



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0016206
(43) 공개일자 2023년02월01일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/32 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2818 (2013.01)
A61K 39/39558 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7045196
- (22) 출원일자(국제) 2021년06월22일
심사청구일자 2022년12월22일
- (85) 번역문제출일자 2022년12월22일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2021/066901
- (87) 국제공개번호 WO 2021/259890
국제공개일자 2021년12월30일
- (30) 우선권주장
20181730.1 2020년06월23일
유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인
에프. 호프만-라 로슈 아게
스위스 체하-4070 바젤 그린짜체스트라쎄 124
- (72) 발명자
가서 스테판
스위스 8952 솔리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카
트 아게
호퍼 토마스
스위스 8952 솔리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카
트 아게
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
제일특허법인(유)

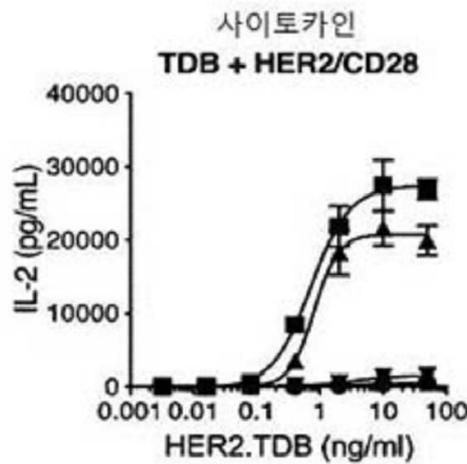
전체 청구항 수 : 총 46 항

(54) 발명의 명칭 Her2를 표적으로 하는 작용성 CD28 항원 결합 분자

(57) 요약

본 발명은 CD28에 대한 1가 결합을 특징으로 하는 Her2-표적화 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자, 이의 생산 방법, 이들 항체를 포함하는 약학 조성물, 및 이의 사용 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도9f



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/2809 (2013.01)
C07K 16/2827 (2013.01)
C07K 16/32 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/522 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)

(72) 발명자

준틸라 티무 타파니

미국 캘리포니아주 94080 사우스 샌 프란시스코 디
엔에이 웨이 1 제넨텍 인코포레이티드

클라인 크리스티안

스위스 8952 솔리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카
트 아게

퀴텔 크리스틴

스위스 8952 솔리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카
트 아게

툼 예니 토스카

스위스 8952 솔리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카
트 아게

우마나 파블로

스위스 8952 솔리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카
트 아게

명세서

청구범위

청구항 1

CD28에 대한 1가 결합을 특징으로 하는 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자로서,

(a) CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인,

(b) 인간 표피 성장 인자 수용체-2(Her2)에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인, 및

(c) Fc 수용체에 대한 항원 결합 분자의 결합 친화도 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 안정한 회합이 가능한 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인

을 포함하고, 이때 Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 상기 제2 항원 결합 도메인은

(i) 서열번호 2의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 3의 CDR-H2 및 서열번호 4의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2), 및 서열번호 5의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 6의 CDR-L2 및 서열번호 7의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L Her2); 또는

(ii) 서열번호 10의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 11의 CDR-H2 및 서열번호 12의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2), 및 서열번호 13의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 14의 CDR-L2 및 서열번호 15의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L Her2); 또는

(iii) 서열번호 132의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 133의 CDR-H2 및 서열번호 134의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2), 및 서열번호 135의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 136의 CDR-L2 및 서열번호 137의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L Her2); 또는

(iv) 서열번호 140의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 141의 CDR-H2 및 서열번호 142의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2), 및 서열번호 143의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 144의 CDR-L2 및 서열번호 145의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L Her2)

을 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

청구항 2

청구항 1에 있어서, Fc 도메인은 인간 IgG1 하위분류이고 아미노산 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)를 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은

(i) 서열번호 26의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 27의 CDR-H2 및 서열번호 28의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 29의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 30의 CDR-L2 및 서열번호 31의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28); 또는

(ii) 서열번호 18의 CDR-H1, 서열번호 19의 CDR-H2 및 서열번호 20의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 21의 CDR-L1, 서열번호 22의 CDR-L2 및 서열번호 23의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)

을 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은

(i) 서열번호 52의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 53의 CDR-H2 및 서열번호 54의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 55의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 56의 CDR-L2 및 서열번호 57의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28); 또는

(ii) 서열번호 58의 CDR-H1, 서열번호 59의 CDR-H2 및 서열번호 60의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 61의 CDR-L1, 서열번호 62의 CDR-L2 및 서열번호 63의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28); 또는

(iii) 서열번호 64의 CDR-H1, 서열번호 65의 CDR-H2 및 서열번호 66의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 67의 CDR-L1, 서열번호 68의 CDR-L2 및 서열번호 69의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)

을 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 24의 아미노산 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 25의 아미노산 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)을 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

청구항 6

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항에 있어서, CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40 및 서열번호 41로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 25, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50 및 서열번호 51로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)을 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

청구항 7

청구항 1 내지 4 및 6 중 어느 한 항에 있어서, CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은

(a) 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는

(b) 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는

(c) 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 51의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는

(d) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는

(e) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는

(f) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함

하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는

(g) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는

(h) 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는

(i) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는

(j) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는

(k) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)

을 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

청구항 8

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 (i) 서열번호 52의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 53의 CDR-H2 및 서열번호 54의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 55의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 56의 CDR-L2 및 서열번호 57의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)을 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

청구항 9

청구항 1 내지 4 및 8 중 어느 한 항에 있어서, CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28)의 CDR, 및 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)의 CDR을 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

청구항 10

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2)의 CDR, 및 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L Her2)의 CDR을 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

청구항 11

청구항 1 내지 10 중 어느 한 항에 있어서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2), 및 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L Her2)을 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

청구항 12

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2)의 CDR, 및 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L Her2)의 CDR을 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

청구항 13

청구항 1 내지 9 및 12 중 어느 한 항에 있어서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2), 및 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄

가변 영역(V_LHer2)을 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

청구항 14

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 138의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2)의 CDR, 및 서열번호 139의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2)의 CDR을 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

청구항 15

청구항 1 내지 9 및 14 중 어느 한 항에 있어서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 138의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2), 및 서열번호 139의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2)을 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

청구항 16

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 146의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2)의 CDR, 및 서열번호 147의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2)의 CDR을 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

청구항 17

청구항 1 내지 9 및 16 중 어느 한 항에 있어서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 146의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2), 및 서열번호 147의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2)을 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

청구항 18

청구항 1 내지 17 중 어느 한 항에 있어서, CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인 및/또는 Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인은 Fab 분자인, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

청구항 19

청구항 1 내지 18 중 어느 한 항에 있어서, CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 Fab 분자이고, 이때 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL과 VH 또는 불변 도메인 CL과 CH1, 특히 가변 도메인 VL과 VH는 서로에 의해 대체되는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

청구항 20

청구항 1 내지 19 중 어느 한 항에 있어서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인은 일반 (conventional) Fab 분자인, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

청구항 21

청구항 1 내지 20 중 어느 한 항에 있어서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인은 Fab 분자이고, 이때 불변 도메인 CL에서 위치 123(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산이 리신(K), 아르기닌(R) 및 히스티딘(H)으로부터 선택된 아미노산으로 치환되고, 위치 124(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산이 리신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)으로 독립적으로 치환되고, 불변 도메인 CH1에서 위치 147(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산이 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 독립적으로 치환되고, 위치 213(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산이 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 독립적으로 치환되는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

청구항 22

청구항 1에 있어서,

(i) 서열번호 92의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 91의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 96의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 및 서열번호 97의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄, 또는

(ii) 서열번호 92의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 91의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 98의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 및 서열번호 97의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄, 또는

(iii) 서열번호 92의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 91의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 101의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 및 서열번호 97의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄

를 포함하는 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

청구항 23

청구항 1에 있어서,

(i) 서열번호 179의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 178의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 180의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 및 서열번호 181의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄, 또는

(ii) 서열번호 179의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 178의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 182의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 및 서열번호 183의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄

를 포함하는 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

청구항 24

청구항 1 내지 18 중 어느 한 항에 있어서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인은 Fab 분자이고, 이때 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL과 VH 또는 불변 도메인 CL과 CH1, 특히 가변 도메인 VL과 VH는 서로에 의해 대체되는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

청구항 25

청구항 1 내지 18 및 24 중 어느 한 항에 있어서, CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 일반 Fab 분자인, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

청구항 26

청구항 1 내지 18, 24 및 25 중 어느 한 항에 있어서, CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 Fab 분자이고, 이때 불변 도메인 CL에서 위치 123(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산은 리신(K), 아르기닌(R) 및 히스티딘(H)으로부터 선택된 아미노산으로 치환되고, 위치 124(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산은 리신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)으로 독립적으로 치환되고, 불변 도메인 CH1에서 위치 147(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산은 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 독립적으로 치환되고, 위치 213(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산은 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 독립적으로 치환되는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

청구항 27

청구항 1 내지 13 및 24 내지 26 중 어느 한 항에 있어서,

(i) 서열번호 83의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 74의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 99의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 및 서열번호 100의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄, 또는

(ii) 서열번호 83의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 74의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 102의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 및 서열번호 100의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄

를 포함하는 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

청구항 28

청구항 1 내지 27 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 항원 결합 도메인은 각각 Fab 분자이고, Fc 도메인은 안정한 회합이 가능한 제1 및 제2 서브유닛으로 구성되고; (i) 제1 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc

도메인의 제1 서브유닛의 N-말단에 융합되고, 제2 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제2 서브유닛의 N-말단에 융합되거나, (ii) 제2 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제1 서브유닛의 N-말단에 융합되고, 제1 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제2 서브유닛의 N-말단에 융합되는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

청구항 29

청구항 1 내지 22 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인은 Fc 도메인의 제1 및 제2 서브유닛의 회합을 촉진시키는 변형을 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

청구항 30

청구항 1 내지 23 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인의 제1 서브유닛은 아미노산 치환 S354C 및/또는 T366W(EU 넘버링)를 포함하고, Fc 도메인의 제2 서브유닛은 아미노산 치환 Y349C, T366S 및 Y407V(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)를 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

청구항 31

청구항 1 내지 30 중 어느 한 항의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 인코딩하는 하나 이상의 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 32

청구항 31의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 이상의 벡터, 특히 발현 벡터.

청구항 33

청구항 31의 폴리뉴클레오티드 또는 청구항 32의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 34

- a) 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자의 발현에 적합한 조건하에서 청구항 33의 숙주 세포를 배양하는 단계, 및
- b) 선택적으로 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 회수하는 단계를 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자의 생산 방법.

청구항 35

청구항 34의 생산 방법에 의해 생산된 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

청구항 36

청구항 1 내지 30 중 어느 한 항의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 및 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학 조성물.

청구항 37

약제로 사용하기 위한, 청구항 1 내지 30 중 어느 한 항의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 청구항 36의 약학 조성물.

청구항 38

(a) T 세포 활성화, 또는 (b) T 세포 효과기 기능의 향상에 사용하기 위한, 청구항 1 내지 30 중 어느 한 항의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 청구항 36의 약학 조성물.

청구항 39

암 치료에서 사용하기 위한, 청구항 1 내지 30 중 어느 한 항의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 청구항 36의 약학 조성물.

청구항 40

암 치료에 사용하기 위한, 청구항 1 내지 30 중 어느 한 항의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 청구항 36의 약학 조성물로서, 상기 사용은 화학요법제, 방사선 요법, 및/또는 암 면역요법에 사용하기 위한 기타 제제와 병용 투여하기 위한 것인, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 약학 조성물.

청구항 41

암 치료에 사용하기 위한, 청구항 1 내지 30 중 어느 한 항의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 청구항 36의 약학 조성물로서, 상기 사용은 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체와 병용 투여하기 위한 것인, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 약학 조성물.

청구항 42

청구항 41에 있어서, T-세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체는 항-Her2/항-CD3 항체인, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 약학 조성물.

청구항 43

암 치료에 사용하기 위한, 청구항 1 내지 30 중 어느 한 항의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 청구항 36의 약학 조성물로서, 상기 사용은 항-PD-L1 항체 또는 항-PD-1 항체와 병용 투여하기 위한 것인, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 약학 조성물.

청구항 44

질환 치료용, 특히, 암 치료용 약제의 제조에 있어서, 청구항 1 내지 30 중 어느 한 항의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 청구항 36의 약학 조성물의 용도.

청구항 45

개체의 질환, 특히, 암을 치료하는 방법으로서, 청구항 1 내지 30 중 어느 한 항의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 청구항 36의 약학 조성물의 유효량을 상기 개체에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 46

청구항 45에 있어서, 화학요법제, 방사선 요법, 및/또는 암 면역요법에 사용하기 위한 기타 제제와 병용하여, 특히, T-세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체 또는 항-PD-L1 항체 또는 항-PD-1 항체와 병용하여 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 CD28에 대한 1가 결합을 특징으로 하는 Her2-표적화 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자, 이의 생산 방법, 이들 분자를 함유하는 약학 조성물, 및 질환, 특히 암의 치료에서 이의 면역조절제 및/또는 공동자극제로서의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암 면역요법은 흑색종, 비소세포 폐암 및 신장 세포 암종과 같은 암 유형에서 극적이고 지속적인 반응을 초래할 수 있는 점점 더 효과적인 치료 옵션이 되고 있다. 이는 대부분 항-PD-1(예를 들어, Keytruda, Merck; Opdivo, BMS), 항-CTLA-4(예를 들어, Yervoy, BMS) 및 항-PD-L1(예를 들어, Tecentriq, Roche)을 비롯한 몇 가지 면역관문 차단 성공에 의해 이루어지게 된다. 이들 제제는 많은 암 유형에 대한 표준 치료 또는 병용 요법의 중추 역할을 할 가능성이 있지만 일부 환자(<25%)만이 이러한 요법으로부터 이점을 얻는다. 또한, 다양한 암(전립선암, 결장직장암, 췌장암, 육종, 삼중음성 유방암 등)은 이러한 면역조절제에 대해 일차적 내성을 나타낸다. 다수의 보고서는 기존 항-종양 T 세포의 부재가 일부 환자들에서 반응이 불량하거나 없게되는 것의 원인이 됨을 나타낸다. 요약하면, 기존 면역 요법의 두드러진 항암 효과에도 불구하고 많은 암 환자 집단을 다루고 그리고 새로운 종양 특이적 T 세포 반응을 유도하고 향상시키는 것을 목표로 하는 요법을 개발하기 위한 분명한 의학적

필요성이 존재한다.

[0003]

CD28은 중요한 신호전달 모티프를 포함하는 세포질 도메인과 단일 막관통 도메인에 부착된 페어링된 V-세트 먼 역글로불린 슈퍼패밀리(IgSF) 도메인들을 특징으로 하는 공동자극 분자 서브패밀리의 기본 구성원이다(Carreno and Collins, 2002). 서브패밀리의 다른 구성원에는 ICOS, CTLA-4, PD1, PD1H, TIGIT 및 BTLA가 포함된다(Chen and Flies, 2013). CD28 발현은 T 세포에 제한되며 PD-1 또는 CTLA-4를 발현하는 것들을 비롯하여 모든 나이브 그리고 대부분의 항원-감작 서브세트들에서 우세하다. CD28 및 CTLA-4는 상동성이 매우 높으며 수지상 세포, B 세포, 대식세포 및 종양 세포에서 발현되는 동일한 B7 분자 CD80 및 CD86에 결합하기 위해 경쟁한다(Linsley 외, 1990). 리간드의 B7 계열에 대한 더 높은 CTLA-4의 친화도는 CTLA-4가 리간드 결합에 대해 CD28을 증가하고 효과기 T 세포 반응을 억제하게 한다(Engelhardt 외, 2006). 대조적으로, PD-1은 CD28의 세포질 도메인을 부분적으로 탈인산화함으로써 CD28 신호 전달을 억제하는 것으로 나타났다(Hui 외, 2017). 전문 항원 제시 세포의 표면에서 CD80 또는 CD86에 의한 CD28의 결합은 나이브 T 세포의 기능적 신생 경로(de novo) 프라이밍, 후속 클론 확장, 사이토카인 생산, 표적 세포 용해 및 장기 기억 형성에 반드시 필요하다. CD28 리간드의 결합은 또한 OX-40, ICOS 및 4-1BB와 같은 유도성 보조 자극 수용체의 발현을 촉진한다(Acuto 및 Michel, 2003에서 검토됨). CD28의 결합 시, 이황화-연결된 동종이량체, 막 근위 YNMN 모티프 및 원위 PYAP 모티프는 여러 키나아제 및 어댑터 단백질과 복합체를 형성하는 것으로 나타났다(Boomer and Green, 2010). 이러한 모티프는 NFAT, AP-1 및 NFκB 계열 전사 인자들의 CD28 의존적 활성화에 의해 매개되는 IL2 전사 유도에 중요하다(Fraser 외, 1991)(June 외, 1987)(Thompson 외, 1989). 그러나 CD28의 세포질 도메인 내에서 발견되는 인산화 및 유비퀴틴화에 대해 잘 특성화되지 않은 추가 부위들이 발견된다. 문헌(Esensten 외, 2016)에서 검토된 바와 같이, CD28 개시 경로는 일반 T 세포의 증식 및 효과기 기능을 촉진하는 데 중요한 역할을 한다. CD28 결합은 또한 조절 T 세포의 항염증 기능을 촉진한다. CD28은 T 세포 수용체의 신호를 부분적으로 증가시켜 T 세포를 공동 자극하지만 고유한 신호 전달 이벤트를 매개하는 것으로도 나타났다(Acuto and Michel, 2003; Boomer and Green, 2010; June 외, 1987). CD28에 의해 특이적으로 유발된 신호는 다운스트림 단백질의 인산화 및 기타 번역 후 변형(예를 들어, PI3K 매개 인산화), 전사 변화(예를 들어, Bcl-xL 발현), 후생적 변화(예를 들어, IL-2 프로모터), 세포골격 리모델링(예를 들어, 미세소관 형성 중심의 방향) 및 해당 속도(glycolytic rate)의 변화(예를 들어, 해당 플럭스)를 비롯한 많은 중요한 T 세포 기능의 양상들을 조절한다. CD28 결핍 마우스는 감염성 병원균, 동종이식 항원, 이식편대숙주병, 접촉 과민증 및 천식에 대한 반응이 감소했다(Acuto and Michel, 2003). CD28-매개 공동 자극이 없으면 시험관내 및 생체내에서 T 세포 증식이 감소되고, 배 중심 형성 및 면역글로불린 이소형 분류 전환이 상당히 억제되며, T 헬퍼(Th)-세포 분화 및 Th2-유형 사이토카인의 발현이 감소된다. CD4 의존성 세포독성 CD8+ T 세포 반응도 영향을 받는다. 중요하게도, CD28-결핍 나이브 T 세포는 특히 낮은 항원 농도에서 감소된 증식 반응을 보였다. 점점 더 많은 문헌이 T 세포에 CD28을 결합시키면 항종양 가능성이 생긴다는 사실을 뒷받침한다. 최근 증거는 PD-L1/PD-1 및 CTLA-4 면역관문 억제제의 항암 효과가 CD28에 의존한다는 것을 보여준다(Kamphorst 외, 2017; Tai 외, 2007). CTLA-4 및 PD-1 차단 치료 효과를 조사한 임상 연구는 진행성 흑색종 및 기타 암 환자에서 예외적으로 유망한 결과를 보여주었다. 또한, 세포내 TCR 신호전달 도메인(CD3z) 및 세포내 공동자극 도메인(CD28 및/또는 4-1BB 도메인)에 융합된 세포의 항원 인식 도메인을 포함하는 인공 키메라 T 세포 수용체를 발현하는 유전자 조작된 T 세포의 주입은 B 세포 암 및 기타 암에서의 높은 반응 속도 및 지속성을 나타내었다.

[0004]

CD28 작용성 항체는 (i) CD28 초작용성 항체 및 (ii) CD28 일반 작용성 항체의 두 범주로 나눌 수 있다. 일반적으로, 나이브 T 세포의 활성화를 위해 T 세포 항원 수용체(TCR, 신호 1)의 결합과 CD28에 의한 공동자극 신호(신호 2)가 모두 필요하다. CD28 초작용체(CD28SA)는 명백한 T 세포 수용체 결합 없이 T 세포를 자율적으로 활성화시킬 수 있는 CD28 특이적 단클론 항체이다(Hüinig, 2012). 설치류에서 CD28SA는 일반 및 조절 T 세포를 활성화시킨다. CD28SA 항체는 자가면역, 염증 및 이식의 여러 모델에서 치료적으로 유효하다. 그러나 인간 CD28SA 항체 TGN1412에 대한 2006년의 1상 연구에서 생명을 위협하는 사이토카인 폭풍이 발생했다. 후속 연구에 따르면 인간 T 세포와 전임상 동물 모델의 T 세포의 CD28 반응성 차이로 인한 투여 오류로 인해 독성이 발생한 것으로 나타났다. TGN1412는 현재 RA 환자와 전이성 또는 절제 불가능한 진행성 고형 악성종양 환자를 대상으로 공개 라벨, 다기관 용량 증량 연구에서 재평가되고 있다. 클론 9.3과 같은 CD28 일반 작용성 항체는 CD28 천연 리간드를 모방하고 T 세포 수용체 신호(신호 1)가 있는 경우에만 T 세포 활성화를 향상시킬 수 있다. 공개된 관찰 결과들은 항체의 결합 에피토프가 해당 작용성 항체가 초작용제인지 일반 작용제인지에 중요한 영향을 미친다는 것을 나타낸다(Beyersdorf 외, 2005). 초작용성 TGN1412는 CD28의 양상 모티프에 결합하는 반면, 일반 작용성 분자 9.3은 리간드 결합 에피토프에 가깝게 결합한다. 상이한 결합 에피토프의 결과로, 초작용성 및 일반 작용

성 항체는 T 세포 표면에서 CD28 분자의 선형 복합체를 형성하는 능력이 다르다. 정확하게, TGN1412는 CD28의 선형 배열을 효율적으로 형성할 수 있으며, 이는 아마도 T 세포 활성화에 대한 임계값을 증가하기에 충분한 신호전달 구성요소들을 응집하게 한다. 반면에 일반 작용제 9.3은 선형 구조가 아닌 복합체를 생성한다. 흑색종 관련 프로테오글리칸 및 CD28에 대한 재조합 이중특이적 단일 사슬 항체를 사용하여 9.3 클론을 기반으로 하는 일반 작용성 결합체를 전환하려는 시도가 이전에 발표된 바 있다(Otz 외, 2009). 보고된 이중특이적 단일 사슬 항체는, 이중특이적 단일 사슬 항체가 다량체 구조체를 형성하는 고유한 경향에 기초하여 일반 CD28 작용성 결합체 9.3의 사용에도 불구하고 "초작용성" 활성을 발휘하는 것으로 보고되었다.

[0005] 인간 표피 성장 인자 수용체-2(Her2; ErbB2)는 수용체 티로신 키나제이며 표피 성장 인자 수용체(EGFR) 계열의 막관통 수용체 구성원이다. Her2는 다양한 종양 유형에서 과발현되며 질환 개시 및 진행과 관련이 있다. 이것은 나쁜 예후와 관련이 있다. 예를 들어, Her2의 과발현은 대략 30%의 인간 유방암에서 관찰되며 이는 이러한 종양과 관련된 공격적인 성장 및 불량한 임상 결과와 관련이 있다(Slamon 외(1987) Science 235:177-182).

[0006] 인간화 항-Her2 단클론 항체 트라스투주맙(CAS 180288-69-1, 헤르셉틴(HERCEPTIN®), huMab4D5-8, rhuMab Her2, Genentech)은 Her-2의 세포외 도메인을 표적으로 한다(US 5677171; US 5821337; US 6054297; US 6165464; US 6339142, US 6407213, US 6639055, US 6719971, US 6800738, US 7074404, Coussens 외 (1985) Science 230:1 132-9, Slamon 외 (1989) Science 244:707-12, Slamon 외 (2001) New Engl. J. Med. 344:783-792). 트라스투주맙은 Her-2를 과발현하는 인간 종양 세포의 증식을 억제하는 것으로 나타났으며 항체 의존성 세포 독성, ADCC의 매개체이다(Hudziak 외 (1989) Mol Cell Biol 9:1 165-72; Lewis 외 (1993) Cancer Immunol Immunother; 37:255-63; Baselga 외 (1998) Cancer Res. 58:2825-2831; Hotaling 외 (1996) [초록]. Proc. Annual Meeting Am Assoc Cancer Res; 37:471; Pegram MD, 외 (1997) [초록]. Proc Am Assoc Cancer Res; 38:602; Sliwkowski 외 (1999) Seminars in Oncology 26(4), Suppl 12:60- 70; Yarden Y. and Sliwkowski, M. (2001) Nature Reviews: Molecular Cell Biology, Macmillan Magazines, Ltd., Vol. 2:127-137).

[0007] 헤르셉틴(HERCEPTIN®)(트라스투주맙, Genentech Inc.)은 Her2 과발현 전이성 유방암 환자의 치료용으로 1998년에 승인되었다(Baselga 외, (1996) J. Clin. Oncol. 14:737-744). 2006년 FDA는 Her2-양성 림프절-양성 유방암 환자의 보조 치료를 위한 독소루비신, 사이클로포스파미드 및 파클리탁셀을 포함하는 치료 요법의 일부로 헤르셉틴(HERCEPTIN®)을 승인했다. 페르투주맙(재조합 인간화 단클론 항체 2C4, rhuMab 2C4로도 알려짐, 페르제타(PERJETA®), Genentech, Inc, South San Francisco)은 Her2를 표적으로 하는 또 다른 항체 치료제이다. 페르투주맙은 Her 이량체화 억제제(HDI)이며 다른 Her 수용체(예를 들어, EGFR/Her1, Her2, Her3 및 Her4)와 활성 이종이량체 또는 동종이량체를 형성하는 Her2의 능력을 억제하는 기능을 한다. 예를 들어, Harari and Yarden Oncogene 19:6102-14 (2000); Yarden and Sliwkowski. Nat Rev Mol Cell Biol 2:127-37 (2001); Sliwkowski, Nat Struct Biol 10:158-9 (2003); Cho 외, Nature 421:756-60 (2003); 및 Malik 외, Pro Am Soc Cancer Res 44:176-7 (2003); US 7560111. 페르제타(PERJETA®)는 트라스투주맙 및 도세탁셀과 함께 진행성 또는 말기(전이성) Her2 양성 유방암 환자 치료용으로 2012년에 처음 승인되었다. 한편, 트라스투주맙과 페르투주맙을 사용한 병용 요법은 Her2 양성, 국소 진행성, 염증성 또는 초기 단계 유방암의 선행(수술 전) 치료와 재발 위험이 높은 Her2 양성 초기 유방암(EBC)의 보조(수술 후) 치료에도 승인되었다. 페르제타와 헤르셉틴의 작용 메커니즘은 둘 다 Her2 수용체에 결합하지만 다른 위치에 결합하므로 서로를 보완하는 것으로 여겨진다. 페르제타와 헤르셉틴의 조합은 HER 신호전달 경로의 보다 포괄적인 이중 차단을 제공하여 종양 세포의 성장과 생존을 방지하는 것으로 생각된다. 인간 ErbB2의 도메인 II, III 및 IV에 대해 지시되는 이중특이적, 2가 Her2 항체는 WO 2012/143523에 개시되어 있다. 헤르셉타그(Herceptarg)로 불리는, 항체 rhuMab 2C4 및 hu4D5의 최적화된 변이체를 포함하는 이중특이적 HER-2 항체는 WO 2015/091738에 기재되어 있다.

[0008] 유방암에서 트라스투주맙의 치료 효능은 잘 입증되었지만, 내성 때문에 트라스투주맙으로부터 혜택을 받지 못하는 환자들이 많다. 낮은 수준의 Her2를 발현하는 특정 암에서 효과적인 항-Her2 요법의 부족, 현재 요법에 대한 내성 및 Her2-발현 암의 유병률을 고려할 때, 이러한 암들을 치료하기 위한 새로운 요법이 필요하다.

[0009] 제한된 양의 항-CD3 이중특이적 항체, 즉 Her2-표적화 CD3 항체와 같은 T 세포 이중특이적 항체(TCB)가 작용성 항-CD28 분자와 조합될 때 더 나은 T 세포 활성화가 달성되는 것으로 밝혀졌다. CD28이 다양한 종양 적응증들에서 기준선의 T 세포들에서 발현되고(Lavin 외, 2017; Tirosh 외, 2016, Zheng 외, 2017) CD28 신호전달의 활성화가 T 세포 수용체 신호를 강화시킨다는 점을 감안할 때, Her2-표적화 CD28 항원 결합 분자와 TCB 분자의 조합은 강력하고 오래 지속되는 항종양 반응을 유도하기 위해 상승작용적으로 작용할 것으로 예상된다. 따라서, 본 발명자들은, TCB와 상승작용을 나타내고 TCB 신호의 존재시 엄격한 종양 표적 의존성을 위해 CD28 결합 1가

필요로 하는 새로운 Her2-표적화 작용성 CD28 분자를 기술한다.

발명의 내용

- [0010] 본 발명은 다량체를 형성할 필요 없이 종양-의존성 T 세포 활성화 및 종양 세포 사멸을 구현하는 Her2-표적화 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 기술한다. 본 발명의 이중특이적 CD28 항원 결합 분자는 CD28에 대한 1가 결합을 특징으로 하고 인간 표피 성장 인자 수용체-2(Her2)에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다는 점에서 특징이 있다. 더욱이, 이들은 안정한 회합이 가능한 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인을 보유하는데 이는 Fc 수용체에 대한 항원 결합 분자의 결합 친화도 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 이로써 Fc 수용체-매개 가교결합이 없어지고 Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인의 결합을 통한 가교결합에 의해 종양-특이적 활성화가 달성된다.
- [0011] 그러므로, 본 발명은 다음을 포함하는, CD28에 대한 1가 결합을 특징으로 하는 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 제공한다:
- [0012] (a) CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인,
- [0013] (b) 인간 표피 성장 인자 수용체-2(Her2)에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인, 및
- [0014] (c) Fc 수용체에 대한 항원 결합 분자의 결합 친화도 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 안정한 회합이 가능한 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인.
- [0015] 특히, 본 발명은 CD28에 대한 1가 결합을 특징으로 하는 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 제공하며, 다음을 포함하고:
- [0016] (a) CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인,
- [0017] (b) 인간 표피 성장 인자 수용체-2(Her2)에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인, 및
- [0018] (c) Fc 수용체에 대한 항원 결합 분자의 결합 친화도 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 안정한 회합이 가능한 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인,
- [0019] 여기서 Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 상기 제2 항원 결합 도메인은 다음을 포함한다:
- [0020] (i) 서열번호 2의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 3의 CDR-H2, 및 서열번호 4의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2), 및 서열번호 5의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 6의 CDR-L2 및 서열번호 7의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2); 또는
- [0021] (ii) 서열번호 10의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 11의 CDR-H2, 및 서열번호 12의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2), 및 서열번호 13의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 14의 CDR-L2 및 서열번호 15의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2); 또는
- [0022] (iii) 서열번호 132의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 133의 CDR-H2, 및 서열번호 134의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2), 및 서열번호 135의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 136의 CDR-L2 및 서열번호 137의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2); 또는
- [0023] (iv) 서열번호 140의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 141의 CDR-H2, 및 서열번호 142의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2), 및 서열번호 143의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 144의 CDR-L2 및 서열번호 145의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2).
- [0024] 한 양상에서, 본 발명은 CD28에 대한 1가 결합을 특징으로 하는 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 제공하며, 다음을 포함하고:
- [0025] (a) CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인,
- [0026] (b) 인간 표피 성장 인자 수용체-2(Her2)에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인에 특이적으로 결합할

수 있는 제2 항원 결합 도메인, 및

- [0027] (c) Fc 수용체에 대한 항원 결합 분자의 결합 친화도 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 안정한 회합이 가능한 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인,
- [0028] 여기서 Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 상기 제2 항원 결합 도메인은 다음을 포함한다:
- [0029] (i) 서열번호 2의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 3의 CDR-H2, 및 서열번호 4의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2), 및 서열번호 5의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 6의 CDR-L2 및 서열번호 7의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L Her2); 또는
- [0030] (ii) 서열번호 10의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 11의 CDR-H2, 및 서열번호 12의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2), 및 서열번호 13의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 14의 CDR-L2 및 서열번호 15의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L Her2).
- [0031] 또 다른 양상에서, 본 발명은 CD28에 대한 1가 결합을 특징으로 하는 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 제공하며, 다음을 포함하고:
- [0032] (a) CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인,
- [0033] (b) 인간 표피 성장 인자 수용체-2(Her2)에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인, 및
- [0034] (c) Fc 수용체에 대한 항원 결합 분자의 결합 친화도 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 안정한 회합이 가능한 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인,
- [0035] 여기서 Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 상기 제2 항원 결합 도메인은 다음을 포함한다:
- [0036] (iii) 서열번호 132의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 133의 CDR-H2, 및 서열번호 134의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2), 및 서열번호 135의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 136의 CDR-L2 및 서열번호 137의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L Her2); 또는
- [0037] (iv) 서열번호 140의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 141의 CDR-H2, 및 서열번호 142의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2), 및 서열번호 143의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 144의 CDR-L2 및 서열번호 145의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L Her2).
- [0038] 한 양상에서, Fc 도메인이 IgG, 특히 IgG1 Fc 도메인 또는 IgG4 Fc 도메인인 본원에 정의된 바와 같은 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공된다. 한 특정 양상에서, 안정한 회합이 가능한 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인이다. 한 양상에서, Fc 도메인은 아미노산 치환 L234A 및 L235A(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)를 포함한다. 한 양상에서, Fc 도메인은 인간 IgG1 하위분류이고 아미노산 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)를 포함한다.
- [0039] 한 양상에서, 상기 본원에 정의된 바와 같은 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 다음을 포함한다:
- [0040] (i) 서열번호 26의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 27의 CDR-H2, 및 서열번호 28의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 29의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 30의 CDR-L2 및 서열번호 31의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28); 또는
- [0041] (ii) 서열번호 18의 CDR-H1, 서열번호 19의 CDR-H2, 및 서열번호 20의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 21의 CDR-L1, 서열번호 22의 CDR-L2 및 서열번호 23의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28).
- [0042] 한 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자의 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 26의 CDR-H1, 서열번호 27의 CDR-H2, 및 서열번호 28의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 29의 CDR-L1, 서열번호 30의 CDR-L2 및 서열번호 31의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)

을 포함한다.

- [0043] 또 다른 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자의 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 18의 CDR-H1, 서열번호 19의 CDR-H2, 및 서열번호 20의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 21의 CDR-L1, 서열번호 22의 CDR-L2 및 서열번호 23의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)을 포함한다.
- [0044] 추가 양상에서, 상기 본원에 정의된 바와 같은 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 다음을 포함한다:
- [0045] (i) 서열번호 52의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 53의 CDR-H2, 및 서열번호 54의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 55의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 56의 CDR-L2 및 서열번호 57의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28); 또는
- [0046] (ii) 서열번호 58의 CDR-H1, 서열번호 59의 CDR-H2, 및 서열번호 60의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 61의 CDR-L1, 서열번호 62의 CDR-L2 및 서열번호 63의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28); 또는
- [0047] (iii) 서열번호 64의 CDR-H1, 서열번호 65의 CDR-H2, 및 서열번호 66의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 67의 CDR-L1, 서열번호 68의 CDR-L2 및 서열번호 69의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28).
- [0048] 한 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자의 CD28에 특이적 결합을 할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 52의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 53의 CDR-H2, 및 서열번호 54의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 55의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 56의 CDR-L2 및 서열번호 57의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)을 포함한다.
- [0049] 또 다른 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자의 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 58의 CDR-H1, 서열번호 59의 CDR-H2, 및 서열번호 60의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 61의 CDR-L1, 서열번호 62의 CDR-L2 및 서열번호 63의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)을 포함한다.
- [0050] 또한 또 다른 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자의 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 64의 CDR-H1, 서열번호 65의 CDR-H2, 및 서열번호 66의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 67의 CDR-L1, 서열번호 68의 CDR-L2 및 서열번호 69의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)을 포함한다.
- [0051] 또한, 상기 정의된 바와 같은 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 24의 아미노산 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 25의 아미노산 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)을 포함한다.
- [0052] 한 추가 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되고, 여기서 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40 및 서열번호 41로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 25, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50 및 서열번호 51로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)을 포함한다.
- [0053] 또 다른 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 다음을 포함한다:
- [0054] (a) 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함

하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는

- [0055] (b) 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는
- [0056] (c) 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 51의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는
- [0057] (d) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는
- [0058] (e) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는
- [0059] (f) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는
- [0060] (g) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는
- [0061] (h) 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는
- [0062] (i) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는
- [0063] (j) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는
- [0064] (k) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28).
- [0065] 한 특정 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 다음을 포함한다:
- [0066] (i) 서열번호 52의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 53의 CDR-H2, 및 서열번호 54의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 55의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 56의 CDR-L2 및 서열번호 57의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28). 한 양상에서, CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28)의 CDR, 및 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)의 CDR을 포함한다.
- [0067] 또 다른 특정 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)을 포함한다. 한 추가의 특정 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)을 포함한다.
- [0068] 한 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 2의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 3의 CDR-H2, 및 서열번호 4의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2), 및 서열번호 5의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 6의 CDR-L2

및 서열번호 7의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2)을 포함한다. 한 양상에서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2)의 CDR, 및 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2)의 CDR을 포함한다. 한 특정 양상에서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2), 및 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2)을 포함한다.

[0069] 또 다른 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 10의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 11의 CDR-H2, 및 서열번호 12의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2), 및 서열번호 13의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 14의 CDR-L2 및 서열번호 15의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2)을 포함한다. 한 양상에서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2)의 CDR, 및 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2)의 CDR을 포함한다. 한 특정 양상에서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2), 및 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2)을 포함한다.

[0070] 또한 또 다른 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 132의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 133의 CDR-H2, 및 서열번호 134의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2), 및 서열번호 135의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 136의 CDR-L2 및 서열번호 137의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2)을 포함한다. 한 양상에서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 138의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2)의 CDR, 및 서열번호 139의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2)의 CDR을 포함한다. 한 특정 양상에서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 138의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2), 및 서열번호 139의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2)을 포함한다.

[0071] 또 다른 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 140의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 141의 CDR-H2, 및 서열번호 142의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2), 및 서열번호 143의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 144의 CDR-L2 및 서열번호 145의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2)을 포함한다. 한 양상에서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 146의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2)의 CDR, 및 서열번호 147의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2)의 CDR을 포함한다. 한 특정 양상에서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 146의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2), 및 서열번호 147의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2)을 포함한다.

[0072] 추가 양상에서, 상기 본원에 정의된 바와 같은 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인 및/또는 Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인은 Fab 단편 또는 교차Fab 단편이다. 한 양상에서, (a) CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 Fab 단편, (b) Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 교차Fab 단편, 및 (c) Fc 수용체에 대한 항원 결합 분자의 결합 친화도 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 안정적인 회합이 가능한 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인을 포함하는, 본원에 기재된 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공된다. 또 다른 양상에서, (a) CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 교차Fab 단편, (b) Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 Fab 단편, 및 (c) Fc 수용체에 대한 항원 결합 분자의 결합 친화도 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 안정적인 회합이 가능한 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인을 포함하는, 본원에 기재된 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공된다.

[0073] 한 양상에서, CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL과 VH 또는 불변 도메인 CL과 CH1, 특히 가변 도메인 VL과 VH가 서로에 의해 대체된 Fab 단편이다. 한 양상에서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 상기 제2 항원 결합 도메인은 일반 Fab 단편이다. 한 양상에서, Her2에

특이적으로 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인은 Fab 분자이며, 이때 불변 도메인 CL에서 위치 123(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산이 리신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)에서 선택된 아미노산으로 치환되고 위치 124(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산이 리신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)으로 독립적으로 치환되고, 이때 불변 도메인 CH1에서 위치 147(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산이 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 독립적으로 치환되고 위치 213(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산이 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 독립적으로 치환된다(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링).

