



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0104332
(43) 공개일자 2020년09월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2809 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7020455
- (22) 출원일자(국제) 2018년12월20일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2020년07월15일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2018/086046
- (87) 국제공개번호 WO 2019/122049
국제공개일자 2019년06월27일
- (30) 우선권주장
17209444.3 2017년12월21일
유럽특허청(EPO)(EP)
- (71) 출원인
에프. 호프만-라 로슈 아게
스위스 체하-4070 바젤 그린짜체스트라체 124
- (72) 발명자
바카크 마리나
스위스 8952 솔리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카
트 아게
파우티 탄야
스위스 8952 솔리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카
트 아게
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
제일특허법인(유)

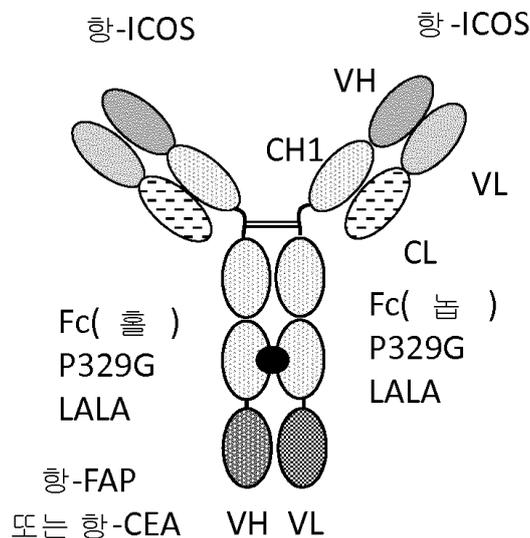
전체 청구항 수 : 총 37 항

(54) 발명의 명칭 **중양 표적화된 ICOS 작용제와 T-세포 이중특이성 분자의 조합 치료**

(57) 요약

본 발명은 종양-관련 항원에 결합하는 하나 이상의 항원을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자 및 암 치료에서 T-세포와 조합되는 이의 용도, 작용성 ICOS-결합 분자 그 자체, 상기 분자를 포함하는 약학 조성물, 및 이의 사용 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1c



(52) CPC특허분류

C07K 16/2818 (2013.01)
C07K 16/3007 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/35 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/64 (2013.01)
C07K 2317/75 (2013.01)

(72) 발명자

클라인 크리스티안

스위스 8952 솔리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카
트 아게

샘 요한네스

스위스 8952 솔리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카
트 아게

우마나 파블로

스위스 8952 솔리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카
트 아게

무르 라모나

스위스 8952 솔리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카
트 아게

칠롱카 외르크

스위스 8952 솔리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카
트 아게

하베거 루카스

스위스 8952 솔리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카
트 아게

명세서

청구범위

청구항 1

암의 치료 방법 또는 암 진행의 지연 방법에 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자로서, 종양 관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체와 조합으로 사용되는 작용성 ICOS-결합 분자.

청구항 2

제1항에 있어서,

종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자 및 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체가 단일 조성물로 함께 투여되거나 2개 이상의 상이한 조성물로 별도 투여되는, 작용성 ICOS-결합 분자.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열을 포함하는 하나 이상의 ICOS-L을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 인간 ICOS에 작용적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

항-섬유아세포 활성화 단백질(항-FAP)에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

(a) (i) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP), 및 (iv) 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하거나;

(b) (i) 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP), 및 (iv) 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하는,

FAP에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_H FAP) 및 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_L FAP)를 포함하거나;

서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_H FAP) 및 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_L FAP)를 포함하는,

FAP에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

암배아 항원(CEA)에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.

청구항 9

제1항 내지 제4항 및 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

(a) (i) 서열번호 145의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 146의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 147의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_H CEA), 및 (iv) 서열번호 148의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 149의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 150의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_L CEA)를 포함하거나;

(b) (i) 서열번호 158의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 159의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 160의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_H CEA), 및 (iv) 서열번호 161의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 162의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 163의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_L CEA)를 포함하는,

CEA에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 ICOS-결합 분자.

청구항 10

제1항 내지 제4항, 제8항 및 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

서열번호 151의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_H CEA) 및 서열번호 152의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_L CEA)를 포함하거나;

서열번호 164의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_H CEA) 및 서열번호 165의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_L CEA)를 포함하는,

CEA에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.

청구항 11

제1항, 제2항 및 제4항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_H ICOS); 및

(iv) 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_L ICOS)

를 포함하는 ICOS에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.

청구항 12

제1항, 제2항 및 제4항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_H ICOS) 및 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_L ICOS)를 포함하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

Fc 수용체에 대한 결합 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 Fc 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.

청구항 14

제1항, 제2항, 제4항 내지 제7항 및 제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함하거나;

서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 66의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 하나의 경쇄를 포함하는

작용성 ICOS-결합 분자.

청구항 15

제1항, 제2항 및 제8항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

서열번호 155의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 156의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 157의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체가 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체인, 작용성 ICOS-결합 분자.

청구항 17

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체가 중쇄 가변부(V_H CD3) 및 경쇄 가변부(V_L CD3)를 포함하는 제1 항원 결합 도메인; 및

중쇄 가변부(V_H CEA) 및 경쇄 가변부(V_L CEA)를 포함하는 제2 항원 결합 도메인

을 포함하는, 작용성 ICOS-결합 분자.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체가 서열번호 40의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_H CD3) 및/또는 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_L CD3)를 포함하는 제1 항원 결합 도메인을 포함하는, 작용성 ICOS-결합 분자.

청구항 19

(A) 활성화 성분으로서, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 제1 조성물; 및

(B) 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함

하는 제2 조성물

을 포함하는,

결합, 특히 암의 치료에 조합으로, 순차적으로 또는 동시에 사용하기 위한 약학 제형.

청구항 20

종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자로서,

상기 종양-관련 항원이 섬유아세포 활성화 단백질(FAP), 암배아 항원(CEA), 엽산 수용체 알파(FoIR1), 흑색종-관련 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸(MCSP), 표피 성장 인자 수용체(EGFR), 인간 표피 성장 수용체 2(HER2) 및 p95HER2로 이루어진 군으로부터 선택되는, 작용성 ICOS-결합 분자.

청구항 21

제20항에 있어서,

(a) (i) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP), 및 (iv) 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하거나;

(b) (i) 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP), 및 (iv) 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하는,

FAP에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.

청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서,

서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP) 및 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하거나;

서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP) 및 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하는,

FAP에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.

청구항 23

제20항에 있어서,

(a) (i) 서열번호 145의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 146의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 147의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HCEA), 및 (iv) 서열번호 148의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 149의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 150의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함하거나;

(b) (i) 서열번호 158의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 159의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 160의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HCEA), 및 (iv) 서열번호 161의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 162의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 163의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함하는,

CEA에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 ICOS-결합 분자.

청구항 24

제20항 또는 제23항에 있어서,

서열번호 151의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_H CEA) 및 서열번호 152의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_L CEA)를 포함하거나;

서열번호 164의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_H CEA) 및 서열번호 165의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_L CEA)를 포함하는,

CEA에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.

청구항 25

제20항 또는 제21항에 있어서,

(i) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_H ICOS); 및

(iv) 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_L ICOS)

를 포함하는 ICOS에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.

청구항 26

제20항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서,

종양-관련 표적에 대한 1가 결합 및 ICOS에 대한 1가 결합을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.

청구항 27

제20항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서,

종양-관련 표적에 대한 1가 결합 및 ICOS에 대한 2가 결합을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.

청구항 28

제20항 내지 제27항 중 어느 한 항의 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 29

제28항의 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 30

제28항의 단리된 폴리뉴클레오티드 또는 제29항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 31

(i) ICOS-결합 분자의 발현에 적합한 조건하에 본 발명의 숙주 세포를 배양하는 단계; 및

(ii) ICOS-결합 분자를 회수하는 단계

를 포함하는 제20항 내지 제27항 중 어느 한 항의 작용성 ICOS-결합 분자의 제조 방법.

청구항 32

제20항 내지 제27항 중 어느 한 항의 작용성 ICOS-결합 분자 및 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학 조성물.

청구항 33

암 치료에 사용하기 위한 제20항 내지 제27항 중 어느 한 항의 작용성 ICOS-결합 분자 또는 제32항의 약학 조성물.

청구항 34

제20항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서,

암 면역치료에 사용하기 위한 화학요법제, 방사선 및/또는 기타 제제와의 조합 투여를 위한 작용성 ICOS-결합 분자.

청구항 35

제34항에 있어서,

PD-L1/PD-1 상호작용 차단제와의 조합으로 투여하기 위한 작용성 ICOS-결합 분자.

청구항 36

제20항 내지 제27항 중 어느 한 항의 작용성 ICOS-결합 분자의 암 치료용 약제의 제조를 위한 용도.

청구항 37

치료 효과량의 제20항 내지 제27항의 작용성 ICOS-결합 분자 또는 제23항의 약학 조성물을 암을 갖는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 상기 개체내 질환의 치료 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 중앙 표적화된 작용성 ICOS-결합 분자, 및 이의 T-세포 이중특이성 분자와의 조합된 면역조절제로서 암 치료에서의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 면역 억제를 조절하는 경로는 암 치료에 있어서 최근까지 주요한 돌파구가 되어 왔다. 세포독성 T-림프구 항원 4(CTLA-4, YERVOY/이필리무맙), 세포 예정사 단백질 1(PD-1, OPDIVO/니볼루맙 또는 KEYTRUDA/펩브롤리주맙) 및 PD-L1(아테졸리주맙)을 표적화하는 확인점 봉쇄(checkpoint blockade) 항체는 다양한 중앙 적응증의 환자에서 허용가능한 독성, 유망한 임상 반응, 지속성있는 질환 제어 및 향상된 생존을 입증해 왔다. 그러나, 단지 소수의 환자들만이 면역 확인점 봉쇄(ICB) 치료에 대해 지속성있는 반응을 겪고, 나머지 환자들은 1차 또는 2차 내성을 나타내는데, 이는 더 다수의 환자에게 생존적 이점을 제공하는 추가적인 경로를 조절할 명확한 필요성을 제시한다.

[0003] ICOS(CD278)는 유도가능한 T-세포 공동-자극제이고 B7/CD28/CTLA-4 면역글로불린 상과에 속한다(문헌[Hutloff, et al., Nature 1999, 397]). 이의 발현은 주로 T-세포에서 제한되고 NK 세포에서는 단지 약한 발현만 나타난다(문헌[Ogasawara et al., J Immunol. 2002, 169] 및 인간 NK 세포를 사용한 미출판된 자체 데이터). T-세포에 구성요소로서 발현되는 CD28과는 달리, ICOS는 미접촉(naive) T_H1 및 T_H2 효과기 T-세포 집단에서는 거의 발현되지 않고(문헌[Paulos CM et al., Sci Transl Med 2010, 2]), 휴지 T_H17, T 세포성 보조자(T_{FH}) 및 조절성 T(T_{reg}) 세포에는 발현된다. 그러나, ICOS는 초회 항원자극시 모든 T-세포 부분 집합에 TCR/CD3-진입기전을 강하게 유도한다(문헌[Wakamatsu et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110]).

[0004] ICOS 경로를 통한 신호전달은 이의 리간드(이른바 ICOS-L(B7h, B7RP-1, CD275), B-세포, 대식세포, 수지상 세포 및 TNF-α로 처리된 비면역 세포에 발현됨)의 결합시 발생한다(문헌[Simpson et al., Current Opinion in Immunology 2010, 22]). CD28 및 CTLA4에 대한 리간드 B7-1 및 B7-2 둘다 ICOS에 결합 및 활성화가 불가능하다. 그러나, ICOS-L은 CD28 및 CTLA-4 둘다에 약하게 결합하는 것으로 나타났다(문헌[Yao et al., Immunity 2011, 34]). 활성화시, ICOS(다이설파이드-연결된 동종이량체)는 PI3K 및 AKT 경로를 통해 신호를 유도한다. CD28과는 대조적으로, ICOS는 고유한 YMFH SH2 결합 모티프를 갖는데, 이는 CD28에 의해 사용되는 아이소형

(isoform)에 비해 증가된 지질 키나제 활성을 갖는 PI3K 변이체를 사용한다. 결과적으로, 포스포타디리노시톨 (3,4,5)-트라이포스페이트의 더 증가된 생성 및 AKT 신호전달에서 동시적 증가가 관찰되어, T-세포 생존에 있어서 ICOS의 중요한 역할을 입증한다(문헌[Simpson et al., Current Opinion in Immunology 2010, 22]).

[0005] 샤프(Sharpe)에 의해 검토된 바(문헌[Immunol Rev., 2009, 229])와 같이, ICOS/ICOS 리간드 경로는 효과기 T-세포 반응 및 T 의존성 B-세포 반응을 자극하고, IL-10을 생성하는 T_{reg}를 제어함에 의한 T-세포 반응을 조절하는데 결정적인 역할을 한다. 또한, ICOS는 케모카인(C-X-C 모티프) 수용체 5(CXCR5)⁺ 소포성 보조자 T-세포(T_{FH}) (배중심 반응 및 체액성 면역을 조절하는 고유한 T-세포 부분집합)의 생성에 중요하다. ICOS-결핍 마우스에서의 최근 연구는 ICOS가 인터루킨-21(IL-21) 생성을 조절하여 결과적으로 T 보조자(Th) 유형 17(T_H17) 및 T_{FH}의 확대를 제어할 수 있음을 제시한다. 이러한 맥락에서, ICOS는 T_H1-유사 T_H17 표현형에 대해 CD4 T-세포를 양극화시키는 것으로 설명되며, 이는 몇몇 암 적응증, 예컨대 흑색종 및 초기 난소 암 등의 환자의 향상된 생존과 상관관계가 있는 것으로 나타났다(문헌[Rita Young, J Clin Cell Immunol. 2016, 7]).

[0006] ICOS-결핍 마우스는 손상된 배중심 형성을 나타나고 IL-10 및 IL-17의 생성이 감소하는데, 이는 다양한 질환 모델, 예컨대 당뇨병(T₁D), 기도 염증(T_H2) 및 EAE 신경-염증 모델(T_H17)에서 자가면역성 표현형의 손상된 발달에서 확인하다(문헌[Warnatz et al, Blood 2006]). 이와 같은 선상에서, 돌연변이 ICOS를 갖는 인간 공통 가변성 면역결핍 환자는 중증의 저감마글로불린혈증 및 방해된 B-세포 항상성을 나타낸다(문헌[Sharpe, Immunol Rev., 2009, 229]). 눈여겨 볼 증점은, ICOS 수용체를 통한 공동-자극성 신호전달이 동시의 TCR 활성화 신호를 받는 T-세포에서만 나타난다는 점이다(문헌[Wakamatsu et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110]).

[0007] T-세포 이중특이성(TCB) 분자는 매력적인 면역 세포 진입기전제(engager)인데, 이는 상기 분자가 상응하는 T-세포 수용체에 의한 MHC-펩티드 인식의 필요성을 우회하면서도 다클론 T-세포가 세포-표면의 종양-관련 항원에 반응할 수 있도록 하기 때문이다(문헌[Yuraszcek et al., Clinical Pharmacology & Therapeutics 2017, 101]). CEA CD3 TCB(항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체)는 암에 대항하는 면역 체계에 진입하는, 시험중의 면역글로불린 G₁(IgG₁) T-세포 이중특이성 항체이다. 이는 T-세포 상의 인간 CD3ε, 및 다양한 암 세포, 예컨대 CRD(직장결장암), GC(위암), NSCLC(비소세포폐암) 및 BC(유방암)에 의해 발현되는 암배아 항원(CEA)에 동시 결합함으로써 T-세포가 종양 세포를 재지향하도록 설계된 것이다. T-세포와 종양 세포의 가교결합은 CD3/TCR 하류 신호전달, 및 면역성 시냅스의 형성, T-세포 활성화, 세포독성 과립 및 기타 사이토카인의 분비, 및 궁극적으로는 종양 세포의 투약량-의존적 및 시간-의존적 용해를 야기한다. 또한, CEA CD3 TCB는 T-세포 침투를 증가시키고 고도로 염증화된 종양 미세환경을 생성하기에, 특히 충분한 내생적 적응성 및 기능적 면역 침투를 결여함에 기인하여 면역 확인점 봉쇄 치료(ICB)에 대한 1차적 내성을 나타내는 종양에 대한 ICB를 위한 이상적인 조합 짝(combination partner)이 되는 것으로 제안된다. 그러나, T-세포에서의 단일 또는 다수의 억제성 경로를 차단함으로써 제지요소(brake)들을 무효화시키는 것은 몇몇 공동-자극성 수용체, 예컨대 종양 미세환경(TME)내의 오 기능 T-세포의 4-1BB(CD137), ICOS 및 OX40의 역설적 반응(paradoxical expression)에 기인하여 불충분할 수 있다.

[0008] ICOS에 있어서, 갈수록 다수의 문헌이 CD4⁺ 및 CD8⁺ 효과기 T-세포에서 CD278을 사용하는 것이 항-종양 잠재성을 가짐을 실질적으로 뒷받침하고 있다. ICOS-ICOS-L 신호전달을 활성화시키는 것은 단일치료에서, 항-CTLA4 치료의 맥락에서 몇몇 공통유전자 마우스 모델에서 효과적인 항-종양 반응을 유도한 바 있고, 여기서 ICOS 하류 신호전달의 활성화가 항-CTLA4 치료의 효능을 상당히 증가시켰다(문헌[Fu T et al., Cancer Res, 2011, 71] 및 알리슨(Allison) 등의 WO 2011/041613 A2, 2009년). 또한, 항-CTLA4 항체로 치료받은 환자로부터 도출된 데이터는 CD4 및 CD8 T-세포에서 지속적으로 증가되는 ICOS 발현의 수준과 예컨대 전이성 흑색종, 요로상피세포암, 유방암 또는 전립선암을 갖는 종양 환자의 전반적인 생존의 향상의 연관성을 나타냈다(문헌[Giacomo et al., Cancer Immunol Immunother. 2013, 62]; 문헌[Carthon et al., Clin Cancer Res. 2010, 16]; 문헌[Vonderheide et al., Clin Cancer Res. 2010, 16]; 문헌[Liakou et al, Proc Natl Acad Sci USA 2008, 105] 및 문헌[Vonderheide et al., Clin Cancer Res. 2010, 16]). 따라서, ICOS 양성 T 효과기 세포는 이필리무맙 반응 양성의 예상 바이오마커인 것으로 제시된다.

[0009] 더 우수항 항-종양 효과가 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체, 즉 CEA TCB가 종양-표적화된 작용성 ICOS-결합 분자와 조합될 때 성취됨이 발견되었다. ICOS가 다양한 종양 적응증의 기준치에서 이미 발현되는 것(알리슨 등(Al:lison et al.), 2009년, WO 2011/041613 A2), 및 PI3K 및 AKT를 통한 ICOS 하류 신호전달의 활성화가 완전

한 활성을 위해서는 동시적인 CD3 유발에 의존하는 것을 근거로, TCB 분자와 종양-표적화된 ICOS 분자의 조합은 강하고 장기지속적인 항-종양 반응을 유도하는데 상승효과적으로 작용한다. T-세포 이중특이성 항체는 T-세포에 초기 TCR 활성화 진호전달을 제공하고, 이어서, 종양-표적화된 작용성 ICOS-결합 분자와의 조합은 항-종양 T-세포 면역성을 더욱 증폭한다. 따라서, 본원에서, 본 발명자들은 특히 CEA를 발현하는 종양(CEA-양성 암)에 대항하는 암 치료를 위한 신규한 조합 치료를 설명한다.

발명의 내용

- [0010] 본 발명은 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자 및 이의 항-CD3 이중특이성 항체와의 조합에서의 용도, 특히 이의 암의 치료 방법 또는 암의 진행 지연 방법에서의 용도에 관한 것이다. 본원에 설명된 조합 치료가 T-세포 활성화와 T-세포 증식을 조기 유도하고 T 기억 세포를 유도하고 결과적으로 종양 성장을 억제하고 종양 세포를 제거하는데 있어서 항-CD3 이중특이성 항체 단독에 비해 더 효과적임이 밝혀졌다. 특히, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 종양-관련 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 항원을 포함하는 이중특이성 작용성 ICOS-결합 분자이다.
- [0011] 하나의 양상에서, 본 발명은 암의 치료 방법 또는 암의 진행 지연 방법에 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자를 제시하고, 상기 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 종양-관련 항원에 특이적인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체와의 조합으로 사용된다. 하나의 양상에서, 종양-관련 항원에 특이적인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체는 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체이다.
- [0012] 하나의 양상에서, 본 발명은 암의 치료 방법 또는 암의 진행 지연 방법에 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이성 작용성 ICOS-결합 분자를 제시하고, 상기 작용성 ICOS-결합 분자는 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인 및 (i) 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열을 포함하는 하나 이상의 ICOS-L; 또는 (ii) 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 인간 ICOS에 작용적으로 결합가능한 하나의 항원 결합 도메인을 포함하고, 종양-관련 항원에 특이적인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체와의 조합으로 사용된다. 하나의 양상에서, T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체는 이중특이성 작용성 ICOS-결합 분자와 동일한 종양-관련 항원에 결합한다. 또다른 양상에서, T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체는 이중특이성 작용성 ICOS-결합 분자와 상이한 종양-관련 항원에 결합한다. 하나의 양상에서, 종양-관련 항원에 특이적인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체는 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체이다. 추가의 양상에서, 암의 치료 방법 또는 암의 진행 지연 방법에 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자가 제시되고, 상기 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자 및 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체는 단독 조성물로 통합 투여되거나 2개 이상의 상이한 조성물로 개별 투여된다. 하나의 양상에서, 이는 2개 이상의 상이한 조성물로 개별 투여된다. 추가의 양상에서, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 T-세포 활성화 항-CD3 항체와 상승효과적으로 작용한다.
- [0013] 하나의 양상에서, 암의 치료 방법 또는 암의 진행 지연 방법에 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체와의 조합으로 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자가 제시되고, 상기 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 하나 이상의 ICOS-L 또는 이의 단편을 포함한다. 하나의 양상에서, 작용성 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 ICOS-결합 분자는 2개의 ICOS-L 또는 이의 단편을 포함한다. 특정 양상에서, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열을 포함하는 하나 이상의 ICOS-L을 포함한다.
- [0014] 추가의 양상에서, 암의 치료 방법 또는 암의 진행 지연 방법에 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체와의 조합으로 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자가 제시되고, 상기 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 ICOS에 작용적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 특히, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 인간 ICOS에 작용적으

로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0015]

또다른 양상에서, 본 발명은 암의 치료 방법 또는 암의 진행 지연 방법에 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체와의 조합으로 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자를 제시하고, 상기 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 항-섬유아세포 활성화 단백질(항-FAP)에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자이다. 하나의 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자는 (a) (i) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP), 및 (iv) 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하거나, (b) (i) 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP), 및 (iv) 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하는 FAP에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 특정 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자는 (i) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP), 및 (iv) 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하는 FAP에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0016]

하나의 양상에서, 암의 치료 방법 또는 암의 진행 지연 방법에 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체와의 조합으로 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자가 제시되고, 상기 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP) 및 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하거나, 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP) 및 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하는 FAP에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 특히, 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP) 및 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하는 FAP에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0017]

또다른 양상에서, 본 발명은 암의 치료 방법 또는 암의 진행 지연 방법에 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체와의 조합으로 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자를 제시하고, 상기 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 암배아 항원(CEA)에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자이다. 하나의 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자는 (a) (i) 서열번호 145의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 146의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 147의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HCEA), 및 (iv) 서열번호 148의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 149의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 150의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함하거나, (b) (i) 서열번호 158의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 159의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 160의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HCEA), 및 (iv) 서열번호 161의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 162의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 163의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함하는 CEA에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 특정 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자는 (i) 서열번호 145의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 146의 아미노산 서열을 포함하는

는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 147의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HCEA), 및 (iv) 서열번호 148의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 149의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 150의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함하는 CEA에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 추가의 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자는 (i) 서열번호 158의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 159의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 160의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HCEA), 및 (iv) 서열번호 161의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 162의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 163의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함하는 CEA에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0018] 하나의 양상에서, 암의 치료 방법 또는 암의 진행 지연 방법에 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체와의 조합으로 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자가 제시되고, 상기 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 151의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HCEA) 및 서열번호 152의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함하거나, 서열번호 164의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HCEA) 및 서열번호 165의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함하는 CEA에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 특히, 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 164의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HCEA) 및 서열번호 165의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함하는 CEA에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0019] 또다른 양상에서, 본 발명은 암의 치료 방법 또는 암의 진행 지연 방법에 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체와의 조합으로 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자를 제시하고, 상기 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 (i) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HICOS), 및 (iv) 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LICOS)를 포함하는 ICOS에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 특정 양상에서, 종양-관련 항원에 결합하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HICOS) 및 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LICOS)를 포함하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0020] 추가의 양상에서, 암의 치료 방법 또는 암의 진행 지연 방법에 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체와의 조합으로 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자가 제시되고, 상기 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 IgG Fc 도메인, 구체적으로는 IgG₁ Fc 도메인 또는 IgG₄ Fc 도메인을 포함한다. 특정 양상에서, IgG Fc 도메인은 IgG₁ Fc 도메인이다. 또다른 특정 양상에서, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 Fc 수용체에 대한 결합 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 Fc 도메인을 포함한다. 보다 특히, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 아미노산 치환 L234A(카바트(Kabat) EU 번호부여), L235A 및 P329G를 포함하는 IgG₁ Fc 도메인을 포함한다.

[0021] 하나의 양상에서, 본 발명은 암의 치료 방법 또는 암의 진행 지연 방법에 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체와의 조합으로 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자를 제시하고, 상기 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포

함한다. 또다른 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 66의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 하나의 경쇄를 포함한다. 또다른 양상에서, 암의 치료 방법 또는 암의 진행 지연 방법에 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체와의 조합으로 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자가 제시되고, 상기 작용성 ICOS-결합 분자는 종양-관련 표적에 대한 1가 결합 및 ICOS에 대한 2가 결합을 포함한다. 하나의 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 2개의 경쇄를 포함한다.

[0022] 추가의 양상에서, 본 발명은 암의 치료 방법 또는 암의 진행 지연 방법에 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체와의 조합으로 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자를 제시하고, 상기 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 155의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 156의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 157의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함한다. 추가의 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 137의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 131의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 168의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 169의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함한다. 또다른 양상에서, 암의 치료 방법 또는 암의 진행 지연 방법에 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체와의 조합으로 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자가 제시되고, 상기 작용성 ICOS-결합 분자는 종양-관련 표적에 대한 1가 결합 및 ICOS에 대한 2가 결합을 포함한다. 하나의 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 153의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 154의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 2개의 경쇄를 포함한다. 또다른 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 166의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 167의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 131의 아미노산 서열을 포함하는 2개의 경쇄를 포함한다.

[0023] 또다른 양상에서, 본 발명은 암의 치료 방법 또는 암의 진행 지연 방법에 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체와의 조합으로 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자를 제시하고, 상기 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체는 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체이다. 하나의 양상에서, T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체는 중쇄 가변부(V_H CD3) 및 경쇄 가변부(V_L CD3)를 포함하는 제1 항원 결합 도메인, 및 중쇄 가변부(V_H CEA) 및 경쇄 가변부(V_L CEA)를 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다. 특히, T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체는 (i) 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3를 포함하는 중쇄 가변부(V_H CD3), 및 (iv) 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 39의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3를 포함하는 경쇄 가변부(V_L CD3)를 포함한다. 보다 특히, T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체는 서열번호 40의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_H CD3) 및/또는 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_L CD3)를 포함하는 제1 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0024] 추가의 양상에서, 본원에서 전술한 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체는 (a) (i) 서열번호 42의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3를 포함하는 중쇄 가변부(V_H CD3), 및 (iv) 서열번호 45의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 46의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 47의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3를 포함하는 경쇄 가변부(V_L CD3)를 포함하거나, (b) (i) 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 51의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 52의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3를 포함하는 중쇄 가변부(V_H CD3), 및 (iv) 서열번호 53의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 54의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 55의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3를 포함하는 경쇄 가변부(V_L CD3)를 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다. 하나의 양상에서, T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체는 서열번호 48의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_H CEA) 및/또는 서열번호 49의

아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하거나, 서열번호 56의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HCEA) 및/또는 서열번호 57의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0025] 또다른 양상에서, 본 발명은 암의 치료 방법 또는 암의 진행 지연 방법에 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체와의 조합으로 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자를 제시하고, 상기 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체는 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체이고, 상기 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체는 CEA에 결합하는 제3 항원 결합 도메인을 포함한다. 특히, 상기 제3 항원 결합 도메인은 (a) (i) 서열번호 42의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3를 포함하는 중쇄 가변부(V_HCEA), 및 (iv) 서열번호 45의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 46의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 47의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3를 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함하거나, (b) (i) 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 51의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 52의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3를 포함하는 중쇄 가변부(V_HCD3), 및 (iv) 서열번호 53의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 54의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 55의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3를 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함한다. 보다 특히, 제3 항원 결합 도메인은 서열번호 48의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HCEA) 및/또는 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하거나, 서열번호 56의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HCEA) 및/또는 서열번호 57의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0026] 추가의 양상에서, 암의 치료 방법 또는 암의 진행 지연 방법에 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체와의 조합으로 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자가 제시되고, 상기 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체는 IgG Fc 도메인, 구체적으로는 IgG₁ Fc 도메인 또는 IgG₄ Fc 도메인을 포함한다. 특정 양상에서, IgG Fc 도메인은 IgG₁ Fc 도메인이다. 또다른 특정 양상에서, 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체는 Fc 수용체에 대한 결합 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 Fc 도메인을 포함한다. 보다 특히, 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체는 아미노산 치환 L234A(카밧 EU 번호부여), L235A 및 P329G를 포함하는 IgG₁ Fc 도메인을 포함한다.

[0027] 특정 양상에서, 암의 치료 방법 또는 암의 진행 지연 방법에 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체와의 조합으로 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자가 제시되고, 상기 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체는 (a) 서열번호 58, 59, 60 및 61의 아미노산 서열을 포함하거나, (b) 서열번호 62, 63, 64 및 65의 아미노산 서열을 포함한다. 보다 특히, T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체는 서열번호 58, 59, 60 및 61의 아미노산 서열을 포함한다.

[0028] 또다른 양상에서, 본 발명은 암의 치료 방법 또는 암의 진행 지연 방법에 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체와의 조합으로 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자를 제시하고, 상기 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체와의 조합으로 및 PD-L1/PD-1 상호작용 차단제와의 조합으로 사용된다. 하나의 양상에서, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 항-PD-L1 항체 또는 항-PD1 항체이다. 보다 특히, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 아테졸리주맙, 듀르발루맙, 펌브롤리주맙 및 니볼루맙으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 양상에서, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 아테졸리주맙이다.

[0029] 추가의 양상에서, 본 발명은 질환, 특히 암의 치료에 조합으로 순차적 또는 동시적으로 사용하기 위한 (A) 활성 성분으로서, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 제1 조성물; 및 (B) 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포

활성화 항-CD3 이중특이성 항체 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 제2 조성물을 포함하는 약학 제품을 제시한다. 특히, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 본원에서 전술한 분자이다. 또다른 양상에서, 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체는 본원에서 전술한 항-CD3 이중특이성 항체이다.

[0030] 또다른 양상에서, 본 발명은 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자, 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 특정 양상에서, 암의 치료, 보다 특히 고형 종양의 치료에 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자, 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학 조성물이 제시된다.

[0031] 또다른 양상에서, 이중특이성 작용성 ICOS-결합 종양-표적화된 분자를 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체와의 조합으로 투여함에 의한 암의 치료 방법 또는 암의 진행 지연 방법이 제시되고, 상기 이중특이성 작용성 ICOS-결합 분자는 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인; 및 (i) 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열을 포함하는 하나 이상의 ICOS-L; 또는 (ii) 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 인간 ICOS에 작용적으로 결합가능한 하나의 항원 결합 도메인을 포함하고, 상기 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체는 종양-관련 항원에 결합한다. 하나의 양상에서, T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체는 이중특이성 작용성 ICOS-결합 분자와 동일한 종양-관련 항원에 결합한다. 또다른 양상에서, T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체는 ICOS-결합 분자와 상이한 종양-관련 항원에 결합한다.

[0032] 또다른 양상에서, 본 발명은 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자를 제시하고, 상기 종양-관련 항원은 섬유아세포 활성화 단백질(FAP), 암배아 항원(CEA), 엽산 수용체 알파(FoIR1), 흑색종-관련 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸(MCSP), 표피 성장 인자 수용체(EGFR), 인간 표피 성장 수용체 2(HER2) 및 p95HER2로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0033] 하나의 양상에서, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자가 제시되고, 상기 종양-관련 항원은 FAP이다. 특히, 작용성 ICOS-결합 분자는 (a) (i) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP), 및 (iv) 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하거나, (b) (i) 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP), 및 (iv) 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하는 FAP에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 보다 특히, 작용성 ICOS-결합 분자는 (i) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP), 및 (iv) 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하는 FAP에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 하나의 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP) 및 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하는 FAP에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인, 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP) 및 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하는 FAP에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 추가의 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자는 (i) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HICOS), 및 (iv) 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LICOS)를 포함하는 ICOS에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 보다

특히, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HICOS) 및 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LICOS)를 포함하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 추가의 양상에서, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 IgG Fc 도메인, 구체적으로는 IgG₁ Fc 도메인 또는 IgG₄ Fc 도메인을 포함한다. 보다 특히, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 IgG₁ Fc 도메인을 포함한다. 특정 양상에서, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 Fc 수용체에 대한 결합 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 Fc 도메인을 포함한다. 보다 특히, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 아미노산 치환 L234A(카바트 EU 번호부여), L235A 및 P329G를 포함하는 IgG₁ Fc 도메인을 포함한다.

[0034]

하나의 추가 양상에서, 암의 치료 방법 또는 암의 진행 지연 방법에 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체와의 조합으로 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자가 제시되고, 상기 종양-관련 항원은 CEA이다. 특히, 작용성 ICOS-결합 분자는 (a) (i) 서열번호 145의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 146의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 147의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HCEA), 및 (iv) 서열번호 148의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 149의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 150의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함하거나, (b) (i) 서열번호 158의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 159의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 160의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HCEA), 및 (iv) 서열번호 161의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 162의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 163의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함하는 CEA에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 보다 특히, 작용성 ICOS-결합 분자는 (i) 서열번호 145의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 146의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 147의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HCEA), 및 (iv) 서열번호 148의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 149의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 150의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함하는 CEA에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 하나의 추가 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자는 (i) 서열번호 158의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 159의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 160의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HCEA), 및 (iv) 서열번호 161의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 162의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 163의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함하는 CEA에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 하나의 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 151의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HCEA) 및 서열번호 152의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함하는 CEA에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인, 또는 서열번호 164의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HCEA) 및 서열번호 165의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함하는 CEA에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 추가의 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자는 (i) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HICOS), 및 (iv) 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LICOS)를 포함하는 ICOS에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 보다 특히, 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HICOS) 및 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LICOS)를 포함하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 또다른 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자는 (i) 서열번호 123의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 124의 아미노산 서열을 포함하는

CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 125의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_H ICOS), 및 (iv) 서열번호 126의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 127의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 128의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_L ICOS)를 포함하는 ICOS에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 보다 특히, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 129의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_H ICOS) 및 서열번호 130의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_L ICOS)를 포함하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 추가의 양상에서, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 IgG Fc 도메인, 구체적으로는 IgG₁ Fc 도메인 또는 IgG₄ Fc 도메인을 포함한다. 보다 특히, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 IgG₁ Fc 도메인을 포함한다. 추가의 양상에서, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 Fc 수용체에 대한 결합 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 Fc 도메인을 포함한다. 보다 특히, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 아미노산 치환 L234A(카바트 EU 번호부여), L235A 및 P329G를 포함하는 IgG₁ Fc 도메인을 포함한다.

[0035] 하나의 양상에서, 본 발명은 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자를 제시하고, 상기 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함한다. 추가의 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 66의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 하나의 경쇄를 포함한다. 또다른 양상에서, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자가 제시되고, 상기 작용성 ICOS-결합 분자는 종양-관련 표적에 대한 1가 결합 및 ICOS에 대한 2가 결합을 포함한다. 하나의 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 2개의 경쇄를 포함한다.

[0036] 하나의 추가 양상에서, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자가 제시되고, 상기 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 155의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 156의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 157의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함한다. 추가의 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 137의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 131의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 168의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 169의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함한다. 또다른 양상에서, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자가 제시되고, 상기 작용성 ICOS-결합 분자는 종양-관련 표적에 대한 1가 결합 및 ICOS에 대한 2가 결합을 포함한다. 하나의 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 153의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 154의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 2개의 경쇄를 포함한다. 하나의 추가 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 166의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 167의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 131의 아미노산 서열을 포함하는 2개의 경쇄를 포함한다.

[0037] 본 발명의 또다른 양상에 따라, 본원에서 전술한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드가 제시된다. 또한, 본 발명은 본 발명의 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 특히 발현 벡터, 및 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제시한다. 일부 양상에서, 숙주 세포는 진핵 세포, 특히 포유동물 세포이다.

[0038] 또다른 양상에서, (i) 항원 결합 분자의 발현에 적합한 조건하에 본 발명의 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 (ii) 항원 결합 분자를 회수하는 단계를 포함하는 본원에서 전술한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자의 제조 방법이 제시된다. 또한, 본 발명은 본 발명의 방법에 의해 제조된 본원에 기재된 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자를 포괄한다.

[0039] 또한, 본 발명은 본원에 기재된 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함

하는 작용성 ICOS-결합 분자 및 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

- [0040] 또한, 약제로서 사용하기 위한 본원에서 전술한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자, 또는 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자를 포함하는 약학 조성물이 본 발명에 포괄된다.
- [0041] 하나의 양상에서,
- [0042] (i) T 세포 자극;
- [0043] (ii) 활성화된 T 세포의 생존 지원;
- [0044] (iii) 감염 치료;
- [0045] (iv) 암 치료;
- [0046] (v) 암 진행의 지연; 또는
- [0047] (vi) 암을 갖는 환자의 생존 연장
- [0048] 에 사용하기 위한 본원에서 전술한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자, 또는 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자를 포함하는 약학 조성물이 제시된다.
- [0049] 특정 양상에서, 암의 치료에 사용하기 위한 본원에서 전술한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자, 또는 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자를 포함하는 약학 조성물이 제시된다.
- [0050] 또다른 특정 양상에서, 암의 치료에 사용하기 위한 본원에서 전술한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자가 제시되고, 상기 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 암 면역치료를 사용하기 위한 화학치료제, 방사선 및/또는 기타 제제와의 조합 투여를 위한 것이다.
- [0051] 추가의 양상에서, 암의 치료에 사용하기 위한 본원에서 전술한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자가 제시되고, 상기 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 PD-L1/PD-1 상호작용 차단제와의 조합으로 사용된다. 하나의 양상에서, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 항-PD-L1 항체 또는 항-PD1 항체이다. 보다 특히, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 아테졸리주맙, 듀르발루맙, 펌브롤리주맙 및 니볼루맙으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 양상에서, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 아테졸리주맙이다.
- [0052] 추가의 양상에서, 본 발명은 종양 세포의 성장을 억제하기 위해 효과량의 본원에서 전술한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자, 또는 본원에서 전술한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자를 포함하는 약학 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 개체내 종양 세포의 성장을 억제하는 방법을 제시한다.
- [0053] 또한, 질환의 치료를 필요로 하는 개체내 상기 질환의 치료를 위한 약제의 제조, 특히 암의 치료를 위한 약제의 제조를 위한 본원에서 전술한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자의 용도, 및 약학적으로 허용되는 형태의 본원에서 전술한 종양-관련 항원에 결합하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 치료 효과량의 약학 조성물을 상기 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 상기 개체내 질환의 치료 방법이 제시된다. 특정 양상에서, 질환은 암이다. 임의의 상기 양상에서, 개체는 포유동물, 특히 인간이다.

도면의 간단한 설명

- [0054] 도 1은 모두 FAP- 또는 CEA-표적화된 ICOS 분자 및 이의 비표적화된 (DP47) 참조 분자의 개략도를 도시한 것이다. 도 1a 및 1b에서, 1+1 형태의 표적화된 ICOS 이중특이성 항체의 상이한 유형이 도시되어 있다. 도 1a는 FAP 또는 CEA를 종양-관련 표적화 장기로서 포함한다. 2+1 형태(종양-관련 표적에 대해 1가임)의 FAP-ICOS 또는 CEA-ICOS 항체는 도 1c에 도시되어 있고, 도 1d 및 1e에는 1+1 형태(도 1d) 및 2+1 형태(도 1e)의 비표적화된 (DP47)-ICOS 이중특이성 항체가 도시되어 있다. 도 1f는 종양-관련 항원에 특이적인 인간 T-활성화 항-CD3

이중특이성(CEA TCB) 항체의 개략도를 도시한 것이다.

도 2는 FAP-표적화된 mICOS-L 분자(도 2a) 및 비표적화된 (DP47)-mICOS-L 참조 분자(도 2c)의 개략도를 도시한 것이다. 도 2c는 종양-관련 항원에 특이적인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성(CEA TCB) 항체의 개략도를 도시한 것이다.

도 3은 건강한 기증체로부터의 T-세포, 또는 동일 환자의 정상조직으로부터 단리된 TIL 또는 T-세포에서 ICOS의 발현을 도시한 것이다. 도 3e 내지 3h는 TIL 대 기준치의 인간 PBMC 대 CEA-양성 로보(Lovo) 표적 세포의 존재 하에 TCB 처리에 의한 것 대 의하지 않은 것에서 ICOS 발현을 도시한 것이다. 유동 세포분석으로 측정된 ICOS-양성 T-세포의 중앙값 형광 강도 및 퍼센트. 도시된 것은 표준편차(SD)에 의한 기법적 3반복(technical triplicate)이다.

도 4는 유동 세포분석으로 측정된 CEACAM5 TCB-매개 인간 T 세포의 활성화시 인간 ICOS의 증가를 도시한 것이다. 도 4a 및 4b는 CEACAM5 TCB로 48시간 동안 항온배양시 ICOS⁺ CD4(도 4a) 및 CD8⁺(도 4b)의 투약량-의존적 증가를 도시한 것이다. 그래프는 기법적 3반복을 나타낸 것이고, 오차 막대는 SD를 나타낸다. 도 4c 및 4d는 5명의 상이한 건강한 인간 PBMC 기증체에 대해 48시간 동안 CEA TCB(100 nM) 또는 CEACAM5 TCB(20 nM) 처리시 ICOS⁺ CD4⁺(도 4c) 및 CD8⁺(도 4d) T-세포의 퍼센트 증가를 도시한 것이다.

도 5는 쥐과 T-세포의 mTCB-매개 활성화시 쥐과 CD4⁺, T_{reg} 또는 CD8⁺ T-세포에서 쥐과 ICOS 발현의 증가를 도시한 것이다. MC38-hCEA 종양 표적 세포, hCEA(HO) Tg 마우스로부터의 쥐과 비장세포 및 증가하는 농도의 mCEA-TCB의 동반-항온배양 48시간 후 쥐과 CD4(도 5a 및 5d), T_{reg}(도 5b 및 5e) 또는 CD8 T-세포(도 5c 및 5f)의 ICOS-양성 세포의 퍼센트(도 5a 내지 5c) 및 중앙값 형광 강도(MFI, 도 5d 내지 5f). 그래프는 기법적 3반복을 나타낸 것이고, 오차 막대는 SD를 나타내고, 아이소형 값은 제외하였다.

도 6은 유동 세포분석으로 측정된 인간 ICOS(도 6a 및 6b) 및 인간 FAP(도 6c)에 대한 상이한 FAP-ICOS 분자의 결합을 도시한 것이다. 유동 세포분석으로 측정된 활성화된 PBMC(기브코(Gibco) #11161D 사용, 48시간, 비드 대 세포 비) 및 FAP-발현 NIH/3T3-hFAP 세포에 대한 상이한 FAP- 또는 DP47-ICOS 분자의 결합에 대한 중앙값 형광 강도. 도시된 것은 SD에 의한 기법적 3반복이다.

도 7은 유동 세포분석으로 측정된 쥐과 ICOS-발현 세포(도 7a) 및 쥐과 FAP-발현 세포(도 7b)에 대한 FAP-mICOS-L의 결합을 도시한 것이다. 유동 세포분석으로 측정된 안정한 CHO-K1 형질감염체, 과발현 쥐과 ICOS(도 7a) 및 3T3-mFAP 세포(모세포주 ATCC #CCL-92, 쥐과 FAP를 안정적으로 과발현하도록 변형됨)(도 7b)에 대한 FAP-mICOS-L의 결합에 대한 중앙값 형광 강도.

도 8은 상이한 FAP 분자 대 비표적화된 ICOS 분자의 평가를 도시한 것이다. 도 8a에서, Jurkat-NFAT 리포터 분석을 사용하여 잠재적인 초작용성(superagonism)을 다루었다. 그래프는 동시 코팅된 CD3의 존재 또는 부재하에 상이한 플레이트-결합 ICOS 구조물에 의한 예비활성화된 Jurkat-NFAT-Luc2P 세포(프로메가(Promega) #CS176501)의 발광 신호 강도, 즉 발광 강도를 나타낸다. 도시된 것은 표준오차(SEM)에 의한 기법적 3반복이다. 도 8b 내지 8e에서, FAP를 통한 ICOS 분자의 가교결합의 효과(유동 세포분석에 의한 T-세포 활성화 분석에서 다뤄짐)가 도시되어 있다. 도시된 것은 CD4⁺ T-세포(도 8b 및 8c) 또는 CD8⁺ T-세포(도 8d 및 8e)의 초기 T-세포 활성화 CD69 및 후기 활성화 마커 CD25의 표면 발현 수준을 중앙값 형광 강도(MFI)로서, 또는 곡선 하 면적 AUC(도 8f 내지 8i)로서 도시한 것이다. 중앙값 형광 강도(MFI)는 인간 PBMC 효과기, MKN45 종양 세포 및 3T3-hFAP 섬유아세포를 5:1:1의 E:T로, FAP 표적화된 FAP-ICOS 구축물 또는 비표적화된 DP47-ICOS 구축물의 증가하는 농도의 존재하 80 pM CEACAM5 TCB의 존재하에 동반-항온배양 48시간 후 측정된 것이다. 그래프는 기법적 3반복을 나타내고, 오차 막대는 SD를 나타낸다.

도 9는 유동 세포분석으로 측정시 3T3-hFAP 세포에 대한 결합에 의해 가교결합된 FAP-ICOS 이중특이성 분자에 의한 CEACAM5-TCB-매개 T-세포 활성화의 증가를 도시한 것이다. 도시된 것은 FAP-ICOS₂₊₁ 분자의 증가하는 농도의 존재하에 양성 CD4⁺ 및 CD8⁺ T-세포의 MFI 또는 퍼센트로서 CD69의 발현 수준(도 9a 내지 9d), 및 5명 이하의 상이한 건강한 인간 PBMC 기증체에 대해 FAP-ICOS 분자 및 CEACAM5-TCB의 동반-배양에 의해 유도된 T-세포 활성화의 최대 배수 증가(도 9e 내지 9h)이다. CD4⁺ T-세포(도 9a 및 9b) 또는 CD8⁺ T-세포(도 9c 및 9d)의 MFI(도 9a 및 9c) 및 퍼센트(도 9b 및 9d)는 인간 PBMC 효과기, MKN45 종양 세포 및 3T3-hFAP 섬유아세포를 5:1:1의 E:T로, FAP-ICOS₂₊₁ 분자의 증가하는 농도의 존재하 80 pM CEACAM5 TCB 존재하에 동반-배양 48시간

후 나타난 것이다. 그래프는 기법적 3반복을 나타내고, 오차 막대는 SD를 나타낸다. 도 9e 내지 9h는 5명 이하의 상이한 건강한 인간 PBMC 기증체에 대해 지시된 FAP-ICOS 분자 및 80 pM TCB의 동반-배양에 의해 유도된 T-세포 활성화의 최대 배수 증가를 도시한 것이다.

도 10은 몇몇 FAP-ICOS 형식의 부재 대 존재하에 증가된 CEACAM5-TCB-매개 T-세포 증식 및 T-세포 분화를 도시한 것이다. 그래프는 유동 세포분석으로 측정시 절대 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T-세포의 수(도 10a 및 10b), 및 미접촉 (naive)의 중심 기억(T_{cm}), 효과기 기억(T_{em}) 및 $CD45RA$ -양성 효과기 기억(T_{emra}) 세포의 수를 증가하는 TCB 농도에 의해(도 10c 내지 10j), 또는 2.9 pM의 고정된 농도에서(도 10k 및 10l) 나타난 것이다. $CD4^+$ 및 $CD8^+$ (도 10a 및 10b), 또는 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ T_{em} , T_{cm} , T_{naive} 및 T_{emra} 기억 T-세포 부분집합(도 10c 내지 10j)의 절대 세포 개수를 인간 PBMC 효과기, MKN45 종양 세포 및 3T3-hFAP 섬유아세포를 5:1:1의 E:T로, 1nM FAP-ICOS₁₊₁, FAP-ICOS₂₊₁, FAP-ICOS₁₊₁ HT의 존재하 CEACAM5-TCB(증가하는 농도)의 존재하에 동반-향온배양 96시간 후 나타난 것이다. 그래프는 기법적 3반복의 평균을 나타내고, 오차 막대는 SD를 나타낸다. 도 10k 및 10l은 도 10c 내지 10j에 도시된 데이터 집합을 참조로 하고, 1 nM의 지시된 ICOS 분자의 부재 대 존재하에 2.9 pM CEACAM5-TCB의 고정 농도에서 미접촉의 중심 기억, 효과기 기억 또는 T_{emra} 세포의 절대 개수를 강조하였다. 게이팅(gating)을 하기와 같이 수행하였다: $T_{em} = CD45RO+CCR7-$, $T_{cm} = CD45RO+CCR7+$, $T_{emra} = CD45RO-CCR7-$, $T_{naive} = CD45RO-CCR7+$.

도 11은 FAP-mICOS-L의 존재하에 증가된 mCEA-TCB-매개 T-세포 활성화를 도시한 것이다. 그래프는 유동 세포분석으로 평가된 $CD25$ 및 $CD69$ -양성 $CD8^+$ 및 $CD4^+$ T-세포의 퍼센트를 나타낸다. $CD25-$ 및 $CD69$ -양성 $CD8^+$ T-세포(도 11a) 또는 $CD4^+$ T-세포(도 11b)의 퍼센트를 MC38-hCEA 종양 세포, 3T3-mFAP 섬유아세포 및 쥐과 비장세포 효과기 세포(C57 B1/6 마우스)를 50:1의 E:T로, 50 nM FAP-표적화된 또는 비표적화된 참조 mICOS-L 분자의 존재 또는 부재하 1.5 nM mCEA-TCB의 존재하에 동반-향온배양 48시간 후 나타난 것이다. 그래프는 3반복을 나타내고, 오차 막대는 SD를 나타내고, 아이소형 값은 제하였다.

도 12는 NSG 마우스에서 단일 주사 후 FAP-ICOS₁₊₁의 약동학적 프로파일을 도시한 것이다.

도 13은 인간화된 마우스에서 MKN45 이종이식에서 FAP-ICOS₁₊₁과 CEACAM5-TCB 조합의 효능 연구를 도시한 것이다. 도시된 것은 연구 설계 및 처리군이다.

도 14는 인간화된 마우스에서 MKN45 이종이식에서 FAP-ICOS₁₊₁ 및 CEACAM5-TCB 조합의 효능 연구를 도시한 것이다. 도시된 것은 평균 종양 부피(도 14a) 또는 y축 상에 도표화된 개별 마우스의 종양 성장(도 14b 내지 14d)이다. 개별 마우스에 대해 도표화된 44일차에서의 종양 중량을 도 14e에 정리하였다. FAP-ICOS₁₊₁의 존재하에 증가된 TCB-매개 종양 퇴행을 볼 수 있다.

도 15는 인간화된 NSG 마우스에서 MKN45 및 3T3-hFAP 세포의 동반-이식 모델에서 FAP-ICOS₁₊₁ 항체 및 CEACAM5-TCB의 조합 치료시 FoxP3+의 종양-특이적 고갈을 도시한 것이다. 비장(도 15c 및 15d) 및 종양(도 15a 및 15b)에서 $CD4^+$ T-세포 중 T_{reg} 의 빈도 및 $CD8$ 및 T_{reg} 의 비를 나타냈다.

도 16은 사이토카인 분석을 도시한 것이다. 인간화된 NSG 마우스에서 MKN45 및 3T3-hFAP 세포의 동반-이식 모델에서 FAP-ICOS₁₊₁ 항체 및 CEACAM5-TCB의 조합 치료시 선택된 케모카인 및 사이토카인의 종양내 변화를 나타냈다. 각각의 모양은 개별 마우스를 나타낸다. 도시된 것은 CCL3(도 16a), TNF- α (도 16b) 및 CXCL13(도 16c)에 대한 데이터이다.

도 17은 ICOS-조절된 유전자를 확인하기 위해, 인간화된 NSG 마우스에서 MKN45 및 3T3-hFAP의 동반-이식 모델에서 CEACAM5-TCB에 의한 FAP-ICOS₁₊₁ 조합 연구의 잔류 종양의 유전자 분석을 도시한 것이다. 도시된 것은 유의하게 상향조절된 유전자 TNFAIP6(p 값은 0.1임) 및 CXCL13(p 값은 0.05임)의 배수 증가이고, 임계값은 TCB 단일치료 효과와 비교하여 2의 배수 변화 이상을 갖도록 설정하였다. TNFAIP6에 대한 데이터는 도 17a에 제시되고, CXCL13에 대한 데이터는 도 17b에 제시된다.

도 18은 모든 FAP- 또는 CEA-표적화된 항-쥐과 ICOS 분자의 개략도를 도시한 것이다. 2+1 형태(종양-관련 표적에 대해 1가)의 종양 표적화된 쥐과 ICOS 항체를 도 18a에 1+1 형태는 도 18b에 도시하였다.

도 19는 유동 세포분석으로 측정시 ICOS-양성 활성화된 인간 $CD4^+$ (상위 패널, 도 19a) 또는 인간 $CD8^+$ T-세포

(하위 패널, 도 19b), 또는 CEA-양성 MKN45 세포(도 19c 및 19d)에 대한 CEA-표적화된 ICOS 분자의 결합을 도시한 것이다. 그래프는 기법적 3반복의 MFI를 나타내고, 오차 막대는 SD를 나타낸다.

도 20은 80 pM의 TCB의 존재하에, 인간 PBMCs, MKN45 및 NIH-3T3-hFAP를 5:1:1의 세포 비 및 상이한 ICOS 분자의 증가하는 농도에서 동반-항온배양 48시간 후 CD69-양성 CD4⁺ T-세포의 %, 즉 T-세포의 활성화를 도시한 것이다(도 20a 참고). 그래프는 기법적 3반복을 나타내고, 오차 막대는 SD를 나타낸다. 도 20b에서, CEACAM5-TCB 단일치료와 비교하여, 200 pM 또는 1 nM의 ICOS 분자와 80 pM의 CEACAM5-TCB의 조합에 의해 유도된 CD69-양성 CD4⁺ T-세포의 %의 배수 증가가 대표화된다.

도 21은 유동 세포분석으로 측정시 ICOS-양성 CHO 세포 과발형 쥐과 ICOS(도 21a), 쥐과 NIH-3T3-mFAP 세포(도 21b), 또는 CEA-양성 MKN45 세포(도 21c)에 대한 항-쥐과 ICOS 분자의 결합을 도시한 것이다. 그래프는 기법적 3반복의 MFI를 나타내고, 오차 막대는 SD를 나타낸다.

도 22는 1.5 nM의 쥐과 CEA-TCB의 존재하에 C57Bl/6 마우스, MC38-hCEA 및 NIH-3T3-hFAP를 3:1:1의 세포 비 및 상이한 ICOS 분자의 증가하는 농도로 동반-항온배양 48시간 후 CD69-양성 CD4⁺(도 22a 및 22c), 또는 CD8⁺ T-세포(도 22b 및 22d)의 %, 즉 쥐과 T-세포의 활성화를 도시한 것이다. 그래프는 기법적 3반복을 나타내고, 오차 막대는 SD를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0055] 정의

[0056] 달리 정의하지 않는 한, 본원에 사용된 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속한 분야에 일반적으로 사용되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원의 이해를 위해, 하기 정의가 적용될 것이고, 단수형으로 사용되는 용어는 복수형을 포함하며, 이의 역도 마찬가지이다.

[0057] 본원에 사용된 용어 "항원 결합 분자"는 넓게는, 항원 결정인자에 특이적으로 결합하는 분자를 지칭한다. 항원 결합 분자의 예는 항체, 항체 단편 및 스캐폴드(scaffold) 항원 결합 단백질이다.

[0058] 본원에 사용된 용어 "중양-관련 항원에 결합하는 항원 결합 도메인", 중양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 항원 결합 도메인", 또는 "중양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 잔기"는 항원 결정인자에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드 분자를 지칭한다. 특정 양상에서, 항원 결합 도메인은 상기 도메인이 부착된 실체(예컨대 ICOS 작용제)를 표적 부위, 예컨대 항원 결정인자를 보유하는 특정 유형의 중양 세포 또는 중양 기질을 지향하도록 할 수 있다. 표적 항원에 특이적으로 결합가능한 항원 결합 도메인은 본원에 추가로 정의된 항체 및 단편을 포함한다. 또한, 항원 결합 도메인은 본원에서 이후로 정의되는 스캐폴드 항원 결합 단백질, 예컨대 설계된 반복 단백질 또는 설계된 반복 도메인을 기반으로 하는 결합 도메인(예컨대 WO 2002/020565 참고)을 포함한다.

[0059] 항체 또는 이의 단편과 관련하여, 용어 "표적 세포 항원에 특이적으로 결합가능한 항원 결합 도메인"은 항원의 부분 또는 전체에 특이적으로 결합하고 상보적인 면적을 포함하는 분자의 일부를 지칭한다. 특정 항원 결합가능한 항원 결합 도메인은 예컨대 하나 이상의 항체 가변 도메인(항체 가변부로도 지칭됨)에 의해 제시될 수 있다. 특히, 항원 결합 도메인은 제1 부분 및 제2 부분으로 구성되고, 여기서 제1 부분은 항체 경쇄 가변부(VL)를 포함하고, 제2 부분은 항체 중쇄 가변부(VH)를 포함하거나, 제2 부분이 항체 경쇄 가변부(VL)를 포함하고, 제1 부분은 항체 중쇄 가변부(VH)를 포함한다. 또다른 양상에서, "표적 세포 항원에 특이적으로 결합가능한 항원 결합 도메인"은 Fab 단편 또는 교차(cross)-Fab 단편일 수 있다.

[0060] 용어 "항체"는 본원에서 넓은 의미로 사용되고, 다양한 항체 구조, 예컨대 비한정적으로 단클론 항체, 다클론 항체, 단일특이성 항체 및 다중특이성 항체(예컨대 이중특이성 항체), 및 목적 항원-결합 활성을 나타내는 한의 항체 단편을 포함한다.

[0061] 본원에 사용된 용어 "단클론 항체"는 실질적으로 균질한 항체의 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하는데, 즉 상기 집단을 구성하는 개별 항체는, 예컨대 자연 발생 돌연변이를 함유하거나 단클론 항체의 제조 동안 발생하는 가능한 변이체 항체(이러한 항체는 일반적으로 소량으로 존재함)를 제외하고는 일치하고/거나 동일한 에피토프에 결합한다. 전형적으로, 상이한 결정인자(에피토프)에 대해 지향되는 다클론 항체 제조와는 대조적으로, 단클론 항체 제조의 각각의 단클론 항체는 항원의 단일 결정인자에 대해 지향된다.

[0062] 본원에 사용된 용어 "단일특이성"은 각각이 동일한 항체의 동일한 에피토프에 결합하는 하나 이상의 결합 부위

를 갖는 항체를 지칭한다.

- [0063] 용어 "이중특이성"은 항원 결합 분자가 2개 이상의 구별된 항원 결정인자에 특이적으로 결합가능함을 의미한다. 전형적으로, 이중특이성 항원 결합 분자는 각각이 상이한 항원 결정인자에 특이적인 2개의 항원 결정 부위를 포함한다. 특정 양태에서, 이중특이성 항원 결합 분자는 2개의 항원 결정인자, 특히 2개의 구별된 세포에 발현된 2개의 항원 결정인자에 동시에 결합할 수 있다.
- [0064] 본원에 사용된 용어 "가(valent)"는 하나의 구별된 항원 결정인자에 대해 특이성인 항원 결합 분자 내의 하나의 구별된 항원 결정인자에 대해 특이성인 특정된 수의 결합 부위의 존재를 지칭한다. 따라서, 용어 "1가", "2가", "4가" 및 "6가" 각각은 항원 결합 분자내의 특정 항원 결정인자에 대해 특이성인 1개, 2개, 4개 및 6개의 결합 부위를 지칭한다. 본 발명의 특정 양상에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항원 결합 분자는 특정 항원 결정인자에 대해 1가일 수 있거나(상기 항원 결정인자에 단지 하나의 결합 부위만을 가짐을 의미함), 특정 항원 결정인자에 대해 2가 또는 4가일 수 있다(상기 항원 결정인자에 대해 2개의 결합 부위 또는 4개의 결합 부위를 가짐을 의미함).
- [0065] 용어 "전장 항체", "완전 항체" 및 "진 항체"는 고유 항체 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖는 항체를 지칭하는데 상호교환가능하게 사용된다. "고유 항체"는 다양한 구조로 자연 발생하는 면역글로불린 분자를 지칭한다. 예컨대, 고유 IgG-강(class) 항체는 다이설파이드로 결합된 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄로 구성된 약 150,000 Da의 이종사량체 당단백질이다. N-말단에서 C-말단으로, 각각의 중쇄는 가변부(VH)(가변 중 도메인 또는 중쇄 가변 도메인으로도 지칭됨)에 이어 3개의 불변 도메인(CH1, CH2 및 CH3)(중쇄 가변부로도 지칭됨)을 갖는다. 유사하게, N-말단으로부터 C-말단으로, 각각의 경쇄는 가변부(VL)(가변 경 도메인 또는 경쇄 가변 도메인으로도 지칭됨)에 이어 경쇄 불변 도메인(CL)(경쇄 불변부로도 지칭됨)을 갖는다. 항체의 중쇄는 α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG), 또는 μ (IgM)로 지칭되는 5개 유형으로 분류될 수 있고, 이 중 일부는 하위 유형, 예컨대 γ_1 (IgG₁), γ_2 (IgG₂), γ_3 (IgG₃), γ_4 (IgG₄), α_1 (IgA₁) 및 α_2 (IgA₂)로 추가로 나뉠 수 있다. 항체의 경쇄는 이의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기준으로 카파(κ) 및 람다(λ)로 지칭되는 2개의 유형으로 분류될 수 있다.
- [0066] "항체 단편"은 완전 항체 이외의 분자를 지칭하되, 이는 온전 항체가 결합하는 항원에 결합하는 온전 항체의 부분을 포함한다. 항체 단편의 예는 비한정적으로 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, 이항체(diabody), 삼항체(tirabody), 사항체(tetrabody), 교차 Fab 단편, 선형 항체, 단일쇄 항체 분자(예컨대 scFv) 및 단일 도메인 항체를 포함한다. 특정 항체 단편의 개관을 위해, 문헌[Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003)]을 참고한다. scFv 단편의 개관을 위해, 예컨대 문헌[Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]; WO 93/16185; US 5,571,894 및 US 5,587,458을 참고한다. 회수 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하고 증가된 체내 반감기를 갖는 Fab 및 F(ab')₂의 논의를 위해 US 5,869,046을 참고한다. 이항체는 2가 또는 이중특이성일 수 있는 2개의 항원 결합 부위를 갖는 항체 단편이고, 예컨대 EP 404,097; WO 1993/01161; 문헌[Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003)]; 및 문헌[Hollinger et al., Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993)]을 참고한다. 삼항체도 문헌[Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003)]에 기재되어 있다. 단일 도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 부분; 또는 항체의 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 부분을 포함하는 항체 단편이다. 특정 양태에서, 단일-도메인 항체는 인간 단일 도메인 항체이다(미국 메사추세츠주 월담 소재의 도만티스 인코포레이티드(Domantis, Inc.), 예컨대 US 6,248,516 B1 참고). 항체 단편은 본원에 기재된 바와 같이 다양한 기법, 예컨대 비한정적으로 완전 항체의 단백질분해성 소화 및 재조합 숙주 세포(예컨대 *E.coli* 또는 파지)에 의한 제조에 의해 제조될 수 있다.
- [0067] 완전 항체의 파파인 절단은 2개의 일치하는 항원 결합 단편을 생성하고, 이는 각각 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 및 불변 도메인, 및 중쇄의 제1 불변 도메인(CH1)을 함유하는 Fab 단편으로도 지칭된다. 따라서, 본원에 사용된 용어 "Fab 단편"은 경쇄의 VL 및 불변 도메인(CL)을 포함하는 경쇄 단편, 및 중쇄의 VH 및 제1 불변 도메인을 포함하는 항체를 지칭한다. Fab' 단편은 항체 경첩부의 하나 이상의 시스테인을 비롯하여 중쇄 CH1 도메인의 카복시 말단의 몇몇 잔기가 추가됨으로써 Fab 단편과는 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기가 유리 티올 기를 보유하는 Fab' 단편이다. 펩신 처리는 2개의 항원-조합 부위(2개의 Fab 단편) 및 Fc 영역의 부분을 갖는 F(ab')₂ 단편을 생성한다. 본 발명에 따라, 용어 "Fab 단편"은 하기 정의된 "교차 Fab 단편" 또는 "교차(crossover) Fab 단편"도 포함한다.

- [0068] 용어 "교차 Fab 단편", "xFab 단편" 또는 "교차-Fab 단편"은 중쇄의 가변부 또는 불변부가 교환된 Fab 단편을 지칭한다. 2개의 상이한 쇠 조성의 교차 Fab 분자가 가능하고 본 발명의 이중특이성 항체에 포함된다. 한편, Fab 중쇄 및 경쇄의 가변부가 교환되는데, 즉 교차 Fab 분자는 경쇄 가변부(VL) 및 중쇄 불변부(CH1)로 구성된 펩티드 쇠, 및 중쇄 가변부(VH) 및 경쇄 불변부(CL)로 구성된 펩티드 쇠를 포함한다. 이러한 교차 Fab 분자는 교차 Fab_(VLVH)로도 지칭된다. 한편, Fab 중쇄 및 경쇄의 불변부가 교환될 때, 교차 Fab 분자는 중쇄 가변부(VH) 및 경쇄 불변부(CL)로 구성된 펩티드 쇠, 및 경쇄 가변부(VL) 및 중쇄 불변부(CH1)로 구성된 펩티드 쇠를 포함한다. 이러한 교차 Fab는 교차 Fab_(CLCH1)로도 지칭된다.
- [0069] "단일쇄 Fab 단편" 또는 "scFab"는 항체 중쇄 가변 도메인(VH), 항체 불변 도메인 1(CH1), 항체 경쇄 가변 도메인(VL), 항체 경쇄 불변 도메인(CL) 및 연결자로 이루어진 폴리펩티드로서, 상기 항체 도메인들 및 연결자는 N-말단에서 C-말단 방향으로 a) VH-CH1-연결자-VL-CL, b) VL-CL-연결자-VH-CH1, c) VH-CL-연결자-VL-CH1 또는 d) VL-CH1-연결자-VH-CL의 순서 중 하나를 갖고, 상기 연결자는 30개 이상, 바람직하게는 32 내지 50개의 아미노산의 폴리펩티드이다. 상기 단일쇄 Fab 단편은 CL 도메인과 CH1 도메인간의 자연적인 다이설파이드 결합을 통해 안정화된다. 또한, 이러한 단일쇄 Fb 분자는 시스테인 잔기의 삽입(예컨대, 카뮈 번호부여에 따라 중쇄에서 위치 44 및 가변 경쇄에서 위치 100)을 통해 쇠간 다이설파이드 결합의 생성에 의해 더욱 안정화될 수 있다.
- [0070] "교차 단일쇄 Fab 단편" 또는 "x-scFab"는 항체 중쇄 가변 도메인(VH), 항체 불변 도메인 1(CH1), 항체 경쇄 가변 도메인(VL), 항체 경쇄 불변 도메인(CL) 및 연결자로 이루어진 폴리펩티드로서, 상기 항체 도메인들 및 연결자는 N-말단에서 C-말단 방향으로 a) VH-CL-연결자-VL-CH1 또는 b) VL-CH1-연결자-VH-CL의 순서 중 하나를 갖고, VH 및 VL은 함께 항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 형성하고 상기 연결자는 30개 이상의 아미노산의 폴리펩티드이다. 또한, 이러한 x-Fab 분자는 시스테인 잔기의 삽입(예컨대, 카뮈 번호부여에 따라 가변 중쇄에서 위치 44 및 가변 경쇄에서 위치 100)을 통해 쇠간 다이설파이드 결합의 생성에 의해 더욱 안정화될 수 있다.
- [0071] "단일쇄 가변 단편(scFv)"은 10 내지 약 25개의 아미노산의 짧은 연결자 펩티드로 연결된 항체의 중쇄(V_H) 및 경쇄(V_L)의 가변부의 융합 단백질이다. 통상적으로, 연결자는 글리신이 풍부하여 가요성이 있고, 세린 또는 트레오닌이 풍부하여 용해성이 있으며, V_H의 N-말단과 V_L의 C-말단을 연결하거나 V_H의 C-말단과 V_L의 N-말단을 연결할 수 있다. 이러한 단백질은 불변부의 제거 및 연결자의 도입에도 불구하고 고유의 항체의 특이성을 유지한다. scFv 항체는, 예컨대 문헌[J.S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-96]에 기재되어 있다. 또한, 항체 단편은 VL과 함께 기능 항원 결합 부위로 조립되는 VH 또는 VH와 함께 기능 항원 결합 부위로 조립되는 VL의 특성을 갖는 단일쇄 폴리펩티드를 포함하고, 이에 따라 전장 항체의 항원 결합 특성을 제공한다.
- [0072] "스캐폴드 항원 결합 단백질"은 당업계에, 예컨대 피브로넥틴으로 공지되어 있고, 설계된 안키린 반복 단백질(DARPin)이 항원 결합 도메인을 위한 대체 스캐폴드로서 사용되어져 왔다(예컨대 문헌[Gebauer and Skerra, *Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics.* *Curr Opin Chem Biol* 13:245-255 (2009)] 및 문헌[Stumpp et al., *Darpins: A new generation of protein therapeutics.* *Drug Discovery Today* 13: 695-701 (2008)] 참고). 본 발명의 하나의 양상에서, 스캐폴드 항원 결합 단백질은 CTLA-4(에비바디(Evibody)), 리포칼린(안티칼린(Anticalin)), 단백질 A 유도된 분자, 예컨대 단백질 A의 Z-도메인(어피바디(Affibody)), A-도메인(어비머(Avimer)/맥시바디(Maxibody)), 형질 트랜스페린(트랜스-바디(trans-body)); 설계된 알키린 반복 단위(DARPin), 항체 경쇄 또는 중쇄의 가변 도메인(단일 도메인 항체, sdAb), 항체 중쇄의 가변 도메인(나노바디(nanobody), aVH), V_{NAR} 단편, 피브로넥틴(아드넥틴(AdNectin)), C-형 렉틴 도메인(테트라넥틴(Tetranectin)); 신규 항원 수용체 베타-락타마제의 가변 도메인(V_{NAR} 단편), 인간 감마-크리스탈린 또는 유비퀸틴(어필린 분자(Affilin molecule)); 인간 단백질분해효소 억제제의 쿠니츠(kunitz) 유형 도메인, 마이크로바디, 예컨대 낫틴(knottin) 과의 단백질, 펩티드 압타머 및 피브로넥틴(아드넥틴)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. CTLA-4(세포독성 T 림프구-관련 항원 4)는 주로 CD4⁺ T 세포에 발현되는 CD28-과의 수용체이다. 이의 세포의 도메인은 가변 도메인-유사 Ig 접힘(fold)을 갖는다. 항체의 CDR에 상응하는 루프(loop)는 상이한 결합 특성을 부여하는 이중 서열로 치환될 수 있다. 상이한 결합 특이성을 갖도록 변형된 CTLA-4 분자는 에비바디로도 공지되어 있다(예컨대 US 7166697 B1). 에비바디는 항체(예컨대 도메인 항체)의 단리된 가변부와 대략 동일한 크기이다. 더욱 자세한 설명은 문헌[*Journal of Immunological Methods* 248 (1-2), 31-45 (2001)]을 참고한다. 리포칼린은 작은 소수성 분자, 예컨대 스테로이드, 빌린, 레티노이드 및 지질을 운반하는 세포외 단백질과이다. 이는 원뿔형 구조의 열린 말단에 다수의 루프를 갖는 단단한 베타-시트 2차 구조를 갖고, 상이한 표적

항원에 결합하도록 변형될 수 있다. 안티칼린은 160 내지 180 아미노산 크기이고, 리포칼린으로부터 유도된다. 더욱 자세한 설명은 문헌[Biochim Biophys Acta 1482: 337-350 (2000)], US 7250297B1 및 US 20070224633을 참고한다. 어피타디는 스타필로코커스 아우레우스의 단백질 A로부터 유도된 스캐폴드이고, 항원에 결합하도록 변형될 수 있다. 상기 도메인은 약 58개의 아미노산의 3개의 나선형 다발로 이루어진다. 라이브러리는 표면 잔기의 무작위화에 의해 생성된다. 더욱 자세한 설명은 문헌[Protein Eng. Des. Sel. 2004, 17, 455-462] 및 EP 1641818A1을 참고한다. 아비머는 A-도메인 스캐폴드 과로부터 유도된 다도메인 단백질이다. 약 35 아미노산의 고유 도메인은 한정된 다이설파이드 결합 구조를 채용한다. 다양성은 A-도메인 과에 의해 나타나는 자연 변이를 셔플링(shuffling)함으로써 생성된다. 더욱 자세한 설명은 문헌[Nature Biotechnology 23(12), 1556 - 1561 (2005)] 및 문헌[Expert Opinion on Investigational Drugs 16(6), 909-917 (June 2007)]을 참고한다. 트랜스페린은 허용되는 표면 루프 내의 펩티드 서열의 삽입에 의해 상이한 표적 항원에 결합하도록 변형될 수 있다. 변형된 트랜스페린 스캐폴드의 예는 트랜스-바디를 포함한다. 더욱 자세한 설명은 문헌[J. Biol. Chem 274, 24066-24073 (1999)]를 참고한다. 설계된 안키린 반복 단위 단백질(DARPin)은 세포골격에 대한 내재막 단백질의 부착을 매개하는 단백질 과인 안키린으로부터 유도된다. 단일 안키린 반복은 2개의 알파 나선 및 하나의 베타 턴(turn)으로 이루어진 33개의 잔기 모티프이다. 이는 각각의 반복의 제1 알파 나선 및 베타 턴 내의 잔기를 무작위화함으로써 상이한 표적 항원에 결합하도록 변형될 수 있다. 이의 결합 계면은 모듈의 수를 증가 시킴(친화도 성숙의 방법)으로써 증가될 수 있다. 더욱 자세한 설명은 문헌[J. Mol. Biol. 332, 489-503 (2003), PNAS 100(4), 1700-1705 (2003)]; 문헌[J. Mol. Biol. 369, 1015-1028 (2007)] 및 US 20040132028 A1 을 참고한다. 단일 도메인 항체는 단일 단량체 가변 항체 도메인으로 이루어진 항체 단편이다. 최초의 단일 도메인은 낙타로부의 항체 중쇄의 가변 도메인으로부터 유도되었다(나노바디 또는 V_HH 단편). 또한, 용어 "단일 도메인 항체"는 자율 인간 중쇄 가변 도메인(VH) 또는 상어로부터 유도된 V_{NAR} 단편을 포함한다. 피브로넥틴은 항원에 결합하도록 변형될 수 있는 스캐폴드이다. 아드넥틴은 인간 피브로넥틴 III형(FN3)의 15개 반복 단위의 10번째 도메인의 자연 아미노산 서열의 골격으로 이루어진다. 베타 샌드위치의 하나의 말단에서 3개의 루프는 아드넥틴이 관심 치료 표적을 특이적으로 인식하도록 변형될 수 있다. 더욱 자세한 설명은 문헌[Des. Sel. 18, 435- 444 (2005)], US 20080139791, WO 2005056764 및 US 6818418 B1을 참고한다. 펩티드 압타머는 스캐폴드 단백질, 전형적으로는, 활성 부위에 삽입된 구속된 가변 펩티드 루프를 함유하는 티오레독신(TrxA)으로 이루어 지는 조합화학 인식 분자이다. 더욱 자세한 설명은 문헌[Expert Opin. Biol. Ther. 5, 783-797 (2005)]을 참고한다. 마이크로바디는 3 내지 4개의 시스테인 가교를 함유하는 25 내지 50 아미노산 길이의 자연 발생 마이크로단백질로부터 유도되고, 마이크로단백질의 예는 칼라타바이(KalataBI), 코노톡신 및 노트틴을 포함한다. 마이크로단백질은 마이크로단백질의 전반적인 접힘에 영향을 줌 없이 25개 이하의 아미노산을 포함하도록 변형될 수 있다. 변형된 노트틴 도메인의 더 자세한 설명은 WO 2008098796을 참고한다.

