

Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala
145 150 155 160

Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
165 170 175

Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val
180 185 190

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
195 200 205

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

210 215 220

Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile

225 230 235 240

Lys Arg

<210> 24

<211> 244

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of anti-CD3 ScFv

<400> 24

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys

165 170 175

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

180 185 190

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr

195 200 205

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

210 215 220

Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys

225 230 235 240

Val Glu Ile Lys

<210> 25

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of light chain of M700 monoclonal antibody

<400> 25

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp

115 120 125

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

130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu

145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

<210> 26

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of heavy chain of M700 monoclonal antibody

<400> 26

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Asp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Ile His Tyr Asn Glu Lys

50 55 60

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

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

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

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly Lys
450
<210> 27
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Amino acid sequence of light chain of M100 monoclonal antibody
<400> 27
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 28
<211> 449
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Amino acid sequence of heavy chain of M100 monoclonal antibody
<400> 28
Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
20 25 30
Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

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

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

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Lys

<210> 29

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of light chain of Mco101

<400> 29

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

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser

85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

115 120 125

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

130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 30

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of heavy chain of Mco101

<400> 30

Glu Val Lys Leu Asp Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Met Gly Ile Tyr

85 90 95

Tyr Cys Thr Gly Ser Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asp Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

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

<210> 31
<211> 476
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Amino acid sequence of single chain of Mco101
<400> 31
Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr

20 25 30

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

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

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

Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
225 230 235 240
Gly Ala Ala Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
245 250 255
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
260 265 270

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
275 280 285

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
290 295 300
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
305 310 315 320
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
325 330 335
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
340 345 350

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
355 360 365
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
370 375 380
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Arg Val Lys Gly
385 390 395 400
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
405 410 415

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser
420 425 430
Phe Phe Leu Ala Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
435 440 445
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
450 455 460
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470 475

<210> 32

<

211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of anti-EpCAM light chain variable region CDRL1

<400> 32

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Thr

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of anti-EpCAM light chain variable region CDRL2

<400> 33

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of anti-EpCAM light chain variable region CDRL3

<400> 34

Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of anti-EpCAM heavy chain variable region CDRH1

<400> 35

Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Trp Leu Gly

1 5 10

<210> 36

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of anti-EpCAM heavy chain variable region CDRH2

<400> 36

Asp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Ile His Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of anti-EpCAM heavy chain variable region CDRH3

<400> 37

Leu Arg Asn Trp Asp Glu Pro Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 38

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of anti-EpCAM light chain variable region CDRL1

<400> 38

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of anti-EpCAM light chain variable region CDRL2

<400> 39

Gly Ala Ser Thr Thr Ala Ser
1 5

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213

> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of anti-EpCAM light chain variable region CDRL3

<400> 40

Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Pro Ala Tyr Thr

1 5 10

<210> 41

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of anti-EpCAM heavy chain variable region CDRH1

<400> 41

Ser Tyr Ala Ile Ser

1 5

<210> 42

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of anti-EpCAM heavy chain variable region CDRH2

<400> 42

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

1 5 10 15

Gly

<210> 43

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of anti-EpCAM heavy chain variable region CDRH3

<400> 43

Gly Leu Leu Trp Asn Tyr

1 5

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of CDRH1 of anti-CD3 ScFv

<400> 44

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His

1 5 10

<210> 45

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of CDRH2 of anti-CD3 ScFv

<400> 45

Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 46

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of CDRH3 of anti-CD3 ScFv

<400> 46

Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of CDRL1 of anti-CD3 ScFv

<400> 47

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn

1 5 10

<210> 48

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of CDRL2 of anti-CD3 ScFv

<400> 48

Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly

1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of CDRL3 of anti-CD3 ScFv

<400> 49

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr

1 5

<210> 50

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of heavy chain variable region of anti-CD3 ScFv

<400> 50

Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 51

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of light chain variable region of anti-CD3 ScFv

<400> 51

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr

35 40 45

Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of CDRH1 of anti-CD3 ScFv

<400> 52

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn

1 5 10

<210> 53

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of CDRH2 of anti-CD3 ScFv

<400> 53

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15
Val Lys Asp

<210> 54

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of CDRH3 of anti-CD3 ScFv

<400> 54

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 55

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of CDRL1 of anti-CD3 ScFv

<400> 55

Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
1 5 10

<210> 56

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of CDRL2 of anti-CD3 ScFv

<400> 56

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of CDRL3 of anti-CD3 ScFv

<400> 57

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val

1 5

<210> 58

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of heavy chain variable region of anti-CD3 ScFv

<400> 58

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110

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

115 120 125

<210> 59

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of light chain of anti-CD3 ScFv

<400> 59

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 60

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of light chain constant region CL

<400> 60

Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1 5 10 15

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro
35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65 70 75 80
Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 61
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Amino acid sequence of light chain constant region CL
<400> 61
Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1 5 10 15
Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
20 25 30
Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro

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

<210> 62
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Amino acid sequence of light chain constant region CL
<400> 62

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

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

<210> 63

<211> 106

<212

> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of light chain constant region CL

<400> 63

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

Val Asn Thr Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60
Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65 70 75 80
Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser
100 105

<210> 64

<211> 106

<212
> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of light chain constant region CL

<400> 64

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

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

<210> 65

<211> 106

<212
> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of light chain constant region CL

<400> 65

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

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro
35 40 45

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

<210> 66
<211> 110
<212
> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Amino acid sequence of heavy chain constant region CH2
<400> 66
Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

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

<210> 67

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of heavy chain constant region CH2

<400> 67

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

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

<210> 68

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of heavy chain constant region CH2

<400> 68

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

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 69

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of heavy chain constant region CH2

<400> 69

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 70

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of heavy chain constant region CH2

<400> 70

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

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

<210> 71
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Amino acid sequence of heavy chain constant region CH2
<400> 71

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

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

85 90 95

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

100 105

<210>

72

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of heavy chain constant region CH3

<400> 72

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 73

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of heavy chain constant region CH3

<400> 73

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 74

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of heavy chain constant region CH3

<400> 74

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 75

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of heavy chain constant region CH3

<400> 75

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

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

Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe
85 90 95

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

<210> 76

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of heavy chain constant region CH3

<400> 76

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Lys
1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

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