[0074] 한 특정 양상에서, 다음을 포함하는 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공된다:

[0075] (i) 서열번호 92의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 91의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 96의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 및 서열번호 97의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄, 또는

[0076] (ii) 서열번호 92의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 91의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 98의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 및 서열번호 97의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄, 또는

[0077] (iii) 서열번호 92의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 91의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 101의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 및 서열번호 97의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄.

[0078] 또 다른 특정 양상에서, 다음을 포함하는 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공된다:

[0079] (i) 서열번호 179의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 178의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 180의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 및 서열번호 181의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄, 또는

[0080] (ii) 서열번호 179의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 178의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 182의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 및 서열번호 183의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄.

[0081] 한 추가 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인은 Fab 분자이고 이때 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL과 VH 또는 불변 도메인 CL과 CH1, 특히 가변 도메인 VL과 VH는 서로에 의해 대체된다. 한 양상에서, CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 일반 Fab 분자이다. 한 양상에서, CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 Fab 분자이며, 이때 불변 도메인 CL에서 위치 123(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산이 리신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)에서 선택된 아미노산으로 치환되고 위치 124(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산이 리신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)으로 독립적으로 치환되고, 이때 불변 도메인 CH1에서 위치 147(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산이 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 독립적으로 치환되고 위치 213(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산이 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 독립적으로 치환된다(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링).

[0082] 한 특정 양상에서, 다음을 포함하는 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공된다:

[0083] (i) 서열번호 83의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 74의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 99의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 및 서열번호 100의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄, 또는

[0084] (ii) 서열번호 83의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 74의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 102의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 및 서열번호 100의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄.

[0085] 또 다른 양상에서, 본원에 개시된 바와 같은 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 제1 및 제2 항원 결합 도메인은 각각 Fab 분자이고 Fc 도메인은 안정한 회합이 가능한 제1 및 제2 서브유닛으로 구성되고; (i) 제1 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제1 서브유닛의 N-말단에 융합되고 제2 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제2 서브유닛의 N-말단에 융합되거나, (ii) 제2 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제1 서브유닛의 N-말단에 융합되고 제1 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제2 서브유닛의 N-말단에 융합된다. 한 양상에서, Fc 도메인은 Fc 도메인의 제1 및 제2 서브유닛의 회합을 촉진하는 변형을 포함한다. 한 양상에서, Fc 도메인의 제1 서브유닛은 아미노산 치환 S354C 및 T366W(EU 넘버링)를 포함하고 Fc 도메인의 제2 서브유닛은 아미노산 치환 Y349C, T366S 및 Y407V(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)를 포함한다.

[0086] 본 발명의 또 다른 양상에 따르면, 본 발명의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 인코딩하는 하나 이상의 단리된 폴리뉴클레오티드(들)가 제공된다. 본 발명은 추가로 본 발명의 단리된 폴리뉴클레오티드(들)을 포함

하는 하나 이상의 벡터(들), 특히 발현 벡터(들), 및 본 발명의 단리된 폴리뉴클레오티드(들) 또는 발현 벡터(들)을 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 일부 양상에서, 숙주 세포는 진핵 세포, 특히, 포유동물 세포이다. 일부 양상에서, 숙주 세포는 원핵 세포이다. 또 다른 양상에서, 본 발명은 추가로 하나 이상의 벡터(들)을 제공하며, 특히, 본원에 기재된 바와 같은 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합의 발현에 적합한 조건하에서 본 발명의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 생산하는 방법이 제공된다. 선택적으로, 이 방법은 또한 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 회수하는 단계를 포함한다. 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 의해 생산된 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 포함한다.

[0087] 본 발명은 또한 본 발명의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 및 적어도 하나의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 한 양상에서, 이러한 약학 조성물은 질환, 특히 암의 치료에 사용하기 위한 것이다. 한 양상에서, 이러한 약학 조성물은 Her2-양성 암의 치료에 사용하기 위한 것이다.

[0088] 또한 본 발명은 본 발명의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 약학 조성물을 사용하는 방법을 포함한다. 한 양상에서, 본 발명은 약제로서 사용하기 위한 본 발명에 따른 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 약학 조성물을 제공한다. 한 양상에서, (a) 세포 활성화 항상 또는 (b) T 세포 효과기 기능 향상에 사용하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공된다. 한 양상에서, 질환 치료에 사용하기 위한 본 발명에 따른 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 약학 조성물이 제공된다. 한 특정 양상에서, 질환은 암, 특히, Her2-양성 암이다. 또 다른 양상에서 암 치료에 사용하기 위한 본 발명에 따른 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 약학 조성물이 제공되며, 여기서 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자는 화학요법제, 방사선 요법 및/또는 또는 암 면역요법에 사용하기 위한 기타 제제와 병용 투여하기 위한 것이다. 한 추가 양상에서, 암 치료에 사용하기 위한 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 약학 조성물이 제공되며, 여기서 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자는 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체와 병용 투여하기 위한 것이다. 한 양상에서, T-세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체는 항-Her2/항-CD3 항체이다. 또 다른 양상에서, 암 치료에 사용하기 위한 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 약학 조성물이 제공되며, 여기서 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자는 항-PD-L1 항체 또는 항-PD-1 항체와 병용 투여하기 위한 것이다.

[0089] 또한, 질환 치료용 약제의 제조에 있어서 본 발명의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 약학 조성물의 용도가 제공되며; 뿐만 아니라 본 발명에 따른 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 본 발명에 따른 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 약학적으로 허용되는 형태로 포함하는 조성물의 치료적 유효량을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 개체의 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 특정 양상에서, 질환은 암이다. 한 양상에서, 본 발명에 따른 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 본 발명에 따른 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 포함하는 조성물을 약학적으로 허용되는 형태로 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 (a) T 세포 활성화를 향상시키거나 (b) T 세포 효과기 기능을 향상시키는 방법이 제공된다. 또 다른 양상에서, 질환 치료를 위한 약제의 제조에 있어서 본 발명에 따른 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자의 용도가 제공되며, 여기서 치료는 화학요법제, 방사선 요법 및/또는 암 면역요법에 사용하기 위한 기타 제제와의 공동 투여를 포함한다. 추가 양상에서, 개체의 질환을 치료하는 방법이 제공되며, 이 방법은 상기 개체에게 치료 유효량의 본 발명에 따른 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 본 발명에 따른 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 약학적으로 허용되는 형태로 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 방법은 화학요법제, 방사선 요법 및/또는 암 면역요법에 사용하기 위한 다른 제제와의 공동-투여를 포함한다. 추가 양상에서, 개체의 질환을 치료하는 방법이 제공되며, 이 방법은 상기 개체에게 치료 유효량의 본 발명에 따른 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 본 발명에 따른 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 약학적으로 허용되는 형태로 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 방법은 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체의 공동-투여를 포함한다. 한 양상에서, T-세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체는 항-Her2/항-CD3 항체이다. 추가 양상에서, 개체의 질환을 치료하는 방법이 제공되며, 이 방법은 상기 개체에게 치료 유효량의 본 발명에 따른 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 본 발명에 따른 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 약학적으로 허용되는 형태로 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 방법은 항-PD-L1 항체 또는 항-PD-1 항체의 공동-투여를 포함한다. 또한 개체에서 종양 세포의 성장을 억제하는 방법이 제공되며, 이 방법은 종양 세포의 성장을 억제하기 위해 유효량의 본 발명에 따른 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자, 또는 본 발명에 따른 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 약학적으로 허용되는 형태로 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함한다. 임의의 상기 양상들에서 개체는 바람직하게는 포유동물, 특히 인간이다.

도면의 간단한 설명

[0090]

도 1a 내지 1d에는 본원에 기술된 예시적인 분자들의 개략도가 도시되어 있다. **도 1a**는 1가 hu IgG1 PGLALA 이소형("Fc 침묵")으로서 CD28 작용성 항체 변이체의 개략도를 보여준다. **도 1b**는 1+1 형식의 이중특이적 Her2-CD28 항원 결합 분자를 나타내며, 여기서 CD28 항원 결합 도메인을 포함하는 Fab 분자에서 VH 및 VL 도메인은 서로 교환되고(VH/VL 교차fab) Her2 항원 결합 도메인을 포함하는 Fab 분자에서 CH1 및 CL 도메인의 특정 아미노산들이 교환되어(하전된 변이체) 경쇄와 더 나은 페어링을 가능하게 한다. Fc 도메인은 hu IgG1 PGLALA 버전이다. **도 1c**는 N297G 돌연변이를 포함하는 두 개의 중쇄를 갖는 1+1 형식의 이중특이적 Her2-CD28 항원 결합 분자를 나타내며, 여기서 두 Fab 분자는 상이한 세포주에서 발견되고, 정제되어, 온전한 이중특이적으로 조립된다. **도 1d**는 1+1 형식의 이중특이적 Her2-CD28 항원 결합 분자를 나타내며, 여기서 Her2 항원 결합 도메인을 포함하는 Fab 분자에서 VH 및 VL 도메인은 서로 교환되고(VH/VL 교차fab) CD28 항원 결합 도메인을 포함하는 Fab 분자에서 CH1 및 CL 도메인의 특정 아미노산들이 교환되어(하전된 변이체) 경쇄와 더 나은 페어링을 가능하게 한다.

CD28(SA) 및 이의 변이체의 가변 도메인의 정렬은 **도 2a** 내지 **2d**에 도시되어 있다. CD28(SA) VH 도메인 및, 시스테인 50을 제거하고 생성된 항-CD28 결합체의 친화도를 상이한 정도로 감소시키기 위한 이의 변이체의 정렬이 **도 2a**에 도시되어 있다. 참고로, VH 변이체 i 및 j에서 CD28(SA)의 CDR은 IGHV1-2 프레임워크에서 IGHV3-23 프레임워크로 이식되었다(**도 2b**). **도 2c**에서, CD28(SA) VL 도메인 및 생성된 항-CD28 결합체의 친화도를 상이한 정도로 감소시키기 위한 이의 변이체의 정렬이 도시되어 있다. 변이체 t에서, CDR은 트라스투주맵(헤르셉틴) VL 서열의 프레임워크 서열로 이식되었다(**도 2d**).

도 3a 내지 3c에서 세포 상의 인간 CD28에 대한 상청액으로부터의 단일특이적, 1가 IgG 형식의 친화도-감소된 CD28 작용성 항체 변이체의 결합을 도시하고 있다. 음성 대조군(항-DP47) 및 원래의 CD28 항체 CD28(SA) 대비 인간 CD28을 발현하는 CHO 세포(부모 세포주 CHO-k1 ATCC #CCL-61, 인간 CD28을 안정적으로 과발현하도록 변형됨)에 대한 결합의 중간 형광 강도를 유동 세포 계측법으로 평가하였다. 변이체 1-10의 결합 곡선을 **도 3a**에, 변이체 11 내지 22의 결합 곡선을 **도 3b**에, 변이체 23 내지 31의 결합 곡선을 **도 3c**에 나타내었다. 기술적 중복을 SD와 함께 도시한다.

도 4a는 인간 유방암 세포주 KPL-4에 의해 세포 표면 상에 발현된 Her2에 대한 Her2-CD28 이중특이적 항원 결합 분자의 결합을 나타낸다. Her2-CD28(P1AF6741) 또는 대조군 분자(DP47 huIgG1 P329G LALA 항체)를 X축에 표시한 바와 같은 상이한 농도에서 Her2-발현 세포주 KPL-4와 함께 인큐베이션하였다. 그 후 과량의 결합되지 않은 분자를 세척하고 결합된 분자들을 2차 결합 R-피코에리쓰린 AffiniPure F(ab')₂ 단편 염소 항-인간 IgG, Fc γ 단편 특이적으로 검출했다. 형광 강도(MFI)의 중앙값을 유세포측정법으로 측정하였으며 용량 의존 방식으로 테스트된 분자들의 친화도를 나타낸다. 기술적 중복 +/- SEM의 평균값을 나타낸다.

도 4b는 CHOK1-huCD28 세포주의 세포 표면에서 발현된 CD28에 대한 Her2-CD28 이중특이적 항원 결합 분자의 결합을 보여준다. Her2-CD28(P1AF6741) 또는 대조군 분자(DP47 huIgG1 P329G LALA 항체)를 X축에 표시한 바와 같은 상이한 농도에서 CHOK1-huCD28 세포주와 함께 인큐베이션하였다. 그 후 과량의 결합되지 않은 분자를 세척하고 결합된 분자들을 2차 결합 R-피코에리쓰린 AffiniPure F(ab')₂ 단편 염소 항-인간 IgG, Fc γ 단편 특이적으로 검출했다. 형광 강도(MFI)의 중앙값을 유세포측정법으로 측정하였으며 용량 의존 방식으로 테스트된 분자들의 친화도를 나타낸다. 기술적 중복 +/- SEM의 평균값을 나타낸다.

도 5는 Her2-CD28 이중특이적 항원 결합 분자가 KPL-4 세포의 존재하에 IL-2 리포터 분석에서 항-CD3 자극에 대한 T 세포 반응을 향상시킨다는 것을 보여준다. 준최적 농도의 항-CD3 IgG 클론 OKT3(10 nM) 및 증가하는 농도의 Her2-CD28(P1AF6741) 또는 대조 분자(DP47)의 존재하에서 KPL-4 세포와 함께 6시간 공동 인큐베이션 후 발광 관독값으로 측정된 IL-2 수용체 세포 활성화를 도시한다. 점선은 항-CD3만을 나타낸다. 기술적 중복 +/- SEM의 평균값을 나타낸다.

도 6A는 인간 유방암 세포주 KPL-4의 세포 표면 상에 발현된 Her2에 대한 Her2-CD28 이중특이적 항원 결합 분자 B, D 및 A의 결합을 나타낸다. 음성 대조군(생식세포 대조군 DP47 IgG1 Fc PGLALA)을 포함하는 모든 분자는 5배 희석에서 0.01-500nM의 농도 범위에서 인큐베이션되었다. 그 후, Fc γ 단편 특이적 염소 항-인간 IgG R-피코에리쓰린 AffiniPure F(ab')₂ 2차 항체로 과량의 결합되지 않은 분자를 세척하고 결합된 분자를 검출했다. 형광 강도(MFI)의 중앙값을 유세포측정법으로 측정하였으며 용량 의존 방식으로 테스트된 분자들의 친화도를 나타낸다. 모든 값은 기술적 삼중 +/- SEM의 평균으로 표시된다.

도 6B는 CHOk1 huCD28의 세포 표면 상에 발현된 CD28에 대한 Her2-CD28 이중특이적 항원 결합 분자 B, D 및 A의 결합을 나타낸다. 음성 대조군(DP47 IgG1 Fc PGLALA)을 포함하는 모든 분자는 5배 희석에서 0.01-500nM의 농도 범위에서 인큐베이션되었다. 그 후, Fc γ 단편 특이적 염소 항-인간 IgG R-피코에리쓰린 AffiniPure F(ab')₂ 2차 항체로 과량의 결합되지 않은 분자를 세척하고 결합된 분자를 검출했다. 형광 강도(MFI)의 중앙값을 유세포측정법으로 측정하였으며 용량 의존 방식으로 테스트된 분자들의 친화도를 나타낸다. 모든 값은 기술적 삼중 +/- SEM의 평균으로 표시된다.

도 7A 및 도 7B는 KPL4 종양 표적 세포의 존재(**도 7A**) 또는 부재(**도 7B**)하에서 트라스투주맵 CLC-CD28(분자 D) 및 페르투주맵 CLC-CD28(분자 A 및 B)의 교차 변이체 간의 비교를 보여준다. DP47 IgG1 Fc PGLALA는 비결합 대조군으로 포함되었다. 리포터 및 표적 세포를 5:1의 E:T 비율로 플레이팅하였다. 10 nM의 농도로 항-CD3를 첨가한 후, 분자를 희석 인자 4로 0.002 내지 10 nM 범위의 농도로 인큐베이션하였다. 배양 6시간 후, 기질 완충액을 첨가하고 발광을 측정하였다. 모든 값은 기술적 중복 +/- SEM의 평균으로 표시된다.

도 8A는 높은 Her2-발현 세포주 KPL4와 함께 배양된 인간 CD4⁺ T 세포의 HER2 TDB 유도된 활성화에 대한 500 ng/mL 농도에서 CD28 항체 뿐만 아니라 Her2-CD28 이중특이적 항원 결합 분자 2C4/CD28(분자 F) 및 4D5/CD28(분자 G)의 효과를 보여주는 그래프이다. T 세포 활성화는 CD69 및 CD25의 이중 발현에 의해 측정되었다. **도 8B**는 높은 Her2-발현 세포주 KPL4와 함께 배양된 인간 CD8⁺ T 세포의 HER2 TDB 유도된 활성화에 대한 500 ng/mL 농도의 Her2-CD28 이중특이적 항원 결합 분자 2C4/CD28 및 4D5/CD28 뿐만 아니라 CD28 항체의 효과를 보여주는 그래프이다. T 세포 활성화는 CD69 및 CD25의 이중 발현에 의해 측정되었다.

도 8C는 KPL-4 종양 세포의 HER2 TDB 매개 표적 세포 사멸에 대한 Her2-CD28 이중특이적 항원 결합 분자 2C4/CD28 및 4D5/CD28 뿐만 아니라 CD28 항체의 효과를 나타내는 그래프이다.

도 9a 내지 **9g**는 치료 후 T 세포 활성화 분석 24시간으로부터 수집된 상청액 샘플에서 측정된, HER2 TDB 유도된 사이토카인 방출에 대한 Her2-CD28 이중특이적 항원 결합 분자 2C4/CD28 및 4D5/CD28, 뿐만 아니라 CD28 항체의 효과를 보여준다. 가용성 사이토카인 GM-CSF(**도 9a**), IFN-감마(**도 9b**), IL-10(**도 9c**), IL-6(**도 9d**), TNF-알파(**도 9e**), IL-2(**도 9f**) 및 IL-1b(**도 9g**)의 양을 나타낸다.

도 10A 내지 **10D**는 HER2-TDB로 치료한 후 최대 15일차까지 다양한 시점에서 Her2-CD28 이중특이적 항원 결합 분자 2C4/CD28 및 4D5/CD28, 뿐만 아니라 CD28 항체를 사용한 공동 자극의 면역 세포의 수에 대한 효과를 보여준다. 총 면역 세포 수는 **도 10A**에 나타난 반면, **도 10B**는 CD4⁺ 세포 수를 나타낸다. **도 10C**는 CD8⁺ 세포 수를 나타내고, NK 세포 수는 **도 10D**에 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

- [0091] **정의**
- [0092] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 해당 분야에서 일반적으로 사용되는 바와 같은 동일한 의미를 가진다. 본원을 해석하기 위해서, 다음 정의들을 적용하며 적절한 경우 언체나 단수로 사용된 용어가 복수를 또한 포함할 것이며 이의 역도 마찬가지이다.
- [0093] 본원에서 사용되는 용어 "**항원 결합 분자**"는 가장 넓은 의미로, 항원 결정인자에 특이적으로 결합하는 분자를 지칭한다. 항원 결합 분자의 예는 항체, 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체), 항체 단편 및 스캐폴드 항원 결합 단백질이다.
- [0094] 본원에 사용된 용어 "**종양 관련 항원에 결합하는 항원 결합 도메인**" 또는 "**종양 관련 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 모이어티**"는 종양 관련 항원 Her2에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드 분자를 지칭한다. 한 양상에서, 항원 결합 도메인은 Her2를 통해 신호전달을 활성화할 수 있다. 특정 양상에서, 항원 결합 도메인은 Her2-발현 세포, 예를 들어, 특정 유형의 종양 세포에 부착된 모이어티(예를 들어, CD28 항체)를 지시할 수 있다. Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 본원에 추가로 정의된 항체 및 이의 단편을 포함한다. 또한, 종양 관련 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 본원에 추가로 정의된 바와 같은 스캐폴드 항원 결합 단백질, 예를 들어 설계된 반복 단백질 또는 설계된 반복 도메인을 기반으로 하는 결합 도메인을 포함한다(예를 들어 WO 2002/020565 참조).
- [0095] 항원 관련 분자, 즉, 항체 또는 이의 단편과 관련하여, 용어 "**항원 결합 도메인**"은 항원에 특이적으로 결합하고 항원의 일부 또는 전부에 상보적인 영역을 포함하는 분자의 일부를 지칭한다. 특이적 항원 결합이 가능한 항원

결합 도메인은 예를 들어 하나 이상의 항체 가변 도메인(항체 가변 영역으로도 지칭됨)에 의해 제공될 수 있다. 특히, 특이적 항원 결합이 가능한 항원 결합 도메인은 항체 경쇄 가변 영역(VL) 및 항체 중쇄 가변 영역(VH)을 포함한다. 또 다른 양상에서, "종양 관련 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인"은 또한 Fab 단편 또는 교차Fab 단편일 수 있다. 항원 결합 도메인 등과 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "제1", "제2" 또는 "제3"은 각 유형의 모이어티 중 하나 이상이 존재할 때 구별의 편의를 위해 사용된다. 이러한 용어의 사용은 명시적으로 언급되지 않는 한 모이어티의 특정 순서 또는 방향을 부여하려는 의도가 아니다.

[0096] 본원에서 용어 "**항체**"는 가장 넓은 의미로 사용되며, 이들에 한정되지는 않지만, 단클론 항체, 다클론 항체, 단일특이적 항체, 및 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체), 및 목적하는 항원-결합 활성을 나타내는 경우의 항체 단편을 비롯한, 다양한 항체 구조체를 포함한다.

[0097] 본원에서 사용되는 용어 "**단클론 항체**"는 실질적으로 동질성 항체 집단으로부터 획득된 항체를 말하는데, 예를 들어, 개별 항체는 동일한 집단 및/또는 같은 에피토프에 결합하는 집단을 포함하는데, 다만, 변이체 항체, 예를 들어, 자연 발생적 돌연변이 또는 단클론 항체 제제를 만드는 동안 발생하는 돌연변이를 가진 변이체 항체 가능성이 있으며, 이러한 변이체들은 일반적으로 소량으로 존재한다. 상이한 결정부위(에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 통상적으로 포함하는 다클론 항체 제제와 반대로, 단클론 항체 제제의 각각의 단클론 항체는 항원 상의 단일 결정부위에 대해 지시된다.

[0098] 본원에 사용된 용어 "**단일특이적**" 항체는 각각의 결합 부위가 동일한 항원의 동일한 에피토프에 결합하는 하나 이상의 상기 결합 부위를 갖는 항체를 나타낸다. 용어 "**이중특이적**"은 항원 결합 분자가 적어도 2개의 개별 항원 결정인자에 특이적으로 결합할 수 있음을 의미한다. 전형적으로, 이중특이적 항원 결합 분자는 2개의 항원 결합 부위를 포함하며, 이들 각각은 상이한 항원 결정인자에 대해 특이적이다. 그러나, 이중특이적 항원 결합 분자는 또한 추가 항원 결정기에 결합하는 추가 항원 결합 부위를 포함할 수 있다. 특정 양상들에서, 이중특이적 항원 결합 분자는 2개의 항원결정인자, 특히, 2개의 개별 세포에서 또는 동일한 세포에서 발현되는 2개의 항원결정인자에 동시에 결합할 수 있다. 따라서 본 발명에 따른 용어 "**이중특이적**"은 또한 삼중특이성 분자, 예를 들어 CD28 항체 및 2개의 상이한 표적 세포 항원에 지시되는 2개의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 분자를 포함할 수 있다.

[0099] 본원에서 사용되는 용어 "**~가(valent)**"는 하나의 별개의 항원 결정인자에 특이적인 항원 결합 분자 내의 하나의 별개의 항원 결정인자에 특이적인 특정 수의 결합 부위들의 존재를 나타낸다. 이에 따라 용어 "2가", "4가" 및 "6가"는 각각 항원 결합 분자 내에서 특정 항원 결정인자에 특이적인 2개의 결합 부위, 4개의 결합 부위 및 6개의 결합 부위의 존재를 나타낸다. 본 발명의 특정 양상에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항원 결합 분자는 특정 항원 결정인자에 대해 1가일 수 있고, 이는 이들이 상기 항원 결정인자에 대해 단 하나의 결합 부위를 갖는 것을 의미하거나, 또는 특정 항원 결정인자에 대해 2가 또는 4가일 수 있고, 이는 상기 항원 결정인자에 대해 각각 2개의 결합 부위 또는 4개의 결합 부위를 갖는 것을 의미한다.

[0100] 용어 "전장 항체", "온전한 항체" 및 "전 항체(w홀 antibody)"는 천연 항체 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖는 항체를 지칭하기 위해 본원에서 호환적으로 사용된다. "**천연 항체**" 또는 "**야생형**"은 다양한 구조를 갖는 천연 발생 면역글로불린 분자를 지칭한다. 예를 들면, 천연 IgG-분류 항체는 이종사량체 당단백질로써, 약 150,000 달톤이며, 2개의 경쇄와 2개의 중쇄를 포함하며, 이들은 이황화 결합에 의해 연결되어 있다. 도메인 N-말단으로부터 C-말단으로, 각각의 중쇄는 가변 중쇄 도메인 또는 중쇄 가변 도메인이라고도 불리는 가변 영역(VH), 이어서 중쇄 불변 영역으로도 불리는 3개의 불변 도메인(CH1, CH2, 및 CH3)을 갖는다. 유사하게, N-말단으로부터 C-말단으로, 각각의 경쇄는 가변 경쇄 도메인 또는 경쇄 가변 도메인이라고도 불리는 가변 영역(VL), 이어서 경쇄 불변 영역으로도 불리는 경쇄 불변 도메인(CL)을 갖는다. 항체의 중쇄는 α(IgA), δ(IgD), ε(IgE), γ(IgG), 또는 μ(IgM)라 불리는 5가지 유형 중 하나로 지정될 수 있으며, 이들 중 일부는 하위 유형, 예를 들어 γ1(IgG1), γ2(IgG2), γ3(IgG3), γ4(IgG4), α1(IgA1) 및 α2(IgA2)로 추가로 분류될 수 있다. 항체의 경쇄는 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라 카파(κ) 및 람다(λ)라고 하는 두 가지 유형 중 하나로 지정될 수 있다.

[0101] "**항체 단편**"은 온전한 항체가 결합하는 항원에 결합하는 온전한 항체의 일부를 포함하는 온전한 항체 이외의 분자를 지칭한다. 항체 단편의 예는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 교차 Fab 단편; 선형 항체; 단쇄 항체 분자(예를 들어 scFv); 및 단일 도메인 항체를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 특정 항체 단편들에 대한 검토는 Hudson 등, Nat. Med. 9, 129-134 (2003)를 참조한다. scFv 단편들의

검토는 예로써, Pluckthün, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); WO 93/16185; 그리고 미국 특허 제 5,571,894 및 5,587,458을 또한 참고한다. 구조 수용체(salvage receptor) 결합 에피토프 잔기를 포함하고 생체내 반감기가 증가된 Fab 및 F(ab')₂ 단편에 대한 논의는 미국 특허 제 5,869,046을 참조하라. 디아바디는 2가 또는 이중특이 적일 수 있는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 항체 단편으로, 예를 들어, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson 등, Nat Med 9, 129-134 (2003); 및 Hollinger 등, Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993)를 참조하라. 트리아바디(Triabodies) 및 테트라바디(tetrabodies)는 또한 Hudson 외. Nat. Med. 9, 129-134 (2003)에 설명되어 있다. 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부 또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 항체 단편이다. 특정 실시형태들에서, 단일 도메인 항체는 인간 단일 도메인 항체이다 (Domantis, Inc., Waltham, MA; 예를 들어, 미국 특허 제 6,248,516 B1 참조). 항체 단편은 본원에 기재된 바와 같이, 온전한 항체의 단백질분해 소화, 뿐만 아니라 재조합 숙주 세포 (예를 들어, 대장균 또는 파지)에 의한 제조를 포함한 (그러나 이에 제한되지 않음) 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0102] 온전한 항체들의 파파인 분해는 각각 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 및 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인(CH1) 또한 함유하는 2개의 동일한 항원-결합 단편들, 소위 "Fab" 단편들을 생성한다. 따라서, 본원에서 사용되는 용어 "**Fab 단편**" 또는 "**Fab 분자**"는 가변 경쇄(VL) 도메인 및 경쇄(CL)의 불변 도메인을 포함하는 경쇄 단편, 및 가변 중쇄(VH) 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인(CH1)을 포함하는 항체 단편을 지칭한다. Fab' 단편은 항체 힌지(hinge)의 영역으로부터의 하나 또는 그 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에서 몇 개 잔기들을 부가함에 의해, Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 본원에서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 유리 티올기를 보유하는 Fab' 단편이다. 펩신 처리는 2개의 항원 결합 부위 (2개의 Fab 단편) 및 Fc 영역의 일부를 갖는 F(ab')₂ 단편을 생성한다. "**일반의 Fab 단편**"은 VL-CL 경쇄와 VH-CH1 중쇄로 구성된다.

[0103] 용어 "교차Fab 단편" 또는 "xFab 단편" 또는 "교차 Fab 단편"은 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 또는 불변 영역이 교환된 Fab 단편을 지칭한다. 교차 Fab 분자의 다음 2가지 서로 다른 사슬 조성이 가능하며 이는 본 발명의 이중 특이적 항체에 포함된다: 하나는, 상기 Fab 중쇄 및 경쇄의 가변 영역들이 교환된다, 즉 상기 교차 Fab 분자는 경쇄 가변 도메인(VL) 및 중쇄 불변 도메인(CH1)으로 구성된 펩티드 사슬, 및 중쇄 가변 도메인(VH) 및 경쇄 불변 도메인(CL)으로 구성된 펩티드 사슬을 포함한다. 이러한 교차 Fab 분자를 또한 교차Fab_(VLVH)로도 지칭한다. 다른 하나는, 상기 Fab 중쇄 및 경쇄의 불변 영역들이 교환될 때, 상기 교차 Fab 분자는 중쇄 가변 도메인(VH) 및 경쇄 불변 도메인(CL)으로 구성된 펩티드 사슬, 및 경쇄 가변 도메인(VL) 및 중쇄 불변 도메인(CH1)으로 구성된 펩티드 사슬을 포함한다. 이러한 교차 Fab 분자를 또한 교차Fab_(CLCH1)로도 지칭한다.

[0104] "단일 사슬 Fab 단편" 또는 "**scFab**"은 항체 중쇄 가변 도메인 (VH), 항체 중쇄 불변 도메인 1 (CH1), 항체 경쇄 가변 도메인 (VL), 항체 경쇄 불변 도메인 (CL) 및 링커로 구성된 폴리펩티드로서, 여기서 상기 항체 도메인 및 상기 링커는 N-말단에서 C-말단 방향으로 다음 순서 중 하나를 가지며: a) VH-CH1-링커-VL-CL, b) VL-CL-링커-VH-CH1, c) VH-CL-링커-VL-CH1 또는 d) VL-CH1-링커-VH-CL, 여기서 상기 링커는 적어도 30개 아미노산, 바람직 하게는 32 내지 50개 아미노산의 폴리펩티드이다. 상기 단일 사슬 Fab 단편은 CL 도메인과 CH1 도메인 사이의 자연 이황화 결합을 통해 안정화된다. 또한, 이들 단일 사슬 Fab 분자들은 (예를 들어, Kabat 넘버링에 따라 가 변 중쇄에서 위치 44 및 가변 경쇄에서 위치 100) 시스테인 잔기의 삽입을 통한 사슬간 이황화 결합의 생성에 의해 추가로 안정화 될 수 있다.

[0105] "교차 단일 사슬 Fab 단편" 또는 "**x-scFab**"는 항체 중쇄 가변 도메인 (VH), 항체 중쇄 불변 도메인 1 (CH1), 항 체 경쇄 가변 도메인 (VL), 항체 경쇄 불변 도메인 (CL) 및 링커로 구성된 폴리펩티드로서, 여기서 상기 항체 도메인 및 상기 링커는 N-말단에서 C-말단 방향으로 다음 순서 중 하나를 가지며: a) VH-CL-링커-VL-CH1 및 b) VL-CH1-링커-VH-CL, 여기서 VH 및 VL은 함께 항원에 특이적으로 결합하는 항원-결합 부위를 형성하고, 여기서 상기 링커는 적어도 30개의 아미노산의 폴리펩티드이다. 또한, 이들 x-scFab 분자들은 (예를 들어, Kabat 넘버 링에 따라 가변 중쇄에서 위치 44 및 가변 경쇄에서 위치 100) 시스테인 잔기의 삽입을 통한 사슬간 이황화 결 합의 생성에 의해 추가로 안정화 될 수 있다.

[0106] "**단일-사슬 가변 단편(scFv)**"은 10 내지 약 25개 아미노산의 짧은 링커 펩티드와 연결된, 항체의 중쇄(V_H) 및 경쇄(V_L)의 가변 영역의 융합 단백질이다. 이러한 링커는 일반적으로 가요성을 위해 글리신, 용해도를 위해 세린 또는 트레오닌이 풍부하며, VH의 N-말단을 VL의 C-말단과 연결할 수 있거나 그 반대일 수 있다. 이 단백질은 불 변 영역의 제거와 링커의 도입에도 불구하고 원래 항체의 특이성을 유지한다. scFv 항체는 예를 들어 Houston,

J.S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-96에 기재되어 있다. 또한, 항체 단편은 기능성 항원 결합 부위에 대해, VH 도메인의 특징을 갖는, 즉 VL 도메인과 함께 조립될 수 있는, 또는 VL 도메인의 특징을 갖는, 즉 VH 도메인과 함께 조립될 수 있고, 그리하여 전장 항체의 항원 결합 성질을 제공할 수 있는 단일 사슬 폴리펩티드를 포함한다.

[0107]

"스캐폴드 항원 결합 단백질"은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 피브로넥틴 및 설계된 안키린 반복 단백질(DARPin)은 항원 결합 도메인에 대한 대안적인 스캐폴드로 사용되었고, 예를 들어, Gebauer 및 Skerra, *Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics*, *Curr Opin Chem Biol* 13:245-255 (2009) 및 Stumpp 외, *Darpins: A new generation of protein therapy*, *Drug Discovery Today* 13: 695-701 (2008)를 참고하라. 본 발명의 한 양상에서, 스캐폴드 항원 결합 단백질은 CTLA-4(에비바디), 리포칼린(안티칼린), 단백질 A의 Z-도메인과 같은 단백질 A 유래 분자(어피바디), A-도메인(아비머/맥시바디), 혈청 트랜스페린(트랜스-바디); 설계된 안키린 반복 단백질(DARPin), 항체 경쇄 또는 중쇄의 가변 도메인(단일 도메인 항체, sdAb), 항체 중쇄의 가변 도메인(나노바디, aVH), V_{NAR} 단편, 피브로넥틴(애드넥틴, AdNectin), C형 렉틴 도메인(테트라넥틴); 새로운 항원 수용체 베타-락타마제의 가변 도메인 (V_{NAR} 단편), 인간 감마-결정질 또는 유비퀸틴의 가변 도메인(어필린(Affilin) 분자); 인간 프로테아제 억제제의 쿠니츠 유형 도메인, 노틴 계열의 단백질과 같은 마이크로바디, 펩티드 앵타머 및 피브로넥틴(애드넥틴)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. CTLA-4(세포독성 T 림프구 관련 항원 4)는 주로 CD4⁺ T 세포에서 발현되는 CD28 계열 수용체이다. 그것의 세포의 도메인은 가변 도메인-유사 Ig 폴드를 갖는다. 항체의 CDR에 상응하는 루프는 상이한 결합 특성을 부여하기 위해 이중 서열로 치환될 수 있다. 상이한 결합 특이성을 갖도록 조작된 CTLA-4 분자는 에비바디(Evibodies)로도 알려져 있다(예를 들어, US7166697B1). 에비바디는 항체(예를 들어, 도메인 항체)의 단리된 가변 영역과 거의 동일한 크기이다. 자세한 내용은 *Journal of Immunological Methods* 248(1-2), 31-45(2001)를 참조하라. 리포칼린은 스테로이드, 빌린, 레티노이드 및 지질과 같은 작은 소수성 분자를 운반하는 세포외 단백질 계열이다. 이들은 다른 표적 항원에 결합하도록 조작될 수 있는 원추형 구조의 열린 말단에 다수의 루프가 있는 단단한 베타 시트 2차 구조를 가지고 있다. 안티칼린은 160~180개의 아미노산 크기로 리포칼린에서 유래한다. 자세한 내용은 *Biochim Biophys Acta* 1482: 337-350(2000), US7250297B1 및 US20070224633을 참조하라. 어피바디(affibody)는 항원에 결합하도록 조작될 수 있는 황색 포도구균의 단백질 A에서 파생된 스캐폴드이다. 이 도메인은 약 58개 아미노산의 3-나선 번들로 구성된다. 라이브러리는 표면 잔기들의 무작위배정에 의해 생성되었다. 자세한 내용은 *Protein Eng. Des. Sel.* 2004, 17, 455-462 및 EP 1641818A1을 참조하라. 아비머는 A-도메인 스캐폴드 계열에서 유래한 다중 도메인 단백질이다. 약 35개 아미노산의 고유 도메인은 정의된 이황화 결합 구조를 채택한다. 다양성은 A-도메인 계열이 나타내는 자연적 변이를 서플링함으로써 생성된다. 자세한 내용은 *Nature Biotechnology* 23(12), 1556 - 1561(2005) 및 *Expert Opinion on Investigational Drugs* 16(6), 909-917(2007년 6월)을 참조하라. 트랜스페린은 단량체 혈청 수송 당단백질이다. 트랜스페린은 허용 표면 루프에 펩티드 서열을 삽입하여 다른 표적 항원에 결합하도록 조작될 수 있다. 조작된 트랜스페린 스캐폴드의 예에는 트랜스-바디(Trans-body)가 포함된다. 자세한 내용은 *J. Biol. Chem* 274, 24066-24073(1999)를 참조하라. 설계된 안키린 반복 단백질(DARPin)은 세포골격에 대한 통합 막 단백질의 부착을 매개하는 단백질들의 계열인 안키린에서 파생된다. 단일 안키린 반복서열은 2개의 알파 나선과 베타 회전으로 구성된 33개 잔기 모티프이다. 이들은 첫 번째 알파 나선과 각 반복서열의 베타 회전에 있는 잔기들을 무작위화하여 다른 표적 항원들에 결합하도록 조작할 수 있다. 모듈의 수를 늘려 이들의 결합 경계면을 늘릴 수 있다(친화도 성숙 방법). 자세한 내용은 *J. Mol. Biol.* 332, 489-503 (2003), *PNAS* 100(4), 1700-1705 (2003) 및 *J. Mol. Biol.* 369, 1015-1028(2007) 및 US20040132028A1을 참조하라. 단일 도메인 항체는 단일 단량체 가변 항체 도메인으로 구성된 항체 단편이다. 첫 번째 단일 도메인은 낙타과 항체 중쇄의 가변 도메인(나노바디 또는 V_H 단편)에서 파생되었다. 또한, 단일 도메인 항체라는 용어는 자율 인간 중쇄 가변 도메인(aVH) 또는 상이로부터 유래된 V_{NAR} 단편을 포함한다. 피브로넥틴은 항원에 결합하도록 조작될 수 있는 스캐폴드이다. 애드넥틴은 인간 피브로넥틴 III형(FN3)의 15개 반복 단위 중 10번째 도메인의 천연 아미노산 서열의 백본으로 구성된다. 베타-샌드위치의 한쪽 끝에 있는 3개의 루프는 애드넥틴이 관심 치료 표적을 구체적으로 인식할 수 있도록 조작될 수 있다. 자세한 내용은 *Protein Eng. Des. Sel.* 18, 435-444 (2005), US20080139791, WO2005056764 및 US6818418B1을 참조하라. 펩티드 앵타머는 활성 부위에 삽입된 구속 가변 펩티드 루프를 포함하는 불변 스캐폴드 단백질, 일반적으로 티오레독신(TrxA)으로 구성된 조합형 인식 분자이다. 자세한 내용은 *Expert Opin. Biol. Ther.* 5, 783-797 (2005)을 참조하라. 마이크로바디는 3-4개의 시스테인 다리를 포함하는 25-50개 아미노산 길이의 자연 발생 마이크로단백질에서 파생된 다-마이크로단백질의 예로는 KalataBI 및 코노톡신 및 노트틴이 있다. 마이크로단백질은 마이크로단백질의 전체

폴딩에 영향을 미치지 않으면서 최대 25개의 아미노산을 포함하도록 조작될 수 있는 루프를 가지고 있다. 조작된 노트틴 도메인에 대한 보다 자세한 내용은 W02008098796을 참조하라.