- [0073] 참조 분자로서 "동일한 에피토프에 결합하는 항원 결합 분자"는 경쟁 분석에서 이의 항원에 대한 상기 참조 분자의 결합을 50% 이상 차단하는 항원 결합 분자를 지칭하고, 역으로, 상기 참조 분자는 경쟁 분석에서 상기 항원 결합 분자의 항원에 대한 결합을 50% 이상 차단한다.
- [0074] 용어 "항원 결합 도메인"은 항원의 전부 또는 일부에 특이적으로 결합가능하고 상보적인 면적을 포함하는 항원 결합 분자를 지칭한다. 항원이 대형인 경우, 항원 결합 분자는 항원의 특정 부분(에피토프로 지칭됨)에만 결합할 수 있다. 항원 결합 도메인은 예컨대 하나 이상의 가변 도메인(가변부로도 지칭됨)에 의해 제시될 수 있다. 바람직하게는, 항원 결합 도메인은 항체 경쇄 가변부(VL) 및 항체 중쇄 가변부(VH)를 포함한다.
- [0075] 본원에 사용된 용어 "항원 결정인자"는 "항원" 및 "에피토프"와 동의어이고, 항원 결합 잔기가 결합하여 항원 결합 잔기-항원 복합체를 형성하는 폴리펩티드의 부위(예컨대 아미노산의 연속적인 이어짐 또는 불연속적인 아미노산의 상이한 영역으로 이루어진 일치 형태)를 지칭한다. 유용한 항원 결정인자는, 예컨대 종양 세포의 표면, 바이러스-감염 세포의 표면, 기타 질환 세포의 표면, 면역 세포의 표면, 혈청의 유리물(free) 및/또는 세포 외 기질(ECM)에서 찾을 수 있다. 달리 제시하지 않는 한, 본원에서 항원으로서 유용한 단백질은 임의의 척추동물 출처, 예컨대 영장류(예컨대 인간) 및 설치류(예컨대 마우스 및 래트)로부터의 임의의 고유한 형태의 단백질일 수 있다. 특정한 양태에서, 항원은 인간 단백질이다. 본원에서 특정 단백질을 참조하는 경우, 용어 "전장"은 미처리 단백질, 및 세포내 처리로부터 야기되는 임의의 형태의 단백질을 포괄한다. 또한, 상기 용어는 단백질의 자연 발생 변이체, 예컨대 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포괄한다.
- [0076] "특이적 결합"은 결합이 항원에 대해 선택성이고 원치않거나 비특이적인 상호작용과는 구별될 수 있음을 의미한다. 항원 결합 분자가 특정 항원에 결합하는 능력은 효소결합 면역흡착 분석(ELISA) 또는 당업자에게 친숙한 기타 기법, 예컨대 표면 플라즈몬 공명(SPR) 기법(비아코어(BIAcore) 계기에서 분석됨)(문헌[Liljebblad et al.,

Glyco J 17, 323-329 (2000)], 및 종래의 결합 분석(문헌[Heeley, *Endocr Res* 28, 217-229 (2002)])을 통해 측정될 수 있다. 하나의 양태에서, 비관련 단백질에 대한 항원 결합 분자의 결합도는, 예컨대 SPR에 의해 측정되어 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합의 약 10% 미만이다. 특정 양태에서, 항원에 결합하는 분자는 1 μM 이하, 100 nM 이하, 10 nM 이하, 1 nM 이하, 0.1 nM 이하, 0.01 nM 이하 또는 0.001 nM 이하(예컨대 10^{-8} M 이하, 예를 들어 10^{-8} 내지 10^{-13} M, 예를 들어 10^{-9} 내지 10^{-13} M)의 해리 상수(K_d)를 갖는다.

[0077] "친화도" 또는 "결합 친화도"는 분자(예컨대 항체)의 단일 결합 부위와 이의 결합짝(예컨대 항원)간 비공유결합 상호작용의 총 합이 세기를 지칭한다. 달리 제시하지 않는 한, 본원에 사용된 "결합 친화도"는 고유 결합 친화도를 지칭하고, 이는 결합짝 구성원들(항체와 항원)간의 1:1 상호작용을 반영한다. 분자 X 및 이의 결합짝 Y의 친화도는 일반적으로 해리 상수(K_d)에 의해 표시될 수 있고, 이는 해리 속도 상수(k_{off})와 회합 속도 상수(k_{on})의 비이다. 따라서, 등가의 친화도는 속도 상수의 비가 동일하게 유지되는 한 상이한 속도 상수를 포함할 수 있다. 친화도는 본원에 기재된 것을 비롯한 당업계 통상의 방법으로 측정될 수 있다. 친화도 측정을 위한 특정 방법은 SPR이다.

[0078] 본원에 사용된 "종양-관련 항원" 또는 TAA는 표적 세포, 예컨대 종양내 세포, 예컨대 암세포 또는 종양 기질의 세포의 표면에 제시되는 항원 결정인자(ICOS와는 상이함)를 지칭한다. 특정 양태에서, 표적 세포 항원은 종양 세포의 표면 상의 항원이다. 하나의 양태에서, TAA는 섬유아세포 활성화 단백질(FAP), 암배아 항원(CEA), 엽산 수용체 알파(FoIR1), 흑색종-관련 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸(MCSP), 표피 성장 인자 수용체(EGFR), 인간 표피 성장 수용체 2(HER2) 및 p95HER2로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특히, 종양-관련 항원은 FAP 또는 CEA이다.

[0079] 프롤린 엔도펩티다제 또는 세프라제(EC 3.4.21)로도 공지되어 있는 용어 "섬유아세포 활성화 단백질(FAP)"은 달리 제시하지 않는 한 임의의 척추 동물 출처, 예컨대 포유동물, 예컨대 영장류(예컨대 인간), 비인간 영장류(예컨대 시노몰거스 원숭이) 및 설치류(예컨대 마우스 및 래트)로부터의 임의의 고유 FAP를 지칭한다. 용어 "전장"은 미처리 단백질, 및 세포내 처리로부터 야기되는 임의의 형태의 단백질을 포괄한다. 또한, 상기 용어는 단백질의 자연 발생 변이체, 예컨대 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포괄한다. 하나의 양태에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 인간, 마우스 및/또는 시노몰거스 FAP에 특이적으로 결합가능하다. 인간 FAP의 아미노산 서열은 유니프로트(UniProt)(www.uniprot.org) 접근번호 Q12884(버전 149, 서열번호 79), 또는 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_004451.2에 제시되어 있다. 인간 FAP의 세포외 도메인(ECD)은 아미노산 위치 26에서 760으로 이어진다. His-태깅된 인간 FAP ECD의 아미노산 서열은 서열번호 80에 제시되어 있다. 마우스 FAP의 아미노산 서열은 유니프로트 접근번호 P97321(버전 126, 서열번호 81), 또는 NCBI RefSeq NP_032012.1에 제시되어 있다. 마우스 FAP의 세포외 도메인(ECD)은 아미노산 위치 26에서 761로 이어진다. 서열번호 82는 His-태깅된 마우스 FAP ECD의 아미노산 서열을 나타낸다. 서열번호 83은 시노몰거스 FAP ECD의 아미노산 서열이다. 바람직하게는, 본 발명의 항-FAP 결합 분자는 FAP의 세포외 도메인에 결합한다.

[0080] 용어 "암배아 항원(CEA)"은 암배아 항원-관련 세포 부착소 분자 5(CEACAM5)로도 공지되어 있고, 달리 제시하지 않는 한 임의의 척추 동물 출처, 예컨대 포유동물, 예컨대 영장류(예컨대 인간), 비인간 영장류(예컨대 시노몰거스 원숭이) 및 설치류(예컨대 마우스 및 래트)로부터의 임의의 고유 CEA를 지칭한다. 인간 CEA의 아미노산 서열은 유니프로트(www.uniprot.org) 접근번호 P06731(버전 151, 서열번호 84)에 제시되어 있다. CEA는 오랫동안 종양-관련 항원으로서 확인되어 왔다(문헌[Gold and Freedman, *J Exp Med.*, 121:439-462, 1965]; 및 문헌[Berinstein N. L., *J Clin Oncol.*, 20:2197-2207, 2002]). 원래, CEA는 태아 조직에서만 발견되는 단백질로서 분류되었고, 현재는 몇몇 정상 성인 조직에서 확인되어 왔다. 이러한 조직은 근본적으로는 주로 상피, 예컨대 위창자, 호흡기 및 비노생식 세포, 및 결합, 자궁경부, 땀샘 및 전립선 세포이다(문헌[Nap et al., *Tumour Biol.*, 9(2-3):145-53, 1988]; 및 문헌[Nap et al., *Cancer Res.*, 52(8):2329-2339, 1992]). 상피 근본의 종양 및 이의 전이는 종양-관련 항원으로서 CEA를 함유한다. CEA 자체의 존재가 암세포로의 형질전환을 나타내지는 않지만, CEA의 분포가 이를 나타낸다. 정상 조직에서, CEA는 일반적으로 세포의 첨단(apical) 표면 상에 발견되어(문헌[Hammarstrom S., *Semin Cancer Biol.* 9(2):67-81 (1999)]), 혈류 중 항체에 접근이 불가하다. 정상 조직과 대조적으로, CEA는 암세포의 전체 표면에 발견되는 경향이 있다(문헌[Hammarstrom S., *Semin Cancer Biol.* 9(2):67-81 (1999)]). 이러한 발현 패턴의 변화는 암세포에 결합하는 항체에 CEA가 접근가능하게 한다. 또한, CEA 발현은 암세포에서 증가한다. 또한, 증가된 CEA 발현은 증가된 세포내 부착소를 촉진하고, 이는 전이를 야기한다(문헌[Marshall J., *Semin Oncol.*, 30(a Suppl. 8):30-6, 2003]). 다양한 종양 실체에서 CEA 발현의 발현률은 일반적으로 매우 높다. 공개된 데이터에 따라, 조직 샘플에서 수행된 자체

분석에서 결장직장 암종(CRC)에서 약 95%, 췌장암에서 90%, 위암에서 80%, 비소세포 폐암(NSCLC, 이는 여기서 HER3과 동반-발현됨)에서 60%, 유방암에서 40%로 높은 발현률이 확인되었고, 소세포 폐암 및 교모세포종에서는 낮은 발현이 발견됐다.

[0081] CEA는 세포로부터 용이하게 절단되어 직접적으로 또는 림프계를 통해 종양으로부터 혈류로 유입된다. 이러한 특성에 기인하여, 혈청 CEA의 수준은 암의 진단 및 암, 특히 직장결장암의 재발에 대한 검열을 위한 임상적 마커로서 사용되어 왔다(문헌[Goldenberg D M., *The International Journal of Biological Markers*, 7:183-188, 1992]; 문헌[Chau I., et al., *J Clin Oncol.*, 22:1420-1429, 2004]; 및 문헌[Flamini et al., *Clin Cancer Res*; 12(23):6985-6988, 2006]).

[0082] 용어 "FolR1"은 엽산 수용체 알파를 지칭하고 다수의 암에서 잠재적 진단 및 치료 표적으로서 확인되어 왔다. 이는 달리 제시하지 않는 한 임의의 척추 동물 출처, 예컨대 포유동물, 예컨대 영장류(예컨대 인간), 비인간 영장류(예컨대 시노몰거스 원숭이) 및 설치류(예컨대 마우스 및 래트)로부터의 임의의 고유 FolR1을 지칭한다. 인간 FolR1의 아미노산 서열은 유니프로트 접근번호 P15328(서열번호 85)에 제시되어 있고, 쥐과 FolR1은 유니프로트 접근번호 P35846(서열번호 86)의 아미노산 서열을 갖고, 시노몰거스 FolR1은 유니프로트 접근번호 G7PR14(서열번호 87)에 제시된 아미노산 서열을 갖는다. FolR1은 세포의 형질막에 발현된 N-당화된 단백질이다. FolR1은 엽산 및 몇몇 환원된 엽산 유도체에 높은 친화도를 갖고, 생리학적 엽산, 즉 5-메틸테트라하이드로엽산의 세포 내부로의 전달을 매개한다. FolR1은 다양한 다수의 난소암, 및 다수의 자궁암, 자궁내막암, 췌장암, 신장암, 폐암 및 유방암에서 과발현되기에 FolR1-지향되는 암 치료에 바람직한 표적인 한편, 정상 조직에서 FolR1의 발현은 신장 근위 세관, 폐의 폐포세포, 방광, 고환, 맥락막 및 갑상선에서 상피 세포의 침단 막으로 제한된다. 최근의 연구들은 FolR1 발현이 3중 음성 유방암에서 특히 높음을 확인하였다(문헌 [Necela et al. *PLoS One* 2015, 10(3), e0127133]).

[0083] 용어 "흑색종-관련 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸(MCSP)"은 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸 4(CSPG4)로도 공지되어 있고, 달리 제시하지 않는 한 임의의 척추 동물 출처, 예컨대 포유동물, 예컨대 영장류(예컨대 인간), 비인간 영장류(예컨대 시노몰거스 원숭이) 및 설치류(예컨대 마우스 및 래트)로부터의 임의의 고유 MSCP를 지칭한다. 인간 MSCP의 아미노산 서열은 유니프로트 접근번호 Q6UVK1(버전 103, 서열번호 88)에 제시되어 있다. MCSP는 세포막에 발현된 N-연결된 280 kDa 당단백질 성분 및 450 kDa 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸 성분으로 이루어지는 고도로 당화된 내재성 막 콘드로이친 설페이트 프로테오글리칸이다(문헌 [Ross et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1983, 225:370-38]). MCSP는 다수의 정상 및 형질전환된 세포에 보다 널리 분포되어 있다. 특히, MCSP는 표피의 거의 모든 기저 세포에서 발견된다. MCSP는 흑색종 세포에서 상이하게 발현되고, 분석되는 양성 반(nevi) 및 흑색종 병반의 90% 초과에서 발현되는 것으로 밝혀졌다. 또한, MCSP는 멜라닌세포 유래의 종양, 예컨대 기저 세포 암종, 신경성선 유래의 다양한 종양 및 유방 암종에서 발현되는 것으로 밝혀졌다.

[0084] 용어 "표피 성장 인자 수용체(EGFR)"는 원암유전자(proto-oncogene) c-ErbB-1 또는 수용체 티로신-단백질 키나제 erbB-1로도 지칭되고, 달리 제시하지 않는 한 임의의 척추 동물 출처, 예컨대 포유동물, 예컨대 영장류(예컨대 인간), 비인간 영장류(예컨대 시노몰거스 원숭이) 및 설치류(예컨대 마우스 및 래트)로부터의 임의의 고유 EGFR을 지칭한다. 인간 EGFR의 아미노산 서열은 유니프로트 접근번호 P00533(버전 211, 서열번호 89)에 제시되어 있다. 원암유전자 "HER2"(인간 표피 성장 인자 수용체 2)는 인간 진피 성장 인자 수용체와 관련되어 있고 다소 상동인 단백질 티로신 키나제(p185HER2)를 암호화한다. HER2는 당업계에 c-erbB-2로도 공지되어 있고, 때로는 래트 상동 neu로 지칭된다. HER2의 증폭 및/또는 과발현은 다수의 인간 악성 종양과 관련되어 있고, 인간 유방암 및 난소암의 25 내지 30%의 진행에 내재적으로 연루되는 것으로 나타난다. 또한, 증폭의 정도는 중앙값 환자 생존 기간과 가역적인 상관관계가 있다(문헌[Slamon, D. J. et al., *Science* 244:707-712 (1989)]). 인간 HER2의 아미노산 서열은 유니프로트 접근번호 P04626(버전 230, 서열번호 90)에 제시되어 있다. 본원에 사용된 용어 "p95HER2"는 HER2 수용체 단백질의 카복시 말단 단편(CTF)을 지칭하고, 이는 "611-CTF" 또는 "100-115 kDa p95HER2"로도 공지되어 있다. p95HER2는 전장 HER2 분자의 코돈 위치 611에서 HER2 mRNA의 번역 개시를 통해 세포에 생성된다(문헌[Anido et al, *EMBO J* 25; 3234-44 (2006)]). 이는 100 내지 115 kDa의 분자량을 갖고, 세포막에서 발현되는데, 여기서 이는 분자간 다이설파이드 결합에 의해 유지되는 동종이량체를 형성할 수 있다(문헌[Pedersen et al., *Mol Cell Biol* 29, 3319-31 (2009)]). 인간 p95HER2의 예시적인 서열은 서열번호 91에 제시되어 있다.

[0085] 용어 "ICOS"(유도가능한 T-세포 공동-자극제(Costimulator))는 달리 제시하지 않는 한 임의의 척추 동물 출처, 예컨대 포유동물, 예컨대 영장류(예컨대 인간), 비인간 영장류(예컨대 시노몰거스 원숭이) 및 설치류(예컨대 마

우스 및 래트)로부터의 임의의 유도가능한 T-세포 공동자극성 단백질을 지칭한다. ICOS는 AILIM 또는 CD78로도 지칭되고 CD28 상과(CD28/CTLA-4 세포-표면 수용체 과)의 구성원이고, 초기 T-세포 활성화 후 T-세포에 특이적으로 발현된다. 또한, ICOS는 다른 T-세포 부분집합, 예컨대 T_H1 , T_H2 및 T_H17 의 발달과 기능에 중요한 역할을 한다. 주목할 점은, ICOS는 T_H1 및 T_H2 세포 둘다와 관련된 T-세포 증식 및 사이토카인 분비를 공동-자극한다. 이에 따라, ICOS KO 마우스가 다양한 질환 모델, 예컨대 당뇨(T_H1), 기도 염증(T_H2) 및 EAE 신경-염증 모델(T_H17)에서 자가면역성 표현형의 손상된 발달에서 자가면역 표현형의 손상된 발달을 입증한다. T 효과기(T_{eff}) 세포 기능을 조절하는 이의 역할 이외에도, ICOS는 T 조절 세포(T_{regs})도 조절한다. ICOS는 T_{reg} 에서 높은 수준으로 발현되고, T_{reg} 항상성 및 기능에도 연관되어 있다. 활성화시, ICOS, 즉 다이실파이드-연결된 동종이량체는 PI3K 및 AKT 경로를 통해 신호를 유도한다. 후속의 신호전달 사건은 계통 특이적 전사 인자(예컨대 T-bet, GATA-3)의 발현을 야기하고, 결과적으로 T-세포 증식 및 생존에 영향을 준다. 또한, 상기 용어는 ICOS의 자연 발생 변이체, 예컨대 스플라이스 변이체 또는 대립형질 변이체를 포괄한다. 인간 ICOS의 아미노산 서열은 유니프روت(www.uniprot.org) 접근번호 Q9Y6W8(서열번호 3)에 제시되어 있다.

[0086] 본원에 기술된 바와 같이, ICOS 리간드(ICOS-L; B7-H2; B7RP-1; CD275; GL50)도 B7 상과의 구성원이고, ICOS에 대한 막 결합 천연 리간드이고, B-세포, 대식세포 및 수지상 세포의 세포 표면에서 발현된다. ICOS-L은 ICOS와 이의 상호작용에서 세포 표면 상의 비공유결합으로 연결된 동종이량체로서 기능한다. 인간 ICOS-L은 인간 CD28 및 CTLA-4에도 결합하는 것으로 보고되어 있다(문헌[Yao et al., 2011, Immunity, 34: 729-740]). huICOS-L의 엑토도메인(ectodomain)의 예시적인 아미노산 서열은 서열번호 1에 제시되어 있고, 쥐과 ICOS-L(muICOS-L)의 예시적인 아미노산 서열은 서열번호 2에 제시되어 있다.

[0087] 용어 "가변부" 또는 "가변 도메인"은 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합에 참여하는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 일반적으로, 고유 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인(각각 VH 및 VL)은 4개의 불변 프레임 워크 영역(FR) 및 3개의 추가변부(HVR)를 포함하는 각각의 도메인을 갖는 유사한 구조를 갖는다. 예컨대, 문헌[Kindt et al., Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)]을 참고한다. 단일 VH 또는 VL은 항원 결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다.

[0088] 본원에 사용된 용어 "추가변부" 또는 "HVR"은 서열(상보성 결정부, 또는 CDR)이 추가변성이고/거나 구조적으로 한정된 루프(추가변 루프)를 형성하고/거나 하우언 접촉 잔기(항원 접촉부)를 함유하는 항원 가변 도메인의 각각의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 항체는 6개의 HVR(VH에서 3개(H1, H2 및 H3), 및 VL에서 3개(L1, L2 및 L3))을 포함한다. 본원에서 예시적인 HVR은 하기를 포함한다:

[0089] (a) 아미노산 잔기 26-32(L1), 50-52(L2), 91-96(L3), 26-32(H1), 53-55(H2) 및 96-101(H3)에서 나타나는 추가 변 루프(문헌[Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)]);

[0090] (b) 24-34(L1), 50-56(L2), 89-97(L3), 31-35b(H1), 50-65(H2), 및 95-102(H3)에서 나타나는 CDR(문헌[Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]);

[0091] (c) 아미노산 잔기 27c-36(L1), 46-55(L2), 89-96(L3), 30-35b(H1), 47-58(H2) 및 93-101(H3)에서 나타나는 항원 접촉부(MacCallum et al. *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)); 및

[0092] (d) 상기 (a), (b) 및/또는 (c)의 조합, 및 HVR 아미노산 잔기 46-56(L2), 47-56(L2), 48-56(L2), 49-56(L2), 26-35(H1), 26-35b(H1), 49-65(H2), 93-102(H3) 및 94-102(H3).

[0093] 달리 제시하지 않는 한, HVR(예컨대 CDR) 잔기, 및 가변 도메인의 기타 잔기(예컨대 FR 잔기)는 본원에서 상기 카뎀 등에 따른 문헌에 따라 번호부여된다.

[0094] 또한, 카뎀 등은 임의의 항체에 적용가능한 가변부 서열을 위한 번호부여 체계를 정의하였다. 당업자는 "카뎀 번호부여"의 서열 자체 이외의 임의의 실험 데이터에 의존하지 않고 상기 체계를 임의의 가변부 서열에 명확히 적용할 수 있다. 본원에 사용된 "카뎀 번호부여"는 문헌[Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983)]에 의해 제시된 번호부여 체계를 지칭한다. 달리 특정하지 않는 한, 항체 가변부의 특정 아미노산 잔기 위치의 번호부여에 대한 참조는 카뎀 번호부여 체계를 따른다.

[0095] 본원에 사용된 용어 "친화도 성숙된"은 항원 결합 분자(예컨대 항체)의 맥락에서, 예컨대 돌연변이에 의해, 참

조 항체와 동일한 항원에 결합하고, 바람직하게는 동일한 에피토프에 결합하는 상기 참조 항체 결합 분자로부터 유도된 항원 결합 분자를 지칭하고, 항원에 대해 상기 참조 항원 결합 분자의 친화도보다 높은 친화도를 갖는다. 일반적으로, 친화도 성숙은 항원 결합 분자의 하나 이상의 CDR의 하나 이상의 아미노산의 변형을 수반한다. 전형적으로, 친화도 성숙된 항원 결합 분자는 초기 참조 항원 결합 분자와 동일한 에피토프에 결합한다.

- [0096] "프레임워크" 또는 "FR"은 추가변부(HVR) 잔기 이외의 가변 도메인 잔기를 지칭한다. 일반적으로, 가변 도메인의 FR은 4개의 도메인(FR1, FR2, FR3 및 FR4)으로 이루어진다. 따라서, HVR 및 FR 서열은 일반적으로 VH(또는 VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4의 순서로 나타난다.
- [0097] 본원의 목적을 위해, "수용체 인간 프레임워크"는 하기 정의된 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 공통 프레임워크로부터 유도된 경쇄 가변 도메인(VL) 프레임워크 또는 중쇄 가변 도메인(VH) 프레임워크의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크를 포함한다. 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 공통 프레임워크로부터 유도된 프레임워크는 이와 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 아미노산 서열 변화를 함유할 수 있다. 일부 양태에서, 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하 또는 2개 이하의 아미노산 변화가 존재한다. 일부 양태에서, VL 수용체 인간 프레임워크는 VL 인간 면역글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 공통 프레임워크 서열과 일치한다.
- [0098] 용어 "키메라 항체"는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 출처 또는 종으로부터 유도되고, 나머지 중쇄 및/또는 경쇄가 상이한 출처 또는 종으로부터 유도된 항체를 지칭한다.
- [0099] 항체의 "강(class)"은 중쇄에 의해 보유되는 불변 도메인 또는 불변부의 유형을 지칭한다. 항체의 5개 주요 강(IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM)이 존재하고, 이중 몇몇은 아강(동형)(예컨대 IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂)으로 더욱 나눌 수 있다. 상이한 강 of 면역글로불린에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 지칭된다.
- [0100] "인간화된 항체"는 비인간 HVR로부터의 아미노산 잔기 및 인간 FR로부터의 아미노산 잔기를 포함하는 키메라 항체를 지칭한다. 특정 양태에서, 인간화된 항체는 하나 이상, 전형적으로는 2개 이상의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 여기서 HVR(예컨대 CDR)의 모두 또는 실질적으로 모두는 비인간 항체의 것에 상응하고, FR의 모두 또는 실질적으로 모두는 인간 항체의 것에 상응한다. 인간화된 항체는 인간 항체로부터 유도된 항체 불변부의 적어도 일부를 임의적으로 포함할 수 있다. "항체의 인간화된 형태", 예컨대 비인간 항체는 인간화를 거친 항체를 지칭한다. 본 발명에 포괄되는 다른 형태의 "인간화된 항체"는 불변부가 원래 항체의 불변부로부터 추가적으로 변형되거나 변화되어 본 발명에 따른 특성, 특히 C1q 결합 및/또는 Fc 수용체(FcR) 결합을 생성하는 항체이다.
- [0101] "인간 항체"는 인간 또는 인간 세포에 의해 생산되거나, 인간 항체 레퍼토리 또는 인간 항체 암호화 서열을 이용하는 비인간 출처로부터 유도된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 보유하는 항체이다. 구체적으로는, 이러한 인간 항체의 정의는 비인간 항원 결합 잔기를 포함하는 인간화된 항체는 배제한다.
- [0102] "CH1 도메인"은 대략 EU 위치 118(카밧에 따른 EU 번호부여 체계)로부터 EU 위치 215로 이어지는 항체 중쇄 폴리펩티드의 부분을 나타낸다. 하나의 양상에서, CH1 도메인은 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSVG HTPFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKVK(서열번호 170)의 아미노산 서열을 갖는다. 통상적으로, EPKSC(서열번호 171)의 아미노산 서열을 갖는 분절이 이어져 CH1 도메인을 경첩부에 연결한다.
- [0103] 용어 "경첩부"는 야생형 항체 중쇄에서 CH1 도메인과 CH2 도메인을 연결(예컨대 카밧 EU 번호 체계에 따라 대략 위치 216으로부터 대략 위치 320, 또는 대략 위치 226으로부터 대략 위치 230)하는 항체 중쇄 폴리펩티드의 부분을 나타낸다. 기타 IgG 아강(subclass)의 경첩부는 IgG₁ 아강 서열의 경첩부 시스테인 잔기에 의한 정렬에 의해 결정될 수 있다. 일반적으로, 경첩부는 일치하는 아미노산 서열을 갖는 2개의 폴리펩티드로 이루어진 이량체 분자이다. 일반적으로, 경첩부는 25개 이하의 아미노산 잔기를 갖고 회합되는 결합 부위가 독립적으로 움직일 수 있도록 가요성이 있다. 경첩부는 3개의 도메인인 상부 경첩 도메인, 중간부 경첩 도메인 하부 경첩 도메인으로 하위 분류될 수 있다(예컨대 문헌[Roux, et al., J. Immunol. 161 (1998) 4083] 참고).
- [0104] 하나의 양상에서, 경첩부는 아미노산 서열 DKTHTCPXCP(서열번호 172)를 갖고, 여기서 X는 S 또는 P이다. 하나의 양상에서, 경첩부는 아미노산 서열 HTPCXCP(서열번호 173)를 갖고, 여기서 X는 S 또는 P이다. 하나의 양상에서, 경첩부는 아미노산 서열 CPXCP(서열번호 174)를 갖고, 여기서 X는 S 또는 P이다.
- [0105] 본원에서 용어 "Fc 도메인" 또는 "Fc 영역"은 상기 불변부의 적어도 일부를 함유하는 면역글로불린 중쇄의 C-

말단 영역을 한정하는데 사용된다. 상기 용어는 고유 서열 Fc 영역 및 변형 Fc 영역을 포함한다. IgG 중쇄의 Fc 영역의 경계가 약간 변할 수도 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 대개 Cys226으로부터 또는 Pro230으로부터 중쇄의 카복시-말단까지 연장되는 것으로 한정된다. 그러나, 숙주 세포에 의해 생산된 항체는 상기 중쇄의 C-말단으로부터 하나 이상, 특히 하나 또는 2개의 아미노산의 번역-후 절단을 겪을 수도 있다. 따라서, 전장 중쇄를 암호화하는 특정한 핵산 분자의 발현에 의해 숙주 세포에 의해 생산된 항체는 전장 중쇄를 포함하거나, 전장 중쇄의 절단된 변이체(또한 본원에서 "절단된 변형 중쇄"라 칭한다)를 포함할 수 있다. 이는 상기 중쇄의 최종 2개의 C-말단 아미노산이 글리신(G446) 및 리신(K447, 카뱃 EU 색인에 따른 번호부여)인 경우일 수 있다. 따라서, 상기 Fc 영역의 C-말단 리신(Lys447) 또는 C-말단 글리신(Gly446) 및 리신(K447)이 존재할 수도, 또는 존재하지 않을 수도 있다. Fc 도메인(또는 본원에 정의된 바와 같은 Fc 도메인의 아단위)을 포함하는 중쇄의 아미노산 서열을 본원에서 달리 나타내지 않는 한 C-말단 글리신-리신 다이펩티드 없이 나타낸다. 하나의 양상에서, 본 발명에 따른 항체 또는 이종특이성 항원 결합 분자에 포함된 본원에 명시된 바와 같은 Fc 도메인의 아단위를 포함하는 중쇄는 추가적인 C-말단 글리신-리신 다이펩티드(G446 및 K447, 카뱃의 EU 색인에 따른 번호부여)를 포함한다. 하나의 양상에서, 본 발명에 따른 항체 또는 이종특이성 항원 결합 분자에 포함된 본원에 명시된 바와 같은 Fc 도메인의 아단위를 포함하는 중쇄는 추가적인 C-말단 글리신 잔기(G446, 카뱃의 EU 색인에 따른 번호부여)를 포함한다. IgG Fc 도메인의 아단위는 IgG CH2 및 IgG CH3 불변 도메인을 포함한다.

[0106] 인간 IgG Fc 영역의 "CH2 도메인"은 통상적으로 대략 EU 위치 231(카뱃에 따른 EU 번호부여 체계)의 아미노산 잔기로부터 대략 EU 위치 340의 아미노산 잔기로 이어진다. 하나의 양상에서, CH2 도메인은 APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVWDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQESTYRW SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAK(서열번호 175)의 아미노산 서열을 갖는다. CH2 도메인은 또 다른 도메인과 밀접하여 짝지어지지 않는다는 점에 있어서 고유하다. 오히려, 2개의 N-연결된 탄수화물 분지쇄가 완전 Fc 영역의 2개의 CH2 도메인들 사이에 개재된다. 상기 탄화수소가 도메인-도메인 짝지움에 대한 대체를 제공하고 CH2 도메인을 안정화시키는 데 도움을 주는 것으로 추측된다(문헌[Burton, Mol. Immunol. 22 (1985) 161-206]). 하나의 양태에서, 탄화수소쇄는 CH2 도메인에 부착된다. 본원에서, CH2 도메인은 고유서열 CH2 도메인 또는 변이 CH2 도메인일 수 있다.

[0107] "CH3 도메인"은 대략 EU 위치 341(카뱃에 따른 EU 번호부여 체계)로부터 EU 위치 446으로 이어지는 항체 중쇄 폴리펩티드의 부분을 나타낸다. 하나의 양상에서, CH3 도메인은 GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NWFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG(서열번호 176)의 아미노산 서열을 갖는다. 여기서, CH3 영역은 고유 서열 CH3 도메인 또는 변이 CH3 도메인(예컨대 이의 하나의 쇠에 도입된 돌출부(knob) 및 이의 또 다른 쇠에 상응하게 도입된 공동(hole))을 갖는 CH3 도메인, 명확히 본원에 참조로 혼입되는 US 5,821,333 참조)일 수 있다. 이러한 변이 CH3 도메인은 본원에 기재된 바와 같이 2개의 비일치 항체 중쇄의 이종이량체화(heterodimerization)를 촉진하는데 사용될 수 있다. 하나의 양태에서, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 Cys226 또는 Pro230으로부터 중쇄의 카복시 말단으로 이어진다. 그러나, Fc 영역의 C-말단 리신(Lys447)은 존재하거나 존재하지 않을 수 있다. 본원에서 달리 특정되지 않는 한, Fc 영역 또는 불변부의 아미노산 잔기의 번호부여는 문헌[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991]에 기재되어 있는 US 색인으로도 지칭되는 EU 번호부여 체계에 따른다.

[0108] " knob-인투-홀" 기술은, 예컨대 US 5,731,168; US 7,695,936; 문헌[Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996)] 및 문헌[Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001)]에 기재되어 있다. 일반적으로, 상기 방법은 제1 폴리펩티드의 계면에 돌출부(knob) 및 제2 폴리펩티드의 계면에 상응하는 공동(hole)을 도입함을 수반하여, 상기 돌출부가 상기 공동에 자리잡음으로써 이종이량체 형성 및 후부(hinder) 동종 이량체 형성이 촉진된다. 돌출부는 제1 폴리펩티드의 계면으로부터의 작은 아미노산 측쇄를 더 큰 측쇄(예컨대 티로신 또는 트립토판)으로 대체함으로써 구축된다. 돌출부와 동일하거나 유사한 크기의 상보적 공동은 제2 폴리펩티드의 계면에서 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 것(예컨대 알라닌 또는 트레오닌)으로 대체함으로써 생성된다. 돌출부 및 공동은 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 변경함으로써, 예컨대 부위-특이성 돌연변이 생성 또는 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다. 특정 양태에서, knob 변형은 Fc 도메인의 2개의 아단위 중 하나에서 T366W의 아미노산 치환을 포함하고, 홀 변형은 Fc 도메인의 2개의 아단위 중 또 다른 하나에서 T366S, L368 및 Y407의 아미노산 치환을 포함한다. 더욱 특정한 양태에서, knob 변형을 포함하는 Fc 도메인의 아단위는 S354C의 아미노산 치환을 포함하고, 홀 변형을 포함하는 Fc 도메인의 아단위는 Y349C의 아미노산 치환 추가로 포함한다. 이러한 2개의 시스테인 잔기의 도입은 Fc 영역의 2개의 아단위들간의 다이설파이드 가교가 형성됨을 야기하고, 이에 따라 이량체를 안정화시킨다(문헌

[Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)].

- [0109] 용어 "효과기 기능"은 항체의 Fc 영역에 기인하는 생체활성을 지칭하고, 항체의 동종형에 따라 다르다. 항체 효과기 기능의 예는 C1q 결합 및 보체 의존적 세포독성(CDC), Fc 수용체 결합, 항체 의존적 세포 매개된 세포독성(ADCC), 항체 의존적 세포 식세포작용(ADCP), 사이토카인 분비, 항원 제시 세포에 의한 면역 복합체 매개된 항원 함입, 세포 표면 수용체(예컨대 B 세포 수용체)의 하향조절 및 B 세포 활성화를 포함한다.
- [0110] Fc 수용체 결합 의존적 효과기 기능은 조혈 세포의 특화된 세포 표면 수용체인 Fc 수용체(FcR)를 갖는 항체의 Fc 영역의 상호작용에 의해 매개될 수 있다. Fc 수용체는 면역글로불린 상과에 속하고, 항체 의존적 세포 매개된 세포독성(ADCC)을 통해 면역 복합체의 식세포작용에 의한 항원-코팅된 병원체의 제거 및 상용하는 항체로 코팅된 적혈구 및 다양한 기타 세포 표적(예컨대 종양 세포)의 용해 둘다를 매개하는 것으로 밝혀졌다(예컨대 문헌[Van de Winkel, J.G. Anderson, C.L., J. Leukoc. Biol. 49 (1991) 511-524] 참고). FcR은 면역글로불린 동종형에 대한 이의 특이성에 의해 정의된다. IgG 항체에 대한 Fc 수용체는 Fc γ R로서 지칭된다. Fc 수용체 결합은, 예컨대 문헌[J.V. and Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492]; 문헌[Capel, P.J., et al., Immunomethods 4 (1994) 25-34]; 문헌[de Haas, M., et al., J. Lab. Clin. Med. 126 (1995) 330-341]; 및 문헌[Gessner, J.E., et al., Ann. Hematol. 76 (1998) 231-248]에 기재되어 있다.
- [0111] IgG 항체의 Fc 영역(Fc γ R)에 대한 수용체의 가교결합은 매우 다양한 효과기 기능, 예컨대 식세포작용, 항체 의존적 세포독성, 염증 매개자의 방출, 및 면역 복합체 말소 및 항체 생성의 조절을 유발한다. 인간에서, 3개의 장의 Fc γ R이 특성규명되어 있고, 이는 하기와 같다:
- [0112] - Fc γ RI(CD64)는 단량체 IgG에 높은 친화도로 결합하고, 대식세포, 단핵구, 호중구 및 호산구에 발현된다. E233-G236(카바트의 EU 색인에 따른 번호부여), P238, D265, N297, A327 및 P329(카바트의 EU 색인에 따른 번호부여) 중 하나 이상의 아미노산 잔기에서 Fc 영역 IgG의 변형은 Fc γ RI에 대한 결합을 감소시킨다. 위치 323-236에서 IgG₂ 잔기는 IgG₁ 및 IgG₄로 치환되어 Fc γ RI에 대한 결합을 10³배 감소시켰고 항체 감수성 적혈구 세포에 대한 인간 단핵구의 반응을 제거하였다(문헌[Armour, K.L., et al., Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2613-2624]).
- [0113] - Fc γ RII(CD32)은 IgG와 중간 내지 낮은 친화도로 결합 복합체화되고 야생 발현된다. 상기 수용체는 2개의 아형인 Fc γ RIIA 및 Fc γ RIIB로 나뉜다. Fc γ RIIA는 살해(예컨대 대식세포, 단핵구 또는 호중구)에 수반되는 것으로 밝혀졌고, 살해 과정을 활성화시킬 수 있는 것으로 보인다. Fc γ RIIB는 억제 과정에서 주요 역할을 하는 것으로 보이고, B 세포, 대식세포, 비만세포 및 호산구에서 발견된다. B 세포에서, 이는 면역글로불린 생성 및 예컨대 IgE 강으로의 동종형 전환을 더욱 억제하는 기능을 하는 것으로 보인다. 대식세포에서, Fc γ RIIB는 Fc γ RIIA를 통해 매개된 식세포작용을 억제하는 작용을 한다. 호산구 및 비만세포에서, B 형태는 개별 수용체에 대한 IgE 결합을 통해 이러한 세포의 활성화를 억제하는데 도움을 줄 수 있다. Fc γ RIIA에 대한 감소된 결합은, 예컨대 E233-G236(카바트의 EU 색인에 따른 번호부여), P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, R292 및 K414의 아미노산 서열 중 하나 이상에서 돌연변이를 갖는 IgG Fc 영역을 포함하는 항체에서 발견된다.
- [0114] - Fc γ RIII(CD16)는 IgG에 중간 내지 낮은 친화도로 결합하고, 2개의 유형으로서 존재한다. Fc γ RIIIA는 NK 세포, 대식세포, 호산구, 일부 단핵구 및 T 세포에서 발견되고, ADCC를 매개한다. Fc γ RIIIB는 호중구에 고도로 발현된다. FR γ IIIA에 대한 감소된 결합은, 예컨대 E233-G236(카바트의 EU 색인에 따른 번호부여), P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, S239, E269, E293, Y296, V303, A327, K338 및 D376의 아미노산 잔기 중 하나 이상에서 돌연변이를 갖는 IgG Fc 영역을 포함하는 항체에서 발견된다.
- [0115] Fc 수용체에 대한 인간 IgG₁의 결합 부위(전술한 돌연변이 부위)의 맵핑(mapping) 및 Fc γ RI 및 Fc γ RIIA에 대한 결합을 측정하는 방법은 문헌[Shields, R.L., et al. J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604]에 기재되어 있다.
- [0116] 용어 "ADCC" 또는 "항체 의존적 세포독성"은 Fc 수용체 결합에 의해 매개되는 기능이고 효과기 세포의 존재하에 본원에 보고된 항체에 의한 표적 세포의 용해를 지칭한다. 초기 단계 매개 ADCC를 도입하는 항체의 능력은 Fc γ 수용체 발현 세포, 예컨대 Fc γ RI 및/또는 Fc γ RIIA를 재조합 발현하는 세포 또는 NK 세포(Fc γ IIIA는 필수적으로 발현함)에 대한 결합을 측정함으로써 시험된다. 특히, NK 세포에서 Fc γ R에 대한 결합이 측정된다.
- [0117] "활성화 Fc 수용체"는 항체의 Fc 영역에 의한 후속의 인게이지먼트(engagement)가 수용체-보유 세포를 자극하여 효과기 기능을 수행하게 하는 신호전달 사건을 야기하는 Fc 수용체이다. 활성화 Fc 수용체는 Fc γ RIIIa(CD16a), Fc γ RI(CD64), Fc γ RIIa(CD32) 및 Fc α RI(CD89)를 포함한다. 특정 활성화 Fc 수용체는 인간 Fc

γRIIIa이다(유니프로트 접근번호 P08637, 버전 141).

- [0118] "엑토도메인"은 세포외 공간(즉 표적 세포의 외부 공간)에 이르는 막 단백질의 도메인이다. 통상적으로, 엑토도메인은 표면과 초기 접촉하여 신호전달을 유도하는 단백질의 일부이다.
- [0119] 용어 "펩티드 연결자"는 하나 이상, 바람직하게는 약 2 내지 20개의 아미노산을 포함하는 펩티드를 지칭한다. 펩티드 연결자는 당업계에 공지되어 있고 본원에 기재된다. 적합한 비면역원성 연결자 펩티드는, 예컨대 $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$ 또는 $G_4(SG_4)_n$ 펩티드 연결자(여기서 n은 일반적으로 1 내지 10, 전형적으로는 1 내지 4, 특히 2의 수입), 즉 GGGGS(서열번호 92), GGGGSGGGGS(서열번호 93), SGGGSGGGG(서열번호 94) 및 GGGGSGGGSSGGGS(서열번호 95)로 이루어진 군으로부터 선택되며, GSPGSSSSGS(서열번호 96), $(G_4S)_3$ (서열번호 97), $(G_4S)_4$ (서열번호 98), GSGSGSGS(서열번호 99), GSGSGNGS(서열번호 100), GSGSGSG(서열번호 101), GSGSG(서열번호 102), GGS(서열번호 103), GGSNGSG(서열번호 104), GNGSGSG(서열번호 105) 및 GNGSG(서열번호 106)도 포함한다. 특히 관심이 되는 펩티드 연결자는 (G_4S) (서열번호 92), $(G_4S)_2$ 또는 GGGGSGGGGS(서열번호 93), $(G_4S)_3$ (서열번호 97) 및 $(G_4S)_4$ (서열번호 98)이다.
- [0120] 본원에 사용된 용어 "아미노산"은 알라닌(3개 문자 코드: ala, 1개 문자 코드: A), 아르기닌, 아스파라긴(asn, N), 아스파르트산(asp, D), 시스테인(cys, C), 글루타민(gln, Q), 글루탐산(glu, E), 글리신(gly, G), 히스티딘(his, H), 이소류신(ile, I), 류신(leu, L), 리신(lys, K), 메티오닌(met, M), 페닐알라닌(phe, F), 프롤린(pro, P), 세린(ser, S), 트레오닌(thr, T), 트립토판(trp, W), 티로신(tyr, Y) 및 발린(val, V)을 포함하는 자연 발생 카복시 α-아미노산의 군을 나타낸다.
- [0121] "융합된" 또는 "연결된"은 성분(예컨대 전술한 TNF 리간드 과 구성원의 폴리펩티드 및 엑토도메인)이 펩티드 결합에 의해 직접적으로 또는 하나 이상의 펩티드 연결자를 통해 연결됨을 의미한다.
- [0122] 참조 폴리펩티드(단백질) 서열과 관련하여 "퍼센트(%) 아미노산 서열 일치성"은 최대 퍼센트 서열 일치성을 성취하기 위해 필요에 따라 서열을 정렬하고 갭(gap)을 도입한 후, 참조 폴리펩티드 서열내의 아미노산 잔기와 일치하는 후보 서열내의 아미노산 잔기의 퍼센트로서 정의되고, 임의의 보존적 치환은 서열 일치성의 일부로서 간주하지 않는다. 퍼센트 아미노산 서열 일치성을 측정하기 위한 정렬은 당업자에 의한 다양한 방법, 예컨대 공개 이용가능 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN, SAWI 또는 메가라인(Megalign)(DNASTAR)을 사용하여 성취될 수 있다. 당업자는 서열을 정렬하기에 적절한 매개변수, 예컨대 비교되는 서열의 전장에 걸친 최대 정렬을 성취하는데 요하는 임의의 알고리즘을 결정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적을 위해, % 아미노산 서열 일치성 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 생성된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 진엔테크 인코포레이티드(Genentech, Inc.)에 의해 제작되었고, 소스 코드는 미국 20559 워싱턴 D.C. 소재의 미국 저작권 청에서 사용자 문서에 의해 제출되었고, 미국 저작권 등록번호 TXU510087하에 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 미국 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 소재의 진엔테크 인코포레이티드로부터 공개 이용 가능하고, 상기 소스 코드로부터 컴파일링될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 UNIX 작동 시스템, 예컨대 디지털 UNIX V4.0D를 사용하여 컴파일링되어야 한다. 모든 서열 비교 매개변수는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되고 변경되지 않는다. ALIGN-2가 아미노산 서열 비교에 사용되는 경우, 소정 아미노산 서열 A와 소정 아미노산 서열 B의 % 아미노산 서열 일치성(이는 다르게는 소정 아미노산 서열 A가 소정 서열 아미노산 서열 B와 특정 %의 아미노산 서열 일치성을 갖거나 포함하는 것으로 표현될 수 있음)은 하기 수학적 식 1로 계산된다:
- [0123] [수학적 식 1]
- [0124] $100 \times X/Y$
- [0125] 상기 식에서,
- [0126] X는 서열 정렬 ALIGN-2 프로그램의 A 및 B의 정렬에서 상기 프로그램에 의해 일치하는 짝(identical match)으로서 계수된 아미노산 잔기의 개수이고;
- [0127] Y는 B에서 아미노산 잔기의 총 개수이다. 아미노산 서열 A의 길이와 아미노산 서열 B의 길이가 동일하지 않은 경우, A 대 B의 % 아미노산 서열 일치성이 B 대 A의 % 아미노산 서열 동일성과 일치하지 않을 것이 이해될 것이다. 달리 구체적으로 언급하지 않는 한, 본원에 사용된 모든 % 아미노산 서열 일치성 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 사용하여 바로 앞 문단에 기재된 바와 같이 수득된다.
- [0128] 특정 양태에서, 본원에 제시되는 작용성 ICOS-결합 분자의 아미노산 서열 변이체가 고려된다. 예컨대, 작용성

ICOS-결합 분자의 결합 친화도 및/또는 생물학적 특성을 향상시키는 것이 바람직할 수 있다. 작용성 ICOS-결합 분자의 아미노산 서열 변이체는 적절한 변형을 분자를 암호화하는 뉴클레오티드 서열에 도입함으로써, 또는 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다. 예컨대, 이러한 변형은 항체의 아미노산 서열내의 잔기의 삭제 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 삭제, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 최종 구조물이 도출되되 상기 최종 구조물이 목적 특성, 예컨대 항원 결합을 보유하도록 수행될 수 있다. 치환 돌연변이 생성에 관심이 되는 부위는 HVR 및 프레임워크(FR)를 포함한다. 보존적 치환은 표제 "바람직한 치환"으로 하기 표 A에 제시되고, 아미노산 측쇄 강 1 내지 6을 참조로 하여 추가로 후술된다. 아미노산 치환은 목적 활성(예컨대 유지된/향상된 항원 결합, 감소된 면역원성 또는 향상된 ADCC 또는 CDC)을 위해 선별된 관심 분자 및 생성물에 도입될 수 있다.

[0129] [표 A]

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

- [0130]
- [0131] 아미노산은 공통 측쇄의 특성에 따라 하기와 같이 그룹화될 수 있다:
- [0132] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- [0133] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- [0134] (3) 산성: Asp, Glu;
- [0135] (4) 염기성: His, Lys, Arg;
- [0136] (5) 측쇄 배향에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro;
- [0137] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.
- [0138] 비보존적 치환은 상기 부류 중 하나의 구성원을 다른 부류의 것으로 교환하는 것을 수반할 것이다.

[0139] 용어 "아미노산 서열 변이체"는 모 항원 결합 분자(예컨대 인간화된 또는 인간 항체)의 하나 이상의 추가변부에 아미노산 치환이 존재하는 실질적인 변이체를 포함한다. 일반적으로, 추가의 연구를 위해 선택되는 생성 변이체는 모 항원 결합 분자에 비해 특정한 생물학적 특성(예컨대 증가된 친화도 또는 감소된 면역원성)의 개질(예컨대 향상)을 가질 것이고/거나 모 항원 결합 분자의 특정한 생물학적 특성이 실질적으로 유지될 것이다. 예시적인 치환 변이체는 친화도 성숙된 항체이고, 이는 통상적으로, 예컨대 파지 디스플레이-기반 친화도 성숙 기법, 예컨대 본원에 기재된 것을 사용하여 생성될 수 있다. 간략히는, 하나 이상의 HVR 잔기가 변이되고, 변이체 항원 결합 분자가 파지에 디스플레이되고, 특정한 생체활성(예컨대 결합 친화도)에 대해 선별된다. 특정 양태에서, 치환, 삽입 또는 삭제는 항원 결합 분자가 항원에 결합하는 능력이 실질적으로 감소되지 않는 한 하나 이상의 HVR내에서 일어날 수 있다. 예컨대, 결합 친화도를 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경(예컨대 본원에 제시된 보존적 치환)은 HVR에서 제조될 수 있다. 돌연변이생성에 대해 표적화될 수 있는 항체의 잔기 또는 영역의 동정에 유용한 방법은 "알라닌 스캐닝 돌연변이생성(alanine scanning mutagenesis)"이고, 문헌

[Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085]에 기재되어 있다. 상기 방법에서, 잔기 또는 표적 잔기의 군(예컨대 하전된 잔기, 예컨대 Arg, Asp, His, Lys 및 Glu)이 동정되고 중성 또는 음으로 하전된 아미노산(예컨대 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체되어 항체와 항원의 상호작용이 영향을 받는지 여부를 확인한다. 추가의 치환은 초기 치환에 대한 기능적 민감성을 나타내는 아미노산 위치에 도입될 수 있다. 다르게는 또는 추가적으로, 항원-항원 결합 분자가 복합체를 형성하여 항체와 항원간의 접촉점이 동정된다. 이러한 접촉 잔기 및 인접 잔기가 치환에 대한 후보로서 표적화되거나 제거될 수 있다. 변이체는 목적 특성을 갖는지 여부를 확인하기 위해 선별될 수 있다.

[0140] 아미노산 서열 삽입은 하나의 잔기 내지 100개 이상의 잔기를 갖는 폴리펩티드 길이의 아미노- 및/또는 카복시-말단 융합, 및 단일 또는 다수의 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 삽입의 예는 N- 또는 C-말단에 의한 작용성 ICOS-결합 분자의 폴리펩티드로의 결합을 포함하고, 이는 작용성 ICOS-결합 분자의 혈청 반감기를 증가시킨다.

[0141] 특정 양태에서, 본원에서 제시되는 작용성 ICOS-결합 분자는 항체가 당화되는 정도를 증가 또는 감소시키기 위해 변경된다. 분자의 당화 변이체는 하나 이상의 당화 부위가 생성되거나 제거될 수 있도록 통상적으로는 아미노산 서열을 변경함으로써 획득될 수 있다. 작용성 ICOS-결합 분자가 Fc 영역을 포함하는 경우, 이에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 전형적으로, 포유동물 세포에 의해 생성된 고유 항체는 일반적으로 Fc 영역의 CH2 도메인의 Asn297에 대한 N-연결에 의해 부착된 분지된 2안테나형(biantennary) 올리고당을 포함한다(예컨대 문헌[Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997)] 참고). 2안테나형 올리고당 구조의 줄기(stem)에서, 올리고당은 다양한 탄수화물, 예컨대 만노스, N-아세틸 글루코사민(GlcNAc), 갈락토스 및 시알산, 및 GlcNAc에 부착된 푸코스를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 작용성 ICOS-결합 분자에서 올리고당의 변형은 특정한 향상된 특성을 갖는 변이체를 생성하기 위해 수행될 수 있다. 하나의 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자의 변이체 또는 항체는 Fc 영역에 (직접 또는 간접) 부착된 푸코스를 결여하는 탄수화물 구조를 갖도록 제시된다. 이러한 푸코실화 변이체는 향상된 ADCC 기능을 가질 수 있다(예컨대 US 2003/0157108(프레스타 엘.(Presta, L.)) 또는 US 2004/0093621(교와 하코 코교 컴퍼니 리미티드(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.)) 참고). 또 다른 양상에서, 본 발명의 작용성 ICOS-결합 분자의 변이체 또는 항체는 단면화된(bisected) 올리고당(예컨대 Fc 영역에 부착된 2안테나형 올리고당이 GlcNAc에 의해 단면화됨)을 갖도록 제시된다. 이러한 변이체는 감소된 푸코실화 및/또는 향상된 ADCC 기능을 가질 수 있다(예컨대 WO 2003/011878(장-마리에트(Jean-Mairet) 등); US 6,602,684(우마나(Umana) 등); 및 US 2005/0123546(우마나 등) 참고). Fc 영역에 부착된 올리고당에서 하나 이상의 갈락토스를 갖는 변이체도 제시된다. 이러한 항체 변이체는 향상된 CDC 기능을 가질 수 있고, 예컨대 WO 1997/30087(파텔(Patel) 등); WO 1998/58964(라주, 에스(Raju, S.)); 및 WO 1999/22764(라주 에스)에 기재되어 있다.

[0142] 특정 양상에서, 본 발명의 작용성 ICOS-결합 분자의 시스테인 변형된 변이체(예컨대 티오맵(THIOMAB: 상표명), 여기서 상기 분자의 하나 이상의 잔기는 시스테인 잔기로 치환됨)을 생성하는 것이 바람직할 수 있다. 특정 양상에서, 치환된 잔기는 분자의 접근가능한 위치에 나타난다. 이러한 잔기를 시스테인으로 치환함으로써, 반응성 티올기가 항체의 접근가능한 부위에 자리잡을 수 있고 항체를 다른 잔기, 예컨대 약물 잔기 또는 연결자-약물 잔기에 접합시켜 면역접합체를 생성하는데 사용될 수 있다. 특정 양상에서, 임의의 하나 이상의 하기 잔기가 시스테인으로 치환될 수 있다: 경쇄의 V205(카뱃 번호부여); 중쇄의 A118(EU 번호부여); 및 중쇄 Fc 영역의 S400(EU 번호부여). 시스테인 변형된 항원 결합 분자는 US 7,521,541에 기재된 바와 같이 생성될 수 있다.

[0143] 특정 양상에서, 본원에 제시되는 작용성 ICOS-결합 분자는 당업계에 공지되어 있고 용이하게 이용가능한 추가의 비단백성 잔기를 갖도록 추가로 변형될 수 있다. 항체의 유도에 적합한 잔기는 비한정적으로 수용성 중합체를 포함한다. 수용성 중합체의 비한정적인 예는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-다이옥솔란, 폴리-1,3,6-트라이옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산(동중중합체 또는 랜덤 공중합체), 및 텍스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 동중중합체, 폴리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올(예컨대 글리세롤), 폴리비닐 알코올 및 이의 혼합물을 포함한다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드는 이의 물에서의 안정성에 기인하여 제조에서 유리할 수 있다. 중합체는 임의의 분자량의 것일 수 있고, 분지되거나 비분지될 수 있다. 항체에 부착되는 중합체의 개수는 다를 수 있고, 하나 초과 중합체가 부착되는 경우, 이는 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도에 사용되는 중합체의 개수 및/또는 유형은 비한정적으로 향상되어야 할 항체의 특정 특성 또는 기능을 비롯하여 이종특이성 항체 유도체가 한정된 조건에서 사용될 지 여부 등에 대한 고찰을 기반으로 결정될 수 있다. 또 다른 양상에서, 방사선에 대한 노출에 의해 선택적으로 가열될 수 있는 항체의 접합체 및 비단백성 잔기가 제시된다.

하나의 양태에서, 비단백성 잔기는 탄소 나노튜브이다(문헌[Kam, N.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605]). 방사선은 임의의 파장의 것일 수 있고, 비한정적으로 정상 세포에 해를 주지 않되 비단백성 잔기를 항체-비단백 잔기에 인접한 세포는 살해하는 온도로 가열하는 파장을 포함할 수 있다. 또 다른 양상에서, 본원에 제시되는 이중특이성 항체의 면역접합체가 수득될 수 있다. "면역접합체"는 하나 이상의 이중 분자, 예컨대 비한정적으로 세포독성제에 접합된 항체이다.

[0144] 용어 "폴리뉴클레오티드"는 단리된 핵산 분자 또는 구조물, 예컨대 메신저 RNA(mRNA), 바이러스로 유도된 RNA 또는 플라스미드 DNA(pDNA)를 지칭한다. 폴리뉴클레오티드는 통상적인 포스포다이에스터 결합 또는 비통상적인 결합(아미드 결합, 예컨대 펩티드 핵산(PNA)에서 발견됨)을 포함할 수 있다. 용어 "핵산 분자"는 폴리뉴클레오티드에 존재하는 임의의 하나 이상의 핵산 분절, 예컨대 DNA 또는 RNA 단편을 지칭한다.

[0145] "단리된 핵산 분자" 또는 "단리된 폴리뉴클레오티드"는 고유 환경으로부터 제거된 핵산 분자, DNA 또는 RNA이다. 예컨대, 벡터에 함유된 폴리펩티드를 암호화하는 제조합 폴리뉴클레오티드가 본 발명을 위해 단리된 것으로 간주된다. 단리된 폴리뉴클레오티드의 추가의 예는 이중 숙주 세포내에 유지된 제조합 폴리뉴클레오티드 또는 용액 중 (부분 또는 실질) 정제된 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 단리된 폴리뉴클레오티드는 폴리뉴클레오티드 분자를 통상적으로 함유하는 세포에 함유된 폴리뉴클레오티드 분자를 의미하지만, 상기 폴리뉴클레오티드 분자는 자연 염색체 위치와는 상이한 염색체의 또는 염색체 위치에 존재한다. 단리된 RNA 분자는 본 발명의 체내 또는 시험관내 RNA 전사물, 및 양성 및 음성 가닥 형태, 및 이중가닥 형태를 포함한다. 본 발명에 따른 단리된 폴리뉴클레오티드 또는 핵산은 합성 제조된 이러한 분자를 추가로 포함한다. 또한, 폴리뉴클레오티드 또는 핵산은 조절 요소(regulatory element), 예컨대 프로모터, 리보솜 결합 부위 또는 전사 종결자이거나 이를 포함할 수 있다.

[0146] 예컨대 본 발명의 참조 뉴클레오티드 서열과 95% 이상 일치하는 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산 또는 폴리뉴클레오티드는 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열이 참조 뉴클레오티드 서열의 매 100개 뉴클레오티드당 5개 이하의 점 돌연변이를 포함할 수 있음을 제외하고는 참조 서열과 동일함을 의미한다. 즉, 참조 뉴클레오티드 서열과 95% 이상 동일한 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 수득하기 위해, 참조 서열에서 5% 이하의 뉴클레오티드가 삭제되거나 또 다른 뉴클레오티드로 치환될 수 있거나, 참조 서열에서 총 뉴클레오티드의 5% 이하의 개수의 뉴클레오티드가 참조 서열에 삽입될 수 있다. 참조 서열의 이러한 변경은 참조 뉴클레오티드 서열의 5' 또는 3' 말단 위치나 상기 말단 위치간의 임의의 위치(참조 서열의 잔기 중에 개별적으로 개재된 것 또는 참조 서열내의 하나 이상의 연속적인 군)에서 일어날 수 있다. 실질적으로는, 임의의 특정 폴리뉴클레오티드 서열이 본 발명의 뉴클레오티드 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 일치하는 지 여부는 기지의 컴퓨터 프로그램, 예컨대 폴리펩티에 대해 상기 논의한 것(예컨대 ALIGN-2)을 사용하여 통상적으로 확인될 수 있다.

[0147] 용어 "발현 카세트(expression cassette)"는 표적 세포에서 특정 핵산의 전사를 허용하는 일련의 특정된 핵산 요소를 갖는 제조합 또는 합성으로 생성된 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 제조합 발현 카세트는 플라스미드, 염색체, 미토콘드리아 DNA, 플스티드 DNA, 바이러스 또는 핵산 단편에 혼입될 수 있다. 전형적으로, 발현 벡터의 제조합 발현 카세트 부분은 다른 서열들 중에서도 전사될 핵산 서열 및 프로모터를 포함한다. 특정 양태에서, 본 발명의 발현 카세트는 본 발명이 이중특이성 항원 결합 분자 및 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0148] 용어 "벡터" 또는 "발현 벡터"는 "발현 구조물"과 동의어이고, 표적 세포에서 작동가능하게 회합되는 특정 유전자의 발현을 도입하고 유도하는데 사용되는 DNA 분자를 지칭한다. 상기 용어는 자가-복제성 핵산 구조로서의 벡터, 및 도입되는 숙주 세포의 게놈에 혼입되는 벡터를 포함한다. 본 발명의 발현 벡터는 발현 카세트를 포함한다. 발현 벡터는 다량의 안정한 mRNA의 전사를 가능하게 한다. 발현 벡터가 표적 세포내에 존재하게 되면, 유전자에 의해 암호화되는 리보핵산 분자 또는 단백질이 세포 전사 및/또는 번역 장치에 의해 생성된다. 하나의 양태에서, 본 발명의 발현 벡터는 본 발명의 이중특이성 항원 결합 분자 또는 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다.

[0149] 용어 "숙주 세포", "숙주 세포계" 및 "숙주 세포 배양"은 상호교환가능하게 사용되고, 외인성 핵산이 도입되는 세포 및 상기 세포의 자손을 지칭한다. 숙주 세포는 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"를 포함하고, 이는 경로의 개수와 상관없이 1차 형질전환된 세포 및 이로부터 유도된 자손을 포함한다. 자손은 모세포와 핵산 함량이 동일할 필요는 없지만, 돌연변이를 포함할 수 있다. 고유 형질전환된 세포에서 선별되거나 선택된 동일한 기능 또는 생체활성을 갖는 돌연변이 자손이 여기에 포함된다. 숙주 세포는 본 발명의 이중특이성 항원 결합

분자를 생성하는데 사용될 수 있는 임의의 유형의 세포 체계이다. 숙주 세포는 배양된 세포, 예컨대 포유동물의 배양된 세포, 예컨대 CHO 세포, BHK 세포, NSO 세포, SP2/0 세포, YO 골수종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PERC6 세포 또는 하이브리도마 세포, 효모 세포, 곤충 세포 및 식물 세포, 및 예컨대 형질전환 동물, 형질전환 식물 또는 배양된 식물이나 동물 조직에 포함된 세포도 포함한다.

- [0150] 제제의 "효과량"은 투여되는 세포 또는 조직에서 생리학적 변화를 야기하는데 필요한 양을 지칭한다.
- [0151] 제제의 "치료 효과량"은 목적 치료 또는 예방 결과를 성취하는데 필요한 투여량 및 기간에서의 효과량을 지칭한다. 제제의 치료 효과량은, 예컨대 질환의 유해 효과를 제거, 감소, 지연, 최소화 또는 예방한다.
- [0152] "개체" 또는 "대상"은 포유동물이다. 포유동물은 비한정적으로 사육 동물(예컨대 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류(예컨대 인간 및 비인간 영장류, 예컨대 원숭이), 토끼 및 설치류(예컨대 마우스 및 래트)를 포함한다. 특히, 개체 또는 대상은 인간이다.
- [0153] 용어 "약학 조성물"은 제제를 지칭하고, 이는 그 형태로 이에 함유된 활성 성분의 생체활성이 효과적이게 하고, 제형이 투여되는 대상에게 허용불가하게 독성인 추가의 성분을 함유하지 않는다.
- [0154] "약학적으로 허용되는 부형제"는 대상에게 비독성인 약학 조성물 중 활성 성분 이외의 성분을 지칭한다. 약학적으로 허용되는 부형제는 비한정적으로 완충제, 안정화제 또는 보존제를 포함한다.
- [0155] 용어 "패키지 삽입물"은 치료 제품의 시판 포장에 통상적으로 포함되는 지침서를 지칭하고, 상기 치료 제품의 사용에 관한 지시사항, 투여량, 투여법, 조합 치료법, 금지사항 및/또는 주의사항이 실려있다.
- [0156] 본원에 사용된 "치료(및 이의 문법적 변형, 예컨대 "치료하다" 또는 "치료하는")은 치료되는 개체의 자연적 과정을 변경하는 시도에 있어서 임상적 중재를 지칭하고, 예방을 위해 또는 임상 병리학의 과정 동안 수행될 수 있다. 치료의 바람직한 효과는 비한정적으로 질환의 발생 또는 재발의 방지, 증상의 경감, 질환의 임의의 직접적 또는 간접적 병리학적 결과의 축소, 질환 진행 속도의 감소, 병태의 개선 또는 완화, 및 관해 또는 향상된 예후를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명의 분자는 질환의 발달을 지연시키거나 질환의 진행을 둔화시키는데 사용된다.
- [0157] 본원에 사용된 용어 "암"은 증식성 질환, 예컨대 림프종, 암종, 아세포종, 육종, 백혈병, 림프구성 백혈병, 폐암, 비소세포 폐암(NSCL), 기관지 폐포세포 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안내 흑색 종, 자궁암, 난소암, 직장암, 항문암, 위암, 위암, 대장암(CRC), 췌장암, 유방암, 삼중 음성 유방암, 자궁암, 난관암, 자궁내막암, 자궁경부암, 질암, 외음부암, 호지킨 병, 식도암, 소장암, 내분비계암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 방광암, 신장 또는 요관 암, 신장세포암종, 신장 골반암, 중피종, 간세포암, 담도암, 중추신경계(CNS)의 신생물, 척추 축 종양, 뇌간 신경교종, 교모세포종, 성상세포종, 신경초종, 뇌실막종, 수질 모세포종, 수막종, 편평 상피세포 암종, 뇌하수체 선종 및 유잉 육종, 및 상기 암 중 임의의 것의 불응성인 형태, 또는 상기 암들 중 하나 이상의 조합을 지칭한다.
- [0158] **본 발명의 작용성 ICOS-결합 분자**
- [0159] 본 발명은 특히 유리한 특성, 예컨대 생산성, 안정성, 결합 친화도, 생체활성, 표적화 효율, 감소된 독성, 및 환자에게 투여되고 이에 따라 가능한 강화된 효능을 가질 수 있는 확장된 투여량 범위를 갖는 신규한 이중특이성 항체를 제시한다.
- [0160] **종양-관련 항원에 결합하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 예시적인 작용성 ICOS-결합 분자**
- [0161] 하나의 양상에서, 본 발명은
- [0162] (a) ICOS에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인;
- [0163] (b) 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인; 및
- [0164] (c) Fc 도메인
- [0165] 을 포함하는 이중특이성 작용성 ICOS-결합 분자를 제시한다.
- [0166] 특정 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자는 효과기 기능을 감소시키거나 제거하는 돌연변이를 포함하는 Fc 도메인을 포함한다. 효과기 기능을 감소시키거나 제거하는 돌연변이는 Fc 수용체를 통한 가교결합에 의한 비특이적 작용성을 방지하고 ICOS⁺ 세포의 ADCC를 방지할 것이다.

- [0167] 본원에 기재된 작용성 ICOS-결합 분자는 표적 세포, 전형적으로 암 세포 또는 종양 기질에서 면역 반응을 선택적으로 유도하는다는 점에서 ICOS에 특이적으로 결합가능한 다른 통상적인 항체들을 능가하는 장점을 갖는다. 하나의 양상에서, 종양-관련 항원은 섬유아세포 활성화 단백질(FAP), 암배아 항원(CEA), 엽산 수용체 알파(FoIR1), 흑색종-관련 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸(MCSP), 표피 성장 인자 수용체(EGFR), 인간 표피 성장 수용체 2(HER2) 및 p95HER2로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특히, 종양-관련 항원은 FAP 또는 CEA이다. 하나의 특정 양상에서, 종양-관련 항원은 FAP이다.
- [0168] 특히, 작용성 ICOS-결합 분자는 (a) (i) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP), 및 (iv) 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하거나, (b) (i) 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP), 및 (iv) 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하는 FAP에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다.
- [0169] 보다 특히, 작용성 ICOS-결합 분자는 (i) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP), 및 (iv) 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하는 FAP에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다.
- [0170] 특정 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 10의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP) 및 서열번호 11의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하는 FAP에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인, 또는 서열번호 18의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP) 및 서열번호 19의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하는 FAP에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 특정 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP) 및 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하는 FAP에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인, 또는 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP) 및 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하는 FAP에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 보다 특히, 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP) 및 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하는 FAP에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다.
- [0171] 또다른 특정 양상에서, 종양-관련 항원은 CEA이다. 특히, 작용성 ICOS-결합 분자는 (a) (i) 서열번호 145의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 146의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 147의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HCEA), 및 (iv) 서열번호 148의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 149의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 150의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함하거나, (b) (i) 서열번호 158의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 159의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 160의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HCEA), 및 (iv) 서열번호 161의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 162의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 163의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함하는 CEA에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합

도메인을 포함한다.

[0172] 보다 특히, 작용성 ICOS-결합 분자는 (i) 서열번호 145의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 146의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 147의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HCEA), 및 (iv) 서열번호 148의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 149의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 150의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함하는 CEA에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 또다른 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자는 (i) 서열번호 158의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 159의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 160의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HCEA), 및 (iv) 서열번호 161의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 162의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 163의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함하는 CEA에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0173] 특정 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 151의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HCEA) 및 서열번호 152의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함하는 CEA에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인, 또는 서열번호 164의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HCEA) 및 서열번호 165의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함하는 CEA에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 보다 특정한 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 151의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HCEA) 및 서열번호 152의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함하는 CEA에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인, 또는 서열번호 164의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HCEA) 및 서열번호 165의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함하는 CEA에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 보다 특히, 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 151의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HCEA) 및 서열번호 152의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함하는 CEA에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0174] 추가의 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자는 (i) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HICOS), 및 (iv) 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LICOS)를 포함하는 ICOS에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0175] 보다 특히, 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 26의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HICOS) 및 서열번호 27의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LICOS)를 포함하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 보다 특히, 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HICOS) 및 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LICOS)를 포함하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 종양-관련 항원에 결합하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0176] 하나의 양상에서,

[0177] (a) 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HICOS) 및 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LICOS)를 포함하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 종양-관련 항원에 결합하는 하나 이상의 항원 결합 도메인; 및

[0178] (b) 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP) 및 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하거나, 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP) 및 서열번호 19

의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_L FAP)를 포함하는 FAP에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인

- [0179] 을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자가 제시된다.
- [0180] 또다른 양상에서,
- [0181] (a) 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_H ICOS) 및 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_L ICOS)를 포함하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 종양-관련 항원에 결합하는 하나 이상의 항원 결합 도메인; 및
- [0182] (b) 서열번호 151의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_H CEA) 및 서열번호 152의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_L CEA)를 포함하는 CEA에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하거나, 서열번호 164의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_H CEA) 및 서열번호 165의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_L CEA)를 포함하는 CEA에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인
- [0183] 을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자가 제시된다.
- [0184] 하나의 양상에서, 본 발명은 (a) ICOS에 특이적으로 결합가능한 하나의 항원 결합 도메인, (b) 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나의 항원 결합 도메인, 및 (c) Fc 도메인을 포함하는 이중특이성 작용성 ICOS-결합 분자를 제시한다. 따라서, 이러한 경우, 작용성 ICOS-결합 분자는 ICOS에 대한 결합에 대해 1가이고 종양-관련 항원에 대한 결합에 1가이다(1+1 형식).
- [0185] 특정 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자가 제시되고, 상기 분자는 (a) ICOS에 특이적으로 결합가능한 제1 Fab 단편, (b) 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 제2 Fab 단편, 및 (c) 서로 안정한 회합이 가능한 제1 및 제2 아단위로 구성된 Fc 도메인을 포함한다.
- [0186] 보다 특히, 이중특이성 항원 결합 분자가 제시되고, 상기 분자는
- [0187] (i) 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_H ICOS) 및 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_L ICOS)를 포함하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 종양-관련 항원에 결합하는 제1 Fab 단편; 및
- [0188] (ii) 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_H FAP) 및 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_L FAP)를 포함하거나, 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_H FAP) 및 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_L FAP)를 포함하는 FAP에 특이적으로 결합가능한 제2 Fab 단편을 포함한다.
- [0189] 또다른 양상에서, 이중특이성 항원 결합 분자가 제시되고, 상기 분자는
- [0190] (i) 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_H ICOS) 및 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_L ICOS)를 포함하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 종양-관련 항원에 결합하는 제1 Fab 단편; 및
- [0191] (ii) 서열번호 151의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_H CEA) 및 서열번호 152의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_L CEA)를 포함하는 CEA에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하거나, 서열번호 164의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_H CEA) 및 서열번호 165의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_L CEA)를 포함하는 CEA에 특이적으로 결합가능한 제2 Fab 단편
- [0192] 을 포함한다.
- [0193] 특정 양상에서, 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄(HC1), 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄(HC2), 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 및 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함하는 이중특이성 항원 결합 분자가 제시된다.

- [0194] 하나의 추가의 특정 양상에서, 서열번호 155의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄(HC1), 서열번호 156의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄(HC2), 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 및 서열번호 157의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함하는 이중특이성 항원 결합 분자가 제시된다.
- [0195] 하나의 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자가 제시되고, 상기 분자는 (a) ICOS에 특이적으로 결합가능한 제1 Fab 단편, (b) VH 및 VL 도메인을 포함하는, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 제2 항원 결합 도메인, 및 (c) 서로 안정한 회합이 가능한 제1 및 제2 아단위로 구성된 Fc 도메인을 포함하되, 상기 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 항원 결합 분자의 VH 및 VL 도메인 중 하나는 Fc 도메인의 제1 아단위의 C-말단에 융합되고, 상기 VH 및 VL 중 나머지 하나는 Fc 도메인의 제2 아단위의 C-말단에 융합된다. 이러한 분자는 1+1 헤드-투-테일(head-to-tail)로 지칭된다.
- [0196] 특정 양상에서, 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄(HC1), 서열번호 66의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄(HC2), 및 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 이중특이성 작용성 ICOS-결합 분자가 제시된다.
- [0197] 또다른 양상에서, 본 발명은 (a) ICOS에 특이적으로 결합가능한 2개의 항원 결합 도메인, (b) 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나의 항원 결합 도메인, 및 (c) Fc 도메인을 포함하는 이중특이성 작용성 ICOS-결합 분자를 제시한다. 따라서, 이러한 경우, 작용성 ICOS-결합 분자는 ICOS에 대한 결합에 대해 2가이고 종양-관련 항원에 대한 결합에 1가이다(2+1 형식).
- [0198] 하나의 양상에서, 작용성 ICOS-결합 분자가 제시되고, 상기 분자는 (a) ICOS에 특이적으로 결합가능한 2개의 Fab 단편, (b) VH 및 VL 도메인을 포함하는, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 제2 항원 결합 도메인, 및 (c) 서로 안정한 회합이 가능한 제1 및 제2 아단위로 구성된 Fc 도메인을 포함하되, 상기 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 항원 결합 분자의 VH 및 VL 도메인 중 하나는 Fc 도메인의 제1 아단위의 C-말단에 융합되고, 상기 VH 및 VL 중 나머지 하나는 Fc 도메인의 제2 아단위의 C-말단에 융합된다. 이러한 분자는 2+1로 지칭된다.
- [0199] 특정 양상에서, 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄(HC1), 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄(HC2), 및 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 2개의 경쇄를 포함하는 이중특이성 작용성 ICOS-결합 분자가 제시된다.
- [0200] 또다른 특정 양상에서, 서열번호 153의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄(HC1), 서열번호 154의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄(HC2), 및 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 2개의 경쇄를 포함하는 이중특이성 작용성 ICOS-결합 분자가 제시된다.
- [0201] 또한, 본 발명은 (a) 쥐과 ICOS 리간드의 하나 이상의 엑토도메인, (b) 표적 세포 항원에 특이적으로 결합가능한 하나의 항원 결합 도메인, 및 (c) 안정한 회합이 가능한 제1 및 제2 아단위로 구성된 Fc 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자를 제시한다. 특히, 작용성 ICOS-결합 분자는 쥐과 ICOS 리간드의 2개 이상의 엑토도메인을 포함한다.
- [0202] 보다 특히, 서열번호 71의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄(HC1) 및 서열번호 72의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄(HC2)를 포함하는 이중특이성 작용성 쥐과 ICOS-결합 분자가 제시된다.
- [0203] 추가의 양상에서, 이중특이성 작용성 쥐과 ICOS-결합 분자가 제시되고, 상기 작용성 ICOS-결합 분자는 작용성 ICOS-결합 분자는 (i) 서열번호 123의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 124의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 125의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HICOS), 및 (iv) 서열번호 126의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 127의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 128의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LICOS)를 포함하는 쥐과 ICOS에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다.
- [0204] 보다 특히, 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 129의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HICOS) 및 서열번호 130의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LICOS)를 포함하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 보다 특히, 작용성 ICOS-결합 분자는 서열번호 129의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HICOS) 및 서열번호 130의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LICOS)를 포함하는 하나

이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 중앙-관련 항원에 결합하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다.