- [0108] 참조 항체와 "**동일한 에피토프에 결합하는 항원 결합 분자**"는 경쟁 분석에서 참조 분자의 그 항원에 대한 결합을 50% 이상 차단하는 항원 결합 분자를 지칭하며, 반대로, 참조 분자는 경쟁 분석에서 이러한 항원 결합 분자의 그 항원에 대한 결합을 50% 이상 차단한다.
- [0109] 용어 "**항원 결합 도메인**"이란 용어는 항원의 일부 또는 전부에 특이적으로 결합하고 이에 상보성인 영역을 포함하는 항원 결합 분자의 부분을 지칭한다. 항원이 큰 경우, 항원 결합 분자는 오직 해당 항원의 특정 부분에만 결합할 수 있으며, 이러한 부분을 에피토프라 칭한다. 항원 결합 도메인은 예를 들어 하나 이상의 가변 도메인(또한 가변 영역이라 칭함)에 의해 제공될 수 있다. 바람직하게는, 항원 결합 도메인은 항체 경쇄 가변 도메인(VL) 및 항체 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함한다.
- [0110] 본원에 사용된 용어 "**항원 결정인자**"는 "항원" 및 "에피토프"와 동의어이며 항원 결합 모이어티가 결합하여, 항원 결합 모이어티-항원 복합체를 형성하는 폴리펩티드 거대분자 상의 부위(예를 들어, 아미노산의 연속 신장부(stretch) 또는 비인접 아미노산들의 상이한 영역들로 구성된 입체형태 구성)를 지칭한다. 유용한 항원 결정인자는 예를 들어 종양 세포의 표면, 바이러스에 감염된 세포의 표면, 다른 질환 세포의 표면, 면역 세포의 표면 상에서, 혈청내 및/또는 세포의 기질(ECM) 중에서 자유롭게 발견될 수 있다. 본원에서 항원으로서 유용한 단백질은 달리 지시가 없는 한, 임의의 척추동물 출처, 예를 들어 포유동물, 예를 들어 영장류(예를 들어 인간) 및 설치류(예를 들어 마우스 및 래트)로부터의 임의의 천연 형태의 단백질일 수 있다. 특정 실시형태에서 항원은 인간 단백질이다. 본원에서 특정 단백질을 지칭하는 경우, 이 용어는 "전장"의, 비가공 단백질, 뿐만 아니라 세포에서 가공된 임의의 형태의 단백질을 포함한다. 이 용어는 또한 단백질의 자연 발생 변이체, 예를 들어, 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포함한다.
- [0111] 용어 "**Her2에 특이적으로 결합할 수 있는**"은 항원 결합 분자가 Her2를 표적하는데 있어서 진단제 및/또는 치료제로서 유용하도록 하기에 충분한 친화도로 Her2에 결합할 수 있는 항원 결합 분자를 지칭한다. 항원 결합 분자는 항체, Fab 분자, 교차 Fab 분자, 단일 사슬 Fab 분자, Fv 분자, scFv 분자, 단일 도메인 항체, 및 VH 및 스캐폴드 항원 결합 단백질을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 한 양상에서, 항-Her2 항원 결합 분자의 관련 없는 비-Her2 단백질에 대한 결합 정도는, 예를 들어, 표면 플라즈몬 공명 (SPR)으로 측정하였을 때, 해당 항원 결합 분자가 Her2에 결합하는 것의 약 10% 미만이다. 특히, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 분자는 $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0.1 \text{ nM}$, $\leq 0.01 \text{ nM}$, 또는 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (예를 들어, 10^{-8} M 또는 그 미만, 예를 들어, 10^{-8} M 내지 10^{-13} M , 예를 들어, 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수 (K_D)를 갖는다. 특정 양상들에서, 항-Her2 항원 결합 분자는 상이한 종들의 Her2에 결합한다. 특히, 항-Her2 항원 결합 분자는 인간 및 사이노몰구스 Her2에 결합한다.
- [0112] 용어 "에피토프"는 항체가 결합하는 단백질성 또는 비단백질성 항원 상의 부위를 나타낸다. 에피토프는 인접한 아미노산 스트레치(선형 에피토프)로부터 형성될 수 있거나, 예를 들어 항원의 폴딩으로 인해, 즉 단백질성 항원의 3차 폴딩에 의해 공간적으로 근접하게 되는 비연속 아미노산(입체형 에피토프)을 포함할 수 있다. 선형 에피토프는 전형적으로 단백질성 항원이 변성제에 노출된 후에도 여전히 항체에 의해 결합되는 반면, 입체형 에피토프는 전형적으로 변성제로 처리시 파괴된다. 에피토프는 고유한 공간 형태에 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상 또는 8-10개 아미노산을 포함한다.
- [0113] "에피토프 4D5" 또는 "4D5 에피토프" 또는 "4D5"는 항체 4D5(ATCC CRL 10463) 및 트라스투주맵이 결합하는 HER2의 세포의 도메인 내의 영역이다. 이 에피토프는 HER2의 막관통 도메인에 가깝고 HER2의 도메인 IV 내에 존재한다. 4D5 에피토프에 결합하는 항체를 스크리닝하기 위해 *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow 및 David Lane(1988)에 설명된 바와 같이 일상적인 교차-차단 분석을 수행할 수 있다. 대안적으로, 항체가 HER2의 4D5 에피토프(예를 들어, 인간 HER2의 약 잔기 550 내지 약 잔기 610 영역 내(서열번호 54))의 임의의 하나 이상의 잔기에 결합하는지 여부를 평가하기 위해 에피토프 맵핑이 수행될 수 있다.
- [0114] "에피토프 2C4" 또는 "2C4 에피토프"는 항체 2C4가 결합하는 HER2의 세포의 도메인 내의 영역이다. 2C4 에피토프에 결합하는 항체를 스크리닝하기 위해 *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow 및 David Lane(1988)에 설명된 바와 같이 일상적인 교차-차단 분석을 수행할 수 있다. 대안적으로, 항체가 HER2의 2C4 에피토프의 임의의 하나 이상의 잔기에 결합하는지 여부를 평가하기 위해 에피토프 맵핑이

수행될 수 있다. 에피토프 2C4는 HER2의 세포외 도메인에 있는 도메인 II의 잔기를 포함한다. 2C4 항체 및 페르 투주맵은 도메인 I, II 및 III의 접합부에서 HER2의 세포외 도메인에 결합한다(Franklin 외, Cancer Cell 5:317-328 (2004)).

[0115] "**특이적 결합**"은 결합이 항원에 대해 선택적이고 원치 않는 또는 비특이적 상호작용과 구별될 수 있음을 의미한다. 특정한 항원에 결합하는 항원 결합 분자의 능력은 효소-결합된 면역흡착 분석(ELISA) 또는 당업자에게 친숙한 다른 기술, 예를 들어 표면 플라즈몬 공명(SPR) 기술 (Biacore 장비상에서 분석됨) (Liljeblad 등, Glyco J 17, 323-329 (2000)), 및 전통적인 결합 분석(Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002))을 통해 측정될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 관련되지 않은 단백질에 대한 항원 결합 분자의 결합 정도는 예를 들어, SPR에 의해 측정시 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합의 약 10% 미만이다. 특정 실시형태들에서, 항원에 결합하는 분자는 $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{ nM}$, $\leq 10\text{ nM}$, $\leq 1\text{ nM}$, $\leq 0.1\text{ nM}$, $\leq 0.01\text{ nM}$, 또는 $\leq 0.001\text{ nM}$ (예를 들어, 10^{-8} M 또는 그 미만, 예를 들어, 10^{-8} M 내지 10^{-13} M , 예를 들어, 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수 (K_D)를 갖는다.

[0116] "**친화도**" 또는 "결합 친화도"는 분자의 단일 결합 부위(예를 들어, 항체)와 이의 결합 짝(예를 들어, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 총 강도를 의미한다. 달리 표시되지 않은 한, 본원에 기재된 "결합 친화도"는 결합쌍(예를 들면, 항체 및 항원)의 구성원 간의 1:1 상호작용을 반영하는 고유 결합 친화도를 의미한다. 분자 X의 그 짝 Y에 대한 친화도는 일반적으로 해리 상수(K_D)로 나타낼 수 있으며, 이는 해리 및 결합속도 상수(각각 k_{off} 및 k_{on})의 비이다. 따라서, 균등한 친화도는 상기 속도 상수들의 비가 동일하게 유지되는 한 상이한 속도 상수를 포함할 수도 있다. 친화도는 본원에 기재된 것을 포함하여 해당 분야에 공지된 일반적인 방법에 의해 측정될 수 있다. 친화도의 특정한 측정 방법은 표면 플라즈몬 공명(SPR)이다.

[0117] 본원에 사용된 "**종양 관련 항원**" 또는 TAA는 표적 세포, 예를 들어, 종양내 세포, 예를 들어 암세포 또는 종양 기질의 세포의 표면에 제시되는 항원 결정인자를 지칭한다. 특정 양상들에서, 표적 세포 항원은 종양 세포의 표면 상의 항원이다. 한 특정 양상에서, TAA는 Her2이다.

[0118] "ErbB2", "ErbB2 수용체" 또는 "c-ErbB-2"로도 알려져 있는 용어 "**Her2**"는 세포에서 HER2 전구체 단백질의 처리로부터 생성되는 천연의 성숙 HER2를 지칭한다. 이 용어는 달리 지시가 없는 한, 영장류(예를 들어, 인간) 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트)와 같은 포유동물을 포함한 임의의 척추동물 출처의 HER2를 지칭한다. 이 용어는 또한 HER2의 자연 발생 변이체, 예를 들어, 스플라이스 변이체 또는 대립형질 변이체를 포함한다. 예시적인 인간 HER2 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 103에 제시되어 있다.

[0119] 용어 "**CD28**" (분화 클러스터 28, Tp44)은 달리 지시가 없는 한, 영장류(예를 들어 인간), 비인간 영장류(예를 들어 사이노몰구스 원숭이) 및 설치류(예를 들어 마우스 및 래트)와 같은 포유동물을 비롯한 임의의 척추동물 출처의 임의의 CD28 단백질을 지칭한다. CD28은 T 세포에서 발현되며 T 세포 활성화 및 생존에 필요한 공동 자극 신호를 제공한다. T 세포 수용체(TCR) 외에 CD28을 통한 T 세포 자극은 다양한 인터루킨 생산을 위한 강력한 신호를 제공할 수 있다. CD28은 CD80(B7.1) 및 CD86(B7.2) 단백질에 대한 수용체이며 나이브 T 세포에서 항시적으로 발현되는 유일한 B7 수용체이다. 인간 CD28의 아미노산 서열은 UniProt(www.uniprot.org) 수탁 번호 P10747에 제시되어 있다(서열번호 1).

[0120] "**작용성 항체**"는 주어진 수용체에 대한 작용성 기능을 포함하는 항체를 지칭한다. 일반적으로 수용체에 작용제 리간드(인자)가 결합하면 수용체 단백질의 3차 구조가 바뀌어 수용체가 활성화된다(수용체가 막 단백질인 경우에는 보통 세포 성장 신호 등이 전달된다). 수용체가 이량체를 형성하는 유형인 경우 작용성 항체는 수용체를 적절한 거리와 각도로 이량체화하여 리간드에 유사하게 작용할 수 있다. 적절한 항-수용체 항체는 리간드에 의해 수행되는 수용체들의 이량체화를 모방할 수 있으므로 작용성 항체가 될 수 있다.

[0121] "**CD28 작용성 항원 결합 분자**" 또는 "CD28 일반 작용성 항원 결합 분자"는 T 세포 수용체 신호("신호 2"의 존재시 T 세포 활성화를 향상시키기 위해 그 역할면에서 CD28 천연 리간드(CD80 또는 CD86)를 모방하는 항원 결합 분자이다. T 세포가 완전히 활성화되려면 두 가지 신호가 필요하다. 생리학적 조건 하에서 "신호 1"은 T 세포 수용체(TCR) 분자와 항원 제시 세포(APC) 상의 펩티드/주조직 적합성 복합체(MHC) 복합체들의 상호작용으로부터 발생하고 "신호 2"는 공동자극 수용체, 예를 들어, CD28의 결합에 의해 제공된다. CD28 작용성 항원 결합 분자는 T 세포를 공동자극할 수 있다(신호 2). 또한 이는 TCR 복합체에 대한 특이성을 가진 분자와 함께 T 세포 증식 및 사이토카인 분비를 유도할 수 있지만, CD28 작용성 항원 결합 분자는 TCR의 추가 자극 없이는 T 세포를 완전히 활성화할 수 없다. 그러나 CD28 특이적 항원 결합 분자의 하위분류, 소위 CD28 초작용성 항원 결합 분자

가 존재한다. "CD28 초작용성 항원 결합 분자"는 TCR의 추가 자극 없이 T 세포를 완전히 활성화할 수 있는 CD28 항원 결합 분자이다. CD28 초작용성 항원 결합 분자는 사전 T 세포 활성화(신호 1) 없이 T 세포 증식 및 사이토카인 분비를 유도할 수 있다.

- [0122] 본원에 사용된 "T 세포 항원"은 T 림프구, 특히 세포독성 T 림프구의 표면에 제시되는 항원 결정인자를 지칭한다.
- [0123] 본원에 사용된 "T 세포 활성화 치료제"는 대상체에서 T 세포 활성화를 유도할 수 있는 치료제, 특히 대상체에서 T 세포 활성화를 유도하도록 설계된 치료제를 지칭한다. T 세포 활성화 치료제의 예는 활성화 T 세포 항원, 예를 들어, CD3, 및 표적 세포 항원, 예를 들어, CFA 또는 염산 수용체에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체를 포함한다.
- [0124] 본원에 사용된 "활성화 T 세포 항원"은 T 림프구, 특히 세포독성 T 림프구에 의해 발현되는 항원 결정인자를 지칭하며, 이는 항원 결합 분자와 상호작용시 T 세포 활성화를 유도하거나 향상시킬 수 있다. 구체적으로, 항원 결합 분자와 활성화 T 세포 항원의 상호작용은 T 세포 수용체 복합체의 신호전달 캐스케이드를 촉발시킴으로써 T 세포 활성화를 유도할 수 있다. 예시적인 활성화 T 세포 항원은 CD3이다.
- [0125] 용어 "CD3"은 달리 지시가 없는 한, 영장류(예를 들어 인간), 비인간 영장류(예를 들어 사이노몰구스 원숭이) 및 설치류(예를 들어 마우스 및 래트)와 같은 포유동물을 비롯한 임의의 척추동물 출처의 임의의 천연 CD3을 지칭한다. 이 용어는 "전장"의, 비처리 CD3, 뿐만 아니라 세포에서 처리된 임의의 형태의 CD3를 포함한다. 이 용어는 또한 CD3의 자연 발생 변이체, 예를 들어, 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포함한다. 하나의 양태에서, CD3은 인간 CD3, 특히 인간 CD3의 입실론 서브유닛(CD3 ϵ)이다. 인간 CD3 ϵ 의 아미노산 서열은 UniProt (www.uniprot.org) 등록 번호 P07766 (버전 144), 또는 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_000724.1에 제시되어 있다. 또한 서열번호 188을 참조하라. 사이노몰구스 [마카카 파시쿨라리스(Macaca fascicularis)] CD3 ϵ 의 아미노산 서열은 UniProt (www.uniprot.org) 등록 번호 Q95LI5에 제시되어 있다. 또한 서열번호 189를 참조하라.
- [0126] "가변 도메인" 또는 "가변 영역"은 항원 결합 분자가 항원에 결합하는데 관여하는 항체 중쇄 또는 경쇄 도메인을 지칭한다. 천연 항체의 중쇄와 경쇄(차례로 V_H 및 V_L)의 가변 도메인은 일반적으로 유사한 구조를 가지며, 각 도메인은 4개의 보존된 프레임워크 영역(FRs)과 3개의 초가변 영역(HVR들)을 포함한다. 예를 들어, Kindt 외. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., 91 페이지 (2007)을 참조하라. 단일 V_H 또는 V_L 도메인은 항원 결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다.
- [0127] 본원에서 사용되는 용어 "초가변 영역" 또는 "HVR"은 서열에서 초가변적이고, 항원 결합 특이성을 결정하는 항원 결합 가변 도메인 영역들 각각, 예를 들면, "상보성 결정 영역들" ("CDR들")을 지칭한다. 일반적으로, 항원 결합 도메인들은 6개의 HVR: V_H에 3개(CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3), 및 V_L에 3개(CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3)를 포함한다. 본원에서 예시적인 CDR들은 다음을 포함한다:
- [0128] (a) 아미노산 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), 및 96-101 (H3)에서 나타나는 초가변 루프 (Chothia 및 Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987));
- [0129] (b) 아미노산 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2), 및 95-102 (H3)에서 나타나는 CDR (Kabat 등, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)); 및
- [0130] (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 외 *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)).
- [0131] 달리 지시되지 않는 한, CDR들은 상기 Kabat 외의 문헌에 따라 결정된다. 당업자는 CDR 표시가 또한 상기 Chothia, 상기 MacCallum의 문헌, 또는 임의의 다른 과학적으로 허용되는 명명법에 따라 결정될 수 있음을 이해할 것이다. Kabat 외, 또한 가변 영역 서열에 대한 넘버링 체계를 정의했으며, 이는 모든 항체에 적용할 수 있다. 당업자는 상기 "Kabat 넘버링" 체계를 해당 서열 자체에서 벗어난 임의의 실험 데이터에 의존하지 않고 임의의 가변 영역 서열에 명확하게 할당할 수 있다. 본원에서 사용되는 "넘버링"은 Kabat 등, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983)에 제시된 넘버링 체계를 지칭한다. 달리 명시되지 않는 한, 항체 가변 영역 내 특정한 아미노산 잔기 위치의 넘버링은 Kabat 넘버링 체계를 참조한다.

- [0132] 항원 결합 분자(예를 들어, 항체)와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "**친화도 성숙된**"은 참조 항원 결합 분자로부터, 예를 들어 돌연변이에 의해 유도되고, 참조 항체와 동일한 항원에 결합하고, 예를 들어, 동일한 에피토프에 결합하고; 항원에 대해 참조 항원 결합 분자 보다 높은 친화도를 가지는 항원 결합 분자를 지칭한다. 친화도 성숙은 일반적으로 항원 결합 분자의 하나 이상의 CDR에서 하나 이상의 아미노산 잔기의 변형을 포함한다. 전형적으로, 친화도 성숙된 항원 결합 분자는 초기 참조 항원 결합 분자와 동일한 에피토프에 결합한다.
- [0133] "**프레임워크**" 또는 "FR"은 초가변 영역 (HVR) 잔기들 이외의 가변 도메인 잔기를 지칭한다. 가변 도메인의 FR은 일반적으로 4개의 FR 도메인들로 구성된다: FR1, FR2, FR3, 및 FR4. 따라서, HVR 및 FR 서열들은 일반적으로 VH (또는 VL)에서 다음의 순서로 나타난다: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.
- [0134] 본원의 목적과 관련하여 "**수용체 인간 프레임워크**"는 하기 정의된 바와 같이, 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 공통 프레임워크로부터 유래된 경쇄 가변 도메인(VL) 프레임워크 또는 중쇄 가변 도메인(VH) 프레임워크의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크이다. 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 공통 프레임워크로부터 "유래된" 수용체 인간 프레임워크는 이의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 아미노산 서열 변화를 함유할 수 있다. 일부 실시형태들에서, 아미노산 변화의 수는 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하 또는 2개 이하이다. 일부 실시형태들에서, VL 수용체 인간 프레임워크는 VL 인간 면역글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 공통 프레임워크 서열과 서열이 동일하다.
- [0135] 용어 "**키메라**" 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 출처 또는 종들로부터 유래되는 반면, 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지는 상이한 출처 또는 종들로부터 유래되는 항체를 지칭한다.
- [0136] 항체의 "**분류(class)**"란 항체의 중쇄가 보유하는 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을 지칭한다. 항체에는 5가지 주요 분류가 있다: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM, 그리고 이들 중 몇몇은 하위분류(이소형), 예를 들어, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, 및 IgA₂로 더욱 세분될 수 있다. 상이한 면역글로불린 분류에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 차례로 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 불린다.
- [0137] "**인간화**" 항체는 비인간 HVR로부터의 아미노산 잔기 및 인간 FR로부터의 아미노산 잔기를 포함하는 키메라 항체를 지칭한다. 특정 실시형태들에 있어서, 인간화 항체는 실질적으로 최소한 하나의, 그리고 전형적으로 2개의 가변 도메인을 모두 포함하는데, 이때 HVR들 (가령, CDRs)의 모든 또는 실질적으로 모든 것은 비-인간 항체에 대응하며, FRs의 모든 또는 실질적으로 모든 것은 인간 항체의 것에 대응한다. 인간화 항체는 선택적으로 인간 항체로부터 유래된 항체 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 항체의 "**인간화 형태**", 예를 들어, 비-인간 항체는 인간화를 거친 항체를 지칭한다. 본 발명에 의해 포함되는 "인간화 항체"의 다른 형태는 불변 영역이 최초 항체의 불변 영역으로부터 추가로 변형되거나 또는 변화되어있어, 본 발명에 따른 성질, 특히 C1q 결합 및/또는 Fc 수용체(FcR) 결합에 관한 성질을 생성하는 것들이다.
- [0138] "**인간 항체**"는 인간 또는 인간 세포에 의해 생성되거나 인간 항체 레퍼토리 또는 다른 인간 항체-인코딩 서열을 이용하는 비-인간 출처로부터 유래된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 항체이다. 인간 항체의 정의에서 특히 비-인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체는 제외한다.
- [0139] 용어 "**CH1 도메인**"은 대략적으로 EU 위치 118로부터 EU 위치 215(Kabat에 따른 EU 넘버링 체계)에 이르는 항체 중쇄 폴리펩티드의 부분을 나타낸다. 한 양상에서, CH1 도메인은 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKVK(서열번호 104)의 아미노산 서열을 갖는다. 일반적으로 CH1 도메인을 힌지 영역에 연결하는 EPKSC(서열번호 107)의 아미노산 서열을 갖는 분절이 이어진다.
- [0140] 용어 "**힌지 영역**"은 야생형 항체 중쇄에서 CH1 도메인 및 CH2 도메인을 연결하는 항체 중쇄 폴리펩티드의 부분, 예를 들어 Kabat의 EU 넘버링 체계에 따라 약 위치 216으로부터 약 위치 230까지, 또는 Kabat의 EU 넘버링 체계에 따라 약 위치 226으로부터 약 위치 230까지를 나타낸다. 다른 IgG 하위분류의 힌지 영역은 IgG1 하위분류 서열의 힌지-영역 시스테인 잔기와 함께 정렬함으로써 결정될 수 있다. 힌지 영역은 일반적으로 동일한 아미노산 서열을 가진 두 개의 폴리펩티드로 구성된 이량체 분자이다. 힌지 영역은 일반적으로 최대 25개의 아미노산 잔기를 포함하고 유연하므로, 관련된 표적 결합 부위들이 독립적으로 움직일 수 있다. 힌지 영역은 상부, 중간 및 하부 힌지 도메인의 3개 도메인으로 세분될 수 있다(예를 들어, Roux, 외, J. Immunol. 161 (1998) 4083 참조).
- [0141] 한 양상에서, 힌지 영역은 아미노산 서열 DKTHTCPXCP (서열번호 108)를 가지며, 여기서 X는 S 또는 P이다. 한 양상에서, 힌지 영역은 아미노산 서열 HTCPCXCP(서열번호 109)를 갖고, 여기서 X는 S 또는 P이다. 한 양상에서,

힌지 영역은 아미노산 서열 CPXCP(서열번호 110)를 가지며, 여기서 X는 S 또는 P이다.

- [0142] 본원에서 용어 "**Fc 도메인**" 또는 "Fc 영역"은 불변 영역의 적어도 일부를 함유하는 항체 중쇄의 C-말단 영역을 정의하는데 사용된다. 상기 용어는 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함한다. IgG Fc 영역은 IgG CH2 및 IgG CH3 도메인을 포함한다.
- [0143] 인간 IgG Fc 영역의 "CH2 도메인"은 대개 약 EU 위치 231의 아미노산 잔기로부터 약 EU 위치 340(Kabat에 따른 EU 넘버링 시스템)의 아미노산 잔기에 이른다. 한 양상에서, CH2 도메인은 APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVWDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQESTYRW SVLTVLHQDW LNKKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAK(서열번호 105)의 아미노산 서열을 갖는다. CH2 도메인은 또 다른 도메인과 근접하게 페어링되지 않는다는 점에서 독특하다. 오히려, 2개의 N-연결된 분지형 탄수화물 사슬이 온전한 천연 Fc-영역의 2개의 C_H2 도메인 사이에 삽입된다. 탄수화물은 도메인-도메인 페어링에 대한 대체물을 제공하고 CH2 도메인을 안정화하는 데 도움이 될 수 있다고 추측되었다. Burton, Mol. Immunol. 22 (1985) 161-206. 한 실시형태에서, 탄수화물 사슬이 상기 CH2 도메인에 부착된다. 본원에서 상기 CH2 도메인은 천연 서열 CH2 도메인 또는 변형 CH2 도메인일 수 있다.
- [0144] "CH3 도메인"은 Fc 영역에서 CH2 도메인에 대한 C-말단 잔기의 스트레치를 포함하며 대략 EU 위치 341에서 EU 위치 446(Kabat에 따른 EU 넘버링 시스템)까지 연장되는 항체 중쇄 폴리펩티드의 일부를 나타낸다. 한 양상에서, CH3 도메인은 GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPG (서열번호 106)의 아미노산 서열을 갖는다. 본원에서 상기 CH3 영역은 천연 서열 CH3 도메인 또는 변형 CH3 도메인(예를 들어, 이의 하나의 사슬에 도입된 "돌기"("뿔") 및 이의 다른 사슬에 도입된 상응하는 "공동"("홀")을 갖는 CH3 도메인; 명시적으로 본원에 참고로 포함되는 US 5,821,333 참조) 일 수 있다. 이러한 변이체 CH3 도메인은 본원에 기재된 2개의 동일하지 않은 항체 중쇄의 이중이량체화를 촉진하기 위해 사용될 수 있다. 한 실시형태에서, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 Cys226, 또는 Pro230에서 중쇄의 카복실-말단까지 연장된다. 그러나, Fc 영역의 C-말단 리신(Lys447)은 존재하거나 존재하지 않을 수 있다. 명시적으로 다른 언급이 없는 한, Fc 영역 또는 불변 영역에서 아미노산 잔기의 넘버링은 EU 넘버링 체계, Kabat 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991에서 설명된 소위 EU 인덱스에 따른다.
- [0145] "**뿔-인투-홀**" 기술은 예를 들어 US 5,731,168; US 7,695,936; Ridgway 등, Prot Eng 9, 617-621 (1996) 및 Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001)에 기재되어 있다. 일반적으로, 상기 방법은 제1 폴리펩티드의 경계면에 돌기 ("뿔") 그리고 제2 폴리펩티드의 경계면에 이에 상응하는 구멍 ("홀")을 도입시켜 상기 돌기가 상기 구멍 안에 위치되게 함으로써 이형이량체 형성을 촉진시키고, 동형이량체 형성을 방해한다. 돌기 (Protuberances)는 제1 폴리펩티드의 경계면의 작은 아미노산 측쇄를 더 큰 측쇄 (가령, 티로신 또는 트립토판)로 대체함으로써 제작된다. 상기 돌기와 동일 또는 유사한 크기의 상보적 공동(cavities)은, 제2 폴리펩티드의 경계면에서 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 측쇄 (가령, 알라닌 또는 트레오닌)로 대체함으로써 생성된다. 상기 돌기 및 공동은 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을, 예를 들어, 부위-특이적 돌연변이유발에 의해, 또는 펩티드 합성에 의해 변경함으로써 생성될 수 있다. 특정 실시형태에서 뿔 변형은 Fc 도메인의 2개 하위유닛 중 하나에 아미노산 치환 T366W을 포함하고, 홀 변형은 Fc 도메인의 2개 하위유닛 중 다른 하나에 아미노산 치환 T366S, L368A 및 Y407V를 포함한다. 한 추가의 특정 실시형태에서, 뿔 변형을 포함하는 Fc 도메인의 하위유닛은 아미노산 치환 S354C를 추가로 포함하고, 홀 변형을 포함하는 Fc 도메인의 하위유닛은 아미노산 치환 Y349C를 추가로 포함한다. 이들 2개 시스템 잔기들의 도입은 Fc 영역의 상기 2개 서브유닛들 사이에 이황화물 가교를 형성시켜, 이러한 이량체를 더욱 안정화시킨다(Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).
- [0146] "면역글로불린의 Fc 영역과 균등한 영역"은 면역글로불린의 Fc 영역의 천연 대립유전자 변이체뿐만 아니라, 치환, 부가 또는 결실을 생성시키지만 효과기 기능(예를 들어 항체-의존적인 세포 세포독성)을 매개하는 상기 면역글로불린의 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 변형을 갖는 변이체를 포함하는 것으로 한다. 예를 들어, 하나 이상의 아미노산을 생물학적 기능을 실질적으로 소실하지 않고 면역글로불린의 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단으로부터 결실시킬 수 있다. 이러한 변이체들은 활성에 대해 최소의 영향을 미치도록 해당 분야에 공지된 일반적인 법칙에 따라 선택될 수 있다(예를 들어, Bowie, J. U. 등, Science 247:1306-10 (1990) 참조).
- [0147] "**야생형 Fc 도메인**"이라는 용어는 자연에서 발견되는 Fc 도메인의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 의미한다. 야생형 인간 Fc 도메인은 천연 인간 IgG1 Fc-영역(비-A 및 A 동종형), 천연 인간 IgG2 Fc-영역, 천연 인간 IgG3 Fc-영역 및 천연 인간 IgG4 Fc-영역 및 이의 자연 발생 변이체를 포함한다. 야생형 Fc-영역은 서열번호 111(IgG1, 백인 동종형), 서열번호 112(IgG1, 아프리카계 미국인 동종형), 서열번호 113(IgG2), 서열번호

114(IgG3), 및 서열번호 115(IgG4)에 나타낸다.

- [0148] 용어 "**변이체(인간) Fc 도메인**"은 적어도 하나의 "아미노산 돌연변이"로 인해 "야생형"(인간) Fc 도메인 아미노산 서열의 아미노산 서열과 상이한 아미노산 서열을 나타낸다. 한 양상에서, 변이체 Fc-영역은 천연 Fc-영역과 비교하여 적어도 하나의 아미노산 돌연변이, 예를 들어 약 1 내지 약 10개의 아미노산 돌연변이를, 그리고 한 양상에서 천연 Fc 영역에 약 1 내지 약 5개의 아미노산 돌연변이를 갖는다. 한 양상에서, (변이체) Fc-영역은 야생형 Fc-영역과 적어도 약 95%의 상동성을 갖는다.
- [0149] 용어 "**효과기 기능**"은 항체의 Fc 영역에 기인하는 생물학적 활성을 지칭하며, 이는 항체 이소형에 따라 달라진다. 항체 효과기 기능들의 예에는 다음이 포함된다: Clq 결합 및 보체 의존적인 세포독성(CDC), Fc 수용체 결합, 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC), 항체-의존성 세포 식균작용(ADCP), 사이토카인 분비, 항원 제공 세포에 의한 면역 복합체-매개된 항원 흡수, 세포 표면 수용체(예를 들어 B 세포 수용체)의 하향조절, 및 B 세포 활성화.
- [0150] Fc 수용체 결합 의존적 효과기 기능은 항체의 Fc-영역과 조혈 세포 상의 특수화된 세포 표면 수용체인 Fc 수용체(FcR)들의 상호작용에 의해 매개될 수 있다. Fc 수용체는 면역글로불린 슈퍼패밀리에 속하며, 면역 복합체의 식균 작용에 의한 항체-코팅 병원체의 제거와 적혈구 및 상응하는 항체로 코팅된 다양한 다른 세포 표적(예를 들어, 종양 세포)의 용해 모두를 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC)을 통해 매개하는 것으로 나타났다(예를 들어, Van de Winkel, JG 및 Anderson, CL, J. Leukoc. Biol. 49 (1991) 511-524 참조). FcR은 면역글로불린 이소형에 대한 다음과 같은 그 특이성에 의해 정의된다: IgG 항체에 대한 Fc 수용체는 Fc γ R로 지칭된다. Fc 수용체 결합은 예를 들어 Ravetch, J.V. and Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492, Capel, P.J., 외, Immunomethods 4 (1994) 25-34; de Haas, M., 외, J. Lab. Clin. Med. 126 (1995) 330-341; 및 Gessner, J.E., 외, Ann. Hematol. 76 (1998) 231-248에 기재되어 있다.
- [0151] IgG 항체(Fc γ R)의 Fc 영역에 대한 수용체의 가교결합은 식균 작용, 항체 의존성 세포 독성, 염증 매개체 방출, 면역 복합체 제거 및 항체 생성 조절을 비롯한 다양한 효과기 기능을 촉발한다. 인간에서 다음과 같은 세 가지 Fc γ R 분류가 특성화되었다:
- [0152] - Fc γ RI(CD64)는 단량체 IgG에 높은 친화도로 결합하여 대식세포, 단핵구, 호중구, 및 호산구에서 발견된다. Fc-영역 IgG에서 아미노산 잔기 E233-G236, P238, D265, N297, A327 및 P329(Kabat의 EU 인덱스에 따른 넘버링) 중 적어도 하나에서의 변형은 Fc γ RI에 대한 결합을 감소시킨다. 위치 233-236의 IgG2 잔기는 IgG1 및 IgG4로 치환되어 Fc γ RI에 대한 결합을 10³배 감소시키고 항체에 민감한 적혈구에 대한 인간 단핵구 반응을 제거했다(Armour, KL, 외, Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2613-2624).
- [0153] - Fc γ RII(CD32)는 복합체 IgG에 중간 내지 낮은 친화도로 결합하며 널리 발견된다. 이 수용체는 Fc γ RIIA 및 Fc γ RIIB의 두 가지 하위 유형으로 나눌 수 있다. Fc γ RIIA는 사멸에 관여하는 많은 세포(예를 들어, 대식세포, 단핵구, 호중구)에서 발견되며 사멸 과정을 활성화할 수 있는 것으로 보인다. Fc γ RIIB는 억제 과정에서 역할을 하는 것으로 보이며 B 세포, 대식세포, 비만 세포 및 호산구에서 발견된다. B 세포에서는 추가 면역글로불린 생성 그리고, 예를 들어 IgE 분류로의 이소형 전환을 억제하는 기능을 하는 것으로 보인다. 대식세포에서 Fc γ RIIB는 Fc γ RIIA를 통해 매개되는 식균작용을 억제하는 작용을 한다. 호산구 및 비만 세포에서 B형은 IgE가 별도의 수용체에 결합하여 이들 세포들의 활성화를 억제하는 데 도움이 될 수 있다. Fc γ RIIA에 대한 감소된 결합은 예를 들어 아미노산 잔기 E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, R292 및 K414 중 적어도 하나에 돌연변이가 있는 IgG Fc-영역을 포함하는 항체에서 발견된다 (Kabat의 EU 인덱스에 따른 넘버링).
- [0154] - Fc γ RIII(CD16)은 중 내지 저 친화도로 IgG에 결합하며 2가지 유형으로 존재한다. Fc γ RIIIA는 NK 세포, 대식세포, 호산구 및 일부 단핵구 및 T 세포에서 발견되며 ADCC를 매개한다. Fc γ RIIIB는 호중구에서 고도로 발견된다. Fc γ RIIIA에 대한 결합 감소는 예를 들어 아미노산 잔기 E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, S239, E269, E293, Y296, V303, A327, K338 및 D376(Kabat의 EU 인덱스에 따른 넘버링) 중 적어도 하나에 돌연변이가 있는 IgG Fc-영역을 포함하는 항체에서 발견된다.
- [0155] Fc 수용체에 대한 인간 IgG1의 결합 부위 맵핑, 위에서 언급한 돌연변이 부위 및 Fc γ RI 및 Fc γ RIIA에 대한 결합을 측정하는 방법은 Shields, R.L., 외, J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604에 기재되어 있다.
- [0156] 용어 "**ADCC**" 또는 "항체-의존성 세포독성"은 면역 효과기 세포에 의한 항체-코팅된 표적 세포의 용해를 유도하는 면역 메커니즘이다. 표적 세포는 일반적으로 Fc 영역의 N-말단인 단백질 부분을 통해 Fc 영역을 포함하는 항

체 또는 이의 유도체가 특이적으로 결합하는 세포이다. 본원에 사용된 용어 "감소된 ADCC"는, 상기 정의된 ADCC의 메커니즘에 의해 표적 세포를 둘러싸고 있는 배지에서 주어진 항체 농도에서 주어진 시간에 용해되는 표적 세포 수의 감소, 및/또는 ADCC의 메커니즘에 의해 주어진 시간에 주어진 수의 표적 세포의 용해를 달성하는 데 필요한 표적 세포를 둘러싼 배지에서 항체 농도의 증가로 정의된다. ADCC의 감소는 동일한 표준 생산, 정제, 제형 및 저장 방법(이는 당업자에게 공지됨)을 사용하여 동일한 유형의 숙주 세포에 의해 생성되었으나 조작되지 않은 동일한 항체에 의해 매개되는 ADCC에 비해 상대적이다. 예를 들어, ADCC를 감소시키는 아미노산 치환을 Fc 도메인에 포함하는 항체에 의해 매개되는 ADCC의 감소는 Fc 도메인에서 이러한 아미노산 치환이 없는 동일한 항체에 의해 매개되는 ADCC에 비해 상대적이다. ADCC를 측정하기에 적합한 분석법은 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, PCT 공개 번호 WO 2006/082515 또는 PCT 공개 번호 WO 2012/130831 참조). 예를 들어, ADCC를 매개하는 초기 단계를 유도하는 항체의 능력은 Fc γ RI 및/또는 Fc γ RIIA를 재조합적으로 발현하는 세포 또는 NK 세포(본질적으로 Fc γ RIIIA를 발현함)와 같은 Fc γ 수용체 발현 세포에 대한 이들의 결합을 측정함으로써 조사된다. 특히, NK 세포 상의 Fc γ R에 대한 결합이 측정된다.

[0157] "활성화 Fc 수용체"는 항체의 Fc 영역에 의한 결합 후 효과기 기능을 수행하도록 수용체-보유 세포를 자극하는 신호전달 이벤트를 유도하는 Fc 수용체이다. 활성화 Fc 수용체는 Fc γ RIIIa (CD16a), Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIa (CD32), 및 Fc α RI (CD89)를 포함한다. 특정한 활성화 Fc 수용체는 인간 Fc γ RIIIa이다 (UniProt 수탁 번호 P08637, 버전 141).

[0158] "엑토도메인"은 세포의 공간(즉 표적 세포 외부의 공간)내로 연장되는 막 단백질의 도메인이다. 엑토도메인은 대개 표면과의 접촉을 개시시켜 신호전달을 유도하는 단백질의 부분이다.

[0159] 용어 "펩티드 링커"는 하나 이상의 아미노산, 전형적으로 약 2 내지 20개 아미노산을 포함하는 펩티드를 지칭한다. 펩티드 링커는 해당 분야에 공지이거나 본원에 기재된 바와 같다. 적합한 비면역원성 링커 펩티드는, 예를 들어, (G₄S)_n, (SG₄)_n 또는 G₄(SG₄)_n 펩티드 링커 (이때 "n"은 일반적으로 1 내지 5, 전형적으로 2 내지 4, 특히, 2임), 즉, GGGGS(서열번호 117) GGGSGGGGS(서열번호 118), SGGGSGGGG(서열번호 119) 및 GGGSGGGSGGGG(서열번호 120)로 이루어진 군으로부터 선택된 펩티드이고, 또한 서열들 GSPGSSSSGS (서열번호 121), (G₄S)₃ (서열번호 122), (G₄S)₄ (서열번호 123), GSGSGSGS (서열번호 124), GSGSGNGS (서열번호 125), GSGSGSGS (서열번호 126), GSGSGS (서열번호 127), GSGS (서열번호 128), GSGSGNGS (서열번호 129), GGNGSGSG (서열번호 130) 및 GGNGSG (서열번호 131)를 포함한다. 특히 관심대상인 펩티드 링커는 (G₄S)(서열번호 117), (G₄S)₂ 또는 GGGSGGGGS(서열번호 118), (G₄S)₃(서열번호 122) 및 (G₄S)₄(서열번호 123)이다.