- [0205] 특정 양상에서, 서열번호 166의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄(HC1), 서열번호 167의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄(HC2), 및 서열번호 131의 아미노산 서열을 포함하는 2개의 경쇄를 포함하는 이중특이성 작용성 ICOS-결합 분자가 제시된다.
- [0206] 또다른 특정 양상에서, 서열번호 137의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄(HC1), 서열번호 168의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄(HC2), 서열번호 131의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 및 서열번호 169의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함하는 이중특이성 작용성 ICOS-결합 분자가 제시된다.
- [0207] **Fc 수용체 결합 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 Fc 도메인 변형**
- [0208] 본 발명의 작용성 ICOS-결합 분자의 Fc 도메인은 면역글로불린 분자의 중쇄 도메인을 포함하는 폴리펩티드 쇠 한쌍으로 이루어진다. 예컨대, 면역글로불린 G(IgG) 분자의 Fc 도메인은 이량체이고, 이의 각각의 아단위는 CH2 및 CH3 중쇄 불변 도메인을 포함한다. Fc 도메인의 2개의 아단위는 서로 안정한 회합이 가능하다.
- [0209] 따라서, 중앙-관련 항원에 결합하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 IgG Fc 도메인, 구체적으로는 IgG₁ Fc 도메인 또는 IgG₄ Fc 도메인을 포함한다. 보다 특히, 중앙-관련 항원에 결합하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 IgG₁ Fc 도메인을 포함한다.
- [0210] Fc 도메인은 표적 조직에서 우수한 축적에 기여하는 긴 혈청 반감기 및 바람직한 조직-혈액 분포 비를 비롯한 본 발명의 항원 결합 분자의 바람직한 약동학적 특성을 부여한다. 그러나, 동시에, 본 발명의 이중특이성 항체가 바람직한 항원-보유 세포에 대한 표적화가 아닌 바람직하지 않은 표적화를 야기할 수 있다. 따라서, 특정 양상에서, 본 발명의 작용성 ICOS-결합 분자의 Fc 도메인은 고유 IgG₁ Fc 도메인에 비해 Fc 수용체에 대한 감소된 결합 친화도 및/또는 감소된 효과기 기능을 나타낸다. 보다 특히, Fc 영역은 IgG₁ Fc 영역이다. 하나의 양상에서, Fc 도메인은 Fc 수용체에 실질적으로 결합하지 않고/거나 효과기 기능을 유도하지 않는다. 특정 양상에서, Fc 수용체는 Fc γ 수용체이다. 하나의 양상에서, Fc 수용체는 인간 Fc 수용체이다. 구체적 양상에서, Fc 수용체는 활성화된 인간 Fc γ 수용체, 보다 구체적으로는 Fc γ RIIIa, Fc γ RI 또는 Fc γ RIIa, 가장 구체적으로는 인간 Fc γ RIIIa이다. 하나의 양상에서, Fc 도메인은 효과기 기능을 유도하지 않는다. 감소된 효과기 기능은 비한정적으로 하기 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 감소된 보체 의존적 세포독성(CDC), 감소된 항체 의존적 세포 매개된 세포독성(ADCC), 감소된 항체 의존적 식세포작용(ADCP), 감소된 사이토카인 분비, 항원 제시 세포에 의한 면역 복합체 매개된 항원 함입의 감소, NK 세포에 대한 감소된 결합, 대식세포에 대한 감소된 결합, 단핵구에 대한 감소된 결합, 다형핵 세포에 대한 감소된 결합, 세포자연사를 유도하는 신호전달의 감소된 유도, 감소된 수지상 세포 성숙 또는 감소된 T 세포 프라이밍(priming).
- [0211] 특정 양상에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 본원에 제시되는 항체의 Fc 도메인에 도입되고, 이에 따라 Fc 영역 변이체가 생성될 수 있다. Fc 영역 변이체는 하나 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형(예컨대 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열(IgG₁, IgG₂, IgG₃ 또는 IgG₄ 영역)을 포함할 수 있다.
- [0212] 특정 양상에서, 본 발명은 Fc 도메인이 Fc 수용체, 특히 Fc γ 수용체에 대한 결합을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 항체를 제시한다.
- [0213] 하나의 양상에서, 본 발명의 항체의 Fc 도메인은 Fc 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합 친화도 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 포함한다. 전형적으로, 동일한 하나 이상의 아미노산 돌연변이가 Fc 도메인의 2개의 아단위 각각에 존재한다. 특히, Fc 도메인은 위치 E233(EU 번호부여), L234, L235, N297, P331 및 P329에서의 아미노산 치환을 포함한다. 특히, Fc 도메인은 IgG 중쇄의 위치 234(EU 번호부여) 및 235, 및 329(EU 번호부여)에서의 아미노산 치환을 포함한다. 보다 특히, IgG 중쇄에서 (카밧에 따른 EU 번호부여로) L234A, L235A 및 P329G(P329GLALA)의 아미노산 치환을 갖는 Fc 도메인을 포함하는 본 발명에 따른 항체가 제시된다. L234A 및 L235A의 아미노산 치환은 이른바 "LALA" 돌연변이를 지칭한다. 아미노산 치환의 P329GLALA 조합은 인간 IgG₁ Fc 도메인의 Fc γ 수용체 결합을 완전히 소거하고, 이의 특성, 예컨대 돌연변이 Fc 도메인의 제조 방법 및 Fc 수용체 결합 또는 효과기 기능을 측정하기 위한 방법이 기재되어 있는 WO 2012/130831 A1에 기재되어 있다.
- [0214] 또한, 감소된 Fc 수용체 결합 및/또는 효과기 기능을 갖는 Fc 도메인은 Fc 도메인 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329 중 하나 이상의 치환을 갖는 것을 포함한다(US 6,737,056). 이러한 Fc 돌연변이는 아미노산

위치 265, 269, 270, 297 및 327 중 하나 이상에서의 치환, 예컨대 잔기 265 및 296의 알라닌으로의 치환을 갖는 이른바 "DANA"를 포함한다(US 7,332,581).

[0215] 또 다른 양상에서, Fc 도메인은 IgG₄ 도메인이다. IgG₄ 항체는 IgG₁ 항체에 비해 Fc 수용체에 대한 감소된 결합 친화도 및 감소된 효과기 기능을 나타낸다. 보다 구체적 양상에서, Fc 도메인은 위치 S228(카바트 번호부여)에서의 아미노산 치환, 특히 S228P의 아미노산 치환을 포함하는 IgG₄ Fc 도메인이다. 보다 구체적 양상에서, Fc 도메인은 (EU 번호부여로) L235E, S228P 및 P329G의 아미노산 치환을 포함하는 IgG₄ Fc 도메인이다. 이러한 IgG₄ Fc 도메인 돌연변이 및 이의 Fc γ 수용체 결합 특성은 WO 2012/130831에 기재되어 있다.

[0216] 모계 IgG의 태아로의 전달의 원인이 되는(문헌[Guyer, R.L. et al., J. Immunol. 117 (1976) 587-593], 및 문헌[Kim, J.K. et al., J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434]) 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대해 증가된 반감기 및 향상된 결합을 갖는 항체는 US 2005/0014934에 기재되어 있다. 이러한 항체는 Fc 영역의 FcRn에 대한 결합을 향상시키는 하나 이상의 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다. 이러한 Fc 변이체는 하기 Fc 영역 잔기 중 하나 이상에서 치환을 갖는 것을 포함한다: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 또는 434, 예컨대 Fc 영역 잔기 434의 치환(US 7,371,826). Fc 영역 변이체의 다른 예들에 대해서는 문헌[See also Duncan, A.R. and Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740]; US 5,648,260; US 5,624,821; 및 WO 94/29351을 참고한다.

[0217] Fc 수용체에 대한 결합은, 예컨대 표준 계측법, 예컨대 비아코어 계기(지이 헬스케어(GE Healthcare))를 사용하여 ELISA 또는 SPR 용이하게 특정될 수 있고, 이러한 Fc 수용체는 재조합 발현에 의해 수득될 수 있다. 적합한 이러한 결합 분석은 본원에 기재되어 있다. 다르게는, Fc 도메인의 결합 친화도 또는 세포 활성화 Fc 수용체에 대한 Fc 도메인을 포함하는 이중특이성 항원 결합 분자는 특정 Fc 수용체를 발현하기 위한 공지되어 있는 세포계, 예컨대 Fc γ IIIa 수용체를 발현하는 인간 NK 세포를 사용하여 평가될 수 있다. Fc 도메인 또는 Fc 도메인을 포함하는 본 발명의 항원 결합 분자의 효과기 기능은 당업계에 공지되어 있는 방법에 의해 측정될 수 있다. ADCC를 측정하기에 적합한 분석이 본원에 기재되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험 관내 분석의 다른 예는 US 5,500,362; 문헌[Hellstrom et al. Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986)]; 문헌[Hellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985)]; US 5,821,337; 및 문헌[Bruggemann et al., J Exp Med 166, 1351-1361 (1987)]에 기재되어 있다. 다르게는, 비방사성 분석법이 사용될 수 있다(예컨대 유동 세포측정법을 위한 ACT1(상표명) 비방사성 세포독성 분석(미국 캘리포니아주 마운틴뷰 소재의 셀 테크놀로지 인코포레이티드(CellTechnology, Inc.); 및 사이토크스96(CytoTox96: 등록상표) 비방사성 세포독성 분석(미국 위스콘신주 메디슨 소재의 프로메가(Promega))). 이러한 분석에 유용한 효과기 세포는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 및 자연 살해(NK) 세포를 포함한다. 다르게는 또는 추가적으로, 관심 분자의 ADCC 활성은 체내에서 평가될 수 있다(예컨대 동물 모델에서, 예를 들어 문헌[Clynes et al., Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998)]에 개시되어 있는 것).

[0218] 하기 부분은 Fc 수용체 결합 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 Fc 도메인 변형을 포함하는 본 발명의 작용성 ICOS-결합 분자의 바람직한 양상을 기재한 것이다. 하나의 양상에서, 본 발명은 (a) ICOS에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인, (b) 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인, 및 (c) 서로 안정한 회합이 가능한 제1 및 제2 아단위로 구성된 Fc 도메인을 포함하는 이중특이성 항원 결합 분자에 관한 것으로서, 상기 Fc 도메인은 Fc 수용체, 특히 Fc γ 수용체에 대한 항체의 결합 친화도를 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 특정 양상에서, 본 발명은 (a) ICOS에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인, (b) 표적 세포 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인, 및 (c) 서로 안정한 회합이 가능한 제1 및 제2 아단위로 구성된 Fc 도메인을 포함하는 이중특이성 항원 결합 분자에 관한 것으로서, 상기 Fc 도메인은 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 특정 양상에서, Fc 도메인은 아미노산 돌연변이 L234A(카바트 EU 색인에 따른 번호부여), L235A 및 P329G를 갖는 인간 IgG₁이다.

[0219] 본 발명의 하나의 양상에서, Fc 영역은 위치 D265 및 P329에서 아미노산 치환을 포함한다. 일부 양상에서, Fc 영역은 CH2 도메인내의 아미노산 치환 D265A 및 P329G("DAPG")를 포함한다. 하나의 이러한 양태에서, Fc 영역은 IgG₁ Fc 영역, 특히 마우스 IgG₁ Fc 영역이다. DAPG 돌연변이는 WO 2016/030350 A1에 기재되어 있고, 중쇄의 CH2 영역내에 도입되어 쥐과 Fc γ 수용체에 대한 항원 결합 분자의 결합을 제거한다.

[0220] **이중이량체화를 촉진하는 Fc 도메인 변형**

- [0221] 본 발명의 작용성 ICOS-결합 분자는 Fc 도메인의 2개의 아단위 중 하나 또는 다른 하나에 융합된 상이한 항원 결합 부위를 갖고, 이에 따라 Fc 도메인의 2개의 아단위는 2개의 비동일 폴리펩티드쇄에 포함될 수 있다. 이러한 폴리펩티드의 재조합 공동-발현 및 후속의 이량체화는 2개의 폴리펩티드의 몇몇 가능한 조합을 야기한다. 따라서, 본 발명의 작용성 ICOS-결합 분자의 수율 및 순도를 향상시키기 위해, 본 발명의 이중특이성 항원 결합 분자의 Fc 도메인내에 목적하는 폴리펩티드의 회합을 촉진하는 변형을 도입하는 것이 바람직할 것이다.
- [0222] 따라서, 특정 양상에서, 본 발명은 (a) ICOS에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인, (b) 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인, 및 (c) 서로 안정한 회합이 가능한 제1 및 제2 아단위로 구성된 Fc 도메인을 포함하는 이중특이성 항원 결합 분자에 관한 것으로서, 상기 Fc 도메인은 Fc 도메인의 제1 및 제2 아단위의 회합을 촉진하는 변형을 포함한다. 인간 IgG Fc 도메인의 2개의 아단위들간의 가장 광범위한 단백질-단백질 상호작용의 부위는 Fc 도메인의 CH3 도메인에서이다. 따라서, 하나의 양상에서, 상기 변형은 Fc 도메인의 CH3 도메인내에 존재한다.
- [0223] 특정 양상에서, 상기 변형은 이른바 "놉-인투-홀" 변형이고, Fc 도메인의 2개의 아단위 중 하나에서 "놉" 변형을 포함하고 Fc 도메인의 2개의 아단위 중 다른 하나에서 "홀" 변형을 포함한다. 따라서, 본 발명은 (a) ICOS에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인, (b) 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인, 및 (c) 서로 안정한 회합이 가능한 제1 및 제2 아단위로 구성된 Fc 도메인을 포함하는 이중특이성 항원 결합 분자에 관한 것으로서, 놉-인투-홀 방법에 따라 상기 Fc 도메인의 제1 아단위는 놉을 포함하고 상기 Fc 도메인의 제2 아단위는 홀을 포함한다. 특정 양상에서, Fc 도메인의 제1 아단위는 아미노산 치환 S354C(EU 번호부여) 및 T366W를 포함하고 Fc 도메인의 제2 아단위는 아미노산 치환 Y349C(카밧 EU 색인에 따른 번호부여), T366S 및 Y407V를 포함한다.
- [0224] "놉-인투-홀" 기술은, 예컨대 US 5,731,168; US 7,695,936; 문헌[Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996)] 및 문헌[Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001)]에 기재되어 있다. 일반적으로, 상기 방법은 제1 폴리펩티드의 계면에 돌출부(놉) 및 제2 폴리펩티드의 계면에 상응하는 공동(홀)을 도입함을 수반하여, 상기 돌출부가 상기 공동에 자리잡음으로써 이중이량체 형성 및 후부(hinder) 동종 이량체 형성이 촉진된다. 돌출부는 제1 폴리펩티드의 계면으로부터의 작은 아미노산 측쇄를 더 큰 측쇄(예컨대 티로신 또는 트립토판)으로 대체함으로써 구축된다. 돌출부와 동일하거나 유사한 크기의 상보적 공동은 제2 폴리펩티드의 계면에서 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 것(예컨대 알라닌 또는 트레오닌)으로 대체함으로써 생성된다.
- [0225] 따라서, 하나의 양상에서, 본 발명의 작용성 ICOS-결합 분자의 Fc 도메인의 제1 아단위의 CH3 도메인에서, 아미노산 잔기는 더 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 교체됨으로써 제2 아단위의 CH3 도메인내의 공간내에 위치가능한 제1 아단위의 CH3 도메인내에 돌출부를 생성하고, Fc 도메인의 제2 아단위의 CH3 도메인에서, 아미노산 잔기는 더 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 교체됨으로써 제1 아단위의 CH3 도메인내의 돌출부가 위치가능한 제2 아단위의 CH3 도메인내 공동을 생성한다. 상기 돌기 및 공동은, 예를 들어 부위-특이적인 돌연변이 유발에 의해서 또는 펩티드 합성에 의해서, 상기 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 변경시킴으로써 만들 수 있다. 특정 양상에서, Fc 도메인의 제1 아단위의 CH3 도메인에서, 위치 366에서의 트레오닌 잔기는 트립토판 잔기(T366W)로 대체되고, Fc 도메인의 제2 아단위의 CH3 도메인에서, 위치 407에서의 티로신 잔기는 발린 잔기(Y407V)로 대체된다. 하나의 양상에서, Fc 도메인의 제2 아단위에서, 위치 366에서의 트레오닌 잔기는 세린 잔기(T366S)로 대체되고, 위치 368에서의 류신 잔기는 알라닌 잔기(L368A)로 대체된다.
- [0226] 더 추가의 양상에서, Fc 도메인의 제1 아단위에서, 추가적으로, 위치 354에서의 세린 잔기는 시스테인 잔기(S354C)로 대체되고, Fc 도메인의 제2 아단위에서, 추가적으로, 위치 349에서의 티로신 잔기는 시스테인 잔기(Y349C)로 대체된다. 상기 2개의 시스테인 잔기의 도입은 Fc 도메인의 2개의 아단위간의 다이설파이드 가교의 형성을 야기한다. 다이설파이드 가교는 이량체를 더욱 안정화시킨다(문헌[Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)]). 특정 양상에서, Fc 도메인의 제1 아단위는 아미노산 치환 S354C(EU 번호부여) 및 T366W를 포함하고, Fc 도메인의 제2 아단위는 아미노산 치환 Y349C(카밧 EU에 따른 번호부여), T366S 및 Y407V를 포함한다.
- [0227] 하나의 양상에서, Fc 영역의 제1 아단위는 위치 392 및 409에서 아스파르트산 잔기(D)를 포함하고, Fc 영역의 제2 아단위는 위치 356 및 399에서 리신 잔기(K)를 포함한다. 일부 양태에서, Fc 영역의 제1 아단위에서, 위치 392 및 409의 리신 잔기는 아스파르트산 잔기로 대체되고(K392D, K409D), Fc 영역의 제2 아단위에서, 위치 356의 글루타메이트 잔기 및 위치 399의 아스파르트산 잔기는 리신 잔기로 대체된다(E356K, D399K). "DDKK" 놉-인투-홀 기술은 예컨대 WO 2014/131694 A1에 기재되어 있고, 상보적인 아미노산 잔기를 제공하는 아단위를 부유하는 중쇄의 조립이 선호된다.

- [0228] 다른 양상에서, Fc 도메인의 제1 및 제2 아단위의 회합 촉진 변형은 정전기 조향(electrostatic steering) 효과를 매개하는 변형을 포함한다(예컨대 WO 2009/089004에 기재되어 있음). 일반적으로, 상기 방법은 하전된 아미노산 잔기를 갖는 2개의 Fc 도메인의 계면에서 하나 이상의 아미노산 잔기의 대체를 수반하여 동종이량체 형성이 정전기적으로 비선호되지만 이종이량체화는 정전기적으로 선호되게 된다.
- [0229] 본원에 보고된 이중특이성 항체의 C-말단 중쇄는 아미노산 잔기 PGK로 종결되는 완전한 C-말단일 수 있다. 중쇄의 C-말단은 C-말단 아미노산 잔기 중 1 또는 2개가 제거된 단축된 C-말단일 수 있다. 바람직한 양상에서, 중쇄의 C-말단은 PG로 종결되는 단축된 C-말단일 수 있다. 본원에 보고된 모든 양상 중 하나의 양상에서, 본원에 특정된 C-말단 CH3 도메인을 포함하는 중쇄를 포함하는 이중특이성 항체 항체는 C-말단 글리신-리신 다이펩티드(G446 및 K447, 카바트의 EU 색인에 따른 번호부여)를 포함한다. 본원에 보고된 모든 양상 중 하나의 양상에서, 본원에 특정된 C-말단 CH3 도메인을 포함하는 중쇄를 포함하는 이중특이성 항체는 C-말단 글리신 잔기(G446, 카바트의 EU 색인에 따른 번호부여)를 포함한다.
- [0230] **본 발명에 사용하기 위한 예시적인 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체**
- [0231] 본 발명은 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체, 및 작용성 ICOS-결합 분자와의 조합에서의 이의 용도, 특히 암의 치료 방법 또는 암의 진행 지연 방법, 특히 고품종양의 치료 방법 또는 고품종양의 지연 방법에서의 이의 용도에 관한 것이다. 본원에 사용된 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체는 CD3에 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 CEA에 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이성 항체이다.
- [0232] 따라서, 본원에 사용된 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체는 중쇄 가변부(V_H CD3) 및 경쇄 가변부(V_L CD3)를 포함하는 제1 항원 결합 도메인, 및 중쇄 가변부(V_H CEA) 및 경쇄 가변부(V_L CEA)를 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다.
- [0233] 특정 양상에서, 조합으로 사용하기 위한 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체는 서열번호 33의 CDR-H1 서열, 서열번호 34의 CDR-H2 서열 및 서열번호 35의 CDR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_H CD3); 및/또는 서열번호 33의 CDR-L1 서열, 서열번호 34의 CDR-L2 서열 및 서열번호 35의 CDR-L3 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_L CD3)를 포함하는 제1 항원 결합 도메인을 포함한다. 보다 특히, 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체는 서열번호 39의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 중쇄 가변부(V_H CD3) 및 서열번호 40의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 경쇄 가변부(V_L CD3)를 포함하는 제1 항원 결합 도메인을 포함한다. 추가의 양상에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체는 서열번호 39의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_H CD3) 및 서열번호 40의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_L CD3)를 포함한다.
- [0234] 하나의 양상에서, CD3에 특이적으로 결합하는 항체는 전장 항체이다. 하나의 양상에서, CD3에 특이적으로 결합하는 항체는 인간 IgG 강의 항체, 특히 인간 IgG₁ 강의 항체이다. 하나의 양상에서, CD3에 특이적으로 결합하는 항체는 항체 다편, 특히 Fab 분자 또는 scFv 분자, 보다 특히 Fab 분자이다. 특정 양상에서, CD3에 특이적으로 결합하는 항체는 Fab 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인 또는 불변 도메인이 교환된(즉 서로 대체된) 교차 Fab 분자이다. 하나의 양상에서, CD3에 특이적으로 결합하는 항체는 인간화된 항체이다.
- [0235] 또다른 양상에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체는
- [0236] (a) 서열번호 41의 CDR-H1 서열, 서열번호 42의 CDR-H2 서열 및 서열번호 43의 CDR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_H CEA); 및/또는 서열번호 44의 CDR-L1 서열, 서열번호 45의 CDR-L2 서열 및 서열번호 46의 CDR-L3 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_L CEA); 또는
- [0237] (b) 서열번호 49의 CDR-H1 서열, 서열번호 50의 CDR-H2 서열 및 서열번호 51의 CDR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_H CEA); 및/또는 서열번호 52의 CDR-L1 서열, 서열번호 53의 CDR-L2 서열 및 서열번호 54의 CDR-L3 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_L CEA)
- [0238] 를 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다.
- [0239] 보다 특히, 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체는 서열번호 47의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 중쇄 가변부(V_H CEA) 및 서열번호 48의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는

99% 동일한 경쇄 가변부(V_L CEA)를 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다. 추가의 양상에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체는 서열번호 47의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_H CEA) 및 서열번호 48의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_L CEA)를 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다. 또다른 양상에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체는 서열번호 55의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 중쇄 가변부(V_H CEA) 및 서열번호 56의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 경쇄 가변부(V_L CEA)를 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다. 추가의 양상에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체는 서열번호 55의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_H CEA) 및 서열번호 56의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_L CEA)를 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0240] 또다른 특정 양상에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체는 CEA에 결합하는 제3 항원 결합 도메인을 포함한다. 또다른 양상에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체는

[0241] (a) 서열번호 41의 CDR-H1 서열, 서열번호 42의 CDR-H2 서열 및 서열번호 43의 CDR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_H CEA); 및/또는 서열번호 44의 CDR-L1 서열, 서열번호 45의 CDR-L2 서열 및 서열번호 46의 CDR-L3 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_L CEA); 또는

[0242] (b) 서열번호 49의 CDR-H1 서열, 서열번호 50의 CDR-H2 서열 및 서열번호 51의 CDR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_H CEA); 및/또는 서열번호 52의 CDR-L1 서열, 서열번호 53의 CDR-L2 서열 및 서열번호 54의 CDR-L3 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_L CEA)

[0243] 를 포함하는 제3 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0244] 보다 특히, 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체는 서열번호 47의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 중쇄 가변부(V_H CEA) 및 서열번호 48의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 경쇄 가변부(V_L CEA)를 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다. 추가의 양상에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체는 서열번호 47의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_H CEA) 및 서열번호 48의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_L CEA)를 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다. 또다른 특정 양상에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체는 서열번호 55의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 중쇄 가변부(V_H CEA) 및 서열번호 56의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 경쇄 가변부(V_L CEA)를 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다. 추가의 양상에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체는 서열번호 55의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_H CEA) 및 서열번호 56의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_L CEA)를 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0245] 추가의 양상에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체는 제1 항원 결합 도메인이 교차-Fab 분자(Fab 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인 또는 불변 도메인이 교환됨)이고, 제2 및 제3 항원 결합 도메인이 존재하는 경우, 상기 항원 결합 도메인이 통상적인 Fab 분자인, 이중특이성 항체이다.

[0246] 또다른 양상에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체는 (i) 제2 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C-말단에서 제1 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N-말단에 융합되고, 제1 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제1 아단위의 N-말단에 융합되고, 제3 항원 결합 도메인이 Fc 도메인의 제2 아단위의 N-말단에 융합되거나, (ii) 제1 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C-말단에서 제2 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N-말단에 융합되고, 제2 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제1 아단위의 N-말단에 융합되고, 제3 항원 결합 도메인이 Fc 도메인의 제2 아단위의 N-말단에 융합된, 이중특이성 항체이다.

[0247] Fab 분자는 상기 Fc 도메인에 또는 서로에 직접적으로, 또는 하나 이상의 아미노산, 전형적으로는 약 2 내지 20 개의 아미노산을 포함하는 펩티드 연결자를 통해 융합될 수 있다. 펩티드 연결자는 당해 분야에 공지되어 있으며 본원에 기재되어 있다. 적합한, 비-면역원성 연결자 펩티드는 예를 들어 $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$, $(G_4S)_n$, 또는 $G_4(SG_4)_n$ 펩티드 연결자이며, 여기에서 "n"은 일반적으로 1 내지 10, 전형적으로 2 내지 4의 정수이다. 하나의 양태에서 상기 펩티드 연결자는 적어도 5 아미노산의 길이, 하나의 양태에서 5 내지 100의 길이, 추가의 양태에

서, 10 내지 50 아미노산의 길이를 갖는다. 하나의 양태에서 상기 펩티드 연결자는 $(GxS)_n$ 또는 $(GxS)_nG_m$ 이며, 이때 G=글리신, S=세린, 및 $(x=3, n=3, 4, 5$ 또는 $6, \text{ 및 } m=0, 1, 2$ 또는 $3)$ 또는 $(x=4, n=2, 3, 4$ 또는 5 및 $m=0, 1, 2, \text{ 또는 } 3)$, 하나의 양태에서 $x=4$ 및 $n=2$ 또는 3 , 추가의 양태에서 $x=4$ 및 $n=2$ 이다. 하나의 양태에서 상기 펩티드 연결자는 $(G_4S)_2$ 이다. 상기 제1 및 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄를 서로에 대해 융합시키기에 특히 적합한 펩티드 연결자는 $(G_4S)_2$ 이다. 상기 제1 및 제2 Fab 단편의 Fab 중쇄를 연결시키기에 적합한 예시적인 펩티드 연결자는 서열 (D)-(G₄S)₂를 포함한다(서열번호 110 및 111). 또다른 적합한 상기와 같은 연결자는 서열 $(G_4S)_4$ 를 포함한다. 추가로, 연결자들은 면역글로불린 경첩부(의 일부)를 포함할 수 있다. 특히 Fab 분자가 Fc 도메인 아단위의 N-말단에 융합되는 경우, 상기를 면역글로불린 경첩부 또는 그의 일부를 통해, 추가의 펩티드 연결자와 함께 또는 상기 연결자 없이 융합시킬 수 있다.

- [0248] 추가의 양상에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체는 Fc 수용체 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 Fc 도메인을 포함한다. 특히, 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체는 아미노산 치환 L234A, L235A 및 P329G를 포함하는 IgG₁ Fc 도메인을 포함한다.
- [0249] 특정 양상에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체는 서열번호 61의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 폴리펩티드, 서열번호 62의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 폴리펩티드, 서열번호 63의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 폴리펩티드 및 서열번호 64의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 폴리펩티드를 포함한다. 추가의 특정 양태에서, 이중특이성 항체는 서열번호 61의 폴리펩티드, 서열번호 62의 폴리펩티드, 서열번호 63의 폴리펩티드 및 서열번호 64의 폴리펩티드를 포함한다(CEACD3 TCB).
- [0250] 추가의 특정 양상에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체는 서열번호 57의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 폴리펩티드, 서열번호 58의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 폴리펩티드, 서열번호 59의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 폴리펩티드 및 서열번호 60의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 폴리펩티드를 포함한다. 추가의 특정 양태에서, 이중특이성 항체는 서열번호 57의 폴리펩티드, 서열번호 58의 폴리펩티드, 서열번호 59의 폴리펩티드 및 서열번호 60의 폴리펩티드를 포함한다(CEACD3 TCB).
- [0251] 특정 이중특이성 항체는 PCT 공개 WO 2014/131712 A1에 기재되어 있다.
- [0252] 추가의 양상에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체는 이중특이성 T-세포 진입기전제(바이트(BiTE: 등록상표)도 포함한다. 추가의 양상에서, 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체는 WO 2007/071426 또는 WO 2014/131712에 기재된 이중특이성 항체이다. 또다른 양상에서, 이중특이성 항체는 MEDI565이다.
- [0253] 또다른 양상에서, 본 발명은 중쇄 가변부(V_HmuCD3) 및 경쇄 가변부(V_LmuCD3)를 포함하는 제1 항원 결합 도메인, 중쇄 가변부(V_HmuCEA) 및 경쇄 가변부(V_LmuCEA)를 포함하는 제1 항원 결합 도메인, 및 중쇄 가변부(V_HmuCEA) 및 경쇄 가변부(V_LmuCEA)를 포함하는 제1 항원 결합 도메인을 포함하는 쥐과 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체에 관한 것이다.
- [0254] 특정 양상에서, 쥐과 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체는 서열번호 75의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 폴리펩티드, 서열번호 76의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 폴리펩티드, 서열번호 77의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 폴리펩티드 및 서열번호 78의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 폴리펩티드를 포함한다. 추가의 특정 양태에서, 쥐과 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체는 서열번호 75의 폴리펩티드, 서열번호 76의 폴리펩티드, 서열번호 77의 폴리펩티드 및 서열번호 78의 폴리펩티드를 포함한다(CEACD3 TCB).
- [0255] **본 발명에 사용하기 위한 PD-L1/PD-1 상호작용 차단제**
- [0256] 본 발명의 하나의 양상에서, 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체, 특히 항-CEA/항-CD3 항체는 암의 치료 방법 또는 암의 진행의 지연 방법에 사용하기 위한 것이고, 종양-관련 항원에 특이성인 상기 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체는 4-1BB(CD137) 작용제와의 조합으로 사용되고, 추가적으로 PD-L1/PD-1 상호작용 차단제와의 조합된다. 또다른 양상에서, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 표적화된 4-1BB 작용제화만 조합된다. 모든 이러한 양상에서, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 PD-L1 결합 길항제 또는 PD-1 결

합 길항제이다. 특히, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 항-PD-L1 항체 또는 항-PD-1 항체이다.

[0257] 용어 "PD-L1"은 CD274 또는 B7-H1으로도 공지되어 있고, 임의의 척추 동물 출처, 예컨대 포유동물, 예컨대 영장류(예컨대 인간), 비인간 영장류(예컨대 시노몰거스 원숭이) 및 설치류(예컨대 마우스 및 래트)로부터의 임의의 고유 PD-L1을 지칭한다. 완전 인간 PD-L1의 아미노산 서열은 유니프로트(www.uniprot.org) 접근번호 Q9NZQ7 (서열번호 107)에 기재되어 있다. 용어 "PD-L1 결합 길항제"는 PD-L1과 이의 하나 이상의 결합쪽, 예컨대 PD-1 또는 B7-1의 상호작용으로부터 야기되는 신호전달을 감소, 차단, 억제, 제거 또는 중단시키는 분자를 지칭한다. 일부 양태에서, PD-L1 결합 길항제는 PD-L1의 이의 결합쪽에 대한 결합을 억제하는 분자이다. 특정 양상에서, PD-L1 결합 길항제는 PD-L1의 PD-1 및/또는 B7-1에 대한 결합을 억제한다. 일부 양태에서, PD-L1 결합 길항제는 항-PD-L1 항체, 이의 항원 결합 단편, 면역부착소, 융합 단백질, 올리고펩티드, 및 PD-L1과 이의 하나 이상의 결합쪽, 예컨대 PD-1 또는 B7-1의 상호작용으로부터 야기되는 신호전달을 감소, 차단, 억제, 제거 또는 중단시키는 분자를 포함한다. 하나의 양태에서, PD-L1 결합 길항제는 PD-L1을 통한 신호전달에 의해 T 림프구에 발현된 세포 표면 단백질에 의하거나 이를 통해 매개되는 음성 공동-자극성 신호를 감소시켜 기능장애 T-세포를 덜 기능장애적으로 만든다(예컨대 항원 인식에 대한 효과기 반응을 강화시킴). 특히, PD-L1 결합 길항제는 항-PD-L1 항체이다. 용어 "항-PD-L1 항체", "인간 PD-L1에 결합하는 항체", "인간 PD-L1에 특이적으로 결합하는 항체" 또는 "길항성 항-PD-L1"은 인간 PD-L1 항원에 1.0×10^{-8} mol/L 이하, 하나의 양상에서 1.0×10^{-9} mol/L 이하의 K_D 값의 결합 친화도로 특이적으로 결합하는 항체를 지칭한다. 결합 친화도는 표준적인 결합 분석, 예컨대 표면 플라즈몬 공명 기법(비야코어(BIAcore: 등록상표), 스웨덴 우프살라 소재의 지이 헬스케어)에 의해 측정된다.

[0258] 특정 양상에서, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 항-PD-L1 항체이다. 특정 양상에서, 항-PD-L1 항체는 아테졸리주맙(MPDL3280A, RG7446), 듀르발루맙(MEDI4736), 아벨루맙(MSB0010718C) 및 MDX-1105로 이루어진 군으로부터 선택된다. 구체적 양상에서, 항-PD-L1 항체는 본원에 기재된 YW243.55.S70이다. 또다른 구체적 양상에서, 항-PD-L1 항체는 본원에 기재된 MDX-1105이다. 또다른 특정 양상에서, 항-PD-L1 항체는 본원에 기재된 MEDI4736 (듀르발루맙)이다. 더 추가의 양상에서, 항-PD-L1 항체는 MSB0010718C(아벨루맙)이다. 보다 특히, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 아테졸리주맙(MPDL3280A)이다. 또다른 양상에서, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 서열번호 109의 중쇄 가변 도메인 VH(PDL-1) 및 서열번호 110의 경쇄 가변 도메인 VL(PDL-1)을 포함하는 항-PD-L1 항체이다. 또다른 양상에서, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 서열번호 111의 중쇄 가변 도메인 VH(PDL-1) 및 서열번호 112의 경쇄 가변 도메인 VL(PDL-1)을 포함하는 항-PD-L1 항체이다.

[0259] 용어 "PD-1"은 CD276, PD1 또는 세포 예정사 단백질 1로도 공지되어 있고, 임의의 척추 동물 출처, 예컨대 포유동물, 예컨대 영장류(예컨대 인간), 비인간 영장류(예컨대 시노몰거스 원숭이) 및 설치류(예컨대 마우스 및 래트)로부터의 임의의 고유 PD-1, 특히 유니프로트(www.uniprot.org) 접근번호 Q15116(서열번호 108)에 제시되어 있는 아미노산 서열을 갖는 인간 단백질 PD-1이다. 용어 "PD-1 결합 길항제"는 PD-1과 이의 하나 이상의 결합쪽에 대한 결합을 억제하는 분자를 지칭한다. 일부 양태에서, PD-1 결합 길항제는 PD-1의 PD-L1에 대한 결합을 억제하는 분자이다. 일부 양태에서, PD-1 결합 길항제는 PD-1의 PD-L2에 대한 결합을 억제하는 분자이다. 일부 양태에서, PD-1 결합 길항제는 PD-1의 PD-L1 및 PD-L2 둘다에 대한 결합을 억제하는 분자이다. 특히, PD-1 결합 길항제는 항-PD-1 항체이다. 용어 "항-PD-1 항체", "인간 PD-1에 결합하는 항체", "인간 PD-1에 특이적으로 결합하는 항체" 또는 "길항성 항-PD-1"은 인간 PD-L1 항원에 1.0×10^{-8} mol/L 이하, 하나의 양상에서 1.0×10^{-9} mol/L 이하의 K_D 값의 결합 친화도로 특이적으로 결합하는 항체를 지칭한다. 결합 친화도는 표준적인 결합 분석, 예컨대 표면 플라즈몬 공명 기법(비야코어(등록상표), 스웨덴 우프살라 소재의 지이 헬스케어)에 의해 측정된다.

[0260] 특정 양상에서, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 항-PD-1 항체이다. 특정 양상에서, 항-PD-1 항체는 MDX 1106(니볼루맙), MK-347(헵브롤리주맙), CT-011(피딜리주맙), MEDI-0680 (AMP-514), PDR001, REGN2810 및 BGB-108, 특히 헵브롤리주맙 및 니볼루맙으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또다른 양상에서, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 서열번호 113의 중쇄 가변 도메인 VH(PD-1) 및 서열번호 114의 경쇄 가변 도메인 VL(PD-1)을 포함하는 항-PD-1 항체이다. 또다른 양상에서, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 서열번호 115의 중쇄 가변 도메인 VH(PD-1) 및 서열번호 116의 경쇄 가변 도메인 VL(PD-1)을 포함하는 항-PD-1 항체이다.

[0261] **폴리뉴클레오티드**

[0262] 또한, 본 발명은 본원에 기재된 작용성 ICOS-결합 분자 또는 T-세포 이중특이성 항체 또는 이의 단편을 암호화

하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제시한다.

[0263] 본 발명의 이중특이성 항체를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드는 전체 항원 결합 분자를 암호화하는 단일 폴리뉴클레오티드로서 또는 공동-발현되는 다수의(예를 들어 2개 이상의) 폴리뉴클레오티드로서 발현될 수 있다. 공동-발현되는 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 폴리펩티드들은 예를 들어 다이설파이드 결합 또는 다른 수단을 통해 회합하여 기능성 항원 결합 분자를 형성할 수 있다. 예를 들어, 면역글로불린의 경쇄 부분은 상기 면역글로불린의 중쇄 부분과는 별도의 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화될 수 있다. 공동-발현시, 상기 중쇄 폴리펩티드는 상기 경쇄 폴리펩티드와 회합하여 면역글로불린을 형성할 것이다.

[0264] 일부 양상에서, 상기 단리된 폴리뉴클레오티드는 본원에 기재된 본 발명에 따른 전체 항원 결합 분자를 암호화한다. 다른 양태에서, 상기 단리된 폴리뉴클레오티드는 본원에 기재된 항원 결합 분자에 포함된 폴리펩티드를 암호화한다.

[0265] 일부 양태에서 상기 폴리뉴클레오티드 또는 핵산은 DNA이다. 다른 양태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 RNA, 예를 들어 메신저 RNA(mRNA)의 형태의 RNA이다. 본 발명의 RNA는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다.

[0266] **제조합 방법**

[0267] 본 발명의 이중특이성 항원 결합 분자는, 예컨대 고체 상태 펩티드 합성(예컨대 메리필드(Merrifield) 고체 합성) 또는 제조합 제조에 의해 수득될 수 있다. 제조합 제조의 경우, 항원 결합 분자 또는 이의 폴리펩티드 단편(예컨대 전술한 것)을 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드는 단리되고 숙주 세포에서의 추가 클로닝 및/또는 발현을 위해 하나 이상의 벡터로 삽입된다. 이러한 폴리뉴클레오티드는 통상적인 절차를 사용하여 용이하게 단리되고 서열분석될 수 있다. 본 발명의 하나의 양상에서, 본 발명의 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 바람직하게는 발현 벡터가 제시된다. 당업자에게 주지되어 있는 방법이 이중특이성 항원 결합 분자(단편)의 암호화 서열을 함유하는 발현 벡터를 적절한 전사/번역 제어 신호와 함께 구축하는데 사용될 수 있다. 이러한 방법은 시험관내 제조합 DNA 기법, 합성적 기법 및 체내 제조합/유전적 제조합을 포함한다. 예컨대, 문헌[Maniatis et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989)]; 및 문헌[Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)]에 기재된 기법을 참고한다. 발현 벡터는 플라스미드 또는 바이러스의 일부이거나, 핵산 단편일 수 있다. 발현 벡터는 발현 카세트를 포함하고, 여기에 이중특이성 항원 결합 분자 또는 이의 폴리펩티드 단편(즉 코딩 영역)을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 프로모터 및/또는 기타 전사 또는 번역 제어 요소와의 작동가능한 회합으로 클로닝된다. 본원에 사용된 "코딩 영역"은 아미노산으로 번역되는 코돈으로 이루어진 핵산의 일부이다. "정지 코돈"(TAG, TGA 또는 TAA)은 아미노산으로 번역되지 않지만, 코딩 영역의 일부로서 간주될 수 있고, 그러나, 임의의 측면 서열(flanking sequence), 예컨대 프로모터, 리보솜 결합 부위, 전사 종결자, 인트론, 및 5' 및 3' 미번역된 영역 등이 존재하는 경우, 이들은 코딩 영역의 일부가 아니다. 2개 이상의 코딩 영역은 단일 폴리뉴클레오티드 구조물, 예컨대 단일 벡터, 또는 개별의 폴리뉴클레오티드 구조물, 예컨대 개별의 (상이한) 벡터에 존재할 수 있다. 또한, 임의의 벡터는 코딩 영역을 함유할 수 있거나, 2개 이상의 코딩 영역을 포함할 수 있고, 예컨대 본 발명의 벡터는 번역후 또는 번역과 동시에 단백질분해성 절단을 통해 최종 단백질로 분리될 수 있는 하나 이상의 폴리펩티드를 암호화할 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터, 폴리뉴클레오티드 또는 핵산은 이중 코딩 영역(본 발명의 이중특이성 항원 결합 분자 또는 이의 단편, 또는 이의 변이체 또는 유도체)을 암호화할 수 있다. 이중 코딩 영역은 비한정적으로 특화된 요소 또는 모티프, 예컨대 분비 신호 펩티드 또는 이중 기능 도메인을 포함한다. 작동가능한 회합은 유전자 생성물, 예컨대 폴리펩티드를 위한 코딩 영역이 조절 서열의 영향 또는 제어하에 하나 이상의 조절 서열과 회합되는 경우이다. 2개의 DNA 단편(예컨대 폴리펩티드 코딩 영역 및 이에 회합된 프로모터)은 프로모터 기능의 유도가 목적 유전자 생성물을 암호화하는 mRNA의 전사를 야기하는 경우 및 상기 2개의 DNA간의 연결의 성질이 유전자 생성물의 발현을 유도하는 발현 조절 서열의 능력을 방해하지 않거나 전사될 DNA 주형의 능력을 방해하지 않는 경우가 "작동가능하게 회합된" 것이다. 따라서, 프로모터 영역은 프로모터가 핵산의 전사를 수행할 수 있는 경우 폴리펩티드를 암호화하는 핵산에 의해 작동가능하게 회합될 것이다. 프로모터는 예정된 세포에서만 DNA의 실질적인 전사를 유도하는 세포-특이성 프로모터일 수 있다. 프로모터 이외의 기타 전사 제어 요소, 예컨대 증폭자, 작동유전자, 억제자 및 전사 종결 신호는 폴리뉴클레오티드와 작동가능하게 회합되어 세포 특이적 전사를 유도한다.

[0268] 적합한 프로모터 및 기타 전사 제어 영역이 본원에 개시된다. 다양한 전사 제어 영역은 당업자에게 공지되어 있다. 이는 비한정적으로 척추동물 세포에서 기능하는 전사 제어 영역, 예컨대 비한정적으로 거대세포바이러스

(예컨대 전초기 프로모터, 인트론 A와 접합), 유인원 바이러스 40(예컨대 전초기 프로모터) 및 레트로바이러스(예컨대 라우스 육종 바이러스)로부터의 프로모터 및 증폭자 분절을 포함한다. 기타 전사 제어 영역은 척추동물 유전자로부터 유도된 것, 예컨대 액틴, 열 충격 단백질, 소의 성장 호르몬 및 토끼 α-글로빈, 및 진핵세포에서 발현 유전자의 제어가 가능한 기타 서열을 포함한다. 추가로 적합한 전체 제어 영역은 조직 특이성 프로모터 및 증폭자, 및 유도성 프로모터(예컨대 테트라사이클린을 포함하는 프로모터)를 포함한다. 유사하게, 다양한 번역 제어 요소가 당업자에게 공지되어 있다. 이는 비한정적으로 리보솜 결합 부위, 번역 개시 및 종결 코돈, 및 바이러스 시스템으로부터 유도된 요소(특히 내부 리보솜 진입 부위 또는 IRES(CITE 서열로도 지칭됨))를 포함한다. 발현 카세트는 다른 특징, 예컨대 복제 원점, 및/또는 염색체 통합 요소, 예컨대 레트로 바이러스 긴 말단 반복(LTR), 또는 아데노 관련 바이러스(AAV) 역위 말단 반복(ITR)을 포함한다.

[0269] 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 핵산 코딩 영역은 분비 또는 신호 펩티드를 암호화하는 추가의 코딩 영역과 결합될 수 있고, 이는 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 폴리펩티드의 분비를 유도한다. 예컨대 이중특이성 항원 결합 분자 또는 폴리펩티드 단편의 분비가 목적되는 경우, 신호 서열을 암호화하는 DNA 서열은 본 발명의 이중특이성 항원 결합 분자 또는 이의 폴리펩티드 단편을 암호화하는 핵산의 상류에 위치할 수 있다. 합성 가설에 따라, 포유동물 세포에 의해 분비되는 단백질은 조면 소포체에 걸쳐 성장하는 단백질 쉘의 반출이 개시되면 성숙한 단백질로부터 절단되는 신호 펩티드 또는 분비 선도 서열을 갖는다. 일반적으로, 당업자는 척추동물 세포에 의해 분비되는 폴리펩티드가 번역된 폴리펩티드로부터 절단되어 분비되거나 성숙한 형태의 폴리펩티드를 생성하는 폴리펩티드의 N-말단에 융합되는 신호 펩티드를 가짐을 알고 있다. 특정 양태에서, 고유 신호 펩티드, 예컨대 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄 신호 펩티드가 사용되거나, 작동가능하게 회합되는 폴리펩티드의 분비를 유도하는 능력을 유지하는 서열의 기능 유도체가 사용된다. 다르게는, 이중 포유동물 신호 펩티드 또는 이의 기능 유도체가 사용될 수 있다. 예컨대 야생형 선도 서열은 인간 조직 플라스미노겐 활성화자(TPA) 또는 마우스 β-글루쿠로니다제의 선도 서열로 치환될 수 있다.

[0270] 나중의 정제(예컨대 히스티딘 태그)를 용이하게 하거나 융합 단백질의 표지를 보조하는데 사용될 수 있는 짧은 단백질 서열을 암호화하는 DNA 암호화는 본 발명의 이중특이성 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 내에 또는 이의 말단에 포함될 수 있다.

[0271] 본 발명의 추가의 양상에서, 본 발명의 하나 이상의 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포가 제시된다. 특정 양태에서, 하나 이상의 본 발명의 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제시된다. 폴리뉴클레오티드 및 벡터는 폴리뉴클레오티드 및 벡터와 관련하여 본원에 기재된 임의의 특징을 단독으로 또는 조합으로 혼입할 수 있다. 하나의 양상에서, 숙주 세포는 본 발명의 이중특이성 항체(의 부분)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함한다(예컨대 형질전환되거나 형질감염됨). 본원에 사용된 용어 "숙주 세포"는 본 발명의 융합 단백질 또는 이의 단편을 생성하도록 변형될 수 있다. 복제, 및 항원 결합 분자의 발현을 지원하는데 적합한 숙주 세포는 당업계에 주지되어 있다. 이러한 세포는 필요에 따라 특정 발현 벡터에 의해 형질감염되거나 형질도입될 수 있고, 벡터를 함유하는 다량의 세포는 대규모 배양기에 파종되어 배양되어 임상 적용례를 위한 충분한 양의 항원 결합 분자가 수득될 수 있다. 적합한 숙주 세포는 원핵 미생물, 예컨대 *E. Coli* 또는 다양한 진핵 세포, 예컨대 차이니즈 햄스터 난세포(CHO), 인간 배아 신장(HEK) 세포 또는 곤충 세포 등을 포함한다. 예컨대, 폴리펩티드는 당화가 필요치 않을 때 박테리아에서 생성될 수 있다. 발현 후, 폴리펩티드는 가용성 분획 중 박테리아 세포 페이스트로부터 단리될 수 있고 추가로 정제될 수 있다. 원핵생물, 원핵 미생물, 예컨대 사상성 진균 또는 효모가 폴리펩티드 암호화 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이고, 부분적으로 또는 전적으로 인간 당화 패턴을 갖는 폴리펩티드의 생성을 야기하는 당화 경로가 인간화된 효모 및 진균 균주도 포함된다. 문헌[Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004)]; 및 문헌[Li et al., Nat Biotech 24, 210-215 (2006)]을 참고한다.

[0272] 또한, (당화) 폴리펩티드의 발현에 적합한 숙주 세포는 다세포 개체(무척추동물 및 척추동물)로부터 유도된다. 무척추동물 세포의 예는 실물 및 곤충 세포를 포함한다. 다수의 바칼로 바이러스 균주가 곤충 세포와의 접합, 특히 스포도프테라 프루지페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포의 형질감염에 사용될 수 있는 것으로 확인되었다. 또한, 식물 세포가 숙주로서 이용될 수 있다. 예컨대 US 5,959,177, US 6,040,498, US 6,420,548, US 7,125,978 및 US 6,417,429를 참고한다(형질전환 식물에서 항체 생성을 위한 플랜티바디스(PLANTIBODIES: 상표명) 기술이 기재되어 있음). 또한, 척추동물 세포가 숙주로서 사용될 수 있다. 예컨대 현탁액에서 성장하도록 적응된 포유동물 세포계가 유용할 수 있다. 유용한 포유동물 숙주 세포의 다른 예는 SV40(COS-7)에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포계, 인간 배아 신장 세포계(예컨대 문헌[Graham et al., J Gen Virol 36, 59 (1977)]에 기재된 293 또는 293T), 야기 햄스터 신장 세포(BHK), 마우스 세르틀리 세포(예컨대

대 문헌[Mather, Biol Reprod 23, 243-251 (1980)]에 기재된 TM4 세포), 원숭이 신장 세포(CV1), 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(VERO-76), 인간 척추 암종 세포(HELA), 개의 간 세포(Hep G2), 마우스 유방 종양 세포(MMT 060562), TRI 세포(예컨대 문헌[Mather et al., Annals N.Y. Acad Sci 383, 44-68 (1982)]에 기재됨), MRC 5 세포 및 FS4 세포이다. 기타 유용한 포유동물 세포계는 차이나이즈 햄스터 난소(CHO) 세포, 예컨대 dhfr-CHO 세포(문헌[Urlaub et al., Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980)]); 및 골수종 세포계, 예컨대 YO, NS0, P3X63 및 Sp2/0을 포함한다. 단백질 제조에 적합한 포유동물 숙주 세포계의 개관은, 예컨대 문헌[Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)]을 참고한다. 숙주 세포는 배양된 세포, 예컨대 포유동물 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 박테리아 세포 및 식물 세포, 및 형질전환 동물 또는 형질전환 식물, 또는 배양된 식물 또는 동물 조직에 포함된 세포를 포함한다. 하나의 양태에서, 숙주세포는 진핵 세포, 바람직하게는 포유동물 세포, 예컨대 차이나이즈 햄스터 난소(CHO) 세포, 인간 배아 신장(HEK) 세포 또는 림프종 세포(예컨대 YO, NS0 또는 Sp20 세포)이다. 상기 시스템에서 외래 유전자를 발현하기 위한 표준적인 기술이 당업계에 공지되어 있다. 항원 결합 도메인의 중쇄 또는 경쇄를 포함하는 폴리펩티드를 발현하는 세포는 다른 면역글로불린 쇄들도 발현함으로써 발현되는 생성물이 중쇄 및 경쇄를 갖는 항원 결합 도메인이 되도록 변경될 수 있다.

[0273] 하나의 양상에서, 본 발명의 작용성 ICOS-결합 분자 또는 이의 폴리펩티드 단편의 제조 방법이 제시되고, 상기 방법은 본 발명의 항체 또는 이의 폴리펩티드 단편의 발현에 적합한 조건하에 작용성 ICOS-결합 분자 또는 이의 폴리펩티드 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 본 발명의 항체 또는 이의 폴리펩티드 단편을 상기 숙주 세포(또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 회수하는 단계를 포함한다.

[0274] 특정 양상에서, 항체의 부분을 형성하는, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 항원 결합 도메인 또는 ICOS 에 특이적으로 결합가능한 종양 항원 결합 도메인(예컨대 Fab 단편 또는 VH 및 VL)은 항원한 하나 이상의 면역글로불린 가변부를 포함한다. 가변부는 자연 또는 비자연 발생 항체 및 이의 단편의 일부를 형성하거나 이로부터 유도될 수 있다. 다클론 항체 및 단클론 항체를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있다(예컨대 문헌 [Harlow and Lane, "Antibodies, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988] 참고). 비자연 발생 항체는 고체상 합성을 사용하여 구축될 수 있거나(예컨대 US 4,186,567 참고), 예컨대 가변 중쇄 및 가변 경쇄를 포함하는 조합 라이브러리를 선별함으로써 수득될 수 있다(예컨대 맥캐이퍼티(McCafferty)의 US 5,969,108 참고).

[0275] 임의의 동물 종의 면역글로불린을 본 발명에 사용할 수 있다. 본 발명에 유용한 면역글로불린은 쥐과, 영장류 또는 인간 기원일 수 있다. 융합 단백질이 인간 용도로 의도되는 경우, 면역글로불린의 키메라 형태를 사용할 수 있고, 상기 면역글로불린의 불변부는 인간 유래이다. 면역글로불린의 인간화된 형태 또는 완전한 인간 형태를 또한 당해 분야에 주지된 방법에 따라 제조할 수 있다(예를 들어 US 5,565,332(윈터(Winter)) 참고). 인간화를 다양한 방법들, 예를 들어 비제한적으로 (a) 비-인간(예를 들어 공여 항체) CDR을 중요한 프레임워크 잔기(예를 들어 양호한 항원 결합 친화도 또는 항체 기능의 유지에 중요한 것들)의 유지와 함께 또는 상기 유지 없이 인간(예를 들어 수용 항체) 프레임워크 및 불변부상에 접목시키거나, (b) 오직 비-인간 특이성-결정부(SDR 또는 a-CDR; 항체-항원 상호작용에 중요한 잔기)만을 인간 프레임워크 및 불변부상에 접목시키거나, (c) 전체 비-인간 가변 도메인을 이식하지만, 상기를 표면 잔기의 교체에 의해 인간-유사 섹션으로 "은폐"시킴으로써 성취할 수 있다. 인간화된 항체 및 그의 제조 방법은 예를 들어 문헌[Almagro and Fransson, Front Biosci 13, 1619-1633 (2008)]에 리뷰되어 있으며, 예를 들어 문헌[Riechmann et al., Nature 332, 323-329 (1988)]; 문헌[Queen et al., Proc Natl Acad Sci USA 86, 10029-10033 (1989)]; US 5,821,337, US 7,527,791, US 6,982,321 및 US 7,087,409; 문헌[Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005)](특이성 결정부(SDR) 이식을 기재한다); 문헌[Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991)]("재표면화"를 기재한다); 문헌[Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005)]("FR 셔플링"을 기재한다); 및 문헌[Osbourne et al., Methods 36:61-68 (2005)] 및 문헌[Klimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000)](FR 셔플링으로의 "유도된 선택" 접근을 개시함)에 추가로 기재되어 있다. 본 발명에 따른 특정 면역글로불린은 인간 면역글로불린이다. 인간 항체 및 인간 가변부는 당업계에 공지되어 있는 다양한 기법을 사용하여 제조될 수 있다. 인간 항체는 문헌[van Dijk and van de Winkel, Curr Opin Pharmacol 5, 368-74 (2001) and Lonberg, Curr Opin Immunol 20, 450-459 (2008)]에 일반적으로 기재되어 있다. 인간 가변부는 하이브리도마 방법에 의해 제조된 인간 단클론 항체의 일부를 형성하거나 이로부터 유래할 수 있다(예컨대 문헌[Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)] 참고). 인간 항체 및 인간 가변부는 항원성 자극에 반응하여 온전한 인간 항체 또는 인간 가변부를 갖는 온전한 항체를 생성하도록 변형된 형질전환 동물에 면역원을 투여함으로써 제조될 수 있다(예컨대 문헌[Lonberg, Nat Biotech 23, 1117-1125 (2005)] 참고). 또한, 인간 항체 및

인간 가변부는 인간-유래 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변부 서열을 단리함으로써 생성될 수 있다(문헌[Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178, 1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001)]; 및 문헌[McCafferty et al., *Nature* 348, 552-554; Clackson et al., *Nature* 352, 624-628 (1991)] 참고). 파지는 전형적으로 단일체 Fv(scFv) 단편 또는 Fab 단편으로서 항체 단편을 디스플레이한다.

[0276] 특정 양상에서, 항원 결합 도메인은 PTC 공개 WO 2012/020006(친화도 성숙에 관련된 예 참고) 또는 US 2004/0132066에 개시된 방법에 따라 강화된 결합 친화도를 갖도록 조작된다. 특정 항원 결정인자에 결합하는 본 발명의 항원 결합 분자의 능력은 효소-연결 면역흡착 분석(ELISA) 또는 당업자에 친숙한 기타 기법, 예컨대 플라즈몬 공명 기법(문헌[Liljeblad, et al., *Glyco J* 17, 323-329 (2000)]), 및 종래의 결합 분석(문헌[Heeley, *Endocr Res* 28, 217-229 (2002)])을 통해 측정될 수 있다. 경쟁 분석은 특정 항원에의 결합에 대해 참조 항체와 경쟁하는 항원 결합 분자를 확인하는데 사용될 수 있다. 특정 양태에서, 이러한 경쟁적 항원 결합 분자는 참조 항원 결합 분자에 의해 결합되는 것과 동일한 에피토프(예컨대 선형 또는 입체구조 에피토프)에 결합한다. 항체가 결합하는 에피토프의 매핑(mapping)에 대한 자세한 예시적 방법은 문헌[Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", in *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)]에 제시된다. 예시적인 경쟁 분석에서, 부동화된 항원에 결합하는 제1 표지된 항체 및 항원에 대한 결합에 대해 제1 항원과 경쟁하는 능력이 시험되는 제2 미표지된 항체를 포함하는 용액에서 항온배양한다. 제2 항원 결합 분자는 하이브리도마 상정액에 존재할 수 있다. 대조군으로서, 부동화된 항원을 제1 표지된 항체는 포함하되 제2 미표지된 항체는 포함하지 않는 용액 중 항온배양한다. 항원에 대한 제1 항체의 결합에 허용되는 조건하에 항온배양 후, 과량의 미결합 항체를 제거하고, 부동화된 항원과 회합된 표지의 양을 측정한다. 부동화된 항원과 회합된 표지의 양이 대조군 샘플에 비해 시험 샘플에서 실질적으로 감소한 경우, 이는 제2 항체가 항원에 대한 결합에 대해 제1 항체와 경쟁함을 나타낸다. 문헌[Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)]를 참고한다.

[0277] 본원에 기재된 작용성 ICOS-결합 분자는 당업계에 공지되어 있는 기법, 예컨대 고성능 액체 크로마토그래피, 이온 결합 크로마토그래피, 젤 전기영동, 친화도 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토그래피 등에 의해 정제될 수 있다. 특정 단백질을 정제하는데 사용되는 실질적인 조건은 부분적으로는 순전하, 소수성 및 친수성과 같은 요인들에 의존할 것이고, 이는 당업자에게 명백하다. 친화도 크로마토그래피 정제의 경우, 항체, 리간드, 수용체 또는 항원이 이중특이성 항원 결합 분자가 결합하도록 사용될 수 있다. 예컨대, 본 발명의 융합 단백질의 친화도 크로마토그래피의 경우, 단백질 A 또는 단백질 G를 갖는 기질이 사용될 수 있다. 서열 단백질 A 또는 G 친화도 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토그래피가 하기 실시예에 기재된 바와 같이 항원 결합 분자를 본질적으로 단리하는데 사용될 수 있다. 이중특이성 항원 결합 분자 또는 이의 단편의 정제는 당업계에 주지되어 있는 임의의 다양한 방법, 예컨대 젤 전기영동 및 고압 액체 크로마토그래피 등에 의해 측정될 수 있다. 예컨대, 실시예에 기재된 바와 같이, 발현된 이중특이성 항원 결합 분자가 환원성 및 비환원성 SDS-PAGE에 의해 완전하고 적절히 조립된 것으로 나타났다.

[0278] **분석**

[0279] 본원에 제시되는 항원 결합 분자는 당업계에 공지되어 있는 다양한 분석에 의해 이의 물리적/화학적 특성 및/또는 생체활성에 대해 확인되거나 선별되거나 특성규명될 수 있다.

[0280] **1. 친화도 분석**

[0281] ICOS에 대해 본원에 제시되는 항체의 친화도는 표준 계기측정, 예컨대 비아코어 계기(지이 헬스케어), 및 예컨대 재조합 발현에 의해 수득될 수 있는 수용체 또는 표적 단백질을 사용하여 SPR에 의해 하기 실시예에 제시된 방법에 따라 측정될 수 있다. 표적 세포 항원에 대한 이중특이성 항원 결합 분자의 친화도도 표준 계기측정, 예컨대 비아코어 계기(지이 헬스케어), 및 예컨대 재조합 발현에 의해 수득될 수 있는 수용체 또는 표적 단백질을 사용하여 SPR에 의해 측정될 수 있다. 친화도 측정에 대한 구체적인 설명적 및 예시적 양태는 실시예 9에 기재되어 있다. 하나의 양상에 따라, K_D 는 비아코어(등록상표) T100 장치(지이 헬스케어)를 사용하여 25°C에서 SPR에 의해 측정된다.

[0282] **2. 결합 분석 및 기타 분석**

[0283] 하나의 양상에서, 본원에 보고된 항체는 이의 항원 결합 활성, 예컨대 기지의 방법, 예컨대 ELISA, 웨스턴 블롯 및 유동 세포분석 등에 의해 시험된다.

[0284] **3. 활성 분석**

[0285] 몇몇 세포-기반 체외 분석을 종양-관련 항원에 결합하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자를 평가하기 위해 수행하였다. 분석은 T-세포의 T-세포 특이성(TCB)-매개 활성화의 존재하에 항-ICOS 이중특이성 분자의 추가적인 작용적/공동-자극적 활성을 나타내도록 설계되었다. 예컨대, CD3/TCR 및 ICOS의 진입기전시 유도되는 루시퍼라제의 NFAT-조절된 발현을 갖는 리포터 세포주에 의한 Jurkat 분석을 실시 예 11에 보다 상세히 기재하였다(여기서 플레이트-결합된 것 대 용액 중에 있는 것, 및 코팅된 CD3 IgG 자극의 부재 대 존재하의 ICOS IgG 분자를 측정함).

[0286] 또한, 1차 인간 PMCB 동반-배양 분석을 시험하고 실시예 12에 기재하였다(여기서 FAP-표적화된 ICOS 분자는 T-세포 상의 CD3 및 종양 세포 상의 인간 CEA에 동시적 결합에 의해 가교연결된 TCB 분자의 존재하에 T-세포 상의 인간 ICOS 및 인간 FAP에 대한 동시적 결합에 의해 가교결합되고 3T3-hFAP 세포(모세포주 ATCC #CCL-92, 인간 FAP를 안정적으로 과발현하도록 변형됨)에 발현됨). 1차 쥐과 비장세포 동반-배양 분석을 실시예 13에 기재하였다.

[0287] 특정 양상에서, 본원에 보고된 항체를 이러한 생물학적 활성에 대해 시험한다.

[0288] **약학 조성물, 제형 및 투여 경로**

[0289] 추가의 양상에서 본 발명은 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자, 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학 조성물을 제시한다. 특정 양상에서, 암의 치료, 보다 특히 고형 종양의 치료에 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자, 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학 조성물이 제시된다. 하나의 추가 양상에서, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자 및 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체를 포함하는 약학 조성물이 제시되고, 상기 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자 및 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체는 단독 조성물로 통합 투여되거나 2개 이상의 상이한 조성물로 개별 투여된다. 또다른 양상에서, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체와 동시, 선행 또는 후속으로 투여된다.

[0290] 또다른 양상에서, 약학 조성물은 본원에 제시된 작용성 ICOS-결합 분자 및 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함한다. 또다른 양상에서, 약학 조성물은 본원에 제시된 작용성 ICOS-결합 분자 및 하나 이상의 추가 치료제, 예컨대 후술되는 것을 포함한다.

[0291] 또다른 양상에서, 암의 치료 방법 또는 암의 진행 지연 방법에 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체와의 조합으로 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자를 제시하고, 상기 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체와의 조합으로 및 PD-L1/PD-1 상호작용 차단제와의 조합으로 사용된다. 또다른 양상에서, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자는 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체와의 조합 및 PD-L1/PD-1 상호작용 차단제와의 조합으로 사용하기 위한 것이다. 특정 양상에서, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 항-PD-L1 항체 또는 항-PD1 항체이다. 보다 특히, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 아테졸리주맙, 듀르발루맙, 펌브롤리주맙 및 니볼루맙으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 양상에서, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 아테졸리주맙이다. 또다른 특정 양상에서, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 펌브롤리주맙 또는 니볼루맙이다.

[0292] 본 발명의 약학 조성물은 치료 효과량의, 약학적으로 허용가능한 담체 중에 용해되거나 분산된 항체를 포함한다. "약학적으로 또는 약물학적으로 허용가능한"이란 어구는 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 일반적으로 무독성인, 즉 적합한 대로 동물, 예를 들어 인간에게 투여시 불리하거나, 알려지성이거나 또는 다른 부적합한 반응을 생성하지 않는 분자 존재 및 조성물을 지칭한다. 하나 이상의 항체 및 임의적으로 추가적인 활성 성분을 함유하는 약학 조성물의 제제는 본 발명에 참고로 인용된 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990]에 예시된 바와 같이, 본원에 비추어 당해 분야의 숙련가들

에게 공지될 것이다. 더욱이, 동물(예를 들어 인간) 투여를 위해서, 제제는 FDA 생물 표준 관청 또는 다른 국가의 상응하는 당국에 의해 요구되는 바와 같은 멸균성, 발열원성, 일반적인 안전성 및 순도 표준을 충족시켜야 한다. 바람직한 조성물은 동결건조된 제형 또는 수용액이다. 본원에 사용되는 바와 같이, "약학적으로 허용가능한 담체"는 당업자에게 공지된 바와 같은 임의의 모든 용매, 완충제, 분산 배지, 코팅제, 계면활성제, 산화방지제, 보존제(예를 들어 항균제, 항진균제), 등장성 제제, 염, 안정화제 및 이의 조합을 포함한다.

[0293] 비경구 조성물은 주사에 의해, 예를 들어 피하, 피내, 병변내, 정맥내, 동맥내, 근육내, 경막내 또는 복강내 주사에 의해 투여하기 위해 설계된 것들을 포함한다. 주사용으로, 본 발명의 TNF 과 리간드 삼량체-함유 항원 결합 분자를 수용액 중에, 바람직하게는 생리학적으로 적합한 완충제, 예를 들어 탱크 용액, 링거액, 또는 생리식염수 완충제 중에서 제형화할 수 있다. 상기 용액은 제형화제, 예를 들어 현탁, 안정화 및/또는 분산제를 함유할 수 있다. 한편으로, 상기 항체 또는 이중특이성 항원 결합 분자는 사용전에 적합한 비히클, 예를 들어 멸균 발열성 물질 제거수로 조성되는 분말 형태 중에 존재할 수 있다. 멸균 주사액은 본 발명의 항체 또는 이중특이성 항원 결합 분자를 필요에 따라, 하기에 열거되는 다양한 다른 성분들과 함께 적합한 용매 중에 필요한 양으로 혼입시킴으로써 제조된다. 멸균은 예를 들어 멸균 여과 멤브레인을 통한 여과에 의해 쉽게 수행될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 다양한 멸균된 활성 성분을 기본 분산 배지 및/또는 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클 중에 혼입시킴으로써 제조된다. 멸균 주사액, 현탁액 또는 유화액의 제조에 사용하기 위한 멸균 분말의 경우에, 바람직한 제조 방법은 앞서 멸균-여과된 액체 배지로부터 활성 성분 + 임의의 추가적인 목적하는 성분의 분말을 제공하는 진공-건조 또는 동결-건조이다. 상기 액체 배지를 필요한 경우 적합하게 완충시켜야 하며 상기 액체 희석제를 주사전에 먼저 충분한 염수 또는 글루코스로 등장성으로 만들어야 한다. 상기 조성물은 제조 및 보관 조건하에서 안정해야 하며, 미생물, 예를 들어 세균 및 진균의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 내독소 오염을, 예를 들어 0.5 ng/mg 단백질 미만의 안전 수준에서 최소로 유지시켜야 함을 알 것이다. 적합한 약학적으로 허용가능한 담체는 비제한적으로 완충제, 예를 들어 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함한 산화방지제; 보존제(예를 들어 옥타데실다이메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드; 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예를 들어 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 사이클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량(약 10 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어 글리신, 글루타민, 아스파라진, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 다른 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스, 또는 텍스트린; 킬레이트화제, 예를 들어 EDTA; 당, 예를 들어 슈크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 솔비톨; 염-형성 대이온, 예를 들어 나트륨; 금속 착체(예를 들어 Zn-단백질 착체); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함한다. 수성 주사 현탁액은 상기 현탁액의 점도를 개선시키는 화합물, 예를 들어 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 솔비톨, 텍스트린 등을 함유할 수 있다. 임의적으로, 상기 현탁액은 또한 적합한 안정화제 또는 고도로 농축된 용액의 제조를 허용하도록 상기 화합물의 용해도를 증가시키는 작용제를 함유할 수 있다. 추가로, 상기 활성 화합물의 현탁액을 적합한 대로 유성 주사 현탁액으로서 제조할 수 있다. 적합한 친지성 용매 또는 비히클은 지방 오일, 예를 들어 참깨 오일, 또는 합성 지방산 에스터, 예를 들어 에틸 클리에이트 또는 트라이글리세라이드, 또는 리포솜을 포함한다.

[0294] 활성 성분을 예를 들어 코아세르베이션 기법에 의해서 또는 계면 중합에 의해서 제조된 미세캡슐, 예를 들어 콜로이드 약물 전달 시스템(예를 들어 리포솜, 알부민 미소구, 미세유화액, 나노-입자 및 나노캡슐) 중의 또는 거대유화액 중의 각각의 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-미세캡슐 및 폴리-(메틸메트아크릴레이트) 미세캡슐 중에 포집할 수 있다. 상기와 같은 기법들은 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences(18th Ed. Mack Printing Company, 1990)]에 개시되어 있다. 서방성 제제를 제조할 수도 있다. 서방성 제제의 적합한 예는 상기 폴리펩티드를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 기질(상기 기질은 성형품, 예를 들어 필름 또는 미세캡슐의 형태이다)을 포함한다. 특정 양태에서, 주사성 조성물의 연장된 흡수는 상기 조성물 중에 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트, 젤라틴 또는 이들의 조합의 사용에 의해 발생될 수 있다.

[0295] 본원에서 예시적인 약학적으로 허용되는 부형제는 장용성 약물 분산제, 예컨대 가용성 중립-활성 히알루로니다제 당단백질(sHASEGP), 예컨대 인간 가용성 PH-20 히알루로니다제 당단백질, 예컨대 rHuPH20(히알넥스(HYLENEX: 등록상표), 백스터 인터네셔널 인코포레이티드(Baxter International, Inc.))을 추가로 포함한다. 특정한 예시적인 sHASEGPs, 예컨대 rHuPH20 및 이의 사용 방법은 US 2005/0260186 및 US 2006/0104968에 기재되어 있다. 하나의 양상에서, sHASEGP는 하나 이상의 추가적인 글리코사미노글리카나제, 예컨대 콘드로이티나제와 조합된

다.

- [0296] 예시적인 동결건조 항체 제형은 US 6,267,958에 기재되어 있다. 수성 항체 제형은 US 6,171,586 및 WO 2006/044908에 기재되어 있는 것을 포함하고, 후자의 제형은 히스티딘-아세테이트 완충제를 포함한다.
- [0297] 전술된 조성물들 외에, 본원에 기재된 작용성 ICOS-결합 분자를 또한 데포(depot) 제제로서 제형화할 수 있다. 상기와 같은 장기간 작용하는 제형은 이식(예를 들어 피하 또는 근육내)에 의해 또는 근육내 주사에 의해 투여될 수 있다. 따라서, 예를 들어 작용성 ICOS-결합 분자를 적합한 중합체성 또는 소수성 물질(예를 들어 허용가능한 오일 중의 유화액으로서) 또는 이온 교환 수지와, 또는 드물게 용해성인 유도체, 예를 들어 드물게 용해성인 염으로서 제형화할 수 있다.
- [0298] 본 발명의 작용성 ICOS-결합 분자를 포함하는 약학 조성물을 통상적인 혼합, 용해, 유화, 캡슐화, 포집 또는 동결건조 공정에 의해 제조할 수 있다. 약학 조성물을 하나 이상의 생리학적으로 허용가능한 담체, 희석제, 부형제, 또는 상기 단백질의, 약학적으로 사용될 수 있는 제제로의 가공을 용이하게 하는 보조제를 사용하여 통상적인 방식으로 제형화할 수 있다. 적합한 제형화는 선택된 투여 경로에 따라 변한다.
- [0299] 작용성 ICOS-결합 분자를 유리산 또는 염기, 중성 또는 염 형태의 조성물로 제형화할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 염은 상기 유리산 또는 염기의 생물학적 활성을 실질적으로 유지시키는 염이다. 상기는 산 부가염, 예를 들어 단백질성 조성물의 유리 아미노기와 형성되거나 무기산, 예를 들어 염산 또는 인산, 또는 아세트산, 옥살산, 타타르산 또는 만델산과 같은 유기산과 형성되는 것들을 포함한다. 유리 카복실기와 형성된 염은 또한 무기 염기, 예를 들어 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘 또는 철 수산화물; 또는 아이소프로필아민, 트라이메틸아민, 히스티딘 또는 프로카인과 같은 유기염기로부터 유도될 수 있다. 약학적 염은 상응하는 유리 염기 형태보다 수성 및 다른 양성자성 용매 중에서 더 용해성으로 되는 성향이 있다.
- [0300] 본원의 조성물은 바람직하게는 서로 유해 효과를 주지 않는 상보적 활성을 갖는 것으로 처리되는 특정 적응증에 필요한 하나 초과 활성 성분도 함유할 수 있다. 이러한 활성 성분은 의도되는 목적에 효과적인 양의 조합으로 적합하게 존재한다. 체내 투여에 사용되는 제형은 일반적으로 멸균성이다. 멸균성은, 예컨대 멸균 여과막을 통해 용이하게 성취될 수 있다.
- [0301] **치료 방법 및 조성물**
- [0302] 하나의 양상에서, 효과량의 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자 및 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체, 특히 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체를 투여하는 단계를 포함하는 대상의 암의 치료 방법 또는 암의 진행 지연 방법이 제시된다.
- [0303] 하나의 이러한 양상에서, 상기 방법은 효과량의 하나 이상의 추가 치료제를 대상에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 추가의 양태에서, 본원에서, 효과량의 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자 및 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체, 특히 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체를 투여하는 단계를 포함하는 종양 축소를 위한 방법이 제시된다. 임의의 상기 양상에 따른 "개체" 또는 "대상"은 바람직하게는 인간이다.
- [0304] 추가의 양상에서, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자 및 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체, 특히 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체를 포함하는 암 면역치료에 사용하기 위한 조성물이 제시된다. 특정 양태에서, 암 면역치료의 방법에 사용하기 위한 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자 및 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체, 특히 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체를 포함하는 조성물이 제시된다.
- [0305] 추가의 양상에서, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자 및 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체, 특히 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체를 포함하는 조성물의 약제의 생산 또는 제조에서의 용도가 제시된다. 하나의 양상에서, 약제는 암의 치료를 위한 것이다. 추가의 양상에서, 약제는 고형 종양을 갖는 개체에게 효과량의 상기 약제를 투여하는 단계를 포함하는 종양 축소의 방법에 사용하기 위한 것이다. 하나의 이러한 양상에서, 상기 방법은 상기 개체에게 효과량의 하나 이상의 추가적인 치료제를 투여하는 단계를 포함한다. 추가의 양태에서, 상기 약제는 고형 종양을 치료하기 위한 것이다. 일부 양상에서, 상기 개체는 CEA 양성 암을 갖는다. 일부 양상에서, CEA 양성 암은 결장암, 폐암, 난소암, 위암, 방광암, 췌장암, 자궁내막암, 유방암, 신장암, 식도암 또는 전립선암이다. 일부 양상에서, 유방암은 유방 암종 또는 유방 선암종이다. 일부 양상에서, 유방 암종은 침습성 도관 암종이다. 일부 양상에서, 폐암은 폐 선암종이다. 일부 양태에서, 결장암은 결장직장 선암종이다. 임의의 상기 양태에 따른 "대상" 또는

"개체"는 인간일 수 있다.