[0160] 본원에서 사용되는 용어 "아미노산"은 알라닌(3문자 코드: ala, 1문자 코드: A), 아르기닌(arg, R), 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 천연 카르복시 α -아미노산의 그룹을 나타낸다.

[0161] "융합된" 또는 "연결된"은 성분들(예를 들어 폴리펩티드 및 상기 TNF 리간드 패밀리 구성원의 엑토도메인)이 펩티드 결합에 의해, 직접적으로 또는 하나 이상의 펩티드 링커를 통해 결합됨을 의미한다.

[0162] 참조 폴리펩티드 (단백질) 서열에 대한 "아미노산 서열 동일성 퍼센트(%)"는, 서열들을 정렬하고 필요에 따라 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해 갭을 도입한 후 참조 폴리펩티드 서열의 아미노산 잔기들과 동일한, 후보 서열의 아미노산 잔기들의 백분율로 정의되며, 보존적 치환은 서열 동일성의 일부로 고려하지 않는다. 아미노산 서열 동일성 퍼센트를 결정하기 위한 정렬은 해당 분야의 기술 범위에 속하는 다양한 방식으로, 예를 들어, BLAST, BLAST-2, ALIGN, SAWI 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 이루어질 수 있다. 당업자는 비교되는 서열들의 전체 길이에 걸쳐 최대 정렬을 구현하는 데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여 서열들을 정렬하기 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적을 위해, 아미노산 서열 동일성 % 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 생성된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 Genentech, Inc.에서 제작되었으며 소스 코드는 미국 워싱턴 D.C., 20559에 소재한 미국 저작권청에 사용자 문서와 함께 제출되었으며, 미국 저작권 등록 번호 TXU510087로 등록되었다. ALIGN-2 프로그램은 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코에 소재한 Genentech, Inc.사로부터 공개적으로 이용가능하거나 소스 코드로부터 컴파일될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 디지털 UNIX V4.0D를 포함한 UNIX 운영 체제에서 사용되도록 컴파일해야 한다. 모든 서열 비교 매개변수는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되며 변경되지 않는다.

다. ALIGN-2가 아미노산 서열 비교에 사용되는 경우에, 소정의 아미노산 서열 B에 대한, 이것과, 또는 이에 대한 소정의 아미노산 서열 A의 % 아미노산 서열 동일성(대안적으로 소정의 아미노산 서열 B에 대한, 이것과, 또는 이에 대한 소정의 % 아미노산 서열 동일성을 갖거나 포함하는 소정의 아미노산 서열 A로서 표현될 수 있음)은 아래와 같이 계산된다: $100 \times \frac{X}{Y}$ 이 때 X는 A와 B의 해당 프로그램 정렬에서 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의해 동일한 매칭으로서 점수화된 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B의 총 아미노산 잔기 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우, B에 대한 A의 아미노산 서열 동일성 %는 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일성 %와 동일하지 않을 것임이 이해될 것이다. 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 아미노산 서열 동일성 % 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 사용하여 바로 앞 단락에 기재된 바와 같이 얻는다.

[0163] 특정 양태에서, 본원에 제시된 CD28 항원 결합 분자의 아미노산 서열 변이체가 고려된다. 예를 들면, CD28 항원 결합 분자의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 성질들을 개선하는 것이 바람직할 수 있다. CD28 항원 결합 분자의 아미노산 서열 변이체를, 이러한 분자를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 적합한 변형을 도입시키거나, 또는 펩티드 합성에 의해 제조할 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들면, 항체의 아미노산 서열 내의 잔기의 결실, 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 최종 구조체가 원하는 특성, 예를 들어, 항원 결합을 보유하는 한, 최종 구조체에 도달하기 위한 어떠한 결실, 삽입 및 치환의 조합이라도 이루어질 수 있다. 치환 돌연변이유발에 대한 관심 부위는 HVR 및 프레임워크(FR)를 포함한다. 보존적 치환을 표 A에서 "바람직한 치환"이라는 제목하에 제시하며 아미노산 측쇄 분류 (1) 내지 (6)을 참조하여 하기에 상세히 기재한다. 아미노산 치환을 관심 분자에 도입하고 원하는 활성, 예를 들어 유지/개선 항원 결합, 감소된 면역원성, 또는 개선된 ADCC 또는 CDC에 대해 생성물을 스크리닝할 수 있다.

[0164] 표 A

최초 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

[0165]

- [0166] 아미노산은 다음과 같이 공통적인 측쇄 성질들에 따라 그룹화될 수 있다:
- [0167] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- [0168] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- [0169] (3) 산성: Asp, Glu;
- [0170] (4) 염기성: His, Lys, Arg;
- [0171] (5) 측쇄 방향에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro;
- [0172] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.
- [0173] 비-보존적 치환은 이들 분류들 중 하나의 구성원을 또 다른 분류로 바꾸게 될 것이다.
- [0174] 용어 "**아미노산 서열 변이체**"는 모체 항원 결합 분자(예를 들어, 인간화 또는 인간 항체)의 하나 이상의 추가변 영역 잔기들에 아미노산 치환이 존재하는 실질적인 변이체를 포함한다. 일반적으로, 추가 연구를 위하여 선별된 생성된 변이체(들)은 모체 항원 결합 분자와 비교하였을 때, 특정 생물학적 성질들 (예를 들어, 증가된 친화도, 감소된 면역원성)의 변형(예를 들어, 개선)을 가지거나 및/또는 모체 항원결합 분자의 특정 생물학적 성질들을 실질적으로 보유할 것이다. 예시적인 치환 변이체는 친화도 성숙 항체이며, 이는 예를 들어 본원에 기재된 것과 같은 파지 디스플레이 기반 친화도 성숙 기술을 사용하여 편리하게 생성될 수 있다. 간단히 말해서, 하나 이상의 HVR 잔기를 돌연변이시키고 변이체 항원 결합 분자가 파지 상에 제시되고 특정 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화도)에 대해 스크리닝된다. 특정 예들에 있어서, 치환, 삽입, 또는 결실은 이러한 변경으로 이 항원 결합 분자가 항원에 결합하는 능력이 실질적으로 감소되지 않는 한, 하나 또는 그 이상의 HVR들에서 나타날 수 있다. 예를 들어, 결합 친화도를 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경(예를 들어, 본원에 제공된 보존적 치환)이 HVR에서 이루어질 수 있다. 돌연변이유발을 위해 표적화될 수 있는 항체의 잔기 또는 영역을 식별하는데 유용한 방법은 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"로 지칭되며, Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085에 기재되어 있다. 이 방법에서, 표적 잔기 또는 표적 잔기들의 그룹 (예를 들어, 하전된 잔기, 가령 Arg, Asp, His, Lys, 및 Glu)이 식별되고, 중성 또는 음 전하 아미노산 (예를 들어, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체되어, 항원과 항체의 상호작용이 영향을 받았는지를 판단한다. 초기 치환에 대한 기능적 민감성을 나타내는 아미노산 위치에 추가 치환이 도입될 수 있다. 대안으로, 또는 추가로, 항원-항원 결합 분자 복합체의 결정 구조를 이용하여 항체와 항원 간의 접촉점을 식별한다. 이러한 접촉 잔기와 이웃 잔기는 치환의 후보로서 표적되거나, 또는 제거될 수 있다. 변이체들이 원하는 성질을 포함하는지 여부를 결정하기 위해 이들을 스크리닝할 수 있다.
- [0175] 아미노산 서열 삽입은 1개 잔기 내지 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드에 이르는 길이 범위의 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합, 뿐만 아니라 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 삽입의 예는 CD28 항원 결합 분자의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드에 대한 N- 또는 C-말단에 융합된 CD28 항원 결합 분자를 포함한다.
- [0176] 특정 실시형태들에서, 본원에 제공된 CD28 항원 결합 분자는 이 항체가 당화되는 정도를 증가 또는 감소시키기 위하여 변경된다. 상기 분자의 당화 변이체는 편의상, 하나 이상의 당화 부위가 생성되거나 제거되도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 수득될 수 있다. 작용제 CD28 항원 결합 분자가 Fc 도메인을 포함하는 경우, 거기에 부착된 탄수화물은 변경될 수 있다. 포유동물 세포들에 의해 만들어지는 천연 항체는 Fc 영역의 CH2 도메인의 Asn297에 N-연결부에 의해 일반적으로 부착된 분지화된, 이촉각성(biantennary) 올리고사카라이드를 전형적으로 포함한다. 예를 들어, Wright 외 *TIBTECH* 15:26-32 (1997) 참조. 상기 올리고사카라이드는 다양한 탄수화물, 예로써, 만노스, N-아세틸 글루코사민 (GlcNAc), 갈락토스, 및 시알산, 뿐만 아니라 상기 바이안테너리 올리고사카라이드 구조의 "스텝(stem)"에 GlcNAc에 부착된 푸코스를 포함할 수 있다. 일부 실시형태들에서, 특정 개선된 특성을 갖는 변이체를 생성하기 위해 작용성 ICOS-결합 분자에서 올리고당의 변형이 이루어질 수 있다. 한 양상에서, Fc 영역에 (직접적으로 또는 간접적으로) 부착된 푸코스가 없는 탄수화물 구조를 갖는 작용성 CD28-결합 분자의 변이체가 제공된다. 이러한 같은 푸코실화 변이체는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다, 예를 들어, US 특허 공개 공보 US 2003/0157108 (Presta, L.) 또는 US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)를 참조하라. 본 발명의 CD28 항원 결합 분자의 추가 변이체는 양분되어 있는 올리고당, 예를 들어, Fc 영역에 부착된 이촉각성 올리고당이 GlcNAc에 의해 양분되어 있는 것들을 포함한다. 이러한 항체 변이체는 감소된 푸코실화 및/또는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다, 예를 들어 WO 2003/011878 (Jean-Mairet 외.); US 특허 제 6,602,684

호 (Umana 외.); 및 US 2005/0123546 (Umana 외.)를 참조하라. Fc 영역에 부착된 올리고당에 최소한 한 개의 갈락토스 잔기를 가진 변이체들 또한 제공된다. 이러한 항체 변이체들은 개선된 CDC 기능을 가질 수 있으며, 예로써, WO 1997/30087 (Patel 외.); WO 1998/58964 (Raju, S.); 그리고 WO 1999/22764 (Raju, S.)에서 설명되어 있다.

[0177] 특정 양상에서, 본 발명의 CD28 항원 결합 분자의 시스템인 조작된 변이체, 예를 들어, 이러한 분자의 하나 이상의 잔기가 시스템인 잔기로 치환된 "티오Mab"를 생성하는 것이 바람직할 수 있다. 특정 실시형태에서, 상기 치환된 잔기는 분자의 접근가능한 부위에서 나타난다. 이들 잔기를 시스템인으로 치환함으로써, 반응성 티올기는 이러한 항체의 접근가능한 부위에 위치하게 되고, 다른 모이어티, 예를 들어, 약물 모이어티 또는 링커-약물 모이어티에 이 항체가 접합되어 면역접합체가 생성될 수 있다. 특정 실시형태들에 있어서, 다음과 같은 임의의 하나 또는 그 이상의 잔기는 시스템인으로 치환될 수 있다: 경쇄의 V205 (Kabat 넘버링); 중쇄의 A118 (EU 넘버링); 그리고 중쇄 Fc 영역의 S400 (EU 넘버링). 시스템인 조작된 항원 결합 분자는 예를 들면, 미국 특허 제 7,521,541에서 설명된 것과 같이 생성될 수 있다.

[0178] 특정 양상들에 있어서, 본 발명에서 제공되는 CD28 항원 결합 분자는 해당 분야에 공지되어 있고, 쉽게 입수할 수 있는 추가의 비단백질성 모이어티를 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 상기 항체의 유도체화에 적합한 모이어티들은 수용성 중합체들을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 수용성 중합체들의 비-제한적 예들에는, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1, 3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트라이옥세인, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산(동중중합체 또는 무작위 공중합체), 및 텍스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 동중중합체, 폴리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올(예를 들어, 글리세롤), 폴리비닐 알콜, 및 이의 혼합물이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데하이드는 물에서의 안정성으로 인하여 제조에 있어 장점을 가질 수 있다. 중합체는 임의의 분자량일 수 있고, 분지형 또는 비-분지형일 수 있다. 항체에 부착된 중합체의 수는 다양할 수 있으며, 하나 이상의 중합체가 부착되는 경우, 이들은 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 이용된 중합체의 수 및/또는 유형은 개선되는 항체의 특정 성질들 또는 기능들, 상기 이중특이적 항체 유도체가 특정 조건하에서 치료에 이용되는지의 여부를 포함하는 고려사항들에 근거하여 결정될 수 있다. 또 다른 양상에서, 방사선에 노출시켜 선별적으로 가열될 수 있는 항체와 비단백질성 모이어티의 접합체들이 제공된다. 한 실시형태에서, 상기 비단백질성 모이어티는 탄소 나노튜브다 (Kam, N.W. 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605). 방사능은 임의의 과장일 수 있으며, 정상 세포들에게 해를 주지 않지만, 그러나 상기 항체-비단백질성 모이어티에 근접한 세포들은 사멸되는 온도에서 비단백질성 모이어티에 열을 가하는 과장이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또 다른 양상에서, 본원에 제공된 CD28 항원 결합 분자들의 면역접합체가 수득될 수 있다. "면역접합체"는 세포독성제를 비롯한 그러나 이에 제한되지 않는 하나 이상의 이중 분자(들)에 접합된 항체이다.

[0179] 용어 "폴리뉴클레오티드"는 단리된 핵산 분자 또는 구조체, 예를 들어, 전령 RNA(mRNA), 바이러스 유래 RNA, 또는 플라스미드 DNA(pDNA)를 지칭한다. 폴리뉴클레오티드는 통상적인 포스포디에스테르 결합 또는 통상적이지 않은 결합(예를 들어, 펩티드 핵산(PNA)에서 발견되는 것과 같은 아미드 결합)을 포함할 수 있다. 용어 "핵산 분자"는 폴리뉴클레오티드에 존재하는 임의의 하나 이상의 핵산 단편, 예를 들어, DNA 또는 RNA 단편을 지칭한다. 각 뉴클레오티드는 염기, 특히 퓨린- 또는 피리미딘 염기 (즉, 시토신 (C), 구아닌 (G), 아데닌 (A), 티민 (T) 또는 우라실 (U)), 당 (즉, 데옥시리보스 또는 리보스) 및 포스페이트 기로 구성된다. 종종, 핵산 분자는 염기 서열로 기재되며, 이 염기는 핵산 분자의 1차 구조 (선형 구조)를 나타낸다. 염기들의 서열은 일반적으로 5'으로부터 3'으로 제시된다. 본원에서, 용어 핵산 분자는, 예를 들어, 상보적 DNA (cDNA) 및 게놈 DNA를 비롯한 데옥시리보핵산 (DNA), 리보핵산 (RNA), 특히, 전령 RNA (mRNA), DNA 또는 RNA의 합성 형태들, 그리고 둘 이상의 이러한 분자들을 포함하는 혼합 중합체를 포함한다. 핵산 분자는 선형 또는 원형일 수 있다. 또한, 핵산 분자라는 용어는 센스 및 안티센스 가닥 모두, 뿐만 아니라 단일 가닥 및 이중 가닥 형태를 포함한다. 더욱이, 본원에 기재된 핵산 분자는 자연 발생 또는 비-자연 발생 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 비-자연 발생 뉴클레오티드의 예에는 유도된 당 또는 포스페이트 골격 연결부 또는 화학적으로 변형된 잔기가 있는 변형된 뉴클레오티드 염기가 포함된다. 핵산 분자는 또한, 시험관내에서 및/또는 생체내에서, 예를 들면, 숙주 또는 환자에서 본원 발명의 항체의 직접적인 발현을 위한 벡터로서 적합한 DNA와 RNA 분자를 포괄한다. 이러한 DNA (예를 들어, cDNA) 또는 RNA (예를 들어, mRNA) 벡터는 비변형 또는 변형될 수 있다. 예를 들면, mRNA는 RNA 벡터의 안정성 및/또는 인코딩된 분자의 발현을 개선하기 위하여 화학적으로 변형될 수 있으며, 이러한 mRNA는 대상체에 주사되어 생체내에서 항체를 생성할 수 있다 (예를 들어, Stadler 외, (2017) Nature Medicine 23:815-817 또는 EP

2 101 823 B1 참고).

- [0180] "단리된" 핵산 분자 또는 폴리뉴클레오티드는 그 천연 환경으로부터 제거된 핵산 분자, DNA 또는 RNA를 의미한다. 예를 들어, 본 발명의 목적을 위해 단리된, 벡터에 함유된 폴리펩티드를 인코딩하는 재조합 폴리뉴클레오티드가 고려된다. 또 다른 단리된 폴리뉴클레오티드의 예는 이중 숙주 세포에서 유지되는 재조합 폴리뉴클레오티드 또는 용액 중의 (부분적으로 또는 실질적으로) 정제된 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 단리된 폴리뉴클레오티드는 폴리뉴클레오티드 분자를 보통 포함하는 세포 안에 있는 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하지만, 상기 폴리뉴클레오티드 분자는 자연 염색체 위치와는 상이한 염색체 위치에 존재하거나 또는 염색체 외부에 존재한다. 단리된 RNA 분자는 본 발명의 생체내 또는 시험관내 RNA 전사물, 뿐만 아니라 양성 및 음성 가닥 형태, 및 이중-가닥 형태를 포함한다. 본 발명에 따른 단리된 폴리뉴클레오티드 또는 핵산은 합성적으로 생성된 상기와 같은 분자를 추가로 포함한다. 또한, 폴리뉴클레오티드 또는 핵산은 프로모터, 리보솜 결합 부위 또는 전사 종결인자와 같은 조절 요소 일 수 있고 또는 이를 포함할 수 있다.
- [0181] 본 발명의 참조 뉴클레오티드 서열에 적어도, 예를 들어 95% "동일한" 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산 또는 폴리뉴클레오티드는 상기 참조 뉴클레오티드 서열의 각 100개 뉴클레오티드당 최대 5개의 점 돌연변이를 포함할 수 있음을 제외하고 상기 폴리뉴클레오티드 서열이 상기 참조 서열과 동일함을 의미한다. 즉, 참조 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 95% 동일한 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 획득하기 위해서, 상기 참조 서열 중 뉴클레오티드의 5% 이하를 결실시키거나 또는 또 다른 뉴클레오티드로 치환하거나, 상기 참조 서열의 전체 뉴클레오티드의 최대 5%의 수의 뉴클레오티드를 상기 참조 서열에 삽입할 수 있다. 상기 참조 서열의 이러한 변경은 상기 참조 서열 내 잔기들 간에 개별적으로 또는 상기 참조 서열 내 하나 이상의 인접 그룹들 중에 산재된, 상기 참조 뉴클레오티드 서열의 5' 또는 3' 말단 위치 또는 상기 말단 위치들 사이의 어디에서나 발생할 수 있다. 실제 문제로서, 임의의 특정한 폴리뉴클레오티드 서열이 본 발명의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한지 여부는 통상적으로 공지된 컴퓨터 프로그램, 예를 들어, 폴리펩티드에 대해 상기 논의된 것들(예를 들어 ALIGN-2)을 사용하여 측정할 수 있다.
- [0182] 용어 "**발현 카세트**"는 표적 세포에서 특정 핵산의 전사를 허용하는 일련의 명시된 핵산 요소와 함께 재조합적으로 또는 합성적으로 생성되는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 이러한 재조합 발현 카세트를 플라스미드, 염색체, 미토콘드리아 DNA, 플라스미드 DNA, 바이러스 또는 핵산 단편에 통합시킬 수 있다. 전형적으로, 발현 벡터의 재조합 발현 카세트 부분은, 다른 서열들 중에서도, 전사되는 핵산 서열 및 프로모터를 포함한다. 특정 양상에서, 본 발명의 발현 카세트는 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자 또는 이의 단편을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0183] "**벡터**" 또는 "발현 벡터"란 용어는 "발현 구조체"와 동의어이며 표적 세포에서 작동 가능하게 연결된 특정 유전자의 발현을 도입하고 지시하는 데 사용되는 DNA 분자를 의미한다. 이 용어에는 자가-복제 핵산 구조체로서의 벡터 그리고 그것이 도입되는 숙주 세포의 게놈에 통합된 벡터가 포함된다. 본 발명의 발현 벡터는 발현 카세트를 포함한다. 발현 벡터는 다량의 안정한 mRNA의 전사를 가능하게 한다. 일단 이러한 발현 벡터가 표적 세포내에 있으면, 해당 유전자에 의해 인코딩되는 리보핵산 분자 또는 단백질이 세포 전사 및 /또는 번역 기작에 의해 생성된다. 한 실시형태에서, 본 발명의 발현 벡터는 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자 또는 이의 단편을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다.
- [0184] 용어 "**숙주 세포**", "숙주 세포주", 및 "숙주 세포 배양물"은 호환적으로 이용되며, 외인성 핵산이 도입되어 있는 세포를 지칭하고 이러한 세포들의 자손을 포함한다. 숙주 세포는 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"를 포함하며, 이는 계대 수에 관계없이 1차 형질전환된 세포 및 이로부터 유래된 자손을 포함한다. 자손은 핵산 함량이 부모 세포와 완전히 동일하지 않을 수 있지만 돌연변이를 포함할 수 있다. 최초로 형질전환된 세포에서 스크리닝되거나 선별된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이 자손이 본원에 포함된다. 숙주 세포는 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자를 생성함에 사용될 수 있는 임의의 유형의 세포 시스템이다. 숙주 세포는 배양된 세포, 예를 들어, 몇가지 언급하자면, 포유동물 배양된 세포, 예를 들어, CHO 세포, BHK 세포, NSO 세포, SP2/0 세포, YO 골수종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포 또는 하이브리도마 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 및 식물 세포를 포함하나, 또한 유전자삽입 동물, 유전자삽입 식물 또는 배양된 식물 또는 동물 조직내에 포함된 세포를 포함한다.
- [0185] 제제의 "**유효량**"은 투여되는 세포 또는 조직에서 생리학적 변화를 일으키는데 필요한 양을 지칭한다.
- [0186] 제제, 예를 들어, 약학 조성물의 "**치료적 유효량**"은 원하는 치료 또는 예방 결과를 달성하기 위해 필요한 투여량으로 그리고 기간 동안 효과적인 양을 지칭한다. 제제의 치료적 유효량은 예를 들어 질환의 부작용을 제거,

감소, 지연, 최소화 또는 방지한다.

- [0187] "개체" 또는 "대상체"는 포유동물이다. 포유동물로는 가축(예를 들어, 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류(예를 들어, 인간 및 비-인간 영장류, 예를 들어, 원숭이), 토끼 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트)가 포함되나, 이로 한정되지는 않는다. 특히, 개체 또는 대상체는 인간이다.
- [0188] 용어 "약학 조성물"은 내부에 포함된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과가 있도록 하기 위한 형태의 제제를 지칭하며, 제제가 투여되는 대상체에게 허용불가능한 독성을 주는 추가 성분들은 포함하지 않는다.
- [0189] "약학적으로 허용되는 부형제"는 활성 성분 이외에 약학 조성물 안에 있는 성분을 말하며, 대상체에게 비독성이다. 약학적으로 허용되는 담체는 부형제, 완충액, 안정화제, 또는 보존제를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0190] "약품 설명서(package insert)"라는 용어는 치료 제품의 사용에 관한 적응증, 사용법, 투여량, 투여, 병용 요법, 금기 및/또는 경고에 대한 정보를 포함하는 치료 제품의 상용 패키지에 관례적으로 포함되는 지침서를 지칭하는 데 사용된다.
- [0191] 본원에서 사용되는 "치료" (및 "치료하다" 또는 "치료하는"과 같은 이의 문법적 변형)는 치료를 받는 개체의 자연적 과정을 변경하려는 시도에 있어서의 임상적 개입을 의미하며, 예방을 위해 또는 임상 병리학 과정 중에 수행될 수 있다. 치료의 바람직한 효과에는 질환의 발생 또는 재발 방지, 증상의 완화, 상기 질환의 임의의 직접 또는 간접적인 병리학적 결과의 감소, 전이 방지, 질환 진행 속도 감소, 상기 질환 상태의 개선 또는 경감, 그리고 차도 또는 개선된 예후가 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태들에 있어서, 본 발명의 분자는 질환 또는 질환의 발달을 지연 또는 질환의 진행을 느리게 하는데 이용된다.
- [0192] 본원에서 사용되는 용어 "병용 치료" 또는 "공동 투여"는 병용 투여(두 가지 또는 그 이상의 요법제가 동일할 또는 별도 제제 안에 함유됨), 및 별도 투여를 포함하고, 이 경우, 상기 본원에 기록된 항체의 투여는 추가적인 요법제 및/또는 요법제들, 바람직하게는 항체 또는 항체들의 투여 이전, 동시 및/또는 이후에 일어난다.
- [0193] "암"이라는 용어는 통상적으로 조절되지 않는 세포 성장/증식을 특징으로 하는 포유동물의 생리학적 병태를 지칭하거나 설명한다. 따라서, 본원에서 사용되는 용어 암은 암종, 림프종(예를 들어, 호지킨 및 비호지킨 림프종), 모세포종, 육종 및 백혈병과 같은 증식성 질환을 의미한다. 특히, 용어 암은 림프구성 백혈병, 폐암, 비소세포 폐(NSCL)암, 세기관지 폐포 세포 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 항문암, 위암, 위장암, 유방암, 자궁암, 나팔관 암종, 자궁내막 암종, 자궁경부 암종, 질암종, 외음부 암종, 호지킨병, 식도암, 소장암, 내분비계암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선 암, 방광암, 신장암 또는 요관암, 신세포암, 신우 암종, 중피종, 간세포암, 담즙 암, 중추 신경계 신생물증(CNS), 척수 축 종양, 뇌간신경아교종, 다형성 교모세포종, 성상세포종, 신경초종, 뇌실막종, 수모세포종, 수막종, 편평세포 암종, 뇌하수체 선종 및 유잉 육종 (임의의 상기 암의 불응성 형태 포함), 또는 하나 이상의 상기 암의 조합을 포함한다. 한 양상에서, 암은 고형암이다. 또 다른 양상에서, 암은 혈액암, 특히 백혈병, 가장 특히 급성 림프구성 백혈병(ALL) 또는 급성 골수성 백혈병(AML)이다.
- [0194] "Her2-양성" 암은 정상 수준보다 높은 Her2를 갖는 암 세포를 포함한다. Her2-양성 암의 예는 Her2-양성 유방암 및 Her2-양성 위암을 포함한다. 선택적으로, Her2-양성 암은 2+ 또는 3+의 면역조직화학(IHC) 점수 및/또는 >2.0의 인시튜 혼성화(ISH) 증폭 비율을 갖는다.
- [0195] 용어 "초기 단계 유방암(EBC)" 또는 "초기 유방암"은 본원에서 유방 또는 액와 림프절을 넘어 전이되지 않은 유방암을 지칭하는 데 사용된다. 여기에는 인시튜 유관 암종 및 I기, IIA기, IIB기 및 IIIA기 유방암이 포함된다.
- [0196] 종양 또는 암을 "0기", "1기", "2기", "3기" 또는 "4기" 및 이 분류 내의 다양한 하위 단계로 언급하는 것은 당 업계에 공지된 전체 병기 그룹화 또는 로마 숫자 병기화 방법을 사용한 종양 또는 암의 분류를 나타낸다. 암의 실제 병기는 암의 유형에 따라 다르지만 일반적으로 0기 암은 인시튜 병변, 1기 암은 작은 국소 종양, 2기 및 3기 암은 국소 진행성 종양으로 국소 림프절의 침범을 나타내고, IV기 암은 전이성 암을 나타낸다. 각 유형의 종양에 대한 구체적인 병기는 숙련된 임상자에게 공지이다.
- [0197] "전이성 유방암"이라는 용어는 암세포가 혈관이나 림프관에 의해 원래 부위에서 신체의 다른 부위로 전이되어 유방 외 하나 이상의 장기에서 하나 이상의 이차 종양을 형성하는 유방암의 상태를 의미한다.
- [0198] "진행성" 암은 국소 침습 또는 전이에 의해 기원 부위 또는 장기 외부로 퍼진 암이다. 따라서, 용어 "진행성"

암은 국소 진행성 및 전이성 질환을 모두 포함한다.

- [0199] "재발성 암"은 수술과 같은 초기 요법에 대한 반응 후 초기 부위 또는 원위 부위에서 재발한 암이다. "국소 재발성" 암은 이전에 치료한 암과 동일한 부위에서 치료 후 재발하는 암이다. "수술가능" 또는 "절제가능" 암은 원발성 장기에 국한되어 수술(절제)에 적합한 암이다. "비-절제성" 또는 "절제불가능" 암은 수술로 제거(절제)할 수 없다.
- [0200] **본 발명의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자**
- [0201] 본 발명은 특히 유리한 성질들, 예를 들어, 생산성, 안정성, 결합 친화도, 생물학적 활성, 표적화 효율, 감소된 독성, 환자에게 제공될 수 있는 확장된 투여량 범위를 가진 신규한 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자들을 제공하며, 이를 통해 효능을 향상시킬 수 있다. 이러한 신규한 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자들은 Fc 수용체에 대한 항원 결합 분자의 결합 친화도 및/또는 효과기 기능을 감소시키는(Fc 침묵) 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 안정한 회합이 가능한 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인을 포함하므로 Fc 수용체들을 통한 비특이적 가교 결합이 없어진다. 대신에, 이들은 종양 부위에서 가교결합을 유발하는 Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 적어도 하나의 항원 결합 도메인을 포함한다. 따라서 종양 특이적 T 세포 활성화가 달성된다.
- [0202] 본원은 CD28에 대한 1가 결합을 가지는 다음을 포함하는 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 제공하며:
- [0203] (a) CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인,
- [0204] (b) 인간 표피 성장 인자 수용체-2(Her2)에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인, 및
- [0205] (c) Fc 수용체에 대한 항원 결합 분자의 결합 친화도 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 안정한 회합이 가능한 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인,
- [0206] 여기서 Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 상기 제2 항원 결합 도메인은 다음을 포함한다:
- [0207] (i) 서열번호 2의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 3의 CDR-H2, 및 서열번호 4의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2), 및 서열번호 5의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 6의 CDR-L2 및 서열번호 7의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2); 또는
- [0208] (ii) 서열번호 10의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 11의 CDR-H2, 및 서열번호 12의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2), 및 서열번호 13의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 14의 CDR-L2 및 서열번호 15의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2); 또는
- [0209] (iii) 서열번호 132의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 133의 CDR-H2, 및 서열번호 134의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2), 및 서열번호 135의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 136의 CDR-L2 및 서열번호 137의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2); 또는
- [0210] (iv) 서열번호 140의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 141의 CDR-H2, 및 서열번호 142의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2), 및 서열번호 143의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 144의 CDR-L2 및 서열번호 145의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2).
- [0211] 본원은 CD28에 대한 1가 결합을 가지는 다음을 포함하는 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 제공하며:
- [0212] (a) CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인,
- [0213] (b) 인간 표피 성장 인자 수용체-2(Her2)에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인, 및
- [0214] (c) Fc 수용체에 대한 항원 결합 분자의 결합 친화도 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 안정한 회합이 가능한 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인,
- [0215] 여기서 Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 상기 제2 항원 결합 도메인은 다음을 포함한다:
- [0216] (i) 서열번호 2의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 3의 CDR-H2, 및 서열번호 4의 CDR-H3을 포함하는 중

쇄 가변 영역(V_H Her2), 및 서열번호 5의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 6의 CDR-L2 및 서열번호 7의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L Her2); 또는

[0217] (ii) 서열번호 10의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 11의 CDR-H2, 및 서열번호 12의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2), 및 서열번호 13의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 14의 CDR-L2 및 서열번호 15의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L Her2).

[0218] 또 다른 양상에서, 본 발명은 CD28에 대한 1가 결합을 특징으로 하는 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 제공하며, 다음을 포함하고:

[0219] (a) CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인,

[0220] (b) 인간 표피 성장 인자 수용체-2(Her2)에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인, 및

[0221] (c) Fc 수용체에 대한 항원 결합 분자의 결합 친화도 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 안정한 회합이 가능한 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인,

[0222] 여기서 Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 상기 제2 항원 결합 도메인은 다음을 포함한다:

[0223] (iii) 서열번호 132의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 133의 CDR-H2, 및 서열번호 134의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2), 및 서열번호 135의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 136의 CDR-L2 및 서열번호 137의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L Her2); 또는

[0224] (iv) 서열번호 140의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 141의 CDR-H2, 및 서열번호 142의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2), 및 서열번호 143의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 144의 CDR-L2 및 서열번호 145의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L Her2).

[0225] 한 양상에서, Fc 도메인이 IgG, 특히 IgG1 Fc 도메인 또는 IgG4 Fc 도메인인 상기 본원에 정의된 바와 같은 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공된다. 한 특정 양상에서, 안정한 회합이 가능한 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인이다. Fc 도메인은 Fc 수용체에 대한 항원 결합 분자의 결합 친화도를 감소시키는/시키거나 효과기 기능을 감소 또는 제거하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 한 양상에서, Fc 도메인은 아미노산 치환 L234A 및 L235A(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)를 포함한다. 한 양상에서, Fc 도메인은 인간 IgG1 하위분류이고 아미노산 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)를 포함한다. 한 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 항원 결합 분자는 안정한 회합이 가능한 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인을 포함하고, 여기서 제1 서브유닛은 서열번호 70의 아미노산 서열(Fc 홀 PGLALA)을 포함하고 제2 서브유닛은 서열번호 71의 아미노산 서열(Fc 늑 PGLALA)을 포함한다.

[0226] 한 양상에서, 상기 본원에 정의된 바와 같은 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 다음을 포함한다:

[0227] (i) 서열번호 26의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 27의 CDR-H2, 및 서열번호 28의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 29의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 30의 CDR-L2 및 서열번호 31의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28); 또는

[0228] (ii) 서열번호 18의 CDR-H1, 서열번호 19의 CDR-H2, 및 서열번호 20의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 21의 CDR-L1, 서열번호 22의 CDR-L2 및 서열번호 23의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28).

[0229] 한 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자의 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 26의 CDR-H1, 서열번호 27의 CDR-H2, 및 서열번호 28의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 29의 CDR-L1, 서열번호 30의 CDR-L2 및 서열번호 31의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)을 포함한다.

- [0230] 또 다른 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자의 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 18의 CDR-H1, 서열번호 19의 CDR-H2, 및 서열번호 20의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 21의 CDR-L1, 서열번호 22의 CDR-L2 및 서열번호 23의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)을 포함한다.
- [0231] 추가 양상에서, 상기 본원에 정의된 바와 같은 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 다음을 포함한다:
- [0232] (i) 서열번호 52의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 53의 CDR-H2, 및 서열번호 54의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 55의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 56의 CDR-L2 및 서열번호 57의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28); 또는
- [0233] (ii) 서열번호 58의 CDR-H1, 서열번호 59의 CDR-H2, 및 서열번호 60의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 61의 CDR-L1, 서열번호 62의 CDR-L2 및 서열번호 63의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28); 또는
- [0234] (iii) 서열번호 64의 CDR-H1, 서열번호 65의 CDR-H2, 및 서열번호 66의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 67의 CDR-L1, 서열번호 68의 CDR-L2 및 서열번호 69의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28).
- [0235] 한 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자의 CD28에 특이적 결합을 할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 52의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 53의 CDR-H2, 및 서열번호 54의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 55의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 56의 CDR-L2 및 서열번호 57의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)을 포함한다.
- [0236] 또 다른 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자의 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 58의 CDR-H1, 서열번호 59의 CDR-H2, 및 서열번호 60의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 61의 CDR-L1, 서열번호 62의 CDR-L2 및 서열번호 63의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)을 포함한다.
- [0237] 또한 또 다른 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자의 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 64의 CDR-H1, 서열번호 65의 CDR-H2, 및 서열번호 66의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 67의 CDR-L1, 서열번호 68의 CDR-L2 및 서열번호 69의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)을 포함한다.
- [0238] 또한, 상기 정의된 바와 같은 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 24의 아미노산 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 25의 아미노산 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)을 포함한다. 한 양상에서, CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40 및 서열번호 41로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 25, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50 및 서열번호 51로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)을 포함한다.
- [0239] 또 다른 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 다음을 포함한다:
- [0240] (a) 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는

- [0241] (b) 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는
- [0242] (c) 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 51의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는
- [0243] (d) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는
- [0244] (e) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는
- [0245] (f) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는
- [0246] (g) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는
- [0247] (h) 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는
- [0248] (i) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는
- [0249] (j) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는
- [0250] (k) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28).
- [0251] 한 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28)의 CDR, 및 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)의 CDR을 포함한다. 또 다른 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자의 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 52의 CDR-H1, 서열번호 53의 CDR-H2, 및 서열번호 54의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 55의 CDR-L1, 서열번호 56의 CDR-L2 및 서열번호 57의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)을 포함한다.
- [0252] 또 다른 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28)의 CDR, 및 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)의 CDR을 포함한다. 또 다른 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자의 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 58의 CDR-H1, 서열번호 59의 CDR-H2, 및 서열번호 60의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 61의 CDR-L1, 서열번호 62의 CDR-L2 및 서열번호 63의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)을 포함한다.
- [0253] 또 다른 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28)의 CDR, 및 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)의 CDR을 포함한다. 또 다른 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자의 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 64의 CDR-H1, 서열번호 65의 CDR-H2, 및 서열번호 66의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 67의 CDR-L1, 서

열번호 68의 CDR-L2 및 서열번호 69의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)을 포함한다.

[0254] 한 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)을 포함하는 항원 결합 도메인과 비교하여 감소된 친화도로 CD28에 결합한다. 친화도는 CD28을 발현하는 CHO 세포에 대한 결합으로서 유세포 측정법에 의해 측정된다. 한 양상에서, CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)을 포함하는 항원 결합 도메인과 비교하여 감소된 친화도로 CD28에 결합하고 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28)의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 및 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함한다. 한 양상에서, 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)을 포함하는 항원 결합 도메인과 비교하여 감소된 친화도로 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 37의 아미노산 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 44의 아미노산 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)을 포함한다.

[0255] 한 특정 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)을 포함한다.

[0256] 또 다른 특정 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)을 포함한다.

[0257] 한 추가의 특정 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)을 포함한다.

[0258] **Her2-표적화 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자**

[0259] 종양 관련 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인이 인간 표피 성장 인자 수용체-2(Her2)에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인인 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 본원에서 제공된다.

[0260] 한 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2), 및 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L Her2)을 포함한다. 한 양상에서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2)의 CDR, 및 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L Her2)의 CDR을 포함한다. 한 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 8의 아미노산 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2), 및 서열번호 9의 아미노산 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L Her2)을 포함한다. 특히, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2), 및 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L Her2)을 포함한다.

[0261] 또 다른 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, 서열번호

11의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 (V_H Her2), 및 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역 (V_L Her2)을 포함한다. 한 양상에서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2)의 CDR, 및 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L Her2)의 CDR을 포함한다. 한 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 16의 아미노산 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2), 및 서열번호 17의 아미노산 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L Her2)을 포함한다. 특히, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2), 및 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L Her2)을 포함한다.

[0262] 또한 본원은 본원에 기재된 바와 같은 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 개시하며, 여기서 Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 (i) 서열번호 132의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 133의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2 및 (iii) 서열번호 134의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 (V_H Her2), 및 (iv) 서열번호 135의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 136의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 137의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역 (V_L Her2)을 포함한다. 한 양상에서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 138의 아미노산 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2), 및 서열번호 139의 아미노산 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L Her2)을 포함한다. 특히, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 138의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2), 및 서열번호 139의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L Her2)을 포함한다(페르투주맵, 2C4).

[0263] 더욱이 본원은 본원에 기재된 바와 같은 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 개시하며, 여기서 Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 (i) 서열번호 140의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 141의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2 및 (iii) 서열번호 142의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 (V_H Her2), 및 (iv) 서열번호 143의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 144의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 145의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역 (V_L Her2)을 포함한다. 한 양상에서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 146의 아미노산 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2), 및 서열번호 147의 아미노산 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L Her2)을 포함한다. 특히, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 146의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2), 및 서열번호 147의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L Her2)을 포함한다(트라스투주맵, 4D5).

[0264] 또한, 본원은 본원에 기재된 바와 같은 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 개시하며, 여기서 Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 (i) 서열번호 156의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (ii) 서열번호 157의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2 및 (iii) 서열번호 158의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 (V_H Her2), 및 (iv) 서열번호 159의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (v) 서열번호 160의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (vi) 서열번호 161의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역 (V_L Her2)을 포함한다. 한 양상에서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인은 서열번호 162의 아미노산 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2), 및 서열번호 163의 아미노산 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L Her2)을 포함한다. 특히, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 162의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2), 및 서열번호 163의

아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2)을 포함한다(7C2).

- [0265] **CD28에 대한 결합에 대해 1가 및 Her2에 대한 결합에 대해 1가인 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자(1+1 형식)**
- [0266] 한 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인 및/또는 Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인은 Fab 단편이다. 한 특정 양상에서, CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인 및 Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인은 모두 Fab 단편이다.
- [0267] 한 양상에서, (a) CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 교차Fab 단편, (b) Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 일반 Fab 단편, 및 (c) Fc 수용체에 대한 항원 결합 분자의 결합 친화도 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 안정한 회합이 가능한 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인을 포함하는, 본원에 기재된 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공된다. 또 다른 양상에서, (a) CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 일반 Fab 단편, (b) Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 교차Fab 단편, 및 (c) Fc 수용체에 대한 항원 결합 분자의 결합 친화도 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 안정한 회합이 가능한 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인을 포함하는, 본원에 기재된 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공된다.
- [0268] 한 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 Fab 단편이고 이때 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL과 VH 또는 불변 도메인 CL과 CH1, 특히 가변 도메인 VL과 VH는 서로에 의해 대체된다(교차fab 단편). 한 양상에서, CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL과 VH 또는 불변 도메인 CL과 CH1, 특히 가변 도메인 VL과 VH가 서로에 의해 대체된 Fab 단편이고, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인은 일반 Fab 단편이다. 한 양상에서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인은 Fab 단편이며, 이때 불변 도메인 CL에서 위치 123(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산이 리신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)에서 선택된 아미노산으로 치환되고 위치 124(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산이 리신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)으로 독립적으로 치환되고, 이때 불변 도메인 CH1에서 위치 147(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산이 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 독립적으로 치환되고 위치 213(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산이 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 독립적으로 치환된다(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링).
- [0269] 한 특정 양상에서, 서열번호 92의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 91의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 96의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 및 서열번호 97의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함하는 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공된다(분자 A). 한 추가 양상에서, 서열번호 92의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 91의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 98의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 및 서열번호 97의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함하는 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공된다(분자 B). 또 다른 양상에서, 서열번호 92의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 91의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 101의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 및 서열번호 97의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함하는 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공된다(분자 D).
- [0270] 또 다른 양상에서, 서열번호 179의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 178의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 180의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 및 서열번호 181의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함하는 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공된다(분자 F). 또 다른 양상에서, 서열번호 179의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 178의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 182의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 및 서열번호 183의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함하는 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공된다(분자 G).
- [0271] 한 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인은 Fab 단편이고 이때 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL과 VH 또는 불변 도메인 CL과 CH1, 특히 가변 도메인 VL과 VH는 서로에 의해 대체된다(교차fab 단편). 한 양상에서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인은 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL과 VH 또는 불변 도메인 CL과 CH1, 특히 가변 도메인 VL과 VH가 서로에 의해 대체된 Fab 단편이고, CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 일반 Fab 단편이다. 한 양상에서, CD28에 특이적으로 결합할 수

있는 항원 결합 도메인은 Fab 단편이며, 이때 불변 도메인 CL에서 위치 123(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산이 리신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)에서 선택된 아미노산으로 치환되고 위치 124(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산이 리신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)으로 독립적으로 치환되고, 이때 불변 도메인 CH1에서 위치 147(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산이 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 독립적으로 치환되고 위치 213(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산이 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 독립적으로 치환된다(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링).

[0272] 한 특정 양상에서, 서열번호 83의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 74의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 99의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 및 서열번호 100의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함하는 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공된다(분자 C). 한 특정 양상에서, 서열번호 83의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 74의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 102의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 및 서열번호 100의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함하는 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공된다(분자 E).

[0273] **Fc 수용체 결합 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 Fc 도메인 변형**

[0274] 본 발명의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자의 Fc 도메인은 면역글로불린 분자의 중쇄 도메인을 포함하는 한 쌍의 폴리펩티드 사슬로 이루어진다. 예를 들어, 면역글로불린 G(IgG) 분자의 Fc 도메인은 이량체이며, 이의 각 서브유닛은 CH2 및 CH3 IgG 중쇄 불변 도메인을 포함한다. Fc 도메인의 두 서브유닛은 서로 안정한 연합이 가능하다. Fc 도메인은 표적 조직에서의 양호한 축적 및 유리한 조직-혈액 분포 비율에 기여하는 긴 혈청 반감기를 포함하여 본 발명의 항원 결합 분자에 유리한 약동학적 특성을 부여한다. 그러나 다른 한편으로 이는 본 발명의 이중특이적 항체를 바람직한 항원-보유 세포 보다는 Fc 수용체를 발현하는 세포에 대한 바람직하지 않은 표적화를 초래할 수 있다.

[0275] 따라서, 본 발명의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자의 Fc 도메인은 천연 IgG1 Fc 도메인과 비교하여 Fc 수용체에 대해 감소된 결합 친화도 및/또는 감소된 효과기 기능을 나타낸다. 한 양상에서, Fc는 Fc 수용체에 실질적으로 결합하지 않거나 및/또는 효과기 기능을 유도하지 않는다. 특정 양상에서, Fc 수용체는 Fc γ 수용체이다. 한 양상에서, Fc 수용체는 인간 Fc 수용체이다. 한 구체적인 양상에서, Fc 수용체는 활성화 인간 Fc γ 수용체, 보다 구체적으로 인간 Fc γ RIIIa, Fc γ RI 또는 Fc γ RIIa, 가장 구체적으로 인간 Fc γ RIIIa이다. 한 양상에서, Fc 도메인은 효과기 기능을 유도하지 않는다. 이러한 효과기 기능의 감소는 비제한적으로 다음 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 보체 의존성 세포독성(CDC) 감소, 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC) 감소, 항체-의존성 세포 식균작용(ADCP) 감소, 사이토카인 분비 감소, 항원 제시 세포에 의한 면역 복합체-매개 항원 흡수 감소, NK 세포에 대한 결합 감소, 대식세포에 대한 결합 감소, 단핵세포에 대한 결합 감소, 다형핵세포에 대한 결합 감소, 직접적인 신호전달 유도 세포자멸사 감소, 수지상세포 성숙화 감소, 또는 T 세포 프라이밍 감소.

[0276] 특정 양상들에서, 하나 이상의 아미노산 변형이 본원에 제공된 항체의 Fc 영역 내로 도입되어 Fc 영역 변이체를 생성할 수 있다. 상기 Fc 영역 변이체는 하나 또는 그 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형(예를 들어, 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열 (예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)를 포함할 수 있다.

[0277] 한 특정 양상에서, 본 발명은 Fc 영역이 Fc 수용체, 특히 Fc 수용체에 대한 결합을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 항원 결합 분자를 제공한다. 한 양상에서, 본 발명은 Fc 영역이 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하고 항체에 의해 유도된 ADCC가 야생형 인간 IgG1 Fc 영역을 포함하는 항체에 의해 유도된 ADCC의 0-20%로 감소된 항체를 제공한다.

[0278] 한 양상에서, 본 발명의 항원 결합 분자의 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 상기 Fc 도메인의 2개의 서브유닛 각각에 존재한다. 특히, 상기 Fc 도메인은 E233, L234, L235, N297, P331 및 P329(EU 넘버링)의 위치에 아미노산 치환을 포함한다. 특히, Fc 도메인은 IgG 중쇄의 위치 234 및 235(EU 넘버링) 및/또는 329(EU 넘버링)에서의 아미노산 치환을 포함한다. 보다 특히, IgG 중쇄에 아미노산 치환 L234A, L235A 및 P329G("P329G LALA", EU 넘버링)를 갖는 Fc 도메인을 포함하는 본 발명에 따른 항원 결합 분자를 제공한다. 이러한 아미노산 치환 L234A 및 L235A는 소위 LALA 돌연변이를 지칭한다. 이러한 아미노산 치환의 "P329G LALA" 조합은 인간 IgG1 Fc 도메인의 Fc γ 수용체 결합을 완전히 제거하는데, 이는 국제 특허 출원 공개공보 WO 2012/130831 A1에 기재되어 있으며, 이 문헌은 또한 이러한 돌연변이 Fc 도메인의 제조 방법 및 Fc 수용체 결합 또는 효과기 기능과 같은 이의 성질을 측정하는 방법을 기재한다.

- [0279] 감소된 Fc 수용체 결합 및/또는 효과기 기능을 갖는 Fc 도메인은 또한 Fc 도메인 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329 중 하나 이상의 치환을 갖는 것들을 포함한다(US 6,737,056). 이러한 Fc 돌연변이체들은 잔기 265 및 297의 잔기가 알라닌으로 치환된 소위 "DANA" Fc 돌연변이체를 포함하는, 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327중 2개 또는 그 이상에서 치환을 가진 Fc 돌연변이체를 포함한다 (미국 특허 제 7,332,581 참고).
- [0280] 또 다른 양상에서, 상기 Fc 도메인은 IgG4 Fc 도메인이다. IgG4 항체는 IgG1 항체와 비교하여 Fc 수용체에 대한 감소된 결합 친화도 및 감소된 효과기 기능을 나타낸다. 보다 구체적인 양상에서, Fc 도메인은 S228 위치에 아미노산 치환(Kabat 넘버링), 특히 아미노산 치환 S228P를 포함하는 IgG4 Fc 도메인이다. 보다 구체적인 양상에서, Fc 도메인은 아미노산 치환 L235E 및 S228P 및 P329G(EU 넘버링)를 포함하는 IgG4 Fc 도메인이다. 이러한 IgG4 Fc 도메인 돌연변이체 및 이의 Fc γ 수용체 결합 성질은 또한 WO 2012/130831에 기재되어 있다.
- [0281] 추가로 또는 대안적으로, 하나 이상의 치환 돌연변이는 비당화 부위 돌연변이(예를 들어, 아미노산 잔기 N297(EU 넘버링)에서의 비당화 부위 돌연변이, 예를 들어, N297G 또는 N297A(EU 넘버링)의 비당화 부위 돌연변이)를 포함하며, 이는 또한 Fc 수용체에 대한 결합 및/또는 효과기 기능을 감소시킨다. 특정 양상에서, Fc 도메인은 EU 넘버링에 따른 아미노산 치환 N297G를 포함하는 IgG1 Fc 도메인이다.
- [0282] 돌연변이 Fc 도메인을 해당 분야에 공지된 유전학적 또는 화학적 방법을 사용하여 아미노산 결실, 치환, 삽입 또는 변형시켜 제조할 수 있다. 유전학적 방법은 인코딩 DNA 서열의 부위-특이적 돌연변이유발, PCR, 유전자 합성 등을 포함할 수 있다. 정확한 뉴클레오티드 변화는 예를 들어 시퀀싱에 의해 확인할 수 있다.
- [0283] Fc 수용체에 대한 결합은 예를 들어 ELISA에 의해서 또는 BIAcore 기기(GE Healthcare)와 같은 표준 기기를 사용하는 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해서 쉽게 측정할 수 있으며 이러한 Fc 수용체는 재조합 발현에 의해 얻을 수 있다. 또는, Fc 도메인 또는 Fc 도메인을 포함하는 세포 활성화 항체의 Fc 수용체에 대한 결합 친화도를 특정 Fc 수용체, 예를 들어, 인간 NK 세포 발현 Fc γ IIIa 수용체를 발현하는 것으로 공지된 세포주를 사용하여 평가할 수 있다.
- [0284] Fc 도메인, 또는 Fc 도메인을 포함하는 본 발명의 항원 결합 분자의 효과기 기능을 해당 분야에 공지된 방법에 의해 측정할 수 있다. ADCC를 측정하기에 적합한 분석이 본원에 기재되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 분석의 다른 예들은 US 5,500,362; Hellstrom 외, Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) 및 Hellstrom 등, Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); US 5,821,337; Bruggemann 등, J Exp Med 166, 1351-1361 (1987)에 기재되어 있다. 대안으로, 비-방사능활성 분석 방법들이 이용될 수 있다 (예를 들면, 유동 세포측정을 위한 ACTI™ 비-방사능활성 세포독성 분석 (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); 그리고 CytoTox 96® 비-방사능활성 세포독성 분석 (Promega, Madison, WI) 참고). 이러한 분석에 유용한 효과기 세포들은 말초 혈액 단핵 세포들 (PBMC) 및 자연 살해 (NK) 세포들을 포함한다. 대안으로, 또는 추가적으로, 관심 분자의 ADCC 활성은, 예를 들어, Clynes 외. Proc. Natl Acad. Sci. USA 95, 652-656 (1998)에서 공개된 바와 같은 동물 모델에서 생체내에서 평가될 수 있다.
- [0285] 일부 양상들에서, 보체 성분, 구체적으로 C1q에 대한 Fc 도메인의 결합은 감소된다. 따라서, Fc 도메인이 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된 일부 양상들에서, 효과기 기능 감소는 CDC 감소를 포함한다. C1q 결합 분석을 수행하여 본 발명의 항체가 C1q에 결합할 수 있는지, 그리하여 CDC 활성을 갖는지 여부를 측정할 수 있다. 예를 들어, WO 2006/029879 및 WO 2005/100402의 C1q 및 C3c 결합 ELISA 참조. 보체 활성화를 평가하기 위하여, CDC 분석이 실행될 수 있다 (예를 들면, Gazzano-Santoro 외. J. Immunol. Methods 202, 163 (1996); Cragg 외. Blood. 101, 1045-1052 (2003); 그리고 Cragg 및 Glennie, Blood. 103, 2738-2743 (2004) 참조).
- [0286] 한 특정 양상에서, 천연 IgG₁ Fc 도메인과 비교하여 Fc 수용체에 대한 감소된 결합 친화도 및/또는 감소된 효과기 기능을 나타내는 Fc 도메인은 아미노산 치환 L234A, L235A 및 선택적으로 P329G를 포함하는 인간 IgG₁ Fc 도메인이거나, 또는 아미노산 치환 S228P, L235E 및 선택적으로 P329G를 포함하는 인간 IgG₄ Fc 도메인이다(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링). 보다 구체적으로, 이는 아미노산 치환 L234A, L235A 및 P329G(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)를 포함하는 인간 IgG₁ Fc 도메인이다.
- [0287] 또 다른 양상에서, Fc 도메인은 Fc 수용체에 대한 결합 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환이 N297에 있는 IgG1 또는 IgG4 Fc 도메인이다. 특정 양상에서, Fc 도메인은 EU 넘버링에 따른 아미노산 치환 N297G를 포함하는 IgG1 Fc 도메인이다.

[0288] 이종이량체화를 촉진하는 Fc 도메인 변형

[0289] 본 발명의 이종특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자는 Fc 도메인의 2개의 서브유닛 중 하나 또는 다른 하나에 융합된 상이한 항원 결합 부위들을 포함하므로, Fc 도메인의 2개의 서브유닛은 2개의 동일하지 않은 폴리펩티드 사슬에 포함될 수 있다. 이들 폴리펩티드의 재조합 공동발현 및 후속된 이량체화는 이들 2개 폴리펩티드의 몇 가지 가능한 조합을 유도한다. 따라서 재조합적 생성에서 본 발명의 이종특이적 항원 결합 분자의 수율 및 순도를 개선하기 위해, 본 발명의 이종특이적 항원 결합 분자의 Fc 도메인에 원하는 폴리펩티드들의 회합을 촉진하는 변형을 도입하는 것이 유리할 것이다.

[0290] 따라서, 특정 양상에서 본 발명은 (a) CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 하나의 항원 결합 도메인, (b) 종양 관련 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 적어도 하나의 항원 결합 도메인, 및 (c) Fc 수용체에 대한 항원 결합 분자의 결합 친화도 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 안정적인 회합이 가능한 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인을 포함하는 CD28에 대한 1가 결합을 가지는 이종특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자에 관한 것이며, 여기서 Fc 도메인은 Fc 도메인의 제1 및 제2 서브유닛의 회합을 촉진하는 변형을 포함한다. 인간 IgG Fc 도메인의 두 서브유닛들 사이의 가장 광범위한 단백질-단백질 상호작용 부위는 Fc 도메인의 CH3 도메인에 있다. 따라서, 한 양상에서, 상기 변형은 Fc 도메인의 CH3 도메인에 있다.

[0291] 특정 양상에서 상기 변형은 소위 "눙-인투-홀" 변형으로, Fc 도메인의 2개의 서브유닛 중 하나에 "눙" 변형 및 Fc 도메인의 2개의 서브유닛 중 다른 하나에 "홀" 변형을 포함한다. 따라서, 본 발명은 (a) CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 하나의 항원 결합 도메인, (b) 종양 관련 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 적어도 하나의 항원 결합 도메인, 및 (c) Fc 수용체에 대한 항원 결합 분자의 결합 친화도 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 안정적인 회합이 가능한 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인을 포함하는 CD28에 대한 1가 결합을 가지는 이종특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자에 관한 것이며, 여기서 Fc 도메인의 제1 서브유닛은 눙 인투 홀 방법에 따라 눙을 포함하고 Fc 도메인의 제2 서브유닛은 홀을 포함한다. 특정 양상에서, Fc 도메인의 제1 서브유닛은 아미노산 치환 S354C 및/또는 T366W(EU 넘버링)를 포함하고 Fc 도메인의 제2 서브유닛은 아미노산 치환 Y349C, T366S 및 Y407V(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)를 포함한다.

[0292] 눙-인투-홀 기술은 예를 들어 US 5,731,168; US 7,695,936; Ridgway 등, Prot Eng 9, 617-621 (1996) 및 Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001)에 기재되어 있다. 일반적으로, 상기 방법은 제1 폴리펩티드의 경계면에 돌기 ("눙") 그리고 제2 폴리펩티드의 경계면에 이에 상응하는 구멍 ("홀")을 도입시켜 상기 돌기가 상기 구멍 안에 위치되게 함으로써 이형이량체 형성을 촉진시키고, 동형이량체 형성을 방해한다. 돌기 (Protuberances)는 제1 폴리펩티드의 경계면의 작은 아미노산 측쇄를 더 큰 측쇄 (가령, 티로신 또는 트립토판)로 대체함으로써 제작된다. 상기 돌기와 동일 또는 유사한 크기의 상보적 공동(cavities)은, 제2 폴리펩티드의 경계면에서 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 측쇄 (가령, 알라닌 또는 트레오닌)로 대체함으로써 생성된다.

[0293] 따라서, 한 양상에서, 본 발명의 이종특이적 항원 결합 분자의 Fc 도메인의 제1 서브유닛의 CH3 도메인에서 아미노산 잔기는 보다 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 대체되고, 이에 의해 제1 서브유닛의 CH3 도메인 내부에, 제2 서브유닛의 CH3 도메인 내부의 공동에 위치할 수 있는 돌기를 생성하고, Fc 도메인의 제2 서브유닛의 CH3 도메인에서 아미노산 잔기는 보다 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 대체되고, 이에 의해 제2 서브유닛의 CH3 도메인 내부에, 제1 서브유닛의 CH3 도메인 내부의 돌기가 위치할 수 있는 공동을 생성한다. 상기 돌기 및 공동은 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을, 예를 들어, 부위-특이적 돌연변이유발에 의해, 또는 펩티드 합성에 의해 변경함으로써 생성될 수 있다. 특정 양상에서, Fc 도메인의 제1 서브유닛의 CH3 도메인에서 366번 위치의 트레오닌 잔기는 트립토판 잔기로 대체되고(T366W), Fc 도메인의 제2 서브유닛의 CH3 도메인에서 407번 위치의 티로신 잔기는 발린 잔기로 대체된다(Y407V). 한 양상에서, Fc 도메인의 제2 서브유닛에서, 추가로 366번 위치의 트레오닌 잔기는 세린 잔기로 대체되고(T366S), 368번 위치의 류신 잔기는 알라닌 잔기로 대체된다(L368A).

[0294] 또한 추가 양상에서, Fc 도메인의 제1 서브유닛에서, 추가로 354번 위치의 세린 잔기는 시스테인 잔기로 대체되고(S354C), Fc 도메인의 제2 서브유닛에서 추가로 349번 위치의 티로신 잔기는 시스테인 잔기로 대체된다(Y349C). 이들 2개 시스테인 잔기들의 도입은 Fc 도메인의 상기 2개 하위유닛들 사이에 이황화물 가교결합을 형성시키므로, 이량체를 더욱 안정화시킨다 (Carter (2001), J Immunol Methods 248, 7-15). 특정 양상에서, Fc 도메인의 제1 서브유닛은 아미노산 치환 S354C 및 T366W(EU 넘버링)를 포함하고 Fc 도메인의 제2 서브유닛은 아미노산 치환 Y349C, T366S 및 Y407V(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)를 포함한다.

[0295] 또다른 양상에서, Fc 도메인의 제1 및 제2 서브유닛의 회합을 촉진하는 변형은 예를 들어 PCT 공개 공보 WO

2009/089004에 기재된 정전기적 조향 효과를 매개하는 변형을 포함한다. 일반적으로, 이 방법은 2개의 Fc 도메인 서브유닛의 경계면에서 하나 이상의 아미노산 잔기의 하전된 아미노산 잔기로의 대체를 포함하므로 동종이량체 형성은 정전기적으로 바람직하지 않지만 이종이량체화는 정전기적으로 유리하게 된다.

[0296] 본원에 보고된 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 중쇄의 C-말단은 아미노산 잔기 PGK로 끝나는 완전한 C-말단 일 수 있다. 중쇄의 C-말단은 C 말단 아미노산 잔기 중 1개 또는 2개가 제거된 단축된 C-말단일 수 있다. 한 바람직한 양상에서, 중쇄의 C-말단은 P로 끝나는 단축된 C-말단이다. 한 바람직한 양상에서, 중쇄의 C-말단은 PG로 끝나는 단축된 C-말단이다. 본원에 보고된 모든 양상들 중 한 양상에서, 본원에 명시된 바와 같은 C-말단 CH3 도메인을 포함하는 중쇄를 포함하는 CD28 항원 결합 분자는 C-말단 글리신-리신 디펩티드 (G446 및 K447, Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)를 포함한다. 본원에 보고된 모든 양상들 중 한 양상에서, 본원에 명시된 바와 같은 C-말단 CH3 도메인을 포함하는 중쇄를 포함하는 CD28 항원 결합 분자는 C-말단 글리신 잔기 (G446, Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)를 포함한다.

[0297] **Fab 도메인의 변형**

[0298] 한 양상에서, 본 발명은 (a) CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인, (b) Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인, 및 (c) Fc 수용체에 대한 항원 결합 분자의 결합 친화도 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 안정적인 결합이 가능한 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인을 포함하는 CD28에 대한 1가 결합으로 특징되는 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자에 관한 것이며, 여기서 Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인은 Fab 단편이고 이러한 Fab 단편에서 VH 및 VL의 가변 도메인 또는 불변 도메인 CH1 및 CL은 교차Mab 기술에 따라 교환된다.

[0299] 하나의 결합 팔(교차MabVH-VL 또는 교차MabCH-CL) 에서 도메인 대체/교환을 갖는 다중특이적 항체는 WO2009/080252 및 Schaefer, W. 외, PNAS, 108(2011) 11187-1191에 자세히 설명되어 있다. 이 항체들은 (이러한 도메인 교환이 없는 접근 방식에 비해) 제1 항원에 대한 경쇄와 제2 항원에 대한 잘못된 중쇄의 미스매칭으로 인한 부산물을 분명히 줄인다.

[0300] 한 양상에서, 본 발명은 (a) CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인, (b) Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인, 및 (c) Fc 수용체에 대한 항원 결합 분자의 결합 친화도 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 안정적인 결합이 가능한 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인을 포함하는 CD28에 대한 1가 결합으로 특징되는 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자에 관한 것이며, 여기서 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 Fab 단편에서 가변 도메인 VL 및 VH는 서로 대체되어 VH 도메인이 경쇄의 일부가 되고 VL 도메인이 중쇄의 일부가 된다.

[0301] 또 다른 양상에서, 그리고 정확한 페어링을 추가로 개선하기 위해, (a) CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인, (b) Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인, 및 (c) Fc 수용체에 대한 항원 결합 분자의 결합 친화도 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 안정적인 결합이 가능한 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인을 포함하는 CD28에 대한 1가 결합으로 특징되는 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자는, 상이한 하전된 아미노산 치환(소위 "하전 잔기")를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 교차 또는 비-교차 CH1 및 CL 도메인에 도입된다. 한 특정 양상에서, 본 발명은 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자에 관한 것이며, 여기서 CL 도메인들 중 하나에서 위치 123(EU 넘버링)의 아미노산이 아르기닌(R)으로 대체되어 있고 위치 124(EU 넘버링)의 아미노산이 리신(K)으로 치환되어 있고, CH1 도메인들 중 하나에서 위치 147(EU 넘버링) 및 위치 213(EU 넘버링)의 아미노산이 글루탐산(E)으로 치환되어 있다. 한 특정 양상에서, CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 Fab 단편의 CL 도메인에서 위치 123(EU 넘버링)의 아미노산은 아르기닌(R)으로 대체되어 있고 위치 124(EU 넘버링)의 아미노산은 리신(K)으로 대체되어 있으며 CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 Fab 단편의 CH1 도메인에서 위치 147(EU 넘버링) 및 위치 213(EU 넘버링)의 아미노산은 글루탐산(E)으로 대체되어 있다.

[0302] **폴리뉴클레오티드**

[0303] 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 이의 단편을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 추가로 제공한다. 본 발명의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 인코딩하는 하나 이상의 단리된 폴리뉴클레오티드는 전체 항원 결합 분자를 인코딩하는 단일 폴리뉴클레오티드로서 또는 공동-발현되는 다중(예를 들어, 2개 이상) 폴리뉴클레오티드로서 발현될 수 있다. 공동 발현된 폴리뉴클레오티드에 의해 인코딩된 폴리펩티드는 예를 들어 이황화 결합 또는 다른 수단을 통해 결합하여 기능성 항원 결합 분자를 형

성할 수 있다. 예를 들어, 면역글로불린의 경쇄 부분은 면역글로불린의 중쇄 부분과 별개의 폴리뉴클레오티드에 의해 인코딩될 수 있다. 공동 발현될 때, 중쇄 폴리펩티드는 경쇄 폴리펩티드와 회합하여 면역글로불린을 형성할 것이다. 일부 양상에서, 단리된 폴리뉴클레오티드는 본원에 기재된 바와 같은 본 발명에 따른 전체 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 인코딩한다. 다른 양상에서, 단리된 폴리뉴클레오티드는 본원에 기재된 본 발명에 따른 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자에 포함된 폴리펩티드를 인코딩한다. 특정 양상들에서, 폴리뉴클레오티드 또는 핵산은 DNA이다. 다른 양상들에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 예를 들어 메신저 RNA(mRNA) 형태의 RNA이다. 본 발명의 RNA는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다.

[0304] **제조합 방법**

[0305] 본 발명의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자는 예를 들어 고상 펩티드 합성(예를 들어, Merrifield 고상 합성) 또는 제조합 생산에 의해 얻을 수 있다. 제조합 생산을 위해, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 이의 폴리펩티드 단편을 인코딩하는, 예를 들어 상기 기재된 바와 같은 하나 이상의 폴리뉴클레오티드가 단리되고 숙주 세포에서의 추가 클로닝 및/또는 발현을 위해 하나 이상의 벡터 내부에 삽입된다. 상기와 같은 폴리뉴클레오티드는 통상적인 과정을 사용하여 쉽게 단리되고 시퀀싱 될 수 있다. 본 발명의 하나의 양상에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 중 하나 이상을 포함하는 벡터, 바람직하게는 발현 벡터를 제공한다. 당업자들에게 주지된 방법을 사용하여 적절한 전사/번역 조절 신호와 함께 이러한 항체(단편)의 코딩 서열을 함유하는 발현 벡터를 제작할 수 있다. 이들 방법은 시험관내 제조합 DNA 기술, 합성 기술 및 생체내 제조합/유전자 제조합을 포함한다. 예를 들어, Maniatis 등, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989); 및 Ausubel 등, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)에 기재된 기술들을 참조하라. 이러한 발현 벡터는 플라스미드, 바이러스의 부분이거나 또는 핵산 단편일 수 있다. 이러한 발현 벡터는 내부에 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 폴리펩티드 단편(즉, 코딩 영역)가 프로모터 및/또는 다른 전사 또는 번역 조절 요소와 작동가능한 회합으로 클로닝되는 발현 카세트를 포함한다. 본원에서 사용된 "코딩 영역"은 아미노산으로 번역되는 코돈들로 구성된 핵산의 일부이다. "정지 코돈"(TAG, TGA 또는 TAA)은 아미노산으로 번역되지 않지만, 존재하는 경우, 코딩 영역의 일부인 것으로 간주될 수 있으나, 임의의 연결 서열, 예를 들어, 프로모터, 리보솜 결합 부위, 전사 종결인자, 인트론, 5' 및 3' 비번역 영역 등은 코딩 영역의 일부가 아니다. 2개 이상의 코딩 영역이 단일 폴리뉴클레오티드 구조체에, 예를 들어 단일 벡터상에, 또는 별도의 폴리뉴클레오티드 구조체에, 예를 들어, 별도의(상이한) 벡터상에 존재할 수 있다. 또한, 임의의 벡터는 단일 코딩 영역을 함유할 수 있고 또는 2개 이상의 코딩 영역을 포함할 수 있다, 예를 들어, 본 발명의 벡터는 하나 이상의 폴리펩티드를 인코딩할 수 있으며, 이들은 단백질분해 절단을 통해 최종 단백질로 번역-후 또는 번역과 동시에 분리된다. 또한, 본 발명의 벡터, 폴리뉴클레오티드, 또는 핵산은 본 발명의 항체, 또는 이의 폴리펩티드 단편, 또는 이의 변이체 또는 유도체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 융합되거나 또는 융합되지 않은 이중 코딩 영역들을 코딩할 수 있다. 이중 코딩 영역들은 제한없이, 특수화된 구성요소 또는 모티프, 예를 들어, 분비 신호 펩티드 또는 이중 기능성 도메인을 포함한다. 작동가능한 회합은, 유전자 산물, 예를 들어, 폴리펩티드에 대한 코딩 영역의 발현이 하나 이상의 조절 서열들의 영향 또는 제어하에 놓이도록 하는 방식으로 유전자 산물이 조절 서열들과 회합되는 경우이다. 2개의 DNA 단편(예를 들어 폴리펩티드 코딩 영역 및 이와 회합된 프로모터)은 프로모터 기능의 유도가 원하는 유전자 산물을 인코딩하는 mRNA의 전사를 생성시키고 이러한 2개의 DNA 단편들 사이의 링크지의 성질이 이러한 유전자 산물의 발현을 지시하는 발현 조절 서열들의 능력을 방해하지 않는 또는 전사될 DNA 템플릿의 능력을 방해하지 않는 경우 "작동가능하게 회합된다". 따라서, 프로모터 영역은 프로모터가 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산의 전사를 실행할 수 있는 경우 이러한 핵산과 작동가능하게 회합될 것이다. 상기 프로모터는 오직 예정된 세포에서만 해당 DNA의 실질적인 전사를 유도하는 세포-특이성 프로모터일 수 있다. 프로모터 외에, 다른 전사 조절 요소들, 예를 들어, 인핸서, 오퍼레이터, 리프레서, 및 전사 종결 신호가 이러한 폴리뉴클레오티드와 작동가능하게 회합되어 세포-특이성 전사를 유도할 수 있다.

[0306] 적합한 프로모터 및 기타 전사 조절 영역이 본원에 개시되어 있다. 다양한 전사 조절 영역이 당업자에게 공지되어 있다. 여기에는 비제한적으로 척추동물 세포에서 기능하는 전사 조절 영역, 예를 들어 비제한적으로 거대세포 바이러스로부터의 프로모터 및 인핸서 분절(예를 들어 인트론-A와 접합된, 극초기 프로모터), 유인원 바이러스 40(예를 들어, 초기 프로모터), 및 레트로바이러스(예를 들어 Rous 육종 바이러스)를 포함한다. 다른 전사 조절 영역은 척추동물 유전자로부터 유래된 것들, 예를 들어 액틴, 열충격 단백질, 소 성장 호르몬 및 토기 $\hat{\alpha}$ -글로빈, 뿐만 아니라 진핵생물 세포에서 유전자 발현을 조절할 수 있는 다른 서열들을 포함한다. 또 다른 적합한 전사 조절 영역은 조직-특이성 프로모터 및 인핸서, 뿐만 아니라 유도성 프로모터(예를 들어 프로모터 유도

성 테 트라사이클린)를 포함한다. 유사하게, 다양한 번역 조절 요소들이 당업자들에게 공지되어 있다. 이들에는 리보솜 결합 부위, 번역 개시 및 종결 코돈, 및 바이러스 시스템으로부터 유래된 요소들(특히 내부 리보솜 진입 부위, 또는 IRES, 또한 CITE 서열로서 지칭됨)이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 발현 카세트는 또한 다른 특징들, 예를 들어 복제 원점, 및/또는 염색체 통합 요소, 예를 들어, 레트로바이러스 긴 말단 반복 서열(LTR), 또는 아데노-연관 바이러스(AAV) 역위 말단 반복 서열(ITR)을 포함할 수 있다.

[0307] 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 핵산 코딩 영역은, 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 의해 인코딩되는 폴리펩티드의 분비를 지시하는, 분비 또는 신호 펩티드를 인코딩하는 또 다른 코딩 영역과 회합될 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 이의 폴리펩티드 단편의 분비를 원하는 경우, 신호 서열을 인코딩하는 DNA를 본 발명의 항체 또는 이의 폴리펩티드 단편을 인코딩하는 핵산의 상류에 배치할 수 있다. 이러한 신호 가설에 따르면, 일단 거친면 소포체를 가로질러 성장하는 단백질 사슬의 방출이 시작되면, 포유동물 세포에 의해 분비된 단백질은 성숙한 단백질로부터 절단된 신호 펩티드 또는 분비 리더 서열을 갖는다. 당업자는 척추동물 세포에 의해 분비되는 폴리펩티드가 일반적으로 폴리펩티드의 N-말단에 융합된 신호 펩티드를 가지며, 이는 번역된 폴리펩티드로부터 절단되어 폴리펩티드의 분비된 또는 "성숙한" 형태를 생성한다는 것을 알고 있다. 특정 실시형태에서, 천연 신호 펩티드, 예를 들어, 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄 신호 펩티드, 또는 이와 작동가능하게 회합된 폴리펩티드의 분비를 지시하는 능력을 보유하는 해당 서열의 기능적 유도체가 사용된다. 한편, 이종 포유동물 신호 펩티드, 또는 이의 기능적 유도체를 사용할 수 있다. 예를 들어, 상기 야생형 리더 서열을 인간 조직 플라스미노겐 활성화제(TPA) 또는 마우스 β글루쿠로니다제의 리더 서열로 치환할 수 있다.

[0308] 추후 정제를 용이하게 하거나(예를 들어 히스티딘 태그) 또는 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자의 표지를 지원하는데 사용될 수 있는 짧은 단백질 서열을 인코딩하는 DNA를, 본 발명의 항체 또는 이의 폴리펩티드 단편들을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 내부에 또는 이의 단부에 포함시킬 수 있다.

[0309] 본 발명의 추가 양상에서, 본 발명의 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 특정 양상에서 본 발명의 하나 이상의 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 이러한 폴리뉴클레오티드 및 벡터는 각각의 폴리뉴클레오티드 및 벡터와 관련하여 본원에 기재된 특징들 중 어느 하나를 단독으로 또는 조합하여 통합할 수 있다. 한 양상에서, 숙주 세포는 본 발명의 항체(의 부분)를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함한다(예를 들어 상기 벡터로 형질전환되거나 형질감염되었다). 본원에서 사용되는 용어 "숙주 세포"는 본 발명의 융합 단백질 또는 이의 단편을 생성하도록 조작될 수 있는 임의의 종류의 세포 시스템을 지칭한다. 항원 결합 분자를 복제하고 이의 발현을 지원하기에 적합한 숙주 세포는 해당 분야에 널리 공지이다. 이러한 세포는 특정한 발현 벡터로 적절히 형질감염 또는 형질도입 될 수 있으며 다량의 벡터 함유 세포를 대규모 발효장치의 씨딩을 위해 증식시켜 임상용으로 충분한 양의 항원 결합 분자를 수득할 수 있다. 적합한 숙주 세포는 원핵 미생물, 예를 들어, 대장균, 또는 다양한 진핵생물 세포, 예를 들어, 중국 햄스터 난소 세포(CHO), 곤충 세포 등을 포함한다. 예를 들어 폴리펩티드는, 특히 당화가 필요하지 않은 경우, 박테리아에서 생성될 수 있다. 발현 후에, 이러한 폴리펩티드는 용액 분획 중의 박테리아 세포 페이스트로부터 단리되어 추가로 정제될 수 있다. 원핵세포 이외에도, 진핵 미생물, 이를 테면 섬유상 진균 또는 효모는 폴리펩티드-인코딩 벡터의 적절한 클로닝 또는 발현 숙주이며, 여기에는 당화 경로가 "인간화되고", 결과적으로 부분적으로 또는 온전하게 인간 당화 패턴을 가진 폴리펩티드가 생산되는 진균 및 효모 균주가 포함된다. Gerngross, *Nat Biotech* 22, 1409-1414 (2004), and Li 외, *Nat Biotech* 24, 210-215 (2006)를 참조하라.

[0310] (당화된) 폴리펩티드의 발현에 적합한 숙주 세포들은 또한 다세포 유기체 (무척추동물 및 척추동물)로부터 유래한다. 무척추동물 세포들의 예로는 식물 및 곤충 세포들이 포함된다. 스포도프테라 푸르기페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포들의 형질감염을 위하여 곤충 세포들과 병용될 수 있는 많은 베칼로바이러스 균주들이 확인되었다. 식물 세포 배양물 또한 숙주로 이용될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, 및 6,417,429호를 참고하라 (유전자삽입 식물에서 항체를 생산하기 위한 PLANTIBODIES™을 설명). 척추동물 세포들 또한 숙주로 이용될 수 있다. 예를 들면, 현탁액에서 성장하도록 개조시킨 포유동물 세포주들이 유용할 수 있다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 다른 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7); 인간 배아 신장 세포주 (예를 들면, Graham 등, *J. Gen Virol.* 36, 59 (1977)에 설명된 293 또는 293T 세포), 아기 햄스터 신장 세포 (BHK); 마우스 세르틀리 세포 (예를 들면, Mather, *Biol. Reprod.* 23, 243-251 (1980)에 설명된 TM4 세포), 원숭이 신장 세포 (CV1); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76), 인간 경부 암종 세포 (HELA); 개 신장 세포 (MDCK), 버팔로 래트 간 세포 (BRL 3A), 인간 폐 세포 (W138), 인간 간 세포 (Hep G2), 마우스 유방 종양 세포 (MMT 060562), (예를 들면, Mather 등, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383, 44-68 (1982)에 설명된) TRI 세포, MRC 5 세포, 및 FS4 세포이다. 다른 유용한 포유동물 숙주

세포주는 DHFR-CHO 세포를 포함하는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 (Urlaub 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216 (1980)); 및 YO, NS0, P3X63 및 Sp2/0과 같은 골수종 세포주를 포함한다. 단백질 생산에 적합한 특정 포유동물 숙주 세포주의 검토는 예를 들어, Yazaki 및 Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)를 참고하라. 숙주 세포는 배양된 세포, 예를 들어, 몇가지 언급하자면, 포유동물 배양된 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 박테리아 세포 및 식물 세포를 포함하나, 또한 유전자삽입 동물, 유전자삽입 식물 또는 배양된 식물 또는 동물 조직내에 포함된 세포를 포함한다. 한 실시형태에서, 상기 숙주 세포는 진핵 세포, 바람직하게는 포유동물 세포, 예를 들어, 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포, 인간 배아 신장(HEK) 세포 또는 림프구 세포 (예를 들어, YO, NS0, Sp20 세포)이다. 이들 시스템에서 외래 유전자를 발현시키는 표준 기술은 해당 분야에 공지되어 있다. 면역글로불린의 중쇄 또는 경쇄를 포함하는 폴리펩티드를 발현하는 세포들은, 면역글로불린 사슬의 다른 하나를 또한 발현하도록 조작되어, 발현된 생성물이 중쇄 및 경쇄를 모두 갖는 면역글로불린이 되게 할 수 있다.