- [0306] 효과량의 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자 및 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체, 특히 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체를 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 상기 대상의 암의 치료 방법 또는 암 진행의 지연 방법이 제시되고, 상기 대상은 작용성 ICOS-결합 분자로 치료되기 전에는 T-세포에서 낮은 ICOS 기저 발현을 포함한다.
- [0307] 상기 제시된 조합 치료는 조합된 투여(2개 이상의 치료제가 동일 또는 별개의 제형에 포함됨), 및 별개 투여를 포함하고, 이러한 경우, 본원에 보고된 항체의 투여는 추가적인 치료제 또는 제제의 투여에 선행 및/또는 동시 및/또는 후행하여 수행될 수 있다. 하나의 양상에서, T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체, 특히 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체의 투여, 및 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자의 투여, 및 임의적으로, 추가적인 치료제의 투여는 서로 약 1개월 이내에, 또는 약 1, 2 또는 3주 이내에, 또는 약 1, 2, 3, 4, 5 또는 6일 이내에 수행될 수 있다.
- [0308] 본원에 제시된 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체, 특히 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체, 및 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자 둘다(및 임의의 추가적인 치료제)는 임의의 적합한 수단, 예컨대 비경구, 폐내 및 비강내 투여될 수 있고, 국소 치료가 필요한 경우 병변내 투여될 수 있다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 투약은 부분적으로 투여가 단기 또는 장기인지 여부에 따라 임의의 적합한 경로에 의해, 예컨대 주사, 예컨대 정맥내 또는 피하 주사에 의한 것일 수 있다. 다양한 투약 스케줄, 예컨대 비제한적으로 다양한 시점에 걸쳐 단회 또는 다회 투여, 일시 투여(bolus administration) 및 간헐(pulse) 주입이 여기서 고려된다.
- [0309] 본원에 제시된 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체, 특히 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체, 및 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자 둘다는 양호한 의학적 실행과 일관되는 방식으로 제형화, 복용 및 투여될 수 있다. 이와 관련하여 고려되는 요인들은 치료되는 특정 질환, 치료되는 특정 포유동물, 개별 환자의 임상적 조건, 질환의 원인, 작용제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄, 및 의료 종사자에게 공지된 다른 요인들을 포함한다. 항체는 논의되는 질환을 예방하거나 치료하는데 현재 사용되는 하나 이상의 제제를 갖도록 제형화될 필요는 없지만 임의적으로는 이를 갖도록 제형화된다. 이러한 기타 제제의 효과량은 제형에 존재하는 항체의 양, 질환 또는 치료의 유형, 및 상기 논의된 기타 요인에 의존한다. 일반적으로, 이는 본원에 기재된 것과 동일한 투약량 및 투여 경로, 또는 본원에 기재된 투약량의 1 내지 99% 및 경험적/임상적으로 적절하다고 판단되는 임의의 경로로 사용된다.
- [0310] 추가의 양상에서, 효과량의 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자를 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 상기 대상의 암의 치료 방법 또는 암 진행의 지연 방법이 제시된다.
- [0311] **다른 작용제 및 치료**
- [0312] 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 본 발명의 작용성 ICOS-결합 분자를 치료법에서 하나 이상의 다른 작용제와 함께 투여할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 작용성 ICOS-결합 분자를 적어도 하나의 추가적인 치료제와 동반-투여할 수 있다. 용어 "치료제"는 치료가 필요한 개체내 증상 또는 질병을 치료하기 위해 투여될 수 있는 임의의 작용제를 포함한다. 이러한 추가적인 치료제는 치료되는 특정 적응증에 적합한 임의의 활성 성분, 바람직하게는 서로 장애적으로 영향을 주지 않는 상보적 활성을 갖는 활성 성분을 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 추가적인 치료제는 또다른 항암제이다. 하나의 양상에서, 추가적인 치료제는 화학치료제, 방사선, 및 암 면역치료에 사용하기 위한 기타 제제이다. 추가의 양상에서, 암의 치료에 사용하기 위한 본원에 후술된 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원을 포함하는 ICOS-결합 분자가 제시되고, 상기 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 ICOS-결합 분자는 또다른 면역조절제와 조합으로 투여된다.
- [0313] 용어 "면역조절제"는 면역 체계에 영향을 주는 단클론 항체를 비롯한 임의의 물질을 지칭한다. 본 발명의 분자는 면역조절제로 간주될 수 있다. 면역조절제는 암의 치료를 위한 항-신생물제일 수 있다. 하나의 양상에서, 면역조절제는 비제한적으로 항-CTLA4 항체(예컨대 이필리무맙), 항-PD1 항체(예컨대 니볼루맙 또는 펠브롤리주맙), PD-L1 항체(예컨대 아테졸리주맙, 아벨루맙 또는 두르발루맙), OX-40 항체, LAG3 항체, TIM-3 항체, 4-1 BB 항체 및 GTIR 항체를 포함한다.
- [0314] 추가의 양상에서, 암의 치료에 사용하기 위한 본원에 기재된 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이

상의 항원 결합 도메인을 포함하는 ICOS-결합 분자가 제시되고, 상기 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 ICOS-결합 분자는 PD-L1/PD-1 상호작용 차단제와 조합으로 투여된다. 하나의 양상에서, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 항-PD-L1 항체 또는 항-PD1 항체이다. 보다 특히, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 아테졸리주맙, 두르발루맙, 켈프롤리주맙 및 니볼루맙으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 하나의 구체적인 양상에서, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 아테졸리주맙이다. 또다른 양상에서, PD-L1/PD-1 상호작용 차단제는 켈프롤리주맙 또는 니볼루맙이다. 이러한 기타 제제는 의도 목적에 효과적인 양으로 조합되어 적합하게 존재한다. 이러한 기타 제제의 효과량은 사용되는 작용성 ICOS-결합 분자의 양, 질환 또는 치료의 유형 및 상기 논의된 기타 요인들에 의존한다. 일반적으로, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 ICOS-결합 분자는 본원에 기재된 바와 동일한 투약량 및 투여 경로, 또는 본원에 기재된 투약량의 1 내지 99%, 또는 경험적/임상적으로 적절하다고 판단되는 임의의 투약량 및 임의의 경로로 사용된다.

[0315] 전술한 이러한 조합 치료는 조합된 투여(2개 이상의 치료제가 동일 또는 별개 조성물에 포함됨), 및 별개 투여를 포함하고, 이러한 경우, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 ICOS-결합 분자는 추가적인 치료제 및/또는 보조제의 투여에 선행 및/또는 동시 및/또는 후행하여 수행될 수 있다.

[0316] **제조 물품**

[0317] 본 발명의 또다른 양태에서, 상술한 질환의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용한 물질을 함유하는 제조 물품을 제공한다. 상기 제조 물품은 용기 및 상기 용기 상의 또는 상기 용기와 결합된 표지 또는 패키지 삽입물을 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 주사기, IV 용액 주머니 등을 포함한다. 상기 용기는 다양한 물질들, 예를 들어 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 상기 용기는 조성물을 단독으로, 또는 상태의 치료, 예방 및/또는 진단에 유효한 또다른 조성물과 함께 유지하며 멸균 출입구를 가질 수 있다(예를 들어 상기 용기는 정맥내 용액 주머니 또는 피하주사 바늘에 의해 관통될 수 있는 마개를 갖는 바이알일 수 있다). 상기 조성물 중의 적어도 하나의 활성제는 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 본 발명의 작용성 ICOS-결합 분자이다.

[0318] 상기 표지 또는 패키지 삽입물은 상기 조성물이 선택 상태의 치료에 사용됨을 가리킨다. 더욱이, 상기 제조 물품은 (a) 조성물이 함유된 제1 용기(여기에서 상기 조성물은 종양-관련 항원에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 본 발명의 작용성 ICOS-결합 분자를 포함한다); 및 (b) 조성물이 함유된 제2 용기(여기에서 상기 조성물은 추가의 세포독성제 또는 다른 치료제를 포함한다)를 포함할 수 있다. 본 발명의 상기 양태에서 제조 물품은 상기 조성물을 사용하여 특정 병태를 치료할 수 있음을 가리키는 패키지 삽입물을 추가로 포함할 수 있다.

[0319] 한편으로, 또는 추가로, 상기 제조 물품은 약학적으로 허용가능한 완충제, 예를 들어 주사용 정균수(BWFI), 포스페이트-완충된 염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2(또는 제3) 용기를 추가로 포함할 수 있다. 상기 물품은 상업적 및 사용자 관점에서 바람직할 수 있는 다른 물질, 예를 들어 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기를 추가로 포함할 수도 있다.

[0320] [표 B]

[0321]

서열

| 서열 번호 | 명칭 | 서열 |
|-------|------------------|---|
| 1 | huICOS-L(ECD) | DTQEKEVRAM VGSDELSCA CPEGSRFDLN DVVYVWQTSE SKTVVYTHIP QNSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNI GCCIE NVLQQLNLTV GSQTGNDIGE RDKITENPVS TGEKNAAT |
| 2 | muICOS-L | ETEVGAMVGS NVLSCIDPH RRHFNLSGLY VYWQIENPEV SVTYLPLPKS PGINVDSSYK NRGHLSLDSM KQGNFSLYLK NVTPODTQEF TCRVFMNTAT ELVKILEEVV RLRVAANFST PVI STSDSSN PGQERTYTCM SKNGYPEPNL YWINTT DNSL IDTALQNTV YLNKLGLYDV ISTLRLP WTS RGDVLCVEN VALHQNITSI SQAESFTGNN TKNPQETHNN ELK |
| 3 | 인간 ICOS | UniProt Q9Y6W8:MKSGLWYFFL FCLRIVLTG EINGSANYEM FIFHNGGVQI LCKYPDIVQQ FKMQLKGGQ ILCDLTKTKG SGNTVSIKSL KFCHSQLSNV SVSFFLYNL D HSHANYFCN LSIFDPPPFK VTLTGGYLHI YESQLCCQLK FWLPIGCAAF VVVCLGCIL ICWLTKKYS SSVHDPNGEY MFMRAVNTAK KSRLTDVTL |
| 4 | FAP(4B9) CDR-H1 | SYAMS |
| 5 | FAP(4B9) CDR-H2 | AIIGSGASTYYADSVKG |
| 6 | FAP(4B9) CDR-H3 | GWFGGFNY |
| 7 | FAP(4B9) CDR-L1 | RASQSVTSSYLA |
| 8 | FAP(4B9) CDR-L2 | VGSRRAT |
| 9 | FAP(4B9) CDR-L3 | QQGIMLPPT |
| 10 | FAP(4B9) VH | EVQLES GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKLEWVSAI I GSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GWF GGF NYWGGT LVTVSS |
| 11 | FAP(4B9) VL | EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLI NVG RRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTK VEIK |
| 12 | FAP(28H1) CDR-H1 | SHAMS |
| 13 | FAP(28H1) CDR-H2 | AIWASGEQYYADSVKG |
| 14 | FAP(28H1) CDR-H3 | GWLGNFDY |
| 15 | FAP(28H1) CDR-L1 | RASQSVRSYLA |
| 16 | FAP(28H1) CDR-L2 | GASTRAT |
| 17 | FAP(28H1) CDR-L3 | QQGQVIPPT |
| 18 | FAP(28H1) VH | EVQLES GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMS WVRQAPGKLEWVSAI W ASGEQYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GWLGNFD YWGGT LVTVSS |
| 19 | FAP(28H1) VL | EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSVRSYLA WYQQKPGQAPRLLI IGA STRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGQVIPPTFGQGTK VEIK |
| 20 | ICOS CDR-H1 | GYTFTGYMH |
| 21 | ICOS CDR-H2 | WINPHSGGTNYAQKFQG |
| 22 | ICOS CDR-H3 | TYYYDSSGYHDAFDI |
| 23 | ICOS CDR-L1 | RASQISRLLA |
| 24 | ICOS CDR-L2 | VASSLQS |
| 25 | ICOS CDR-L3 | QQANSFPWT |

[0322]

| | | |
|----|--|---|
| 26 | ICOS(JMab136) VH | <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTFGYMHVVRQAPGQGLEWMGWIN</u> <u>PHSGGTNYAQKRFQGRVTMTRDTSISTAYMELRSLRSDDTAVYYCARTYYYS</u> <u>SGYYHDAFDIWGQGMVTVSS</u> |
| 27 | ICOS(JMab136) VL | <u>DIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCRASQGISRLLAWYQQKPKGKAPKLLIYVAS</u> <u>SLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQANSEFPWTFGGGTKV</u> <u>EIK</u> |
| 28 | VHCH1(JMab136)-Fc <u>늄</u> <u>쇄</u> | 표 1 |
| 29 | VLCL(JMab136) <u>경</u> <u>쇄</u> | 표 1 |
| 30 | VHCH1(4B9)-Fc <u>홀</u> <u>쇄</u> | 표 1 |
| 31 | VLCL(4B9) <u>경</u> <u>쇄</u> | 표 1 |
| 32 | VHCH1(JMab136)-Fc <u>늄</u> <u>쇄</u> -VH(4B9) | 표 2 |
| 33 | VHCH1(JMab136)-Fc <u>홀</u> <u>쇄</u> -VL(4B9) | 표 3 |
| 34 | CD3 CDR-H1 | TYAMN |
| 35 | CD3 CDR-H2 | RIRSKYNNYATYYADSVKG |
| 36 | CD3 CDR-H3 | HGNFGNSYVSWFAY |
| 37 | CD3 CDR-L1 | GSSTGAVTTSNYAN |
| 38 | CD3 CDR-L2 | GTNKRAP |
| 39 | CD3 CDR-L3 | ALWYSLWV |
| 40 | CD3 VH | <u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWRQAPGKGLEWVSRIR</u> <u>SKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNF</u> <u>GNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS</u> |
| 41 | CD3 VL | <u>QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGG</u> <u>TNKRAPGTPARFSGSLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSLWVFGGGT</u> <u>KLTVL</u> |
| 42 | CEA CDR-H1 | EFGMN |
| 43 | CEA CDR-H2 | WINTKTGEATYVEEFGK |
| 44 | CEA CDR-H3 | WDFAYYVEAMDY |
| 45 | CEA CDR-L1 | KASAAVGTYYA |
| 46 | CEA CDR-L2 | SASYRKR |
| 47 | CEA CDR-L3 | HQYYTYPLFT |
| 48 | CEA VH | <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTEFGMNVVRQAPGQGLEWMGWIN</u> <u>TKTGEATYVEEFGKGRVTFITDTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYY</u> <u>VEAMDYWGQGLTVTVSS</u> |
| 49 | CEA VL | <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASAAVGTYYAWYQQKPKGKAPKLLIYAS</u> <u>YRKRGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGGGTK</u> <u>LEIK</u> |
| 50 | CEA CDR-H1(CEACAM5) | DTYMH |
| 51 | CEA CDR-H2(CEACAM5) | RIDPANGNSKYVPKFQG |
| 52 | CEA CDR-H3(CEACAM5) | FGYYVSDYAMAY |
| 53 | CEA CDR-L1(CEACAM5) | RAGESVDIFGVGFLH |
| 54 | CEA CDR-L2(CEACAM5) | RASNRAT |
| 55 | CEA-CDR-L3(CEACAM5) | QQTNEPYPY |
| 56 | CEA VH(CEACAM5) | <u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFNIKDTYMHVVRQAPGQGLEWMGRID</u> <u>PANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAPFGYYVS</u> <u>DYAMAYWGQGLTVTVSS</u> |
| 57 | CEA VL(CEACAM5) | <u>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGFLHWYQQKPGQAPRLLI</u> <u>YRASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAYYCCQTNEPYPYFGQ</u> <u>GTKLEIK</u> |

[0323]

| | | |
|----|--|---|
| 58 | 경체 "CEA 2F1" (CEA TCB) | DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASAAVGTYYVAWYQQKPKGAPKLLIYSAS YRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLTFGGGTK LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC |
| 59 | 경체 인간화된 CD3 ^{CH2527} (Crossfab, VL-CH1) (CEA TCB) | QAVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGG TNKRAPGTPARFSGSLLGGKAAALTLGAQPEDEAEYCYALWYSNLWVFGGGT KLTVLSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSC |
| 60 | CEA ^{CH1A1A 98/99} - 인간화된 CD3 ^{CH2527} (Crossfab VH-Ck) -Fc(홀) P329GLALA(CEA TCB) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWIN TKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYY VEAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRSCAAS GFTFTSYAMNWRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGFNFSYVSWFAYWGQGTITVTVSSASVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC KTHTCPPEAPEAAGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 61 | CEA ^{CH1A1A 98/99} (VH-CH1) -Fc(홀) P329GLALA(CEA TCB) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWIN TKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYY VEAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 62 | CD3 VH-CL(CEACAM5 TCB) | EVQLLESGGGLVQPGGSLRSCAASGFTFTSYAMNWRQAPGKGLEWVSRIR SKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGFN GNSYVSWFAYWGQGTITVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 63 | 인간화된 CEA VH-CH1(EE)-Fc(홀, P329G LALA)(CEACAM5 TCB) | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWRQAPGQGLEWMGRID PANGNSKYVPKQGRVITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYVS DYAMAYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP |

[0324]

| | | |
|----|---|---|
| 64 | 인간화된 CEA VH-CH1(EE)-CD3 VL-CH1-Fc(늄, P329G LALA)(CEACAM5 TCB) | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGFNIKDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRID PANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDAVYYCAPFGYYVS DYAMAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPE PVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKVEPKSCDGGGGSGGGGSAVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSS TGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRLIGGTNKRAPGTPARFSGSLGGKAALTL SGAQPEDEAEYICALWYSLWVFGGKTLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHITCPPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIISKAKGQP REPQVYITLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSDSGSEFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP |
| 65 | 인간화된 CEA VL-CL(RK)(CEACAM5 TCB) | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGFLHWYQQKPGQAPRLLI YRASNRATGIPARFSGSGSDTFLITISSELEPDEFAVYYCQQTNEDEPYTFGQ GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSENRGEC |
| 66 | Fc 흡쇄-VL(4B9) | 표 2 |
| 67 | VHCH1(DP47) Fc 흡쇄 | 표 4 |
| 68 | VLCL(DP47) 경쇄 | 표 4 |
| 69 | VHCH1(JMAb136)-Fc 흡 쇄-VH(DP47) | 표 5 |
| 70 | VHCH1(JMAb136)-Fc 흡쇄-VL(DP47) | 표 5 |
| 71 | 쥐과 ICOS-L 연결자 muIgG1 Fc(DAPG KK) 4GS 연결자 FAP(28H1) VH | 표 7 |
| 72 | 쥐과 ICOS-L 연결자 muIgG1 Fc(DAPG DD) 4GS 연결자 FAP(28H1) VL | 표 7 |
| 73 | 쥐과 ICOS-L 연결자 muIgG1 Fc(DAPG KK) 4GS 연결자 DP47 VH | 표 8 |
| 74 | 쥐과 ICOS-L 연결자 muIgG1 Fc(DAPG DD) 4GS 연결자 DP47 VL | 표 8 |
| 75 | VHCH1(CH1A1A 98/99 2F1)- Fc(KK) DAPG 쇄 | 표 10 |
| 76 | VLCL(CH1A1A 98/99 2F1) 경 쇄 | 표 10 |
| 77 | VHCL VHCH1(2C11- CH1A1A 98/99 2F1)- Fc(DD) DAPG 쇄 | 표 10 |
| 78 | VLCH1(2C11) 경쇄 | 표 10 |
| 79 | 인간 FAP | 유니프로트 접근번호 Q12884 |

[0325]

| | | |
|----|-----------------------|--|
| 80 | His-태깅된 인간 FAP ECD | RPSRVHNSEENTMRALTLKIDILNGTF SYKTFPPNWISGQEYLHQSDANNIVL YNIETGQSYTILSNRTMKS VNASN YGLSPDRQFVYLESDYSKLRYSYTATY YIYDL SNGEFVRGNELPRPIQYLCWSPVGSKLAYVYQNNIYLKQRPGDPPFQ ITFNGRENKIFNGIPDWVYEEEMLATKYALWSPNGKFLAYAEFNDTDIPVI AYSYYGDEQYPRPTINIPYPKAGAKNPVVRIFIIDTTYPAYVGPQEVVPAMI ASSDYFWSL TWVTD ERVCLQW LKRQNVSVLSICDFREDWQTWDCPKTQEH IEESRTGWAGGFFVSTPVS YDAISYKIFSDKDG YKH IHYIKDTVENAIQI TSGKWEAINIFRVTQDSL FYSSENEFEY PGRRN IYRISIGSYPSPK KCVTCH LRKERCQYITASFSYAKYALVCYGPPISTLHDGR TDQEIKILEENKEL ENALKNIQLPKEEIKKLEVDEITLWYKMI LPPQFDRSKKYPLL IQVYGGPCS QSVRSVFAVNWISYLASKEGMVIALVDGRGTAFQGDKLLYAVYRKLGVYEVE DQITAVRKF IEMGFIDEKRIAIWGW SYGGYVSSLALASGTGLFKCGI AVAPV SSWEYYASVYTERFMGLPTKDDNLEHYKNSTVMARAEYFRNVDYLLIHGTAD DNVHFQNSAQIAKALVNAQVDFQAMWYSDQNHGLSGLSTNHLYTHMTHFLKQ CFSLSDGK KKKKKGHHHHHHH |
| 81 | 마우스 FAP | 유니프로트 접근번호 P97321 |
| 82 | His-태깅된 마우스 FAP ECD | RPSRVKPEGNTKRALTLKIDILNGTF SYKTYFPPNWISEQEYLHQSEDDNIVF YNIETRESYIILSNRTMKS VNATD YGLSPDRQFVYLESDYSKLRYSYTATY YIYDLQNGEFVRGYELPRPIQYLCWSPVGSKLAYVYQNNIYLKQRPGDPPFQ ITYTGRENRI FNGIPDWVYEEEMLATKYALWSPDGKFLAYVEFNDSDIPII AYSYYGDEQYPRPTINIPYPKAGAKNPVVRVFI VDTTYPHHVGPMEVVPPEMI ASSDYFWSL TWVSSERVCLQW LKRQNVSVLSICDFREDWHAWECPKNQEH VEESRTGWAGGFFVSTPAFSQDATSYKIFSDKDG YKH IHYIKDTVENAIQI TSGKWEAIYIFRVTQDSL FYSSENEFEGY PGRRN IYRISIGNSPSPK KCVTCH LRKERCQYITASFSYAKYALVCYGPGLPISTLHDGR TDQEIQVLEENKEL ENSLRN IQLPKVEIKKLDGGLTFWYKMI LPPQFDRSKKYPLL IQVYGGPCS QSVKSVFAVNWITYLASKEGIVIALVDGRGTAFQGDKFLHAVYRKLGVYEVE DQITAVRKF IEMGFIDEERIAI WGW SYGGYVSSLALASGTGLFKCGI AVAPV SSWEYYASISERFMGLPTKDDNLEHYKNSTVMARAEYFRNVDYLLIHGTAD DNVHFQNSAQIAKALVNAQVDFQAMWYSDQNHGILSGRSQNHLYTHMTHFLK QCFSLSDGK KKKKKGHHHHHHH |
| 83 | His-태깅된 시노물거스 FAP ECD | RPPRVHNSEENTMRALTLKIDILNGTF SYKTFPPNWISGQEYLHQSDANNIVL YNIETGQSYTILSNRTMKS VNASN YGLSPDRQFVYLESDYSKLRYSYTATY YIYDL SNGEFVRGNELPRPIQYLCWSPVGSKLAYVYQNNIYLKQRPGDPPFQ ITFNGRENKIFNGIPDWVYEEEMLATKYALWSPNGKFLAYAEFNDTDIPVI AYSYYGDEQYPRPTINIPYPKAGAKNPVVRIFIIDTTYPAYVGPQEVVPAMI ASSDYFWSL TWVTD ERVCLQW LKRQNVSVLSICDFREDWQTWDCPKTQEH IEESRTGWAGGFFVSTPVS YDAISYKIFSDKDG YKH IHYIKDTVENAIQI TSGKWEAINIFRVTQDSL FYSSENEFEDY PGRRN IYRISIGSYPSPK KCVTCH LRKERCQYITASFSYAKYALVCYGPPISTLHDGR TDQEIKILEENKEL ENALKNIQLPKEEIKKLEVDEITLWYKMI LPPQFDRSKKYPLL IQVYGGPCS QSVRSVFAVNWISYLASKEGMVIALVDGRGTAFQGDKLLYAVYRKLGVYEVE DQITAVRKF IEMGFIDEKRIAIWGW SYGGYVSSLALASGTGLFKCGI AVAPV SSWEYYASVYTERFMGLPTKDDNLEHYKNSTVMARAEYFRNVDYLLIHGTAD DNVHFQNSAQIAKALVNAQVDFQAMWYSDQNHGLSGLSTNHLYTHMTHFLKQ CFSLSDGK KKKKKGHHHHHHH |
| 84 | 인간 CEA | 유니프로트 접근번호 P06731 |
| 85 | 인간 FoIR1 | 유니프로트 접근번호 P15328 |
| 86 | 쥐과 FoIR1 | 유니프로트 접근번호 P35846 |
| 87 | 시노물거스 FoIR1 | 유니프로트 접근번호 G7PR14 |
| 88 | 인간 MCSP | 유니프로트 접근번호 Q6UVK1 |
| 89 | 인간 EGFR | 유니프로트 접근번호 P00533 |

[0326]

| | | |
|-----|------------------------------|--|
| 90 | 인간 HER2 | 유니프로트 접근번호 P04626 |
| 91 | p95 HER2 | MPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTISI SAVVGI LVVVLGVVFGILIKRRQKIKRYTMRRLLETELVEPLTPSGAMPNQAMRI LKETELRKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVRENTSPKANKE ILDEAYVMAGVGSPIVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDHVRENRRGLG SQDLLNWCMIKAGMSYLEDVRLVHRDLAARNLVKSPNHVKITDFGLARLL DIDETEYHADGGKVP IKWMALESILRRRFTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAKP YDGI PAREIPDLLEKGERLPQPPICTIDVYIMVKCWMIDSECRPRFRELVS EFSRMARDPQRFVVIQNEDELGPASPLDSTFYRSLLEDDDMGDLVDAEEYLPV QQGFFCPDPAPGAGGMVHHRSSSTRSGGDLTLGLEPSEEEAPRSPLAPS EGAGSDVFDGLGMGAARKLQSLPTHDPSPLQRYSEDPVPLPSETDGYVAP LTCSPQPEYVNPQDVRPQPPSPREGPLAARPAGATLERPKTLPKNGVVK DVFAGGAVENPEYLTPQGGAAPQHPPPAFSPAFDNLVYWDQDPPERGAPP STFKGTPTAENPEYLGLDVVPV |
| 92 | 펩티드 연결자(G4S) | GGGGS |
| 93 | 펩티드 연결자(G4S) ₂ | GGGSGGGGS |
| 94 | 펩티드 연결자(SG4) ₂ | SGGGSGGGG |
| 95 | 펩티드 연결자 G4(SG4) ₂ | GGGSGGGSGGGG |
| 96 | 펩티드 연결자 | GSPGSSSSGS |
| 97 | (G4S) ₃ 펩티드 연결자 | GGGSGGGSGGGGS ₃ |
| 98 | (G4S) ₄ 펩티드 연결자 | GGGSGGGSGGGSGGGGS |
| 99 | 펩티드 연결자 | GSGSGSGS |
| 100 | 펩티드 연결자 | GSGSGNGS |
| 101 | 펩티드 연결자 | GGSGSGSG |
| 102 | 펩티드 연결자 | GGSGSG |
| 103 | 펩티드 연결자 | GGSG |
| 104 | 펩티드 연결자 | GGSGNGSG |
| 105 | 펩티드 연결자 | GGNGSGSG |
| 106 | 펩티드 연결자 | GGNGSG |
| 107 | 인간 PD-L1 | 유니프로트 접근번호 Q9NZQ7 |
| 108 | 인간 PD-1 | 유니프로트 접근번호 Q15116 |
| 109 | VH(PD-L1) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWIS PYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGG FDYWGGGTLTVVSS |
| 110 | VL(PD-L1) | DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQDVSTAVAWYQKPKAPKLLIYSAS FLYSGVPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYLYHPATFGGQTKV EIK |
| 111 | VH(PD-L1) 2 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKLEWVANIK QDQSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFG ELAFDYWGGGTLTVVSS |
| 112 | VL(PD-L1) 2 | EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDA SSRATGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGLPWTFGGQTK VEIK |
| 113 | VH(PD-1) | QVQLVQSGVEVKKPGASVKVCSKASGYTFNTNYMWWVRQAPGQGLEWMMGIN PSNGGTNFKPKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFD MGFDYWGGGTTTVVSS |
| 114 | VL(PD-1) | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQKPGQAPRLLI YLASYLESGVPARFSGSGGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGG GTVKVEIK |

[0327]

| | | |
|-----|-------------------------------------|--|
| 115 | VH(PD-1) 2 | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAIVYDGSKRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTILVTVSS |
| 116 | VL(PD-1) 2 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIK |
| 117 | 귀과 ICOS | UniprotkB Q9WVSOMKPYFCRVFV FCFLIRLLTG EINGSADHRMFSFHNGGVQI SCKYPETVQQ LKMRLFRERE VLCELTKTKGSGNAVSIKNP MLCLYHL SNN SVSFFLNPD SSQGSYFPCSLSIFDPPPFQ ERNLGGYLH IYESQLCCQL KLWLPVGCAA FVVVLLFGCI LIIFWFSKKKY GSSVHDPNSE YMFMAAVNTN KKSRLAGVTS |
| 118 | 귀과 ICOS(21-144) ECD | EINGSADHRMFSFHNGGVQI SCKYPETVQQ LKMRLFRERE VLCELTKTKGSGNAVSIKNP MLCLYHL SNN SVSFFLNPD SSQGSYFPCSLSIFDPPPFQ ERNLGGYLH IYESQLCCQL KLWL |
| 119 | 뉴클레오티드 서열 귀과 ICOS 항원 Fc 혼쇄 | 표 16 |
| 120 | 뉴클레오티드 서열 귀과 ICOS 항원 Fc 농쇄 | 표 16 |
| 121 | 귀과 ICOS 항원 Fc 혼쇄 | 표 16 |
| 122 | 귀과 ICOS 항원 Fc 농쇄 | 표 16 |
| 123 | 귀과 ICOS CDR-H1 | GYSFTSYWIG |
| 124 | 귀과 ICOS CDR-H2 | I IYPGDSDRYSPSFQG |
| 125 | 귀과 ICOS CDR-H3 | SSGPYGLYLDY |
| 126 | 귀과 ICOS CDR-L1 | RSSQSLHHSNGYNYLD |
| 127 | 귀과 ICOS CDR-L2 | LGSNRAS |
| 128 | 귀과 ICOS CDR-L3 | MQALWTPPT |
| 129 | 귀과 ICOS(16E09) VH | EVQLVQSGAEVVKPGE SLK I SCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKLEWMI IY PGDSDRYSPSFQGVTVISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYCARSSGPYGLYLDYWGQGTILVTVSS |
| 130 | 귀과 ICOS(16E09) VL | DIVMTQSPSLPVTGPGE PASI SCRSSQSLHHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLL IYLGSNRASGVDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQALWTPPTFGQGTKVEIK |
| 131 | 귀과 ICOS(16E09) P329GLALA 인간 IgG1 경쇄 | 표 19 |
| 132 | 귀과 ICOS(16E09) P329GLALA 인간 IgG1 중쇄 | 표 19 |
| 133 | 귀과 ICOS Fc 농쇄 Avi 태그 | 표 21 |
| 134 | 귀과 ICOS Fc 혼쇄 | 표 21 |
| 135 | VHCH1(16E09) Fc DAPG DD 중쇄-VH(28H1) | 표 23 |
| 136 | VHCH1(16E09) Fc DAPG KK 중쇄-VL(28H1) | 표 23 |
| 137 | VHCH1(16E09) Fc DAPG DD 중쇄 | 표 24 |
| 138 | VHCH1(28H1) Fc DAPG KK 중쇄 | 표 24 |
| 139 | VLCL(28H1)-경쇄 | 표 24 |
| 140 | VHCH1(16E09) Fc DAPG DD 중쇄-VH(DP47) | 표 25 |
| 141 | VHCH1(16E09) Fc DAPG KK 중쇄-VL(DP47) | 표 25 |

[0328]

| | | |
|-----|-------------------------------------|---|
| 142 | VHCH1(16E09) Fc DAPG DD 중쇄 | 표 26 |
| 143 | VHCH1(DP47) Fc DAPG KK 중쇄 | 표 26 |
| 144 | 꺾과 VLCL(DP47)-경쇄 | 표 26 |
| 145 | CEA(MEDI-565)- CDR-H1 | SYWMH |
| 146 | CEA(MEDI-565)- CDR-H2 | FIRNKANGGTTEYAAS |
| 147 | CEA(MEDI-565)- CDR-H3 | DRGLRFYFDY |
| 148 | CEA(MEDI-565)- CDR-L1 | TLRRGINVGAYSIIY |
| 149 | CEA(MEDI-565)- CDR-L2 | YKSDSDKQQGS |
| 150 | CEA(MEDI-565)- CDR-L3 | MIWHSGASAV |
| 151 | CEA(MEDI-565) VH | EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTVSSYWMHWRQAPGKGLEWVGFIRNKANGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRLRFYFDYWGQGTITVTVSS |
| 152 | CEA(MEDI-565) VL | QAVLTQPASLSASPGASASLTCTLRGINVGAYSIIYWYQQKPGSPQYLLRYKSDSDKQQGSGVSRFSASKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCMIWHSGASAVFGGGTKLTVL |
| 153 | VHCH1(JMAb136)-Fc 중쇄-VH(MEDI-565) | 표 28 |
| 154 | VHCH1(JMAb136)-Fc 중쇄-VL(MEDI-565) | 표 28 |
| 155 | VHCH1(JMAb136)-Fc 중쇄 | 표 29 |
| 156 | VHCH1(MEDI-565)-Fc 중쇄 | 표 29 |
| 157 | VLCL(MEDI-565) 경쇄 | 표 29 |
| 158 | CEA(A5B7)- CDR-H1 | DYYMN |
| 159 | CEA(A5B7)- CDR-H2 | FIGNKANGYTTEYSASVKG |
| 160 | CEA(A5B7)- CDR-H3 | DRGLRFYFDY |
| 161 | CEA(A5B7)- CDR-L1 | RASSSVTYIH |
| 162 | CEA(A5B7)- CDR-L2 | ATSNLAS |
| 163 | CEA(A5B7)- CDR-L3 | QHWSSKPPPT |
| 164 | CEA(A5B7) VH | EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFDYYMNWRQPPGKALEWLGFTIGNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDKSQSILYLQMNTLRAEDSATYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTITVTVSS |
| 165 | CEA(A5B7) VL | QTVLSQSPAILLSAPGKVTMTCRASSSVTYIHWYQQKPGSSPKSWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQHWSSKPPPTFGGGTKLEIK |
| 166 | VHCH1(16E09) Fc DAPG DD 중쇄-VL(A5B7) | 표 31 |
| 167 | VHCH1(16E09) Fc DAPG KK 중쇄-VH(A5B7) | 표 31 |
| 168 | VHCH1(A5B7) Fc DAPG KK 중쇄 | 표 32 |
| 169 | VLCL(A5B7)-경쇄 | 표 32 |
| 170 | CH1 도메인 | ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKVV |
| 171 | 연결자 | EPKSC |
| 172 | 경첩부 | DKTHTCPXCP(단 X = S 또는 P) |
| 173 | 짧은 경첩부 | HTCPXCP(단 X = S 또는 P) |
| 174 | 가장 짧은 경첩부 | CPXCP(단 X = S 또는 P) |

[0329]

| | | |
|-----|---------|--|
| 175 | CH2 도메인 | APELLGGPSV FLFPPPKPDT LMSRTPEVT CVWDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQESTYRW SVLTVLHQDW LNKKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAK |
| 176 | CH3 도메인 | GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSP |

[0330]

[0331]

인간 면역글로불린 경쇄 및 중쇄의 뉴클레오티드 서열에 대한 일반적인 정보는 문헌[Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에 제시되어 있다. 인항체의 아미노산은 상기 정의된 카바트(문헌[Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에 따라 번호부여되고 지칭된다.

[0332]

하기 번호부여된 문단(단)은 본 발명의 양상을 설명한다.

[0333]

1. 암의 치료 방법 또는 암 진행의 지연 방법에 사용하기 위한 종양-관련 항원에 결합하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자로서, 상기 종양 관련 항원에 특이적인 T-세포 활성화 항-CD3 이중

특이성 항체와 조합으로 사용되는 작용성 ICOS-결합 분자.

- [0334] 2. 제1단에 있어서,
- [0335] 종양-관련 항원에 특이적인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체가 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체인, 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0336] 3. 제1단 또는 제2단에 있어서,
- [0337] 종양-관련 항원에 결합하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자 및 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체가 단일 조성물로 함께 투여되거나 2개 이상의 상이한 조성물로 별도 투여되는, 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0338] 4. 제1단 내지 제3단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0339] T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체와 상승효과적으로 작용하는, 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0340] 5. 제1단 내지 제4단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0341] 하나 이상의 ICOS-L 또는 이의 단편을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0342] 6. 제1단 내지 제5단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0343] 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열을 포함하는 하나 이상의 ICOS-L을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0344] 7. 제1단 내지 제6단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0345] ICOS에 작용적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0346] 8. 제1단 내지 제4단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0347] 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 인간 ICOS에 작용적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0348] 9. 제1단 내지 제8단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0349] 항-섬유아세포 활성화 단백질(항-FAP)에 결합하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0350] 10. 제1단 내지 제9단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0351] (a) (i) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP), 및 (iv) 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하거나;
- [0352] (b) (i) 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP), 및 (iv) 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하는 FAP에 특이적으로 결합 가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는,
- [0353] FAP에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0354] 11. 제1단 내지 제10단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0355] 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP) 및 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하거나;
- [0356] 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP) 및 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하는

- [0357] FAP에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0358] 11. 제1단 내지 제10단 및 제7단 내지 제11단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0359] (i) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_H ICOS); 및
- [0360] (iv) 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_L ICOS)
- [0361] 를 포함하는 ICOS에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0362] 13. 제1단 내지 제4단 및 제7단 내지 제12단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0363] 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_H ICOS) 및 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_L ICOS)를 포함하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0364] 14. 제1단 내지 제13단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0365] IgG Fc 도메인, 구체적으로는 IgG₁ Fc 도메인 또는 IgG₄ Fc 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0366] 15. 제1단 내지 제14단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0367] Fc 수용체에 대한 결합 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 Fc 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0368] 16. 제1단 내지 제4단 및 제7단 내지 제15단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0369] 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함하거나;
- [0370] 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 66의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 하나의 경쇄를 포함하는
- [0371] 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0372] 17. 제1단 내지 제4단 및 제7단 내지 제15단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0373] 종양-관련 표적에 대한 1가 결합 및 ICOS에 대한 2가 결합을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0374] 18. 제1단 내지 제4단 및 제7단 내지 제15단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0375] 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 2개의 경쇄를 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0376] 19. 제1단 내지 제18단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0377] T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체가 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체인, 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0378] 20. 제1단 내지 제19단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0379] T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체가 중쇄 가변부(V_H CD3) 및 경쇄 가변부(V_L CD3)를 포함하는 제1 항원 결합 도메인, 및 중쇄 가변부(V_H CEA) 및 경쇄 가변부(V_L CEA)를 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는, 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0380] 21. 제1단 내지 제20단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0381] T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체가 (i) 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3를 포함하는 중쇄 가변부(V_H CD3), 및 (iv) 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 39의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3를 포함하는 경쇄 가변부

(V_LCD3)를 포함하는, 작용성 ICOS-결합 분자.

- [0382] 22. 제1단 내지 제21단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0383] T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체가 서열번호 40의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HCD3) 및/또는 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LCD3)를 포함하는 제1 항원 결합 도메인을 포함하는, 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0384] 23. 제1단 내지 제22단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0385] T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체가
- [0386] (a) (i) 서열번호 42의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3를 포함하는 중쇄 가변부(V_HCD3), 및 (iv) 서열번호 45의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 46의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 47의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3를 포함하는 경쇄 가변부(V_LCD3)를 포함하거나;
- [0387] (b) (i) 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 51의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 52의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3를 포함하는 중쇄 가변부(V_HCD3), 및 (iv) 서열번호 53의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 54의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 55의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3를 포함하는 경쇄 가변부(V_LCD3)를 포함하는,
- [0388] 제2 항원 결합 도메인을 포함하는, 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0389] 24. 제1단 내지 제23단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0390] T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체가
- [0391] 서열번호 48의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HCEA) 및/또는 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하거나;
- [0392] 서열번호 56의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HCEA) 및/또는 서열번호 57의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LCEA)를 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는,
- [0393] 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0394] 25. 제1단 내지 제24단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0395] 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체가 CEA에 결합하는 제3 항원 결합 도메인을 포함하는, 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0396] 26. 제1단 내지 제25단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0397] T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체가 Fc 수용체에 대한 결합 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 도메인을 포함하는, 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0398] 27. 제1단 내지 제25단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0399] T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체가
- [0400] (a) 서열번호 58, 59, 60 및 61의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0401] (b) 서열번호 62, 63, 64 및 65의 아미노산을 포함하는,
- [0402] 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0403] 28. 제1단 내지 제27단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0404] 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체와의 조합 및 PD-L1/PD-1 상호작용 차단제와의 조합으로 사용되는 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0405] 29. 제28단에 있어서,

- [0406] PD-L1/PD-1 상호작용 차단제가 항-PD-L1 항체 또는 항-PD1 항체인, 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0407] 30. (A) 활성 성분으로서, 종양-관련 항원에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 제1 조성물; 및
- [0408] (B) 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 제2 조성물
- [0409] 을 포함하고,
- [0410] 질환, 특히 암의 치료에 조합으로 순차적 또는 동시에 사용하기 위한 약학 제품.
- [0411] 31. 종양-관련 항원에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자, 종양-관련 항원에 특이성인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이성 항체 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학 조성물.
- [0412] 32. 제31단에 있어서,
- [0413] 고형 종양의 치료에 사용하기 위한 약학 조성물.
- [0414] 33. 종양-관련 항원이 섬유아세포 활성화 단백질(FAP), 암배아 항원(CEA), 엽산 수용체 알파(FoIR1), 흑색종-관련 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸(MCSP), 표피 성장 인자 수용체(EGFR), 인간 표피 성장 수용체 2(HER2) 및 p95HER2로 이루어진 군으로부터 선택되는, 종양-관련 항원에 결합하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0415] 34. 제33단에 있어서,
- [0416] 종양-관련 항원이 FAP인, 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0417] 35. 제33단 또는 제34단에 있어서,
- [0418] (a) (i) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP), 및 (iv) 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하거나;
- [0419] (b) (i) 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP), 및 (iv) 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하는
- [0420] FAP에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0421] 36. 제33단 내지 제35단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0422] 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP) 및 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하거나;
- [0423] 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HFAP) 및 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LFAP)를 포함하는 FAP에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는
- [0424] 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0425] 37. 제33단 내지 제36단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0426] (i) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (iii) 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변부(V_HICOS); 및
- [0427] (iv) 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변부(V_LICOS)

- [0428] 를 포함하는 ICOS에 특이적으로 결합가능한 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0429] 38. 제33단 내지 제37단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0430] 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변부(V_HICOS) 및 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변부(V_LICOS)를 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0431] 39. 제33단 내지 제38단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0432] IgG Fc 도메인, 구체적으로는 IgG₁ Fc 도메인 또는 IgG₄ Fc 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0433] 40. 제33단 내지 제39단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0434] Fc 수용체에 대한 결합 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 도메인을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0435] 41. 제33단 내지 제40단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0436] 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0437] 42. 제33단 내지 제41단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0438] 종양-관련 표적에 대한 1가 결합 및 ICOS에 대한 2가 결합을 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.
- [0439] 43. 제33단 내지 제40단 및 제42단 중 어느 한 단에 있어서,
- [0440] 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 2개의 경쇄를 포함하는 작용성 ICOS-결합 분자.

[0441] **실시예**

[0442] 후술하는 것은 본 발명의 방법 및 조성물의 예이다. 상기 제시된 일반적인 설명으로 다양한 다른 양태들이 실시될 수 있음이 이해된다.

[0443] **제조합 DNA 기법**

[0444] 문헌[Sambrook et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989]에 기재된 표준적인 방법을 사용하여 DNA를 조작하였다. 분자 생물학적 시약을 제조사의 지침에 따라 사용하였다. 인간 면역글로불린 경쇄 및 중쇄의 뉴클레오티드 서열에 대한 일반적인 정보는 문헌[Kabat, E.A. et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Ed., NIH Publication No 91-3242]에 제시되어 있다.

[0445] **DNA 시퀀싱**

[0446] DNA 서열을 이중 가닥 시퀀싱

[0447] **유전자 합성**

[0448] 목적하는 유전자 단편을 적절한 주형을 사용한 PCR에 의해 생성하거나 진아트 아게(Geneart AG)(독일 레겐부르크)에 의해, 자동화 유전자 합성에 의한 합성 올리고뉴클레오티드 및 PCR 생성물로부터 합성하였다. 정확한 유전자 서열이 이용불가능한 경우, 올리고뉴클레오티드 프라이머를 가장 근접한 동족체로부터의 서열에 기반하여 설계하거나, 유전자를 적절한 조직으로부터 유래하는 RNA로부터 RT-PCR에 의해 단리하였다. 단일 제한 엔도뉴클라제 절단 부위에 의해 측방개입(flanking)된 유전자 단편을 표준 클로닝/시퀀싱 벡터에 도입하였다. 플라스미드 DNA를 형질전환된 박테리아로부터 정제하고 자외선(UV) 스펙트럼분석에 의해 측정하였다. 서프클로닝된 유전자 단편의 DNA 서열을 DNA 시퀀싱에 의해 검증하였다. 유전자 단편을 적합한 제한 부위에 의해 설계하여 각각의 발현 벡터로 서브클로닝되게 하였다. 진행 세포내 분비를 위한 단백질을 표적화하는 선도(leader) 펩티드에 대한 5'-말단 DNA 서열 코딩에 의해 모든 구축물을 설계하였다.

[0449] **세포 배양 기법**

[0450] 문헌[Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-

Schwartz, J. and Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc]에 기재된 표준적인 세포 배양 기법을 사용하였다.

[0451] 단백질 정제

[0452] 표준적인 프로토콜을 참조로 하여 단백질을 여과된 세포 상청액으로부터 정제하였다. 요약하면, 항체를 단백질 A 세파로스 컬럼(지이 헬스케어)에 적용하고 PBS에 의해 세척하였다. 항체의 용리를 pH 2.8에서 성취한 직후, 샘플을 중화시켰다. 응집된 단백질을 PBS 또는 20 mM 히스티딘, 150 mM NaCl pH 6.0 중 크기 배제 크로마토그래피(슈퍼덱스(Superdex) 200, 지이 헬스케어)에 의해 단량체 항체로부터 분리하였다. 단량체 항체 분획을 풀링(pooling)하고 예컨대 밀리포어 아미콘 울트라(MILLIPORE Amicon Ultra)(30 MWC0) 원심성 농축기를 사용하여(필요에 따라) 농축하고 냉동하고 -20°C 또는 -80°C에서 저장하였다. 샘플의 일부를 예컨대 SDS-PAGE, 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 또는 질량 스펙트럼분석에 의해 후속의 단백질 분석 및 분석적 특성규명에 사용하였다.

[0453] SDS-PAGE

[0454] 뉴파지(NuPAGE: 등록상표) 프리-캐스트(Pre-Cast) 겔 시스템(인비트로젠(Invitrogen))을 제조사의 지침에 따라 사용하였다. 특히 10% 또는 4 내지 12% 뉴파지(등록상표) 노박스(Novex: 등록상표) Bis-TRIS 프리-캐스트 겔(pH 6.4) 및 뉴파지(등록상표) MES(환원된 겔, 뉴파지(등록상표) 사용, 항산화 전개 완충 첨가제를 가짐) 또는 MOPS(비환원된 겔)를 사용하였다.

[0455] 분석적 크기 배제 크로마토그래피

[0456] 항체의 응집 및 올리고머 상태의 측정을 위해 크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 HPLC 크로마토그래피에 의해 수행하였다. 요약하면, 어질런트(Agilent) HPLC 1100 시스템에서 300 mM NaCl, 50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7.5 중 토소 TSKgel G3000SW 컬럼 또는 디오넥스(Dionex) HPLC-시스템에서 2 x PBS 중 슈퍼덱스 200 컬럼(지이 헬스케어)에 적용하였다. 용리된 단백질 자외선 흡광 및 피크 면적의 적분에 의해 정량분석하였다. 바이오라드 겔 여과 표준 151-1901(BioRad Gel Filtration Standard 151-1901)을 표준으로서 사용하였다.

[0457] 질량 스펙트럼분석

[0458] 본 부분은 VH/VL 교환(VH/VL CrossMab)에 의한 다중특이성 항체의 특성규명을 이의 정확한 조립에 강조점을 두어 설명한다. 예상되는 1차 구조를 탈클리코실화된 온전한 CrossMab 및 탈당화된/플라스민 절단된 또는 다르게 탈코실화된/제한된 LysC 절단된 CrossMab의 전자분사 이온화 질량 스펙트럼분석(ESI-MS)에 의해 분석하였다.

[0459] VH/VL CrossMab를 포스페이트 또는 Tris 완충액 중 N-글리코시다제 F에 의해 37°C에서 17시간 이하 동안 1 mg/mL의 단백질 농도로 탈당화하였다. 플라스민 또는 제한된 LysC(로슈) 절단을 Tris 완충액 pH 8 중 100 µg 탈당화된 VH/VL CrossMab에 의해 각각 실온에서 120시간 동안 및 37°C에서 40분 동안 수행하였다. 질량 스펙트럼 이전에, 샘플을 세파덱스(Sephadex) G25 컬럼(지이 헬스케어)에서 HPLC를 통해 탈염하였다. 총 질량을 트라이버사 나노메이트(TriVersa NanoMate) 공급원(아드비온(Advion))으로 장착된 maXis 4G UHR-QTOF MS 시스템(브루커 달토닉(Bruker Daltonik))에서 ESI-MS를 통해 측정하였다.

[0460] 표면 플라즈몬 공명(SPR)(비아코어)을 사용한 각각의 항원에 대한 다중특이성 항체의 결합 및 결합 친화도 측정

[0461] 각각의 항원에 대한 생성된 항체의 결합을 비아코어 기기(지이 헬스케어 바이오사이언스 아베(GE Healthcare Biosciences AB), 스웨덴 우프살라)를 사용하여 표면 플라즈몬 공명에 의해 조사하였다. 요약하면, 친화도 측정을 위해 염소-항-인간 IgG, 즉 JIR 109-005-098 항체를 각각의 항원에 대한 항체의 제시를 위해 아민 커플링을 통해 CM5 칩에 부동화시켰다. 결합은 25°C(또는 37°C)에서 HBS 완충액(HBS-P(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.005% 트윈(Tween) 20, pH 7.4) 중에서 측정하였다. 항원(알앤디 시스템즈(R&D Systems)의 것 또는 자체 정제한 것)을 용액에 다양한 농도로 첨가하였다. 80초 내지 3분 동안의 항원 주사에 의해 회합을 측정하고, 해리를 3 내지 10분 동안 HBS 완충액에 의해 상기 칩을 세척함으로써 측정하고, K_D 값을 1:1 랭뮤어 결합 모델을 사용하여 측정하였다. 음성 대조군 데이터(예컨대 완충 곡선)를 샘플 곡선으로부터 제하여 시스템 내재적 기준치 변동을 보정하고 노이즈(noise) 신호를 감소시켰다. 비아코어 평가 소프트웨어(Biacore Evaluation Software)를 사용하여 센서그램(sensorgram)을 분석하고 친화도 데이터를 계산하였다.

[0462] 실시예 1: ICOS에 대한 1가 또는 2가 결합 및 FAP에 대한 1가 결합을 갖는 이중특이성 항체의 생성

[0463] ICOS에 대한 1가 또는 2가 결합 및 FAP에 대한 1가 결합을 갖는 이중특이성 작용성 ICOS 항체를 도 1a 내지 1c에 도시된 바와 같이 제조하였다.

- [0464] A) FAP-ICOS_1+1, huIgG₁ P329G LALA, 1가 ICOS(JMAb136), 1가 FAP(4B9)(도 1a, 서열번호 28 내지 31)
- [0465] B) FAP-ICOS_1+1_HT, huIgG₁ P329G LALA, 1가 ICOS(JMAb136), 1가 FAP(4B9)(중쇄 C 영역의 C-말단 융합됨)(도 1b, 서열번호 29, 32 및 66)
- [0466] C) FAP-ICOS_2+1, huIgG₁ P329G LALA, 2가 ICOS(JMAb136), 1가 FAP(4B9)(도 1c, 서열번호 29, 32 및 33)
- [0467] 실시예 1A에서, FAP-ICOS_1+1 구축물의 HC1은 하기 성분으로 구성되었다: 항-ICOS(JMAb136)의 VHCH1과 이에 이어지는 Fc 홀. HC2는 항-FAP(4B9)의 VHCH1과 이에 이어지는 Fc 노프로 구성되었다.
- [0468] 실시예 1B에서, FAP-ICOS_1+1_HT 구축물의 HC1은 하기 성분으로 구성되었다: C-말단에서, 항-FAP 결합체(4B9)의 VH가 융합된 Fc 홀. HC2는 항-ICOS(JMAb136)의 VHCH1과 이에 이어지는, C-말단에서 항-FAP 결합체(4B9)의 VL이 융합된 Fc 노프.
- [0469] 실시예 1A에서, FAP-ICOS_2+1 구축물(실시예 1C)의 HC1은 하기 성분으로 구성되었다: 항-ICOS(JMAb136)의 VHCH1과 이에 이어지는, C-말단에서 항-FAP 결합체(4B9)의 VH가 융합된 Fc 홀. HC2는 항-ICOS(JMAb136)의 VHCH1과 이에 이어지는, C-말단에서 항-FAP 결합체(4B9)의 VL이 융합된 Fc 노프로 구성되었다.
- [0470] ICOS 결합체에 대해, 클론 JMAb136의 VH 및 VL 서열은 US 2008/0199466 A1에 기재된 것과 동일하였다.
- [0471] Fc 노프와 Fc 홀의 조합은 이중이량체가 생성되도록 한다. 국제 특허 출원 공개 WO 2012/130831A1에 기재된 방법에 따라, Pro329Gly, Leu234Ala 및 Leu235Ala 돌연변이는 노프 및 홀 중쇄의 불변부에 도입되어 Fc γ 수용체에 대한 결합을 제거한다.
- [0472] 이중특이성 작용성 ICOS 항체의 아미노산 서열은 표 1, 2 및 3에서 찾을 수 있다.
- [0473] 서열을 암호화하는 표적화된 이중특이성 작용성 ICOS 분자를 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터로부터의 삽입의 발현을 구동하고 CDS의 3' 말단에 위치하는 합성 폴리A 서열을 함유하는 플라스미드 벡터에 클로닝하였다. 또한, 상기 벡터는 플라스미드의 에피솜 유지보수를 위한 엡스타인-바 바이러스(EBV) oriP 서열을 함유하였다.
- [0474] 이중특이성 작용성 ICOS 항체를 폴리에틸렌이민(PEI)를 사용하여 포유동물 발현 벡터에 의해 HEK293-EBNA 세포를 동반-형질감염시킴으로써 제조하였다. 상기 세포를 상응하는 발현 벡터를 1:1:1:1 비(A: "VHCH1(JMAb136)-Fc 노프 쇄": "VLCL(JMAb136) 경쇄" : "VHCH1(4B9)-Fc 홀 쇄" : "VLCL(4B9) 경쇄") 또는 1:1:1 비(B: "VHCH1(JMAb136)-Fc 노프 쇄-VH(4B9)" : "Fc 홀 쇄-VL(4B9)" : "VLCL(JMAb136) 경쇄") 또는 1:1:2 비(C: "VHCH1(JMAb136)-Fc 노프 쇄-VH(4B9)": "VHCH1(JMAb136)-Fc 홀 쇄-VL(4B9)" : "VLCL(JMAb136) 경쇄")로 사용하여 형질감염시켰다
- [0475] 500 mL 진탕 플라스크에서의 제조를 위해, 4억개의 HEK293-EBNA 세포를 형질감염 24시간 전에 과종하였다. 형질감염을 위해, 세포를 5분 동안 210 x g로 원심분리하고, 상청액을 미리 가온된 CD CHO 배지로 대체하였다. 발현 벡터를 20 mL CD CHO 중 최종 양 200 μ g DNA로 혼합하였다. 540 μ L PEI의 첨가 후, 용액을 15초 동안 와류시키고 10분 동안 실온에서 항온배양하였다.
- [0476] 이어서, 세포를 DNA/PEI 용액과 혼합하고 500 mL 진탕 플라스크로 옮기고 5% CO₂ 대기로 항온배양기에서 3시간 동안 37°C로 항온배양하였다. 항온배양 후, 160 mL의 익스-셀(EX-CELL) 293(시그마(Sigma)) 배지를 첨가하고, 세포를 24시간 동안 배양하였다. 형질감염 1일 후, 1 mM 발프로산, 및 보충제를 갖는 7% 영양물(Feed)을 첨가하였다. 7일 동안 배양 후, 상청액을 15분 동안 210 x g으로 원심분리함으로써 채집하였다. 용액을 멸균 여과(0.22 μ m 필터)하고 0.01%(w/v)의 최종 농도로 나트륨 아자이드로 보충하고 4°C에서 유지하였다.
- [0477] 분비된 단백질을 단백질 A를 사용한 친화도 크로마토그래피에 이어서 크기 배제 크로마토그래피 의해 세포 배양 상청액으로부터 정제하였다. 친화도 크로마토그래피를 위해, 상청액을 40 mL 20 mM 나트륨 포스페이트, 20 mM 나트륨 시트레이트 pH 7.5로 평형도달된 단백질 A 맵셀렉트슈어(MabSelectSure) 컬럼(CV = 5 mL, 지이 헬스케어)에 로딩하였다. 미결합된 단백질을 10 컬럼 부피 이상의 20 mM 나트륨 포스페이트, 20 mM 나트륨 시트레이트-함유 완충액(pH 7.5)에 의해 세척하였다. 결합된 단백질을 15 컬럼 부피의 20 mM 나트륨 시트레이트, 100 mM NaCl, 100 mM 글리신, 0.01% 트윈 20 pH 3.0에 생성된 염화 나트륨의 선형 pH-구배(20 mM로부터 100 mM)를 사용하여 용리시켰다. 이어서, 컬럼을 10 컬럼 부피의 20 mM 나트륨 시트레이트, 100 mM NaCl, 100 mM 글리신, 0.01% 트윈 20 pH 3.0으로 세척하였다. 채집된 분획의 pH를 1/40(v/v)의 2M Tris, pH 8.0을 첨가함으로써 조정하였다. 단백질을 농축하고 여과한 후, 20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl, 0.01% 트윈 20 pH 6.0으로 평

형도달된 하이로드 슈퍼텍스(HiLoad Superdex) 50/600 S200 컬럼(지이 헬스케어)에 로딩하였다.

[0478] 정제된 이중특이성 구축물의 단백질 농도를 아미노산 서열을 기준으로 계산된 몰 흡광계수를 사용하여 280 nm의 OD에서 측정하였다. 이중특이성 구축물의 순도 및 분자량을 환원제(미국의 인비트로젠)의 존재 및 부재하에 랩 칩GXII(LabChipGXII)(칼리퍼(Caliper))를 사용하여 CE-SDS에 의해 분석하였다. 이중특이성 구축물의 응집 함량을 25 mM K₂HPO₄, 125 mM NaCl, 200 mM L-아르기닌 모노하이드로클로라이드, 0.02%(w/v) NaN₃, pH 6.7 전개 완충액으로 평형도달된 TSKgel G3000 SW XL 분석적 크기 배제 컬럼(토소(Tosoh))을 사용하여 25°C에서 분석하였다.

표 1

[0479] 1+1 FAP(4B9)-표적화된 항-ICOS(JMAb136) 인간 IgG₁ P329G LALA(도 1a)의 아미노산 서열

| 서열번호 | 설명 | 서열 |
|------|---------------------------|---|
| 28 | VHCH1(JMAb136)- Fc 눙 쇄 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTF FTGY MHWVRQAPGGLEWMGW INPHSGGTNYAQKFQGRV TMRDTSI STAYMEL SRLRSDDTAVYYCART YYDSSGYHDAFDI WGQGMVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLN NGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVY TLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TPPVLDSDG SFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKLSLSP |
| 29 | VLCL(JMAb136) 경쇄 | DIQMTQSPSSVSASVGD RVTI TCRASQGISRL LAWYQKPKGKAPKLLIYVASSLQSGVPSR FSGSGSG TDF TLTI SSLQPEDFATYYCQ QANSFPWTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDR KLKSGTASV VCLL NNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSS TLTL SKADYE KHKVYACEVTHQGL SSP VTKSFNRGEC |
| 30 | VHCH1(4B9)- Fc 홀 쇄 | EIVLTQSPG TL SLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQKPGQAPRLLIN VGSR RATGIPDRFSGSGS GTDFTLTI S RLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLN NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLVSKLTV DKS RWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKLSLSP |
| 31 | VLCL(4B9) 경쇄 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFS SYAMSWVRQAPGKLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAK GWFGGFNYWGQGT LVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASV VCLL NNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSS TLTL SKADYE KHKVYAC EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC |

표 2

[0480] 1+1 헤드-투-테일 FAP(4B9)-표적화된 항-ICOS(JMAb136) 인간 IgG₁ P329G LALA(도 1b)의 아미노산 서열

| 서열번호 | 설명 | 서열 |
|------|----------------------------------|---|
| 29 | VLCL(JMAb136) 경쇄 | DIQMTQSPSSVSASVGD RVTI TCRASQGISRL LAWYQKPKGKAPKLLIYVASSLQSGVPSR FSGSGSG TDF TLTI SSLQPEDFATYYCQ QANSFPWTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDR KLKSGTASV VCLL NNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSS TLTL SKADYE KHKVYACEVTHQGL SSP VTKSFNRGEC |
| 32 | VHCH1(JMAb136)-Fc 눙 쇄-VH(4B9) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTF FTGY MHWVRQAPGGLEWMGW INPHSGGTNYAQKFQGRV TMRDTSI STAYMEL SRLRSDDTAVYYCART YYDSSGYHDAFDI WGQGMVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLN NGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVY TLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TPPVLDSDG SFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEV QLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFS SYAMSWVRQAPGKLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTI SRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAK GWFGGFNYWGQGT LVTVSS |
| 66 | Fc 홀 쇄-VL(4B9) | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLN NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEIVLTQSPG TL SLSPGERATLSCRAS QSVTSSYLAWYQKPGQAPRLLIN VGSR RATGIPDRFSGSGSGTDF TLTI S RLEPEDFAVYYCQQGIM LPPTFGQGTKVEIK |

표 3

[0481]

| 2+1 FAP(4B9)-표적화된 항-ICOS(JMAb136) 인간 IgG ₁ P329G LALA(도 1c) 의 아미노산 서열 | | |
|---|---------------------------------|--|
| 서열번호 | 설명 | 서열 |
| 29 | VLCL(JMAb136) 경쇄 | DIQMTQSPSSVSASVGRVITTCRASQGISRLLEAWYQQKPKGKAPKLLIYVASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQANSEFPWTFGGGTKVEIKRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC |
| 32 | VHCH1(JMAb136)-Fc 높쇄-VH(4B9) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFGTGYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPHSGGTNYAQKFQGRV TMRDTSISTAYMELSRLESDDTAVYYCARTYYIDSSGYHDAFDIWGQGMVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHCTCPPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEV QLLESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKLEWWSAIIIGSGASTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRRAEDTAVYYCAKGFVGGFNYWGQGLTVTVSS |
| 33 | VHCH1(JMAb136)-Fc 홀쇄-VL(4B9) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFGTGYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPHSGGTNYAQKFQGRV TMRDTSISTAYMELSRLESDDTAVYYCARTYYIDSSGYHDAFDIWGQGMVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHCTCPPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEI VLTSQSPGTLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAPRLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGT DFTLTI S RLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK |

[0482]

실시예 2: ICOS에 대한 1가 또는 2가 결합 및 비표적화된 잔기를 갖는 이중특이성 항체(대조군 분자)의 생성

[0483]

ICOS에 대한 1가 또는 2가 결합 및 비표적화된 잔기를 갖는 하기 이중특이성 ICOS를 표적화된 형식과 유사하게 제조하고 도 1d 및 1e에 도시하였다.

[0484]

A) DP47-ICOS_1+1, huIgG₁ P329G LALA, 1가 ICOS(JMAb136), 1가 DP47(도 1d, 서열번호 28, 29, 67 및 68);

[0485]

B) DP47-ICOS_2+1, huIgG₁ P329G LALA, 2가 ICOS(JMAb136), 1가 DP47(도 1e, 서열번호 29, 69 및 70)

[0486]

본 실시예에서, DP47-ICOS_1+1 구축물의 HC1은 항-ICOS 항체 JMAb136의 VHCH1과 이에 어어지는 Fc 홀을 성분으로 하여 구성되었다. HC2는 비결합 항체 DP47의 VHCH1과 이에 이어지는 Fc 높으로 구성되었다.

[0487]

DP47-ICOS_2+1 구축물의 HC1는 항-ICOS(JMAb136)의 VHCH1과 이에 이어지는, C-말단에서 비결합 클론(DP47)의 VH가 융합된 Fc 홀을 성분으로 하여 구성되었다. HC는 항-ICOS(JMAb136)의 VHCH1과 이에 이어지는, C-말단에서 비결합 클론(DP47)의 VL이 융합된 Fc 높으로 구성되었다.

[0488]

비표적화된 이중특이성 작용성 ICOS 분자를 FAP(4B9)-표적화된 이중특이성 작용성 ICOS 항체에 대해 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조하였다.

표 4

[0489]

| 이중특이성 1+1 비표적화된 DP47 항-ICOS(JMAb136) 인간 IgG ₁ P329G LALA 의 아미노산 서열 | | |
|--|-------------------------|---|
| 서열번호 | 설명 | 서열 |
| 28 | VHCH1(JMAb136)-Fc 높쇄 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFGTGYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPHSGGTNYAQKFQGRV TMRDTSISTAYMELSRLESDDTAVYYCARTYYIDSSGYHDAFDIWGQGMVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHCTCPPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSP |

| | | |
|----|--------------------|---|
| 29 | VLCL (JMab136) 경쇄 | DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGI SRLLA WYQQKPGKAPKLLIYVASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTLSLQLPEDFATYYCQANSFPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 67 | VHCH1 (DP47)-Fc 홀쇄 | EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTLSRLEPEDFAYVYCCQYGSPLTFGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSP |
| 68 | VLCL (DP47) 경쇄 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSGGFDYWGQGLTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |

표 5

[0490]

이중특이성 2+1 비표적화된 DP47 항-ICOS (JMab136) 인간 IgG₁ P329G LALA (도 1e)의 아미노산 서열

| 서열번호 | 설명 | 서열 |
|------|---------------------------------|---|
| 29 | VLCL (JMab136) 경쇄 | DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGI SRLLA WYQQKPGKAPKLLIYVASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTLSLQLPEDFATYYCQANSFPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 69 | VHCH1 (JMab136)-Fc 홀쇄-VH (DP47) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFGTGYYMH WVRQAPGQGLEWMGW INPHSGGTNYAQKFOGRVTMTRDTSISTAYMEL SRLRSDDTAVYYCARTYYDSSGYHDAFDI WGGQTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGGGGSGGGSGGGSGGGGSEI VLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTLSRLEPEDFAYVYCCQYGSPLTFGGGTKVEIK |
| 70 | VHCH1 (JMab136)-Fc 홀쇄-VL (DP47) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFGTGYYMH WVRQAPGQGLEWMGW INPHSGGTNYAQKFOGRVTMTRDTSISTAYMEL SRLRSDDTAVYYCARTYYDSSGYHDAFDI WGGQTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSGGFDYWGQGLTVTVSS |

[0491]

실시예 1 및 2에 기재된 바와 같이 제조된 ICOS (JMab136)에 대한 1가 또는 2가 결합 및 FAP (4B9) 또는 DP47에 대한 1가 결합을 갖는 이중특이성 분자 생화학적 분석의 결과를 하기 표 6에 정리하였다.

표 6

[0492]

| 이중특이성 FAP-ICOS or DP47-ICOS 분자의 생화학적 분석 | | | |
|---|---------|-----------|------------------|
| 분자 | 단량체 [%] | 수율 [mg/L] | CE-SDS (비환원) [%] |
| 1A) FAP-ICOS_1+1 | 91.0 | 13.9 | 100.0 |
| 1B) FAP-ICOS_1+1_HT | 97.3 | 2.6 | 98.3 |
| 1C) FAP-ICOS_2+1 | 96.6 | 6.3 | 94.0 |
| 1D) DP47-ICOS_1+1 | 91.0 | 37.5 | 98.4 |
| 1E) DP47-ICOS_2+1 | 100.0 | 11.7 | 98.5 |

[0493]

실시예 3: FAP-표적화 또는 비표적화(대조군)된 2개 쥐과 ICOS 리간드 구축물의 생성

[0494]

FAP에 대한 1가 결합 또는 비표적화된 잔기를 갖는 하기 이중특이성 쥐과 ICOS 리간드 (ICOS-L) 구축물을 도 2a

및 2b에 도시한 바와 같이 제조하였다.

- [0495] 2A) FAP-표적화된 mICOS-L, mIgG₁ DAPG, 2가 쥐과 ICOS-L(Gly47 - Lys279) 1가 FAP(28H1)(중쇄의 C 영역의 C-말단 융합됨)(도 2a, 서열번호 18 및 19)
- [0496] 2B) 비표적화된 mICOS-L, mIgG₁ DAPG, 2가 쥐과 ICOS-L(Gly47 - Lys279), 1가 비표적화된 잔기(중쇄의 C 영역의 C-말단 융합됨)(도 2b, 서열번호 20 및 21)
- [0497] 본 실시예에서, FAP-표적화된 mICOS-L 구축물 HC1은 ICOS-L, 및 C-말단에서 항-FAP 결합체(28H1)가 융합된 쥐과 Fc DAPG KK로 구성되었다. HC2는 쥐과 ICOS-L과 이에 이어지는, C-말단에서 항-FAP 결합체(28H1)가 융합된 쥐과 Fc DAPG DD로 구성되었다.
- [0498] 유니프르트 Q9JHJ8 ICOS-L로부터 아미노산 서열을 획득하고, 이로부터 Gly47 내지 Ser279를 클로닝에 사용하였다. 쥐과 ICOS 리간드에 대한 아미노산 서열(Gly47 내지 Ser279)은 하기 표 7에서 찾을 수 있다.
- [0499] Fc-DD와 Fc-KK 쇄의 조합은 이중이량체가 생성되도록 한다. 국제 특허 출원 공개 WO 2012/13083 1A에 기재된 방법에 따라, DAPG 돌연변이를 높 및 홀 중쇄의 불변부에 도입하여 Fc γ 에 대한 결합을 제거하였다.
- [0500] 통상적인(PCR 기반이 아닌) 클로닝 기법을 사용하여 상응하는 cDNA를 에비트리아(evitria)의 벡터 시스템에 클로닝하였다. 에비트리아 벡터 플라스미드를 유전자 합성하였다. 음이온 교환 크로마토그래피를 기반으로, 플라스미드 DNA를 낮은 내독소 조건하에 제조하였다. DNA 농도를 260 nm의 파장에서의 흡광으로 측정하였다. 서열의 정확도를 생어 시퀀싱(cDNA의 크기에 따른 플라스미드당 2개 이하의 시퀀싱 반응에 의함)에 의해 검증하였다.
- [0501] 현탁액-적응된 CHO K1 세포(원래 ATCC로부터 입수하고 에비트리아에서 현탁액 배양에서 혈청-미함유 성장에 적응됨)를 제조에 사용하였다. 종자를 화학적으로 정의되고 동물성 성분을 미함유하고 혈청을 미함유하는 배지인 에비그로우(eviGrow) 배지에서 성장시켰다. 세포를 에비트리아의 맞춤형 제작된 전매 형질감염 시약인 에비펙트(eviFect)로 형질감염시키고, 형질감염 후, 세포를 동물성 성분을 미함유하고 혈청을 미함유하는 배지인 에비메이크2(eviMake2)에서 성장시켰다. 상청액을 원심분리 및 후속의 여과(0.2 μ m 필터)에 의해 수확하였다.
- [0502] 분비된 단백질을 단백질 A를 사용한 친화도 크로마토그래피에 이어서 크기 배제 크로마토그래피 의해 세포 배양 상청액으로부터 정제하였다. 친화도 크로마토그래피를 위해, 상청액을 40 mL 20 mM 나트륨 포스페이트, 20 mM 나트륨 시트레이트 pH 7.5로 평형도달된 단백질 A 맵셀렉트슈어 컬럼(CV = 5 mL, 지이 헬스케어)에 로딩하였다. 미결합된 단백질을 10 컬럼 부피 이상의 20 mM 나트륨 포스페이트, 20 mM 나트륨 시트레이트-함유 완충액(pH 7.5)에 의해 세척하였다. 결합된 단백질을 15 컬럼 부피의 20 mM 나트륨 시트레이트, 100 mM NaCl, 100 mM 글리신, 0.01% 트윈 20 pH 3.0에 생성된 염화 나트륨의 선형 pH-구배(20 mM로부터 100 mM)를 사용하여 용리시켰다. 이어서, 컬럼을 10 컬럼 부피의 20 mM 나트륨 시트레이트, 100 mM NaCl, 100 mM 글리신, 0.01% 트윈 20 pH 3.0으로 세척하였다. 채집된 분획의 pH를 1/40(v/v)의 2M Tris, pH 8.0을 첨가함으로써 조정하였다. 단백질을 농축하고 여과한 후, 20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl, 0.01% 트윈 20 pH 6.0으로 평형도달된 하이로드 슈퍼텍스 50/600 S200 컬럼(지이 헬스케어)에 로딩하였다.
- [0503] 정제된 이중특이성 구축물의 단백질 농도를 아미노산 서열을 기준으로 계산된 몰 흡광계수를 사용하여 280 nm의 OD에서 측정하였다. 이중특이성 구축물의 순도 및 분자량을 환원제(미국의 인비트로젠)의 존재 및 부재하에 랩칩GXII(칼리퍼)를 사용하여 CE-SDS에 의해 분석하였다. 이중특이성 구축물의 응집 함량을 25 mM K₂HPO₄, 125 mM NaCl, 200 mM L-아르기닌 모노하이드로클로라이드, 0.02%(w/v) NaN₃, pH 6.7 전개 완충액으로 평형도달된 TSKgel G3000 SW XL 분석적 크기 배제 컬럼(토소)을 사용하여 25°C에서 분석하였다.

표 7

| | | |
|--|----|----|
| FAP(28H1)-표적화된 mICOS-L, mIgG ₁ DAPG | | |
| 의 아미노산 서열 | | |
| 서열번호 | 설명 | 서열 |

| | | |
|----|--|--|
| 71 | 쥐과 ICOS-L 연결자 muIgG ₁ Fc(DAPG KK) 4GS 연결자 FAP(28H1) VH | ETEVGAMVGSNNVLS CIDPHRRHFNL SGLYVYWQ IENPEVSVTYL PYKSPG INVDSSYKNRGHL S LDSMKQGNFSL YLKNVTPQDTQEFTCRVFMNTATEL VK ILEEVRRLVAANFSTPVI STSDSSNPG QERTYTCMSKNGYPEPNLYW INTTDSL IDTALQNNVYLNKLGLYDVI STLRLPWT SRGDVLCV ENVALHQNITS ISQAESFTGNNTKPNQETHNNEKSGSPGSSSSSGSADGCKPCI CTVPVSSVFIF PPKPKDVLTI TLTPKVTCVVAI SKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTKPREEQINSTFRSVSELPIM HQDWLNGKEFKCRVNSAAFAGAP IEKTI SKTKGRPKAPQVYTI PPPKQMAKDKVSLTCMI TNFFPE DITVEWQWNGQPAENYKNTQPI MKTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEKSL SHSPGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMS WVRQAP GKGLEWVSAI WASGEQYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFYWG QGLTVTVSS |
| 72 | 쥐과 ICOS-L 연결자 muIgG ₁ Fc(DAPG DD) 4GS 연결자 FAP(28H1) VL | ETEVGAMVGSNNVLS CIDPHRRHFNL SGLYVYWQ IENPEVSVTYL PYKSPG INVDSSYKNRGHL S LDSMKQGNFSL YLKNVTPQDTQEFTCRVFMNTATEL VK ILEEVRRLVAANFSTPVI STSDSSNPG QERTYTCMSKNGYPEPNLYW INTTDSL IDTALQNNVYLNKLGLYDVI STLRLPWT SRGDVLCV ENVALHQNITS ISQAESFTGNNTKPNQETHNNEKSGSPGSSSSSGSAGSPGSSSSSGSADGCKPCI CTVPVSSVFIFPPKPKDVLTI TLTPKVTCVVAI SKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTKPREEQIN STFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFAGAP IEKTI SKTKGRPKAPQVYTI PPPKQMAKDKV SLTCMI TNFFPEDITVEWQWNGQPAENYDNTQPI MDTDGSYFVYSDLVQKSNWEAGNTFTCSVLH EGLHNNHTEKSLSHSPGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSV SRSYLAWYQQKPGQAPRLLI IGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQQVI PPTFGQGTKEIK |

표 8

[0505]

| DP47-비표적화된 mICOS-L, mIgG ₁ DAPG 의 아미노산 서열 | | |
|---|--|--|
| 서열번호 | 설명 | 서열 |
| 73 | 쥐과 ICOS-L 연결자 muIgG ₁ Fc(DAPG KK) 4GS 연결자 DP47 VH | ETEVGAMVGSNNVLS CIDPHRRHFNL SGLYVYWQ IENPEVSVTYL PYKSPG INVDSSYKNRGHL S LDSMKQGNFSL YLKNVTPQDTQEFTCRVFMNTATEL VK ILEEVRRLVAANFSTPVI STSDSSNPG QERTYTCMSKNGYPEPNLYW INTTDSL IDTALQNNVYLNKLGLYDVI STLRLPWT SRGDVLCV ENVALHQNITS ISQAESFTGNNTKPNQETHNNEKSGSPGSSSSSGSAGSPGSSSSSGSADGCKPCI CTVPVSSVFIFPPKPKDVLTI TLTPKVTCVVAI SKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTKPREEQIN STFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFAGAP IEKTI SKTKGRPKAPQVYTI PPPKQMAKDKV SLTCMI TNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPI MKTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLH EGLHNNHTEKSLSHSPGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSV SSSYLAWYQQKPGQAPRLLI YGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGS PLTFGQGTKEIK |
| 74 | 쥐과 ICOS-L 연결자 muIgG ₁ Fc(DAPG DD) 4GS 연결자 DP47 VL | ETEVGAMVGSNNVLS CIDPHRRHFNL SGLYVYWQ IENPEVSVTYL PYKSPG INVDSSYKNRGHL S LDSMKQGNFSL YLKNVTPQDTQEFTCRVFMNTATEL VK ILEEVRRLVAANFSTPVI STSDSSNPG QERTYTCMSKNGYPEPNLYW INTTDSL IDTALQNNVYLNKLGLYDVI STLRLPWT SRGDVLCV ENVALHQNITS ISQAESFTGNNTKPNQETHNNEKSGSPGSSSSSGSAGSPGSSSSSGSADGCKPCI CTVPVSSVFIFPPKPKDVLTI TLTPKVTCVVAI SKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTKPREEQIN STFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFAGAP IEKTI SKTKGRPKAPQVYTI PPPKQMAKDKV SLTCMI TNFFPEDITVEWQWNGQPAENYDNTQPI MDTDGSYFVYSDLVQKSNWEAGNTFTCSVLH EGLHNNHTEKSLSHSPGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSYAMS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGSTYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKGS GFYWGQGLTVTVSS |

[0506]

본 실시예에 기재된 바와 같이 제조된 mICOS-L을 포함하는 이중특이성 분자의 생화학적 분석의 결과를 하기 표 9에 정리하였다.