[0311] 한 양상에서, 본 발명의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 이의 폴리펩티드 단편의 생산 방법이 제공되며, 이때 이 방법은 본 발명의 항체 또는 이의 폴리펩티드 단편을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포를, 본 발명의 항체 또는 이의 폴리펩티드 단편의 발현에 적합한 조건하에서 본원에 제시된 바와 같이 배양하는 것, 그리고 숙주 세포(또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 본 발명의 항체 또는 이의 폴리펩티드 단편을 회수하는 것을 포함한다.

[0312] 특정 양상들에서, 항원 결합 분자의 일부를 형성하는 Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인(예를 들어 Fab 단편)들은 적어도 항원에 결합할 수 있는 면역글로불린 가변 영역을 포함한다. 가변 영역은 천연 또는 비천연 항체 및 이의 단편의 일부를 형성하며 이로부터 유래될 수 있다. 다클론 항체 및 단클론 항체의 생산 방법은 해당 분야에 공지이다 (예를 들어, Harlow and Lane, "a laboratory manual" 참조). 비천연 항체는 고상 펩티드 합성을 사용하여 제작될 수 있거나, 재조합적으로 생산될 수 있거나(예를 들어 US 4,186,567에 기재된 바와 같이), 또는 예를 들어 가변 중쇄 및 가변 경쇄를 포함하는 조합 라이브러리들을 스크리닝함으로써 획득될 수 있다(예를 들어 US 특허 제 5,969,108(McCafferty) 참조).

[0313] 면역글로불린의 임의의 동물 종을 본 발명에 사용할 수 있다. 본 발명에 유용한 비제한적인 면역글로불린은 쥐과, 영장류, 또는 인간 기원일 수 있다. 융합 단백질이 인간용인 경우, 면역글로불린의 불변 영역이 인간 유래인 키메라 형태의 면역글로불린이 사용될 수 있다. 면역글로불린의 인간화 형태 또는 완전한 인간 형태는 또한 해당 분야에 공지된 방법에 따라 제조할 수 있다 (예를 들어, Winter의 미국 특허 제 5,565,332 참조). 인간화를, 예를 들어, 제한없이, (a) 비인간(예를 들어 공여체 항체) CDR을 중요한 프레임워크 잔기(예를 들어 우수한 항원 결합 친화도 또는 항체 기능의 유지에 중요한 것들)를 유지하면서 또는 유지하지 않고 인간(예를 들어 수용체 항체) 프레임워크 및 불변 영역에 이식하는 것, (b) 오직 비인간 특이성-결정 영역(SDR 또는 CDR; 항체-항원 상호작용에 중요한 잔기)만을 인간 프레임워크 및 불변 영역상에 이식하는 것, 또는 (c) 전체 비인간 가변 도메인들을 이식하고, 그러나 이들을 표면 잔기들을 대체하여 인간-유사 섹션으로 "은폐"하는 것을 비롯한 다양한 방법들에 의해 구현할 수 있다. 인간화된 항체 및 그의 제조 방법은 예를 들어, Almagro and Fransson, Front Biosci 13, 1619-1633 (2008)에 검토되어 있으며, 그리고 또한 Riechmann 등, Nature 332, 323-329 (1988); Queen 등, Proc Natl Acad Sci USA 86, 10029-10033 (1989); US Patent Nos. 5,821,337, 7,527,791, 6,982,321, and 7,087,409; Jones 등, Nature 321, 522-525 (1986); Morrison 등, Proc Natl Acad Sci 81, 6851-6855 (1984); Morrison and Oi, Adv Immunol 44, 65-92 (1988); Verhoeven 등, Science 239, 1534-1536 (1988); Padlan, Molec Immun 31(3), 169-217 (1994); Kashmiri 등, Methods 36, 25-34 (2005) (SDR (a-CDR) 이식을 기재); Padlan, Mol Immunol 28, 489-498 (1991) ("표면 노출 잔기 변형(resurfacing)"을 기재); Dall'Acqua 등, Methods 36, 43-60 (2005) ("FR-셔플링"을 기재); 및 Osbourn 등, Methods 36, 61-68 (2005) 및 Klimka 등, Br J Cancer 83, 252-260 (2000)(FR 셔플링으로의 "유도된 선별" 접근법을 기재)에 상세히 설명되어 있다. 본 발명에 따른 특정한 면역글로불린은 인간 면역글로불린이다. 인간 항체 및 인간 가변 영역을 해당 분야에 공지된 다양한 기술을 사용하여 생산할 수 있다. 인간 항체는 일반적으로 van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001) 및 Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20, 450-459 (2008)에 기재되어 있다. 인간 가변 영역은 하이브리도마 방법에 의해 제조된 인간 단클론 항체의 일부분을 형성하며 이로부터 유래될 수 있다 (예를 들어, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987) 참조). 인간 항체 및 인간 가변 영역은, 또한, 항원 공격에 반응하여 완전한 인간 항체 또는 인간 가변 영역을 갖는 온전한 항체를 생산하도록 변형시킨 유전자삽입 동물에게 면역원을 투여함으로써 제조할 수 있다 (예를 들어, Lonberg, Nat Biotech 23, 1117-1125 (2005) 참조). 인간 항체 및 인간 가변 영역은 또한 인간 유래 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변 영역 서열들을 단리함으로써

써 생성될 수 있다 (예를 들어, Hoogenboom 외, in *Methods in Molecular Biology* 178, 1-37 (O'Brien 등, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001); 및 McCafferty 등, *Nature* 348, 552-554; Clackson 등, *Nature* 352, 624-628 (1991) 참조). 파지는 일반적으로 항체 단편들을 단일 사슬 Fv(scFv) 단편 또는 Fab 단편으로 표시한다.

[0314] 특정 양상들에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자에 포함되는 항원 결합 도메인들은 예를 들어 PCT 공개공보 WO 2012/020006 (친화도 성숙에 관한 실시예를 참조) 또는 U.S. 특허 출원 공개공보 2004/0132066에 개시된 방법들(예를 들어, 친화도 성숙에 관한 실시예 참조)에 따라 향상된 결합 친화도를 갖도록 조작된다. 특정한 항원 결정인자에 결합하는 본 발명의 항원 결합 분자의 능력은 효소-결합된 면역흡착 분석(ELISA) 또는 당업자에게 친숙한 다른 기술, 예를 들어 표면 플라즈몬 공명 기술(Liljeblad 등, *Glyco J* 17, 323-329 (2000)), 및 전통적인 결합 분석(Heeley, *Endocr Res* 28, 217-229 (2002))을 통해 측정될 수 있다. 경쟁 분석을 사용하여 특정한 항원에 대한 결합에 대해 참조 항체와 경쟁하는 항원 결합 분자를 식별할 수 있다. 특정 실시형태에서, 이러한 경쟁 항원 결합 분자는 참조 항원 결합 분자에 의해 결합되는 것과 동일한 에피토프(예를 들어 선형 또는 입체형태 에피토프)에 결합한다. 항원 결합 분자가 결합하는 에피토프를 맵핑하기 위한 상세한 예시적 방법이 "Epitope Mapping Protocols," in *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)에 제공된다. 예시적인 경쟁 분석에서, 고정된 항원은 항원에 결합하는 표지된 제1 항원 결합 분자 및 항원에 결합하기 위해 제1 항원 결합 분자와 경쟁하는 능력에 대해 테스트되는 표지되지 않은 제2 항원 결합 분자를 포함하는 용액에서 인큐베이션된다. 제2 항원 결합 분자는 하이브리도마 상청액에 존재할 수 있다. 대조군으로서, 고정된 항원은 표지된 제1 항원 결합 분자를 포함하지만 표지되지 않은 제2 항원 결합 분자는 포함하지 않는 용액에서 인큐베이션된다. 항원에 대한 제1 항체의 결합을 허용하는 조건하에서 인큐베이션한 후, 과량의 결합되지 않은 항체를 제거하고, 고정된 항원과 결합된 표지의 양을 측정한다. 고정된 항원과 결합된 표지의 양이 대조 샘플에 비해 테스트 샘플에서 실질적으로 감소하면, 이는 제2 항원 결합 분자가 항원에 대한 결합을 위해 제1 항원 결합 분자와 경쟁하고 있음을 나타낸다. Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14(Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) 참조.

[0315] 본원에 기재된 바와 같이 제조된 본 발명의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 해당 분야에 공지된 기술, 예를 들어 고성능 액체 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 젤 전기영동, 친화도 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 등에 의해 정제할 수 있다. 특정 단백질의 정제에 사용되는 실제 조건은 부분적으로, 순 전하, 소수성, 친수성 등과 같은 요인들에 따라 달라질 것이며, 이는 당업자들에게 자명할 것이다. 친화도 크로마토그래피 정제를 위해서, 항원 결합 분자가 결합하는 항체, 리간드, 수용체 또는 항원을 사용할 수 있다. 예를 들어 본 발명의 항원 결합 분자의 친화도 크로마토그래피 정제를 위해서, 단백질 A 또는 단백질 G를 갖는 기질을 사용할 수 있다. 순차적인 단백질 A 또는 G 친화도 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토 그래피를 사용하여 본질적으로 실시예에 기재된 바와 같이 항원 결합 분자를 분리할 수 있다. CD28 항원 결합 분자 또는 이의 단편의 순도를 젤 전기영동, 고압 액체 크로마토그래피 등을 포함한 임의의 다양한 공지의 분석 방법들에 의해 측정할 수 있다. 예를 들어, 실시예들에 기재된 바와 같이 발현된 CD28 항원 결합 분자는 환원 및 비-환원 SDS-PAGE에 의해 입증된 바와 같이 온전하고 적절하게 조립된 것으로 나타났다.

[0316] **분석**

[0317] 본원에 제공된 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자는 해당 분야에 공지된 다양한 분석법에 의해 그 물리적/화학적 특성 및/또는 생물학적 활성에 대해 확인, 스크리닝 또는 특성화될 수 있다.

[0318] **1. 친화도 분석**

[0319] 본원에 제공된 항원 결합 분자의 해당 표적에 대한 친화도는 실시예에 제시된 방법들에 따라서 표준 기기, 예를 들어, Proteon 기기(Bio-rad), 및 재조합 발현에 의해 수득될 수 있는 수용체 또는 표적 단백질을 사용하여 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 측정할 수 있다. 항원 결합 분자의 표적 세포 항원에 대한 친화도 또한 표준 기기, 예를 들어, Proteon 기기(Bio-rad), 및 재조합 발현에 의해 수득될 수 있는 수용체 또는 표적 단백질을 사용하여 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 측정할 수 있다. 한 양상에 따라, K_D 는 25 °C에서 Proteon ® 기기(Bio-Rad)를 사용한 표면 플라즈몬 공명으로 측정된다.

[0320] **2. 결합 분석 및 기타 분석**

[0321] 본원에 제공된 이중특이적 항원 결합 분자의 상응하는 수용체 발현 세포에 대한 결합은 특정 수용체 또는 표적 항원을 발현하는 세포주를 사용하여 예를 들어 유세포분석(FACS)에 의해 평가될 수 있다. 한 양상에서, 인간

CD28을 발현하는 CHO 세포(인간 CD28을 안정적으로 과발현하도록 변형된 부모 세포주 CHO-k1 ATCC #CCL-61)가 결합 분석에 사용된다.

[0322] 추가 양상에서, Her2를 발현하는 암 세포주(예를 들어, 인간 유방암 세포주 KPL-4, Kawasaki Medical School)를 사용하여 표적 세포 항원에 대한 이중특이적 항원 결합 분자의 결합을 입증하였다.

[0323] **3. 활성 분석**

[0324] 한 양상에서, 생물학적 활성을 갖는 CD28 항원 결합 분자를 확인하기 위한 분석이 제공된다. 생물학적 활성은 예를 들어 실시예 3에 기재된 바와 같은 방법으로 측정된 T 세포 활성화 및 사이토카인 분비 또는 종양 세포 사멸을 포함할 수 있다. 또한, 이러한 생체내 및/또는 시험관내 생물학적 활성을 갖는 항원 결합 분자가 제공된다.

[0325] **약학 조성물, 제형 및 투여 경로**

[0326] 한 추가 양상에서, 본 발명은 예를 들어 임의의 하기 치료 방법에 사용하기 위한 본원에 제공된 임의의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 한 실시형태에서, 약학 조성물은 본원에 제공된 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 및 적어도 하나의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함한다. 또 다른 양상에서, 약학 조성물은 본원에 제공된 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 및 적어도 하나의 추가 치료제, 예를 들어 아래 기재되는 치료제를 포함한다.

[0327] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용되는 부형제에 용해되거나 분산된, 치료적 유효량의 하나 이상의 이중특이적 항원 결합 분자를 포함한다. 문구 "약학적으로 또는 약리학적으로 허용되는"은 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 일반적으로 무독성인, 즉, 동물, 예를 들어 인간에게 적절히 투여시 불리하거나, 알려지거나 또는 다른 부적합한 반응을 생성시키지 않는 분자 모이어티 및 조성물을 지칭한다. 적어도 하나의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 및 선택적으로 추가적인 활성 성분을 함유하는 약학 조성물 제제는 본 발명에 참고로 인용된 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990에 예시된 바와 같이, 본원의 내용에 비추어 당업자들에게 공지되어 있을 것이다. 특히, 이러한 조성물은 동결건조된 제형 또는 수용액이다. 본원에 사용되는, "약학적으로 허용되는 부형제"는 당업자에게 공지된 모든 용매, 완충제, 분산 매질, 코팅제, 계면활성제, 산화방지제, 보존제(예를 들어, 항균제, 항진균제), 등장화제, 염, 안정화제 및 이들의 조합을 포함한다.

[0328] 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 패밀리 리간드 삼량체-함유 항원 결합 분자를 수용액 중에, 바람직하게는 생리학적으로 적합한 완충제, 예를 들어 Hank 용액, Ringer액, 또는 생리식염수 완충제에서 제형화할 수 있다. 이러한 용액은 제형화제, 예를 들어 현탁, 안정화 및/또는 분산제를 함유할 수 있다. 한편으로, 이러한 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자는 사용전에 적합한 비히클, 예를 들어 멸균된 발열물질-미함유 수로 조성되는 분말 형태 중에 존재할 수 있다. 멸균 주사액은 본 발명의 용합 단백질을 필요에 따라, 이하에 열거되는 다양한 다른 성분들과 함께 적합한 용매에 필요한 양으로 혼입시킴으로써 제조된다. 멸균은 예를 들어, 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 용이하게 구현될 수 있다. 일반적으로, 분산물은 기본 분산 매질 및/또는 그 외 성분들을 함유하는 멸균 운반체에 다양한 멸균 활성 성분들을 혼입시킴으로써 제조된다. 멸균 주사 용액, 현탁액 또는 에멀전 제조용 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 또는 동결-건조 기술이며 이 방법은 사전에 멸균-여과된 이의 액체 매질로부터 활성 성분과 함께 원하는 임의의 추가 성분으로 된 분말을 생성한다. 상기 액체 매질을 필요한 경우 적합하게 완충시켜야 하며 상기 액체 희석제는 주사전에 먼저 충분한 염수 또는 포도당으로 등장성으로 만들어야 한다. 이러한 조성물은 제조 및 보관 조건들하에서 안정하여야 하며 미생물, 가령, 박테리아 및 진균의 오염 작용에 대하여 보존되어야 한다. 내독소 오염을, 예를 들어 0.5 ng/mg 단백질 미만의 안전 수준에서 최소로 유지시켜야 함을 알 것이다. 적합한 약학적으로 허용되는 부형제는 완충액, 예를 들어, 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제 (예를 들어, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토니움 클로라이드; 벤잘코니움 클로라이드; 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부탈 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤 예를 들어, 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르치놀; 시클로헥사놀; 3-펜타놀; 그리고 m-크레졸); 낮은 분자량의 (약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어, 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로블린; 친수성 중합체 예를 들어, 폴리비닐피롤리돈; 아미노산 예를 들어, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드, 그리고 글루코스, 만노스, 또는 텍스트린을 포함하는 기타 탄수화물; 킬레이트 물질 예를 들어, EDTA; 당, 예를 들어, 슈크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 카운터-이온, 예를 들

어, 나트륨; 금속 복합체 (예를 들어 Zn-단백질 복합체); 및/또는 비-이온성 계면활성제 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 수성 주사 현탁액은 현탁액의 점성도를 증가시키는 화합물들, 가령, 소듐 카복시메틸 셀룰로오스, 소르비톨, 또는 텍스트란 등을 함유할 수 있다. 선택적으로, 현탁액은 또한 적합한 안정화제 또는 고농축 용액을 제조할 수 있도록 화합물들의 용해도를 증가시키는 제제들을 함유할 수 있다. 추가로, 활성 화합물들의 현탁액은 적절한 유성 주사 현탁액으로 제조될 수 있다. 적합한 친유성 용매 또는 비히클에는 지방 오일, 가령, 참기름, 또는 합성 지방산 에스터, 가령, 에틸 올레이트 또는 트라이글리세라이드, 또는 리포솜이 포함된다.

[0329] 활성 성분은 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 미소구, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐)에서 각각 코아세르베이션 기술에 의해 또는 계면 중합, 예를 들어 하이드록시메틸셀룰로오스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐에 의해 준비된 마이크로캡슐 또는 마크로에멀전 (macroemulsions)안에 포집될 수 있다. 이러한 기술은 Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Ed. Mack Printing Company, 1990)에 개시되어 있다. 서방형 제제가 제조될 수 있다. 서방형 제제의 적합한 예들에는 상기 폴리펩티드를 함유하는 고체 소수성 폴리머의 반투과성 매트릭스가 포함되며, 이러한 매트릭스는 성형된 제품 형태, 예를 들어 필름, 또는 마이크로캡슐 형태로 존재한다. 특정 실시형태에서, 주사 조성물의 흡수 연장은 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트, 젤라틴, 또는 이의 조합을 조성물에 사용함으로써 이루어질 수 있다. 본원에서 예시적인 약학적으로 허용되는 부형제는 세포간(interstitial) 약물 분산 물질, 예를 들어, 가용성 중성-활성 히알루로니다제 당단백질 (sHASEGP), 예를 들면, 인간 가용성 PH-20 히알루로니다제 당단백질, 이를 테면, rHuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.)을 포함한다. rHuPH20를 포함하는 특정 예시적인 sHASEGP 및 이를 이용하는 방법은 미국 공개 특허 출원 제2005/0260186 및 2006/0104968에 기재되어 있다. 한 양상에서, sHASEGP는 하나 또는 그 이상의 추가 글리코사미노글리카나제, 예를 들어, 콘드로이티나제와 조합된다. 예시적인 동결건조된 항체 제형은 미국 특허 제 6,267,958에 기재되어 있다. 수용액 항체 제형은 미국 특허 제 6,171,586 및 WO2006/044908에 기재된 것들을 포함하며, 후자의 제형은 히스티딘-아세트이트 완충액을 포함한다. 앞서 기재된 조성물들 외에, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자는 또한 데포 제제로 제제화될 수 있다. 이러한 장기 작용 제형은 이식(예를 들어 피하 또는 근육내)에 의해 또는 근육내 주사에 의해 투여될 수 있다. 그러므로, 예를 들어, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자는 적합한 중합체 또는 소수성 재료 (예를 들어, 허용가능한 오일 중의 에멀전으로서) 또는 이온 교환 수지와 함께, 또는 난용성 유도체로서, 예를 들어, 난용성 염으로서 제형화될 수 있다.

[0330] 본 발명의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 포함하는 약학 조성물을 통상적인 혼합, 용해, 유화, 캡슐화, 포집 또는 동결건조 공정에 의해 제조할 수 있다. 약학 조성물을 하나 이상의 생리학적으로 허용되는 담체, 희석제, 부형제, 또는 이러한 단백질의, 약학적으로 사용될 수 있는 제제로의 가공을 용이하게 하는 보조제를 사용하여 통상적인 방식으로 제형화할 수 있다. 적합한 제형은 선택된 투여 경로에 따라 달라진다. 본 발명의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자는 유리산 또는 염기, 중성 또는 염 형태의 조성물로 제형화될 수 있다. 약학적으로 허용되는 염은 상기 유리산 또는 염기의 생물학적 활성을 실질적으로 유지시키는 염이다. 이들은 산부가 염, 예를 들어, 단백질성 조성물의 유리 아미노기로 형성된 것, 또는 무기산, 가령, 예를 들면, 염산 또는 인산, 또는 아세트산, 옥살산, 타르타르산 또는 만델산과 같은 유기산으로 형성된 것들을 포함한다. 유리 카복실기를 이용하여 형성된 염은 또한 무기 염기, 가령, 예를 들어, 수산화 나트륨, 수산화 칼륨, 수산화 암모늄, 수산화 칼슘, 또는 수산화 철 (ferric hydroxides); 또는, 유기 염기, 가령, 아이소프로필아민, 트라이메틸아민, 히스티딘, 또는 프로케인으로부터 유도될 수 있다. 약학적 염은 상응하는 유리 염기 형태보다 수성 및 다른 양성자성 용매 중에서 더 용해성으로 되는 성향이 있다. 본원의 조성물은 또한 치료되는 특정 적응증에 필요한 둘 이상의 활성 성분, 바람직하게는 서로 불리하게 영향을 미치지 않는 상보적 활성을 갖는 성분을 함유할 수 있다. 이러한 활성 성분은 의도한 목적에 유효한 양으로 조합되어 적절하게 존재한다. 생체내 투여에 사용되는 제형은 일반적으로 멸균이다. 멸균은 예를 들어, 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 용이하게 구현될 수 있다.

[0331] **치료 방법 및 조성물**

[0332] 본원에 제공된 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자는 치료 방법에 단독으로 또는 병용으로 사용될 수 있다.

[0333] 한 양상에서, 의약으로 사용하기 위한 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공된다. 추가 양상들에서, 암 치료에 사용하기 위한 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공된다. 특정 양상들에서, 치료 방법에 사용하기 위한 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공된다. 특정 양상들에서, 유효량의 이중특이적 작

용성 CD28 항원 결합 분자를 개체에게 투여하는 것을 포함하는 암을 가진 개체의 치료 방법에 사용하기 위한 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 제공한다. 이러한 한 실시형태에서, 상기 방법은 예를 들어, 유효량의 최소 하나의 추가 치료제를 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0334] 한 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자는 Her2-발현 암 세포의 성장을 억제하는데 사용하기 위한 것이다. 따라서, 특정 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자는 Her2-양성 암을 치료하는데 사용하기 위한 것이다. Her2-양성 암의 예는 유방암, 난소암, 위암, 방광암, 침샘암, 자궁내막암, 췌장암 및 비소세포 폐암(NSCLC)이다. 한 양상에서, Her2-양성 암은 Her2+ 양성 유방암, 예를 들어, 초기 또는 국소적으로 진행된 Her2+ 양성 유방암이다. 그러므로, 이러한 암의 치료에 사용하기 위한 본원에 기재된 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공된다. 치료를 필요로 하는 대상체, 환자 또는 "개체"는 일반적으로 포유동물, 보다 구체적으로 인간이다.

[0335] 특정 양상들에서, 치료 방법에 사용하기 위한 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공된다. 특정 양상들에서, 유효량의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 개체에게 투여하는 것을 포함하는 암을 가진 개체의 치료 방법에 사용하기 위한 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 제공한다. 또 다른 양상에서, 유효량의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, her2-양성 암, 특히 유방암, 난소암, 위암, 방광암, 침샘암, 자궁내막암, 췌장암 및 비-소세포 폐암(NSCLC)을 갖는 개체를 치료하는 방법에서 사용하기 위한 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공된다. 이러한 한 실시형태에서, 상기 방법은 예를 들어, 유효량의 최소 하나의 추가 치료제를 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0336] 추가 양상에서, 본원은 약제의 제조 또는 조제에서 본원에 기재된 바와 같은 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자의 용도를 제공한다. 한 실시형태에서, 약제는 암, 특히, Her2-양성 암의 치료를 위한 것이다. 한 추가 양상에서, 약제는 암을 가진 개체에게 유효량의 약제를 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법에서의 용도에 관한 것이다. 이러한 한 양상에서, 상기 방법은 예를 들어, 아래에 기재된 바와 같은 유효량의 적어도 하나의 추가 치료제를 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 또 다른 양상에서, 약제는 Her2-양성 암의 치료를 위한 것이다. 한 추가 양상에서, 약제는 암을 가진 개체에게 유효량의 약제를 투여하는 것을 포함하는, 암, 특히, Her2-양성 암을 치료하는 방법에서의 용도에 관한 것이다. 추가 양상에서, 암, 특히 Her2-양성 암을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 한 양상에서, 상기 방법은 암을 가진 개체에게 유효량의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 투여하는 것을 포함한다. 이러한 한 양상에서, 상기 방법은, 아래에 기재된 바와 같은 유효량의 적어도 하나의 추가 치료제를 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 상기 양상 중 하나에 따른 "개체"는 인간일 수 있다.

[0337] 한 추가 양상에서, 본원은 예를 들어, 상기 치료 방법에 사용하기 위한 본원에 보고된 임의의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 포함하는 약학 제형을 제공한다. 한 양상에서, 약학 제형은 본원에 보고된 임의의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 및 약학상 허용되는 담체를 포함한다. 또 다른 양상에서, 약학 제형은 본원에 보고된 임의의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 및 적어도 하나의 추가 치료제를 포함한다.

[0338] 본원에 보고된 바와 같은 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자는 요법에서 단독으로 또는 다른 제제와 병용하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 본원에 보고된 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자는 적어도 하나의 추가 치료제와 공동 투여될 수 있다. 따라서, 암 면역요법에 사용하기 위한 본원에 기재된 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공된다. 특정 실시형태들에서, 암 면역요법에 사용하기 위한 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공된다. 상기 임의의 양상들에 따른 "개체"는 바람직하게는 인간이다.

[0339] 상기의 이러한 병용 요법은 병용 투여(두 가지 또는 그 이상의 요법제가 동일한 또는 별도 제제 안에 함유됨), 및 별도 투여를 포함하고, 이 경우, 상기 본원에 보고된 바와 같은 항체의 투여는 추가적인 요법제 및/또는 요법제들의 투여 이전, 동시 및/또는 이후에 일어난다. 한 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자의 투여 및 추가의 치료제의 투여는 서로 약 1개월 이내 또는 약 1, 2 또는 3주 이내 또는 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일 또는 6일내에 일어난다.

[0340] 본원에 보고된 바와 같은 항원 결합 분자 (및 임의의 추가 치료제)는 비경구, 폐내 및 비강내를 포함하는 임의의 적합한 수단에 의해 투여될 수 있고, 국소 치료의 경우 필요에 따라 병변내 투여될 수 있다. 비경구 주입에는 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여가 포함된다. 투약은 부분적으로는 투약이 단기인지 만성인지에 따라 임의의 적합한 경로, 예를 들어, 주사, 가령, 정맥내 또는 피하 주사에 의해 이루어질 수 있다. 단일 또는 다양한 시점에 걸친 다중 투여, 일시 투여 및 펄스 주입을 비롯한(그러나 이에 제한되지 않는) 다양한 투약 일정이 본원에서 고려된다.

[0341] 본원에 기재된 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자는 모범 의료행위 지침과 일치하는 방식으로 제형화, 투여 및 투여될 것이다. 이와 관련하여 고려해야 할 요소에는 치료 중인 특정 장애, 치료 중인 특정 포유동물, 개별 환자의 임상 병태, 장애의 원인, 제제 전달 부위, 투여 방법, 투여 일정, 및 의료 종사자에게 알려진 기타 요소가 포함된다. 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자는 꼭 그럴 필요는 없지만, 문제의 장애를 예방하거나 치료하기 위해 현재 사용되는 하나 이상의 제제와 함께 선택적으로 제형화된다. 이러한 다른 물질들의 유효량은 제형에 존재하는 항체 또는 면역접합체의 양, 질환 또는 치료의 유형, 그리고 상기에서 논의된 다른 인자들에 따라 달라진다. 이들은 일반적으로 본원에 설명된 투여 경로로 동일한 투여량으로 이용되거나, 또는 본원에서 논의된 투여량의 약 1 내지 99%, 또는 실험적으로/임상적으로 적절한 것으로 판단된 임의의 투여량 및 임의의 경로로 이용된다.

[0342] 질환의 예방 또는 치료를 위한, 본원에 기재된 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자의 적절한 용량(단독으로 또는 한 가지 이상의 다른 추가 치료제와 병용될 때)은 치료되는 질환의 유형, 항체의 유형, 질환의 중증도 및 과정, 항체가 예방적 또는 치료적 목적으로 투여되는지 여부, 선행 요법, 환자의 임상 병력 및 항체에 대한 반응, 그리고 주치의의 재량에 따라 달라질 것이다. 이러한 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자는 한 번에 또는 일련의 치료일정에 걸쳐 환자에게 적절하게 투여된다. 질환의 유형 및 중증도에 따르면, 약 1 µg/kg 내지 15 mg/kg (예를 들어, 0.5 mg/kg - 10 mg/kg)의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자는 예를 들어 1회 이상의 개별 투여에 의해 또는 연속 주입에 의해 환자에게 투여하기 위한 초기 후보 투여량일 수 있다. 상기 언급된 요소들에 따라, 하나의 전형적인 일일 투여량의 범위는 약 1 µg/kg 내지 100 mg/kg 또는 그 이상이 될 수 있다. 수일 또는 보다 장기에 걸친 반복된 투여를 위하여, 병태에 따라, 치료는 일반적으로 질환 증세가 바람직하게 억제될 때까지 지속될 것이다. 상기 항체 또는 면역접합체의 한 가지 예시적인 투여량은 약 0.05 mg/kg 내지 약 10 mg/kg 범위 일 것이다. 따라서, 약 0.5mg/kg, 2.0mg/kg, 4.0mg/kg 또는 10mg/kg(또는 이의 임의의 조합)의 하나 이상의 용량이 환자에게 투여될 수 있다. 이러한 용량은 간헐적으로, 예를 들면 매주 또는 3주마다 투여될 수 있다 (예를 들면 상기 환자는 약 2 내지 약 20회, 또는 예를 들면 약 6회 용량의 항체를 제공받는다). 초기에는 보다 높은 부하 용량, 후속하여 보다 낮은 하나 이상의 용량이 투여될 수 있다. 그러나, 다른 투여량 요법이 유용할 수 있다. 이 요법의 진행은 통상적인 기술 및 분석에 의해 용이하게 모니터링된다.

[0343] **기타 제제 및 치료**

[0344] 상기 기재한 바와 같이, 본 발명의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자는 요법에서 하나 이상의 기타 제제와 병용하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항원 결합 분자는 적어도 하나의 추가 치료제와 공동 투여될 수 있다. 용어 "치료제"는 치료를 필요로 하는 개체의 증상 또는 질환을 치료하기 위해 투여될 수 있는 임의의 제제를 포괄한다. 이러한 추가 치료제는 치료되는 특정 적응증에 적합한 임의의 활성 성분, 바람직하게는 서로 유해 효과를 주지 않는 상보적 활성을 갖는 것을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 추가 치료제는 또 다른 항암제, 예를 들어 미세소관 파괴제, 항대사제, 토포이소머라제 억제제, DNA 삽입제, 알킬화제, 호르몬 요법, 키나제 억제제, 수용체 길항제, 종양 세포 사멸의 활성화제, 또는 항혈관신생제이다. 특정 양상에서, 추가 치료제는 면역조절제, 세포증식 억제제, 세포 부착 억제제, 세포독성제 또는 세포증식억제제, 세포 사멸의 활성화제, 또는 세포사멸 유도제에 대한 세포의 감수성을 증가시키는 제제이다.

[0345] 따라서, 암 치료에 사용하기 위한 본 발명의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 이를 포함하는 약학 조성물이 제공되며, 여기서 이중특이적 항원 결합 분자는 화학요법제, 방사선 및/또는 암 면역요법에 사용하는 기타 제제와 병용 투여된다.

[0346] 이러한 기타 제제는 의도한 목적에 유효한 양으로 조합되어 적절하게 존재한다. 이러한 다른 제제의 유효량은 사용된 용합 단백질의 양, 장애 또는 치료의 유형, 및 상기 논의된 기타 요소들에 따라 다르다. 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자 또는 항체는 일반적으로 본원에서 설명된 바와 같은 투여 경로로 동일한 투여량으로 이용되거나, 또는 본원에서 논의된 투여량의 약 1 내지 99%, 또는 실험적으로/임상적으로 적절한 것으로 판단된 임의의 투여량 및 임의의 경로로 이용된다. 상기의 이러한 병용 요법은 병용 투여(두 가지 또는 그 이상의 요법제가 동일한 또는 별도 조성물 안에 함유됨), 및 별도 투여를 포함하고, 이 경우, 상기 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자 또는 항체의 투여는 추가적인 요법제 및/또는 보조제들의 투여 이전, 동시 및/또는 이후에 일어난다.

[0347] 추가 양상에서, 암, 특히, Her2-양성 암 치료에 사용하기 위한 본원에 기재된 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 이중특이적 항원 결합 분자는 또 다른 면역조절제와 병용 투여된다. 용어 "면역조절제"는 면역 체계에 영향을 미치는 단클론 항체를 포함하는 모든 물질을 지칭한다. 본 발명의 분자는 면역조절

제로 간주될 수 있다. 면역 조절제는 암 치료를 위한 항종양제(항-neoplastic agents)로 사용될 수 있다. 한 양상에서, 면역조절제는 항-CTLA4 항체(예를 들어, 이필리무맙), 항-PD1 항체(예를 들어, 니볼루맙 또는 펌브롤리주맙), PD-L1 항체(예를 들어, 아테졸리주맙, 아벨루맙 또는 더발루맙), OX-40 항체, 4-1BB 항체 및 GITR 항체를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기의 이러한 병용 요법은 병용 투여(두 가지 또는 그 이상의 요법제가 동일한 또는 별도 조성물 안에 함유됨), 및 별도 투여를 포함하고, 이 경우, 상기 이중특이적 항원 결합 분자의 투여는 추가적인 요법제 및/또는 보조제들의 투여 이전, 동시 및/또는 이후에 일어난다.

[0348] **T 세포 이중특이적 항체와의 병용**

[0349] 한 양상에서, 본 발명의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자는 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체와 병용 투여될 수 있다. 한 양상에서, 종양 관련 항원에 특이적인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체는 항-Her2/항-CD3 이중특이적 항체이다. 한 양상에서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 적어도 하나의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자는 항-Her2/항-CD3 이중특이적 항체와 병용 투여하기에 적합하다. 한 양상에서, 항-Her2/항-CD3 항체는 CD3에 결합하는 제1 항원 결합 도메인, 및 Her2에 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다. 특정 양상에서 Her2에 결합하는 제2 결합 도메인은 4-1BBL 삼량체-함유 항원 결합 분자와는 다른 Her2 상의 에피토프에 결합한다.

[0350] 한 양상에서, 본원에서 사용되는 항-Her2/항-CD3 이중특이적 항체는 서열번호 148의 CDR-H1 서열, 서열번호 149의 CDR-H2 서열, 및 서열번호 150의 CDR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HCD3); 및/또는 서열번호 151의 CDR-L1 서열, 서열번호 152의 CDR-L2 서열, 및 서열번호 153의 CDR-L3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LCD3)을 포함하는 제1 항원 결합 도메인을 포함한다. 보다 구체적으로, 항-Her2/항-CD3 이중특이적 항체는 서열번호 154의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 중쇄 가변 영역(V_HCD3) 및/또는 서열번호 155의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 경쇄 가변 영역(V_LCD3)을 포함하는 제1 항원 결합 도메인을 포함한다. 추가 양상에서, 항-Her2/항-CD3 이중특이적 항체는 서열번호 154의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HCD3) 및/또는 서열번호 155의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LCD3)을 포함한다.

[0351] 한 양상에서, 항-Her2/항-CD3 이중특이적 항체는 항체 4D5(트라스투주맙으로 공지된 인간화 버전)와 동일한 에피토프에 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다. 또 다른 양상에서, 항-Her2/항-CD3 이중특이적 항체는 항체 2C4(페르투주맙으로 공지된 인간화 버전)와 동일한 에피토프에 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다. 또한 또 다른 양상에서, 항-Her2/항-CD3 이중특이적 항체는 항체 7C2(미국 특허 제 9,518,118)와 동일한 에피토프에 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0352] 또 다른 양상에서, 항-Her2/항-CD3 이중특이적 항체는 다음을 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다:

[0353] (a) 서열번호 140의 CDR-H1 서열, 서열번호 141의 CDR-H2 서열, 및 서열번호 142의 CDR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2), 및/또는 서열번호 143의 CDR-L1 서열, 서열번호 144의 CDR-L2 서열 및 서열번호 145의 CDR-L3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2), 또는

[0354] (b) 서열번호 132의 CDR-H1 서열, 서열번호 133의 CDR-H2 서열, 및 서열번호 134의 CDR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2), 및/또는 서열번호 135의 CDR-L1 서열, 서열번호 136의 CDR-L2 서열 및 서열번호 137의 CDR-L3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2), 또는

[0355] (c) 서열번호 156의 CDR-H1 서열, 서열번호 157의 CDR-H2 서열, 및 서열번호 158의 CDR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2), 및/또는 서열번호 159의 CDR-L1 서열, 서열번호 160의 CDR-L2 서열 및 서열번호 161의 CDR-L3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2).

[0356] 한 양상에서, 항-Her2/항-CD3 이중특이적 항체는 서열번호 146의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 중쇄 가변 영역(V_HHer2) 및/또는 서열번호 147의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 경쇄 가변 영역(V_LHer2)을 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다. 추가 양상에서, 항-Her2/항-CD3 이중특이적 항체는 서열번호 146의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2) 및/또는 서열번호 147의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2)을 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포

함한다.