표 9

[0507]

| FAP-mICOS-L 또는 DP47-mICOS-L 분자의 생화학적 분석 | | | | |
|---|----------|--------|----------|--------------------------|
| 분자 | 역가[mg/L] | 회수율[%] | 수율[mg/L] | 분석적 SEC (HMW/단량체/LMW) |
| 2A | 28.01 | 48 | 2.69 | 2.9/97.1/0 |
| 2B | 22.30 | 82.96 | 3.72 | 4/96/0 |

[0508]

실시예 4: T-세포 이중특이성(TCB) 항체의 제조, 정제 및 특성규명

[0509]

4.1 인간 또는 인간화된 결합체를 갖는 TCB의 제조

- [0510] WO 2014/131712 A1 또는 WO 2016/079076 A1에 기재된 방법에 따라, TCB 분자를 제조하였다.
- [0511] 실험에 사용된 항-CEA/항-CD3 이중특이성 항체(CEA CD3 TCB 또는 CEA TCB)의 제조는 WO 2014/131712 A1의 실시예 3에 기재되어 있다. CEA CD3 TCB는 "2+1 IgG CrossFab" 항체이고 2개의 상이한 중쇄 및 2개의 상이한 경쇄로 구성된다. CH3 도메인의 점 돌연변이("놈-인투-홀")를 도입하여 2개의 상이한 중쇄의 조립을 촉진하였다. 2개의 상이한 경쇄의 정확한 조립을 촉진하기 위해, CD3 결합 Fab에서 VH 및 VL 도메인의 교환을 수행하였다. 2+1은 분자가 CEA에 특이성인 2개의 항원 결합 도메인 및 CD3에 특이성인 하나의 항원 결합 도메인을 가짐을 의미한다. CEACAM5 CD3 TCB는 동일한 형식을 갖지만 또다른 CEA 결합제를 포함하고, 경쇄의 정확한 짝지음을 지원하기 위한 CD3 결합제의 CH 및 CL 도메인에서의 점 돌연변이를 포함한다.
- [0512] CEA CD3 TCB는 서열번호 58, 59, 60 및 61의 아미노산 서열을 포함한다. CEACAM5 CD TCB는 서열번호 62, 63, 64 및 65의 아미노산 서열을 포함한다. 2+1 형식의 이중특이성 항체의 개략도는 도 1f에 도시되어 있다.
- [0513] 4.2 2+1 형식(쥐과 CEA에 대해 2가 및 쥐과 CD3에 대해 1가)의 항-CEA/항-CD3 T-세포 이중특이성 항체의 제조
- [0514] 항-CEA(CH1A1A 98/99 2F1)/항-CD3(2C11) T-세포 이중특이성 2+1 대응 분자를 하나의 CD3-Fab, 및 2개의 CEA-Fab 및 Fc 도메인으로 이루어지도록 제조하되, 2개의 CEA-Fab가 C-말단을 통해 상기 Fc 부분의 경첩부에 연결되고, CD3-Fab가 C-말단을 통해 하나의 CEA-Fab의 N-말단에 연결되게 하였다. CD3 결합 잔기는 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변부 또는 불변부가 교환된 교차 Fab 분자이다.
- [0515] 쥐과 대응 분자의 Fc 도메인은 muIgG₁ Fc 도메인이되, DDKK 돌연변이를 특히 문헌[Gunasekaran et al., J. Biol. Chem. 2010,19637-19646]에 기재된 바와 같이 도입하여 항체 Fc 이중이량체 형성을 강화하였다. 제1 중쇄의 Fc 부분은 돌연변이 Lys392Asp 및 Lys409Asp를 포함하고(Fc-DD로 지칭됨), 제2 중쇄의 Fc 부분은 돌연변이 Glu356Lys 및 Asp399Lys(Fc-KK로 지칭됨)를 포함한다. 번호부여는 카바트 EU 색인에 따른 것이다. 또한, 예컨대 문헌[Baudino et al. J. Immunol. (2008), 181, 6664-6669] 또는 WO 2016/030350 A1에 기재된 방법에 따라, DAPG 돌연변이를 중쇄의 불변부에 도입하여 마우스 Fc γ 수용체에 대한 결합을 제거하였다. 요약하면, Asp265Ala 및 Pro329Gly(번호부여는 카바트 EU 색인에 따른 것임, 즉 D265A 및 P329G) 돌연변이를 Fc-DD 및 Fc-KK 중쇄의 불변부에 도입하여 Fc γ 수용체에 대한 결합을 제거하였다

표 10

[0516]

| 쥐과 항-CEA/항-CD3 T-세포 이중특이성 항체의 아미노산 서열 | | |
|---------------------------------------|--|---|
| 서열 번호 | 설명 | 서열 |
| 75 | VHCH1(CH1A1A 98/99 2F1)- Fc(KK) DAPG 쇄 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGLEWGMWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPVPSSTWPSQTVTCNV AHPASSTKVDKKI VPRDCGCKPCI CTVPVEVSSVF IFPPKPKDVLITITLTPKVTGVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTTPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKRCRVNSAAFAPGPI EKTISKTKGRPKAPQVYTI PPPKQMAKDKVSLTCMINTFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPI M KTDGSYFVYSKLVNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSP |
| 76 | VLCL(CH1A1A 98/99 2F1) 경쇄 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASAAVGYTVAWYQQKPKGAPKLLIYSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFPYKDI NVKWKIDGSEKQNGVLSWTDQDSKDYMSSTLTITKDEYERHNSYTC EAT HKTSTSPIVKSFNREK |
| 77 | VHCL VHCH1(2C11-CH1A1A 98/99 2F1)- Fc(DD) DAPG 쇄 | EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCEASGFTFSGYGMHWVRQAPGRGLESVAYITSSSINIKYADAVKGRFTVSRDIAKLLFLQMNILKSEDTAMYYCARFDWVKYWGQGTMTVTVSSASDAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFPYKDI NVKWKIDGSEKQNGVLSWTDQDSKDYMSSTLTITKDEYERHNSYTC EATHKTSPIVKSFNREKCGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGLEWGMWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPVPSSTWPSQTVTCNV AHPASSTKVDKKI VPRDCGCKPCI CTVPVEVSSVF IFPPKPKDVLITITLTPKVTGVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTTPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKRCRVNSAAFAPGPI EKTISKTKGRPKAPQVYTI PPPKQMAKDKVSLTCMINTFFPEDITVEWQWNGQPAENYDNTQPI MDTDGSYFVYSKLVNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSP |
| 78 | VLCH1(2C11) 경쇄 | DIQMTQSPSSLPASLGDRTINCASQDINSYLNWYQQKPKGAPKLLIYYTNKLDGVPVSRFSGSGSGRDSSTFISLSESDIGSYCQYYNYPWTFGPGTKLEIKSSAKTTPPSVYPLAPGSAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPVPSSTWPSQTVTCNV AHPASSTKVDKKI VPRDC |

[0517] **실시예 5**

[0518] **5.1 PBMC 분리**

[0519] PBMC를 건강한 기증체의 신선한 혈액으로부터 분리하였다. 요약하면, 혈액을 PBS에 의해 2:1로 희석하였다. 약 30 mL의 혈액/PBS 혼합물을 15 mL의 히스토파크(Histopaque)에 층화(layering)시키고 중단 없이 30분 동안 450 g으로 원심분리하였다. 림프구를 10 mL 피펫에 의해 PBS를 함유하는 50 mL 관에 채집하였다. 상기 관을 PBS로 50 mL까지 채우고 10분 동안 350 g으로 원심분리하였다. 상청액을 버리고, 펠릿(pellet)을 50 mL PBS 중에 재현탁하고 10분 동안 300 g으로 원심분리하였다. 세척 단계를 1회 반복하였다. 세포를 10% FBS 및 1% 글루타맥스를 함유하는 RPMI 중에 재현탁시키고 분석 시작시까지 항온배양기에서 37° C, 5% CO₂로 저장하였다.

[0520] **5.2 비장세포 분리**

[0521] C57B1/6 마우스 또는 hCEA(HO)Tg 마우스의 비장을 젠틀MACS(GentleMACS) C-관(밀텐이(Miltenyi))에 넣고, MACS 완충액(PBS + 0.5% BSA + 2 mM EDTA)을 각각의 관에 첨가하였다. 비장을 젠틀MACS 해리기를 사용하여 해리시키고, 관을 잠시 원심분리시키고, 세포를 100 μm 나일론 세포 스트레이너(strainer)를 통해 통과시켰다. 이어서, 관을 3 mL RPMI1640 배지(시그마, Cat. No. R7388)로 행구고 8분 동안 350 x 3 g로 원심분리하였다. 상청액을 버리고, 세포 현탁액을 70 μm 나일론 세포 스트레이너를 통해 통과시키고 배지로 세척하였다. 또다른 원심분리(350 x 8 g, 8분) 후, 상청액을 버리고 5 mL ACK 용해 완충액을 첨가하였다. 실온에서 항온배양 5분 후, 세포를 RPMI 배지로 세척하였다.

[0522] 이어서, 세포를 재현탁하고, 세포 계수를 위해 펠릿을 분석 배지(RPMI1640, 2% FBS, 1% 글루타맥스(Glutamax))에 풀링하였다(바이-셀-세팅스(Vi-Cell-Settings) 백혈구, 1:10 희석).

[0523] **실시예 6: 건강한 인간 T-세포 아집단 또는 다양한 종양 적응종의 종양-침습성 림프구에서 ICOS 발현**

[0524] 건강한 PBMC 대 상이한 종양 적응종의 TIL에서 상이한 T-세포 집단에 발현된 ICOS의 상대적 강도를 비교하기 위해, ICOS 발현을 다중-색상 유동 세포분석을 사용하여 평가하였다. 또한, 일부 환자에 대해, PBMC를 종양 조직에 인접하는 정상 조직으로부터 분리하고, ICOS 발현을 마찬가지로 평가하였다(도 5a 내지 5d). 종양 샘플을 하기 적응종으로부터 유래하였다: 췌장암(PancCa), 림프절 전이(portio), 음경 선암종, 신장 세포 암종(RCC), 직장결장암(CRC), 흑색종, 중피종, 육종양 연조직 신생물종, 체순환(paracardiac) 종양절, 난소암의 결장 전이, 정상피종, 두경부암, 흉선종, 위장자 간질 종양(GIST), 샘낭 암종의 폐 전이, 신장암, 간 암종의 직장 전이, 소장암, 지방종 연조직 종양 및 폐암(LC).

[0525] **6.1 인간 종양 또는 인접 정상 조직 샘플의 절단**

[0526] 종양 또는 정상 조직으로부터의 ICOS 발현의 분석을 위해 샘플을 절단하고, 단일 세포 현탁액을 유동 세포분석에 의해 분석하였다.

[0527] 요약하면, 4.4 mL 조직 저장 용액(#130-100-008, 밀텐이 바이오테크(Miltenyi Biotech)), 5 mL 아큐타제(Accutase)(#A6964, 시그마), 333 μL 1% BSA(#A9576, 시그마) 및 260 μL 효소 혼합물(275 U/mL 콜라게나제 IV, #LS004189, 워팅턴(Worthington), 10 U/ml DNase I형 4, #10 U/ml DNase I형 4, 시그마 및 471 U/ml 히알루로니다제 #H6254, 시그마)을 사용하여 절단 혼합물을 제조하였다.

[0528] 종양 및 인접 정상 조직 조각을 실온에서 작은 조각으로 절단하고, 절단 혼합물에서 회전 장치를 사용하여 40분 동안 37°C로 항온배양하였다. 70 μm 세포 스트레이너(#352350, 코닝(Corning))를 사용하여 세포를 추가로 분리하였다. 세포 염색기를 10 mL 냉 PBS(#352350, 기브코)로 세척하고, 세포 현탁액을 250 x g으로 10분동안 4°C에서 원심분리하였다. 냉 PBS로 추가의 세척 단계 후, 전술된 바와 같은 원심분리 후, 실온에서 15분 동안 1x 팜라이즈(PharmLyse) 완충액(#555899, 비디 바이오사이언시스(BD Biosciences)) 중 세포 펠릿을 항온배양함으로써 적혈구를 용해시켰다. 냉 PBS를 첨가하여 용해를 정지하고 10분 동안 4°C에서 250 x g으로 원심분리하였다. 세포를 냉 PBS로 2회 세척하고 생존 세포의 수를 트라이판 블루(trypan blue) 염색을 사용하여 측정하였다.

[0529] **6.2 인간 종양 또는 인접 정상 조직 샘플의 절단**

[0530] TIL, 또는 암 환자의 정상 조직으로부터 분리된 T-세포에서 건강한 기증체로부터의 인간 T-세포의 ICOS의 발현

수준을 하기와 같이 측정하였다. 5만 내지 30만 개의 세포를 PBS를 사용하여 1회 세척하고 5분 동안 350 x g으로 원심분리하였다. 생존 및 사멸 세포의 구별을 위해, PBMC를 좀비(Zombie) UV(#423108, 바이오레전드)로 20분 동안 실온에서 항온배양하였다. 세포를 PBS 및 FACS 완충액(PBS, 2% FCS, 5 mM EDTA 및 0.25% 나트륨 아자이드를 함유함)로 세척하고 CD4(#317438, 바이오레전드), CD8(#301044, 바이오레전드) 및 ICOS(#313520, 바이오레전드)에 대해 실온에서 20분 동안 염색하였다. FACS 완충액으로 2회 세척 후, 실온에서 15분 동안 2% PFA-함유 PBS 중 세포의 항온배양에 의해 염색을 고정하였다. 세포를 FACS 완충액으로 1회 세척하고 유동 세포분석(FACS 포르테사(FACS Fortessa) 계기, 디바(Diva) 소프트웨어가 장착됨)에 의해 분석하였다.

[0531] 실시예 7: 중앙 환자의 말초 T-세포 및 TIL에서 ICOS의 CEACAM5-TCB-매개된 상향조절(FACS)

[0532] 생체 외에서 인간 T-세포의 TCB-매개된 활성화시 인간 ICOS의 강화된 발현을 유동 세포분석에 의해 평가하였다(도 3e 내지 3h). 요약하면, 결장 전이를 갖는 난소암 환자로부터 단리된 0.2 Mio PBMC 또는 TIL을 10% FCS, 1% 글루타맥스, 1 mM 나트륨 피루베이트, 1 x NEAA + Pen/Strep 중 재현탁하고, 평저 96 웰 플레이트를 사용하여 0.04 Mio CEA-발현 로보 중앙 세포(#CCL-229, ATCC) 및 10 nM CEACAM5-TCB에 의해 항온배양하였다.

[0533] 또다른 예에서(도 4a 및 4b), 건강한 기증체의 25만개의 PBMC를 0.025 Mio CEA-양성 MKN45 및 다양한 농도의 CEACAM5-TCB(0.1 pM 내지 20 nM)에 의해 48시간 동안 평저 96 웰 플레이트에서 항온배양하였다. 37° C, 5% CO₂에서 48시간의 항온배양 후, 후술되는 바와 같이 표면 마커 CD4, CD8 및 ICOS의 염색 후, ICOS의 상향조절을 평가하였다.

[0534] PBMC를 분석 플레이트로부터 수확하고 새로운 환저 96 웰 플레이트로 옮긴 후, 4°C에서 염색하였다. 세포를 FACS 완충액으로 1회 세척한 후, 30분 동안 4°C에서 제조사의 지침에 따라 항-인간 CD4(#300506, 바이오레전드), 항-인간 CD8(#344722, 바이오레전드), 항-인간 CD25(#356120, 바이오레전드), 항-인간 CD69(#310930, 바이오레전드) 및 항-인간 ICOS(#310931 바이오레전드)를 사용하여 염색하였다.

[0535] 실시예 8: 쥐과 비장세포에서 쥐과 CEA-TCB-매개된 상향조절(FACS)

[0536] 생체 외에서 쥐과 T-세포의 TCB-매개된 활성화시 강화된 쥐과 ICOS를 유동 세포분석에 의해 평가하였다(도 5a 내지 5b). 이를 위해, 종래의 중앙 세포 용해 실험을 실시예 14에 기재된 바와 같이 수행하였다. 48시간 후, 비장세포를 수확하고 후속 염색을 위해 새로운 환저 96 웰 플레이트로 옮겼다.

[0537] 세포를 PBS로 1회 세척하고 PBS 중 1:1000으로 희석된 UV 좀비 염료(#423108 바이오레전드)로 4°C에서 30분 동안 염색하였다. 세포를 FACS 완충액으로 2회 세척하고, 표면 염색을 항-마우스 TCR(#109228 바이오레전드), 항-마우스 ICOS(#135220 바이오레전드), 항-마우스 CD4(#100422 바이오레전드) 및 항-마우스 CD8(#100747 바이오레전드)을 제조사의 지침에 따라 사용하여 4°C에서 30분 동안 염색하였다. 세포를 FACS 완충액으로 2회 세척하고, 광으로부터 보호되는 실온에서 30 내지 45분 동안 펄/픽스 완충액(Perm/Fix Buffer)(#421403 바이오레전드)을 첨가하여 내세포 염색을 시작하였다. 세포를 펄 완충액(#421402 바이오레전드)로 3회 세척하고, 항-쥐과 폭스P3(FoxP3)(#320014 바이오레전드)을 함유하는 펄 완충액에서 염색하였다. 세포를 FACS 완충액으로 2회 세척하고 2% PFA를 함유하는 FACS 완충액에서 실온으로 15분 동안 고정하였다. FACS 완충액으로 1회 세척한 후, 세포를 FACS 완충액 중 재현탁하고 BD FACS 포르테사 장치를 사용하여 분석하였다.

[0538] 실시예 9: FAP- 및 ICOS-발현 세포에 대한 FAP-표적화된 ICOS 및 쥐과 ICOS-L, 및 비표적화된 참조 분자의 결합

[0539] 실시예 1 및 2에서 제조된 몇몇 FAP-ICOS 분자의 결합을 인간 섬유아세포 활성화 단백질(huFAP)을 발현하는 NIH/3T3-huFAP 클론 19를 사용하여 시험하였다. 상기 세포주는 마우스 배아 섬유아세포 NIH/3T3 세포주(ATCC CRL-1658)를 발현 벡터 pETR4921로 형질감염시켜 1.5 µg/mL 푸로마이신(Puromycin) 선택하에 huFAP를 발현시킴으로써 생성하였다. 인간 ICOS에 대한 결합을 활성화된 인간 T-세포에 의해 시험하였다.

[0540] 또한, 3T3-mFAP 세포(모세포계 ATCC #CCL-92, 쥐과 FAP를 안정하게 과발현하도록 변형됨)를 사용하여 실시예 3에서 제조된 mICOS-L 표적화 이중특이성 분자를 이의 쥐과 FAP(mFAP)에 대한 결합에 대해 시험하고, 쥐과 ICOS 발현 세포에 대한 결합은 CHO mICOS(모세포계 CHO-k1 ATCC #CCL-61, 쥐과 ICOS를 안정하게 과발현하도록 변형됨)를 사용하여 시험하였다. 요약하면, 세포를 수확하고 계수하고 생존성을 확인하고 FACS 완충액(0.1% BSA를 갖는 PBS) 중 mL당 백만개의 세포로 재현탁하였다. 100 µL의 세포 현탁액(10만개의 세포를 함유함)을 환저 96 웰 플레이트에서 4°C로 30분 동안 증가하는 농도의 FAP-표적화된 ICOS 또는 mICOS-L 구축물(T-세포/3T3-huFAP 세포에 대한 FAP-ICOS 구축물의 결합을 위해 7 pM 내지 120 nM, 및 mICOS-L 구축물의 결합을 위해 4 pM 내지 300 nM)에 의해 항온배양하고, 세포를 차가운 PBS 0.1% BSA로 2회 세척하고 PE-접합된 당나귀 항-인간 H+L

PE(잭슨 이뮤노 리서치 랩(Jackson Immuno Research Lab) #709-116-149)에 의해 4℃로 추가로 30분 동안 재향온배양하고, 차가운 PBS 0.1% BSA로 2회 세척하였다. 웰당 FAC 완충액 중 75 μL의 1% PFA를 사용하여, 염색을 암실에서 4℃로 20분 동안 고정하였다. FACS 포트테사(소프트웨어 FACS 디바)를 사용하여 FACS에 의해 형광을 분석하였다. 결합 곡선을 그래프패드프리즈6(GraphPadPrism6)을 사용하여 수득하고 도 6a 내지 6c, 7a 및 7b에 나타냈다.

[0541] 인간 ICOS- 및 인간 FAP-발현 세포에 대한 상이한 FAP- 또는 DP47-ICOS 분자의 결합에 의해 측정된 EC₅₀ 값을 하기 표 11에 나타내고, 쥐과 ICOS-발현 CHO 형질감염체에 및 쥐과 FAP-발현 3T3 세포에 대한 FAP-mICOS-L의 결합에 대해 측정된 EC₅₀ 값은 하기 표 12에 나타냈다.

표 11

[0542]

| 인간 ICOS- 및 인간 FAP-발현 세포에 대한 상이한 FAP- 또는 DP47-ICOS 분자의 결합의 EC ₅₀ 값 | | | |
|--|---|---|------------------------------|
| 분자 | CD4 ⁺ T-세포에서 인간 ICOS EC ₅₀ (nM) | CD8 ⁺ T-세포에서 인간 ICOS EC ₅₀ (nM) | 인간 FAP EC ₅₀ (nM) |
| FAP-ICOS_1+1 | 34.86 | 50.72 | 2.98 |
| FAP-ICOS_1+1_HT | 42.62 | 56.43 | 6.73 |
| FAP-ICOS_2+1 | 10.74 | 14.38 | 5.19 |
| DP47-ICOS_1+1 | 19.85 | 25.7 | 결합 없음 |
| DP47-ICOS_2+1 | 9.99 | 12.36 | 결합 없음 |

표 12

[0543]

| 인간 ICOS- 및 인간 FAP-발현 세포에 대한 상이한 FAP- 또는 DP47-ICOS 분자의 결합의 EC ₅₀ 값 | | |
|--|---------|-----------------------|
| 분자 | 표적 | EC ₅₀ (nM) |
| FAP-mICOS-L | 쥐과 ICOS | 28.05 |
| DP47-mICOS-L | 쥐과 ICOS | 23.57 |
| FAP-mICOS-L | 쥐과 FAP | 71.8 |

[0544] **실시예 10: FAP-표적화된 ICOS 및 mICOS-L 분자의 생체 외 기능적 특성규명**

[0545] 몇몇 세포를 기반으로 한 생체 외 분석을 수행하여 FAP-표적화된 ICOS 또는 m-ICOS-L 분자 대 이의 상응하는 비표적화된(DP47) 참조 분자의 활성을 평가하였다.

[0546] 1. Jurkat 분석(CD3/TCR 및 ICOS의 진입기전시 유도되는 루시퍼라제의 NAFT-조절된 발현을 갖는 리포터 세포주), 여기서 ICOS IgG 분자(환자 대 용액 중 및 코팅된 CD3 IgG 자극의 존재 대 부재)를 측정하였다.

[0547] 2. 1차 인간 PBMC 동반-배양 분석, 여기서 T-세포에서 인간 ICOS 및 인간 FAP에 대한 동시적 결합에 의해 가교결합되고, T-세포에서 CD3 및 종양 세포에서 인간 CEA에 대한 동시적 결합에 의해 가교결합되는 TCB 분자의 존재하에, 3T3-huFAP 세포(모세포주 ATCC #CCL-9, 인간 FAP를 안정하게 과발현하도록 변형됨)에서 발현되는 FAP-표적화된 ICOS 분자를 시험하였다. FAP-표적화된 가교결합된 ICOS 분자 대 비표적화된 DP47-ICOS 분자를 용액 중, TCB 분자 및 CEA-양성 종양 세포의 부재 대 존재하에 측정하였다. 유동 세포분석에 의해 측정된 T-세포 활성화, T-세포 분화 또는 T-세포 증식을 판독 출력물로서 수득하였다.

[0548] 3. 1차 쥐과 비장세포 동반-배양 분석, 여기서 T-세포에서 쥐과 ICOS 및 쥐과 FAP에 대한 동시적 결합에 의해 가교결합되고, 쥐과 T-세포에서 mCD3 및 MC38-huCEA 종양 세포에 대한 동시적 결합에 의해 가교연결되는 TCB의 존재하에, 3T3-mFAP 세포에 발현되는 FAP-표적화된 mICOS-L에 분자를 측정하였다.

[0549] **실시예 11: Jurkat 리포터 세포주 분석**

[0550] NFAT 핵 전좌에 반응하여 루시퍼라제를 발현하는 변형된 Jurkat 세포주를 사용하여 동시적 TCR 진입기전에 대한 의존성을 평가하였다.

- [0551] 글로리스폰스(GloResponse) Jurkat-NFAT-RE-luc2P(프로메가, #CS176501) 리포터 세포주를 Jurkat-NFAT 배양 배지(10% FCS, 1% GluMax, 25 mM HEPES, 1x NEAA, 1% So-피루베이트를 함유하는 RPMI1640 배지, 선택: 200 μ g/mL 하이그로마이신 B) 중 1.5 μ g CD3(바이오레전드, #317304) 및 2 μ g/mL CD28(바이오레전드, #302914) 사용으로 예비활성화하여 ICOS 발현을 유도하였다.
- [0552] 세포를 분석 전 밤새 절식시켰다(자극 없는 Jurkat-NFAT 배양 배지). 분석 플레이트(그레이너(Greiner), 96 웰, 백색 벽, 투명 바닥, #655098)를 0.5 μ L CD3(바이오레전드, #317304) + 지시된 농도(3반복(triplicate)에서 4 내지 65000 pM)만의 FAP-ICOS / DP47-ICOS 분자 또는 FAP-ICOS / DP47-ICOS 분자로 (4°C에서 밤새) 동시 코팅하였다. 다음날, 플레이트를 DPBS(기브코, #14190136)로 1회 세척하고 0.1 MiO 자극하고, 절식시킨 Jurkat-NFAT-RE-luc2P를 첨가하였다. NFAT-매개된 신호전달을 37° C, 5% CO₂에서 5시간 항온배양 후 프로메가 원글로(OneGlo) 분석 시스템(프로메가, # E6120)을 제조사의 지침에 따라 사용하여 발광 관독에 의해 평가하였다. 플레이트를 테칸 스파크10M 플레이트 관독기(Tecan Spark10M Plate Reader)(발광 관독, 1000 ms 적분 시간, 자동 감쇠 설정)에서 관독하였다.
- [0553] **실시예 12: 1차 인간 PBMS 동반-배양 분석**
- [0554] CEACAM5-TCB 및 FAP-ICOS를 조합함으로써 매개된 강화된 T-세포 활성화, T-세포 증식 또는 T-세포분화를 CEA-발현 MKN45(DSMZ #ACC 409) 및 huFAP-발현 섬유아세포(NIH/3T3-huFAP 클론 19)에서 평가하였다.
- [0555] 인간 PBMS를 효과기 세포로서 사용하였다. T-세포 활성화를 FAP-ICOS 및 CEACAM5-TCB에 의한 항온배양 48시간 후, T-세포 증식 및 분화를 96시간 후 검출하였다. 요약하면, 실험 1일전, 부착되어 있는 표적 세포 및 섬유아세포를 트립신/EDTA에 의해 수확하고 세척하고 평저 96 웰 플레이트를 사용하여 10000 세포/웰의 밀도로 플레이팅하였다. 세포가 부착되도록 밤새 방치하였다. 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 연막(Buffy Coat)("브러츠펜데 취리히(Blutspende Zurich))으로부터 수득된 헤파린 처리된 혈액의 고농도 림프구 제제의 히스토파크(시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), Cat No. 10771-500ML Histopaque-1077) 밀도 원심분리에 의해 제조하였다. 혈액을 멸균 DPBS로 1:2 희석하고 히스토파크 구매(시그마, #H8889)에 걸쳐 층화시켰다. 원심분리(450 x g, 30분, 실온) 후, PBMC-함유 중간층 상의 혈장을 버리고, 50 mL의 PBS로 후속으로 채워진 새로운 팔콘(falcon) 관으로 옮겼다. 혼합물을 원심분리(400 x g, 10분, 실온)하고, 상정액을 버리고, PBMC 펠릿을 멸균 PBS로 2회 세척하였다(원심분리 단계 350 x g, 10분). 생성된 PBMC 집단을 자동 계수(세덱스 하이레스(Cedex HiRes))하고 습윤화된 항온배양기에서 37°C에서 10% FCS 및 1% 글루타맥스(기브코 35050061)를 함유하는 RPMI1640에 분석 시작시 까지 저장하였다. T-세포 활성화(도 9a 내지 9h)를 측정하기 위해, FAP-ICOS 분자를 지시된 농도(3반복에서 0.11 내지 5000 pM)로 첨가하고, CEACAM5-TCB를 고정된 농도(80 pM)으로 첨가하였다. 대조군으로서, TCB 분자만을 함유하거나 FAP-ICOS 분자만을 함유하는 웰을 포함시켰다. T-세포 증식 및 분화(도 10a 내지 10b)를 위해, CEACAM5-TCB를 증가하는 농도(3반복에서 1.28 내지 200000 pM)로 첨가하고 FAP-ICOS 분자를 고정된 농도(1000 pM)로 첨가하였다.
- [0556] PBMC를 표적 세포 및 섬유아세포에 첨가하여 5:1:1의 최종 E:T 비를 수득하였다. T-세포 활성화를 37° C, 5% CO₂에서 항온배양 48시간 후 T 세포 활성화 마커 CD69(조기 활성화 마커) 및 CD25(후기 활성화 마커)를 인식하는 항체를 사용하여 유동 세포분석에 의해 평가하였다. T-세포 증식은 37° C, 5% CO₂에서 항온배양 96시간 후 계수 비드(Counting Bead)로 정규화된 CD4⁺ 및 CD8⁺의 절대 계수를 사용하여 유동 세포분석에 의해 평가하였다. T-세포 분화는 37° C, 5% CO₂에서 항온배양 96시간 후 기억 부분집합을 구별하기 위해 CD45R0 및 CCR7에 대항하는 항체를 사용하여 유동 세포분석에 의해 평가하였다.
- [0557] 요약하면, PBMC를 400 x g으로 4분 동안 원심부리하고 0.1% BSA를 함유하는 PBS(FACS 완충액)로 2회 세척하였다. CD8(PerCP/Cy5.5 항-인간 CD8a, 바이오레전드 #301032), CD4(APC/Cy7 항-인간 CD4, 바이오레전드 # 300518), CD69(BV421 항-인간 CD69, 바이오레전드 #310930), CD25(PE 항-인간 CD25, 바이오레전드 #356104), CD45R0(APC 항-인간 CD45R0, 바이오레전드 # 304210) 및 CCR7(FITC 항-인간 CCR7, 바이오레전드 # 353216)에 대한 표면 염색을 공급사의 지침에 따라 수행하였다. 절대 T-세포 계수를 계수 비드(정밀 계수 비드, 바이오레전드, #424902)를 제조사의 지침에 따라 사용하여 수득하였다. 이어서, 세포를 0.1% BSA를 함유하는 150 μ L/웰 PBS로 2회 세척하고 1% PFA를 함유하는 75 μ L/웰 FACS 완충액을 사용하여 4°C에서 15 내지 30분 동안 고정하였다. 원심분리 후, 샘플을 150 μ L/웰 FACS. 완충액에 재현탁하고 BD FACS 포르테사를 사용하여 분석하였다.

[0558] 실시예 13: 1차 쥐과 비장세포 동반-배양 분석

[0559] mICOS-L 분자의 존재 또는 부재하에 쥐과 비장세포 효과기 세포 및 인간 CEA-발현 MC38-huCEA 표적 세포(문헌 [Cancer Res 1975, 35:2434-2440]에 기재된 모세포주, 인간 CEA를 안정하게 자체 과발현하도록 변형된 3T3)의 동반-항온배양시 mCEA-TCB에 의해 유도되는 T-세포 활성화를 하기와 같이 평가하였다(도 11a 및 11b).

[0560] huCEA(HO) 형질전환 C57/BL6 마우스 또는 C57/BL6 야생형 마우스(6.5)로부터 단리된 125만개의 비장세포를 평저 96 웰 플레이트의 웰당 25000개의 미리 플레이팅된 MC38-huCEA 종양 세포에 첨가하였다. 고정된 농도의 1.5 nM mCEA-TCB 및 50 nM FAP-표적화 또는 비표적화된 DP47-mICOS-L 분자를 첨가하고, 분석 플레이트를 습윤화된 항온 배양기에서 37°C 및 5% CO₂에서 T-세포 배지(RPMI1640이고, 10% FCS, 1x 글루타맥스(기브코, #35050061), 50 mM x β-머캅토에탄올(시그마, #M3148-100), 200 U/mL IL2(프로류킨(Proleukin), 노바티스(Novartis)), 1 x 항생물 - 항진균제(기브코 #15240062), 1 mM 나트륨 피루베이트(기브코 #11360070)) 중 48시간 동안 항온배양하였다.

[0561] 실시예 14: CEACAM5-TCB와 조합된 FAP-표적화된 ICOS 분자의 생체 내 기능적 특성규명

[0562] 1.4 NSG 마우스에서 단일 주사 후 FAP-ICOS(1+1)의 약동학적 프로파일

[0563] 단일 투약량의 2.5 mg/kg의 FAP-ICOS(1+1)를 NSG 마우스에 주사하였다. 모든 마우스에 200 μL의 적절한 용액에 의해 정맥내 주사하였다. 200 μL당 적절한량의 화합물을 수득하기 위해, 원료 용액(표 12, FAP-ICOS)을 히스티딘 완충액으로 희석하였다. 10분, 1시간, 3시간, 6시간, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 6 일, 8 일, 10 일 및 12 일에 시점당 3개의 마우스에서 채혈하였다. 주사된 화합물을 ELISA에 의해 혈청 샘플 중 분석하였다. 각 단계 후 플레이트를 3회 세척하여 미결합된 물질을 제거하였다. 최종적으로, 퍼옥시다제-결합된 복합체를 ABTS 기질 용액을 첨가하여 착색된 반응 생성물을 형성함으로써 가시화하였다. 405 nm(참조파장 490 nm)에서 측광적으로 측정된 반응 생성물 강도는 혈청 샘플의 분석물 농도에 비례하였다. 결과(도 12)는 안정한 PK-거동 (T_{1/2}: 9.52일)을 나타냈고, 후속의 효능 연구에 대해 주1회 스케줄이 제안되었다.

표 13

[0564]

| 시험된 조성물 설명 | | |
|---------------|-------------------------------------|-------------------|
| 화합물 | 제형 완충액 | 농도 (mg/mL) |
| FAP-ICOS(1+1) | 20mM 히스티딘, 140mM NaCl, pH 6.0 | 2.74 (= 원료 용액) |

[0565] 14.2 완전 인간화된 NOG 마우스에서 3T3-huFAP와 동반이식된(cografted) MKN45에서 CEACAM5-TCB와 조합된 FAP-ICOS(1+1)의 생체 내 효능

[0566] FAP-ICOS와 CEACAM5-TCB의 조합에 대한 개념 연구의 제1 증명은 완전 인간화된 NSG 마우스에서 종양 퇴행 및 이뮤노-PD(Immuno-PD)의 관점에서의 효능을 이해하는 것을 목적으로 하였다.

[0567] 인간 MKN45 세포(인간 위 암종)를 원래 ATCC로부터 수득하고 증식 후 글리카르트 글리카르트(Glycart) 내부 세포 은행에 저장하였다. 37°C, 5% CO₂의 수분-포화된 대기에서 10% FCS를 함유하는 DMEM에서 세포를 배양하였다. 생체 외 경로 12를 97%의 생존률로 피하 주사에 사용하였다. 인간 섬유아세포 NIH-3T3을 원래 ATCC(ATCC, #CCL-92)로부터 수득하고 로슈 뉴트리(Roche Nutley)에서 인간 FAP를 발현하도록 조작하고 10% 소혈청, 1x 나트륨 피루베이트 및 1.5 μg/mL 퓨로마이신을 함유하는 DMEM에서 배양하였다. 클론 39를 생체 외 경로 18번에서 98.2%의 생존률로 사용하였다.

[0568] 50 μL의 매트릭셀(Matrigel)과 혼합된 50 μL의 세포 현탁액(1x10⁶ MKN45 세포 + 1x10⁶ 3T3-huFAP)을 22 내지 30 G의 바늘에 의해 마취된 마우스의 옆구리에 피하 주사하였다.

[0569] 실험 시작시 4 내지 5주령의 암컷 NSG 마우스(잭슨 래버러토리)를 제공된 가이드라인(GV-솔라스(GV-Solas); 펠라사(Felasa); 티에르슈지(TierschG))에 따라 12시간의 명/12시간의 암의 일일 주기로 특이적 병원균 부재 조건하에 유지시켰다. 지역 정부부처에 실험 연구 프로토콜을 검토 및 승인받았다(P 2011/128). 도착 후, 새로운

환경에 적응하도록 하고 관찰을 위해, 동물을 1주 동안 유지시켰다. 연속적인 건강 감시를 규칙적으로 수행하였다.

[0570] 암컷 NSG 마우스에 15 mg/kg의 부설판을 복강내 주사하고 1일 후 제대혈로부터 단리된 1×10^5 의 인간 조혈모세포를 정맥내 주사하였다. 줄기 세포 주사 후 14 내지 16주에, 마우스의 혈액을 설하 채혈하고 성공적인 인간화에 대해 유동 세포분석에 의해 분석하였다. 유효하게 생착된 마우스를 이의 인간 T-세포 빈도에 따라 3개의 처리군으로 무작위화하였다. 이때, 도 13에 도시된 바와 같이 마우스에 종양 세포 및 섬유아세포를 피하 주사하고 종양 크기가 약 200 mm^3 에 도달했을 때(23일차), 화합물 또는 히스티딘 완충액(비히클)로 주1회 처리하였다. $200 \mu\text{L}$ 당 적절한 양의 화합물을 얻기 위해, 원료 용액(표 13)을 필요에 따라 히스티딘 완충액으로 희석하였다. FAP-ICOS 와 CEACAM5-TCB에 의한 조합 치료(군 C, 도 13)를 위해, 조성물을 돈반 주사하였다. 캘리퍼를 사용하여 종양 성장을 주2회 측정하고(도 2), 종양 부피를 하기 수학적 1에 의해 계산하였다.

[0571] [수학적 1]

[0572] $T_v: (W^2/2) \times L$ (W: 너비, L: 길이)

[0573] 종결시(44일차) 후속의 FACS 분석을 위해, 마우스를 희생하고, 종양 및 비장을 제거하고 칭량하고, 콜라게나제 V, 디스파제 II 및 DNase에 의한 효소적 절단을 통해 단일 세포 현탁액을 제조하였다. 인간 CD45, CD3, CD8, CD4, CD25 및 FoxP3(세포내)에 대해 염색된 단일 세포를 FACS 포르테사에서 분석하였다.

[0574] 종양 조직의 작은 조각(30 mg)을 급속 냉동하고, 전체 단백질을 단리하였다. 단백질 현탁액을 멀티플렉스(Multiplex) 분석에 의해 사이토카인 함량에 대해 분석하였다.

[0575] 도 14a 내지 14e는 모든 처리군에서 종양 성장 동력학(평균) 및 연구 종결시 종양 중량을 도시한 것이다. 단일 제제로서 CEACAM5-TCB는 일부 종양 성장 억제물 유도하였다. 그러나, FAP-ICOS와의 조합은 상당히 향상된 종양 성장 억제물 나타냈고, 이는 연구 종결시 종양 중량에서도 반영되었다. 흥미롭게도, 연구 종결시 희생된 동물로부터의 종양의 이뮤노-PD 데이터(도 15a 내지 15d)는 특히 종양 조직에서 T_{reg} 세포의 고갈을 나타냈다. 처리된 동물의 비장세포에서는 고갈이 검출되지 않았다(도 15c 및 15d, 유동 세포분석). T_{reg} 의 고갈은 조합 처리에서 CD8 세포 쪽으로 $CD8/T_{reg}$ 를 이동시켰다.

[0576] 또한, 사이토카인 분석은 조합군에서 종양 조직내 CXCL13, TNF- α 및 CCL3의 평가된 수준을 나타낸다(도 16a, 16b 및 16c).

표 14

| 시험된 조성물 설명 | | |
|---------------|-------------------------------|----------------|
| 화합물 | 제형 완충액 | 농도 (mg/mL) |
| FAP-ICOS(1+1) | 20mM 히스티딘, 140mM NaCl, pH 6.0 | 2.74 (= 원료 용액) |
| CEACAM 5 TCB | 20mM 히스티딘, 140mM NaCl, pH 6.0 | 4.7 (= 원료 용액) |

[0578] **실시예 15: 유전자 발현 분석**

[0579] ICOS-조절된 유전자를 동정하기 위해, 인간화된 NSG 마우스에서 상기 효능 연구의 종양 조직(실시예 14)을 엔카운터(nCounter: 등록상표) 인간 면역 패널(Human Immunology Panel)(미국 워싱턴주 시애틀 소재의 나노스트링 테크놀로지스(NanoString Technologies))를 사용하여 분석하였다.

[0580] 요약하면, 냉동된 새로운 인간화된 종양 조직(30 내지 70 mg)을 파열시키고 RNA 용해 완충액(독일 힐텐 소재의 퀴아겐(Qiagen))에서 균질화시킨 후, 알앤이지 미니 키트(RNEasy Mini Kit)(독일 힐텐 소재의 퀴아겐)를 사용하여 전체 RNA를 추출하였다. 나노스트링 엔카운터 플랫폼을 사용하여 유전자 발현을 정량분석하였다.

[0581] 200 ng의 전체 RNA를 594개의 상이한 면역-관련 인간 유전자에 짝지음되는 바코딩된 탐침자의 패널을 포함하는 엔카운터(등록상표) 인간 면역 패널(미국 워싱턴주 시애틀 소재의 나노스트링 테크놀로지스)에 의해

분석하였다. 코드집합(codeset)을 65°C에서 밤새 RNA에 의해 혼성화하였다. RNA 전사체를 부동화시키고, 바코딩된 탐침자를 나노스트링 엔카운터 디지털 분석기를 사용하여 계수하였다. 코드집합-내부 음성 대조군 탐침자의 기하 평균 상위의 2 표준 편차에 도달했을 때 정규화된 원(raw) 발현 데이터(엔솔버(nSolver) 분석 소프트웨어)를 분석하였다. 이의 발현의 90%가 배경(background) 임계치 미만인 경우, 유전자를 추가의 분석에서 배제하였다. 배경-필터링 후 남아있는 유전자를 내부 양성 대조군의 기하 평균 및 5개의 항존 유전자(GAPDH, HPRT1, ALAS1, GUSB 및 TUBB)에 대해 정규화한 후, log₂-변형하였다.

[0582] 데이터를 클루코어 오믹스 익스플로러(Qlucore Omics Explorer(QOE)) 소프트웨어(스웨덴 룬드 소재의 클루코어 아베(Qlucore AB))에 의해 분석하였다. PCA 및 계층 집단화를 수행하여 처리군간의 유전자 발현 차이를 측정하였다. 전사 수준에서 2-배 차이를 나타낼 때, 유전자가 상이하게 발현된 것으로 간주하였다.

[0583] 도 17a 및 17b는 CEACAM5-TCB-매개된 T-세포 활성화와 조합된 2개의 가장 강력한 ICOS-상향조절된 유전자인 TNFAIP6 및 CXCL13을 도시한 것이다.

[0584] **결과**

[0585] **1. FAP-ICOS 분자의 생체 외 특성규명**

[0586] 암 면역치료제로서 ICOS의 잠재적인 임상적 관련성을 이해하기 위해, 다양한 종양 적응증의 TIL에서 ICOS의 발현을 평가하였다.

[0587] 도 3a 내지 3d에 도시한 바와 같이, CD4⁺ 및 CD8⁺ T-세포 아형 둘다의 종양-침습성-림프구는 동일한 종양 환자의 정상 조직으로부터 단리된 T-세포 또는 건강한 기증체로부터의 (말초) T-세포보다 더 높은 평균 ICOS 발현을 나타낸다. 발현 수준 및 ICOS-발현 T-세포의 퍼센트에 있어서 상당한 기증체 변형들이 관찰되었다. TIL, 로보 종양 세포 및 CEACAM5-TCB에 의한 환자-유래 종양 조각의 생체 외 동반-항온배양시, 대부분의 T-세포가 기준치에서 이미 ICOS-양성이었기에 TIL의 ICOS 수준은 단지 한정적으로만 증가하였다(도 3e 내지 3h).

[0588] 그러나, CEACAM5-TCB 및 건강한 기증체의 새롭게 단리된 PBMC에 의한 로보 종양의 동반-항온배양은 CD4⁺ 및 CD8⁺ T-세포에서 훨씬 더 낮은 기준치 수준의 ICOS 및 TCB-매개된 T-세포의 활성화시 ICOS의 확연한 증가를 나타냈다.

[0589] CD4⁺ 및 CD8⁺ T-세포 둘다에서 ICOS의 상향조절은 T-세포 활성화에 사용되는 TCB 농도와 직접적으로 관련되고 상이한 TCB 분자와 일관되는 것으로 보인다(도 4a 내지 4d).

[0590] 마찬가지로, CEA-양성 종양 세포 및 CD3-양성 T-세포에 의한 mCEA-TCB 또는 mCEACAM5-TCB의 동반-배양은 농도-의존적으로 CD4⁺, CD8⁺ 및 T_{reg} 세포에서 쥐과 ICOS의 발현을 상향조절할 수 있다(도 5a 내지 5f).

[0591] 이는 치료제로서 ICOS가 다수의 종양 적응증에 대해 기준치에서 이미 상향조절되고, T-세포에서 낮은 ICOS 기준치에 의한 설정에서 TCB에 대한 잠재적인 조합적임을 입증한다.

[0592] 생체 외 결합 분석은 ICOS-FAP 분자가 세포에서 농도-의존적으로 인간 FAP 및 인간 ICOS 둘다에 결합할 수 있음을 입증한다(도 6a 및 6b: 인간 T-세포에서 huICOS에 대한 결합, 도 6c: 3T3-huFAP에서 huFAP에 대한 결합). 예상대로, 비표적화된 ICOS-DP47 대조군 분자는 huFAP에 대한 결합을 나타내지 않았다(도 8b). C-말단 융합에 의해 FAP를 표적으로 하는 분자(ICOS-FAP 2+1/ICOS-FAP 1+1 HT)는 인간 FAP에 대한 결합에 대해 약간 더 높은 EC₅₀ 값을 나타낸다(표 10). 형식들간의 유의한 차이는 인간 ICOS에 대한 결합에서는 찾을 수 없었다.

[0593] 도 7a 및 7b에 도시된 바와 같이, 비표적화된 DP47-mFAP-L 및 FAP-mICOSL 분자 둘다는 농도-의존적으로 쥐과 ICOS에 결합한다. 또한, 예상대로, FAP-mICOS-L은 쥐과 FAP에 농도-의존적으로 결합함을 나타낸다.

[0594] Jurkat-NAFT 리포터 세포 또는 1차 세포를 사용한 FAP-ICOS의 특성규명은 동시적인 CD3/TCR 진입기전에 대한 ICOS 신호전달의 의존성을 나타냈다(도 8a). 모든 ICOS 분자는 플레이트에 직접 결합에 의해 가교연결되었고, 이에 따라 DP47-ICOS 및 FAP-ICOS 분자는 동시적 CD3 유발의 존재하에 유사한 활성을 나타냈다. 그러나, 동시적 CD3 유발의 부재하에, 하류 신호전달은 관찰되지 않았다.

[0595] 제2 접근에서, ICOS 신호전달의 유도에서 표적화 및 가교연결의 효과를 평가하였다: FAP- 잔기를 통한 항-ICOS 항체의 인간 FAP-발현 세포에 대한 가교결합은 비표적화된 DP47-ICOS 분자에 비해 훨씬 더 효과적인 ICOS의 신호전달 하류를 야기하였고, 이는 용액 중 평가하였다(도 8e 내지 8e 및 8F 내지 8I). 이러한 모델 체계에서,

비표적화된 분자도 특정 수준의 활성을 나타내지만 이의 각각의 표적화된 버전보다 훨씬 더 낮은 정도임에 주목해야 한다. 이는 ICOS 신호전달의 완전한 출력을 이용하기 위해서는 가교결합이 중요함을 명확히 제시한다.

[0596] ICOS가 CEACAM5-TCB처리시 상향조절됨에 기인하여(도 3a 내지 3h 및 도 4a 내지 4d), CEACAM5-TCB-매개되는 T-세포 활성화를 강화시키는 FAP-ICOS 분자의 잠재력을 측정하였다(도 9a 내지 9h). 도 9a 내지 9d는 CD4⁺(9a 및 9b) 및 CD8⁺(9c 및 9d)에서 강화된 CD25 및 CD69 발현의 예시적인 그래프를 도시한 것이고, CEACAM5-TCB 처리 상에서만 CD25 및 CD69의 투약량-의존적 증가를 나타낸다. 도 9e 내지 9h는 5명 이하의 상이한 건강한 인간 PBMC 기증체 및 모든 5개의 FAP-ICOS 또는 DP47-ICOS 분자의 요약을 도시한 것이다. FAP-ICOS의 강화 효과 및 기준치 활성화 수준이 CEACAM5-TCB 처리에 기인하여 상이한 기증체들간에 크게 달라지고 일부 기증체는 FAP-ICOS의 강화 효과를 전혀 나타내지 않음(예컨대 기증체 4)에 주목해야 한다.

[0597] 상기 관찰과 일관하여, FAP-표적화된 mICOS-L 분자와 mCEA-TCB 분자의 조합의 동반-항은배양은 TCB 효과 단독에 비해 강화된 T-세포 활성화를 야기하고, 이는 CD4⁺ 및 CD8⁺ T-세포에서 CD25 및 CD69의 투약량-의존적 상향조절에서 볼 수 있다(도 11a 및 11b).

[0598] CEACAM5-TCB를 표적화된 ICOS 치료와 조합하는 것의 효과를 추가로 특성규명하기 위해, 본 발명자들은 T-세포 증식 및 T-세포 분화에 있어서 96시간 후 1차 세포의 반응을 특성규명하였다(도 10). 도시한 바와 같이, CEACAM5-TCB 및 FAP-ICOS의 조합은 CEACAM5-TCB 단독 처리에 비해 CD4⁺ 및 CD8⁺ T-세포 둘다의 증식을 유도하였다(도 10a 및 10b). 모든 3개의 형식은 비교적 우수히 작동하였다. 도 12c 내지 12f 및 12g 내지 12j는 CEACAM5-TCB의 고정된 농도 2.9 pM에서(도 10k), CEACAM5-TCB 단독치료와 비교하여 CEACAM5-TCB와 FAP-ICOS의 조합 치료시 효과기 기억 및 중심 기억 T-세포의 증가된 숫자가 관찰됨을 도시한 것이고, 마찬가지로 모든 3개의 형식이 동일하게 우수히 작동하였다. 이는 조기 T-세포 활성화에 대한 증폭 효과(도 9)가 T-세포의 총 개수 및 목적하는 기억 T-세포 부분 집합의 형성의 증가를 전개하여 환자에서 장기적인 효율적 항-종양 반응을 가능하게 할 것임을 뒷받침한다.

[0599] **2. FAP-ICOS 분자의 생체 내 특성규명**

[0600] 상기 선별 분석으로부터의 FAP-ICOS₁₊₁ 분자를 인간 CEA-발현 MKN45 종양 세포 및 3T3-huFAP-발현 섬유아세포로 동반이식된 인간화된 NSG 마우스를 사용하여 생체 내 평가하였다. 예상한대로, CEACAM5-TCB의 단일 치료는 종양 성장의 지연을 야기하였다. 그러나, CEACAM5-TCB와 FAP-ICOS의 조합은 훨씬 더 강력한 항-종양 반응을 유도하였고, 이는 종양-특이적 T_{reg} 고갈, T 효기 세포의 활성화 및 결과적으로 CD8 효과기 대 T_{reg} 세포의 증가된 비율에 기인한다.

[0601] 또한, 남은 종양 샘플의 사이토카인 분석은 CEACAM5-TCB에 의한 단일 치료에 비해 조합군에서 CXCL13, TNF-알파 및 CCL3의 현저히 상향조절된 수준을 나타냈다(도 16a 내지 16c).

[0602] CCL3은 CC 케모카인 과에 속하고 CCL4와 반응하는 것으로 제시되어 왔다. 또한, MIP1알파로서 공지되어 있고 대식세포, 단핵구 및 호중구를 유인하는 것으로 설명된다. 종양 환경에서, CCL3은 백신적 측면에서 항-종양 면역 반응을 증가시킨다(문헌[Allen, 2016]).

[0603] 상기 사이토카인 분석과 일관하여, CXCL13 및 TNFAIP6을 2개의 가장 강력한 ICOS-특이적 조절된 유전자로서 확인하였다(도 17a 및 17b).

[0604] 종양 괴사 인자-유도성 유전자 6 단백질은 TNF-자극되는 유전자 6 단백질 또는 TSG-6으로도 공지되어 있다. 염증성 장 질환에서 질환 활성의 잠재적인 바이오마커로서 설명된다. 이는 세포의 기질 안정성 및 세포 이동에 관여하는 것으로 공지되어 있는 히알루로난-결합 도메인을 나타낸다.

[0605] 케모카인(C-X-C 모티프) 리간드 13(CXCL13)은 B 림프구 화학유인물질(BLC) 또는 B-세포-유인성 케모카인 1(BCA-1)로도 공지되어 있다. CXCR5(hi)ICOS(hi) CD4 T-세포는 IgG 생성의 가장 잠재성있는 유도제이고 다량의 B-세포-유인성 케모카인 CXCL13을 분비한다. 따라서, CXCL13 및 이의 수용체 CXCR5는 림프 조직의 소포내에 B 세포의 조직화를 제어하고, 몇몇 종양 적응증에서 3차 림프 구조의 형성에 중요한 역할을 할 수 있다.

[0606] 최근, B-세포 화학유인물질 CXCL13은 CXCL13-생성(CXCR5) 소포성 보조 T-세포에 의해 유도되는 국소 기억 B-세포 분화에 기인하여 인간 암에서 TFH 세포 침투 및 향상된 생존성과 관련되어 있는 것으로 알려져 있다(문헌[Gu-Trantien 2017]). 이는 상이한 2차 기전을 통한 효능있는 항-종양 반응을 매개하는데 ICOS의 잠재적인 중요한 역할을 재차 강조한다.

[0607] 종합하면, ICOS는 중앙 반응성 T-세포의 현저한 ICOS 기준치 발현에 의해 몇몇 염증화된 중앙 적응증에서 단일 치료제로서 효능있는 항-중앙 분자로서 사용될 수 있다. FAP-표적화된 ICOS 분자를 사용하는 것은 ICOS-발현성의 활성화된 T 효과기 세포의 중앙-특이적 활성화를 가능하게하고, 이에 따라 비표적화된 ICOS 분자에 비해 바람직한 안정성 및 효능 프로파일을 가질 것이다.

[0608] T-세포 특이성 물질은 효능있는 면역 진입기전체이고, 이는 T-세포 활성화를 유도하고 중앙내로의 T-세포 침투를 광화시킬 수 있다. TCB 치료시 증가되는 ICOS 발현은 효능있는 TCB와 중앙-특이성 ICOS 분자를 조합함에 의해 ICOS 단일 치료 접근보다 훨씬 더 넓은 환자 집단의 표적화를 가능하게 할 수 있고, 이는 TCB 또는 ICOS 단일 치료에 비해 강화되고 연장된 항-중앙 반응을 야기할 것으로 기대된다.

[0609] **실시예 16: ICOS 항체의 생성**

[0610] **16.1 항원의 제조, 정제 및 특성규명, 및 파지 디스플레이에 의한 신규한 항체의 생성을 위한 선별 도구**

[0611] **16.1.1 이량체 쥐과 ICOS 항원 Fc(kih) 융합 분자의 제조, 정제 및 특성규명**

[0612] 이량체 ICOS 항원 Fc 융합 분자를 위해, 쥐과 ICOS의 엑토도메인을 암호화하는 DNA 서열(표 15)을 홀 및 낚의 인간 IgG₁ 중쇄 CH2 및 CH3 도메인을 갖는 프레임에 서브클로닝하였다(문헌[Merchant et al., 1998]). S354C/T366W 돌연변이를 함유하는 항-Fc 낚 쇠와 Y349C/T366S/L368A/Y407V 돌연변이를 함유하는 Fc 홀 쇠의 조합은 쇠를 함유하는 엑토도메인의 2개 복제물을 포함하는 ICOS 이중이량체의 생성을 가능하게 함에 따라 Fc-연결된 항원의 이량체 형태를 생성한다. 하기 표 16은 항원 Fc-융합 구축물의 cDNA 및 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

표 15

[0613]

| 항원 엑토도메인(ECB) 및 이의 원점의 아미노산 번호부여 | | | |
|----------------------------------|-------------|-------------------|-----------|
| 서열번호 | 구조 | 원점 | ECD |
| 118 | 쥐과 ICOS ECD | Q9WVS0에 따라 합성됨 | aa 21-144 |

표 16

[0614]

| 이량체 항원 Fc(kih) 융합 분자의 cDNA 및 아미노산 서열 | | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|--|
| 서열번호 | 항원 | 서열 |
| 119 | Nucleotide 서열 쥐과 ICOS 항원 Fc 홀 쇠 | GAGATCAACGGCAGCGCCGACCACCGGATGTTCCAGCTTCCACAATGGCGGCGTGCAGATCAGCTGC AAGTACCCCGAGACAGTGCAGCAGCTGAAGATGCGGCTGTTCCGCGAGCGGGAAGTGTGTGCGAG CTGACCAAGACAAAGGGCAGCGCAACGCGGTGCCATCAAGAACCCCATGCTGTGCCTGTACCAC CTGAGCAACAACAGCGTGTCTTCTTCTGAACAACCCCGACAGCAGCCAGGGCAGCTACTACTTC TGCTCCCTGAGCATCTTCGACCCCCACCATTCCAGGAACGGAACCTGAGCGGCGGCTACCTGCAC ATCTACGAGAGCCAGCTGTGCTGCCAGCTGAAACTGTGGTGTCTGCAGACGTCGACGACAAAAC CACACATGCCACCCGTGCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCA AAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGACGCTGAGC CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA AAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTCAGCGTCCCTACCGTCTGCACCAG GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGCCCTCGGCGCCCCATCGAG AAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCATCCCGG GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCTCTCGTGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCGAGCGGAGAACAACAAGACCAGCCCTCCCGTGTGGAC TCCGACGGCTCTTCTTCTCGTGAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCGCTTACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG TCTCCGGTAAATGA |

| | | |
|-----|---------------------------------------|---|
| 120 | Nucleotide 서열 쥐과 ICOS 항원 Fc 놈 채 | GAGATCAACGGCAGCGCCGACCACCGGATGTTTCAGCTTCCACAATGGCGGCGTGCAGATCAGCTGC AAGTACCCCGAGACAGTGCAGCAGCTGAAGATGCGGCTGTCCGCGAGCGGGAAGTGTGTGCGAG CTGACCAAGACAAAGGGCAGCGGCAACGCCGTGCCATCAAGAACCCCATGCTGTGCCTGTACCAC CTGAGCAACAACAGCGTGTCTTCTTCTGAAACAACCCCGACAGCAGCCAGGGCAGCTACTACTTC TGCTCCCTGAGCATCTTCGACCCCCACCATTCCAGGAACGGAACCTGAGCGGCGGTACCTGCAC ATCTACGAGAGCCAGCTGTGTGCCAGCTGAAACTGTGGCTGTCTGCAGACAAAACCTACACATGCCACCGTGC GGTAGTCCGACACCTCCGACACCCCGGGGTGGTTCTGCAGACAAAACCTACACATGCCACCGTGC CCAGCACCTGAAGCCGAGGGGACCGTCAGTCTTCTTCTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTC ATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAGCTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTC AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAG TACAACAGCAGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG GAGTACAAGTGAAGTCTCCAACAAGCCCTCGGAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC AAAGGGCAGCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCGGATGAGCTGACCAAGAAGC CAGGTACGCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGAGAACAACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACACCCTACACGCAGAAGAGCCCTCTCCTGTCTCCGGTAAATCCGGA GGCCTGAACGACATCTTCGAGGCCAGAAAGATTGAATGGCACGAGTGA |
| 121 | 쥐과 ICOS 항원 Fc 홀 채 | EINGSADHRMFSFHNGGVQISCKYPETVQQLKMRLFREREVLCELLTKTKGSGNAVSIKNPMLCLYH LSNNSVSFFLNNPDSSQGSYFCSLSIFDPPPFQERNLSGGYLHIYESQLCCQLKLWLSADVDDKT HTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPPSR DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSQSVMEALHNRFYTKSLSLSPGK |
| 122 | 쥐과 ICOS 항원 Fc 놈 채 | EINGSADHRMFSFHNGGVQISCKYPETVQQLKMRLFREREVLCELLTKTKGSGNAVSIKNPMLCLYH LSNNSVSFFLNNPDSSQGSYFCSLSIFDPPPFQERNLSGGYLHIYESQLCCQLKLWLSADVDASG GSPTPTPGGSADKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKA KGQPREPQVYTLPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE |

[0615] ICOS-Fc-융합 암호화 서열을 키메라 MPSV 프로모터로부터의 삽입의 발현을 작동시키고 CDS의 3' 말단에 위치하는 합성 폴리A 신호 서열을 함유하는 플라스미드 벡터에 클로닝하였다. 또한, 상기 벡터는 플라스미드의 에피솜 유지보수를 위한 EBV OriP를 함유하였다. 비오틴일화된 항원/Fc 융합 분자의 제조를 위해, 지수적으로 성장하는 현탁액 HEK293 EBNA 세포를 융합 단백질의 2개의 성분(놈 및 홀 채), 및 BirA(비오틴일화 반응에 필수적인 효소)를 암호화하는 3개의 벡터에 의해 공동-형질감염시켰다. 상응하는 벡터를 1:1:0.05(Fc 놈:Fc 홀: BirA)의 비로 사용하였다.

[0616] 500 mL 진탕 플라스크에서 단백질 제조를 위해, 4억개의 HEK293 EBNA 세포를 과종한지 24시간 후 형질감염시켰다. 형질 감염을 위해, 세포를 5분 동안 210 g로 원심분리하고, 상청액을 미리 가온된 CD CHO 배지로 대체하였다. 발현 벡터를 200 µg의 벡터 DNA를 함유하는 20 mL의 CD CHO 중에 재현탁하였다. 540 µL의 폴리에틸렌이민(PEI)의 첨가 후, 용액을 15초 동안 와류시키고 실온에서 10분 동안 항온배양하였다. 이어서, 세포를 DNA/PEI 용액과 혼합하고 500 mL 진탕 플라스크로 옮기고 5% CO₂ 대기에 의해 항온배양기에서 37°C로 3시간 동안 항온배양하였다. 항온배양 후, 160 mL의 F17 배지를 첨가하고, 세포를 24시간 동안 배양하였다. 형질감염 1일 후, 1 mM 발프로산, 및 7% 영양물을 첨가하였다. 7일 동안 배양 후, 상청액을 15분 동안 210 g으로 원심분리함으로써 채집하였다. 용액을 멸균 여과(0.22 µm 필터)하고 0.01%(w/v)의 최종 농도로 나트륨 아자이드로 보충하고 4°C에서 유지하였다.

[0617] 분비된 단백질을 단백질 A를 사용한 친화도 크로마토그래피에 이어서 크기 배제 크로마토그래피 의해 세포 배양 상청액으로부터 정제하였다. 친화도 크로마토그래피를 위해, 상청액을 40 mL 20 mM 나트륨 포스페이트, 20 mM 나트륨 시트레이트 pH 7.5로 평형도달된 하이트랩 단백질 A HP 컬럼(CV = 5 mL, 지이 헬스케어)에 로딩하였다. 미결합된 단백질을 10 컬럼 부피 이상의 20 mM 나트륨 포스페이트, 20 mM 나트륨 시트레이트 및 0.5 M 염화 나트륨-함유 완충액(pH 7.5)에 의해 세척함으로써 제거하였다. 결합된 단백질을 20 컬럼 부피의 20 mM 나트륨 시트레이트, 0.01% 트윈 20 pH 3.0에 생성된 염화 나트륨의 선형 pH-구배(0 mM로부터 500 mM)를 사용하여 용리시켰다. 이어서, 컬럼을 10 컬럼 부피의 20 mM 나트륨 시트레이트, 500 mM 염화 나트륨, 및 0.01%(v/v) 트윈 20 pH 3.0으로 세척하였다. 채집된 분획의 pH를 1/40(v/v)의 2M Tris, pH 8.0을 첨가함으로써 조정하였다. 단백질을 농축하고 여과한 후, 2 mM MOPS, 150 mM 염화 나트륨, pH 7.4의 0.02%(w/v) 나트륨 아자이드 용액으로 평형도달된 하이로드 슈퍼텍스 200 컬럼(지이 헬스케어)에 로딩하였다.

- [0618] 16.1.2 재조합 쥐과 ICOS를 발현하는 안정한 세포주의 생성 및 특성규명
- [0619] 쥐과 ICOS를 암호화하는 전장 cDNA를 포유동물 발현 벡터에 서브클로닝하였다. 리포펙타민 LTX 시약 (Lipofectamine LTX Reagent)(인비트로젠, #15338100)을 제조사의 프로토콜에 따라 사용하여, 플라스미드를 포 유동물 벡터에 서브클로닝하였다. 안정하게 형질감염된 ICOS-양성 CHO-K1 세포를 10% 소 태아 혈청(기브코, #16140063) 및 1% 글루타맥스 보충제(기브코, #31331-028)로 보충된 DMEM/F-12(기브코, # 11320033)에서 유지 시켰다. 형질감염 2일 후, 퓨로마이신(인비트로젠, #ant-pr-1)을 6 µg/mL로 첨가하였다. 초기 선택 후, ICOS 의 가장 높은 세포 표면 발현을 갖는 세포를 BD FACSAria III 세포 분류기(비디 바이오사이언시스)를 사용하여 분류하고 배양하여 안정한 세포 클론을 구성하였다. 발현 수준 및 안정성을 PE 항-인간/마우스/래트 CD278 항 체(바이오레전드, #313508)를 사용한 FACS 분석에 의해 4주에 걸쳐 확인하였다.
- [0620] **16.2 파지 디스플레이에 의한 ICOS-특이성 16E09 항체(대체 분자)의 생성**
- [0621] 16.2.1 일반 Fab 라이브러리로부터 ICOS-특이성 항체의 선택
- [0622] 쥐과 ICOS 재조합 항원에 결합하는 클론의 선택을 위해, 파지 디스플레이에 의한 선택 접근법을 사용하였다. 선택 회차들에 선행하여, 사전-정화 단계를 포함하여 비목적 결합체(예컨대 태그(tag)에 대한 것)를 제거하였다. 이를 위해, 4 웰의 뉴트라비딘 플레이트(피어스(Pierce), No. 15128)를 37°C로 30분 동안 PBS 중 비오틴일화된 항원(고갈제) 200 µL의 100 nM 용액으로 코팅하고 PBS로 간단히 세척하였다.
- [0623] 600 µL의 라이브러리 파지(자체 제조됨)를 실온에서 웨도형 진탕기에서 10분 동안 PBS 중 5% BSA(200 µL)에 의해 항온배양하였다. 미리 차단된 라이브러리 혼합물을 비오틴일화된 고갈제로 코팅된 4 웰에 옮기고 실온에서 1시간 동안 항온배양하였다. 상청액을 상기 웰로부터 조심스럽게 제거하고 선택에 사용하였다.
- [0624] 선택은 비오틴일화된 ICOS-Fc 융합 단백질에서 3개 회차로 수행하였다. 모든 선택 회차에 대해, 30개의 파지 디스플레이 라이브러리를 사용하였다(모든 라이브러리는 자체 제조됨).
- [0625] 패닝(panning) 회차를 용액 중 하기 패턴에 따라 수행하였다: (1) 약 10^{12} 개의 사전-정화된 파지미드 입자를 100 nM 비오틴일화된 ICOS-Fc 단백질에 0.5시간 동안 총 부피 1 mL로 결합, (2) 10분 동안 5.4×10^7 개의 스트렙타 비딘-코팅된 자석 비드의 첨가에 의해, 비오틴일화된 ICOS-Fc 단백질 및 특이적으로 결합된 파지 입자의 포획, (3) 5 x 1 mL PBS/0.1% 트윈 20 및 5 x 1 mL PBS를 사용한 비드의 세척, (4) 10분 동안 1 mL 100mM TEA(시그마-알드리치, Cat. No. 90335)의 첨가에 의한 파지 입자의 용리, 및 500 µL 1M Tris/HCl pH 7.4의 첨가에 의한 중화, (5) 지수적 성장 *E.Coli* TG1 박테리아의 재감염, 및 (6) 후속의 선택 회차에 사용하기 위한 보조파지 VCSM13에 의한 감염 및 후속의 20% PEG-2.5M NaCl 침전. 2회차에서, 항원의 포획: 스트렙타비딘 비드 대신 뉴 트라비딘 플레이트를 사용하여 파지 복합체화를 수행하였다. 뉴트랩타비딘 플레이트를 5 x PBS/0.1% 트윈 20 및 5 x PBS로 세척하였다. 제3 선택 회차를 20 nM의 감소하는 항원 농도에 의해 수행하였다.
- [0626] 16.2.2 선택 회차 후 특이성 ICOS 클론의 선별
- [0627] ICOS 특이성 클론을 미러볼(Mirrorball)에 의한 2개의 상이한 방법으로 확인하였다. 384 웰 플레이트에서 재조합 ICOS 항원에서 ICOS 특이성 클론의 선별을 위해, 50 µL의 스트렙타비딘 코팅된 Sol-RTM 비드(TTP 랩테크 (TTP Labtech), Cat. No.4150-09125)를 80 nM의 비오틴일화된 항원으로 코팅하고 실온으로 1시간 동안 항온배 양하였다. 결합된 항원을 갖는 비드를 PBS로 1회 세척하였다. 항원-비드 복합체를 23 mL의 BPS 중 재현탁하였 다. 알렉사 플루오르(Alexa Fluor: 등록상표) 647 어피니퓨어(AffiniPure) 염소 항-인간 IgG, F(ab')₂ 단편 특 이성 항체(Cat. No. 109-605-006)를 800 ng/mL의 최종 농도가 되도록 상기 혼합물에 첨가하였다. 상기 혼합물 을 각각의 웰에 35 µL의 부피로 동등하게 분배하였다. 상청액 중 50 µL의 Fab를 각각의 웰에 첨가하였다. 샘플을 실온으로 2시간 동안 항온배양한 후, 판독하였다.
- [0628] 384 웰 플레이트에서 ICOS를 발현하는 재조합 세포에서 ICOS 특이성 클론을 선별하기 위해, 세포를 원심분리에 의해 수확하고, 상청액을 버렸다. 세포를 미리 가온된 셀트래커 그린 CMFDA(CellTracker Green CMFDA)(인비트 로젠, Cat. No. C7025) 작업 용액 중 1.2×10^6 세포/mL 농도로 재현탁한 후, 성장 조건하에 세포 항온배양하였 다. 셀트래커 그린 CMFDA 작업 용액을 새로운 미리 가온된 배양 배지로 대체하였다. 세포를 정장 조건하에 다 시 30분 동안 항온배양한 후, PBS로 2회 세척하였다. 세포를 총 부피 8 mL의 PBS에 재현탁하였다. 알렉사 플 루오르(등록상표) 647 어피니퓨어 염소 항-인간 IgG, F(ab')₂ 단편 특이성 항체(잭슨 이뮤노 리서치, Cat. No. 109-605-006)를 800 ng/mL의 최종 농도가 되도록 상기 혼합물에 첨가하였다. 상기 혼합물을 각각의 웰에 20 µ

L의 부피로 동등하게 분배하였다. 상청액 중 5 μ L의 Fab를 15 μ L의 PBS와 함께 각각의 웰에 첨가하였다. 샘플을 실온으로 2시간 동안 항온배양한 후, 판독하였다.

[0629] 16.2.3 선택된 클론의 서열화

[0630] (ICOS 항원을 발현하는 재조합 단백질 및 재조합 세포에서) 미러볼-양성인 클론을 서열화에 선택하여 고유한 클론을 밝혔다.

[0631] 선택된 16E09의 서열을 하기 표 17에 나타냈다.

표 17

[0632]

| 과지-유래 항-쥐과 ICOS 항체 16E09에 대한 가변부 아미노산 서열(밑줄은 상보성 결정부(CDR)임) | | |
|---|---------|---|
| 클론 | 서열번호 | 서열 |
| 16E09 | 130(VL) | DI VMTQSP LSLPVT PGP EAS I SCRSSQSL LHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSN RASGVPDR FSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCMQALWPTPTFGGQTKVEIK |
| | 129(VH) | EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMI IYPGDS DTRYSPSFQGGQVTI SADKSI ST AYLQWSSLKASDTAMYYCARSSGPYGLLDYWGQGLTIVTSS |

[0633] 16.2.4 고유 클론의 Fab 발현 및 정제

[0634] 디프코(Difco) 2xYT 배지(BD, Cat. No. 244020) 중 1 mM 이소프로필-베타-D-티오갈락토시드(IPTG)를 사용하고 100 μ g/mL 엠피실린(어플리켄(AppliChem), Cat. No. A0839.0100)을 첨가하여 30°C에서 밤새 TG1 세포에서 단클론 항체 Fab 단편의 발현을 유도하였다. Fab의 정제를 히스 그라비트랩(His GraviTrap) 친화도 컬럼(지이 헬스케어, Cat. No. 11-0033-99)에서 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다. 완충 교환을 PD-10 탈염 컬럼(지이 헬스케어, Cat. No. 17-0851-01)에서 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다.

[0635] 16.2.5 프로테온(ProteOn) XPR36 계기(바이오라드(Biorad))에서 정제된 클론의 결합 특성규명

[0636] 25°C에서 프로테온 XPR36 계기(바이오라드)를 사용한 SPR에 의해, 단클론 항체 Fab 단편의 친화도(K_D)를 측정하였다. 동력학 측정을 위해, 15 μ g/mL의 쥐과 ICOS 단백질 및 Fc 고갈제를 주사하였다. 한번에 동력학을 측정하기 위해, 정제된 단클론 항체 Fab 단편의 연속 희석액을 개별 채널 1 내지 5에 동시 주사하였다. 완충액(PBST)을 제6 채널에 주입하여 참조를 위한 "인-라인(in-line)" 미처리균을 제공하였다. 회합 속도 상수(k_{on}) 및 해리 속도 상수(k_{off})는 프로테온 매니저 v3.1 소프트웨어에서 단순 1:1 랭뮤어 결합 모델을 사용하고 회합 및 해리 센서그램을 동시 근사시킴으로써 계산하였다. 평형 해리 상수(K_D)를 비 k_{off}/k_{on} 로서 계산하였다(표 18).

표 18

[0637]

| Fab 단편으로서 16E09 항-ICOS 항체의 동력학 속도 상수(K_D) | |
|---|-------------|
| 클론 | 쥐과 ICOS |
| Fab 단편 16E09 | 친화도: 293 nM |

[0638] 16.2.6 쥐과 ICOS를 발현하는 재조합 세포에서 정제된 Fab 단편 16E09의 결합 특성규명

[0639] 정제된 Fab 단편 16E09의 결합을 쥐과 ICOS 재조합 항원을 발현하는 안정한 CHO K1 세포에서 확인하였다.

[0640] 16.3 항-ICOS 16E09 IgG₁ P329G LALA 항체의 제조 및 정제

[0641] 선택된 항-ICOS 클론의 중쇄 및 경쇄 DNA 서열의 가변부를 인간 IgG₁의 불변 경쇄 또는 불변 중쇄를 갖는 프레임에 서브클로닝하였다. 국제 특허 출원 공개 WO 2012/130831 A1에 기재된 방법에 따라, Pro329Gly, Leu234Ala 및 Leu235Ala 돌연변이를 낚 및 홀 중쇄의 불변부에 도입하여 Fc 감마 수용체에 대한 결합을 제거하였다.

[0642] 항-ICOS 클론의 아미노산 서열은 표 19에 제시되어 있다. 항-ICOS-Fc 융합 암호화 서열을 플라스미드 벡터에 클로닝하였고, 이는 CMV 프로모터로부터 삽입의 발현을 구동하고 CDS의 3' 말단에 위치하는 합성 폴리A 서열을

함유한다.

표 19

[0643]

| P329GLALA 인간 IgG ₁ 형식의 항-ICOS 클론 16E09의 아미노산 서열 | | |
|--|-------------|---|
| 클론 | 서열번호 | 서열 |
| 16E09 | 131 (경쇄) | DI VMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALWPTTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLSKADYEEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC |
| | 132 (중쇄) | EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMI IYPGDS DTRYSPSFQGGV TISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYCARSSGPYGLYLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG |

[0644]

항-ICOS 항체는 폴리에틸렌이민을 사용하여 HEK293-EBNA 세포를 포유동물 발현 벡터로 동반-형질감염시킴으로써 제조하였다. 세포를 1:1 비("벡터 중쇄": "벡터 경쇄")로 상응하는 발현 벡터에 의해 형질감염시켰다.

[0645]

30 mL 진탕 플라스크에서의 제조를 위해, 6천만개의 HEK293-EBNA 세포를 형질감염 전에 파종하였다. 형질감염을 위해, 세포를 5분 동안 210 x g로 원심분리하고, 상청액을 미리 가온된 CD CHO 배지로 대체하였다. 발현 벡터(30 µg의 전체 DNA)를 3 mL CD CHO 중 혼합하였다. 81 µL PEI의 첨가 후, 용액을 15초 동안 와류시키고 10분 동안 실온에서 항온배양하였다. 이어서, 세포를 DNA/PEI 용액과 혼합하고 50 mL 진탕 플라스크로 옮기고 5% CO₂ 대기로 항온배양기에서 3시간 동안 37°C로 항온배양하였다. 항온배양 후, 6 mM L-글루타민으로 보충된 24 mL의 익스-셀 배지, 5 g/L 펩소이(PEPSOY) 배지 및 1 mM 발프로산을 첨가하고, 세포를 24시간 동안 배양하였다. 형질감염 1일 후, 12% 영양물 7 및 글루코스(최종 농도 3 g/L)를 첨가하였다. 7일 동안 배양 후, 상청액을 30분 동안 400 x g으로 원심분리함으로써 채집하였다. 용액을 멸균 여과(0.22 µm 필터)하고 0.01%(w/v)의 최종 농도로 나트륨 아자이드로 보충하고 4°C에서 유지하였다.

[0646]

세포 배양 상청액으로부터 항체 분자의 정제는 항-Fc 융합의 정제에 대해 전술한 바와 같이 단백질 A를 사용한 친화도 크로마토그래피에 의해 수행하였다. 단백질을 농축하고 여과한 후 20 mM 히스티딘, pH 6, 140 mM NaCl에 의해 평형화된 하이로드 슈퍼텍스 200 컬럼(지이 헬스케어)에 로딩하였다.

[0647]

정제된 이중특이성 구축물의 단백질 농도를 아미노산 서열을 기준으로 계산된 몰 흡광계수를 사용하여 280 nm의 OD에서 측정하였다. 항체의 순도 및 분자량을 환원제(미국의 인비트로젠)의 존재 및 부재하에 랩칩GXII((칼리퍼)를 사용하여 CE-SDS에 의해 분석하였다. 항체 샘플의 응집 함량을 25 mM K₂HPO₄, 125 mM NaCl, 200 mM L-아르기닌 모노하이드로클로라이드, 0.02%(w/v) Na₃N, pH 6.7 전개 완충액으로 평형도달된 TSKgel G3000 SW XL 분석적 크기 배제 컬럼(토소)을 사용하여 25°C에서 분석하였다. 하기 표 20은 항-ICOS IgG₁ 항체의 수율 및 최종 함량을 정리한 것이다.

표 20

[0648]

| 항-ICOS P329G LALA IgG ₁ 항체의 생화학적 분석 | | | |
|--|-----------|--------------|-------------------|
| 클론 | 수율 [mg/L] | 단량체 [%] aSEC | Purity [%] CE-SDS |
| 16E09 IgG ₁ P329GLALA | 2.63 | 98 | 98 |

[0649]

16.4 항-ICOS 16E09 IgG₁ P329G LALA 항체의 특성규명

[0650]

16.4.1 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정된 귀과 ICOS에 대한 결합(결합도 + 친화도)

[0651]

제조합 단량체 ICOS Fc(kih)에 대한 파지-유래 ICOS-특이성 항체의 결합을 SPR에 의해 평가하였다. 모든 SPR 실험은 25°C, 비아코어 T200에서, 전개 완충액으로서 HBS-EP(0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% 계면활성제 P20, 독일 프라이브루크 소재제의 비아코어)에 의해 수행하였다. 동력학 상수를 비아코어

T200 평가 소프트웨어(vAA, 스웨덴 우프살라 소재의 비아코어 아베)를 사용하여 유도하여 수치 적분에 의해 1:1 랭뮤어 결합에 대한 속도 등식에 근사시키고 결합도를 정성적으로 측정하였다.

[0652] 동일 실험에서, 파지-유래 ICOS-특이성 항체 16E09와 재조합 쥐과 ICOS간의 상호작용의 친화도를 측정하였다. 이를 위해, 쥐과 ICOS의 엑토도메인을 Avi(GLNDIFEAQKIEWHE) 태그(서열을 위해 하기 표 21 참고)를 갖는 프레임에 서브클로닝하였다.

표 21

[0653]

| 쥐과 ICOS Fc(kih) Avi 태그의 아미노산 서열 | | |
|---------------------------------|---------------------|--|
| 서열번호 | 항원 | 서열 |
| 133 | 쥐과 ICOS Fc 놓 Avi 태그 | EINGSADHRMFSFHNGGVQISCKYPETVQQLKMRLFREREVLCELTKTGSGNAVSIKNPMLCLYLHLNNSVSVFLLNPNPSSQGSYYFCSLSFIDPPPFQERNLGGYLHIYESQLCCQLKLWLSADVDASGGSPPTPPGGGSADKTHTCPPCAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLVCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGQVFVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE |
| 134 | 쥐과 ICOS Fc 흘 | EINGSADHRMFSFHNGGVQISCKYPETVQQLKMRLFREREVLCELTKTGSGNAVSIKNPMLCLYLHLNNSVSVFLLNPNPSSQGSYYFCSLSFIDPPPFQERNLGGYLHIYESQLCCQLKLWLSADVDDKTHTCPPCAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGQVFVSCSVMHEALHNRFVTKQKSLSLSPGK |

[0654] 단백질 제조는 실시예 16.1에 Fc-융합 단백질에 대해 기재된 바와 같이 수행하였다. 분비된 단백질을 킬레이팅 크로마토그래피에 이어서 크기 배제 크로마토그래피에 의해 세포 배양 상청액으로부터 정제하였다. 제1 크로마토그래피 단계를 20 mM 나트륨 포스페이트, 500 nM 염화 나트륨, pH 7.4로 평형도달된 닌타 슈퍼플로우 카트리리지(NiNTA Superflow Cartridge)(5 mL, 퀴아겐)에서 수행하였다. 용리는 12 컬럼 부피에 걸쳐 5%로부터 45%로의 용리 완충액(20 mM 나트륨 포스페이트, 500 nM, 염화 나트륨, 500 mM 이미다졸, pH 7.4) 구배를 적용함으로써 수행하였다. 단백질을 농축하고 여과한 후, 2 mM MOPS, 150 mM 염화 나트륨, pH 7.4의 0.02%(w/v) 나트륨 아자이드 용액으로 평형도달된 하이로드 슈퍼텍스 75 컬럼(지이 헬스케어)에 로딩하였다.

[0655] 재조합 쥐과 ICOS Fc(kih)에 대한 ICOS 특이성 항체 16E09의 결합을 인간 ICOS Fc(kih)에 대해 전술한 SPR에 의해 평가하였다(실시예 16.2.5 참고). SPR 실험은 25°C에서 비아코어 T200에서 전개 완충액으로서 HBS-EP(0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.005%(v/v) 계면활성제 P20(지이 헬스케어))를 사용하여 수행하였다.

[0656] 친화도 측정을 위해, 쥐과 ICOS Fc(kih)를 제조사 표준 절차를 사용하여 스트랩타비딘 칩(SA 칩(SA chip), 지이 헬스케어)에 직접 커플링하였다. 부동화 수준은 약 600 RU였다. 재조합 ICOS 특이성 항체의 친화도를 30 μ/분으로 240초 동안 6개의 농도(31.25 내지 1000 nM, 1:2 희석)의 주사에 의해 다주기 동역학으로써 측정하여 회합 상을 기록하였다. 해리 상은 500초 동안 감시하였고 샘플 용액을 HBS-EP로 전환함으로써 촉발하였다. 매 주기 후, 60초 동안 10 mM 글리신 pH 3.0을 하나의 주사로서 사용하여 칩 표면을 재생시켰다. 벌크(bulk) 굴절을 차이를 참조 유동 세포(항-ICOS 항체 항원이 표면 위로 유동하고, 여기서 ICOS 수용체는 부동화되지 않음)에서 수득된 반응을 제한함으로써 보정하였다.

[0657] 친화도 상수를 비아이벨(BIAev1) 소프트웨어(지이 헬스케어)를 사용하여 1:1 랭뮤어에 근사시킴으로써 동력학 속도 상수로부터 유도하였다. 항체 16E09가 쥐과 ICOS에 높은 친화도로 결합함이 나타났다(표 22).

표 22

[0658]

| 쥐과 ICOS에 대한 항-ICOS 항체 16E09의 결합 | | | | |
|---------------------------------|----------|-----------------------|----------------------|--------------------|
| 클론 | 원점 | 재조합 쥐과 ICOS(친화도 형식) | | |
| | | k _a (1/Ms) | k _d (1/s) | K _D (M) |
| 16E09 | 파지 디스플레이 | 1.44E+05 | 1.92E-02 | 1.80E-07 |

[0659] 실시예 17: 쥐과 ICOS에 대한 1가 또는 2가 결합 및 FAP에 대한 1가 결합을 갖는 이중특이성 항체의 생성

[0660] ICOS에 대한 1가 또는 2가 결합 및 FAP에 대한 1가 결합을 갖는 하기 이중특이성 작용성 ICOS 항체를 도 18a 및

18b에 도시된 바와 같이 제조하였다.

[0661] A) ICOS(16E09)-FAP(28H1) 2+1, FAP-표적화된 항-쥐과 ICOS_2+1, mIgG₁ DAPG, 2가 쥐과 ICOS(16E09), 1가 FAP(28H1)(도 18a, 서열번호 135, 136 및 131).

[0662] B) ICOS(16E09)-FAP(28H1) 1+1, FAP-표적화된 항-쥐과 ICOS_1+1, mIgG₁ DAPG, 1가 쥐과 ICOS(16E09), 1가 FAP(28H1)(도 18b, 서열번호 137, 138, 131 및 139).

[0663] ICOS(16E09)-FAP(28H1) 2+1에 대해, FAP-표적화된 항-쥐과 ICOS_2+1 구축물의 제1 중쇄(HC1)는 하기 성분으로 구성되었다: C-말단에서 항-FAP 결합제(28H1)이 융합되는 쥐과 Fc DAPG DD 영역의 항-ICOS(16E09)의 VHCH1. 제2 중쇄는 C-말단에서 항-FAP 결합제(28H1)의 VL이 융합되는 쥐과 Fc DAPG KK 영역의 항-ICOS(16E09)의 VHCH1로 구성되었다.

[0664] 'DDKK' 놓-인투-홀 기술은 예컨대 WO 2014/131694 A1에 기재되어 있고, Fc-DD와 Fc-KK의 조합은 이중이량체의 생성을 가능하게 한다. 요약하면, 아스파르트산 잔기(D)가 위치 392 및 409(카바트 EU 색인에 따른 번호부여, 즉 K392D 및 K409D)에 상응하는 위치에서 하나의 중쇄(HC1)의 Fc 영역 아단위에 제공되고, 리신(K) 잔기가 위치 356 및 399(카바트 EU에 따른 번호부여, 즉 E356K 및 D399K)에 상응하는 위치에서 다른 하나의 중쇄(HC2)의 Fc 영역 아단위에 제공된다. DAPG 돌연변이는 문헌[Baudino et al. J. Immunol. (2008), 181, 6664-6669] 또는 WO 2016/030350 A1에 기재된 방법에 따라 중쇄의 불변부에 도입되어 쥐과 Fc γ 수용체에 대한 결합을 제거한다. 요약하면 알라닌(A)은 위치 265에 상응하는 위치에서 Fc 영역에 제공되고, 글리신(G)은 위치 329에 상응하는 위치에서 Fc 영역에 제공된다(카바트 EU 색인에 따른 번호부여, 즉 D265A 및 P329G).

[0665] ICOS(16E09)-FAP(28H1) 1+1 HC1은 쥐과 Fc DAPG DD에서 항-ICOS(16E09)의 VHCH1로 구성되었다. HC2는 항-FAP의 VHCH1(28H1)과 이에 이어지는 Fc DAPG KK로 구성되었다. 쥐과 ICOS 결합제에 대해, VH 및 VL 서열을 실시예 16.2에 기재된 파지 디스플레이 절차로부터 획득하였다. FAP 결합제(28H1)의 생성 및 제조는 본원에 참조로 혼입되는 WO 2012/020006 A2에 기재되어 있다.

[0666] 이중특이성 작용성 ICOS 항체에 대한 아미노산 서열은 하기 표 23 및 24에서 찾을 수 있다.

표 23

[0667]

| 이중특이성 ICOS(16E09)-FAP(28H1) 2+1 쥐과 IgG ₁ DAPG의 아미노산 서열 | | |
|---|-------------------------------------|---|
| 서열번호 | 설명 | 서열 |
| 135 | VHCH1(16E09) Fc DAPG DD 중쇄-VH(28H1) | EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKLEWMI IYPGDSDRYSPSPFQGGV TISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARSSGPGYGLYLDYWGQGLVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSA AQTNSMVTGLGCLVKGYPPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQVITCNV AHPASSTKVDKKI VPRDCGCKPC ICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTI TLTPKVT CVVVAISKDDPEVQF SWFVDDVEVHTAQTKPREEQINSTRFSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFAP IEKTI SKTKGRP KAPQVYTIPPPKQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYDNTQPIMDTDGSYFVYSDLN VQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGGGGSGGGSGGGSGGGSEI VLTQSPGTL SL SPGERATLSCRASQSVSRSYLAWYQQKPGQAPRLLI IGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQGQV I PPTFGQGTKVEIK |
| 136 | VHCH1(16E09) Fc DAPG KK 중쇄-VL(28H1) | EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKLEWMI IYPGDSDRYSPSPFQGGV TISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARSSGPGYGLYLDYWGQGLVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSA AQTNSMVTGLGCLVKGYPPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQVITCNV AHPASSTKVDKKI VPRDCGCKPC ICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTI TLTPKVT CVVVAISKDDPEVQF SWFVDDVEVHTAQTKPREEQINSTRFSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFAP IEKTI SKTKGRP KAPQVYTIPPPKQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMKTDGSYFVYSKLN VQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLLESGGLVQ PGGSLRLS CAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKLEWVSAI WASGEQYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFDYWGQGLVTVSS |
| 131 | VLCL(16E09)-경쇄 | DI VMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLSHNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLI YLGSNRRASGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALWPTTFGQGTKVEIKRADAAPTIVSIFPPSSSEQLTSGGAS VVCFLNFFYPKDI NVKWKIDGSEKQNGVLSNWTQDQSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTC EATHK TSTSPIVKSFNRNEC |

표 24

[0668]

| 이중특이성 ICOS(16E09)-FAP(28H1) 1+1 쥐과 IgG ₁ DAPG의 아미노산 서열 | | |
|---|----|----|
| 서열번호 | 설명 | 서열 |

| | | |
|-----|----------------------------|---|
| 137 | VHCH1(16E09) Fc DAPG DD 중쇄 | EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMI IYPGDSSTRYSPSFQGGV TISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYCARSSGPGYGLYLDYWGQGLVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSA AQTNMVTGLGCLVEGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQVTVCNV AHPASSTKVDEKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTIITLTPKVTCVVVAISKDDPEVQF SWFVDDVEVHTAQTKPREEQINSTFRSVESELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFAPGAPIEKTI SKTKGRP KAPQVYTI PPPKQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYDNTQPIIMDTDGSYFVYSDLN VQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSP |
| 138 | VHCH1(28H1) Fc DAPG KK 중쇄 | EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQKPGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYVYQGGVIPPFTFGQGTKEIKSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNMVTGLG CLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQVTVCNV AHPASSTKVD KKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTIITLTPKVTCVVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVH TAQTKPREEQINSTFRSVESELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFAPGAPIEKTI SKTKGRPKAPQVYTI PP PPKQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIIMKTDGSYFVYSKLNVQKSNWEAGN TFCVSLHEGLHNHHTKSLSHSP |
| 131 | VLCL(16E09)-경쇄 | 표 23 |
| 139 | VLCL(28H1)-경쇄 | EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMS WVRQAPGKLEWVSAI WASGEQYYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAKGLGNFDYWGQGLVTVSSASDAAPTVISIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTITKDEYERHNSYTC EATHKTSTSPIVKSFNRNEC |

- [0669] 통상적인(PCR 기반이 아닌) 클로닝 기법을 사용하여 상응하는 cDNA를 에비트리아의 벡터 시스템에 클로닝하였다. 에비트리아 벡터 플라스미드를 유전자 합성하였다. 음이온 교환 크로마토그래피를 기반으로, 플라스미드 DNA를 낮은 내독소 조건하에 제조하였다. DNA 농도를 260 nm의 파장에서의 흡광도로 측정하였다. 서열의 정확도를 생어 시퀀싱(cDNA의 크기에 따른 플라스미드당 2개 이하의 시퀀싱 반응에 의함)에 의해 검증하였다.
- [0670] 현탁액-적응된 CHO K1 세포(원래 ATCC로부터 입수하고 에비트리아에서 현탁액 배양에서 혈청-미함유 성장에 적응됨)를 제조에 사용하였다. 종자를 화학적으로 정의되고 동물성 성분을 미함유하고 혈청을 미함유하는 배지인 에비그로우 배지에서 성장시켰다. 세포를 에비트리아의 맞춤형 제작된 전매 형질감염 시약인 에비팩트로 형질감염시키고, 형질감염 후, 세포를 동물성 성분을 미함유하고 혈청을 미함유하는 배지인 에비메이크2에서 성장시켰다. 상청액을 원심분리 및 후속의 여과(0.2 µm 필터)에 의해 수확하였다.
- [0671] 분비된 단백질을 단백질 A를 사용한 친화도 크로마토그래피에 이어서 크기 배제 크로마토그래피 의해 세포 배양 상청액으로부터 정제하였다. 친화도 크로마토그래피를 위해, 상청액을 40 mL 20 mM 나트륨 포스페이트, 20 mM 나트륨 시트레이트 pH 7.5로 평형도달된 단백질 A 맵셀렉트슈어 컬럼(CV = 5 mL, 지이 헬스케어)에 로딩하였다. 미결합된 단백질을 10 컬럼 부피 이상의 20 mM 나트륨 포스페이트, 20 mM 나트륨 시트레이트-함유 완충액(pH 7.5)에 의해 세척하였다. 결합된 단백질을 15 컬럼 부피의 20 mM 나트륨 시트레이트, 100 mM NaCl, 100 mM 글리신, 0.01% 트윈 20 pH 3.0에 생성된 염화 나트륨의 선형 pH-구배(20 mM로부터 100 mM)를 사용하여 용리시켰다. 이어서, 컬럼을 10 컬럼 부피의 20 mM 나트륨 시트레이트, 100 mM NaCl, 100 mM 글리신, 0.01% 트윈 20 pH 3.0으로 세척하였다. 채집된 분획의 pH를 1/40(v/v)의 2M Tris, pH 8.0을 첨가함으로써 조정하였다. 단백질을 농축하고 여과한 후, 20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl, 0.01% 트윈 20 pH 6.0으로 평형도달된 하이로드 슈퍼텍스 50/600 S200 컬럼(지이 헬스케어)에 로딩하였다.
- [0672] 정제된 이중특이성 구축물의 단백질 농도를 아미노산 서열을 기준으로 계산된 몰 흡광계수를 사용하여 280 nm의 OD에서 측정하였다. 이중특이성 구축물의 순도 및 분자량을 환원제(미국의 인비트로젠)의 존재 및 부재하에 랩 칩GXII(칼리퍼)를 사용하여 CE-SDS에 의해 분석하였다. 이중특이성 구축물의 응집 함량을 25 mM K₂HPO₄, 125 mM NaCl, 200 mM L-아르기닌 모노하이드로클로라이드, 0.02%(w/v) NaN₃, pH 6.7 전개 완충액으로 평형도달된 TSKgel G3000 SW XL 분석적 크기 배제 컬럼(토소)을 사용하여 25°C에서 분석하였다.
- [0673] 쥐과 ICOS 및 비표적화된 잔기에 대한 1가 또는 2가 결합을 갖는 이중특이성 항체의 생성(대조군 분자)
- [0674] ICOS에 대한 1가 또는 2가 결합을 갖는 하기 이중특이성 작용성 ICOS 항체를 표적화된 형식과 유사하게 도 18a 및 18b에 도시된 바와 같이 제조하되, 이는 항-FAP 대신, 비표적화된 잔기를 포함하였다.
- [0675] C) ICOS(16E09)-DP47 2+1, 비표적화된 항-쥐과 ICOS 2+1, muIgG₁ DAPG, 2가 쥐과 ICOS(16E09), 1가 비표적화된 잔기(DP47)(서열번호 140, 141 및 131).
- [0676] D) ICOS(16E09)-DP47 1+1, 비표적화된 항-쥐과 ICOS 1+1, muIgG₁ DAPG, 1가 쥐과 ICOS(16E09), 1가 비표적화된

잔기 DP47(서열번호 142, 143, 131 및 144).

[0677] 실시예 C에서, 비표적화된 항-쥐과 ICOS 2+1 구축물은 하기 성분으로 구성되었다: 중쇄(HC1): 항-ICOS(16E09)의 VHCH1과 이에 이어지는 쥐과 Fc DAPG DD(C-말단에서, 비결합 클론(DP47)의 VHCH1이 융합됨). 제2 중쇄(HC2)는 항-ICOS(16E09)의 VHCH1과 이에 이어지는 Fc DAPG KK(C-말단에서, 비결합 클론(DP47)이 융합됨)로 구성되었다.

[0678] 비표적화된 항-쥐과 ICOS 1+1 구축물은 하기 성분을 포함하였다: HC1은 항-ICOS(16E09)의 VHCH1과 이에 이어지는 쥐과 Fc DAPG DD로 구성되었다. HC2는 비결합 항체로서 DP47의 VHCH1과 이에 이어지는 쥐과 Fc DAPG KK로 구성되었다.

[0679] 비표적화된 작용성 ICOS 항체의 아미노산 서열은 하기 표 25 및 26에서 찾을 수 있다.

표 25

[0680] 이중특이성 2+1 비표적화된 DP47 항-ICOS(16E09) 쥐과 IgG₁ DAPG의 아미노산 서열

| 서열번호 | 설명 | 서열 |
|------|-------------------------------------|--|
| 140 | VHCH1(16E09) Fc DAPG DD 중쇄-VH(DP47) | EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWNGI IYPGSDSTRYSPSFQGGV TISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARSSGPYGLYLDYWGQGLTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSA AQTNMVTGLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQVITCNV AHPASSTKVDK I VPRDCGCKPC ICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTI TLTPKVT CVVAI SKDDPEVQF SWFVDDVEVHTAQTTPREEQINSTRFSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFAP IEKTI SKTKGRP KAPQVYTI PPPKQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYDNTQPIMDTDGSYFVYSDLN VQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGGGGSGGGSGGGSGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQYGSSPLTFGGQGTKVEIK |
| 141 | VHCH1(16E09) Fc DAPG KK 중쇄-VL(DP47) | EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWNGI IYPGSDSTRYSPSFQGGV TISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARSSGPYGLYLDYWGQGLTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSA AQTNMVTGLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQVITCNV AHPASSTKVDK I VPRDCGCKPC ICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTI TLTPKVT CVVAI SKDDPEVQF SWFVDDVEVHTAQTTPREEQINSTRFSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFAP IEKTI SKTKGRP KAPQVYTI PPPKQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYDNTQPIMKTDGSYFVYSKLN VQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWSVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGSDFYWGQGLTVTVSS |
| 131 | VLCL(16E09)-경쇄 | 표 23 |

표 26

[0681] 이중특이성 1+1 비표적화된 DP47 항-ICOS(16E09) 쥐과 IgG₁ DAPG의 아미노산 서열

| 서열번호 | 설명 | 서열 |
|------|----------------------------|--|
| 142 | VHCH1(16E09) Fc DAPG DD 중쇄 | EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWNGI IYPGSDSTRYSPSFQGGV TISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARSSGPYGLYLDYWGQGLTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSA AQTNMVTGLGCLVEGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQVITCNV AHPASSTKVDK I VPRDCGCKPC ICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTI TLTPKVT CVVAI SKDDPEVQF SWFVDDVEVHTAQTTPREEQINSTRFSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFAP IEKTI SKTKGRP KAPQVYTI PPPKQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYDNTQPIMDTDGSYFVYSDLN VQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSP |
| 143 | VHCH1(DP47) Fc DAPG KK 중쇄 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWSVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGSDFYWGQGLTVTVSSASDAAPTIVSIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNFPKDI NVKWKIDGSRQNGVLSWTDQDQSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEA THKTSTSP I V KSFNRNRCGCKPC ICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTI TLTPKVT CVVAI SKDDPEVQF SWFVDDVEVHTAQTTPREEQINSTRFSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFAP IEKTI SKTKGRP KAPQVYTI PPPKQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYDNTQPIMKTDGSYFVYSKLN VQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSP |
| 131 | VLCL(16E09)-경쇄 | 표 23 |
| 144 | 쥐과 VLCL(DP47)-경쇄 | EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGQGTKVEIKSSAKTTPPSVYPLAPGSA AQTNMVTGLG CLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQVITCNVAHPASSTKVD K I VPRDC |

[0682] 비표적화된 이중특이성 작용성 ICOS 분자를 FAP(28H1)-표적화된 이중특이성 작용성 ICOS 항체에 대해 본원에 전

술한 바와 같이 제조하였다.

[0683] 본원에 기재된 쥐과 ICOS(16E09)에 대한 1가 또는 2가 결합 및 FAP(28H1) 또는 DP47에 대한 1가 결합을 갖는 이종특이성 분자의 생화학적 분석 결과를 하기 표 27에 정리하였다.

표 27

| 이종특이성 FAP-ICOS 또는 DP47-ICOS 분자의 생화학적 분석 | | | |
|---|--------|----------|--------------------|
| 분자 | 단량체[%] | 수율[mg/L] | CE-SDS(비환원) [%] |
| ICOS(16E09)-FAP(28H1) 2+1 muIgG ₁ DAPG | 100 | 2.58 | 100 |
| ICOS(16E09)-FAP(28H1) 1+1 muIgG ₁ DAPG | 100 | 2.15 | 100 |
| ICOS(16E09)-DP47 2+1 muIgG ₁ DAPG | 100 | 2.36 | 95.5 |
| ICOS(16E09)-DP47 1+1 muIgG ₁ DAPG | 100 | 2.15 | 100 |

[0685] 실시예 18: ICOS에 대한 1가 또는 2가 결합 및 CEA에 대한 1가 결합을 갖는 이종특이성 항체의 생성

[0686] ICOS에 대한 1가 또는 2가 결합 및 CEA에 대한 1가 결합을 갖는 하기 이종특이성 작용성 ICOS 항체를 도 18a 및 18b에 기재된 바와 같이 제조하였다.

[0687] A) ICOS(JMab136)-CEA(MEDI-565) 2+1, CEA-ICOS₂₊₁ huIgG₁ P329G LALA, 2가 ICOS(JMab136), 1가 CEA(MEDI-565)(도 18a, 서열번호 153, 154 및 29).

[0688] B) ICOS(JMab136)-CEA(MEDI-565) 1+1, CEA-ICOS₁₊₁, huIgG₁ P329G LALA, 1가 ICOS(JMab136), 1가 CEA(MEDI-565)(도 18b, 서열번호 155, 29, 156 및 157).

[0689] CEA-ICOS₂₊₁ 구축물은 하기 성분으로 구성되었다: HC1을 항-ICOS(JMab136)의 VHCH1과 이에 이어지는 Fc 홀(C-말단에서, 항-CEA 결합제(MEDI-565)의 VH가 융합됨)로부터 구축하였다. HC2는 항-ICOS(JMab136)의 VHCH1과 이에 이어지는 Fc 늑(C-말단에서, 항-CEA 결합제(MEDI-565)의 VL이 융합됨)으로 구성되었다.

[0690] CEA-ICOS₁₊₁ 구축물은 하기 성분으로 구성되었다: HC1은 항-ICOS(JMab136)의 VHCH1과 이에 이어지는 Fc 홀. HC2는 항-CEA 결합제(MEDI-565)와 이에 이어지는 Fc 늑으로 구성되었다.

[0691] ICOS 결합제에 대해, 클론 JMab136의 VH 및 VL 서열은 US 2008/0199466 A1로부터 입수하였다. CEA 결합제에 대해, MEDI-565의 VH 및 VL 서열은 WO 2014/079886 A1로부터 입수하였다.

[0692] Fc 늑과 Fc 홀 쇠의 조합은 이종이량체의 생성을 가능하게 한다. 국제 특허 출원 공개 WO 2012/130831 A1에 기재된 방법에 따라, Pro329Gly, Leu234Ala 및 Leu235Ala 돌연변이를 늑 및 홀 쇠의 불변부에 도입하여 Fc γ에 대한 결합을 제거하였다.

[0693] 이종특이성 작용성 ICOS 항체의 아미노산 서열은 하기 표 28 및 29에서 찾을 수 있다.

표 28

| 이종특이성 2+1 CEA(MEDI-565)-표적화된 항-ICOS(JMab136) 인간 IgG ₁ P329G LALA의 아미노산 서열 | | |
|--|------------------------------------|---|
| 서열번호 | 설명 | 서열 |
| 29 | VLCL(JMab136) 경쇄 | 표 1 |
| 153 | VHCH1(JMab136)-Fc 늑 쇠-VH(MEDI-565) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFTGYMHWRQAPGQGLEWMGW INPHSGGTNYAQKFQGRV TMRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARTYYDSSGYHDAFDI WGQGTMTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDL DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGGGGSGGGSGGGSGGGSSQA VLTQPASLSASPGASASLTCTLRRLINVGAYS IYWYQQKPGSPQQYLLRYSKSDSDKQQGSGVSSRFS SKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCM IWHSGASAVFGGGTKLTVL |

| | | |
|-----|--------------------------------------|---|
| 154 | VHCH1(JMab136)-Fc 홀쇄-VL(MEDI-565) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYYMHVWRQAPGGLEWMGW INPHSGGTNYAQKFQGRV TMRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARTYYDSSGYYHDAFDIWGQGMVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVKDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGGGGGGGGGSEVQLVESSGGGLV QGRSLRLSCAASGFTVSSYWMHWRQAPGKLEWVGFIRNKANGGTTEY AASVKGRFTISRDDSKNT LYLQMNLSRAEDTAVYYCARDRLRFYFDYWGQGTITVTVSS |
|-----|--------------------------------------|---|

표 29

[0695]

| 이중특이성 1+1 CEA(MEDI-565)-표적화된 항-ICOS(JMab136) 인간 IgG ₁ P329G LALA 의 아미노산 서열 | | |
|--|--------------------------|---|
| 서열번호 | 설명 | 서열 |
| 155 | VHCH1(JMab136)-Fc 홀쇄 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYYMHVWRQAPGGLEWMGW INPHSGGTNYAQKFQGRV TMRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARTYYDSSGYYHDAFDIWGQGMVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVKDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSP |
| 29 | VLCL(JMab136) 경쇄 | DIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCRASQGISRLRLAWYQQKPKGKAPKLLIYVASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC |
| 156 | VHCH1(MEDI-565)-Fc 놉쇄 | QAVLTQPASLSASPGASASLTCTLRRIINGVAYSIIYWYQQKPGSPQYLLRYKSDSDKQGGSGVSSRF SASKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCMIWHSGASAVFGGKTLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVKDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAK KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLVCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLV SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSP |
| 157 | VLCL(MEDI-565) 경쇄 | EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTVSSYWMHWRQAPGKLEWVGFIRNKANGGTTEY AASVKG RFTISRDDSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDRLRFYFDYWGQGTITVTVSSASVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTLTLTKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |

[0696]

ICOS에 대한 1가 또는 2가 결합 및 CEA에 대한 1가 결합을 갖는 이중특이성 작용성 ICOS 항체를 실시예 17에서 FAP(28H1)-표적화된 이중특이성 작용성 ICOS 항체에 대해 기재된 바와 같이 제조하였다. 상기 이중특이성 분자의 생화학적 분석 결과를 하기 표 30에 정리하였다.

표 30

[0697]

| 이중특이성 CEA-ICOS 또는 DP47-ICOS 분자의 생화학적 분석 | | | |
|---|---------|-----------|--------------------|
| 분자 | 단량체 [%] | 수율 [mg/L] | CE-SDS(비환원) [%] |
| CEA(MEDI565)-ICOS(JMab136)_1+1 | 94 | 4.55 | 91 |
| CEA(MEDI565)-ICOS(JMab136)_2+1 | 97 | 3.41 | 97 |

[0698]

쥐과 ICOS에 대한 1가 또는 2가 결합 및 CEA에 대한 1가 결합을 갖는 이중특이성 항체의 생성

[0699]

쥐과 ICOS에 대한 1가 또는 2가 결합 및 CEA에 대한 1가 결합을 갖는 하기 이중특이성 작용성 ICOS 항체를 도 18a 및 18b에 기재된 바와 같이 제조하였다.

[0700]

C) ICOS(16E09)-CEA(A5B7) 2+1 muIgG₁ DAPG, CEA-표적화된 항-쥐과 ICOS_2+1, muIgG₁ DAPG, 2가 쥐과 ICOS(16E09), 1가 CEA(A5B7)(서열번호 166, 167 및 131).

[0701]

D) ICOS(16E09)-CEA(A5B7) 1+1 muIgG₁ DAPG, CEA-표적화된 항-쥐과 ICOS_1+1, muIgG₁ DAPG, 1가 쥐과

ICOS(16E09), 1가 CEA(A5B7)(서열번호 137, 131, 168 및 169).

[0702] 실시예 C에서, CEA-표적화된 항-쥐과 ICOS₂₊₁ 구축물의 HC1은 하기 성분으로 구성되었다: C-말단에서 항-CEA 결합제(A5B7)가 융합되는 쥐과 Fc DAPG DD의 항-ICOS(16E09)의 VHCH1. HC2는 C-말단에서 항-CEA 결합제(A5B7)의 VH가 융합되는 쥐과 FcDAPG KK의 항-ICOS(16E09)의 VHCH1로 구성되었다.

[0703] CEA-ICOS₁₊₁ 구축물(실시예 D)은 HC1(쥐과 Fc DAPG DD의 항-ICOS(16E09)의 VHCH1)로 구성되었다. HC2는 항-CEA(A5B7)의 VHCH1과 이에 이어지는 Fc DAPG KK로 구성되었다.

[0704] Fc-DD와 Fc-KK 쇄의 조합은 이중이량체의 생성을 가능하게 한다. 문헌[Baudino et al. J. Immunol] 또는 WO 2016/030350 A1에 기재된 방법에 따라, DAPG 돌연변이는 중쇄의 불변부에 도입되어 쥐과 Fc 수용체에 대한 결합을 제거한다.

[0705] 이중특이성 작용성 ICOS 항체에 대한 아미노산 서열은 하기 표 31 및 32에서 찾을 수 있다.

표 31

[0706]

| 이중특이성 2+1 CEA(A5B7)-표적화된 항-ICOS(16E09) 쥐과 Ig _{G1} DAPG의 아미노산 서열 | | |
|--|-------------------------------------|---|
| 서열번호 | 설명 | 서열 |
| 166 | VHCH1(16E09) Fc DAPG DD 중쇄-VL(A5B7) | EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMI IYPGSDTRYSPSFQGGV TISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARSSGPGYGLYLDYWGQGLT LVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSA AQTNMVT LGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNV AHPASSTKV DKKI VPRDCGCKPC ICTVPEVSSVF IFPPKPKDVLTI TLTPKVT CVVAI SKDDPEVQF SWFVDDVEVHTAQTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAF GAP IEKTI SKTKGRP KAPQVYTIPPPKQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYDNTQPIMDTDGYSYFVYSDLN VQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGGGGSGGGSGGGSGGGSSQT VLSQSPAILSA SPGEKVTMTCRASSSVTYIHWYQQKPGSSPKSWIYATSNL ASGVPARFSGSGSGTYSYSLTISRVEAED AATYYCQHWSSKPPTFGGGTKLEIK |
| 167 | VHCH1(16E09) Fc DAPG KK 중쇄-VH(A5B7) | EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMI IYPGSDTRYSPSFQGGV TISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARSSGPGYGLYLDYWGQGLT LVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSA AQTNMVT LGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNV AHPASSTKV DKKI VPRDCGCKPC ICTVPEVSSVF IFPPKPKDVLTI TLTPKVT CVVAI SKDDPEVQF SWFVDDVEVHTAQTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAF GAP IEKTI SKTKGRP KAPQVYTIPPPKQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPI MKTDGYSYFVYSKLN VQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGGGGSGGGSGGGSGGGSEVKLVESGGGLVQ PGGSLRLSCATSGFTFTDYIMNWRQPPGKALEWLGFIGNKANGY TTEYSASVKGRFTISRDKS QSIL YLQMNTRAE DSATYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTLTVSS |
| 131 | VLCL(16E09)-경쇄 | 표 19 |

표 32

[0707]

| 이중특이성 1+1 CEA(A5B7)-표적화된 항-ICOS(16E09) 쥐과 Ig _{G1} DAPG의 아미노산 서열 | | |
|--|----------------------------|--|
| 서열번호 | 설명 | 서열 |
| 137 | VHCH1(16E09) Fc DAPG DD 중쇄 | 표 24 |
| 168 | VHCH1(A5B7) Fc DAPG KK 중쇄 | EVKLVESGGGLVQPGSLRLSCATSGFTFTDYIMNWRQPPGKALEWLGFIGNKANGY TTEYSASVKG RFTISRDKS QSILYLQMNTRAE DSATYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTLTVSSASDAAPT VSI FPPSS EQLTSGGASVVCFLNFPKDI NVKWKIDGSE RQNGVLNSWTDQDSK DSTYSMSSTLTLTKDEYERHN SYTCEATHKTSTSPI V KSFNRNECGCKPC ICTVPEVSSVF IFPPKPKDVLTI TLTPKVT CVVAI SKD DPEVQF SWFVDDVEVHTAQTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAF GAP IEKTI SKTKGRP KAPQVYTIPPPKQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPI MKTDGYSYF VYSKLN VQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSP |
| 131 | VLCL(16E09)-경쇄 | 표 19 |
| 169 | VLCL(A5B7)-경쇄 | QTVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVTYIHWYQQKPGSSPKSWIYATSNL ASGVPARFSGSGSGTYSYSLTISRVEAEDAATYYCQHWSSKPPTFGGGTKLEIKSSAKTTPPSVYPLAPGSA AQTNMVT LGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNV AHPASSTKV DKKI VPRDC |

[0708] 쥐과 ICOS에 대한 1가 또는 2가 결합 및 CEA에 대한 1가 결합을 갖는 이중특이성 작용성 ICOS 항체를 FAP(28H1)-표적화된 이중특이성 작용성 ICOS 항체에 대해 본원에 진술한 바와 같이 제조하였다. 상기 이중특이성 분자의 생화학적 분석을 하기 표 33에 정리하였다.

표 33

[0709]

| CEA-ICOS 분자의 생화학적 분석 | | | |
|---|--------|----------|-----------------|
| 분자 | 단량체[%] | 수율[mg/L] | CE-SDS(비환원) [%] |
| ICOS(16E09)-CEA(A5B7) 2+1 muIgG ₁ DAPG | 100 | 3.1 | 96.1 |
| ICOS(16E09)-CEA(A5B7) 1+1 muIgG ₁ DAPG | 100 | 5.97 | 97.4 |

[0710] 실시예 19: 인간 ICOS 또는 인간 CEA를 발현하는 세포에 대한 이중특이성 작용성 ICOS 항체의 결합

[0711] 실시예 18에서 제조된 몇몇 이중특이성 작용성 ICOS 항체의 결합을 ICOS-양성의 미리 활성화된 PBMC 또는 CEA-양성 MKN45 세포(인간 위 암종 세포주, DSMZ ACC 409)를 사용하여 시험하였다. 요약하면, 연막 또는 건강한 기증체로부터의 신선한 혈액으로부터 단리된 인간 PBMC(실시예 5.1에 기재됨)를 2 µg/mL PHA-L(로슈, # 11249738001) 및 100 유닛/mL 제조함 인간 IL-2(프로류킨, 노바티스)를 포함하는 RPMI1640 중 습윤된 항온배양기에서 37°C로 48시간 동안 mL당 백만개의 세포 밀도로 항온배양하였다.

[0712] 분석하는 날, 미리 활성화된 PBMC 세포를 수확하고 PBS로 세척하고, FACS 완충액(0.1 BSA를 갖는 PBS) 중 20만개의 세포를 96 환저 웰 플레이트의 웰마다 플레이팅하였다. 마찬가지로, 부착 MKN45 종양 세포를 트립신(기브코, 25300-054)을 사용하여 탈착하고 세척하고, 15만개의 세포를 환저 96 웰 플레이트로 옮겼다. 후속의 염색을 증가하는 농도의 항-ICOS(7 pM 내지 120 nM)에 의해 4°C로 30분 동안 수행하였다. 이어서, 세포를 차가운 PBS 0.1% BSA로 2회 세척하고 잭슨 이뮤노 리서치 랩으로부터의 표지된 2차 항체(알렉사 플루오르 647-접합된 어피니퓨어 F(ab')₂ 단편 염소 항-인간 IgG, Fc γ 단편 특이성, 190-606-008)에 의해 4°C로 추가로 30분 동안 항온배양하였다. 웰당 FACS 완충액 중 1% PFA(75 µL)를 사용하여, 세포를 FACS 완충액으로 세척하고, 염색을 암실에서 4°C로 20분 동안 고정하였다.

[0713] FACS 포르테사(소프트웨어 FACS 디바)를 사용한 FACS에 의해 형광을 분석하였다. 결합 곡선 및 EC₅₀ 값을 그래프패드프리즘6을 사용하여 수득하였다.

[0714] 결과는 CEA-ICOS 분자가 CD4⁺ 및 CD8⁺ T-세포의 인간 ICOS(도 19a 및 19b) 및 인간 CEA(도 19c 및 19d)에 농도-의존적으로 결합할 수 있음을 나타낸다. EC₅₀ 값은 하기 표 34에 제시되어 있다. 분자 둘다는 인간 ICOS에 대해 유사한 결합 프로파일을 나타낸다. 그러나, ICOS(JMab136)-CEA(MEDI565) 1+1 분자가 ICOS(JMab136)-CEA(MEDI565) 2+1 분자에 비해 인간 CEA에 대한 더 우수한 결합을 나타내고, 여기서 CEA는 VH-VL로서 Fc 영역의 C-말단에 융합된다. 이것이 상이한 기능적 활성으로 번역되는 것을 확인하기 위해, PBMC 효과기 및 CEA- 및 FAP-양성 표적 세포에 의한 동반-배양 분석을 수행하였다(실시예 20).

표 34

[0715]

| ICOS ⁺ PBMC 또는 CEA-양성 MKN45 세포에 대한 상이한 CEA-ICOS 분자의 결합의 EC ₅₀ 값 | | | | |
|---|---------------------------|------|----------|------------|
| 분자 | 결합 EC ₅₀ (MFI) | | | |
| | 인간 ICOS | | 인간 CEA | |
| | CD4 | CD8 | MFI A647 | Freq A647+ |
| ICOS(JMab136)-CEA(MEDI565) 1+1 | n.c. | n.c. | n.c. | 52.73 |
| ICOS(JMab136)-CEA(MEDI565) 2+1 | n.c. | n.c. | n.c. | 454.3 |

[0716] 실시예 20: TCB 유도된 T-세포 활성화의 ICOS-매개되는 촉진(유동 세포분석)

[0717] FAP- 또는 CEA-표적화된 이중특이성 작용성 ICOS 분자가 T-세포의 CEACAM5-TCB-매개되는 활성화를 추가로 증폭시키는 능력을 CEA-양성 MKN45 및 FAP-발현 NIH/3T3-huFAP c1.19 세포(ATCC, CCL-92, 인간 FAP를 안정하게 과

발현하도록 형질감염됨), 및 인간 PBMC의 동반-배양에서 평가하였다.

[0718] 요약하면, 실험 1일 전, 부착 표적 분자를 세포 해리 완충액(기브코, 13151014)에 의해 수확하고 평저 96 웰 플레이트에 10000 세포/웰의 밀도로 플레이팅하였다. 이에 따라, X-선 조사기 RS 2000(라드 소스(Rad source))를 사용하여, NIH/3T3-huFAP 클론 19 세포를 플레이팅 전 추가적으로 5000 rad로 조사하였다(필터 없이 조사, 레벨 5). 표적 세포를 방사 방지하여 부착되게 하였다. 실시예 5.1에 기재된 바와 같이, 연막(블러즈펜데 취리히)으로부터의 고농도 림프구 제제의 히스토파크(시그마-알드리치, Cat No. 10771-500ML Histopaque 1077) 밀도 원심분리에 의해 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 제조하였다.

[0719] 고정된 농도의 80 pM CEACAM5-TCB의 존재하에, 5:1:1의 존재 비의 PBMC 효과기, MKN4 및 NIH3T3-huFAP 표적 세포 및 증가하는 농도(3반복에서 0.11 내지 5000 pM)의 FAP- 또는 CEA-표적화된 ICOS 분자의 동반-항온배양시 48 시간 후, T-세포 활성화를 측정하였고, 실시예 12를 참고한다. 표적화된 ICOS 및 TCB 분자에 의한 동시 치료시 T-세포 활성화는 TCB 단일 치료를 참조로 하였다.

[0720] 도 20a 및 20b에 도시된 바와 같이, CEA-ICOS 및 FAP-ICOS 이중특이성 분자 둘다는 CD4⁺ T-세포의 활성화 마커 CD69의 상향조절에 의해 측정시, CEACAM5-TCB 처리에 의한 단일 치료에 비해 TCB-매개되는 활성화를 더욱 증가시킬 수 있다. 도 20a에 강조표시한 바와 같이, 효과는 농도-의존적이고 ICOS 분자의 높은 농도에서 감소한다. TCB 단일 치료에 관한 배수 증가를 하기 표 35에 나타냈다.

[0721] 명백히, CEA-ICOS 분자가 FAP-표적화된 분자에 비해 TCB-매개되는 T-세포 활성화를 더욱 증폭하는데 더 우수하다. 형식 둘다는 표적화 잔기와는 독립적으로 동등하게 효능이 있다. TCB 단일 치료에 대한 조합 치료의 배수 증가를 CEA- 또는 FAP-표적화된 1+1 또는 2+1 형식(2개의 대표적인 기증체)의 지시된 농도에서 도 20b에 도시하였다.

표 35

| TCB 단일 치료에 비해 표적화된 ICOS 분자 및 TCB에 의한 조합 치료시 CD4 ⁺ T-세포의 CD69의 유도의 배수 증가 | | | | |
|--|--|-----------|---|-----------|
| 분자 | TCB 단독 대비 배수 증가 (1000 pM CEA-ICOS) (% CD69 ⁺ CD4 ⁺) | | TCB 단독 대비 배수 증가 (200 pM CEA-ICOS) (% CD69 ⁺ CD4 ⁺) | |
| | 기증체 1(D1) | 기증체 2(D2) | 기증체 1(D1) | 기증체 2(D2) |
| ICOS(JMab136)-FAP(4B9)) 1+1 | 2.65 | 1.68 | 2.50 | 1.50 |
| ICOS(JMab136)-FAP(4B9)) 2+1 | 2.66 | 1.96 | 2.66 | 1.38 |
| ICOS(JMab136)-CEA(MED I565) 1+1 | 5.95 | 2.47 | 4.99 | 2.91 |
| ICOS(JMab136)-CEA(MED I565) 2+1 | 5.52 | 1.99 | 5.17 | 2.86 |

[0722]

실시예 21: 쥐과 ICOS 또는 인간 CEA를 발현하는 세포에 대한 쥐과 ICOS 분자의 결합(유동 세포분석)

[0723]

ICOS-양성 CHO(ATCC, CCL-61, 쥐과 ICOS를 안정하게 과발현하도록 형질감염됨), FAP-양성 NIH/3T3-moFAP c1.34 세포(ATCC, CCL-92, 쥐과 FAP를 안정하게 과발현하도록 형질감염됨) 또는 CEA-양성 MKN45 세포를 사용하여, 실시예 17 또는 18에서 제조된 몇몇 ICOS 분자의 결합을 시험하였다.

[0724]

[0725] 요약하면, 부착된 MKN45, NIH/3T3-moFAP 또는 CHO-mICOS 세포를 트립신(기브코, 25300-054)을 사용하여 탈착하고 세척하고, 10만개의 세포를 환저 96 웰 플레이트로 옮겼다. CEA-ICOS/FAP-ICOS의 증가하는 농도(3 pM 내지 200 nM)에 의해 4°C로 30분 동안 후속의 염색을 수행하였다. 이어서, 세포를 차가운 PBS 0.1% BSA로 2회 세척하고 표지된 2차 항체(PE-접합됨, 잭슨 이뮤노 리서치 랩으로부터의 # 715-116-150, FACS 완충액 중 1 내지 50 으로 희석됨)에 의해 4°C에서 30분 동안 추가로 항온배양하였다. 웰당 FACS 완충액 중 1% PFA(75 µL)를 사용하여, 세포를 FACS 완충액으로 세척하고, 염색을 암실에서 4°C로 20분 동안 고정하였다. 세포를 FACS 완충액으로 2회 세척하고 분석을 위해 FACS 완충액 중 재현탁하였다.

[0726]

FACS 포르테사(소프트웨어 FACS 디바)를 사용한 FACS에 의해 형광을 분석하였다. 결합 곡선 및 EC₅₀ 값을 그래프패드프리즘6을 사용하여 수득하였다.

[0727] 결과는 CEA- 및 FAP-표적화된 항-쥐과 ICOS 분자가 쥐과 ICOS 및 인간 CEA 또는 쥐과 FAP에 농도-의존적으로 결합할 수 있음을 나타낸다. EC₅₀ 값은 하기 표 36에 제시되어 있다. 분자 둘다는 인간 ICOS에 대해 유사한 결합 프로파일을 나타낸다. 예상대로, 쥐과 ICOS를 2가 표적으로 하는 2+1 이중특이성 형식은 쥐과 ICOS에 대해 1가 결합을 갖는 형식보다 더 우수한 결합을 나타낸다. ICOS(16E09)-FAP(28H1) 2+1 및 ICOS(16E09)-CEA(A5B7) 2+1의 이의 각각의 표적 쥐과 FAP 또는 인간 CEA에 대한 결합은 상응하는 1+1 형식에 비해 약하다. 이는 인간 분자에 대해 관찰되는 결합 효능과 일관되고, 표적화 잔기가 VH-VL로서 융합될 때(Fab 팔(arm)로서 포함됨) 1+1 형식에 비해 약한 표적화 잔기의 친화도에 의해 설명된다.

표 36

[0728]

| 세포에 발현된 쥐과 FAP 또는 인간 CEA에 대해 표적화된 상이한 쥐과 ICOS 분자의 결합의 EC ₅₀ 값 | | | | |
|--|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| EC ₅₀ [pM] | ICOS(16E09)-FAP(28H1) 2+1 | ICOS(16E09)-FAP(28H1) 1+1 | ICOS(16E09)-CEA(A5B7) 2+1 | ICOS(16E09)-CEA(A5B7) 1+1 |
| 쥐과 ICOS | 2882 | 17091 | 3443 | 23238 |
| 쥐과 FAP | 2862 | 141.6 | n.d. | n.d. |
| 인간 CEA | n.d. | n.d. | 90947 | 1118 |

[0729] 실시예 22: TCB-유도되는 T-세포 활성화의 ICOS-매개되는 증폭(유동 세포 분석)

[0730] FAP- 또는 CEA-표적화된 이중특이성 작용성 ICOS 분자가 T-세포의 CEACAM5-TCB-매개되는 활성화를 추가로 증폭시키는 능력을 CEA-양성 MC38-hCEA(문헌[Cancer Res 1975, 35:2434-2440] 및 쥐과(및 인간) FAP-발현 NIH/3T3-huFAP 클론 19 세포(ATCC, CCL-92, 인간 FAP를 안정하게 과발현하도록 형질감염됨), 및 C57B1/6 마우스로부터의 쥐과 비장세포의 동반-배양에서 평가하였다. 음성 대조군으로서 DP47-표적화된 버전을 포함시켰는데, 이는 분석에 포함되는 임의이 세포에 결합하지 않는 것이다. 48시간 후, 쥐과 CD4⁺ 및 CD8⁺ T-세포에서 CD69의 상향조절로서 T-세포 활성화를 평가하였다.

[0731] 요약하면, 실험 1일 전, 부착 표적 분자를 세포 해리 완충액(기브코, 13151014)에 의해 수확하고 평저 96 웰 플레이트에 10000 세포/웰의 밀도로 플레이팅하였다. 이에 따라, X-선 조사기 RS 2000(라드 소스)를 사용하여, NIH/3T3-huFAP 클론 19 세포를 플레이팅 전 추가적으로 5000 rad로 조사하였다(필터 없이 조사, 레벨 5). 표적 세포를 방사 방지하여 부착되게 하였다. C57B1/6 비장세포를 MACS 완충액(PBS + 0.5% BSA + 2 mM EDTA)으로 채워진 젠틀MACS C-관(밀텐이)에 넣어 단리하였다. 비장을 젠틀MACS 해리기를 사용하여 해리시키고, 관을 잠시 원심분리시키고, 세포를 100 μm 나일론 세포 스트레이너를 통해 통과시켰다. 이어서, 관을 3 mL RPMI1640 배지(시그마, Cat. No. R7388)로 행구고 8분 동안 350 x 3 g로 원심분리하였다. 상청액을 버리고, 세포 현탁액을 70 μm 나일론 세포 스트레이너를 통해 통과시키고 배지로 세척하였다. 또다른 원심분리(350 x 8 g, 8분) 후, 상청액을 버리고 5 mL ACK 용해 완충액을 첨가하였다. 실온에서 항온배양 5분 후, 세포를 RPMI 배지로 세척하였다.

[0732] 이어서, 세포 계수(바이-셀-세팅스 백혈구, 1:10 희석)를 위해, 분석 배지(RPMI1640, 10 % FCS, 1 % 글루타맥스(기브코 #35050061), 1 μM 나트륨 피루베이트(기브코 #11360070), 1 μM β-머캅토에탄올(시그마, #M3148-100), 1 x 비필수 아미노산(NEAA, 시그마, Cat. No. M7145), 1 x 항생물-항진균제(기브코 #15240062), 100 U/mL IL-2를 함유함)에 세포를 재현탁하였다.

[0733] 비장세포, CEA-양성 종양 및 쥐과 FAP-양성 섬유아세포를 3:1:1의 최종 비로 37°C, 5% CO₂로 동반-항온배양시, T-세포 활성화 마커 CD69(조기 활성화 마커)를 인식하는 항체를 사용하여 쥐과 T-세포 활성화를 측정하였다. 쥐과 FAP-ICOS 또는 CEA-ICOS 분자를 지시된 농도(3반복에서 5 내지 75000 pM)로 첨가하고, 쥐과 CEA-TCB를 고정 농도(1.5 nM)로 첨가하였다. 표적화된 ICOS 및 TCB 분자에 의한 동시적 치료시 T-세포 활성화에 TCB 단일 치료를 참조하였다

[0734] 요약하면, 비장세포를 400 x g로 4분 동안 원심분리하고 0.1% BSA를 함유하는 포스페이트 완충된 염수(PBS)(FACS 완충액)로 2회 세척하였다. CD45(A1F1700 항-마우스 CD45, 바이오레전드, #103132), CD8(Bv711 항-마우스 CD8a, 바이오레전드 #100747), CD4(Bv421 항-마우스 CD4, 바이오레전드 # 100438) 및 CD69(Pe/Cy7 항-마우스 CD69, 바이오레전드 #104512)에 대한 표면 염색을 공급사의 지침에 따라 수행하였다. 0.1% BSA를 함유

하는 150 μ L PBS로 세포를 2회 세척하고 1% PFA를 함유하는 75 μ L/웰 FACS 완충액을 사용하여 4°C로 15 내지 30분 동안 고정하였다. 원심분리후, 샘플을 150 μ L/웰 FACS 완충액 중 재현탁하고 BD FACS 포르테사를 사용하여 분석하였다.

[0735] 도 22a 내지 22d는 쥐과 CD4⁺ 또는 CD8⁺ T-세포에서 활성화 마커 CD69의 상향조절에 의해 측정시 CEA- 및 FAP-표적화된 항-쥐과 ICOS 분자 둘다가 muCEA-TCB 처리에 의한 단일 치료에 비해 TCB-매개되는 활성화를 더욱 증가 시킴을 나타낸다. CD4⁺ T-세포에 대한 CEA-표적화된 1+1의 효과는 농도-의존적이고 CEA-표적화된 1+1 ICOS 분자의 고농도에서 감소한다(상가 각각의 인간 분자에 대해 관찰된 바와 유사함). DP47-표적화된 참조 버전이 TCB-활성화된 T-세포의 임의의 추가 활성화를 유의하게 증폭시키지 않았음에 기인하여, 활성화는 ICOS 및 CEA 또는 FAP에 동시적 결합에 의한 가교결합된 분자에 의존하였다. TCB 단일 치료에 대한 배수 증가를 하기 표 37에 나타냈다.

표 37

[0736] TCB 단일 치료와 비교한 표적화된 ICOS 분자 및 TCB에 의한 조합 시료시, 쥐과 CD4⁺ 및 CD8⁺ T-세포에서 CD69의 유도의 배수 증가

| 분자 | TCB 단독 대비 배수 증가 (3 nM CEA- 또는 FAP-ICOS) | | TCB 단독 대비 배수 증가 (75 nM CEA- 또는 FAP-ICOS) | |
|---------------------------|--|-------------------------------------|---|-------------------------------------|
| | %CD69 ⁺ CD4 ⁺ | %CD69 ⁺ CD8 ⁺ | %CD69 ⁺ CD4 ⁺ | %CD69 ⁺ CD8 ⁺ |
| ICOS(16E09)-FAP(28H1) 2+1 | 1.1 | 2.3 | 1.1 | 2.4 |
| ICOS(16E09)-FAP(28H1) 1+1 | 1.2 | 1.9 | 1.2 | 1.9 |
| ICOS(16E09)-CEA(A5B7) 2+1 | 1.0 | 1.8 | 1.0 | 1.9 |
| ICOS(16E09)-CEA(A5B7) 1+1 | 1.3 | 1.8 | 1.2 | 1.7 |

[0737] CEA-ICOS 이중특이성 분자는 FAP-표적화된 분자에 비해 TCB-매개된 T-세포 활성화를 더욱 증폭시키는데 우월하였다. 인간 ICOS를 표적화하는 분자에 있어서, 형식 둘다가 표적화 잔기와는 독립적으로 동등하게 효능이 있다.

[0738] 참조 문헌

[0739] Allen F., Bobanga J., et al., CCL3 in the tumor microenvironment augments the antitumor immune response. *J Immunol* May 1, 2016, 196 (75.11).

[0740] Allison J, Sharma P, Quezada, S.A., Fu T. Combination immunotherapy for the treatment of cancer, WO2011/041613A2 2009.

[0741] Bacac M, Fauti T, Sam J, et al. A Novel Carcinoembryonic Antigen T-Cell Bispecific Antibody (CEA TCB) for the Treatment of Solid Tumours. *Clin Cancer Res*. 2016 Jul 1; 22(13):3286-97.

[0742] Bacac M, Klein C, Umana P. CEA TCB: A novel head-to-tail 2:1 T cell bispecific antibody for treatment of CEA-positive solid tumours. *Oncoimmunology*. 2016 Jun 24;5(8).

[0743] Carthon B C et al., "Preoperative CTLA-4 blockade: Tolerability and immune monitoring in the setting of a presurgical clinical trial *Clin Cancer Res*. 2010 16(10); 2861-71.

[0744] Dammeijer F., Lau S.P., van Eijck C.H.J., van der Burg S.H., Aerts J.G.J.V. Rationally combining immunotherapies to improve efficacy of immune checkpoint blockade in solid tumours. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2017 Aug; 36: 5-15.

[0745] Davidson E.H., Hood L., Dimitrov K., Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nature biotechnology* 2008; 26:317-325.

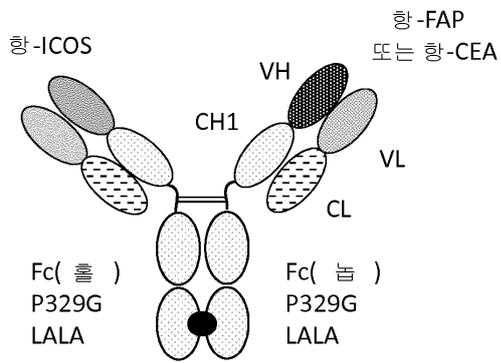
[0746] Fu T et al., The ICOS/ICOSL pathway is required for optimal antitumour responses mediated by 항-CTLA-4 therapy. *Cancer Res*. 2011, 71(16); 5445-54.

[0747] Geiss G.K. et al., Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol*. 2008 Mar;26(3):317-25.

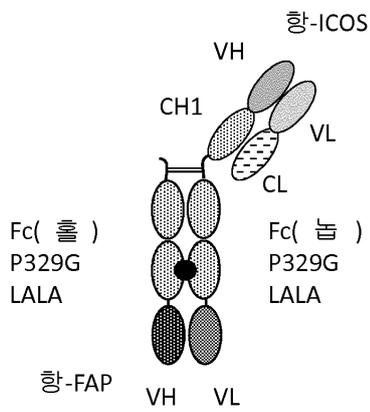
- [0748] Giacomo A M D et al., "Long-term survival and immunological parameters in metastatic melanoma patients who respond to ipilimumab 10 mg/kg within an expanded access program", *Cancer Immunol Immunother.* 2013, 62(6); 1021-8.
- [0749] Gu-Trantien C., Migliori E., et al., CXCL13-producing TFH cells link immune suppression and adaptive memory in human breast cancer. *JCI Insight.* 2017 Jun 2;2(11).
- [0750] Hutloff A., Dittrich A. M., Beier K. C., Eljaschewitsch B., Kraft R., Anagnostopoulos I., Kroczeck R. A. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature.* 1999 Jan 21;397(6716):263-6.
- [0751] Im S.J., Hashimoto M., et al., Defining CD8+ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy. *Nature.* 2016 Sep 15; 537(7620): 417-421.
- [0752] Liakou C I et al., CTLA-4 blockade increases IFN-gamma producing CD4+ICOShi cells to shift the ratio of effector to regulatory T cells in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008,105(39); 14987-92.
- [0753] Manzoor A. M., *Developing Costimulatory Molecules for Immunotherapy of Diseases*, Academic Press, 2015; eBook ISBN 9780128026755.
- [0754] Paulos C. M., Carpenito C., Plesa G., Suhoski M. M., Varela-Rohena A., Golovina T. N., Carroll R. G., Riley J. L., June C. H. The inducible costimulator (ICOS) is critical for the development of human T(H)17 cells. *Sci Transl Med.* 2010 Oct 27;2(55):55ra78.
- [0755] Sharma P, Allison J 2015. The future of immune checkpoint therapy. *Science* 2015; 348: 56-61.
- [0756] Simpson T. R., Quezada S. A., Allison J. P. Regulation of CD4 T cell activation and effector function by inducible costimulator (ICOS). *Current Opinion in Immunology* 2010, 22.
- [0757] Vonderheide R H et al., Tremelimumab in combination with exemestane in patients with advanced breast cancer and treatment-associated modulation of inducible costimulator expression on patient T cells, *Clin Cancer Res.* 2010, 16(13); 3485-94.
- [0758] Wakamatsu E., Mathis D., Benoist C. Convergent and divergent effects of costimulatory molecules in conventional and regulatory CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Jan 15; 110(3):1023-8.
- [0759] Warnatz K., et al., Human ICOS deficiency abrogates the germinal center reaction and provides a monogenic model for common variable immunodeficiency. *Blood* 2006 107:3045-3052.
- [0760] Yao S., Zhu Y., Zhu G., Augustine M., Zheng L., Goode D. J., Broadwater M., Ruff W., Flies S., Xu H., Flies D., Luo L., Wang S., Chen L. B7-h2 is a costimulatory ligand for CD28 in human. *Immunity.* 2011 May 27;34(5):729-40.
- [0761] Young, M. R. I., Th17 Cells in Protection from Tumor or Promotion of Tumor Progression. *J Clin Cell Immunol.* 2016 Jun; 7(3): 431.
- [0762] Yuraszcek et al., Translation and Clinical Development of Bispecific T-cell Engaging Antibodies for Cancer Treatment. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2017, 101.