- [0357] 한 양상에서, 항-Her2/항-CD3 이중특이적 항체는 서열번호 154의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HCD3) 및/또는 서열번호 155의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LCD3)을 포함하는 제1 항원 결합 도메인 및 서열번호 146의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2) 및/또는 서열번호 147의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2)을 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다.
- [0358] 한 양상에서, 항-Her2/항-CD3 이중특이적 항체는 서열번호 174의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄 및/또는 서열번호 175의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 및 서열번호 176의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 및/또는 서열번호 177의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다(HER2 TDB).
- [0359] 또 다른 양상에서, 항-Her2/항-CD3 이중특이적 항체는 서열번호 138의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 중쇄 가변 영역(V_HHer2) 및/또는 서열번호 139의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 경쇄 가변 영역(V_LHer2)을 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다. 추가 양상에서, 항-Her2/항-CD3 이중특이적 항체는 서열번호 138의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2) 및/또는 서열번호 139의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2)을 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다. 또 다른 양상에서, 항-Her2/항-CD3 이중특이적 항체는 서열번호 162의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 중쇄 가변 영역(V_HHer2) 및/또는 서열번호 163의 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 경쇄 가변 영역(V_LHer2)을 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다. 추가 양상에서, 항-Her2/항-CD3 이중특이적 항체는 서열번호 162의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2) 및/또는 서열번호 163의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2)을 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다.
- [0360] 한 양상에서, 항-Her2/항-CD3 이중특이적 항체는 서열번호 154의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HCD3) 및/또는 서열번호 155의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LCD3)을 포함하는 제1 항원 결합 도메인 및 서열번호 162의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2) 및/또는 서열번호 163의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2)을 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다.
- [0361] 한 추가 양상에서, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자는 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체와 조합하여 사용하기 위한 것이며, T-세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체는 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자와 동시에, 이전 또는 이후에 투여된다.
- [0362] 한 추가 양상에서, 암 치료를 위한 약제의 제조를 위한 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자의 용도가 제공되며, 여기서 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자는 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체, 특히, 항-Her2/항-CD3 이중특이적 항체와 병용하기 위한 것이다. 특정 양상들에서, 치료되는 질환은 Her2-양성 암이다. Her2-양성 암의 예는 유방암, 난소암, 위암, 방광암, 침샘암, 자궁내막암, 췌장암 및 비소세포 폐암(NSCLC)이다. 특정 양상에서, 치료될 암은 Her2-양성 유방암, 특히 Her2-양성 전이성 유방암이다.
- [0363] 추가 양상에서 본 발명은 개체의 암을 치료하는 방법을 제공하며, 이 방법은 상기 개체에게 치료적 유효량의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 및 유효량의 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체, 특히, 상기 정의된 바와 같은 항-Her2/항-CD3 이중특이적 항체를 투여하는 단계를 포함한다. 특정 양상에서, 이러한 방법은 Her2-양성 암의 치료를 위한 것이다. Her2-양성 암의 예는 유방암, 난소암, 위암, 방광암, 침샘암, 자궁내막암, 췌장암 및 비소세포 폐암(NSCLC)이다. 한 양상에서, 이러한 방법은 Her2-양성 전이성 유방암을 치료하기 위한 것이다.
- [0364] 또 다른 양상에서, 본원에 기재된 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 및 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체를 포함하는 조합 생성물이 제공된다. 한 양상에서, 중앙 관련 항원에 특이적인 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체는 항-Her2/항-CD3 이중특이적 항체이다.
- [0365] **PD-L1/PD-1 상호작용을 차단하는 제제들과의 병용**
- [0366] 한 양상에서, 본 발명의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자는 PD-L1/PD-1 상호작용을 차단하는 제제, 예컨대 PD-L1 결합 길항제 또는 PD-1 결합 길항제, 특히, 항-PD-L1 항체 또는 항-PD-1 항체와 병용 투여될 수 있다.

[0367] 한 양상에서, PD-L1/PD-1 상호작용을 차단하는 제제는 항-PD-L1 항체이다. CD274 또는 B7-H1이라고도 알려진 용어 "**PD-L1**"은 영장류(예를 들어, 인간) 비인간 영장류(예를 들어, 사이노몰구스 원숭이) 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트)를 비롯한 척추동물 출처로부터 얻은 임의의 천연 PD-L1, 특히, "인간 PD-L1" 을 지칭한다. 완전한 인간 PD-L1의 아미노산 서열은 UniProt (www.uniprot.org) 등록 번호 Q9NZQ7 (서열번호 164)에 제시되어 있다. 용어 "**PD-L1 결합 길항제**"는 PD-L1과 이의 하나 또는 그 이상의 결합 짝, 이를 테면 PD-1, B7-1과의 상호작용으로 인하여 신호전달을 감소, 차단, 억제, 소멸 또는 간섭하는 분자를 지칭한다. 일부 양상예들에 있어서, PD-L1 결합 길항제는 PD-L1이 이의 결합 짝에 결합하는 것을 억제하는 분자다. 특정 양상에서, 상기 PD-L1 결합 길항제는 PD-L1이 PD-1 및/또는 B7-1에 결합하는 것을 억제한다. 일부 양상들에 있어서, 상기 PD-L1 결합 길항제들은 PD-L1과 하나 또는 그 이상의 이의 결합 짝, 이를 테면 PD-1, B7-1과의 상호작용으로 인하여 생성되는 신호 전달을 감소, 차단, 억제, 소멸 또는 간섭하는 항-PD-L1 항체, 이의 항원 결합 단편들, 면역접합체, 융합 단백질, 올리고펩티드 및 기타 분자를 포함한다. 한 양상에서, PD-L1 결합 길항제는 PD-L1을 통하여 T 림프구 매개된 신호생성에서 발현된 세포 표면 단백질에 의해 또는 이를 통하여 매개된 음성 공동-자극 신호를 감소시켜, 이상기능 T-세포의 기능이상을 더 적게 한다(예로써, 항원 인지에 대한 효과기 반응을 강화). 특히, PD-L1 결합 길항제는 항-PD-L1 항체이다. 용어 "**항-PD-L1 항체**" 또는 "인간 PD-L1에 결합하는 항체" 또는 "인간 PD-L1에 특이적으로 결합하는 항체" 또는 "길항적 항-PD-L1"은, 1.0×10^{-8} mol/l 이하의 KD-값, 한 양상에서, 1.0×10^{-9} mol/l 이하의 KD-값의 결합 친화도로 인간 PD-L1 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 지칭한다. 결합 친화도는 표면 플라즈몬 공명 기술(BIAcore®, GE-Healthcare Uppsala, Sweden)과 같은 표준 결합 분석으로 결정된다. 특정 양상에서, PD-L1/PD-1 상호작용을 차단하는 제제는 항-PD-L1 항체이다. 특정 양상에서, 항-PD-L1 항체는 아테졸리주맙(MPDL3280A, RG7446), 더발루맙(MEDI4736), 아벨루맙(MSB0010718C) 및 MDX-1105로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 양상에서, 항-PD-L1 항체는 본원에 기재된 YW243.55.S70이다. 또 다른 특정 양상에서, 항-PD-L1 항체는 본원에 기재된 MDX-1105이다. 여전히 또다른 특이적 양상에서, 항-PD-L1 길항제 항체는 본원에서 설명된 MEDI4736(더발루맙)이다. 또한 추가 양상에서, 항-PD-L1 항체는 MSB0010718C(아벨루맙)이다. 보다 구체적으로, PD-L1/PD-1 상호작용을 차단하는 제제는 아테졸리주맙(MPDL3280A)이다. 또 다른 양상에서, PD-L1/PD-1 상호작용을 차단하는 제제는 서열번호 165의 중쇄 가변 도메인 VH(PDL-1) 및 서열번호 166의 경쇄 가변 도메인 VL(PDL-1)을 포함하는 항-PD-L1 항체이다. 또 다른 양상에서, PD-L1/PD-1 상호작용을 차단하는 제제는 서열번호 167의 중쇄 가변 도메인 VH(PDL-1) 및 서열번호 168의 경쇄 가변 도메인 VL(PDL-1)을 포함하는 항-PD-L1 항체이다.

[0368] CD279, PD1 또는 세포 예정사 단백질 1로도 알려진 용어 "**PD-1**"은 영장류(예를 들어, 인간) 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트)와 같은 포유동물을 포함하는 모든 척추동물 공급원의 천연 PD-L1, 특히 UniProt(www.uniprot.org) 수탁번호 Q15116(서열번호 1691)에 제시된 아미노산 서열을 갖는 인간 단백질 PD-1를 지칭한다. 용어 "**PD-1 결합 길항제**"는 PD-1의 그 리간드 결합 짝에 대한 결합을 억제하는 분자를 지칭한다. 일부 실시형태에서, PD-1 결합 길항제는 PD-1과 PD-L1의 결합을 억제한다. 일부 실시형태에서, PD-1 결합 길항제는 PD-1과 PD-L2의 결합을 억제한다. 일부 실시형태에서, PD-1 결합 길항제는 PD-L1 및 PD-L2 모두에 대한 PD-1의 결합을 억제한다. 특히, PD-L1 결합 길항제는 항-PD-L1 항체이다. 용어 "**항-PD-1 항체**" 또는 "인간 PD-1에 결합하는 항체" 또는 "인간 PD-1에 특이적으로 결합하는 항체" 또는 "길항적 항-PD-1"은, 1.0×10^{-8} mol/l 이하의 KD-값, 한 양상에서, 1.0×10^{-9} mol/l 이하의 KD-값의 결합 친화도로 인간 PD-1 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 지칭한다. 결합 친화도는 표면 플라즈몬 공명 기술(BIAcore®, GE-Healthcare Uppsala, Sweden)과 같은 표준 결합 분석으로 결정된다. 한 양상에서, PD-L1/PD-1 상호작용을 차단하는 제제는 항-PD-1 항체이다. 특정 양상에서, 항-PD-1 항체는 MDX 1106(니볼루맙), MK-3475(렘브롤리주맙), CT-011(피딜리주맙), MEDI-0680(AMP-514), PDR001, REGN2810 및 BGB-108, 특히 렘브롤리주맙 및 니볼루맙으로 구성된 군으로부터 선택된다. 또 다른 양상에서, PD-L1/PD-1 상호작용을 차단하는 제제는 서열번호 170의 중쇄 가변 도메인 VH(PD-1) 및 서열번호 171의 경쇄 가변 도메인 VL(PD-1)을 포함하는 항-PD-1 항체이다. 또 다른 양상에서, PD-L1/PD-1 상호작용을 차단하는 제제는 서열번호 172의 중쇄 가변 도메인 VH(PD-1) 및 서열번호 173의 경쇄 가변 도메인 VL(PD-1)을 포함하는 항-PD-1 항체이다.

[0369] 또 다른 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 및 PD-L1/PD-1 상호작용을 차단하는 제제, 예를 들어, PD-L1 결합 길항제 또는 PD-1 결합 길항제, 특히, 항 PD-L1 항체 또는 항 PD-1 항체를 포함한 병용 생성물이 제공된다.

[0370] 상기의 이러한 병용 요법은 병용 투여(두 가지 또는 그 이상의 요법제가 동일한 또는 별도 제제 안에 함유됨),

및 별도 투여를 포함하고, 이 경우, 치료제의 투여는 추가적인 요법제 및/또는 요법제들의 투여 이전, 동시 및/또는 이후에 일어날수 있다. 하나의 실시형태에서, 이러한 치료제의 투여 및 추가의 치료제의 투여는 서로 약 1개월 이내 또는 약 1, 2 또는 3주 이내 또는 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일 또는 6일내에 일어난다.

[0371] **제조 물품**

[0372] 본 발명의 또 다른 양상에서, 상기 설명된 장애의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용한 물질들을 함유하는 제조 물품이 제공된다. 이러한 제조 물품은 용기 및 용기 위에 또는 용기에 결합된 라벨 또는 약품 설명서를 포함한다. 적합한 용기는 예를 들면, 병, 바이알, 주사기, IV 용액 주머니, 등등을 포함한다. 용기는 다양한 재료들, 가령, 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 상기 용기는 자체가 조성물을 보유하거나 병태의 치료, 방지 및/또는 진단에 효과적인 또다른 조성물과 복합된 조성물을 보유하며, 멸균 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들면, 상기 용기는 피하 주사 바늘이 뚫을 수 있는 마개를 가진 정맥 용액 주머니 또는 바이알일 수 있다). 조성물에서 적어도 하나의 활성제는 본 발명의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자이다. 라벨 또는 약품 설명서에는 이 조성물이 선택된 병태 치료에 사용된다는 것이 명시되어 있다. 더욱이, 제조 물품은 (a) 내부에 본 발명의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 포함하는 조성물이 함유된 제1 용기; 및 (b) 추가의 세포독성 제제 또는 다른 치료제를 포함하는 조성물이 내부에 함유된 제2 용기를 포함한다. 발명의 본 실시형태에서 제조 물품은 이 조성물이 특정 병태의 치료에 사용될 수 있음이 표시된 약품 설명서를 추가로 포함할 수 있다. 한편, 또는 추가적으로, 상기 제조 물품은 약학적으로-허용되는 완충액, 가령, 주사 (BWF1)용 정균수, 포스페이트-완충된 염수, Ringer 용액 및 텍스트로즈 용액이 포함된 제2 (또는 제 3) 용기를 더 포함할 수 있다. 다른 완충액, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기가 포함된 상업적 그리고 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질들을 더 포함할 수 있다.

[0373]

표 B (서열):

서열번호	명칭	서열
1	hu CD28 UniProt 번호 P10747, 버전 1	MLRLLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYDNAVNLSK KYSYNLFSRE FRASLHKGLD SAVEVCVVYQ NYSQQLQVYS KTGFNCDGKL GNESVTFYDQ NLYVNQTDIY FCKIEVMYPP PYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS KPFWLVVVG GVLACYLLV TVAFIIFWVR SKRSRLLHSD YMNMTPRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAAYS
2	중쇄 CDR-H1, 페르투주맵 CLC	DYTMQ
3	중쇄 CDR-H2, 페르투주맵 CLC	DVNPNSGGSIIVRRFKG
4	중쇄 CDR-H3, 페르투주맵 CLC	NLGPFFYFDY
5	경쇄 CDR-L1, 페르투주맵 CLC	KASQDVSTA
6	경쇄 CDR-L2, 페르투주맵 CLC	SASFRYT
7	경쇄 CDR-L3, 페르투주맵 CLC	QQHYTTPPT
8	중쇄 가변 도메인 VH, 페르투주맵 CLC	EVQLVESGGGLVQPQGGSLRLSCAASGFTFNDYTMQW VRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIIVRRFKGRFTLSV DRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPFFYFDY WGQGTLLTVSS
9	경쇄 가변 도메인 VL, 페르투주맵 CLC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSTAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASFRYTGVPSSRFSRSGTDFLTIS SLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIK
10	중쇄 CDR-H1, 트라스투주맵 CLC	GFNIKDTYIH
11	중쇄 CDR-H2, 트라스투주맵 CLC	RIYPTNGYTRYADSVKG
12	중쇄 CDR-H3, 트라스투주맵 CLC	WGGEFYAMDY
13	경쇄 CDR-L1, 트라스투주맵 CLC	KASQDVSTA
14	경쇄 CDR-L2, 트라스투주맵 CLC	SASFRYT

[0374]

서열번호	명칭	서열
15	경쇄 CDR-L3, 트라스투주맙 CLC	QQHYTTPPT
16	중쇄 가변 도메인 VH, 트라스투주맙 CLC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWV RQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGEGFYAMDY WGQGLTVTVSS
17	경쇄 가변 도메인 VL, 트라스투주맙 CLC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSTAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASFRTYGVPSRFSGSRSGDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK
18	CD28(SA) CDR-H1	SYYIH
19	CD28(SA) CDR-H2	CIYPGNVNTNYNEKFKD
20	CD28(SA) CDR-H3	SHYGLDWNFDV
21	CD28(SA) CDR-L1	HASQNIYVWLN
22	CD28(SA) CDR-L2	KASNLHT
23	CD28(SA) CDR-L3	QQGQTYPYT
24	CD28(SA) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYFTTSYYIHWV RQAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDT SISTAYMELSRLLSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWG QGTTVTVSS
25	CD28(SA) VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCHASQNIYVWLNWY QQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIK
26	CD28 CDR-H1 컨센서스	SYYIH
27	CD28 CDR-H2 컨센서스	SIYPX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ TNYNEKFKD, 여기서 X ₁ 는 G 또는 R 이고 X ₂ 는 N 또는 D 이고 X ₃ 은 V 또는 G 이고 X ₄ 는 N 또는 Q 또는 A 임
28	CD28 CDR-H3 컨센서스	SHYGX ₅ DX ₆ NFDV, 여기서 X ₅ 는 L 또는 A 이고 X ₆ 은 W 또는 H 또는 Y 또는 F 임
29	CD28 CDR-L1 컨센서스	X ₇ ASQX ₈ IX ₉ X ₁₀ X ₁₁ LN, 여기서, X ₇ 은 H 또는 R 이고 X ₈ 은 N 또는 G 이고 X ₉ 는 Y 또는 S 이고

[0375]

서열번호	명칭	서열
		X ₁₀ 은 V 또는 N 이고 X ₁₁ 은 W 또는 H 또는 F 또는 Y 이고
30	CD28 CDR-L2 컨센서스	X ₁₂ X ₁₃ SX ₁₄ LX ₁₅ X ₁₆ , 여기서 X ₁₂ 는 K 또는 Y 이고 X ₁₃ 은 A 또는 T 이고 X ₁₄ 는 N 또는 S 이고 X ₁₅ 는 H 또는 Y 이고 X ₁₆ 은 T 또는 S 임
31	CD28 CDR-L3 컨센서스	QXX ₁₇ QTYPYT, 여기서 X ₁₇ 은 G 또는 A 임
32	CD28 VH 변이체 a	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFSYYIHVV RQAPGQGLEWIGSIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDT SISTAYMELSLRSDDTAVYFCTRSYGLDWNFDVWG QGTTVTVSS
33	CD28 VH 변이체 b	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFSYYIHVV RQAPGQGLEWIGSIYPGNVQTNVNEKFKDRATLTVDT SISTAYMELSLRSDDTAVYFCTRSYGLDHNFDVWG QGTTVTVSS
34	CD28 VH 변이체 c	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFSYYIHVV RQAPGQGLEWIGSIYPGNVQTNVNEKFKDRATLTVDT SISTAYMELSLRSDDTAVYFCTRSYGLDHNFDVWG QGTTVTVSS
35	CD28 VH 변이체 d	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFSYYIHVV RQAPGQGLEWIGSIYPRDGTNYNEKFKDRATLTVDT SISTAYMELSLRSDDTAVYFCTRSYGLDYNFDVWG QGTTVTVSS
36	CD28 VH 변이체 e	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFSYYIHVV RQAPGQGLEWIGSIYPGNVQTNVNEKFKDRATLTVDT SISTAYMELSLRSDDTAVYFCTRSYGLDWNFDVWG QGTTVTVSS
37	CD28 VH 변이체 f	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFSYYIHVV RQAPGQGLEWIGSIYPGNVQTNVNEKFKDRATLTVDT SISTAYMELSLRSDDTAVYFCTRSYGLDFNFDVWG QGTTVTVSS
38	CD28 VH 변이체 g	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFSYYIHVV

[0376]

서열번호	명칭	서열
		RQAPGQGLEWIGSIYPRNVQTNYNEKFKDRATLTVDT SISTAYMELSRLSDDTAVYFCTRSHYGLDHNFDVWG QGTTTVVSS
39	CD28 VH 변이체 h	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTFSYIIHWV RQAPGQGLEWIGSIYPRDVQTNYNEKFKDRATLTVDT SISTAYMELSRLSDDTAVYFCTRSHYGLDHNFDVWG QGTTTVVSS
40	CD28 VH 변이체 i	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYIIHWVR QAPGKLEWVASIYPGNVNTRYADSVKGRFTISADTS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRSHYGLDWNFDVW GGTTTVVSS
41	CD28 VH 변이체 j	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYIIHWVR QAPGKLEWVASIYPGNVATRYADSVKGRFTISADTS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRSHYGLDWNFDVW GGTTTVVSS
42	CD28 VL 변이체 k	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCHASQNIYVHLNWAYQ QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFLTIS SLQPEDFATYYCQQAQTYPYTFGGGTKVEIK
43	CD28 VL 변이체 l	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCHASQNIYVFLNWAYQ QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFLTIS SLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIK
44	CD28 VL 변이체 m	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCHASQNIYVYLNWAYQ QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFLTIS SLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIK
45	CD28 VL 변이체 n	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCHASQGISNYLNWAYQ QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFLTIS SLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIK
46	CD28 VL 변이체 o	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCHASQNIYVWLNWAY QQKPGKAPKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFLTI SSLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIK
47	CD28 VL 변이체 p	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCHASQGISNYLNWAYQ QKPGKAPKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFLTIS LQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIK
48	CD28 VL 변이체 q	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCHASQGISNHLNWAY QQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFLTI

[0377]

서열번호	명칭	서열
		SSLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIK
49	CD28 VL 변이체 r	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCHASQGIYVYLNWYQ QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIK
50	CD28 VL 변이체 s	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCHASQGISVYLNWYQ QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIK
51	CD28 VL 변이체 t	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQNIYVWLNWY QQKPGKAPKLLIYKASNLVSGVPSRFSGSRSGDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGQGTKEIK
52	CD28(변이체 8) CDR-H1	SYYIH
53	CD28(변이체 8) CDR-H2	SIYPGNVQTNVNEKFKD
54	CD28(변이체 8) CDR-H3	SHYGLDWNFDV
55	CD28(변이체 8) CDR-L1	HASQNIYVYLN
56	CD28(변이체 8) CDR-L2	KASNLHT
57	CD28(변이체 8) CDR-L3	QQGQTYPYT
58	CD28(변이체 15) CDR-H1	SYYIH
59	CD28(변이체 15) CDR-H2	SIYPGNVQTNVNEKFKD
60	CD28(변이체 15) CDR-H3	SHYGLDWNFDV
61	CD28(변이체 15) CDR-L1	HASQNIYVFLN
62	CD28(변이체 15) CDR-L2	KASNLHT
63	CD28(변이체 15) CDR-L3	QQGQTYPYT
64	CD28(변이체 29) CDR-H1	SYYIH
65	CD28(변이체 29) CDR-H2	SIYPGNVNTNVNEKFKD
66	CD28(변이체 29) CDR-H3	SHYGLDWNFDV
67	CD28(변이체 29) CDR-L1	HASQNIYVWLN
68	CD28(변이체 29) CDR-L2	KASNLHT
69	CD28(변이체 29) CDR-L3	QQGQTYPYT
70	Fc 홀 PGLALA	DKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS LSP

[0378]

서열번호	명칭	서열
71	Fc 노브 PGLALA	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSP
72	VH (CD28 SA) CH1 (EE)- Fc 노브 PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYFTFSYYIHVV RQAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDT SISTAYMELSRLSDDTAVYFCTRSYGLDWNFDVWG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV EDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSS VWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
73	VH (CD28 변이체 g) CH1 (EE) - Fc 노브 PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYFTFSYYIHVV RQAPGQGLEWIGSIYPRNVQTNNEKFKDRATLTVDT SISTAYMELSRLSDDTAVYFCTRSYGLDHNFDVWG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV EDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSS VWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
74	VH (CD28 변이체 f) CH1 (EE) - Fc 노브 PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYFTFSYYIHVV RQAPGQGLEWIGSIYPGNVQTNNEKFKDRATLTVDT SISTAYMELSRLSDDTAVYFCTRSYGLDFNFDVWG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV EDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSS

[0379]

서열번호	명칭	서열
		VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDK THTCPPEAAGGPPSVLFPKPKDTLMISRTEVTC VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
75	VH (CD28 변이체 j) CH1 (EE) - Fc 높 PGLALA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYIHWVR QAPGKLEWVASIYPGNVATRYADSVKGRFTISADTS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRSHYGLDWNFDVW GQGTTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCD KTHTCPPEAAGGPPSVLFPKPKDTLMISRTEVTC CVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS P
76	VH (CD28 변이체 e) CH1 (EE)- Fc 높 PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTFTSYIHWV RQAPGQGLEWIGSIYPGNVQTNYNEKFKDRATLVDT SISTAYMELSRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWG QGTTTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV EDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDK THTCPPEAAGGPPSVLFPKPKDTLMISRTEVTC VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
77	VH (CD28 변이체 b) CH1 (EE) - Fc 높 PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTFTSYIHWV RQAPGQGLEWIGSIYPGNVQTNYNEKFKDRATLVDT SISTAYMELSRSDDTAVYFCTRSHYGLDHNFDVWG QGTTTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV

[0380]

서열번호	명칭	서열
		EDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
78	VH (CD28 변이체 a) CH1 (EE) - Fc 높 PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYFTFSYIHWV RQAPGQGLEWIGSIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDT SISTAYMELSRLSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV EDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
79	VH (CD28 변이체 i) CH1 (EE) - Fc 높 PGLALA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYIHWVR QAPGKLEWVASIYPGNVNTRYADSVKGRFTISADTS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRSHYGLDWNFDVW GGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VEDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCD KHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS P
80	VL-CD28(SA)-CL"RK"	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCHASQNIYVWLNWY QQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQGQTYPTFGGGTKVEIKRTVAAP

[0381]

서열번호	명칭	서열
		SVFIFPPSDRKLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSDKDSTYLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
81	VL (CD28 변이체 k)-CL (RK)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVHLNHWYQ QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFLTIS SLQPEDFATYYCQQAQTYPTYTFGGGKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDRKLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSDKDSTYLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
82	VL (CD28 변이체 l)-CL (RK)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVFLNHWYQ QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFLTIS SLQPEDFATYYCQQGQTYPTYTFGGGKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDRKLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSDKDSTYLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
83	VL (CD28 변이체 m)-CL (RK)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVYLNHWYQ QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFLTIS SLQPEDFATYYCQQGQTYPTYTFGGGKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDRKLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSDKDSTYLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
84	VL (CD28 변이체 n)-CL (RK)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGIYVYLNHWYQ QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFLTIS SLQPEDFATYYCQQGQTYPTYTFGGGKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDRKLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSDKDSTYLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
85	VL (CD28 변이체 s)-CL (RK)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGISVYLNHWYQ QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFLTIS SLQPEDFATYYCQQGQTYPTYTFGGGKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDRKLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSDKDSTYLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
86	VL (CD28 변이체 t)-CL (RK)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNIYVWLNHWY QQKPGKAPKLLIYKASNLVSGVPSRFSGSRSGTDFLTI

[0382]

서열번호	명칭	서열
		SSLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGKLEIKRTVAAP SVFIFPPSDRKLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYKHK KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
87	Fc 홀 PGLALA, HYRF	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNRFTQKSL LSP
88	Avi 태그	GLNDIFEAQKIEWHE
89	CD28(SA) VL-CH1 hu IgG1 Fc 홀 PGLALA	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCHASQNIYVWLNWY QQKPKGAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFLT ISSLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGKVEIKSSASTK GPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP
90	CD28(SA) VH-C 카파	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTFSYYIHVV RQAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDT SISTAYMELSRLLSDDTAVYFCTRSYGLDWNFDVWG QGTTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
91	CD28(SA_변이체 8) VL-CH1 hu IgG1 Fc 홀 PGLALA	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCHASQNIYVWLNWYQ QKPKGAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFLTIS SLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGKVEIKSSASTKG PSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS

[0383]

서열번호	명칭	서열
		GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
92	CD28(SA_변이체 8) VH-C 카파	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTFSYYIHVV RQAPGQGLEWIGSIYPGNVQNTNYNEKFKDRATLTVDT SISTAYMELSRRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDFNFDVWG QGTTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
93	CD28(SA_변이체 15) VL-CH1 hu IgG1 Fc 높 PGLALA	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCHASQNIYVFLNWWYQ QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
94	CD28(SA_변이체 15) VH- C 카파	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTFSYYIHVV RQAPGQGLEWIGSIYPGNVQNTNYNEKFKDRATLTVDT SISTAYMELSRRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWG QGTTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
95	CD28(SA_변이체 29) VH- C 카파	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTFSYYIHVV RQAPGQGLEWIGSIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDT

[0384]

서열번호	명칭	서열
		SISTAYMELSRRLSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWG QGTTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
96	Her2 (페르투주맵 CLC) hu IgG1 VH-CH1 "EE" Fc 출 아생형	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNDYTMDW VRQAPGKLEWVADVNPNSGGSIIVNRRFKGRFTLSV DRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPFYFDY WGQGLTIVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALG CLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS LSP
97	Her2 (페르투주맵 CLC) VL- C 카파 "RK"	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQDVTAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASFRTYGVPSRFSGSRSGDTFTLIS SLQPEDFATYYCQHYHTTPTFGQGTKEIKRTVAAPS VFIFPPSDRKLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
98	Her2 (페르투주맵 CLC) hu IgG1 VH-CH1 "EE" Fc 출 PGLALA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNDYTMDW VRQAPGKLEWVADVNPNSGGSIIVNRRFKGRFTLSV DRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPFYFDY WGQGLTIVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALG CLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTVCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSL

[0385]

서열번호	명칭	서열
		SLSP
99	Her2 (페르투주맵 CLC) VL-CH1 hu IgG1 Fc 늑 PGLALA	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSTAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASFRTYGVPSRFSGSRSGDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKSSASTKG PSVFLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREP QVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
100	Her2 (페르투주맵 CLC) VH-C 카파	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNDYTMDW VRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIIVRRFKRFTLSV DRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPFFYFDY WGQGLTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
101	Her2 (트라스투주맵 CLC) hu IgG1 VH-CH1 "EE" Fc 늑 PGLALA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWV RQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGEGFYAMDY WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVEDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKS CDKTHTCPPEAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSP

[0386]

서열번호	명칭	서열
102	Her2 (트라스투주맵 CLC) VL-CH1 hu IgG1 Fc 노브 PGLALA	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSTAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASFRTYGVPSRFSGRSGDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTKAKGQPREP QVCTLPPSRDELTKNQVSLCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP
103	인간 Her2, UniProt 수탁번호 P04626-1	MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGDMKRLRPA SPETHLDMLRHLVYQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSFL QDIQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDN YALAVLDNGDPLNNTTPTVTGASPGGLRELQLRSLTEIL KGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDT NRSRACHPCSPMCKGSRGWGESSEDCQSLTRTVCAG GCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLHF NHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASC VTACPYNYLSTDVGSCTLVCPLNQEVTAEDGTQRCE KCSKPCARVCYGLGMEHLREVRVTSANIQEFAGCKKI FGSFLPESFDGDPASNTAETLEEITGYLYISAWPDSL DLSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSL RELGSGLALIHHTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLH TANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPPTQCVN CSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNRHCLPCHPEC QPQNGSVTCFGPEADQCACAHYKDPFPCVARCPG VKPDLSEMPIWKFPEEGACQPCPINCTHSCVDLDDK GCPAEQRASPLTSIISAVVIGILLVVVGVVFGILIKRRQQ KIRKYTMRRLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQMRILKET ELRKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLR NTSPKANKEILDEAYVMAGVGSPPVSRLLGICLTSTVQ LVTQLMPYGCLLDHVRENRRGLGSQDLLNWCMIQIA KGMSYLEDVRLVHRDLAARNVLKSPNHVKITDFGLA RLLDIDETEHADGGKVPIKWMALLESILRRRFTHQSDV

[0387]

서열번호	명칭	서열
		WSYGVTVWELMTFGAKPYDGI PAREIPDLLEKGERLPQ PPICTIDVYMIMVKCWMIDSECRPRFRELVSF SRMAR DPQRFVVIQNE DLGPASPLDSTFYRSLEDDDDMGDLV DAEEYLVPPQGGFFCPDPAPGAGGMVHHRSSSTRS GGGDLTLGLEPSEEEAPRSLAPSEGAGSDVFDGDLG MGAAGLQLSLPTHDPSP LQRYSEDPTVPLPSETDGYV APLTCSPPQPEYVNPQDVRPQPPSPREGPLPAARPAGA TLERPKT LSPGKNGVVKDVF AFGGAVENPEYLTPQGG AAPQPHPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAPPSTFK GTPAENPEYLG LDVPV
104	IgG CH1 도메인	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKVK
105	IgG CH2 도메인	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDV SHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQESTYRWSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAK
106	IgG CH3 도메인	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
107	CH1 커넥터	EPKSC
108	헨지 풀	DKTHTCPXCP, X 는 S 또는 P 임
109	헨지 미들	HTCPXCP, X 는 S 또는 P 임
110	헨지 쇼트	CPXCP, X 는 S 또는 P 임
111	IgG1, 백인 동종이형	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
112	IgG1, 아프리카계 미국인 동종이형	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPA

[0388]

서열번호	명칭	서열
		PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQVQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
113	IgG2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPKPPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQVQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
114	IgG3	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLDGTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQVQGNVFSCSVMHEALHNRFQKSLSLSPGK
115	IgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGKTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
116	인간 FcγRIIIa	MWQLLLPTALLLLVSAGMRTELDLPKAVVFLEPQWYRV

[0389]

서열번호	명칭	서열
	UniProt 수탁번호 P08637	LEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYF IDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQ APRWVFKEDPIHLRCHSWKNTALHKVYTLQNGKGR KYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLFGSKNVSSSETV NITITQGLAVSTISSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDGL YFSVKTNIRSSTRDWDKHKFKWRKDPQDK
117	펩티드 링커(G4S)	GGGGG
118	펩티드 링커 (G4S)2	GGGGSGGGG
119	펩티드 링커 (SG4)2	SGGGSGGGG
120	펩티드 링커 G4(SG4)2	GGGGSGGGSGGGG
121	펩티드 링커	GSPGSSSSGS
122	(G4S)3 펩티드 링커	GGGGSGGGSGGGG
123	(G4S)4 펩티드 링커	GGGGSGGGSGGGSGGGG
124	펩티드 링커	GSGSGSGS
125	펩티드 링커	GSGSGNGS
126	펩티드 링커	GGSGSGSG
127	펩티드 링커	GGSGSG
128	펩티드 링커	GGSG
129	펩티드 링커	GGSGNGSG
130	펩티드 링커	GGNGSGSG
131	펩티드 링커	GGNGSG
132	CDR-H1, 페르투주맵	GFTFTDYTMD
133	CDR-H2, 페르투주맵	DVNPNSGGSIYNQRFKG
134	CDR-H3, 페르투주맵	NLGPSFYFDY
135	CDR-L1, 페르투주맵	KASQDVSIGVA
136	CDR-L2, 페르투주맵	SASYRYT
137	CDR-L3, 페르투주맵	QQYYIYPYT
138	중쇄 가변 도메인 VH, 페르투주맵	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDYTM VRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSV DRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDY WGQGLTVTVSS
139	경쇄 가변 도메인 VL, 페르투주맵	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQDVSIGVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPFRFSGSGSDFTLTISS LQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK
140	CDR-H1, 트라스투주맵	GFNIKDTYIH

[0390]

서열번호	명칭	서열
141	CDR-H2, 트라스투주맙	RIYPTNGYTRYADSVKG
142	CDR-H3, 트라스투주맙	WGGDGFYAMDY
143	CDR-L1, 트라스투주맙	RASQDVNTAVA
144	CDR-L2, 트라스투주맙	SASFLYS
145	CDR-L3, 트라스투주맙	QQHYTTPPT
146	중쇄 가변 도메인 VH, 트라스투주맙	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWV RQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDY WGQGLVTVSS
147	경쇄 가변 도메인 VL, 트라스투주맙	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK
148	CDR-H1, CD3	NYYIH
149	CDR-H2, CD3	WIYPGDGNTK YNEKFKG
150	CDR-H3, CD3	DSYSNYFDY
151	CDR-L1, CD3	KSSQSLNSR TRKNYA
152	CDR-L2, CD3	WASTRES
153	CDR-L3, CD3	TQSFILRT
154	중쇄 가변 도메인 VH, CD3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFTNYYIHWV RQAPGQGLEWIGWIYPGDGNTKYNEKFKGRATLTAD TSTSTAYLELSSLRSEDVAVYYCARDYSYNYFDYWGQ GTLVTVSS
155	경쇄 가변 도메인 VL, CD3	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYCTQSFILRTFGQGTKVEIK
156	CDR-H1, Her2 (7C2)	GYWMN
157	CDR-H2, Her2 (7C2)	MIHPSDSEIR ANQKFRD
158	CDR-H3, Her2 (7C2)	GTYDGGFEY
159	CDR-L1, Her2 (7C2)	RASQSVSGSR FTYMH
160	CDR-L2, Her2 (7C2)	YASILES
161	CDR-L3, Her2 (7C2)	QHSWEIPPWT
162	중쇄 가변 도메인 VH, Her2 (7C2)	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYFTGYWMN WLKQRPQGLEWIGMIHPSDSEIRANQKFRDKATLTV DKSSTTAYMQLSSPTSEDSAVYYCARGTYDGGFEYWG QGTLTVSS

[0391]

서열번호	명칭	서열
163	경쇄 가변 도메인 VL, Her2 (7C2)	DIVLTQSPASLVVSLGQRATISCRASQSVSGSRFTYMH WYQQKPGQPPLIKIYASILESGVPARFSGGGSGTDFT LNIIHPVEEDDTATYYCQHSWEIIPPWFGGGKLEIK
164	인간 PD-L1 Uniprot 수탁번호 Q9NZQ7	MRIFAVFIFMTYWHLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTI ECKFPVEKQLDLAALIVWEMEDKNIQFVHGEECLKV QHSSYRQRARLLKQQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYR CMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVDPVTSEH ELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEK LFNVTSTLRINTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVPELP LAHPPNERHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKRGRMMDV KKCGIQDTNSKKQSDTHLEET
165	VH (PD-L1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVV RQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWG QGTLVTVSS
166	VL (PD-L1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVSTAVAWY QQKPGKAPKLLIYASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQYLYHPATFGQGTKVEIK
167	VH (PD-L1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSW VRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFD YWGQGLTVTVSS
168	VL (PD-L1)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQRVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQYGSLPWTFGQGTKVEIK
169	인간 PD-1 Uniprot 수탁번호 Q15116	MQIQAPWPVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNP PTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSEFVLNWMRMS SNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRTVQLPNGRDFH MSVVRARRNDSTYLCGALSLAPKAQIKESLRAELRVT ERRAEVPTAHPSPSPRAGQFQTLVVGVLGSLV LVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSV DYGELDFQWREKTPPEPPVPCVPEQTEYATVFP TSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL
170	VH (PD-1)	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVCKASGYFTNYYMYW VRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTT

[0392]

서열번호	명칭	서열
		DSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDY WGQGTTVTVSS
171	VL (PD-1)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHW YQKPGQAPRLIYLASYLESGVPARFSGSGSDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIK
172	VH (PD-1)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHW VRQAPGKGLEWVAWIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRD NSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGL VTVSS
173	VL (PD-1)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLIYDASNRATGIPARFSGSGSDFTLTISS LEPEDFAVYYCQSSNWPRTFGGQTKVEIK
174	Her2-CD3 (4D5/40G5c) HC1 (Fc 늑)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWV RQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDY WGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPK SCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSP
175	Her2-CD3 (4D5/40G5c) LC1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVNTAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGGQTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVVACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
176	Her2-CD3 (4D5/40G5c) HC2 (Fc 늑)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTNYYIHWV RQAPGQGLEWIGWIYPGDGNTKYNEKFKGRATLTAD TSTSTAYLESSLRSEDVAVYYCARDYSNYYFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVK

[0393]

서열번호	명칭	서열
		DYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFY PSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
177	Her2-CD3 (4D5/40G5c) LC2	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQLLNSRTRKNY LAWYQQKPGQPPELLIYWASTRESGVPDFRFSGSGSGT DFTLTISLQAEADVAVYYCTQSFILRTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
178	CD28(SA_변이체 8) hu IgG1 Fc 홀 N297G	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYFTFSYYIHVV RQAPGQGLEWIGSIYPGNVQNTYNEKFKDRATLTVDT SISTAYMELSRLLSDDTAVYFCTRSHYGLDFNFDVWG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSS VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY GSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
179	CD28(SA_변이체 8) VL-C 카파	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCHASQNIYVYLNWYQ QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHK KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
180	Her2 (4D5) hu IgG1 홀 N297G	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWV RQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDY

[0394]

서열번호	명칭	서열
		WGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLY SLSSVWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
181	Her2 (4D5) VL-C 카파	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGDFTLTIS SLQPEDFATYYCQHYHTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
182	Her2 (2C4) hu IgG1 높 N297G	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDW VRQAPGKGLEWVADVNPNNSGGSIYINQRFKGRFTLSV DRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDY WGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLY SLSSVWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
183	Her2 (2C4) VL-C 카파	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSIGVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGDFTLTIS LQPEDFATYYCQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
184	CD28 IgG4 Fc	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYIHWV

[0395]

서열번호	명칭	서열
		RQAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDT SISTAYMELSRLSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWG QGTTVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYLSV VTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK
185	CD28 카파 경쇄	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCHASQNIYVWLNWY QQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQGQTYPTFGGKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
186	DP47 hulG1 PGLALA 중쇄	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSGFDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYLSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFCVSMHEALHNHYTQKSLSLSP
187	DP47 hulG1 PGLALA 경쇄	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQYGGSSPLTFGQGTVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTSKADYKHK KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
188	인간 CD3ε	MQSGTRWRVGLCLLSVGVWQDGDGNEEMGGITQTP

[0396]

서열번호	명칭	서열
	UniProt 번호 P07766	YKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDK NIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVYPRGSKPEDANFY LYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGLLLLVY YWSKNRKAKAPVTRGAGAGGRQGRQNKERPPPVP NPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRR
189	사이노물구스 CD3ε UniProt 번호 Q95LI5	MQSGTRWRVGLCLLSIGVWQDGDGNEEMGSITQTPY QVSISGTTVILTCQHLGSEAQWQNGKKNKEDSGDR LFLPEFSEMEQSGYYVYPRGSNPEDASHHLYLKARVC ENCMEMDVMAVATIVIVDICITLGLLLVYYWSKNRKA KAKPVTRGAGAGGRQGRQNKERPPPVPNPDYEPIRK GQQDLYSGLNQRR

[0397]

[0398]

인간 면역글로불린 경쇄 및 중쇄의 뉴클레오티드 서열들의 일반적인 정보는 다음 문헌들에 제공되어 있다: Kabat, E.A., 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). 항체 사슬들의 아미노산들은 상기에 정의된 바와 같이 Kabat에 따른 넘버링 체계에 따라 넘버링되고 지칭된다 (Kabat, E.A., 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)).