도면

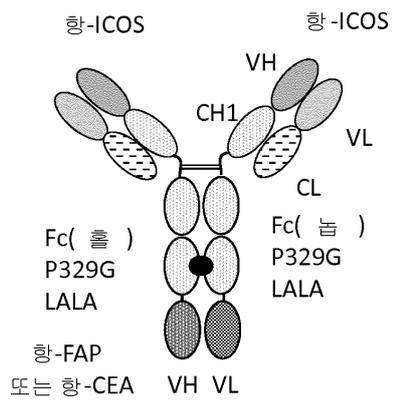
도면1a



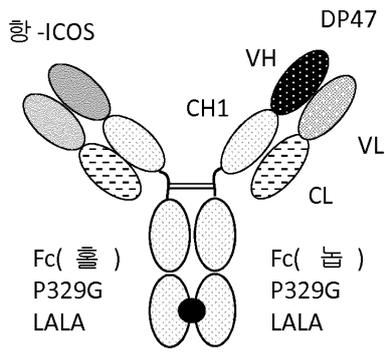
도면1b



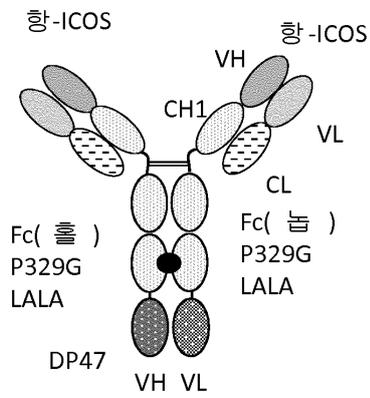
도면1c



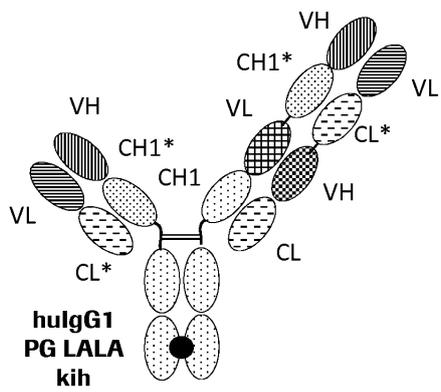
도면1d



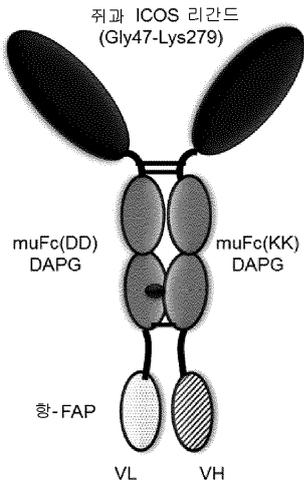
도면1e



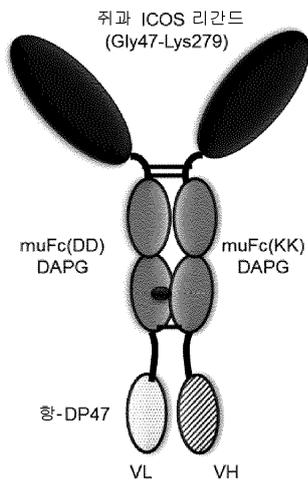
도면1f



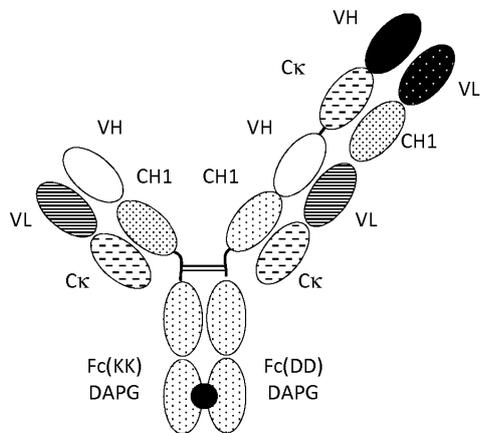
도면2a



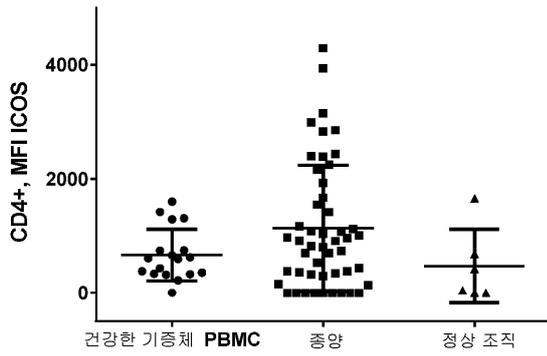
도면2b



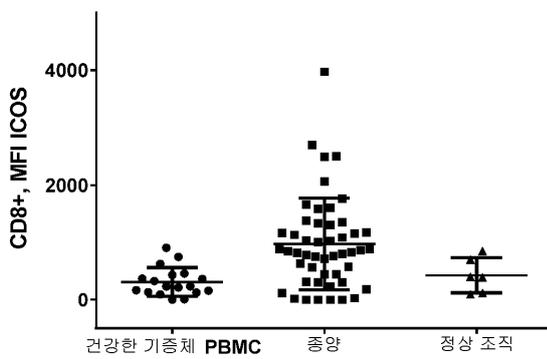
도면2c



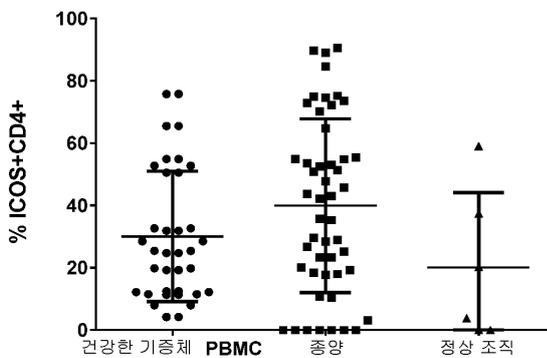
도면3a



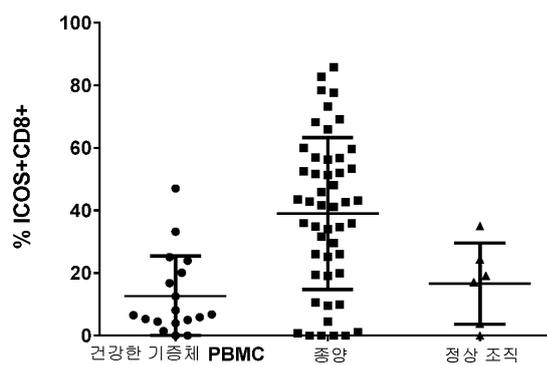
도면3b



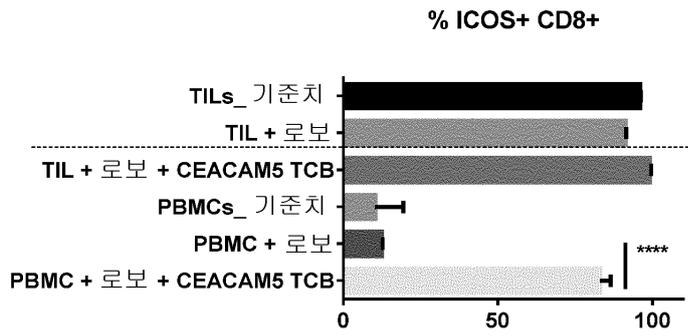
도면3c



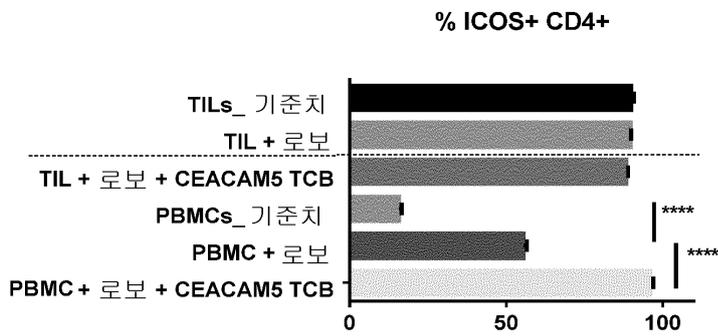
도면3d



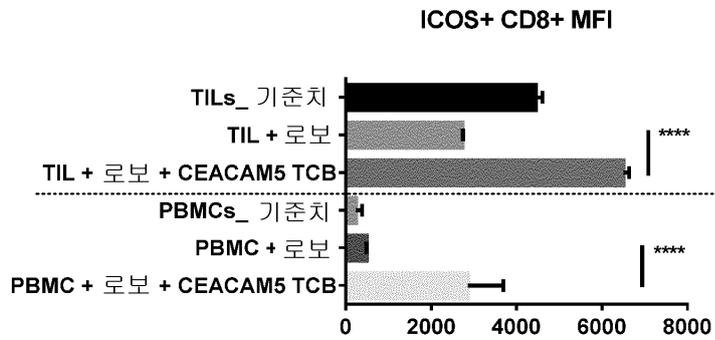
도면3e



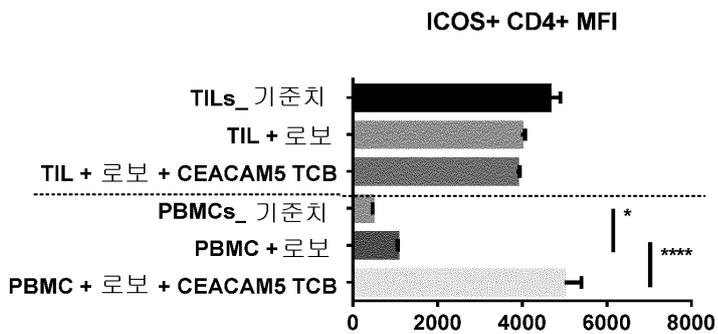
도면3f



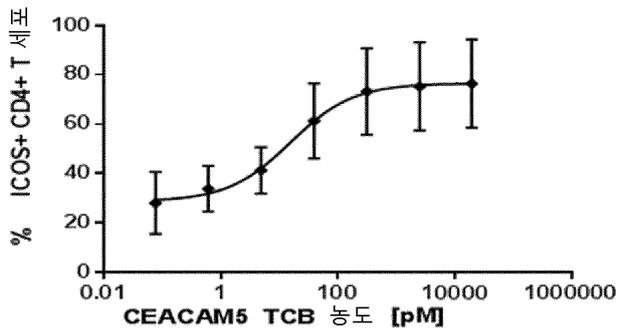
도면3g



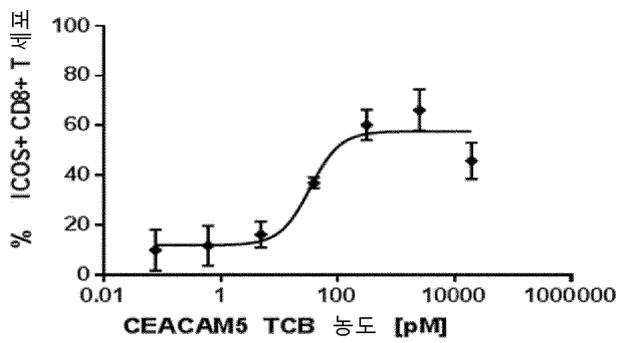
도면3h



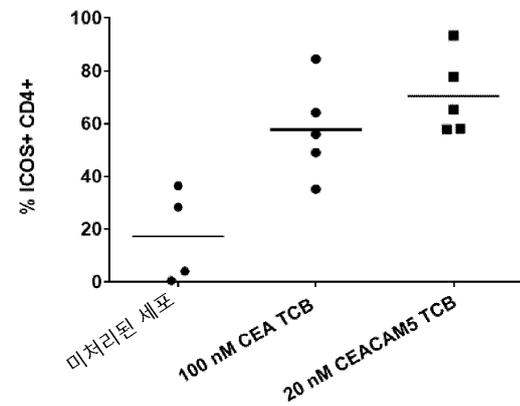
도면4a



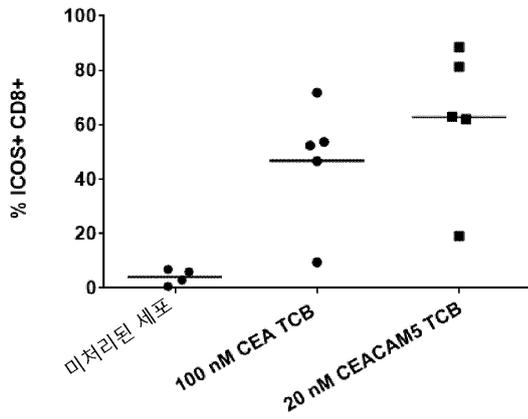
도면4b



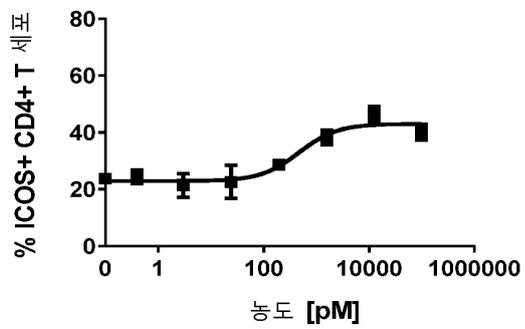
도면4c



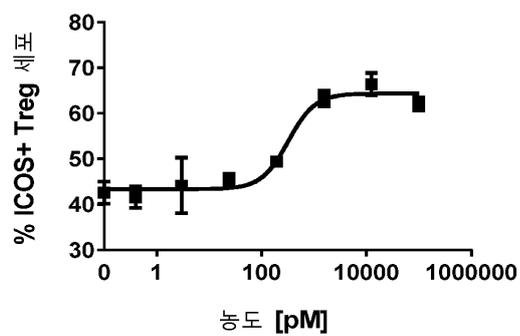
도면4d



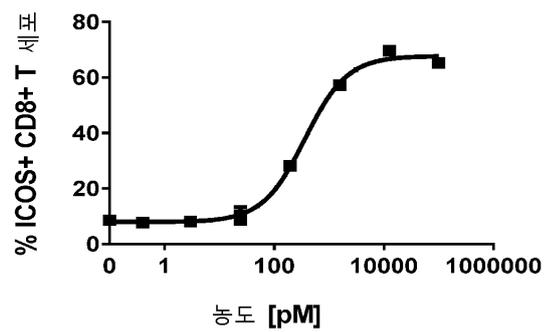
도면5a



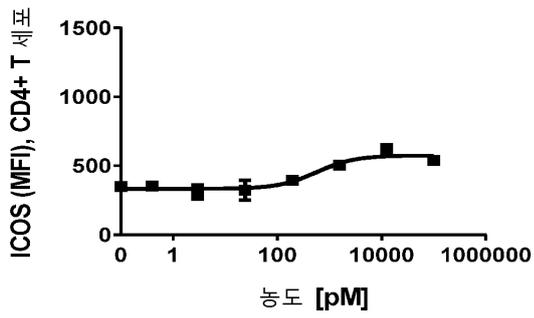
도면5b



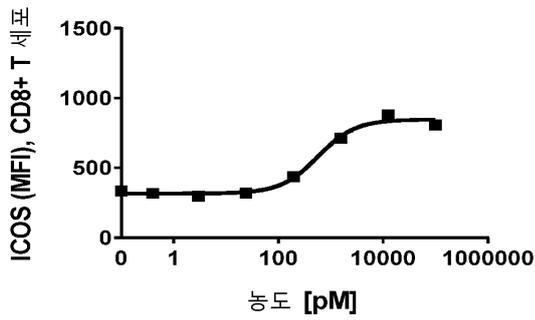
도면5c



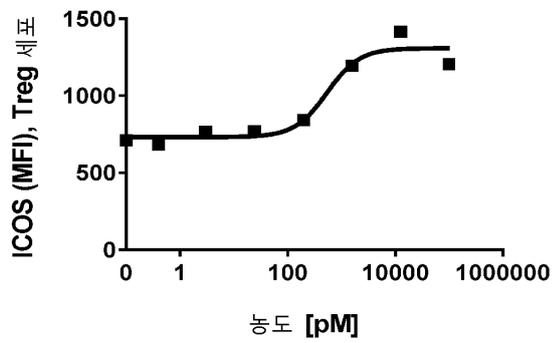
도면5d



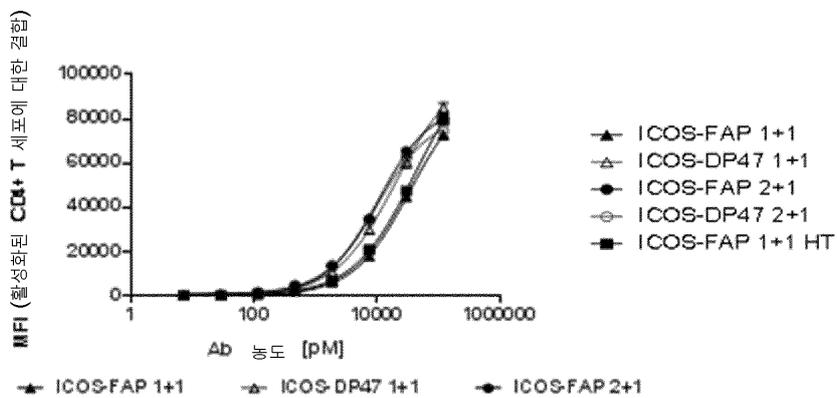
도면5e



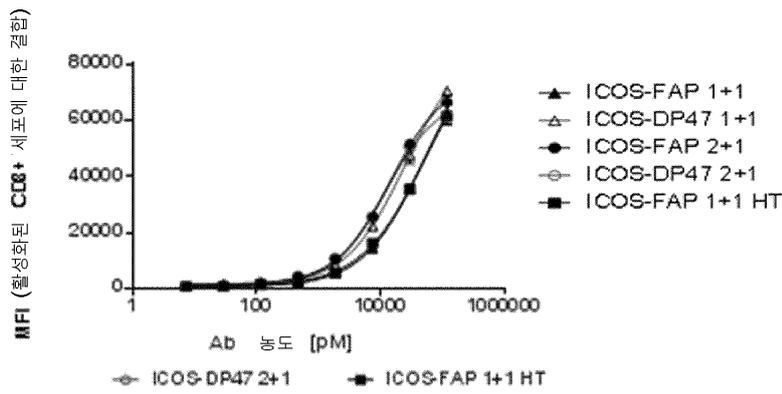
도면5f



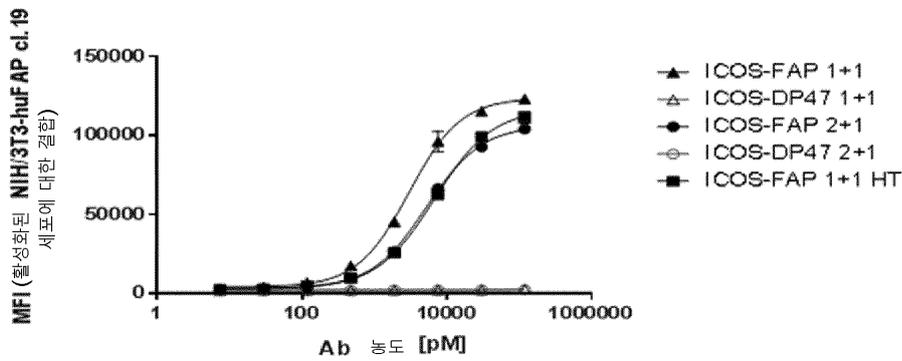
도면6a



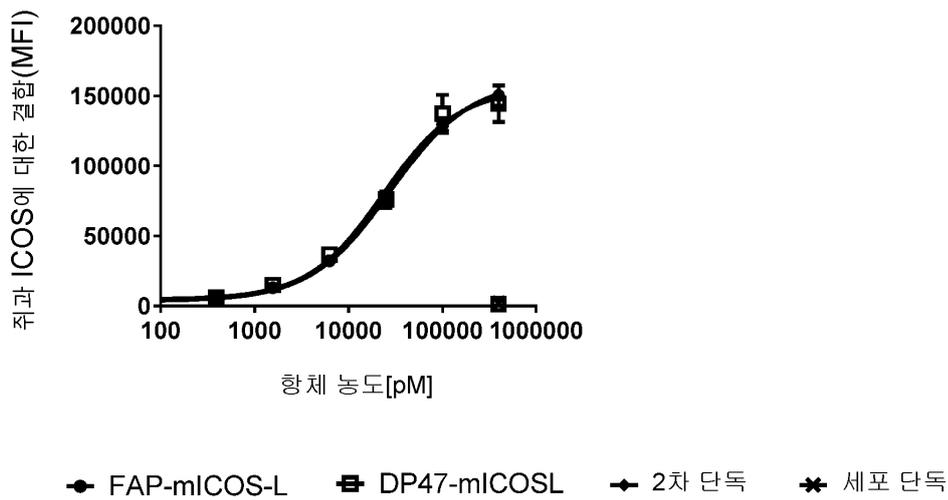
도면6b



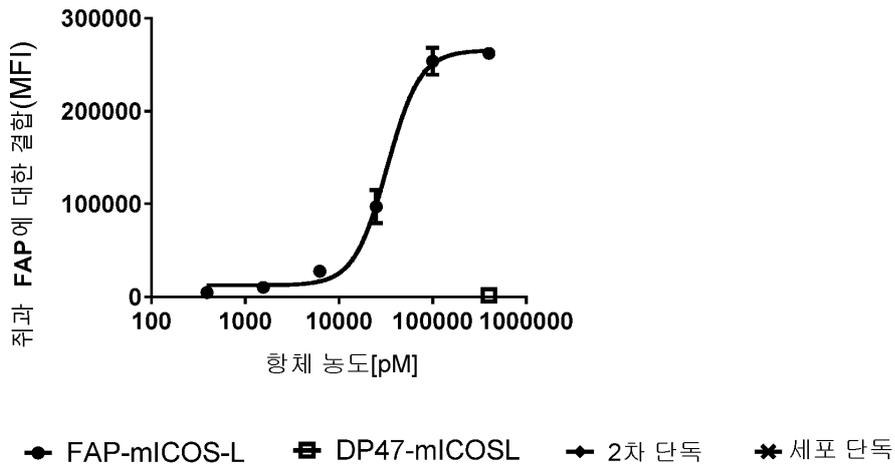
도면6c



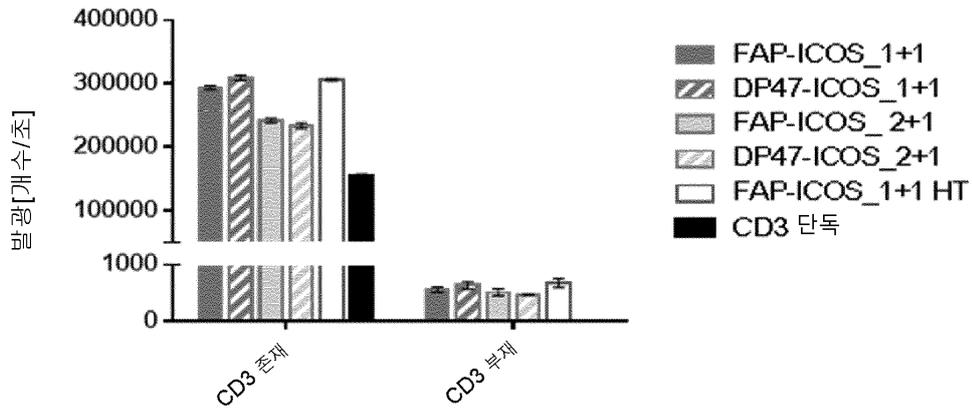
도면7a



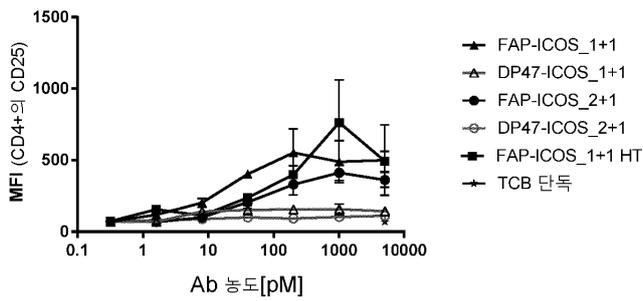
도면7b



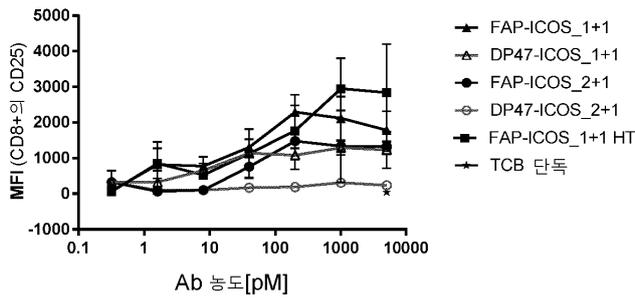
도면8a



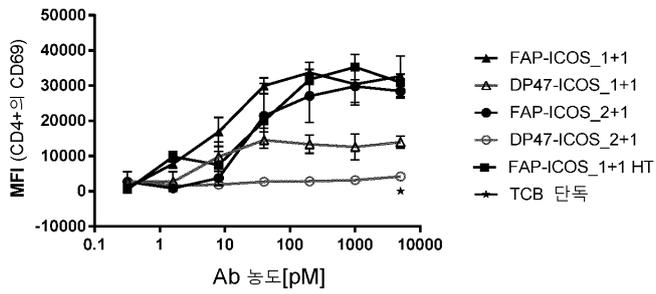
도면8b



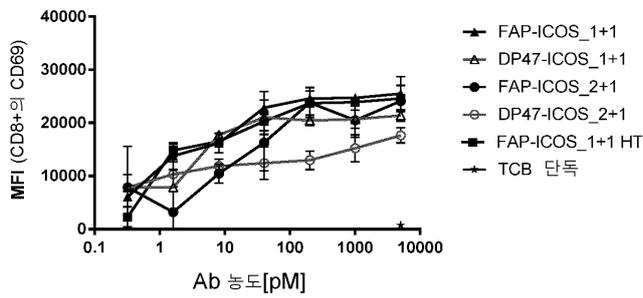
도면8c



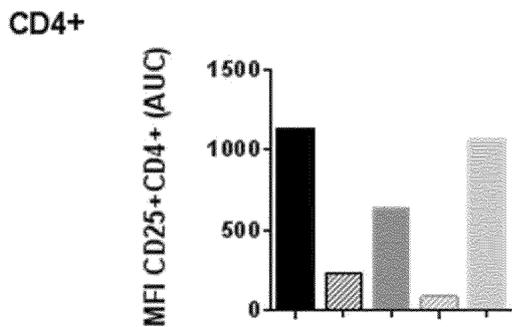
도면8d



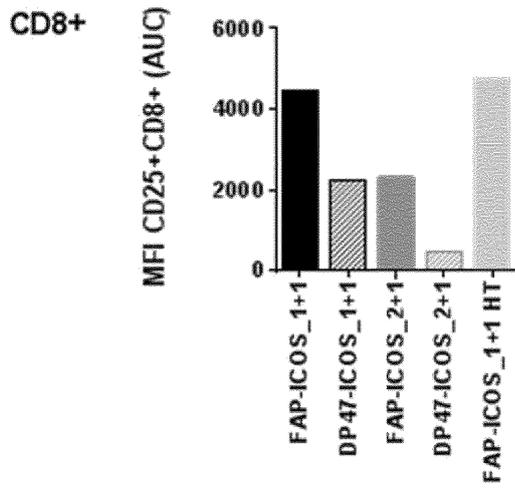
도면8e



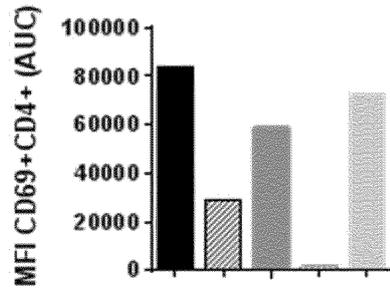
도면8f



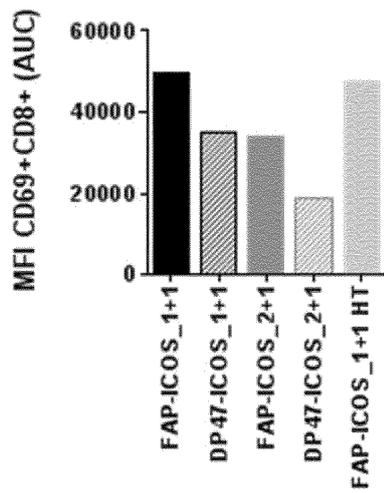
도면8g



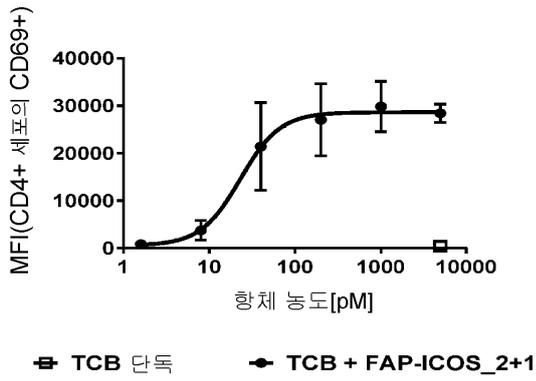
도면8h



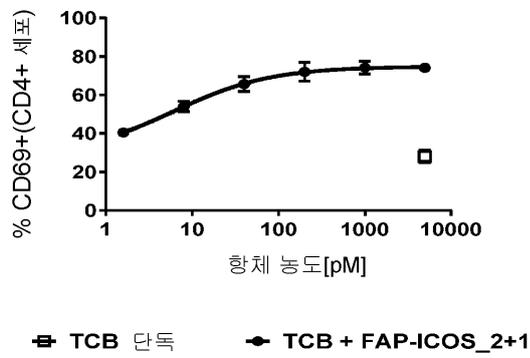
도면8i



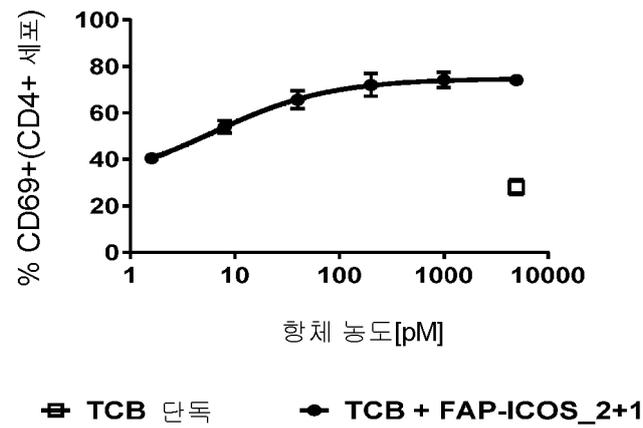
도면9a



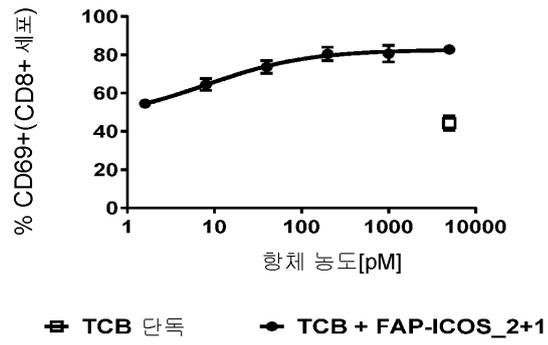
도면9b



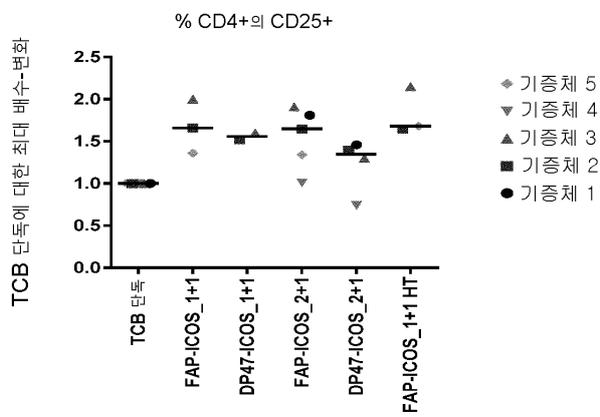
도면9c



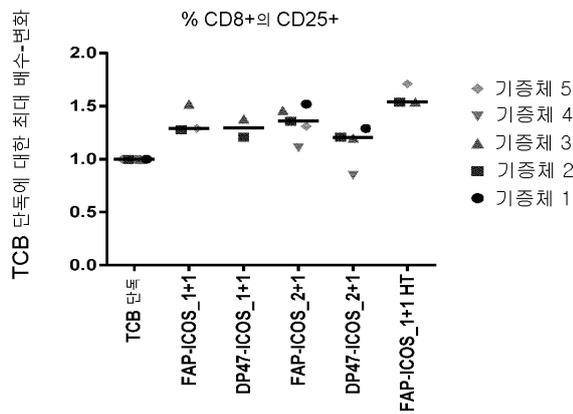
도면9d



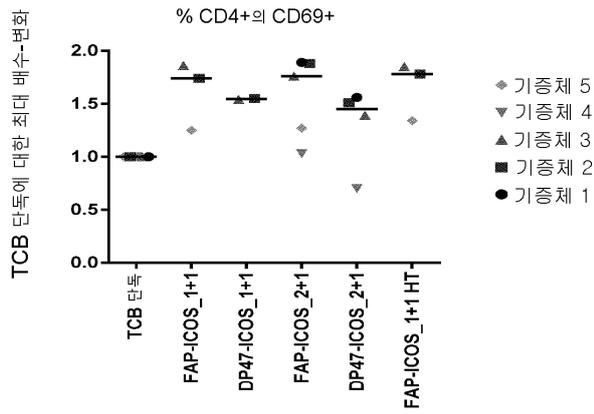
도면9e



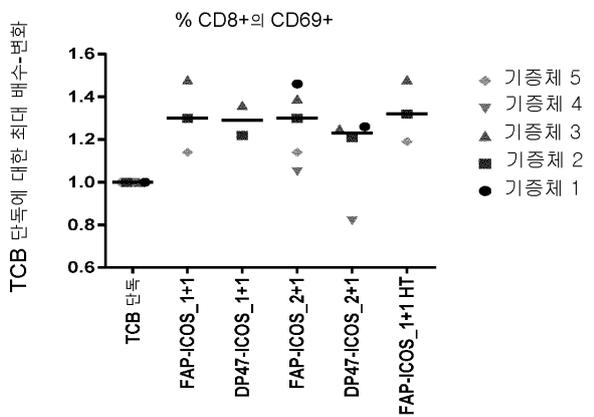
도면9f



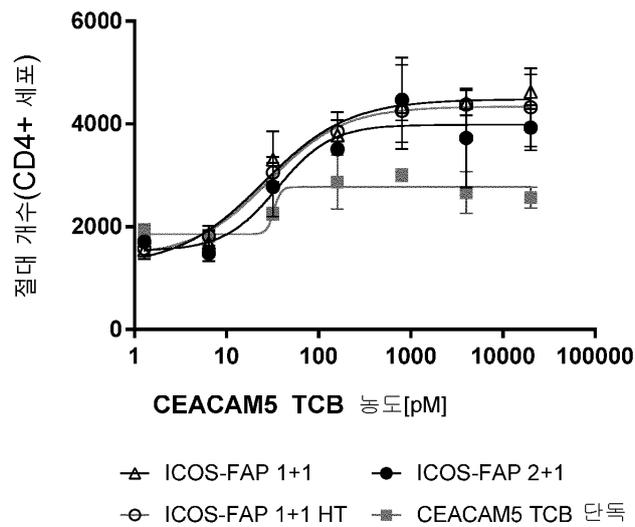
도면9g



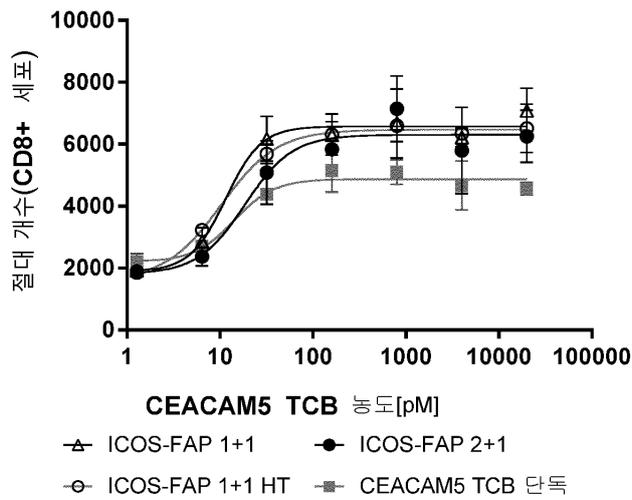
도면9h



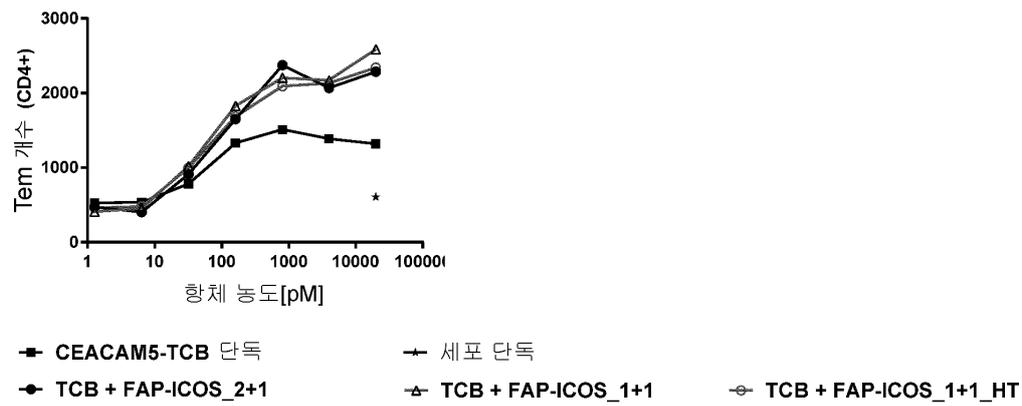
도면10a



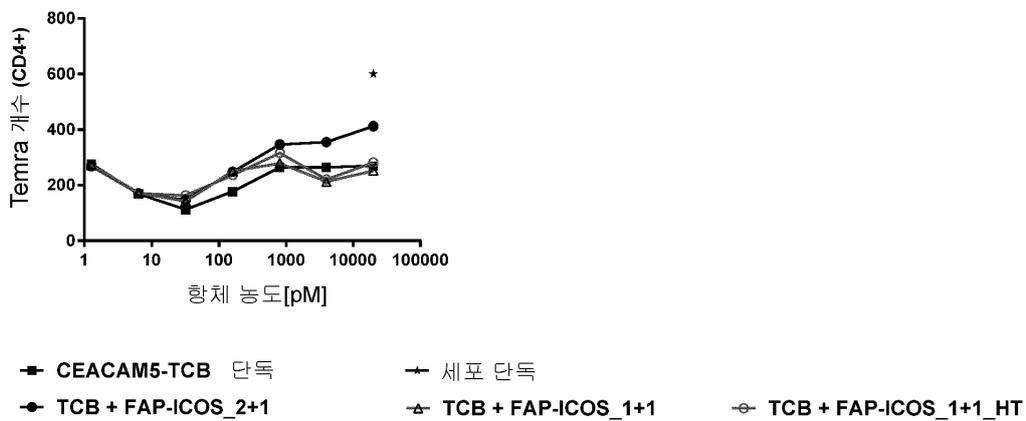
도면10b



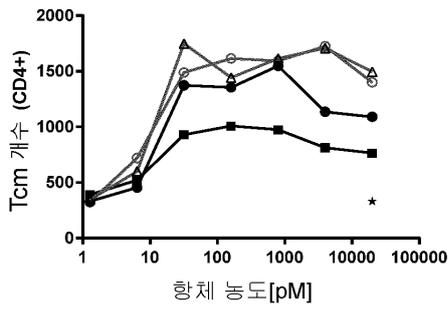
도면10c



도면10d

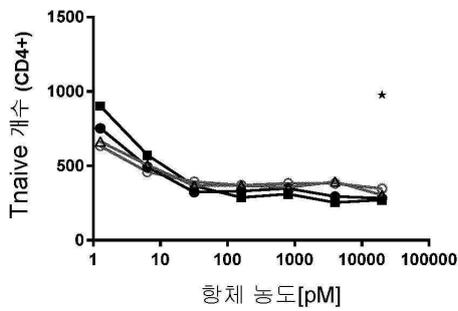


도면10e



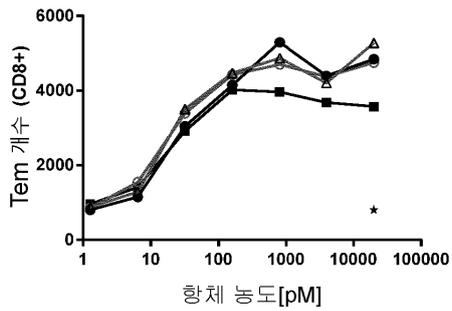
■ CEACAM5-TCB 단독 ★ 세포 단독
 ● TCB + FAP-ICOS_2+1 ▲ TCB + FAP-ICOS_1+1 ⊕ TCB + FAP-ICOS_1+1_HT

도면10f



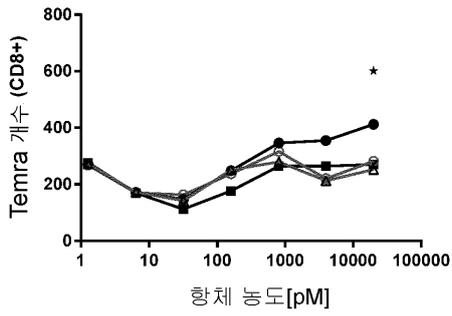
■ CEACAM5-TCB 단독 ★ 세포 단독
 ● TCB + FAP-ICOS_2+1 ▲ TCB + FAP-ICOS_1+1 ⊕ TCB + FAP-ICOS_1+1_HT

도면10g



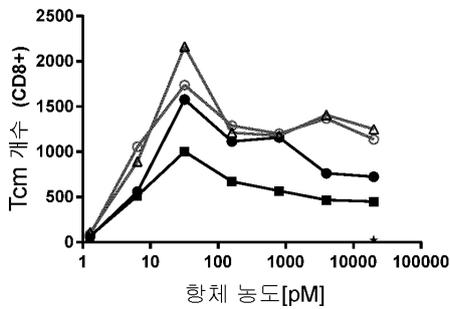
■ CEACAM5-TCB 단독 ★ 세포 단독
 ● TCB + FAP-ICOS_2+1 ▲ TCB + FAP-ICOS_1+1 ⊕ TCB + FAP-ICOS_1+1_HT

도면10h



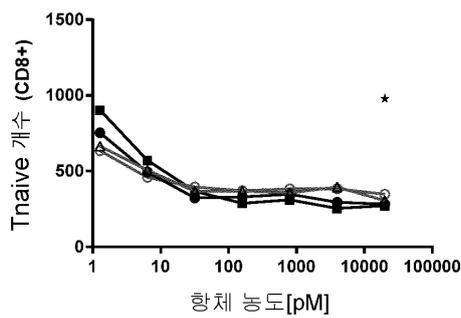
■ CEACAM5-TCB 단독 ▲ 세포 단독
 ● TCB + FAP-ICOS_2+1 ▽ TCB + FAP-ICOS_1+1 ⊖ TCB + FAP-ICOS_1+1_HT

도면10i



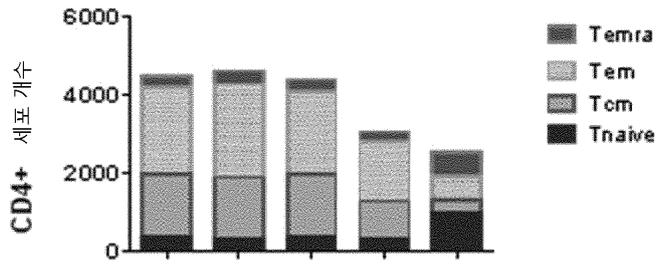
■ CEACAM5-TCB 단독 ▲ 세포 단독
 ● TCB + FAP-ICOS_2+1 ▽ TCB + FAP-ICOS_1+1 ⊖ TCB + FAP-ICOS_1+1_HT

도면10j

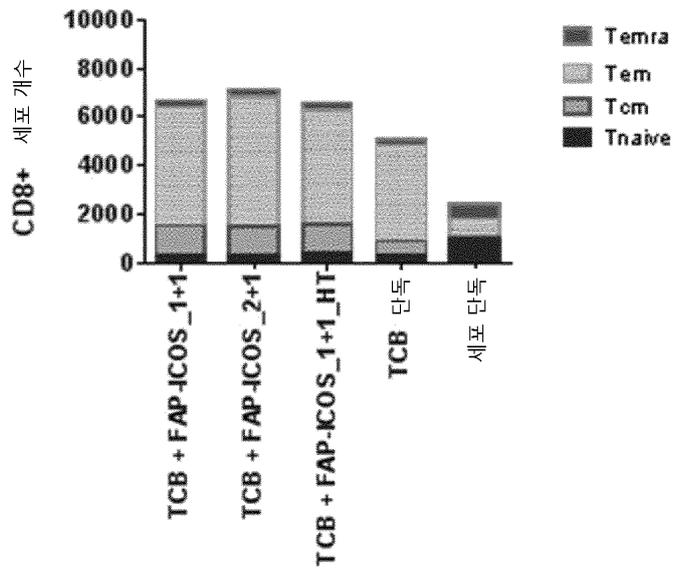


■ CEACAM5-TCB 단독 ▲ 세포 단독
 ● TCB + FAP-ICOS_2+1 ▽ TCB + FAP-ICOS_1+1 ⊖ TCB + FAP-ICOS_1+1_HT

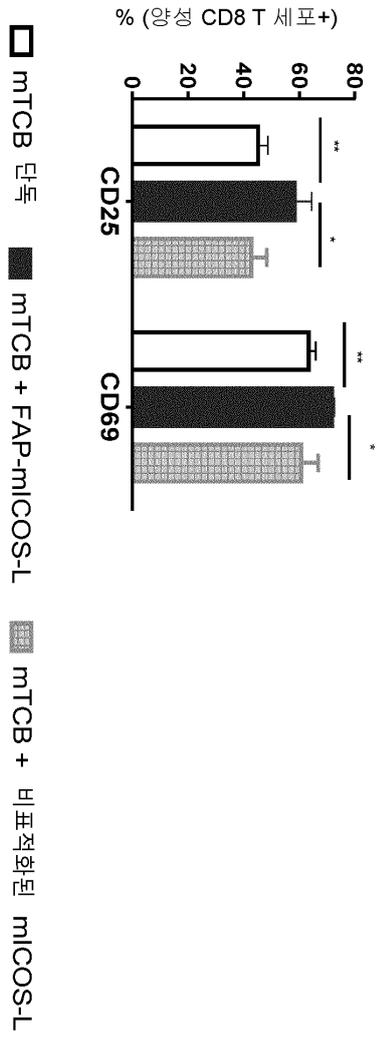
도면10k



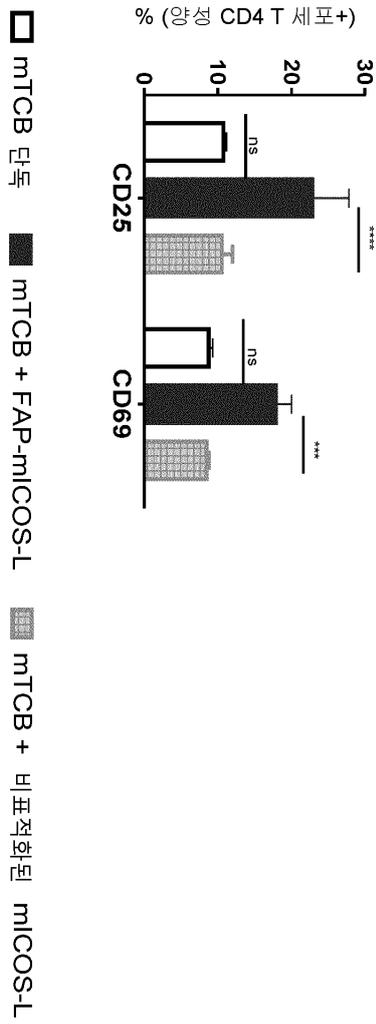
도면10l



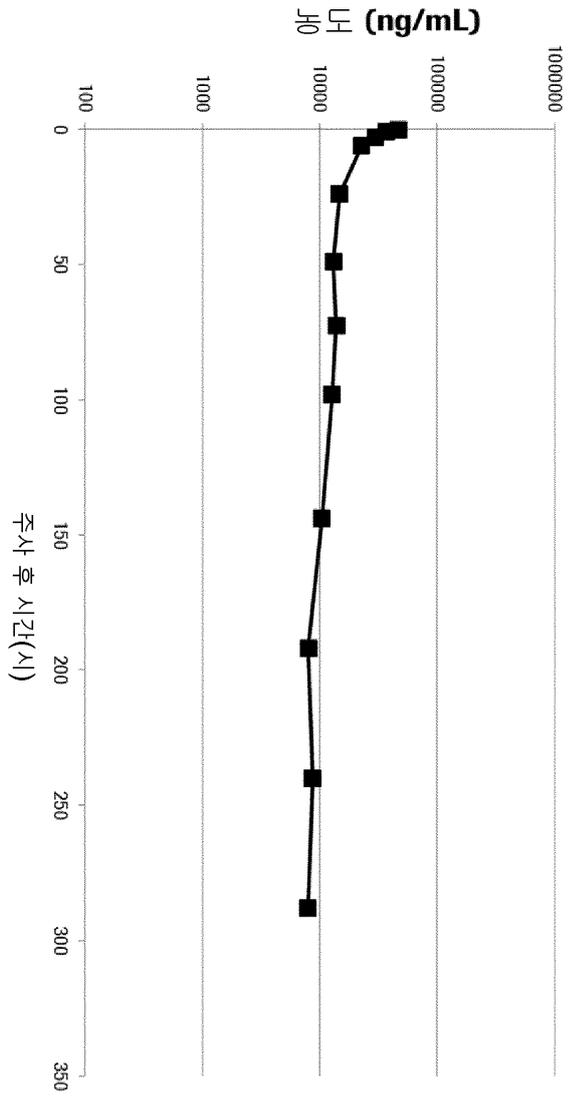
도면11a



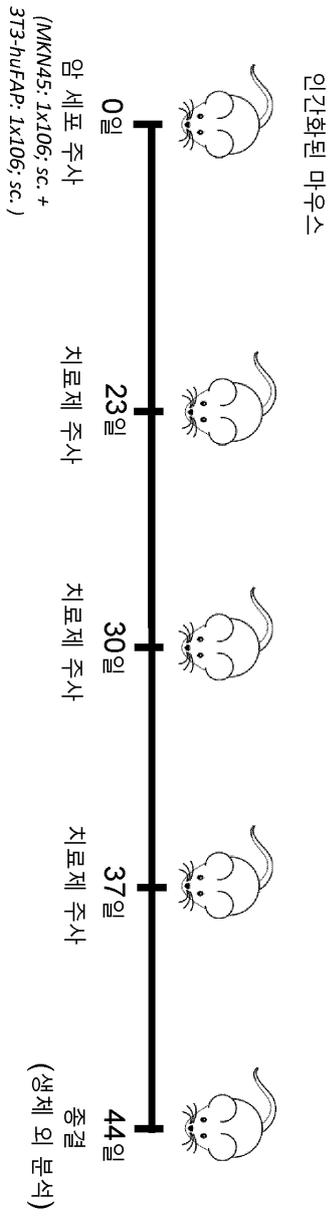
도면11b



도면12

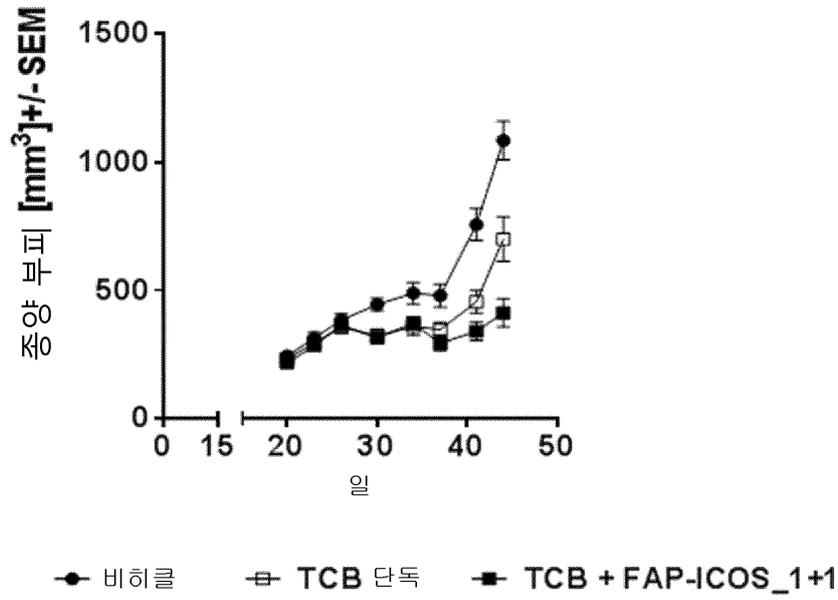


도면13

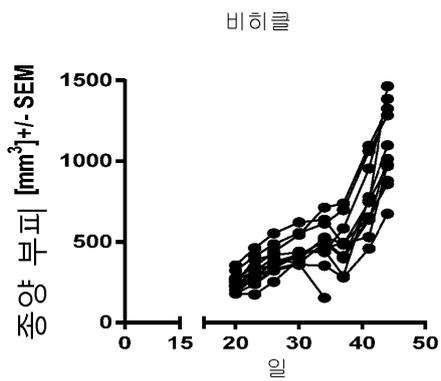


| 군 | 동물 개체수 | 회합물 | 투약량(mg/kg) | 치료제 주사 | 처리 회수 |
|---|--------|---------------------------|------------|--------|----------|
| A | 12 | 비히클 | -- | i.v. | 3 (주 1회) |
| B | 12 | CEACAM5 TCB | 0.5 | i.v. | 3 (주 1회) |
| C | 12 | CEACAM5 TCB + FAPiCOS_1+1 | 5 | i.v. | 3 (주 1회) |

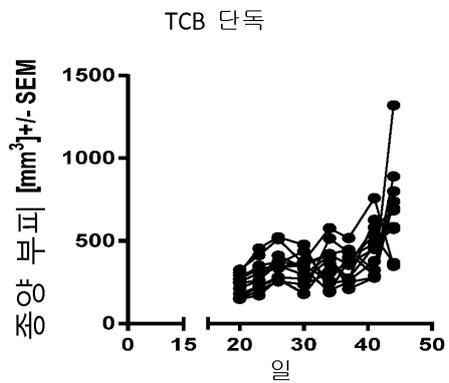
도면14a



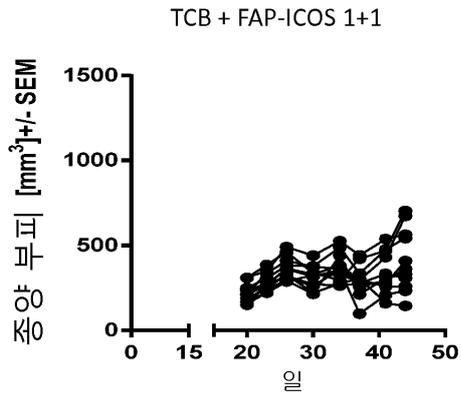
도면14b



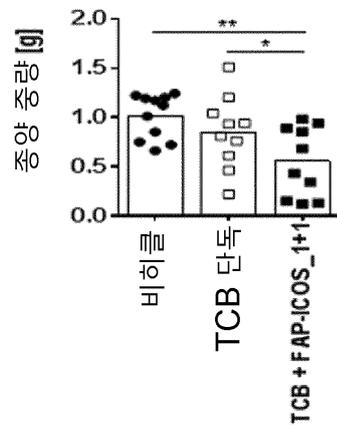
도면14c



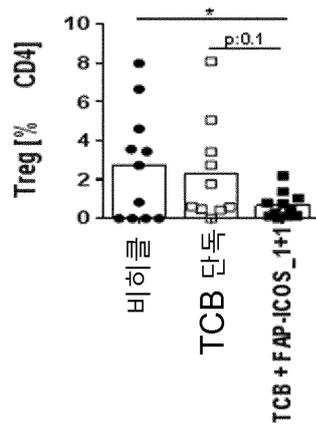
도면14d



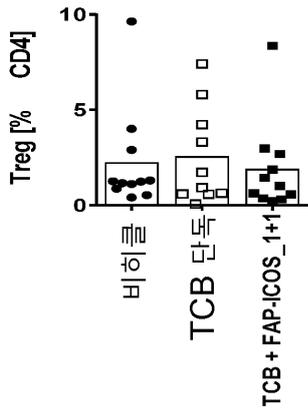
도면14e



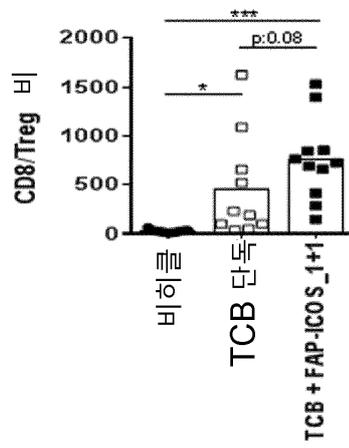
도면15a



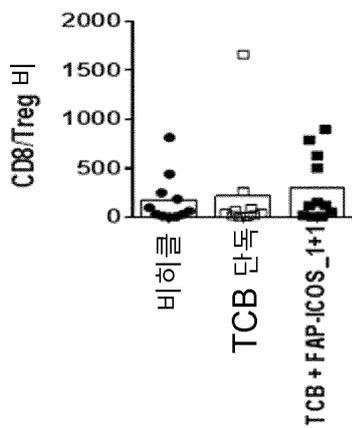
도면15b



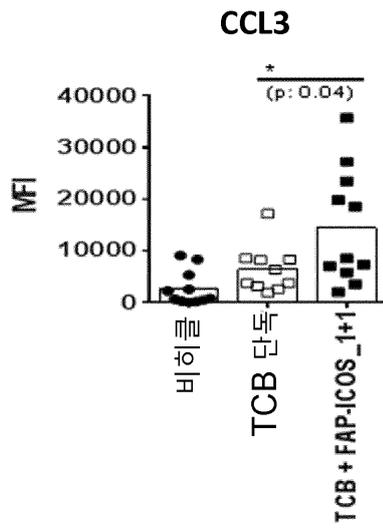
도면15c



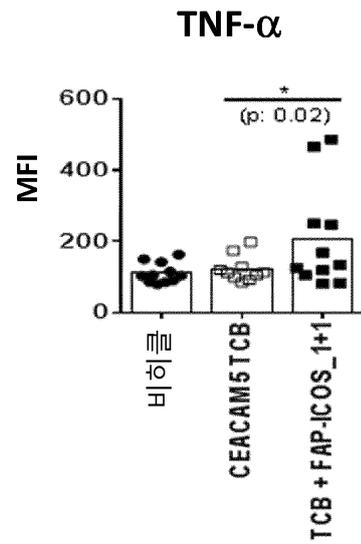
도면15d



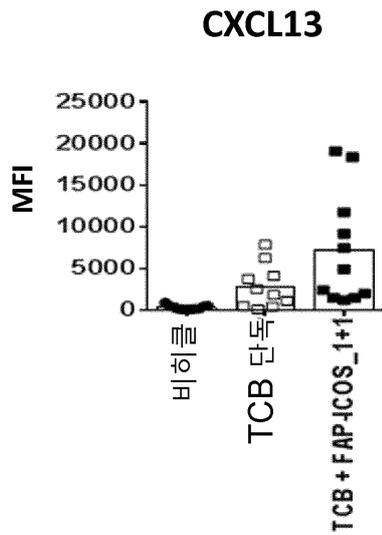
도면16a



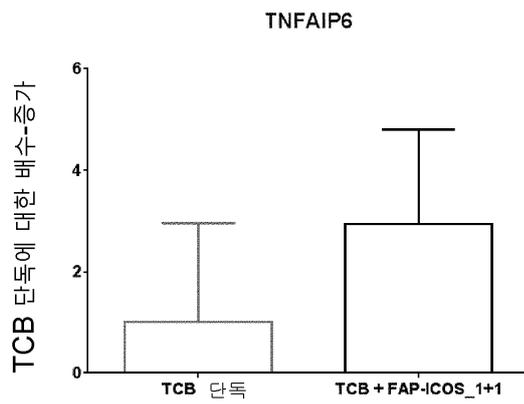
도면16b



도면16c



도면17a

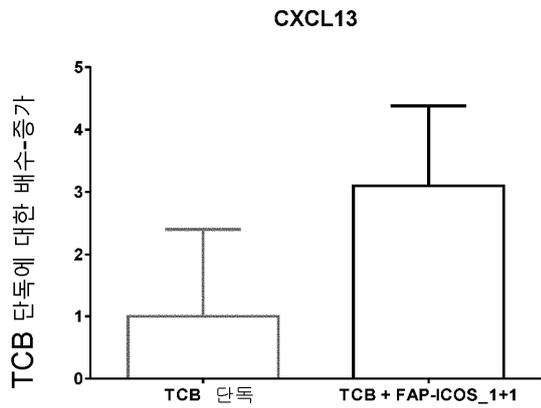


p=0.1, q=0.99.

나머지 유전자 2개 : TNFAIP6 & CXCL13

| 유전자 명칭 | 배수-변화 |
|---------|---------------|
| CXCL13 | 3.1 +/- 1.28 |
| TNFAIP6 | 2.94 +/- 1.86 |

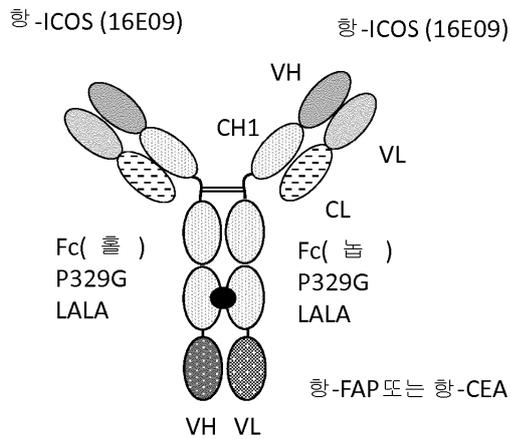
도면17b



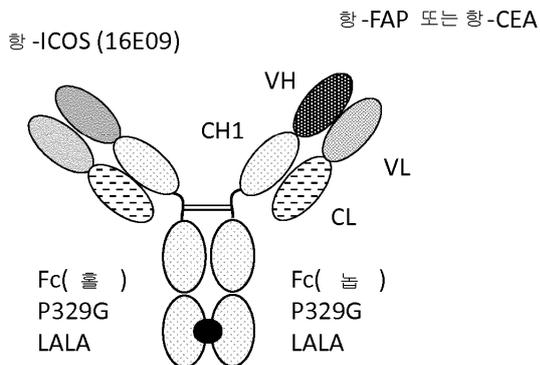
p=0.05, q=0.99. 나머지 유전자 1개

| 유전자 명칭 | 배수-변화 |
|---------|---------------|
| CXCL13 | 3.1 +/- 1.28 |
| TNFAIP6 | 2.94 +/- 1.86 |

도면18a



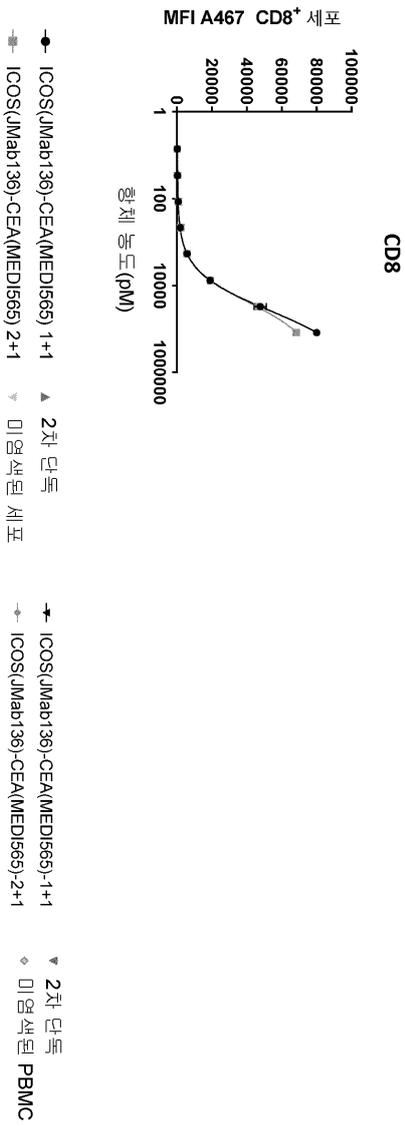
도면18b



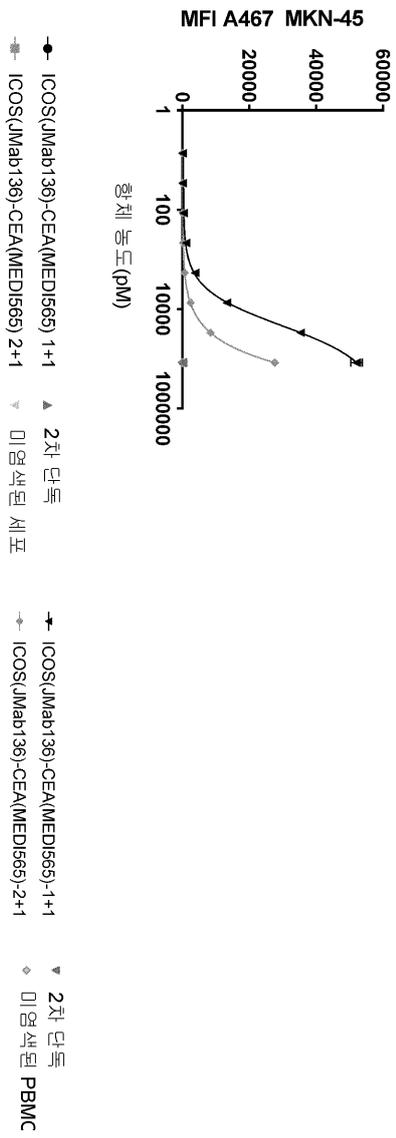
도면19a



도면19b



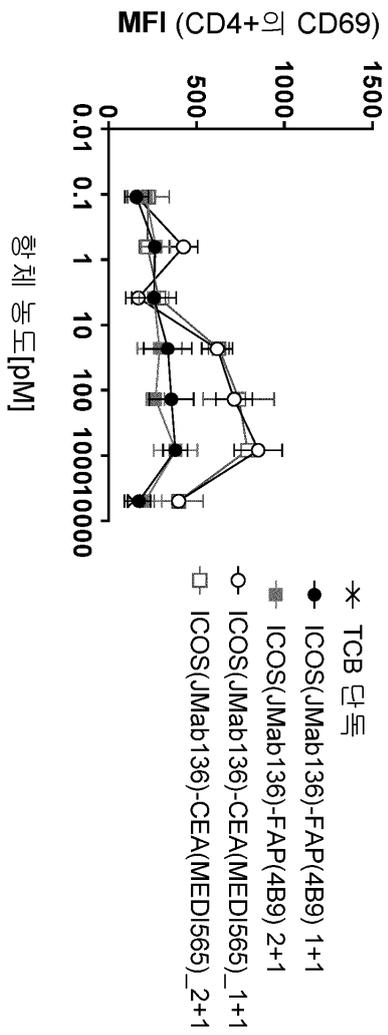
도면19c



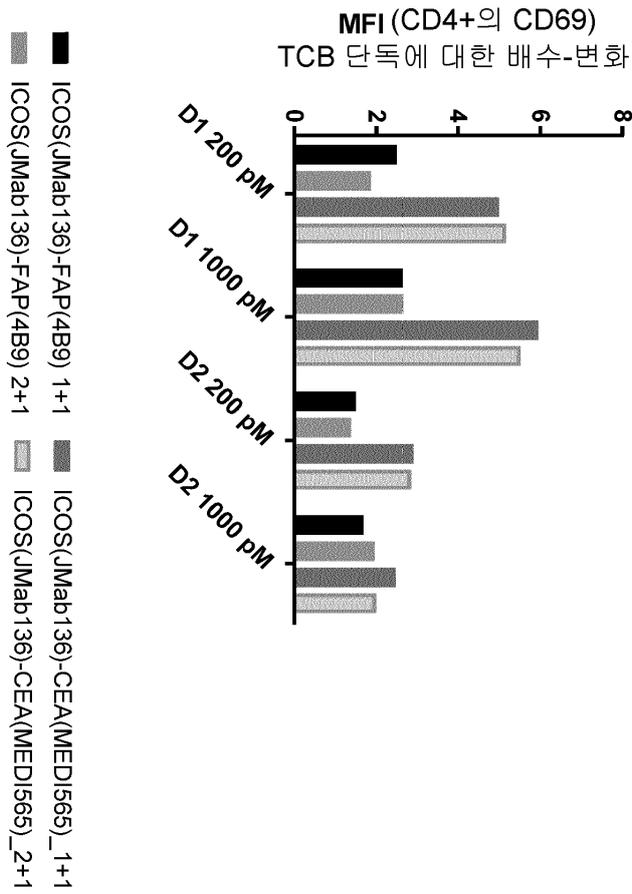
도면19d



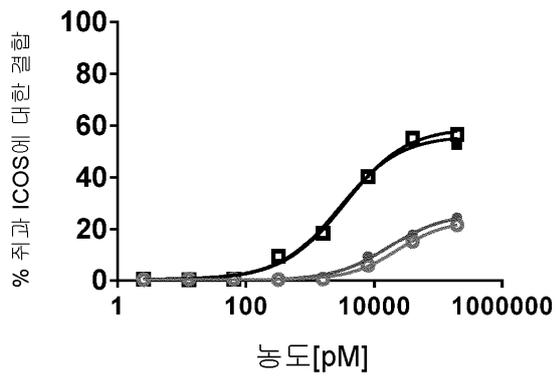
도면20a



도면20b

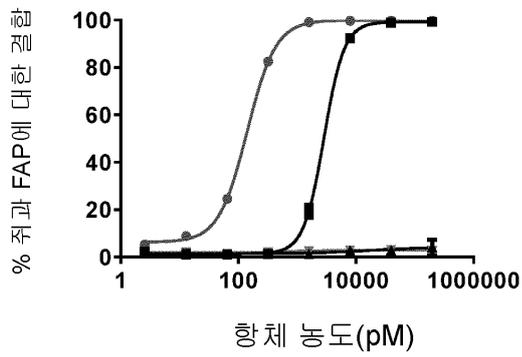


도면21a



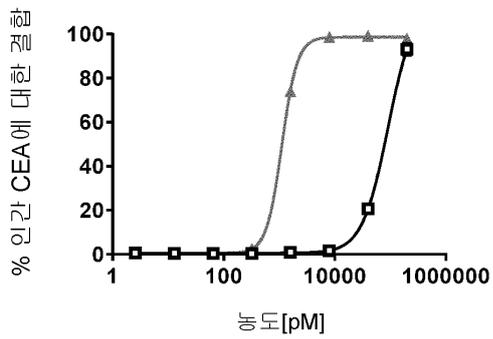
- ◆ ICOS(16E09)-FAP(28H1) 1+1
- ICOS(16E09)-FAP(28H1) 2+1
- ◇ ICOS(16E09)-CEA(A5B7) 1+1
- ICOS(16E09)-CEA(A5B7) 2+1

도면21b



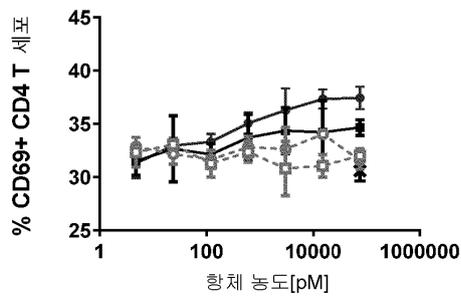
- ICOS(16E09)-FAP(28H1) 1+1
- ICOS(16E09)-FAP(28H1) 2+1
- ICOS(16E09)-CEA(A5B7) 1+1
- ICOS(16E09)-CEA(A5B7) 2+1

도면21c



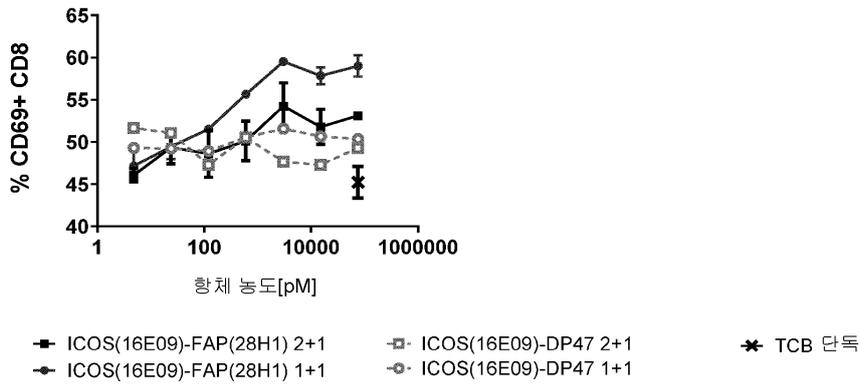
- CEA(A5B7)-ICOS(16E09)-2+1
- ▲ CEA(A5B7)-ICOS(16E09)-1+1

도면22a

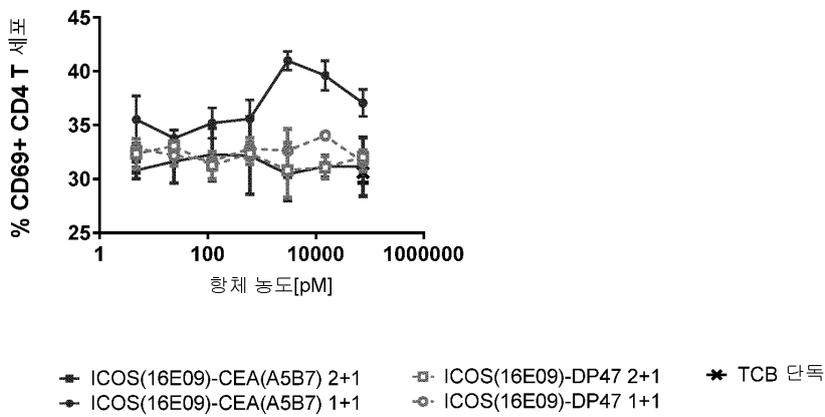


- ICOS(16E09)-FAP(28H1) 2+1
- ICOS(16E09)-FAP(28H1) 1+1
- ICOS(16E09)-DP47 2+1
- ICOS(16E09)-DP47 1+1
- * TCB 단독

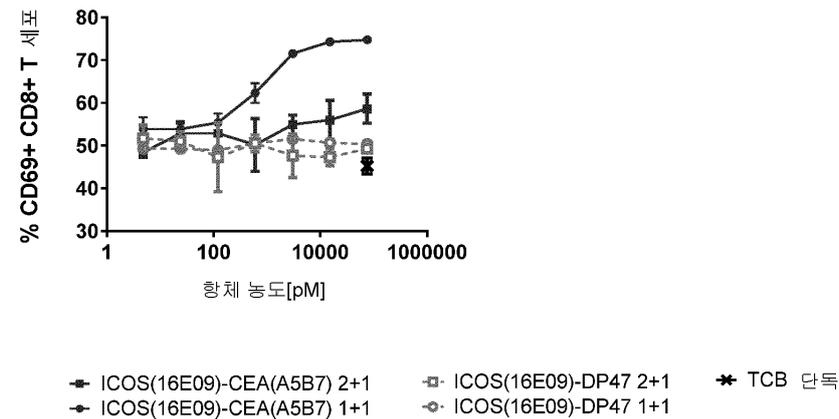
도면22b



도면22c



도면22d



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Combination therapy of tumor targeted ICOS agonists with T-cell bispecific molecules

<130> P34548-W0
 <140> PCT/EP2018/086046
 <141> 2018-12-20
 <150> EP17209444.3
 <151> 2017-12-21
 <160> 176
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu

1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val

20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His

35 40 45

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

50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu

65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu

85 90 95

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

100 105 110

Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro

115 120 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn

130 135 140

Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser

145 150 155 160

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

 Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
 210 215 220
 Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
 225 230 235
 <210> 2
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 2
 Glu Thr Glu Val Gly Ala Met Val Gly Ser Asn Val Val Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Ile Asp Pro His Arg Arg His Phe Asn Leu Ser Gly Leu Tyr Val Tyr
 20 25 30
 Trp Gln Ile Glu Asn Pro Glu Val Ser Val Thr Tyr Tyr Leu Pro Tyr
 35 40 45
 Lys Ser Pro Gly Ile Asn Val Asp Ser Ser Tyr Lys Asn Arg Gly His
 50 55 60
 Leu Ser Leu Asp Ser Met Lys Gln Gly Asn Phe Ser Leu Tyr Leu Lys
 65 70 75 80
 Asn Val Thr Pro Gln Asp Thr Gln Glu Phe Thr Cys Arg Val Phe Met
 85 90 95
 Asn Thr Ala Thr Glu Leu Val Lys Ile Leu Glu Glu Val Val Arg Leu
 100 105 110
 Arg Val Ala Ala Asn Phe Ser Thr Pro Val Ile Ser Thr Ser Asp Ser
 115 120 125
 Ser Asn Pro Gly Gln Glu Arg Thr Tyr Thr Cys Met Ser Lys Asn Gly

130 135 140
 Tyr Pro Glu Pro Asn Leu Tyr Trp Ile Asn Thr Thr Asp Asn Ser Leu

145 150 155 160
 Ile Asp Thr Ala Leu Gln Asn Asn Thr Val Tyr Leu Asn Lys Leu Gly

165 170 175
 Leu Tyr Asp Val Ile Ser Thr Leu Arg Leu Pro Trp Thr Ser Arg Gly

180 185 190
 Asp Val Leu Cys Cys Val Glu Asn Val Ala Leu His Gln Asn Ile Thr

195 200 205
 Ser Ile Ser Gln Ala Glu Ser Phe Thr Gly Asn Asn Thr Lys Asn Pro

210 215 220
 Gln Glu Thr His Asn Asn Glu Leu Lys

225 230

<210> 3

<211> 199

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu Phe Cys Leu Arg Ile Lys
 1 5 10 15

Val Leu Thr Gly Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met Phe Ile
 20 25 30

Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val

35 40 45
 Gln Gln Phe Lys Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln Ile Leu Cys Asp

50 55 60
 Leu Thr Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu

65 70 75 80
 Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu

85 90 95
 Tyr Asn Leu Asp His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn Leu Ser

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

165 170 175
 Asn Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser
 180 185 190

Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu
 195

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAP(4B9) CDR-H1

<400> 4

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAP(4B9) CDR-H2

<400>

5

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

1 5 10 15

Gly

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAP(4B9) CDR-H3

<400> 6

Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr

1 5

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAP(4B9) CDR-L1

<400> 7

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAP(4B9) CDR-L2

<400> 8

Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAP(4B9) CDR-L3

<400> 9

Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro Pro Thr

1 5

<210> 10

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAP(4B9) VH

<400> 10

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

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

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

<210> 11

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAP(4B9) VL

<400> 11

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

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

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

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro

85 90 95

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

100 105

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAP(28H1) CDR-H1

<400> 12

Ser His Ala Met Ser

1 5

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAP(28H1) CDR-H2

<400> 13

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

1 5 10 15

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAP(28H1) CDR-H3

<400> 14

Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr

1 5

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAP(28H1) CDR-L1

<400> 15

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAP(28H1) CDR-L2

<400> 16

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAP(28H1) CDR-L3

<400> 17

Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro Pro Thr

1 5

<210> 18

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAP(28H1) VH

<400> 18

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

Ser Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 19

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

FAP(28H1) VL

<400> 19

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Ile Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro
 85 90 95

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

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ICOS CDR-H1

<400> 20

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His

1 5 10

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ICOS CDR-H2

<400> 21

Trp Ile Asn Pro His Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 22

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ICOS CDR-H3

<400> 22

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

1 5 10 15

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ICOS CDR-L1

<400> 23

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Leu Leu Ala

1 5 10

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ICOS CDR-L2

<400> 24

Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ICOS CDR-L3

<400> 25

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp Thr

1 5

<210> 26

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ICOS VH

<400> 26

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro His Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Ala Arg Thr Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr His Asp Ala Phe
 100 105 110

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

115 120 125

<210> 27

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ICOS VL

<400> 27

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 28

<211> 453

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHCH1(JMAb136)- Fc knob chain

<400> 28

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro His Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Thr Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr His Asp Ala Phe
 100 105 110
 Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 115 120 125
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 130 135 140
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu
 145 150 155 160
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 165 170 175
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 195 200 205
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu
 210 215 220
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240
 Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

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

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

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

 435 440 445
 Leu Ser Leu Ser Pro
 450
 <210> 29
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VLCL(JMab136) Light chain
 <400> 29
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Leu
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 30
 <211> 438
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VHCH1 (4B9)- Fc hole chain

<400> 30

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

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

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

130 135 140
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 145 150 155 160
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 180 185 190
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val

195 200 205
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 210 215 220
 Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 225 230 235 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
245 250 255

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
260 265 270

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
275 280 285

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
305 310 315 320

Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
325 330 335

Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
340 345 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
355 360 365

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

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
385 390 395 400

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

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435

<210> 31
<211> 224
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> VLCL(4B9) Light chain
<400> 31

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

<210> 32

<211> 591

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHCH1 (JMAb136)-Fc knob chain-VH (4B9)

<400> 32

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro His Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Thr Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr His Asp Ala Phe

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240
 Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290 295 300
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315 320
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 325 330 335
 Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 340 345 350
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 355 360 365
 Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 385 390 395 400
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 420 425 430
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 435 440 445
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 450 455 460
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu

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

 530 535 540
 Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 545 550 555 560
 Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Phe Gly
 565 570 575
 Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 580 585 590

 <210> 33
 <211> 582
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> VHCH1 (JMAb136)-Fc hole chain-VL (4B9)
 <400> 33
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro His Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
 Ala Arg Thr Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr His Asp Ala Phe
 100 105 110
 Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 115 120 125
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 130 135 140
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 145 150 155 160
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 165 170 175
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 195 200 205
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 210 215 220
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240
 Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290 295 300
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315 320
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 325 330 335

Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 340 345 350
 Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 355 360 365
 Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 385 390 395 400
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser
 405 410 415
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 420 425 430
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 435 440 445
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 450 455 460
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln
 465 470 475 480
 Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser
 485 490 495
 Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln
 500 505 510
 Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Asn Val Gly Ser Arg
 515 520 525
 Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 530 535 540
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val
 545 550 555 560
 Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly
 565 570 575
 Thr Lys Val Glu Ile Lys

580

<210> 34

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3-HCDR1

<400> 34

Thr Tyr Ala Met Asn

1 5

<210> 35

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3-HCDR2

<400> 35

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

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 36

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3-HCDR3

<400> 36

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

1 5 10

<210> 37

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3-LCDR1

<400> 37

Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn

1 5 10

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3-LCDR2

<400> 38

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro

1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3-LCDR3

<400> 39

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val

1 5

<210> 40

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3 VH

<400> 40

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 Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Val Lys Gly 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 Val 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> 41

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3 VL

<400> 41

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

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe

50 55 60

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

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 Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 42

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-HCDR1

<400> 42

Glu Phe Gly Met Asn

1 5

<210> 43

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-HCDR2

<400> 43

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

1 5 10 15

Gly

<210> 44

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-HCDR3

<400> 44

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

1 5 10

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-LCDR1

<400> 45

Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr Val Ala

1 5 10

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-LCDR2

<400> 46

Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg

1 5

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-LCDR3

<400> 47

His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu Phe Thr

1 5 10

<210> 48

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA VH

<400> 48

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 49

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA VL

<400> 49

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 50

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-HCDR1 (CEACAM5)

<400> 50

Asp Thr Tyr Met His
 1 5

<210> 51

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-HCDR2 (CEACAM5)

<400> 51

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 52

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-HCDR3 (CEACAM5)

<400> 52

Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr

1 5 10

<210> 53

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-LCDR1 (CEACAM5)

<400> 53

Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe Gly Val Gly Phe Leu His

1 5 10 15

<210> 54

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-LCDR2 (CEACAM5)

<400> 54

Arg Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-LCDR3 (CEACAM5)

<400> 55

Gln Gln Thr Asn Glu Asp Pro Tyr Thr

1 5

<210> 56

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA VH (CEACAM5)

<400> 56

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr 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 Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 57

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA VL (CEACAM5)

<400>

57

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

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

<210> 58

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CEA (CEA TCB)

<400> 58

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

65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu

 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys

 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 59
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Light chain CD3 (CEA TCB)
 <400> 59
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

 35 40 45
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 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 Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala
100 105 110
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
115 120 125
Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
130 135 140
Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
145 150 155 160
Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
165 170 175
Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
180 185 190
Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
195 200 205
Val Glu Pro Lys Ser Cys
210
<210> 60
<211> 692
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CEA CD3 crossfab VHck fc knob P329GLALA (CEA TCB)
<400> 60
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe
20 25 30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
 305 310 315 320

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His
 325 330 335

Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 340 345 350

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val
 355 360 365

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 370 375 380

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 385 390 395 400

Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
 405 410 415

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 420 425 430

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 435 440 445

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 450 455 460

Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 465 470 475 480

Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 485 490 495

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 500 505 510

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 515 520 525

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 530 535 540

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

545 550 555 560
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly
 565 570 575

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 580 585 590

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 595 600 605

Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 610 615 620

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 625 630 635 640

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 645 650 655

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 660 665 670

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 675 680 685

Ser Leu Ser Pro
 690

<210> 61

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

CEA VHCH1 Fc hole P329GLALA (CEA TCB)

<400> 61

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

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

435 440 445
 Pro

<210> 62

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3 VH-CL (CEACAM5 TCB)

<400> 62

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 Thr Tyr
 20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Val Lys Gly 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 Val 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 Ala Ser Val

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230

<210> 63

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEACAM5 VH-CH1(EE)-Fc (hole, P329G LALA)

<400> 63

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

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

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

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

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

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

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

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro

<210> 64

<211> 674

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEACAM5 VH-CH1(EE)-CD3 VL-CH1-Fc (knob, P329G LALA)

<400> 64

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

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr 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 Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

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

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

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

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

Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr

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

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

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

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

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

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro
 545 550 555 560
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 565 570 575
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 580 585 590
 Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 595 600 605

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 610 615 620
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 625 630 635 640
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 645 650 655
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 660 665 670

Ser Pro

<210> 65

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEACAM5 VL-CL(RK)

<400> 65

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

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

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

 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 66
 <211> 354
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Fc hole chain-VL (4B9)

<400> 66

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

1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile

 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

 115 120 125
 Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

 130 135 140
 Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val

 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

 210 215 220
 Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

225 230 235 240
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr
 245 250 255
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser

 260 265 270
 Gln Ser Val Thr Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 275 280 285
 Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly
 290 295 300
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 305 310 315 320
 Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln

 325 330 335
 Gln Gly Ile Met Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 340 345 350
 Ile Lys

<210> 67

<211> 440

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHCH1 (DP47)- Fc hole chain

<400> 67

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

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

65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

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

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

 210 215 220
 Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 225 230 235 240
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 245 250 255
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 260 265 270
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

 275 280 285
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 290 295 300
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 305 310 315 320

Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 325 330 335

Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 340 345 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 355 360 365

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

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
 385 390 395 400

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

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 68
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VLCL(DP47) Light chain
 <400> 68

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

65 70 75 80

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

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

Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 115 120 125

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 130 135 140

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
145 150 155 160

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 165 170 175

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 180 185 190

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 195 200 205

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

- <210> 69
- <211> 582
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> VHCH1 (JMab136)-Fc knob chain-VH (DP47)
- <400> 69

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

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

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

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

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

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

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

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

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 290 | 295 | 300 | |
| Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu | | | |
| | 325 | 330 | 335 |
| Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg | | | |
| | 340 | 345 | 350 |
| | | | |
| Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys | | | |
| | 355 | 360 | 365 |
| Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp | | | |
| | 370 | 375 | 380 |
| Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys | | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 |
| Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser | | | |
| | 405 | 410 | 415 |
| | | | |
| Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser | | | |
| | 420 | 425 | 430 |
| Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser | | | |
| | 435 | 440 | 445 |
| Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser | | | |
| | 450 | 455 | 460 |
| Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln | | | |
| 465 | 470 | 475 | 480 |
| | | | |
| Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser | | | |
| | 485 | 490 | 495 |
| Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln | | | |
| | 500 | 505 | 510 |
| Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser | | | |
| | 515 | 520 | 525 |
| Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr | | | |
| | 530 | 535 | 540 |

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val
 545 550 555 560
 Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly
 565 570 575
 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 580
 <210> 70
 <211> 589
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VHCH1 (JMAb136)-Fc hole chain-VL (DP47)
 <400> 70
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

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

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

 130 135 140
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 145 150 155 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190

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

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

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 325 330 335

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

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

Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 385 390 395 400

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

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

 450 455 460
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu
 465 470 475 480
 Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
 485 490 495
 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg
 500 505 510
 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser

 515 520 525
 Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
 530 535 540
 Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 545 550 555 560
 Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Ser Gly Phe
 565 570 575
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

 580 585
 <210> 71
 <211> 519
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Murine ICOSL Linker muIgG1 Fc (DAPG KK) 4GS linker FAP(28H1) VH
 <400> 71
 Gln Asp Thr Gln Glu Phe Thr Cys Arg Val Phe Met Asn Thr Ala Thr
 1 5 10 15
 Glu Leu Val Lys Ile Leu Glu Glu Val Val Arg Leu Arg Val Ala Ala

20 25 30
 Asn Phe Ser Thr Pro Val Ile Ser Thr Ser Asp Ser Ser Asn Pro Gly

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

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

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

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

Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile
 275 280 285
 Pro Pro Pro Lys Lys Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys
 290 295 300
 Met Ile Thr Asn Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp
 305 310 315 320
 Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Lys
 325 330 335
 Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser
 340 345 350
 Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly
 355 360 365
 Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Gly
 370 375 380
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 385 390 395 400
 Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 405 410 415
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 420 425 430
 Ser Ser His Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 435 440 445
 Glu Trp Val Ser Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp
 450 455 460
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 465 470 475 480
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 485 490 495
 Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 500 505 510
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

515

<210> 72

<211> 607

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine ICOSL linker muIgG1 Fc (DAPG DD) 4GS linker FAP(28H1) VL

<400> 72

Glu Thr Glu Val Gly Ala Met Val Gly Ser Asn Val Val Leu Ser Cys

1 5 10 15

Ile Asp Pro His Arg Arg His Phe Asn Leu Ser Gly Leu Tyr Val Tyr

 20 25 30

Trp Gln Ile Glu Asn Pro Glu Val Ser Val Thr Tyr Tyr Leu Pro Tyr

 35 40 45

Lys Ser Pro Gly Ile Asn Val Asp Ser Ser Tyr Lys Asn Arg Gly His

 50 55 60

Leu Ser Leu Asp Ser Met Lys Gln Gly Asn Phe Ser Leu Tyr Leu Lys

65 70 75 80

Asn Val Thr Pro Gln Asp Thr Gln Glu Phe Thr Cys Arg Val Phe Met

 85 90 95

Asn Thr Ala Thr Glu Leu Val Lys Ile Leu Glu Glu Val Val Arg Leu

 100 105 110

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

 115 120 125

Ser Asn Pro Gly Gln Glu Arg Thr Tyr Thr Cys Met Ser Lys Asn Gly

 130 135 140

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

145 150 155 160

Ile Asp Thr Ala Leu Gln Asn Asn Thr Val Tyr Leu Asn Lys Leu Gly

 165 170 175

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

 180 185 190

Asp Val Leu Cys Cys Val Glu Asn Val Ala Leu His Gln Asn Ile Thr

195 200 205
Ser Ile Ser Gln Ala Glu Ser Phe Thr Gly Asn Asn Thr Lys Asn Pro
210 215 220
Gln Glu Thr His Asn Asn Glu Leu Lys Gly Ser Pro Gly Ser Ser Ser
225 230 235 240
Ser Ser Gly Ser Ala Gly Ser Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser
245 250 255
Ala Asp Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser
260 265 270

Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu
275 280 285
Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Ala Ile Ser Lys Asp Asp Pro
290 295 300
Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala
305 310 315 320
Gln Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Ile Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val
325 330 335

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

Met Ile Thr Asn Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp
405 410 415
Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Asp Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp
420 425 430
Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Asp Leu Asn Val Gln Lys Ser
435 440 445

Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly
 450 455 460

Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Gly
 465 470 475 480

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 485 490 495

Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu
 500 505 510

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
 515 520 525

Ser Arg Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 530 535 540

Arg Leu Leu Ile Ile Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp
 545 550 555 560

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 565 570 575

Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln
 580 585 590

Val Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 595 600 605

<210> 73

<211> 607

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine ICOSL Linker muIgG1 Fc (DAPG KK) G4S linker DP47 VH

<400> 73

Glu Thr Glu Val Gly Ala Met Val Gly Ser Asn Val Val Leu Ser Cys
 1 5 10 15

Ile Asp Pro His Arg Arg His Phe Asn Leu Ser Gly Leu Tyr Val Tyr
 20 25 30

Trp Gln Ile Glu Asn Pro Glu Val Ser Val Thr Tyr Tyr Leu Pro Tyr

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

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

 Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Lys
 420 425 430
 Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser
 435 440 445
 Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly
 450 455 460
 Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Gly
 465 470 475 480

 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 485 490 495
 Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu
 500 505 510
 Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
 515 520 525
 Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

530

535

540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

<210> 74

<211> 614

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine ICOSL linker muIgG1 Fc (DAPG DD) 4GS linker DP47 VL

<400> 74

Glu Thr Glu Val Gly Ala Met Val Gly Ser Asn Val Val Leu Ser Cys

1 5 10 15

Ile Asp Pro His Arg Arg His Phe Asn Leu Ser Gly Leu Tyr Val Tyr

20 25 30

Trp Gln Ile Glu Asn Pro Glu Val Ser Val Thr Tyr Tyr Leu Pro Tyr

35 40 45

Lys Ser Pro Gly Ile Asn Val Asp Ser Ser Tyr Lys Asn Arg Gly His

50 55 60

Leu Ser Leu Asp Ser Met Lys Gln Gly Asn Phe Ser Leu Tyr Leu Lys

65 70 75 80

Asn Val Thr Pro Gln Asp Thr Gln Glu Phe Thr Cys Arg Val Phe Met

85 90 95

Asn Thr Ala Thr Glu Leu Val Lys Ile Leu Glu Glu Val Val Arg Leu

100 105 110

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

115 120 125

Ser Asn Pro Gly Gln Glu Arg Thr Tyr Thr Cys Met Ser Lys Asn Gly
 130 135 140
 Tyr Pro Glu Pro Asn Leu Tyr Trp Ile Asn Thr Thr Asp Asn Ser Leu
 145 150 155 160
 Ile Asp Thr Ala Leu Gln Asn Asn Thr Val Tyr Leu Asn Lys Leu Gly
 165 170 175

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

 Ser Ser Gly Ser Ala Gly Ser Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser
 245 250 255
 Ala Asp Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser
 260 265 270
 Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu
 275 280 285
 Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Ala Ile Ser Lys Asp Asp Pro
 290 295 300

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

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

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

 Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Asp Leu Asn Val Gln Lys Ser
 435 440 445
 Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly
 450 455 460
 Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Gly
 465 470 475 480
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 485 490 495

 Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 500 505 510
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 515 520 525
 Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 530 535 540
 Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala
 545 550 555 560

 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 565 570 575
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 580 585 590
 Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 595 600 605
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 610
 <210> 75

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHCH1(CH1A1A 98/99 2F1)- Fc(KK) DAPG chain

<400> 75

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser

 115 120 125

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val

 130 135 140

Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

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

 165 170 175

Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro

 180 185 190

Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro

 195 200 205

Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly
 210 215 220

Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Ala Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270

Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Ile Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu
 290 295 300

Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg
 305 310 315 320

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

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

Lys Lys Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr
 355 360 365

Asn Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Lys Thr Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu
 405 410 415

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

His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro
 435 440

<210> 76

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VLCL (CH1A1A 98/99 2F1) Light chain

<400> 76

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala

 100 105 110

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

 115 120 125

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

 130 135 140

Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val

145 150 155 160

Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met

 165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser

 180 185 190

Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys

 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys

210 215

<210> 77

<211> 676

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHCL VHCH1 (2C11- CH1A1A 98/99 2F1)-
Fc(DD) DAPG chain

<400> 77

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ile Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Phe Asp Trp Asp Lys Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val

100 105 110

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

115 120 125

Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe

130 135 140

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp

145 150 155 160

Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp

165 170 175

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys

180 185 190

Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys
 195 200 205
 Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys Gly
 210 215 220
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser
 225 230 235 240
 Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys
 245 250 255
 Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe Gly Met Asn Trp Val Arg Gln
 260 265 270
 Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr
 275 280 285
 Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr
 290 295 300
 Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg
 305 310 315 320
 Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr
 325 330 335
 Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 340 345 350
 Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly
 355 360 365
 Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys
 370 375 380
 Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu
 385 390 395 400
 Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr
 405 410 415
 Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln
 420 425 430
 Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp

435 440 445
 Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr

 450 455 460
 Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 465 470 475 480
 Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Ala
 485 490 495
 Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp
 500 505 510
 Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Ile Asn

 515 520 525
 Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp
 530 535 540
 Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Gly
 545 550 555 560
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala
 565 570 575
 Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp

 580 585 590
 Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asn Phe Phe Pro Glu Asp Ile
 595 600 605
 Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Asp Asn
 610 615 620
 Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Asp
 625 630 635 640
 Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys

 645 650 655
 Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu
 660 665 670
 Ser His Ser Pro
 675

<210> 78

<211> 211

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VLCH1 (2C11) Light chain

<400> 78

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu

130 135 140

Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His

145 150 155 160

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

165 170 175

Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn

180 185 190

Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro

195 200 205

Arg Asp Cys

210

<210> 79

<211> 760

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Met Lys Thr Trp Val Lys Ile Val Phe Gly Val Ala Thr Ser Ala Val

1 5 10 15

Leu Ala Leu Leu Val Met Cys Ile Val Leu Arg Pro Ser Arg Val His

 20 25 30

Asn Ser Glu Glu Asn Thr Met Arg Ala Leu Thr Leu Lys Asp Ile Leu

 35 40 45

Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Phe Phe Pro Asn Trp Ile Ser Gly

 50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Glu Thr Gly Gln Ser Tyr Thr Ile Leu Ser Asn Arg Thr Met Lys

 85 90 95

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

 100 105 110

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

 115 120 125

Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Ser Asn Gly Glu Phe Val Arg Gly Asn

 130 135 140

Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys Trp Ser Pro Val Gly Ser

145 150 155 160

Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu Lys Gln Arg Pro

 165 170 175

Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Phe Asn Gly Arg Glu Asn Lys Ile

 180 185 190

Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu Glu Glu Met Leu Ala Thr
 195 200 205
 Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly Lys Phe Leu Ala Tyr Ala
 210 215 220
 Glu Phe Asn Asp Thr Asp Ile Pro Val Ile Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly
 225 230 235 240
 Asp Glu Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile Pro Tyr Pro Lys Ala Gly
 245 250 255

 Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Ile Phe Ile Ile Asp Thr Thr Tyr Pro
 260 265 270
 Ala Tyr Val Gly Pro Gln Glu Val Pro Val Pro Ala Met Ile Ala Ser
 275 280 285
 Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp Val Thr Asp Glu Arg Val
 290 295 300
 Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn Val Ser Val Leu Ser Ile
 305 310 315 320

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

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

435 440 445
 Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu
 450 455 460
 Val Cys Tyr Gly Pro Gly Ile Pro Ile Ser Thr Leu His Asp Gly Arg
 465 470 475 480
 Thr Asp Gln Glu Ile Lys Ile Leu Glu Glu Asn Lys Glu Leu Glu Asn
 485 490 495
 Ala Leu Lys Asn Ile Gln Leu Pro Lys Glu Glu Ile Lys Lys Leu Glu
 500 505 510

 Val Asp Glu Ile Thr Leu Trp Tyr Lys Met Ile Leu Pro Pro Gln Phe
 515 520 525
 Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gln Val Tyr Gly Gly Pro
 530 535 540
 Cys Ser Gln Ser Val Arg Ser Val Phe Ala Val Asn Trp Ile Ser Tyr
 545 550 555 560
 Leu Ala Ser Lys Glu Gly Met Val Ile Ala Leu Val Asp Gly Arg Gly
 565 570 575

 Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Leu Leu Tyr Ala Val Tyr Arg Lys Leu
 580 585 590
 Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Ile Thr Ala Val Arg Lys Phe Ile
 595 600 605
 Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Lys Arg Ile Ala Ile Trp Gly Trp Ser
 610 615 620
 Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ser Gly Thr Gly Leu
 625 630 635 640

 Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr
 645 650 655
 Ala Ser Val Tyr Thr Glu Arg Phe Met Gly Leu Pro Thr Lys Asp Asp
 660 665 670
 Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val Met Ala Arg Ala Glu Tyr
 675 680 685

Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His Gly Thr Ala Asp Asp Asn
 690 695 700

Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala Lys Ala Leu Val Asn Ala
 705 710 715 720

Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser Asp Gln Asn His Gly Leu
 725 730 735

Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr His Met Thr His Phe Leu
 740 745 750

Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp
 755 760

<210> 80

<211> 748

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hu FAP ectodomain+poly-lys-tag+his6-tag

<400> 80

Arg Pro Ser Arg Val His Asn Ser Glu Glu Asn Thr Met Arg Ala Leu
 1 5 10 15

Thr Leu Lys Asp Ile Leu Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Phe Phe
 20 25 30

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

Asn Ile Val Leu Tyr Asn Ile Glu Thr Gly Gln Ser Tyr Thr Ile Leu

50 55 60

Ser Asn Arg Thr Met Lys Ser Val Asn Ala Ser Asn Tyr Gly Leu Ser
 65 70 75 80

Pro Asp Arg Gln Phe Val Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp
 85 90 95

Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Ser Asn Gly
 100 105 110

Glu Phe Val Arg Gly Asn Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys

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

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

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

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

Trp Glu Ala Ile Asn Ile Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr
 370 375 380
 Ser Ser Asn Glu Phe Glu Glu Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg
 385 390 395 400
 Ile Ser Ile Gly Ser Tyr Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His
 405 410 415
 Leu Arg Lys Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Asp Tyr
 420 425 430
 Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu Val Cys Tyr Gly Pro Gly Ile Pro Ile Ser
 435 440 445
 Thr Leu His Asp Gly Arg Thr Asp Gln Glu Ile Lys Ile Leu Glu Glu
 450 455 460
 Asn Lys Glu Leu Glu Asn Ala Leu Lys Asn Ile Gln Leu Pro Lys Glu
 465 470 475 480
 Glu Ile Lys Lys Leu Glu Val Asp Glu Ile Thr Leu Trp Tyr Lys Met
 485 490 495
 Ile Leu Pro Pro Gln Phe Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile
 500 505 510
 Gln Val Tyr Gly Gly Pro Cys Ser Gln Ser Val Arg Ser Val Phe Ala
 515 520 525
 Val Asn Trp Ile Ser Tyr Leu Ala Ser Lys Glu Gly Met Val Ile Ala
 530 535 540
 Leu Val Asp Gly Arg Gly Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Leu Leu Tyr
 545 550 555 560
 Ala Val Tyr Arg Lys Leu Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Ile Thr
 565 570 575
 Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Lys Arg Ile
 580 585 590
 Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu
 595 600 605
 Ala Ser Gly Thr Gly Leu Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val

610 615 620
 Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr Ala Ser Val Tyr Thr Glu Arg Phe Met Gly

625 630 635 640
 Leu Pro Thr Lys Asp Asp Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val

645 650 655
 Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His

660 665 670
 Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala

675 680 685
 Lys Ala Leu Val Asn Ala Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser

690 695 700
 Asp Gln Asn His Gly Leu Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr

705 710 715 720
 His Met Thr His Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp Gly Lys

725 730 735
 Lys Lys Lys Lys Lys Gly His His His His His His His

740 745
 <210> 81

<211> 761

<212> PRT

<213> murine

<400> 81
 Met Lys Thr Trp Leu Lys Thr Val Phe Gly Val Thr Thr Leu Ala Ala

1 5 10 15
 Leu Ala Leu Val Val Ile Cys Ile Val Leu Arg Pro Ser Arg Val Tyr

20 25 30
 Lys Pro Glu Gly Asn Thr Lys Arg Ala Leu Thr Leu Lys Asp Ile Leu

35 40 45
 Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Tyr Phe Pro Asn Trp Ile Ser Glu

50 55 60
 Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Glu Asp Asp Asn Ile Val Phe Tyr Asn

65 70 75 80
Ile Glu Thr Arg Glu Ser Tyr Ile Ile Leu Ser Asn Ser Thr Met Lys
85 90 95
Ser Val Asn Ala Thr Asp Tyr Gly Leu Ser Pro Asp Arg Gln Phe Val
100 105 110
Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala
115 120 125
Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Gln Asn Gly Glu Phe Val Arg Gly Tyr
130 135 140
Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys Trp Ser Pro Val Gly Ser
145 150 155 160
Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu Lys Gln Arg Pro
165 170 175
Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Tyr Thr Gly Arg Glu Asn Arg Ile
180 185 190
Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu Glu Glu Met Leu Ala Thr
195 200 205
Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asp Gly Lys Phe Leu Ala Tyr Val
210 215 220
Glu Phe Asn Asp Ser Asp Ile Pro Ile Ile Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly
225 230 235 240
Asp Gly Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile Pro Tyr Pro Lys Ala Gly
245 250 255
Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Val Phe Ile Val Asp Thr Thr Tyr Pro
260 265 270
His His Val Gly Pro Met Glu Val Pro Val Pro Glu Met Ile Ala Ser
275 280 285
Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp Val Ser Ser Glu Arg Val
290 295 300
Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn Val Ser Val Leu Ser Ile
305 310 315 320

Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp His Ala Trp Glu Cys Pro Lys Asn Gln
 325 330 335
 Glu His Val Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp Ala Gly Gly Phe Phe Val
 340 345 350
 Ser Thr Pro Ala Phe Ser Gln Asp Ala Thr Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe
 355 360 365
 Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His Tyr Ile Lys Asp Thr Val
 370 375 380
 Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys Trp Glu Ala Ile Tyr Ile
 385 390 395 400
 Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr Ser Ser Asn Glu Phe Glu
 405 410 415
 Gly Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg Ile Ser Ile Gly Asn Ser
 420 425 430
 Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His Leu Arg Lys Glu Arg Cys
 435 440 445
 Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Tyr Lys Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu
 450 455 460
 Val Cys Tyr Gly Pro Gly Leu Pro Ile Ser Thr Leu His Asp Gly Arg
 465 470 475 480
 Thr Asp Gln Glu Ile Gln Val Leu Glu Glu Asn Lys Glu Leu Glu Asn
 485 490 495
 Ser Leu Arg Asn Ile Gln Leu Pro Lys Val Glu Ile Lys Lys Leu Lys
 500 505 510
 Asp Gly Gly Leu Thr Phe Trp Tyr Lys Met Ile Leu Pro Pro Gln Phe
 515 520 525
 Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gln Val Tyr Gly Gly Pro
 530 535 540
 Cys Ser Gln Ser Val Lys Ser Val Phe Ala Val Asn Trp Ile Thr Tyr
 545 550 555 560
 Leu Ala Ser Lys Glu Gly Ile Val Ile Ala Leu Val Asp Gly Arg Gly

565 570 575
 Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Phe Leu His Ala Val Tyr Arg Lys Leu

580 585 590
 Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Leu Thr Ala Val Arg Lys Phe Ile

595 600 605
 Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Glu Arg Ile Ala Ile Trp Gly Trp Ser

610 615 620
 Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ser Gly Thr Gly Leu

625 630 635 640
 Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr

645 650 655
 Ala Ser Ile Tyr Ser Glu Arg Phe Met Gly Leu Pro Thr Lys Asp Asp

660 665 670
 Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val Met Ala Arg Ala Glu Tyr

675 680 685
 Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His Gly Thr Ala Asp Asp Asn

690 695 700
 Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala Lys Ala Leu Val Asn Ala

705 710 715 720
 Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser Asp Gln Asn His Gly Ile

725 730 735
 Ser Ser Gly Arg Ser Gln Asn His Leu Tyr Thr His Met Thr His Phe

740 745 750
 Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp

755 760

<210> 82

<211> 749

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine FAP ectodomain+poly-lys-tag+his6-tag

<400> 82

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

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

 Trp Ser Pro Val Gly Ser Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile
 130 135 140
 Tyr Leu Lys Gln Arg Pro Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Tyr Thr
 145 150 155 160
 Gly Arg Glu Asn Arg Ile Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu
 165 170 175
 Glu Glu Met Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asp Gly
 180 185 190

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

| | | |
|---|-----|-----|
| 245 | 250 | 255 |
| Pro Glu Met Ile Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp | | |
| 260 | 265 | 270 |
| Val Ser Ser Glu Arg Val Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn | | |
| 275 | 280 | 285 |
| Val Ser Val Leu Ser Ile Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp His Ala Trp | | |
| 290 | 295 | 300 |
| Glu Cys Pro Lys Asn Gln Glu His Val Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp | | |
| 305 | 310 | 315 |
| 320 | | |
| Ala Gly Gly Phe Phe Val Ser Thr Pro Ala Phe Ser Gln Asp Ala Thr | | |
| 325 | 330 | 335 |
| Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His | | |
| 340 | 345 | 350 |
| Tyr Ile Lys Asp Thr Val Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys | | |
| 355 | 360 | 365 |
| Trp Glu Ala Ile Tyr Ile Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr | | |
| 370 | 375 | 380 |
| Ser Ser Asn Glu Phe Glu Gly Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg | | |
| 385 | 390 | 395 |
| 400 | | |
| Ile Ser Ile Gly Asn Ser Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His | | |
| 405 | 410 | 415 |
| Leu Arg Lys Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Tyr Lys | | |
| 420 | 425 | 430 |
| Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu Val Cys Tyr Gly Pro Gly Leu Pro Ile Ser | | |
| 435 | 440 | 445 |
| Thr Leu His Asp Gly Arg Thr Asp Gln Glu Ile Gln Val Leu Glu Glu | | |
| 450 | 455 | 460 |
| Asn Lys Glu Leu Glu Asn Ser Leu Arg Asn Ile Gln Leu Pro Lys Val | | |
| 465 | 470 | 475 |
| 480 | | |
| Glu Ile Lys Lys Leu Lys Asp Gly Gly Leu Thr Phe Trp Tyr Lys Met | | |
| 485 | 490 | 495 |

Ile Leu Pro Pro Gln Phe Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile
 500 505 510

Gln Val Tyr Gly Gly Pro Cys Ser Gln Ser Val Lys Ser Val Phe Ala
 515 520 525

Val Asn Trp Ile Thr Tyr Leu Ala Ser Lys Glu Gly Ile Val Ile Ala
 530 535 540

Leu Val Asp Gly Arg Gly Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Phe Leu His
 545 550 555 560

Ala Val Tyr Arg Lys Leu Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Leu Thr
 565 570 575

Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Glu Arg Ile
 580 585 590

Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu
 595 600 605

Ala Ser Gly Thr Gly Leu Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val
 610 615 620

Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr Ala Ser Ile Tyr Ser Glu Arg Phe Met Gly
 625 630 635 640

Leu Pro Thr Lys Asp Asp Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val
 645 650 655

Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His
 660 665 670

Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala
 675 680 685

Lys Ala Leu Val Asn Ala Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser
 690 695 700

Asp Gln Asn His Gly Ile Leu Ser Gly Arg Ser Gln Asn His Leu Tyr
 705 710 715 720

Thr His Met Thr His Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp Gly
 725 730 735

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly His His His His His His

740 745

- <210> 83
- <211> 748
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Cynomolgus FAP ectodomain+poly-lys-tag+his6-tag
- <400> 83

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

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

 Trp Ser Pro Val Gly Ser Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile
 130 135 140
 Tyr Leu Lys Gln Arg Pro Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Phe Asn
 145 150 155 160
 Gly Arg Glu Asn Lys Ile Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu
 165 170 175
 Glu Glu Met Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly
 180 185 190

Lys Phe Leu Ala Tyr Ala Glu Phe Asn Asp Thr Asp Ile Pro Val Ile
 195 200 205
 Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly Asp Glu Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile
 210 215 220
 Pro Tyr Pro Lys Ala Gly Ala Lys Asn Pro Phe Val Arg Ile Phe Ile
 225 230 235 240
 Ile Asp Thr Thr Tyr Pro Ala Tyr Val Gly Pro Gln Glu Val Pro Val
 245 250 255

 Pro Ala Met Ile Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp
 260 265 270
 Val Thr Asp Glu Arg Val Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn
 275 280 285
 Val Ser Val Leu Ser Ile Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp Gln Thr Trp
 290 295 300
 Asp Cys Pro Lys Thr Gln Glu His Ile Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp
 305 310 315 320

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

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

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 435 | 440 | 445 | |
| Thr Leu His Asp Gly Arg Thr Asp Gln Glu Ile Lys Ile Leu Glu Glu | | | |
| 450 | 455 | 460 | |
| Asn Lys Glu Leu Glu Asn Ala Leu Lys Asn Ile Gln Leu Pro Lys Glu | | | |
| 465 | 470 | 475 | 480 |
| Glu Ile Lys Lys Leu Glu Val Asp Glu Ile Thr Leu Trp Tyr Lys Met | | | |
| 485 | 490 | 495 | |
| Ile Leu Pro Pro Gln Phe Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile | | | |
| 500 | 505 | 510 | |
| | | | |
| Gln Val Tyr Gly Gly Pro Cys Ser Gln Ser Val Arg Ser Val Phe Ala | | | |
| 515 | 520 | 525 | |
| Val Asn Trp Ile Ser Tyr Leu Ala Ser Lys Glu Gly Met Val Ile Ala | | | |
| 530 | 535 | 540 | |
| Leu Val Asp Gly Arg Gly Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Leu Leu Tyr | | | |
| 545 | 550 | 555 | 560 |
| Ala Val Tyr Arg Lys Leu Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Ile Thr | | | |
| 565 | 570 | 575 | |
| | | | |
| Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Lys Arg Ile | | | |
| 580 | 585 | 590 | |
| Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu | | | |
| 595 | 600 | 605 | |
| Ala Ser Gly Thr Gly Leu Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val | | | |
| 610 | 615 | 620 | |
| Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr Ala Ser Val Tyr Thr Glu Arg Phe Met Gly | | | |
| 625 | 630 | 635 | 640 |
| | | | |
| Leu Pro Thr Lys Asp Asp Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val | | | |
| 645 | 650 | 655 | |
| Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His | | | |
| 660 | 665 | 670 | |
| Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala | | | |
| 675 | 680 | 685 | |

Lys Ala Leu Val Asn Ala Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser
 690 695 700

Asp Gln Asn His Gly Leu Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr
 705 710 715 720
 His Met Thr His Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp Gly Lys
 725 730 735

Lys Lys Lys Lys Lys Gly His His His His His His
 740 745

<210> 84

<211> 702

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Met Glu Ser Pro Ser Ala Pro Pro His Arg Trp Cys Ile Pro Trp Gln
 1 5 10 15

Arg Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr
 20 25 30

Thr Ala Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly
 35 40 45

Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln His Leu Phe Gly
 50 55 60

Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Ile
 65 70 75 80

Gly Tyr Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser
 85 90 95

Gly Arg Glu Ile Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Ile
 100 105 110

Ile Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu His Val Ile Lys Ser Asp
 115 120 125

Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu
 130 135 140

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

 Asp Thr Ala Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Ala Arg
 210 215 220
 Arg Ser Asp Ser Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro
 225 230 235 240
 Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr Arg Ser Gly Glu Asn Leu Asn
 245 250 255
 Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe
 260 265 270

 Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn
 275 280 285
 Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys Gln Ala His Asn Ser
 290 295 300
 Asp Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Thr Ile Thr Val Tyr Ala
 305 310 315 320
 Glu Pro Pro Lys Pro Phe Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu
 325 330 335

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

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 385 | 390 | 395 | 400 |
| Val Asp His Ser Asp Pro Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp | | | |
| | 405 | 410 | 415 |
| Asp Pro Thr Ile Ser Pro Ser Tyr Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Val Asn | | | |
| | 420 | 425 | 430 |
| Leu Ser Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser | | | |
| | 435 | 440 | 445 |
| Trp Leu Ile Asp Gly Asn Ile Gln Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Ile | | | |
| | 450 | 455 | 460 |
| Ser Asn Ile Thr Glu Lys Asn Ser Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Asn | | | |
| 465 | 470 | 475 | 480 |
| Asn Ser Ala Ser Gly His Ser Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Thr Val | | | |
| | 485 | 490 | 495 |
| Ser Ala Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro | | | |
| | 500 | 505 | 510 |
| Val Glu Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Ala Gln | | | |
| | 515 | 520 | 525 |
| Asn Thr Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser | | | |
| | 530 | 535 | 540 |
| Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn | | | |
| 545 | 550 | 555 | 560 |
| Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn Ser | | | |
| | 565 | 570 | 575 |
| Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr Gly | | | |
| | 580 | 585 | 590 |
| Pro Asp Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly | | | |
| | 595 | 600 | 605 |
| Ala Asn Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln | | | |
| | 610 | 615 | 620 |
| Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu | | | |
| 625 | 630 | 635 | 640 |

Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe
 645 650 655

Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile
 660 665 670

Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala Gly Ala Thr
 675 680 685

Val Gly Ile Met Ile Gly Val Leu Val Gly Val Ala Leu Ile
 690 695 700

<210> 85

<211> 257

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Met Ala Gln Arg Met Thr Thr Gln Leu Leu Leu Leu Val Trp Val

1 5 10 15
 Ala Val Val Gly Glu Ala Gln Thr Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu
 20 25 30

Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly
 35 40 45

Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala
 50 55 60

Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr

65 70 75 80
 Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys
 85 90 95

Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn
 100 105 110

Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg
 115 120 125

Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu
 130 135 140

Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp
 145 150 155 160
 Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln
 165 170 175
 Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile
 180 185 190
 Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg
 195 200 205
 Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu
 210 215 220
 Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala
 225 230 235 240
 Ala Trp Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu
 245 250 255
 Ser

<210> 86
 <211> 255
 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 86

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

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

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

 Asp Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Gln Gln Trp Trp Glu Asp Cys
 130 135 140
 Gln Ser Ser Phe Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp
 145 150 155 160
 Ser Ser Gly His Asn Glu Cys Pro Val Gly Ala Ser Cys His Pro Phe
 165 170 175
 Thr Phe Tyr Phe Pro Thr Ser Ala Ala Leu Cys Glu Glu Ile Trp Ser
 180 185 190

 His Ser Tyr Lys Leu Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile
 195 200 205
 Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala
 210 215 220
 Arg Phe Tyr Ala Glu Ala Met Ser Gly Ala Gly Phe His Gly Thr Trp
 225 230 235 240
 Pro Leu Leu Cys Ser Leu Ser Leu Val Leu Leu Trp Val Ile Ser
 245 250 255

<210> 87

<211> 257

<212> PRT

<213> Cynomolgus

<400> 87

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

Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Lys Lys Asn Ala

50 55 60

Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr

65 70 75 80

Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys

85 90 95

Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn

100 105 110

Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg

115 120 125

Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Arg Trp Trp Glu

130 135 140

Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp

145 150 155 160

Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Pro Val Gly Ala Ala Cys Gln

165 170 175

Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile

180 185 190

Trp Thr Tyr Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg

195 200 205

Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu

210 215 220

Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala

225 230 235 240

Ala Trp Pro Leu Leu Leu Ser Leu Ala Leu Thr Leu Leu Trp Leu Leu

245 250 255

Ser

<210> 88

<211> 2322

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Met Gln Ser Gly Pro Arg Pro Pro Leu Pro Ala Pro Gly Leu Ala Leu

1 5 10 15

Ala Leu Thr Leu Thr Met Leu Ala Arg Leu Ala Ser Ala Ala Ser Phe

 20 25 30

Phe Gly Glu Asn His Leu Glu Val Pro Val Ala Thr Ala Leu Thr Asp

 35 40 45

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

 50 55 60

Leu Leu Ala Ala Gly Pro Ala Asp His Leu Leu Leu Gln Leu Tyr Ser

65 70 75 80

Gly Arg Leu Gln Val Arg Leu Val Leu Gly Gln Glu Glu Leu Arg Leu

 85 90 95

Gln Thr Pro Ala Glu Thr Leu Leu Ser Asp Ser Ile Pro His Thr Val

 100 105 110

Val Leu Thr Val Val Glu Gly Trp Ala Thr Leu Ser Val Asp Gly Phe

 115 120 125

Leu Asn Ala Ser Ser Ala Val Pro Gly Ala Pro Leu Glu Val Pro Tyr

 130 135 140

Gly Leu Phe Val Gly Gly Thr Gly Thr Leu Gly Leu Pro Tyr Leu Arg

145 150 155 160

Gly Thr Ser Arg Pro Leu Arg Gly Cys Leu His Ala Ala Thr Leu Asn

 165 170 175

Gly Arg Ser Leu Leu Arg Pro Leu Thr Pro Asp Val His Glu Gly Cys

 180 185 190

Ala Glu Glu Phe Ser Ala Ser Asp Asp Val Ala Leu Gly Phe Ser Gly

 195 200 205

Pro His Ser Leu Ala Ala Phe Pro Ala Trp Gly Thr Gln Asp Glu Gly

 210 215 220

Thr Leu Glu Phe Thr Leu Thr Thr Gln Ser Arg Gln Ala Pro Leu Ala

225 230 235 240

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

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

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

 Thr Ile Ser Pro Leu Val Val Ala Glu Gly Gly Thr Ala Trp Leu Glu
 435 440 445
 Trp Arg His Val Gln Pro Thr Leu Asp Leu Met Glu Ala Glu Leu Arg
 450 455 460
 Lys Ser Gln Val Leu Phe Ser Val Thr Arg Gly Ala Arg His Gly Glu
 465 470 475 480

Leu Glu Leu Asp Ile Pro Gly Ala Gln Ala Arg Lys Met Phe Thr Leu
 485 490 495

Leu Asp Val Val Asn Arg Lys Ala Arg Phe Ile His Asp Gly Ser Glu
 500 505 510

Asp Thr Ser Asp Gln Leu Val Leu Glu Val Ser Val Thr Ala Arg Val
 515 520 525

Pro Met Pro Ser Cys Leu Arg Arg Gly Gln Thr Tyr Leu Leu Pro Ile
 530 535 540

Gln Val Asn Pro Val Asn Asp Pro Pro His Ile Ile Phe Pro His Gly
 545 550 555 560

Ser Leu Met Val Ile Leu Glu His Thr Gln Lys Pro Leu Gly Pro Glu
 565 570 575

Val Phe Gln Ala Tyr Asp Pro Asp Ser Ala Cys Glu Gly Leu Thr Phe
 580 585 590

Gln Val Leu Gly Thr Ser Ser Gly Leu Pro Val Glu Arg Arg Asp Gln
 595 600 605

Pro Gly Glu Pro Ala Thr Glu Phe Ser Cys Arg Glu Leu Glu Ala Gly
 610 615 620

Ser Leu Val Tyr Val His Arg Gly Gly Pro Ala Gln Asp Leu Thr Phe
 625 630 635 640

Arg Val Ser Asp Gly Leu Gln Ala Ser Pro Pro Ala Thr Leu Lys Val
 645 650 655

Val Ala Ile Arg Pro Ala Ile Gln Ile His Arg Ser Thr Gly Leu Arg
 660 665 670

Leu Ala Gln Gly Ser Ala Met Pro Ile Leu Pro Ala Asn Leu Ser Val
 675 680 685

Glu Thr Asn Ala Val Gly Gln Asp Val Ser Val Leu Phe Arg Val Thr
 690 695 700

Gly Ala Leu Gln Phe Gly Glu Leu Gln Lys Gln Gly Ala Gly Gly Val
 705 710 715 720

Glu Gly Ala Glu Trp Trp Ala Thr Gln Ala Phe His Gln Arg Asp Val

725 730 735
 Glu Gln Gly Arg Val Arg Tyr Leu Ser Thr Asp Pro Gln His His Ala
 740 745 750

Tyr Asp Thr Val Glu Asn Leu Ala Leu Glu Val Gln Val Gly Gln Glu
 755 760 765

Ile Leu Ser Asn Leu Ser Phe Pro Val Thr Ile Gln Arg Ala Thr Val
 770 775 780

Trp Met Leu Arg Leu Glu Pro Leu His Thr Gln Asn Thr Gln Gln Glu
 785 790 795 800

Thr Leu Thr Thr Ala His Leu Glu Ala Thr Leu Glu Glu Ala Gly Pro
 805 810 815

Ser Pro Pro Thr Phe His Tyr Glu Val Val Gln Ala Pro Arg Lys Gly
 820 825 830

Asn Leu Gln Leu Gln Gly Thr Arg Leu Ser Asp Gly Gln Gly Phe Thr
 835 840 845

Gln Asp Asp Ile Gln Ala Gly Arg Val Thr Tyr Gly Ala Thr Ala Arg
 850 855 860

Ala Ser Glu Ala Val Glu Asp Thr Phe Arg Phe Arg Val Thr Ala Pro
 865 870 875 880

Pro Tyr Phe Ser Pro Leu Tyr Thr Phe Pro Ile His Ile Gly Gly Asp
 885 890 895

Pro Asp Ala Pro Val Leu Thr Asn Val Leu Leu Val Val Pro Glu Gly
 900 905 910

Gly Glu Gly Val Leu Ser Ala Asp His Leu Phe Val Lys Ser Leu Asn
 915 920 925

Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Glu Val Met Glu Arg Pro Arg His Gly Arg
 930 935 940

Leu Ala Trp Arg Gly Thr Gln Asp Lys Thr Thr Met Val Thr Ser Phe
 945 950 955 960

Thr Asn Glu Asp Leu Leu Arg Gly Arg Leu Val Tyr Gln His Asp Asp
 965 970 975

Ser Glu Thr Thr Glu Asp Asp Ile Pro Phe Val Ala Thr Arg Gln Gly
 980 985 990

Glu Ser Ser Gly Asp Met Ala Trp Glu Glu Val Arg Gly Val Phe Arg
 995 1000 1005

Val Ala Ile Gln Pro Val Asn Asp His Ala Pro Val Gln Thr Ile
 1010 1015 1020

Ser Arg Ile Phe His Val Ala Arg Gly Gly Arg Arg Leu Leu Thr
 1025 1030 1035

Thr Asp Asp Val Ala Phe Ser Asp Ala Asp Ser Gly Phe Ala Asp
 1040 1045 1050

Ala Gln Leu Val Leu Thr Arg Lys Asp Leu Leu Phe Gly Ser Ile
 1055 1060 1065

Val Ala Val Asp Glu Pro Thr Arg Pro Ile Tyr Arg Phe Thr Gln
 1070 1075 1080

Glu Asp Leu Arg Lys Arg Arg Val Leu Phe Val His Ser Gly Ala
 1085 1090 1095

Asp Arg Gly Trp Ile Gln Leu Gln Val Ser Asp Gly Gln His Gln
 1100 1105 1110

Ala Thr Ala Leu Leu Glu Val Gln Ala Ser Glu Pro Tyr Leu Arg
 1115 1120 1125

Val Ala Asn Gly Ser Ser Leu Val Val Pro Gln Gly Gly Gln Gly
 1130 1135 1140

Thr Ile Asp Thr Ala Val Leu His Leu Asp Thr Asn Leu Asp Ile
 1145 1150 1155

Arg Ser Gly Asp Glu Val His Tyr His Val Thr Ala Gly Pro Arg
 1160 1165 1170

Trp Gly Gln Leu Val Arg Ala Gly Gln Pro Ala Thr Ala Phe Ser
 1175 1180 1185

Gln Gln Asp Leu Leu Asp Gly Ala Val Leu Tyr Ser His Asn Gly
 1190 1195 1200

Ser Leu Ser Pro Arg Asp Thr Met Ala Phe Ser Val Glu Ala Gly

| | | |
|-----------------------------|---------------------|-------------|
| 1205 | 1210 | 1215 |
| Pro Val His Thr Asp Ala Thr | Leu Gln Val Thr Ile | Ala Leu Glu |
| 1220 | 1225 | 1230 |
| Gly Pro Leu Ala Pro Leu Lys | Leu Val Arg His Lys | Lys Ile Tyr |
| 1235 | 1240 | 1245 |
| | | |
| Val Phe Gln Gly Glu Ala Ala | Glu Ile Arg Arg Asp | Gln Leu Glu |
| 1250 | 1255 | 1260 |
| Ala Ala Gln Glu Ala Val Pro | Pro Ala Asp Ile Val | Phe Ser Val |
| 1265 | 1270 | 1275 |
| Lys Ser Pro Pro Ser Ala Gly | Tyr Leu Val Met Val | Ser Arg Gly |
| 1280 | 1285 | 1290 |
| Ala Leu Ala Asp Glu Pro Pro | Ser Leu Asp Pro Val | Gln Ser Phe |
| 1295 | 1300 | 1305 |
| | | |
| Ser Gln Glu Ala Val Asp Thr | Gly Arg Val Leu Tyr | Leu His Ser |
| 1310 | 1315 | 1320 |
| Arg Pro Glu Ala Trp Ser Asp | Ala Phe Ser Leu Asp | Val Ala Ser |
| 1325 | 1330 | 1335 |
| Gly Leu Gly Ala Pro Leu Glu | Gly Val Leu Val Glu | Leu Glu Val |
| 1340 | 1345 | 1350 |
| Leu Pro Ala Ala Ile Pro Leu | Glu Ala Gln Asn Phe | Ser Val Pro |
| 1355 | 1360 | 1365 |
| | | |
| Glu Gly Gly Ser Leu Thr Leu | Ala Pro Pro Leu Leu | Arg Val Ser |
| 1370 | 1375 | 1380 |
| Gly Pro Tyr Phe Pro Thr Leu | Leu Gly Leu Ser Leu | Gln Val Leu |
| 1385 | 1390 | 1395 |
| Glu Pro Pro Gln His Gly Ala | Leu Gln Lys Glu Asp | Gly Pro Gln |
| 1400 | 1405 | 1410 |
| Ala Arg Thr Leu Ser Ala Phe | Ser Trp Arg Met Val | Glu Glu Gln |
| 1415 | 1420 | 1425 |
| | | |
| Leu Ile Arg Tyr Val His Asp | Gly Ser Glu Thr Leu | Thr Asp Ser |
| 1430 | 1435 | 1440 |

Phe Val Leu Met Ala Asn Ala Ser Glu Met Asp Arg Gln Ser His
 1445 1450 1455
 Pro Val Ala Phe Thr Val Thr Val Leu Pro Val Asn Asp Gln Pro
 1460 1465 1470
 Pro Ile Leu Thr Thr Asn Thr Gly Leu Gln Met Trp Glu Gly Ala
 1475 1480 1485

 Thr Ala Pro Ile Pro Ala Glu Ala Leu Arg Ser Thr Asp Gly Asp
 1490 1495 1500
 Ser Gly Ser Glu Asp Leu Val Tyr Thr Ile Glu Gln Pro Ser Asn
 1505 1510 1515
 Gly Arg Val Val Leu Arg Gly Ala Pro Gly Thr Glu Val Arg Ser
 1520 1525 1530
 Phe Thr Gln Ala Gln Leu Asp Gly Gly Leu Val Leu Phe Ser His
 1535 1540 1545

 Arg Gly Thr Leu Asp Gly Gly Phe Arg Phe Arg Leu Ser Asp Gly
 1550 1555 1560
 Glu His Thr Ser Pro Gly His Phe Phe Arg Val Thr Ala Gln Lys
 1565 1570 1575
 Gln Val Leu Leu Ser Leu Lys Gly Ser Gln Thr Leu Thr Val Cys
 1580 1585 1590
 Pro Gly Ser Val Gln Pro Leu Ser Ser Gln Thr Leu Arg Ala Ser
 1595 1600 1605

 Ser Ser Ala Gly Thr Asp Pro Gln Leu Leu Leu Tyr Arg Val Val
 1610 1615 1620
 Arg Gly Pro Gln Leu Gly Arg Leu Phe His Ala Gln Gln Asp Ser
 1625 1630 1635
 Thr Gly Glu Ala Leu Val Asn Phe Thr Gln Ala Glu Val Tyr Ala
 1640 1645 1650
 Gly Asn Ile Leu Tyr Glu His Glu Met Pro Pro Glu Pro Phe Trp
 1655 1660 1665

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

| | | |
|-----------------------------|---------------------|-------------|
| 1670 | 1675 | 1680 |
| Arg Asp Val Ala Ala Thr Leu | Ala Val Ala Val Ser | Phe Glu Ala |
| 1685 | 1690 | 1695 |
| Ala Cys Pro Gln Arg Pro Ser | His Leu Trp Lys Asn | Lys Gly Leu |
| 1700 | 1705 | 1710 |
| Trp Val Pro Glu Gly Gln Arg | Ala Arg Ile Thr Val | Ala Ala Leu |
| 1715 | 1720 | 1725 |
| | | |
| Asp Ala Ser Asn Leu Leu Ala | Ser Val Pro Ser Pro | Gln Arg Ser |
| 1730 | 1735 | 1740 |
| Glu His Asp Val Leu Phe Gln | Val Thr Gln Phe Pro | Ser Arg Gly |
| 1745 | 1750 | 1755 |
| Gln Leu Leu Val Ser Glu Glu | Pro Leu His Ala Gly | Gln Pro His |
| 1760 | 1765 | 1770 |
| Phe Leu Gln Ser Gln Leu Ala | Ala Gly Gln Leu Val | Tyr Ala His |
| 1775 | 1780 | 1785 |
| | | |
| Gly Gly Gly Gly Thr Gln Gln | Asp Gly Phe His Phe | Arg Ala His |
| 1790 | 1795 | 1800 |
| Leu Gln Gly Pro Ala Gly Ala | Ser Val Ala Gly Pro | Gln Thr Ser |
| 1805 | 1810 | 1815 |
| Glu Ala Phe Ala Ile Thr Val | Arg Asp Val Asn Glu | Arg Pro Pro |
| 1820 | 1825 | 1830 |
| Gln Pro Gln Ala Ser Val Pro | Leu Arg Leu Thr Arg | Gly Ser Arg |
| 1835 | 1840 | 1845 |
| | | |
| Ala Pro Ile Ser Arg Ala Gln | Leu Ser Val Val Asp | Pro Asp Ser |
| 1850 | 1855 | 1860 |
| Ala Pro Gly Glu Ile Glu Tyr | Glu Val Gln Arg Ala | Pro His Asn |
| 1865 | 1870 | 1875 |
| Gly Phe Leu Ser Leu Val Gly | Gly Gly Leu Gly Pro | Val Thr Arg |
| 1880 | 1885 | 1890 |
| Phe Thr Gln Ala Asp Val Asp | Ser Gly Arg Leu Ala | Phe Val Ala |
| 1895 | 1900 | 1905 |

Asn Gly Ser Ser Val Ala Gly Ile Phe Gln Leu Ser Met Ser Asp
 1910 1915 1920

Gly Ala Ser Pro Pro Leu Pro Met Ser Leu Ala Val Asp Ile Leu
 1925 1930 1935

Pro Ser Ala Ile Glu Val Gln Leu Arg Ala Pro Leu Glu Val Pro
 1940 1945 1950

Gln Ala Leu Gly Arg Ser Ser Leu Ser Gln Gln Gln Leu Arg Val
 1955 1960 1965

Val Ser Asp Arg Glu Glu Pro Glu Ala Ala Tyr Arg Leu Ile Gln
 1970 1975 1980

Gly Pro Gln Tyr Gly His Leu Leu Val Gly Gly Arg Pro Thr Ser
 1985 1990 1995

Ala Phe Ser Gln Phe Gln Ile Asp Gln Gly Glu Val Val Phe Ala
 2000 2005 2010

Phe Thr Asn Phe Ser Ser Ser His Asp His Phe Arg Val Leu Ala
 2015 2020 2025

Leu Ala Arg Gly Val Asn Ala Ser Ala Val Val Asn Val Thr Val
 2030 2035 2040

Arg Ala Leu Leu His Val Trp Ala Gly Gly Pro Trp Pro Gln Gly
 2045 2050 2055

Ala Thr Leu Arg Leu Asp Pro Thr Val Leu Asp Ala Gly Glu Leu
 2060 2065 2070

Ala Asn Arg Thr Gly Ser Val Pro Arg Phe Arg Leu Leu Glu Gly
 2075 2080 2085

Pro Arg His Gly Arg Val Val Arg Val Pro Arg Ala Arg Thr Glu
 2090 2095 2100

Pro Gly Gly Ser Gln Leu Val Glu Gln Phe Thr Gln Gln Asp Leu
 2105 2110 2115

Glu Asp Gly Arg Leu Gly Leu Glu Val Gly Arg Pro Glu Gly Arg
 2120 2125 2130

Ala Pro Gly Pro Ala Gly Asp Ser Leu Thr Leu Glu Leu Trp Ala

2135 2140 2145
 Gln Gly Val Pro Pro Ala Val Ala Ser Leu Asp Phe Ala Thr Glu
 2150 2155 2160
 Pro Tyr Asn Ala Ala Arg Pro Tyr Ser Val Ala Leu Leu Ser Val
 2165 2170 2175
 Pro Glu Ala Ala Arg Thr Glu Ala Gly Lys Pro Glu Ser Ser Thr
 2180 2185 2190
 Pro Thr Gly Glu Pro Gly Pro Met Ala Ser Ser Pro Glu Pro Ala
 2195 2200 2205

 Val Ala Lys Gly Gly Phe Leu Ser Phe Leu Glu Ala Asn Met Phe
 2210 2215 2220
 Ser Val Ile Ile Pro Met Cys Leu Val Leu Leu Leu Leu Ala Leu
 2225 2230 2235
 Ile Leu Pro Leu Leu Phe Tyr Leu Arg Lys Arg Asn Lys Thr Gly
 2240 2245 2250
 Lys His Asp Val Gln Val Leu Thr Ala Lys Pro Arg Asn Gly Leu
 2255 2260 2265

 Ala Gly Asp Thr Glu Thr Phe Arg Lys Val Glu Pro Gly Gln Ala
 2270 2275 2280
 Ile Pro Leu Thr Ala Val Pro Gly Gln Gly Pro Pro Pro Gly Gly
 2285 2290 2295
 Gln Pro Asp Pro Glu Leu Leu Gln Phe Cys Arg Thr Pro Asn Pro
 2300 2305 2310
 Ala Leu Lys Asn Gly Gln Tyr Trp Val
 2315 2320
 <210> 89
 <211> 1210
 <212> PRT

 <213> Homo sapiens
 <400> 89
 Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala

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

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

 Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu
 130 135 140
 His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu
 145 150 155 160
 Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met
 165 170 175
 Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro
 180 185 190

 Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln
 195 200 205
 Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg
 210 215 220
 Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys
 225 230 235 240
 Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp
 245 250 255

Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro
 260 265 270
 Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly
 275 280 285
 Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His
 290 295 300
 Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu
 305 310 315 320

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

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

 Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser
 450 455 460
 Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu
 465 470 475 480
 Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu
 485 490 495
 Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro

500 505 510

 Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn
 515 520 525
 Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly
 530 535 540
 Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro
 545 550 555 560
 Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro
 565 570 575

 Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val
 580 585 590
 Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp
 595 600 605
 Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys
 610 615 620
 Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly
 625 630 635 640

 Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu
 645 650 655
 Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His
 660 665 670
 Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu
 675 680 685
 Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu
 690 695 700

 Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser
 705 710 715 720
 Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu
 725 730 735
 Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser
 740 745 750

Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser
 755 760 765

Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser
 770 775 780

Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp
 785 790 795 800

Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn
 805 810 815

Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg
 820 825 830

Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro
 835 840 845

Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala
 850 855 860

Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp
 865 870 875 880

Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp
 885 890 895

Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser
 900 905 910

Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu
 915 920 925

Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr
 930 935 940

Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys
 945 950 955 960

Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln
 965 970 975

Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro
 980 985 990

Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp

| | | |
|---|------|------|
| 995 | 1000 | 1005 |
| Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe | | |
| 1010 | 1015 | 1020 |
| | | |
| Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu Ser Ser Leu | | |
| 1025 | 1030 | 1035 |
| Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp Arg Asn | | |
| 1040 | 1045 | 1050 |
| Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg | | |
| 1055 | 1060 | 1065 |
| Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp | | |
| 1070 | 1075 | 1080 |
| | | |
| Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro | | |
| 1085 | 1090 | 1095 |
| Lys Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln | | |
| 1100 | 1105 | 1110 |
| Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro | | |
| 1115 | 1120 | 1125 |
| His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln | | |
| 1130 | 1135 | 1140 |
| | | |
| Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala His Trp Ala | | |
| 1145 | 1150 | 1155 |
| Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp Tyr Gln | | |
| 1160 | 1165 | 1170 |
| Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn Gly Ile Phe Lys | | |
| 1175 | 1180 | 1185 |
| Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val Ala Pro Gln | | |
| 1190 | 1195 | 1200 |
| | | |
| Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala | | |
| 1205 | 1210 | |
| <210> 90 | | |
| <211> 1255 | | |

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu

1 5 10 15

Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys

 20 25 30

Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His

 35 40 45

Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr

 50 55 60

Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val

65 70 75 80

Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu

 85 90 95

Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr

 100 105 110

Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro

 115 120 125

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

 130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn

 165 170 175

Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys

 180 185 190

His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser

 195 200 205

Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys

 210 215 220

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

225 230 235 240

Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu
 245 250 255

His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val
 260 265 270

Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg
 275 280 285

Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu
 290 295 300

Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln
 305 310 315 320

Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys
 325 330 335

Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu
 340 345 350

Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys
 355 360 365

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp
 370 375 380

Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe
 385 390 395 400

Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro
 405 410 415

Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg
 420 425 430

Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu
 435 440 445

Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly
 450 455 460

Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val
 465 470 475 480

Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr
 485 490 495

Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His
 500 505 510

Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys
 515 520 525

Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys
 530 535 540

Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys
 545 550 555 560

Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys
 565 570 575

Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp
 580 585 590

Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu
 595 600 605

Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln
 610 615 620

Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys
 625 630 635 640

Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser
 645 650 655

Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly
 660 665 670

Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg
 675 680 685

Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly
 690 695 700

Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu
 705 710 715 720

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

725 730 735
 Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile
 740 745 750

Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
 755 760 765

Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg
 770 775 780

Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu
 785 790 795 800

Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg
 805 810 815

Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly
 820 825 830

Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala
 835 840 845

Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe
 850 855 860

Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp
 865 870 875 880

Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg
 885 890 895

Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val
 900 905 910

Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala
 915 920 925

Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro
 930 935 940

Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met
 945 950 955 960

Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe
 965 970 975

Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu
 980 985 990

Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu
 995 1000 1005

Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr
 1010 1015 1020

Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly
 1025 1030 1035

Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg
 1040 1045 1050

Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu
 1055 1060 1065

Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser
 1070 1075 1080

Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu
 1085 1090 1095

Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser
 1100 1105 1110

Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val
 1115 1120 1125

Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro
 1130 1135 1140

Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu Gly Pro Leu Pro
 1145 1150 1155

Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Pro Lys Thr Leu
 1160 1165 1170

Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly
 1175 1180 1185

Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly Ala
 1190 1195 1200

Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp

1205 1210 1215
 Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro
 1220 1225 1230
 Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr
 1235 1240 1245

 Leu Gly Leu Asp Val Pro Val
 1250 1255
 <210> 91
 <211> 645
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 91
 Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys
 1 5 10 15
 Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys
 20 25 30
 Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser Ala Val
 35 40 45

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

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

Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg Leu Leu
 165 170 175

Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu Met Pro
 180 185 190

Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg Leu Gly
 195 200 205

Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly Met Ser
 210 215 220

Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn
 225 230 235 240

Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu
 245 250 255

Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp Gly Gly
 260 265 270

Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg Arg Arg
 275 280 285

Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu
 290 295 300

Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Arg Glu
 305 310 315 320

Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile
 325 330 335

Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp
 340 345 350

Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe Ser Arg
 355 360 365

Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu Asp Leu
 370 375 380

Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu Leu Glu
 385 390 395 400

Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr Leu Val Pro

405 410 415
 Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly Ala Gly Gly Met
 420 425 430

Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg Ser Gly Gly Gly Asp
 435 440 445

Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu Glu Ala Pro Arg Ser Pro
 450 455 460

Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu
 465 470 475 480

Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro
 485 490 495

Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser
 500 505 510

Glu Thr Asp Gly Tyr Val Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu
 515 520 525

Tyr Val Asn Gln Pro Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu
 530 535 540

Gly Pro Leu Pro Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Pro
 545 550 555 560

Lys Thr Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala
 565 570 575

Phe Gly Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly
 580 585 590

Ala Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp
 595 600 605

Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro Pro
 610 615 620

Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Gly
 625 630 635 640

Leu Asp Val Pro Val
 645

<210> 92

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker G4S

<400> 92

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 93

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker (G4S)2

<400> 93

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 94

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker (SG4)2

<400> 94

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5 10

<210> 95

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker G4(SG4)2

<400> 95

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

1 5 10

<210> 96

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker

<400> 96

Gly Ser Pro Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser

1 5 10

<210> 97

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker (G4S)3

<400> 97

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

1 5 10 15

<210> 98

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker (G4S)4

<400> 98

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 99

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker

<400> 99

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5

<210> 100

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker

<400> 100

Gly Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser

1 5

<210> 101

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker

<400> 101

Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 102

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker

<400> 102

Gly Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 103

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker

<400> 103

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 104

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker

<

<400> 104

Gly Gly Ser Gly Asn Gly Ser Gly

1 5

<210> 105

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker

<400> 105

Gly Gly Asn Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 106

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker

<400> 106

Gly Gly Asn Gly Ser Gly

1 5

<210> 107

<211> 290

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu

1 5 10 15

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr

20 25 30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu

35 40 45

Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile

50 55 60
 Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser

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

 130 135 140
 Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
 145 150 155 160
 Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
 165 170 175
 Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
 180 185 190
 Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr

 195 200 205
 Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
 210 215 220
 Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
 225 230 235 240
 Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
 245 250 255
 Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys

 260 265 270
 Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
 275 280 285
 Glu Thr
 290

<210> 108

<211> 288

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln

1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp

 20 25 30

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

 35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val

 50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala

65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg

 85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg

 100 105 110

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

 115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val

 130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro

145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly

 165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys

 180 185 190

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro

 195 200 205

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

210 215 220

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

<210> 109
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH (PD-L1)
 <400> 109

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr 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 Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 110

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL (PD-L1)

<400> 110

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

 100 105

<210> 111

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH (PD-L1) 2

<400> 111

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val

50 55 60

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

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 112

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL (PD-L1) 2

<400> 112

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105

<210> 113

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH (PD-1)

<400> 113

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

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

<210> 114

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL (PD-1)

<400> 114

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

50 55 60

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

<210> 115

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH (PD-1) 2

<400> 115

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
 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 Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

65 70 75 80

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

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

Ser

<210> 116

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL (PD-1) 2

<400> 116

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

1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

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

65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg

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

 100 105

<210> 117

<211> 200

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 117

Met Lys Pro Tyr Phe Cys Arg Val Phe Val Phe Cys Phe Leu Ile Arg

1 5 10 15
 Leu Leu Thr Gly Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asp His Arg Met Phe Ser

 20 25 30
 Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile Ser Cys Lys Tyr Pro Glu Thr Val

 35 40 45
 Gln Gln Leu Lys Met Arg Leu Phe Arg Glu Arg Glu Val Leu Cys Glu

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

65 70 75 80

Met Leu Cys Leu Tyr His Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu
 85 90 95
 Asn Asn Pro Asp Ser Ser Gln Gly Ser Tyr Tyr Phe Cys Ser Leu Ser
 100 105 110
 Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Gln Glu Arg Asn Leu Ser Gly Gly Tyr
 115 120 125
 Leu His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Leu Trp Leu
 130 135 140
 Pro Val Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Leu Leu Phe Gly Cys Ile
 145 150 155 160
 Leu Ile Ile Trp Phe Ser Lys Lys Lys Tyr Gly Ser Ser Val His Asp
 165 170 175
 Pro Asn Ser Glu Tyr Met Phe Met Ala Ala Val Asn Thr Asn Lys Lys
 180 185 190
 Ser Arg Leu Ala Gly Val Thr Ser
 195 200
 <210> 118
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 118
 Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asp His Arg Met Phe Ser Phe His Asn Gly
 1 5 10 15
 Gly Val Gln Ile Ser Cys Lys Tyr Pro Glu Thr Val Gln Gln Leu Lys
 20 25 30
 Met Arg Leu Phe Arg Glu Arg Glu Val Leu Cys Glu Leu Thr Lys Thr
 35 40 45
 Lys Gly Ser Gly Asn Ala Val Ser Ile Lys Asn Pro Met Leu Cys Leu
 50 55 60
 Tyr His Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu Asn Asn Pro Asp
 65 70 75 80

Ser Ser Gln Gly Ser Tyr Tyr Phe Cys Ser Leu Ser Ile Phe Asp Pro
 85 90 95
 Pro Pro Phe Gln Glu Arg Asn Leu Ser Gly Gly Tyr Leu His Ile Tyr
 100 105 110
 Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Leu Trp Leu
 115 120

<210> 119

<211> 1071

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Nucleotide sequence murine ICOS antigen Fc hole chain

<400> 119

gagatcaacg gcagcgccga ccaccggatg ttcagcttcc acaatggcgg cgtgcagatc 60
 agctgcaagt accccgagac agtgcagcag ctgaagatgc ggctgttccg cgagcgggaa 120
 gtgctgtgcg agctgaccaa gacaaagggc agcggcaacg ccgtgtccat caagaacccc 180
 atgctgtgcc tgtaccacct gagcaacaac agcgtgtcct tcttctgaa caaccccgac 240
 agcagccagg gcagctacta cttctgctcc ctgagcatct tgcaccccc accattccag 300
 gaacggaacc tgagcggcgg ctacctgcac atctacgaga gccagctgtg ctgccagctg 360

 aaactgtggc tgtctgcaga cgtcgacgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 420
 cctgaagctg cagggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacacccctc 480
 atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 540
 gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg 600
 cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcacctg cctgcaccag 660
 gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cggcgcccc 720
 atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtgcaccctg 780

 ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tctcgtgcg agtcaaaggc 840
 ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 900
 aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctcgtgag caagtcacc 960
 gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1020
 ctgcacaacc gcttcacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaatg a 1071

<210> 120

<211> 1170

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence murine ICOS antigen Fc knob chain

<400> 120

```

gagatcaacg gcagcgccga ccaccggatg ttcagcttcc acaatggcgg cgtgcagatc      60
agctgcaagt accccgagac agtgcagcag ctgaagatgc ggctgttccg cgagcgggaa      120
gtgctgtgcg agctgaccaa gacaaagggc agcggcaacg ccgtgtccat caagaacccc      180
atgctgtgcc tgtaccacct gagcaacaac agcgtgtcct tcttctgaa caaccccgac      240
agcagccagg gcagctacta cttctgctcc ctgagcatct tcgaccccc accattccag      300
gaacggaacc tgagcggcgg ctacctgcac atctacgaga gccagctgtg ctgccagctg      360
aaactgtggc tgtctgcaga cgtcgacgct agcgggtgta gtccgacacc tccgacacc      420

gggggtggtt ctgcagacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaagccgca      480
gggggaccgt cagtcttctt cttccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg      540
accctgagg tccatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc      600
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagcccg ggaggagcag      660
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat      720
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcg gagccccat cgagaaaacc      780
atctcaaag ccaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatgccgg      840

gatgagctga ccaagaacca ggteagcctg tggtgccctg tcaaaggett ctatcccagc      900
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactaaa gaccacgctt      960
cccgtgctgg actccgacgg ctctctcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc     1020
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac     1080
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatccg gaggcctgaa cgacatcttc     1140
gaggcccaga agattgaatg gcacgagtga                                     1170

```

<210> 121

<211> 356

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> murine ICOS antigen Fc hole chain

<400> 121

Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asp His Arg Met Phe Ser Phe His Asn Gly

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

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

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

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

 245 250 255

Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 260 265 270

Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 275 280 285

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 290 295 300

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
 305 310 315 320

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 325 330 335

Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 340 345 350

Ser Pro Gly Lys
 355

<210> 122

<211> 389

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> murine ICOS antigen Fc knob chain

<400> 122

Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asp His Arg Met Phe Ser Phe His Asn Gly

1 5 10 15

Gly Val Gln Ile Ser Cys Lys Tyr Pro Glu Thr Val Gln Gln Leu Lys
 20 25 30

Met Arg Leu Phe Arg Glu Arg Glu Val Leu Cys Glu Leu Thr Lys Thr
 35 40 45

Lys Gly Ser Gly Asn Ala Val Ser Ile Lys Asn Pro Met Leu Cys Leu
 50 55 60

Tyr His Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu Asn Asn Pro Asp
 65 70 75 80

Ser Ser Gln Gly Ser Tyr Tyr Phe Cys Ser Leu Ser Ile Phe Asp Pro
 85 90 95

Pro Pro Phe Gln Glu Arg Asn Leu Ser Gly Gly Tyr Leu His Ile Tyr
 100 105 110
 Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Leu Trp Leu Ser Ala Asp Val
 115 120 125
 Asp Ala Ser Gly Gly Ser Pro Thr Pro Pro Thr Pro Gly Gly Gly Ser

 130 135 140
 Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
 145 150 155 160
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 165 170 175
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 180 185 190
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

 195 200 205
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 210 215 220
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 225 230 235 240
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro
 245 250 255
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

 260 265 270
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 275 280 285
 Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 290 295 300
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 305 310 315 320
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr

 325 330 335
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

340 345 350
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

355 360 365
 Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys
 370 375 380

Ile Glu Trp His Glu
 385

<210

> 123

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine ICOS CDR-H1

<400> 123

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 124

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine ICOS CDR-H2

<400> 124

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 125

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine ICOS CDR-H3

<400> 125

Ser Ser Gly Pro Tyr Gly Leu Tyr Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 126
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Murine ICOS CDR-L1
 <400> 126
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp
 1 5 10 15

<210> 127
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Murine ICOS CDR-L2
 <400> 127
 Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser

1 5
 <210> 128
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Murine ICOS CDR-L3
 <400> 128
 Met Gln Ala Leu Trp Thr Pro Thr Thr

1 5
 <210> 129
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Murine ICOS (16E09) VH
 <400> 129
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

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

85 90 95
 Ala Arg Ser Ser Gly Pro Tyr Gly Leu Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 130

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine ICOS (16E09) VL

<400> 130

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Leu Trp Thr Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110
 <210> 131
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 16E09 IgG1 light chain
 <400> 131
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

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

 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Leu Trp Thr Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 132 | | |
| <211> 449 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> Artificial Sequence | | |
| <220><223> 16E09 IgG1 P329GLALA heavy chain | | |
| <400> 132 | | |
| Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu | | |
| 1 | 5 | 10 15 |
| Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr | | |
| | 20 | 25 30 |
| Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met | | |
| 35 | 40 | 45 |
| Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe | | |
| 50 | 55 | 60 |
| Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr | | |
| 65 | 70 | 75 80 |
| Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys | | |
| | 85 | 90 95 |
| Ala Arg Ser Ser Gly Pro Tyr Gly Leu Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln | | |
| 100 | 105 | 110 |
| Gly Thr Leu 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 Ala Ala 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 Gly 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

<210> 133

<211> 389

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> murine ICOS Fc knob Avi-tag

<400> 133

Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asp His Arg Met Phe Ser Phe His Asn Gly
 1 5 10 15

Gly Val Gln Ile Ser Cys Lys Tyr Pro Glu Thr Val Gln Gln Leu Lys

20 25 30
 Met Arg Leu Phe Arg Glu Arg Glu Val Leu Cys Glu Leu Thr Lys Thr

35 40 45
 Lys Gly Ser Gly Asn Ala Val Ser Ile Lys Asn Pro Met Leu Cys Leu

50 55 60
 Tyr His Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu Asn Asn Pro Asp

65 70 75 80
 Ser Ser Gln Gly Ser Tyr Tyr Phe Cys Ser Leu Ser Ile Phe Asp Pro

85 90 95
 Pro Pro Phe Gln Glu Arg Asn Leu Ser Gly Gly Tyr Leu His Ile Tyr

100 105 110
 Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Leu Trp Leu Ser Ala Asp Val

115 120 125
 Asp Ala Ser Gly Gly Ser Pro Thr Pro Pro Thr Pro Gly Gly Gly Ser

130 135 140
 Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala

145 150 155 160
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

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

 210 215 220
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 225 230 235 240
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro
 245 250 255
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 260 265 270
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val

 275 280 285
 Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 290 295 300
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 305 310 315 320
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 325 330 335
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

 340 345 350
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 355 360 365
 Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys
 370 375 380
 Ile Glu Trp His Glu
 385
 <210> 134
 <211> 356
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> murine ICOS Fc hole

<400> 134

Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asp His Arg Met Phe Ser Phe His Asn Gly

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

 20 25 30
Met Arg Leu Phe Arg Glu Arg Glu Val Leu Cys Glu Leu Thr Lys Thr

 35 40 45
Lys Gly Ser Gly Asn Ala Val Ser Ile Lys Asn Pro Met Leu Cys Leu

 50 55 60
Tyr His Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu Asn Asn Pro Asp

65 70 75 80
Ser Ser Gln Gly Ser Tyr Tyr Phe Cys Ser Leu Ser Ile Phe Asp Pro

 85 90 95
Pro Pro Phe Gln Glu Arg Asn Leu Ser Gly Gly Tyr Leu His Ile Tyr

 100 105 110
Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Leu Trp Leu Ser Ala Asp Val

 115 120 125
Asp Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala

 130 135 140
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

145 150 155 160
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

 165 170 175
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

 180 185 190
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr

 195 200 205
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

210 215 220

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro
 225 230 235 240

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 245 250 255

Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 260 265 270

Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 275 280 285

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 290 295 300

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
 305 310 315 320

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 325 330 335

Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 340 345 350

Ser Pro Gly Lys
 355

<210> 135
 <211> 571
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VHCH1 (16E09) Fc DAPG DD heavy chain-VH (28H1)
 <400> 135

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

 85 90 95

Ala Arg Ser Ser Gly Pro Tyr Gly Leu Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln

 100 105 110

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

 115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr

 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr

145 150 155 160

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

 165 170 175

Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser

 180 185 190

Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala

 195 200 205

Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys

210 215 220

Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe

225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val

 245 250 255

Thr Cys Val Val Val Ala Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe

 260 265 270

Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys Pro

275 280 285

Arg Glu Glu Gln Ile Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro

290 295 300

Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val

305 310 315 320
 Asn Ser Ala Ala Phe Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
 325 330 335
 Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys

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

 405 410 415
 Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His
 420 425 430
 His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser
 435 440 445
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 450 455 460
 Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu

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

 530 535 540
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro Pro
 545 550 555 560

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

565 570

<210> 136

<211> 579

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHCH1 (16E09) Fc DAPG KK heavy chain-VL (28H1)

<400> 136

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Ser Gly Pro Tyr Gly Leu Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr

145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
 195 200 205

Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys
 210 215 220

Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe
 225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val
 245 250 255

Thr Cys Val Val Val Ala Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270

Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys Pro
 275 280 285

Arg Glu Glu Gln Ile Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro
 290 295 300

Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val
 305 310 315 320

Asn Ser Ala Ala Phe Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
 325 330 335

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

Lys Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asn
 355 360 365

Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro
 370 375 380

Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Lys Thr Asp Gly Ser
 385 390 395 400

Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala
 405 410 415

Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His
 420 425 430

His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser

435 440 445
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 450 455 460

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

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

<210> 137

<211> 442

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHCH1 (16E09) Fc DAPG DD heavy chain

<400> 137

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

50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Ser Gly Pro Tyr Gly Leu Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val
 115 120 125

 Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Glu Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

 Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
 195 200 205
 Ser Ser Thr Lys Val Asp Glu Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys
 210 215 220
 Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe
 225 230 235 240
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val
 245 250 255

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

Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val
 305 310 315 320

Asn Ser Ala Ala Phe Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
 325 330 335

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

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

Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro
 370 375 380

Ala Glu Asn Tyr Asp Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser
 385 390 395 400

Tyr Phe Val Tyr Ser Asp Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala
 405 410 415

Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His
 420 425 430

His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro
 435 440

<210> 138

<211> 432

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHCH1 (28H1) Fc DAPG KK heavy chain

<400> 138

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

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

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

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

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

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

Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Gly Ala Pro Ile Glu

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Thr Cys Met Ile Thr Asn Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp

355 360 365

Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile

370 375 380

Met Lys Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln

385 390 395 400

Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His

405 410 415

Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro

420 425 430

<210> 139

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VLCL (28H1)-light chain

<400> 139

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

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

 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala

 195 200 205
 Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys
 210 215 220
 Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe
 225 230 235 240
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val
 245 250 255
 Thr Cys Val Val Val Ala Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe

 260 265 270
 Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys Pro
 275 280 285
 Arg Glu Glu Gln Ile Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro
 290 295 300

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

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

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

 450 455 460
 Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu
 465 470 475 480
 Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
 485 490 495
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 500 505 510
 Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly

 515 520 525
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
 530 535 540
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu

545 550 555 560
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 565 570
<210> 141
<211> 578
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> VHCH1 (16E09) Fc DAPG KK heavy chain-VL (DP47)

<400> 141
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

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

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

| | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|
| | 180 | 185 | 190 | |
| Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala | | | | |
| | 195 | 200 | 205 | |
| Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys | | | | |
| | 210 | 215 | 220 | |
| Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe | | | | |
| | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val | | | | |
| | 245 | 250 | 255 | |
| Thr Cys Val Val Val Ala Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe | | | | |
| | 260 | 265 | 270 | |
| Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys Pro | | | | |
| | 275 | 280 | 285 | |
| Arg Glu Glu Gln Ile Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro | | | | |
| | 290 | 295 | 300 | |
| Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val | | | | |
| | 305 | 310 | 315 | 320 |
| Asn Ser Ala Ala Phe Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr | | | | |
| | 325 | 330 | 335 | |
| Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys | | | | |
| | 340 | 345 | 350 | |
| Lys Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asn | | | | |
| | 355 | 360 | 365 | |
| Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro | | | | |
| | 370 | 375 | 380 | |
| Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Lys Thr Asp Gly Ser | | | | |
| | 385 | 390 | 395 | 400 |
| Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala | | | | |
| | 405 | 410 | 415 | |
| Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His | | | | |
| | 420 | 425 | 430 | |

His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser
 435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 450 455 460

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 465 470 475 480

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 485 490 495

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 500 505 510

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 515 520 525

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 530 535 540

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 545 550 555 560

Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 565 570 575

Ser Ser

<210> 142

<211> 442

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHCH1 (16E09) Fc DAPG DD heavy chain

<400> 142

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Arg Glu Glu Gln Ile Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro
 290 295 300

Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val
 305 310 315 320

Asn Ser Ala Ala Phe Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
 325 330 335

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

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

Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro
 370 375 380

Ala Glu Asn Tyr Asp Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser
 385 390 395 400

Tyr Phe Val Tyr Ser Asp Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala
 405 410 415

Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His
 420 425 430

His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro
 435 440

<210> 143

<211> 442

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHCH1 (DP47) Fc DAPG KK heavy chain

<400> 143

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

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

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

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

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

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

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

Arg Glu Glu Gln Ile Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro

290 295 300

Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Lys Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asn

355 360 365

Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro

370 375 380

Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Lys Thr Asp Gly Ser

385 390 395 400

Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala

405 410 415

Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His

420 425 430

His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro

435 440

<210> 144

<211> 212

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine VLCL (DP47)-light chain

<400> 144

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

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

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

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

 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser
 165 170 175
 Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys
 180 185 190
 Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val
 195 200 205
 Pro Arg Asp Cys
 210
 <210> 145
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CEA (MEDI-565)- CDR-H1

 <400> 145
 Ser Tyr Trp Met His
 1 5
 <210> 146

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CEA (MEDI-565)- CDR-H2
 <400> 146
 Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala Ser
 1 5 10 15

<210> 147
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CEA (MEDI-565)- CDR-H3
 <400> 147

Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210
 > 148
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CEA (MEDI-565)- CDR-L1
 <400> 148

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

<210> 149
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CEA (MEDI-565)- CDR-L2
 <400> 149

Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser
 1 5 10

<210> 150
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

223> CEA (MEDI-565)- CDR-L3

<400> 150

Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val

1 5 10

<210> 151

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA (MEDI-565) VH

<400> 151

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala

 50 55 60

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

 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

 115 120

<210> 152

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA (MEDI-565) VL

<400> 152

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

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

Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr
 35 40 45

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val
 50 55 60

Ser Ser Arg Phe Ser Ala Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
 65 70 75 80

Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 100 105 110

Leu Thr Val Leu
 115

<210> 153

<211> 590

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHCH1 (JMAB136)-Fc knob chain-VH (MEDI-565)

<400> 153

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro His Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 65 | | 70 | | 75 | | 80 | | | | | | | | | |
| Met | Glu | Leu | Ser | Arg | Leu | Arg | Ser | Asp | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |
| | | 85 | | 90 | | 95 | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ala | Arg | Thr | Tyr | Tyr | Tyr | Asp | Ser | Ser | Gly | Tyr | Tyr | His | Asp | Ala | Phe |
| | | 100 | | | | | | 105 | | | | | | 110 | |
| Asp | Ile | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Met | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr |
| | | 115 | | | | | | 120 | | | | | | 125 | |
| Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser |
| | | 130 | | | | | | 135 | | | | | | 140 | |
| Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu |
| 145 | | | | | 150 | | | | | | 155 | | | | 160 |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His |
| | | | | 165 | | | | | | 170 | | | | | 175 |
| Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser |
| | | | | 180 | | | | | | 185 | | | | | 190 |
| Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys |
| | | | | 195 | | | | | | 200 | | | | | 205 |
| Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu |
| | | | | 210 | | | | | | 215 | | | | | 220 |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro |
| 225 | | | | | | 230 | | | | | | 235 | | | 240 |
| Glu | Ala | Ala | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys |
| | | | | | | | | | | | | | | 245 | |
| Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val |
| | | | | | | | | | | | | | | 260 | |
| Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp |
| | | | | | | | | | | | | | | 275 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr |
| | | | | | | | | | | | | | | 290 | |
| Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp |
| 305 | | | | | | 310 | | | | | | 315 | | | 320 |

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 325 330 335
 Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 340 345 350

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

 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 420 425 430
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 435 440 445
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 450 455 460
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Leu Thr Gln
 465 470 475 480

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

 Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile Leu Leu Ile Ser Gly Leu
 545 550 555 560
 Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Ile Trp His Ser Gly

565 570 575
 Ala Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 580 585 590
 <210> 154
 <211> 585
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VHCH1 (JMAb136)-Fc hole chain-VL (MEDI-565)
 <400> 154

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

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

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

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys | 180 | 185 | 190 |
| | 195 | 200 | 205 |
| Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu | 210 | 215 | 220 |
| Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro | 225 | 230 | 235 |
| Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys | 245 | 250 | 255 |
| Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val | 260 | 265 | 270 |
| Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp | 275 | 280 | 285 |
| Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr | 290 | 295 | 300 |
| Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp | 305 | 310 | 315 |
| Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu | 325 | 330 | 335 |
| Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg | 340 | 345 | 350 |
| Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys | 355 | 360 | 365 |
| Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp | 370 | 375 | 380 |
| Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys | 385 | 390 | 395 |
| Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser | 405 | 410 | 415 |
| Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser | 420 | 425 | 430 |

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 450 455 460

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 465 470 475 480

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr
 485 490 495

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 500 505 510

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
 515 520 525

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 530 535 540

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 545 550 555 560

Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 565 570 575

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 580 585

<210> 155

<211> 453

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHCH1(JMAb136)- Fc hole chain

<400> 155

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

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

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

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

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

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

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

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290 295 300
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315 320
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 325 330 335
 Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 340 345 350
 Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 355 360 365
 Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 385 390 395 400
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser
 405 410 415
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 420 425 430
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 435 440 445
 Leu Ser Leu Ser Pro
 450
 <210> 156
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VHCH1 (MEDI-565)-Fc knob chain
 <400> 156
 Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Arg Gly Ile Asn Val Gly Ala

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

 85 90 95
 Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 100 105 110
 Leu Thr Val Leu 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 Ala Ala 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 Gly 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 Cys 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 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys 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

435 440 445

<210> 157

<211> 228

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VLCL(MEDI-565) Light chain

<400> 157

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

1 5 10 15

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

20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly 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 Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
 130 135 140

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

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
 210 215 220

Arg Gly Glu Cys

225

<210> 158

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA (A5B7)- CDR-H1

<400> 158

Asp Tyr Tyr Met Asn

1 5

<210> 159

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA (A5B7)- CDR-H2

<400> 159

Phe Ile Gly Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 160

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA (A5B7)- CDR-H3

<400> 160

Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 161

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA (A5B7)- CDR-L1

<400> 161

Arg Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Ile His

1 5 10

<210> 162

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA (A5B7)- CDR-L2

<400> 162

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 163

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA (A5B7)- CDR-L3

<400> 163

Gln His Trp Ser Ser Lys Pro Pro Thr

1 5

<210> 164

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA (A5B7) VH

<400> 164

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Phe Ile Gly Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 165

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA (A5B7) VL

<400> 165

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Trp Ser Ser Lys Pro Pro Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 166

<211> 569

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHCH1 (16E09) Fc DAPG DD heavy chain-VL (A5B7)

<400> 166

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Ser Gly Pro Tyr Gly Leu Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val
 115 120 125
 Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
 195 200 205
 Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys
 210 215 220
 Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe
 225 230 235 240
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val
 245 250 255
 Thr Cys Val Val Val Ala Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270
 Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys Pro

275 280 285
 Arg Glu Glu Gln Ile Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro
 290 295 300
 Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val
 305 310 315 320
 Asn Ser Ala Ala Phe Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
 325 330 335
 Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys

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

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

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

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

530 535 540

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Trp Ser Ser Lys Pro Pro Thr Phe

545 550 555 560

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

565

<210> 167

<211> 584

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHCH1 (16E09) Fc DAPG KK heavy chain-VH (A5B7)

<400> 167

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Ser Gly Pro Tyr Gly Leu Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr

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

 Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys
 210 215 220
 Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe
 225 230 235 240
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val
 245 250 255
 Thr Cys Val Val Val Ala Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270

 Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys Pro
 275 280 285
 Arg Glu Glu Gln Ile Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro
 290 295 300
 Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val
 305 310 315 320
 Asn Ser Ala Ala Phe Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
 325 330 335

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

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

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

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ser Gln Ser Ile Leu
 530 535 540
 Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr
 545 550 555 560
 Cys Thr Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 565 570 575
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 580

<210> 168

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHCH1 (A5B7) Fc DAPG KK heavy chain

<400> 168

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Phe Ile Gly Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ser Gln Ser Ile
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Asp Ala Ala Pro Thr
 115 120 125
 Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala
 130 135 140
 Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val
 145 150 155 160
 Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser
 165 170 175
 Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr
 180 185 190
 Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys
 195 200 205
 Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn
 210 215 220
 Arg Asn Glu Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val
 225 230 235 240
 Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile
 245 250 255
 Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Ala Ile Ser Lys Asp

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

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

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

 435 440 445
 <210> 169
 <211> 210
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VLCL (A5B7)-light chain
 <400> 169
 Gln Thr Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Ile

20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Ser Trp Ile Tyr

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

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

 165 170 175
 Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val
 180 185 190
 Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg
 195 200 205
 Asp Cys
 210
 <210> 170
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CH1 domain
 <400> 170

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> 171

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 171

Glu Pro Lys Ser Cys

1 5

<210> 172

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hinge region, X = S or P

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 172

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Xaa Cys Pro

1 5 10

<210> 173

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> short hinge region, X = S or P

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 173

His Thr Cys Pro Xaa Cys Pro

1 5

<210> 174

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> shortest hinge region, X = S or P

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 174

Cys Pro Xaa Cys Pro

1 5

<210> 175

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CH2 domain

<400> 175

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

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

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

<210> 176

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CH3 domain

<400> 176

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
 100 105