[0399]

다음과 같은 번호의 단락들(paras)에 본 발명의 또 다른 양상들을 기재한다:

- [0400] 1. CD28에 대한 1가 결합을 특징으로 하는 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자로서, 다음을 포함하고:
- [0401] (a) CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인,
- [0402] (b) 인간 표피 성장 인자 수용체-2(Her2)에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인, 및
- [0403] (c) Fc 수용체에 대한 항원 결합 분자의 결합 친화도 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 안정한 회합이 가능한 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인,
- [0404] 여기서 Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 상기 제2 항원 결합 도메인은 다음을 포함한다:
- [0405] (i) 서열번호 2의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 3의 CDR-H2, 및 서열번호 4의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2), 및 서열번호 5의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 6의 CDR-L2 및 서열번호 7의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2); 또는
- [0406] (ii) 서열번호 10의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 11의 CDR-H2, 및 서열번호 12의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2), 및 서열번호 13의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 14의 CDR-L2 및 서열번호 15의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2).
- [0407] 2. 단락 1에 있어서, Fc 도메인은 인간 IgG1 하위분류이고 아미노산 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)를 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.
- [0408] 3. 단락 1 또는 2에 있어서, CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 다음을 포함하는, 이중 특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자:
- [0409] (i) 서열번호 26의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 27의 CDR-H2, 및 서열번호 28의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HCD28), 및 서열번호 29의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 30의 CDR-L2 및 서열번호 31의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LCD28); 또는
- [0410] (ii) 서열번호 18의 CDR-H1, 서열번호 19의 CDR-H2, 및 서열번호 20의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HCD28), 및 서열번호 21의 CDR-L1, 서열번호 22의 CDR-L2 및 서열번호 23의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LCD28).
- [0411] 4. 단락 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 24의 아미노산 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HCD28), 및 서열번호 25의 아미노산 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LCD28)을 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.
- [0412] 5. 단락 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40 및 서열번호 41로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HCD28), 및 서열번호 25, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50 및 서열번호 51로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LCD28)을 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.
- [0413] 6. 단락 1 내지 3 또는 5 중 어느 하나에 있어서, CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 다음을 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자:
- [0414] (a) 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HCD28) 및 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LCD28), 또는
- [0415] (b) 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HCD28) 및 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LCD28), 또는

- [0416] (c) 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 51의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는
- [0417] (d) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는
- [0418] (e) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는
- [0419] (f) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는
- [0420] (g) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는
- [0421] (h) 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는
- [0422] (i) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는
- [0423] (j) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28), 또는
- [0424] (k) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28) 및 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28).
- [0425] 7. 단락 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 다음을 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자:
 - [0426] (i) 서열번호 52의 중쇄 상보성 결정 영역 CDR-H1, 서열번호 53의 CDR-H2, 및 서열번호 54의 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28), 및 서열번호 55의 경쇄 상보성 결정 영역 CDR-L1, 서열번호 56의 CDR-L2 및 서열번호 57의 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28).
- [0427] 8. 단락 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CD28)의 CDR, 및 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CD28)의 CDR을 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.
- [0428] 9. 단락 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2)의 CDR, 및 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L Her2)의 CDR을 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.
- [0429] 10. 단락 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2), 및 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L Her2)을 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.
- [0430] 11. 단락 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H Her2)의 CDR, 및 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L Her2)의 CDR을 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.
- [0431] 12. 단락 1 내지 8 또는 11 중 어느 하나에 있어서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은

서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_HHer2), 및 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_LHer2)을 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

- [0432] 13. 단락 1 내지 12 중 어느 하나에 있어서, CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인 및/또는 Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인은 Fab 분자인, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.
- [0433] 14. 단락 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 Fab 분자이고, 이때 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL과 VH 또는 불변 도메인 CL과 CH1, 특히 가변 도메인 VL과 VH는 서로에 의해 대체되는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.
- [0434] 15. 단락 1 내지 14 중 어느 하나에 있어서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인은 일반 Fab 분자인, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.
- [0435] 16. 단락 1 내지 15 중 어느 하나에 있어서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인은 Fab 분자이며, 이때 불변 도메인 CL에서 위치 123(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산이 리신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)에서 선택된 아미노산으로 치환되고 위치 124(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산이 리신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)으로 독립적으로 치환되고, 이때 불변 도메인 CH1에서 위치 147(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산이 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 독립적으로 치환되고 위치 213(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산이 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 독립적으로 치환된 (Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링), 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.
- [0436] 17. 단락 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 다음을 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자:
 - [0437] (i) 서열번호 92의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 91의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 96의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 및 서열번호 97의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄, 또는
 - [0438] (ii) 서열번호 92의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 91의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 98의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 및 서열번호 97의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄, 또는
 - [0439] (iii) 서열번호 92의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 91의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 101의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 및 서열번호 97의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄.
- [0440] 18. 단락 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, Her2에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항원 결합 도메인은 Fab 분자이며 이때 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL과 VH 또는 불변 도메인 CL과 CH1, 특히 가변 도메인 VL과 VH는 서로에 의해 대체되는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.
- [0441] 19. 단락 1 내지 13 또는 18 중 어느 하나에 있어서, CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 일반 Fab 분자인, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.
- [0442] 20. 단락 1 내지 13 또는 18 또는 19 중 어느 하나에 있어서, CD28에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인은 Fab 분자이며, 이때 불변 도메인 CL에서 위치 123(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산은 리신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)에서 선택된 아미노산으로 치환되고 위치 124(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산은 리신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)으로 독립적으로 치환되고, 이때 불변 도메인 CH1에서 위치 147(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산은 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 독립적으로 치환되고 위치 213(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산은 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 독립적으로 치환된(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링), 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.
- [0443] 21. 단락 1 내지 13 또는 18 내지 20 중 어느 하나에 있어서, 다음을 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자:
 - [0444] (i) 서열번호 83의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 74의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 99의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 및 서열번호 100의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄, 또는
 - [0445] (ii) 서열번호 83의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 74의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 102의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 및 서열번호 100의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄.
- [0446] 22. 단락 1 내지 21 중 어느 하나에 있어서, 제1 및 제2 항원 결합 도메인은 각각 Fab 분자이고 Fc 도메인은 안정한 회합이 가능한 제1 및 제2 서브유닛으로 구성되고; (i) 제1 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc

도메인의 제1 서브유닛의 N-말단에 융합되고 제2 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제2 서브유닛의 N-말단에 융합되거나, (ii) 제2 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제1 서브유닛의 N-말단에 융합되고 제1 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제2 서브유닛의 N-말단에 융합되는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.

- [0447] 23. 단락 1 내지 22 중 어느 하나에 있어서, Fc 도메인은 Fc 도메인의 제1 및 제2 서브유닛의 회합을 촉진시키는 변형을 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.
- [0448] 24. 단락 1 내지 23 중 어느 하나에 있어서, Fc 도메인의 제1 서브유닛은 아미노산 치환 S354C 및 T366W(EU 넘버링)를 포함하고 Fc 도메인의 제2 서브유닛은 아미노산 치환 Y349C, T366S 및 Y407V(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)를 포함하는, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.
- [0449] 25. 단락 1 내지 24 중 어느 하나의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 인코딩하는 하나 이상의 단리된 폴리뉴클레오티드.
- [0450] 26. 단락 25의 폴리뉴클레오티드(들)를 포함하는, 하나 이상의 벡터, 특히 발현 벡터.
- [0451] 27. 단락 25의 폴리뉴클레오티드(들) 또는 단락 26의 벡터(들)를 포함하는 숙주 세포.
- [0452] 28. 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자의 생산 방법으로서, a) 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자의 발현에 적합한 조건하에서 단락 27의 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 b) 선택적으로 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자를 회수하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0453] 29. 단락 28의 방법에 의해 생산된 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자.
- [0454] 30. 단락 1 내지 24 중 어느 하나의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 및 적어도 하나의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학 조성물.
- [0455] 31. 약제로 사용하기 위한, 단락 1 내지 24 중 어느 하나의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자, 또는 단락 30의 약학 조성물.
- [0456] 32. (a) T 세포 활성화 또는 (b) T 세포 효과기 기능들의 향상에 사용하기 위한, 단락 1 내지 24 중 어느 한 항의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자, 또는 단락 30의 약학 조성물.
- [0457] 33. 질환 치료에서 사용하기 위한, 단락 1 내지 24 중 어느 하나의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자, 또는 단락 30의 약학 조성물.
- [0458] 34. 단락 33에 있어서, 질환은 암인, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 약학 조성물.
- [0459] 35. 암 치료에 사용하기 위한, 단락 1 내지 24 중 어느 하나의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 단락 30의 약학 조성물로서, 이때 상기 사용은 화학요법제, 방사선 요법 및/또는 암 면역요법에 사용하기 위한 기타 제제와 병용 투여하기 위한 것인, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 약학 조성물.
- [0460] 36. 암 치료에 사용하기 위한, 단락 1 내지 24 중 어느 하나의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 단락 30의 약학 조성물로서, 이때 상기 사용은 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체와 병용 투여하기 위한 것인, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 약학 조성물.
- [0461] 37. 암 치료에 사용하기 위한, 단락 1 내지 24 중 어느 하나의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 단락 30의 약학 조성물로서, 이때 상기 사용은 항-PD-L1 항체 또는 항-PD-1 항체와 병용 투여하기 위한 것인, 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 약학 조성물.
- [0462] 38. 질환 치료용, 특히, 암 치료용 약제의 제조에 있어서, 단락 1 내지 24 중 어느 하나의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자 또는 단락 30의 약학 조성물의 용도.
- [0463] 39. 개체의 질환, 특히, 암을 치료하는 방법으로서, 단락 1 내지 24 중 어느 하나의 이중특이적 작용성 CD28 항원 결합 분자, 또는 단락 30의 약학 조성물의 유효량을 상기 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.
- [0464] 40. 단락 39에 있어서, 화학요법제, 방사선 요법 및/또는 암 면역요법에 사용하기 위한 기타 제제와 병용하여, 특히, T-세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체 또는 항-PD-L1 항체 또는 항-PD-1 항체를 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [0465] ***

- [0466] **실시에**
- [0467] 다음은 본 발명의 방법 및 조성물의 실시예들이다. 다양한 다른 실시예가 전술한 일반적인 설명에 따라 실시될 수 있는 것으로 이해된다.
- [0468] **재조합 DNA 기술**
- [0469] Sambrook 등, *Molecular cloning: A laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989에 기재된 표준 방법을 사용하여 DNA를 조작하였다. 분자 생물학적 시약들은 제조업체의 지침에 따라 사용되었다. 인간 면역글로불린 경쇄 및 중쇄의 뉴클레오티드 서열에 관한 일반적인 정보는 Kabat, E.A. 등, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Ed., NIH Publication No 91-3242에 제공되어 있다.
- [0470] **DNA 시퀀싱**
- [0471] DNA 서열들을 이중 가닥 시퀀싱에 의해 결정하였다.
- [0472] **유전자 합성**
- [0473] 필요한 경우 원하는 유전자 분절들을 적절한 주형을 사용하여 PCR로 생성하거나 Geneart AG(독일 레겐스부르크) 또는 Genscript(미국 뉴저지)에서 자동 유전자 합성을 통해 합성 올리고뉴클레오티드 및 PCR 생성물로부터 합성했다. 단일 제한 엔도뉴클레아제 절단 부위가 연결한 유전자 분절들을 표준 클로닝/시퀀싱 벡터내에 클로닝하였다. 이러한 플라스미드 DNA를 형질전환된 박테리아로부터 정제하고 UV 분광학으로 농도를 측정하였다. 서브클로닝된 유전자 단편들의 DNA 서열을 DNA 시퀀싱으로 확인하였다. 각각의 발현 벡터들 내부로 서브클로닝 할 수 있게 하기에 적합한 제한 부위들을 사용하여 유전자 분절들을 설계하였다. 모든 구조체들은 진핵생물 세포에서의 분비를 위해 단백질을 표적화하는 리더 펩티드를 코딩하는 5'-단부 DNA 서열들을 사용하여 설계되었다.
- [0474] **세포 배양 기술**
- [0475] *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, Inc에 기재된 표준 세포 배양 기술을 사용하였다.
- [0476] **단백질 정제**
- [0477] 단백질을 표준 프로토콜을 참조하여 여과된 세포 배양 상청액으로부터 정제하였다. 요약하면, 항체를 단백질 A 세파로스 컬럼(GE healthcare)에 적용시키고 PBS로 세척하였다. 항체를 pH 2.8에서 용리시킨 다음 샘플을 즉시 중화시켰다. 응집된 단백질은 PBS 중의 또는 20 mM 히스티딘 중의, 150 mM NaCl pH 6.0 중의 크기 배제 크로마토그래피(Superdex 200, GE Healthcare)에 의해 단량체 항체로부터 분리되었다. 단량체 항체 분획들을 모으고, (필요한 경우) 예를 들어, MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO) 원심분리 농축기를 사용하여 농축시키고, 동결시키고 -20°C 또는 -80°C에서 보관하였다. 상기 샘플의 일부를 예를 들어, SDS-PAGE, 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 또는 질량 분광분석법에 의한 차후 단백질 분석 및 분석학적 특성 규명을 위해 제공하였다.
- [0478] **SDS-PAGE**
- [0479] 제조업체의 지시에 따라 NuPAGE® Pre-Cast 겔 시스템 (Invitrogen)을 사용하였다. 특히, 10% 또는 4-12% NuPAGE® Novex® Bis-TRIS Pre-Cast 겔 (pH 6.4) 및 NuPAGE® MES (환원 겔, NuPAGE® 항산화 전개 완충액 첨가제 보유) 또는 MOPS (비환원 겔) 전개 완충액이 사용되었다.
- [0480] **분석학적 크기 배제 크로마토그래피**
- [0481] 항체의 응집 및 올리고머 상태의 측정을 위한 크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 HPLC 크로마토그래피에 의해 수행하였다. 요약하면, 단백질 A 정제된 항체들을 Agilent HPLC 1100 시스템 상에서 300 mM NaCl, 50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7.5의 Tosoh TSKgel G3000SW 컬럼에 또는 Dionex HPLC-시스템 상에서 2 x PBS의 Superdex 200 컬럼 (GE Healthcare)에 처리하였다. 용리된 단백질을 UV 흡광도 및 피크 면적의 적분에 의해 정량분석하였다. BioRad 겔 여과 표준 151-1901은 표준으로 사용하였다.
- [0482] **질량 분광법**
- [0483] 이 섹션에서는 VH/VL 교환이 있는 다중특이적 항체(VH/VL 교차Mab)의 특성화를 정확한 조립에 중점을 두고 설명한다. 예상되는 1차 구조는 탈당화된 온전한 교차Mab 및 탈당화된/플라스민 분해된 또는 대안적으로 탈당화된/

제한된 LysC 분해된 교차Mab의 전자분무 이온화 질량 분석법(ESI-MS)에 의해 분석되었다.

[0484] VH/VL 교차Mab은 1 mg/ml의 단백질 농도에서 최대 17시간 동안 37°C에서 포스페이트 또는 Tris 완충액에서 N-글리코시다제 F로 탈당화되었다. 플라스민 또는 제한적 LysC(Roche) 분해는 각각 실온에서 120시간 동안 및 37°C에서 40분 동안 Tris 완충액 pH 8에서 100 µg의 탈당화된 VH/VL 교차Mab을 사용하여 수행되었다. 질량 분석에 앞서 샘플들을 Sephadex G25 컬럼(GE Healthcare)에서 HPLC를 통해 탈염시켰다. 총 질량은 TriVersa NanoMate 소스(Advion)가 장착된 maXis 4G UHR-QTOF MS 시스템(Bruker Daltonik)에서 ESI-MS를 통해 결정되었다.

[0485] **표면 플라즈몬 공명(SPR)(BIACORE)을 사용하여 각 항원에 대한 다중특이적 항체의 결합 및 결합 친화도 결정**

[0486] 각각의 항원에 대한 생성된 항체의 결합은 BIACORE 기기(GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, 스웨덴)를 사용하여 표면 플라즈몬 공명에 의해 조사된다. 간략하게, 친화도 측정을 위해, 염소-항-인간 IgG, JIR 109-005-098 항체는 각각의 항원에 대한 항체의 제시를 위해 아민 커플링을 통해 CM5 칩 상에 고정화된다. 결합은 HBS 완충액(HBS-P(10mM HEPES, 150mM NaCl, 0.005% Tween 20, pH 7.4), 25°C 또는 대안적으로 37°C에서 측정된다. 항원(R&D Systems 또는 사내 정제)을 다양한 농도로 용액에 첨가했다. 결합은 80초 내지 3분의 항원 주입에 의해 측정되었고; 칩 표면을 HBS 버퍼로 3-10분 동안 세척하여 해리를 측정하고 1:1 Langmuir 결합 모델을 사용하여 KD 값을 추정했다. 시스템 고유의 기준선 드리프트 수정 및 노이즈 신호 감소를 위해 샘플 곡선으로부터 음성 대조군 데이터(예를 들어, 완충액 곡선)를 뺀다. 각각의 Biacore 평가 소프트웨어를 사용하여 센서그램을 분석하고 친화도 데이터를 계산한다.

[0487] **실시예 1**

[0488] **CD28 및 인간 표피 성장 인자 수용체-2(Her2)를 표적으로 하는 이중특이적 항원 결합 분자의 생성 및 생산**

[0489] **1.1 CD28 및 인간 표피 성장 인자 수용체-2(Her2)를 표적으로 하는 이중특이적 항원 결합 분자의 클로닝**

[0490] 항원의 클로닝:

[0491] 인간 CD28(Uniprot: P10747)의 세포외 도메인(성숙된 단백질의 아미노산 1 내지 134)을 인코딩하는 DNA 단편을 용해성-정제 태그로 기능하는 hum IgG1 Fc 단편을 인코딩하는 단편 상류의 2개의 상이한 포유동물 수용자 벡터 내 프레임에 삽입하였다. 발현 벡터 중 하나는 Fc 영역에 "홀" 돌연변이를 함유하고, 다른 하나는 "늪" 돌연변이 그리고 뿐만 아니라 C-말단 avi 태그(GLNDIFEAQKIEWHE, 서열번호 88)를 포함하여, Bir A 비오틴 리가제와 공동 발현하는 동안 특이적인 비오틴화를 가능하게 하였다. 또한 두 Fc 단편 모두 PG-LALA 돌연변이를 포함했다. 두 벡터는 Fc-늪 사슬의 C-말단 단부에 1개의 비오틴화된 avi-태그를 갖는 이량체 CD28-Fc 구조체를 얻기 위해 BirA 비오틴 리가제를 코딩하는 플라스미드와 함께 공동 형질감염되었다.

[0492] 핫스팟이 없고 친화도가 감소된 CD28(SA) 변이체의 생성 및 특성화

[0493] 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 갖는 CD28 초작용성 항체(SA)가 WO 2006/050949에 기재되어 있다.

[0494] 페어링되지 않은 시스테인 잔기, 트립토판 잔기, 탈아미드화 부위의 제거 및 친화도가 감소된 CD28(SA) 변이체 생성

[0495] 상세한 결합체 특성화의 일부로서 CD28(SA) 가변 도메인 서열들의 컴퓨터 분석을 수행하였다. 이러한 분석은 VH의 CDR2 영역(위치 50, Kabat 넘버링)에서 쌍을 이루지 않은 시스테인, VH의 CDR3(위치 100a, Kabat 넘버링) 및 VL의 CDR1(위치 32, Kabat 넘버링)에서 트립토판 잔기 및 VH의 CDR2(위치 56, Kabat 넘버링)에서 잠재적인 아스파라긴 탈아미드화를 밝혀냈다. 트립토판의 산화는 다소 느린 과정이고 환원 화합물을 첨가하여 예방할 수 있지만, 항체 가변 도메인 내 페어링되지 않은 시스테인의 존재가 중요할 수 있다. 유리 시스테인은 반응성이 있어서 다른 단백질의 다른 페어링되지 않은 시스테인 또는 세포 또는 배지의 구성요소들과 안정한 결합을 형성할 수 있다. 결과적으로 이것은 잠재적으로 면역원성이 있는 알 수 없는 변형을 가진 이질적이고 불안정한 생성물을 유발할 수 있으므로 환자에게 위험을 초래할 수 있다. 또한, 아스파라긴의 탈아미드화 및 이에 따른 이소-아스파르테이트 및 숙신이미드의 형성은 시험관내 안정성 및 생체내 생물학적 기능 모두에 영향을 미칠 수 있다. 부모 무린 결합체 5.11A의 결정 구조 분석 결과 C50은 인간 CD28에 대한 결합에 관여하지 않으며 따라서 CD28에 대한 친화도에 영향을 미치지 않고 세린과 같은 유사한 아미노산으로 대체될 수 있음이 밝혀졌다. 그러나 위치 50의 트립토판 잔기 및 아스파라긴 둘 모두는 결합 계면에 가까이 있거나 결합 계면에 관여하므로 유사한 아미노산에 의한 대체는 결합 친화도의 감소를 초래할 수 있다. 본 실시예에서 우리는 특히 다음과 같은 이유로 인간 CD28에 대한 CD28(SA)의 친화도를 감소시키는 것을 목표로 했다: CD28(SA)의 친화도는 1-2 nM 범위이

며 결합 반감기는 약 32분이다. 이러한 강한 친화도는 환자에게 정맥 주사할 때 혈액 및 림프 조직과 같은 다량의 CD28 발현 세포를 포함하는 조직에서 싱크 효과를 가져올 수 있다. 그 결과, 표적하는 구성성분을 통한 화합물의 부위-특이적 표적화가 감소될 수 있고 구조체의 효능이 감소될 수 있다. 이러한 효과를 최소화하기 위해 여러 VH 및 VL 변이체를 생성하여 친화도를 서로 다른 정도까지 감소시켰다(도 2a 및 2c). 잠재적인 안정성 핫스팟을 나타내는 상기 언급된 위치 외에, 인간 CD28에 대한 결합에 직간접적으로 관여하는 추가 잔기들은 본래 무린 생식계열 아미노산 또는 유사한 아미노산으로 대체되었다. 또한, CD28(SA) VL 및 VH 모두의 CDR도 트라스 투주맵의 각각의 프레임워크 서열에 이식되었다(도 2b 및 2d). VH 및 VL 변이체의 여러 조합은 1가 1팔 항-CD28 IgG-유사 구조체들로서 발현되었고 결합은 SPR에 의해 특성화되었다.

[0496] SPR에 의한 감소된 1팔 항-CD28 변이체의 해리 속도 상수(k_{off}) 분석

[0497] 첫 번째 단계에서 항-CD28 결합제 변이체들을 특성화하기 위해 모든 결합제를 1가 1팔 IgG 유사 구조체로 발현시켰다(도 1a). 이 형식은 1:1 모델에서 CD28에 대한 결합을 특성화하기 위해 선택되었다. HEK 세포로의 형질감염 5일 후, 상청액을 수확하고 발현된 구조체들의 역가를 결정하였다.

[0498] 항-CD28 결합제 변이체의 해리 속도는 뉴트라비딘 포획에 의해 NLC 칩 상에 고정된 비오틴화된 huCD28-Fc 항원과 함께 25°C에서 ProteOn XPR36 기기(Biorad)를 사용하여 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 결정되었다. 재조합 항원(리간드)의 고정화를 위해, huCD28-Fc를 PBST(10mM 포스페이트, 150mM 소듐 클로라이드 pH 7.4, 0.005% Tween 20으로 구성된 Tween 20을 포함하는 포스페이트 완충 식염수)로 100 내지 500nM 범위의 농도로 희석시킨 다음, 다양한 접촉 시간에서 25 μ l/분으로 주입하였다. 이로 인해 수직 방향으로 1000에서 3000 반응 단위(RU) 사이의 고정 수준이 생성되었다.

[0499] 원-샷 동역학(one-shot kinetics) 측정을 위해 주입 방향을 수평 방향으로 변경하였다. 생성된 상청액의 역가를 기준으로 1가 1팔 IgG들을 PBST로 희석하여 100 nM에서 6.25 nM 범위의 2배 희석 시리즈를 얻었다. 주입은 120초의 결합 시간 및 300초의 해리 시간으로 별도의 채널 1-5를 따라 50 μ l/분으로 동시에 수행되었다. 참조용 "인-라인" 블랭크를 제공하기 위해 완충액(PBST)을 여섯 번째 채널을 따라 주입하였다. 결합 상호작용은 정제 및 생화학적 특성화 없이 상청액으로부터의 1가 1팔 IgG들로 측정되었기 때문에, 추가 결론을 위해 단백질:단백질 상호작용의 해리 속도만 사용되었다. 해리 센서그램을 피팅하여 ProteOn Manager v3.1 소프트웨어에서 간단한 1:1 Langmuir 결합 모델을 사용하여 해리 속도를 계산했다. 모든 클론의 해리 속도 상수(k_{off}) 값이 표 1에 요약되어 있다. 생성된 변이체의 비교는 부모 서열과 비교하여 최대 30배 감소된 k_{off} 값을 나타내었다.

[0500] 표 1: 모든 발현된 1가 항-CD28 변이체와 해리 속도 상수(k_{off}) 값의 요약

결합 변이체	Tapir ID	서열번호	서열번호	서열번호	$k_{off}(10^{-4}/M)$
CD28(SA)_변이체_1 (부모 CD28)	P1AE4441	72	80	87	3.0
CD28(SA)_변이체_2	P1AE3058	73	81	87	해당 없음
CD28(SA)_변이체_3	P1AE3059	73	82	87	해당 없음
CD28(SA)_변이체_4	P1AE3060	73	83	87	해당 없음
CD28(SA)_변이체_5	P1AE3061	73	80	87	해당 없음
CD28(SA)_변이체_6	P1AE3062	74	81	87	해당 없음
CD28(SA)_변이체_7	P1AE3063	74	82	87	100
CD28(SA)_변이체_8	P1AE3064	74	83	87	68
CD28(SA)_변이체_9	P1AE3065	74	84	87	78
CD28(SA)_변이체_10	P1AE3066	74	85	87	해당 없음
CD28(SA)_변이체_11	P1AE3067	74	80	87	37
CD28(SA)_변이체_12	P1AE3068	75	86	87	2.4
CD28(SA)_변이체_13	P1AE3069	75	80	87	1.9
CD28(SA)_변이체_14	P1AE3070	76	81	87	100
CD28(SA)_변이체_15	P1AE3071	76	82	87	24
CD28(SA)_변이체_16	P1AE3072	76	83	87	10
CD28(SA)_변이체_17	P1AE3073	76	84	87	14
CD28(SA)_변이체_18	P1AE3074	76	85	87	82
CD28(SA)_변이체_19	P1AE3075	76	80	87	2.9
CD28(SA)_변이체_20	P1AE3076	77	81	87	해당 없음
CD28(SA)_변이체_21	P1AE3077	77	82	87	해당 없음
CD28(SA)_변이체_22	P1AE3078	77	83	87	61
CD28(SA)_변이체_23	P1AE3079	77	80	87	43
CD28(SA)_변이체_24	P1AE3080	78	81	87	80
CD28(SA)_변이체_25	P1AE3081	78	82	87	3.51
CD28(SA)_변이체_26	P1AE3082	78	83	87	9.7
CD28(SA)_변이체_27	P1AE3083	78	84	87	14
CD28(SA)_변이체_28	P1AE3084	78	85	87	69
CD28(SA)_변이체_29	P1AE3085	78	80	87	2.5
CD28(SA)_변이체_30	P1AE3086	79	86	87	3.22
CD28(SA)_변이체_31	P1AE3087	79	80	87	2.5

[0501]

[0502]

인간 CD28에 대한 결합을 인간 CD28을 발현하는 CHO 세포(인간 CD28을 안정적으로 과발현하도록 변형된 부모 세포주 CHO-k1 ATCC #CCL-61)로 테스트하였다. 결합을 평가하기 위해, 세포를 수확하고, 계수하고, 생존력을 확인하고, FACS 완충액(eBioscience, Cat No 00-4222-26)에 2.5×10^5 /ml로 재현탁시켰다. 5×10^4 개의 세포를 둥근 바닥 96-웰 플레이트에서 2시간 동안 4°C에서 CD28 결합체의 농도를 증가시키면서(1pM - 100nM) 배양했다. 그런 다음, 세포를 차가운 FACS 완충액으로 3회 세척하고, PE-접합된 염소-항 인간 PE(Jackson ImmunoReserach, Cat No 109-116-098)와 함께 4°C에서 추가 60분 동안 인큐베이션하고, 차가운 FACS 완충액으로 1회 세척하고, 원심 분리하여 100 ul FACS 완충액에 재현탁시킨다. 구조체와 세포들 간의 비특이적 결합 상호작용을 모니터하기 위해 항-DP47 IgG가 음성 대조군으로서 포함되었다. 결합은 FACS Fortessa(BD, Software FACS Diva)를 사용하여 유세포 측정법에 의해 평가되었다. 결합 곡선은 GraphPadPrism6을 사용하여 얻었다. 1가 1팔 IgG-유사 CD28 변이체 구조체들은 도 3a 내지 3c에서 볼 수 있는 바와 같이 결합에서 차이를 보였다.

[0503]

CD28 및 Her2를 표적으로 하는 이중특이적 항원 결합 분자의 클로닝

[0504]

발현 플라스미드의 생성을 위해, 각각의 가변 도메인의 서열을 사용하고 각각의 수용 포유동물 발현 벡터에 미리 삽입된 각각의 불변 영역과 함께 인프레임으로 서브클로닝하였다. Fc 도메인에서는, 국제특허출원 공개 공보 2012/130831호에 기재된 방법에 따라 인간 IgG1 중쇄의 불변영역 내 Pro329Gly, Leu234Ala 및 Leu235Ala 돌연변이(PG-LALA)를 도입하여 Fc 감마 수용체와의 결합을 제거하였다. 이중특이적 항체의 생성을 위해, Fc 단편은 중쇄의 미스페어링을 방지하기 위해 "늑"(T366W 돌연변이, EU 인덱스에 따른 넘버링, 임의로 또한 S354C 돌연변이

이, EU 인덱스에 따른 넘버링) 또는 "홀" 돌연변이(EU 인덱스에 따른 T366S/L368A/Y407V 돌연변이, 선택적으로 EU 인덱스에 따른 Y349C 돌연변이)를 포함하였다. 일부 경우에, 홑 및 홀 항체는 별도의 세포에서 상기 설명된 바와 같이 발현되고, 정제되고, 온전한 이중특이적 항체로 조립되었다. 이중특이적 항원 결합 분자에서 경쇄의 미스페이어링을 피하기 위해, VH/VL 또는 CH1/C카파 도메인의 교환이 하나의 결합 모이어티에 도입되었다(교차Fab 기술). 또 다른 결합 모이어티에서, 국제특허출원 공개 공보 WO 2015/150447에 기술된 바와 같이 CH1 및 C카파 도메인에 전하가 도입되었다.

- [0505] Her2 항체 페르투주맵 CLC 및 트라스투주맵 CLC의 생성 및 제조는 WO 2015/091738에 기재되어 있다.
- [0506] 다음 분자들이 클로닝되었으며, 그 개략도가 **도 1b**, **1c** 또는 **1d**에 도시되어 있다.
- [0507] **분자 A:** CD28(SA_변이체 8) Fab 단편(홑)에 VH/VL 교환 그리고 Her2 (페르투주맵 CLC_WT) Fab 단편(홀)에 하전된 변형이 있으며(**도 1b**, 그러나 Fc 홑 사슬만 PG-LALA 돌연변이를 포함) 서열번호 91 및 96의 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 92 및 97의 경쇄 아미노산 서열을 포함하는, Her2 (페르투주맵 CLC_WT)-CD28 (SA_변이체 8) 1+1 형식, 이중특이적 huIgG1 야생형 /PG-LALA 키메라 교차Fab 분자(P1AF6741).
- [0508] **분자 B:** CD28(SA_변이체 8) Fab 단편(홑)에 VH/VL 교환 그리고 Her2 (페르투주맵 CLC) Fab 단편(홀)에 하전된 변형이 있으며(**도 1b**) 서열번호 91 및 98의 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 92 및 97의 경쇄 아미노산 서열을 포함하는, Her2 (페르투주맵 CLC)-CD28 (SA_변이체 8) 1+1 형식, 이중특이적 huIgG1 PG-LALA 교차Fab 분자(P1AF8305).
- [0509] **분자 C:** CD28(SA_변이체 8) Fab 단편(홑)에 하전된 변형 그리고 Her2 (페르투주맵 CLC) Fab 단편(홀)에 VH/VL 교환이 있으며(**도 1d**) 서열번호 74 및 99의 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 83 및 100의 경쇄 아미노산 서열을 포함하는, Her2 (페르투주맵 CLC)-CD28 (SA_변이체 8) 1+1, 이중특이적 huIgG1 PG-LALA 교차Fab 분자.
- [0510] **분자 D:** CD28(SA_변이체 8) Fab 단편(홑)에 VH/VL 교환 그리고 Her2 (트라스투주맵 CLC) Fab 단편(홀)에 하전된 변형이 있으며(**도 1b**) 서열번호 91 및 101의 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 92 및 97의 경쇄 아미노산 서열을 포함하는, Her2 (트라스투주맵 CLC)-CD28 (SA_변이체 8) 1+1 형식, 이중특이적 huIgG1 PG-LALA 교차Fab 분자(P1AF8338).
- [0511] **분자 E:** CD28(SA_변이체 8) Fab 단편(홑)에 하전된 변형 그리고 Her2 (트라스투주맵 CLC) Fab 단편(홀)에 VH/VL 교환이 있으며(**도 1d**) 서열번호 74 및 102의 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 83 및 100의 경쇄 아미노산 서열을 포함하는, Her2 (트라스투주맵 CLC)-CD28 (SA_변이체 8) 1+1, 이중특이적 huIgG1 PG-LALA 교차Fab 분자.
- [0512] **분자 F:** 서열번호 178 및 180의 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 179 및 181의 경쇄 아미노산 서열을 포함하는, Her2 (4D5)-CD28 (SA_변이체 8) 1+1, 이중특이적 huIgG1 N297G (**도 1c**)
- [0513] **분자 G:** 서열번호 178 및 182의 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 179 및 183의 경쇄 아미노산 서열을 포함하는, Her2 (2C4)-CD28 (SA_변이체 8) 1+1, 이중특이적 huIgG1 N297G (**도 1c**)
- [0514] **1.2 CD28 및 Her2를 표적으로 하는 이중특이적 항원 결합 분자의 생산**
- [0515] 상기 언급된 분자들의 발현은 키메라 MPSV 프로모터 또는 CMV 프로모터에 의해 추진된다. 폴리아데닐화는 CDS의 3' 말단에 위치한 합성 폴리A 신호 서열에 의해 추진된다. 또한 각 벡터에는 상염색체 복제를 위한 EBV OriP 서열이 포함되어 있다.
- [0516] 항체 및 이중특이적 항체는 HEK293 EBNA 세포 또는 CHO EBNA 세포의 일시적 형질감염에 의해 생성되었다. 세포를 원심분리하고 배지를 예열된 CD CHO 배지(Thermo Fisher, 카탈로그 번호 10743029)로 교체했다. 발현 벡터를 CD CHO 배지에서 혼합하고, PEI(폴리에틸렌민, Polysciences, Inc, 카탈로그 번호 23966-1)를 첨가하고, 용액을 와류시키고 실온에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포(2 Mio/ml)를 벡터/PEI 용액과 혼합하고 플라스크로 옮기고 3시간 동안 37°C에서 5% CO₂ 대기의 진탕 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 보충제가 포함된 Excel 배지(총 부피의 80%)를 추가했다 (W. Zhou and A. Kantardjiev, Mammalian Cell Cultures for Biologics Manufacturing, DOI: 10.1007/978-3-642-54050-9; 2014). 형질감염 1일 후, 보충제(공급물, 총 부피의 12%)를 첨가하였다. 배양 7일 후, 원심분리에 의해 세포 상청액을 수집하고, 후속 여과하고(0.2 μm 필터), 하기 제시된 표준 방법에 의해 수집된 상청액으로부터 단백질을 정제하였다.
- [0517] 대안적으로, 본원에 기재된 항체 및 이중특이적 항체들은 Evitria사의 일반(비-PCR 기반) 클로닝 기술을 이용한

자사의 벡터 시스템과 현탁-적응된 CHO K1 세포(본래 ATCC로부터 받았고 Evitria사의 현탁 배양에서의 무혈청 성장에 적응됨)를 사용하여 제조되었다. 생산을 위해, Evitria사는 자사의 무-동물 성분 및 무혈청 배지 (eviGrow 및 eviMake2)와 자사의 형질감염 시약(eviFect)을 사용했다. 원심분리 및 후속 여과(0.2 μm 필터)에 의해 상층액을 수확하고, 수확된 상층액으로부터 표준 방법으로 단백질을 정제하였다.

[0518] **1.3 CD28 및 Her2를 표적으로 하는 이중특이적 항원 결합 분자의 정제**

[0519] 단백질을 표준 프로토콜을 참조하여 여과된 세포 배양 상층액으로부터 정제하였다. 요약하면, 세포 배양 상층액 으로부터 단백질 A-친화도 크로마토그래피(평균 완충액: 20mM 소듐 시트레이트, 20mM 소듐 포스페이트, pH 7.5; 용리 완충액: 20mM 소듐 시트레이트, pH 3.0)에 의해 Fc 함유 단백질을 정제하였다. pH 3.0에서 용리시킨 후 샘플 플을 즉각적으로 pH 중화시켰다. 원심분리(Millipore Amicon® ULTRA-15(Art.Nr.: UFC903096))에 의해 단백질을 농축시키고 20mM 히스티딘, 140mM 염화나트륨, pH 6.0에서 크기 배제 크로마토그래피에 의해 단량체 단백질을 로부터 응집된 단백질을 분리하였다.

[0520] **1.4 CD28 및 Her2를 표적으로 하는 이중특이적 항체의 분석 데이터**

[0521] 정제된 단백질의 농도는 Pace, 등, Protein Science, 1995, 4, 2411-1423에 따라 아미노산 서열을 기초로 계산 된 질량 흡광 계수를 사용하여 280 nm에서의 흡광도를 측정하여 결정되었다. 단백질의 순도 및 분자량은 LabChipGXII(Perkin Elmer) 또는 LabChip GX Touch (Perkin Elmer)를 사용하여 환원제의 존재 및 부재하에 CE-SDS로 분석하였다. 응집체 함량의 결정은 전개 완충액(200 mM KH₂PO₄, 250 mM KCl pH 6.2, 0.02% Na₃)에서 평형화된 분석 크기 배제 컬럼 (TSKgel G3000 SW XL 또는 UP-SW3000)을 사용하는 25°C에서의 HPLC 크로마토그래 피에 의해 수행되었다. 모든 분자의 정제 매개변수들을 표 2에 요약한다.

[0522] **표 2: 이중특이적 CD28 항원 결합 분자의 생산 및 정제 요약**

분자	설명	수율 [mg/l]	분석 SEC (HMW/단량체/LMW) [%]	CE-SDS 로 측정된 순도[%]
A	Her2 (페르투주맵 CLC_WT) - CD28 (SA_변이체 8) 1+1	측정되 지 않음	4.6 / 93.6 / 1.7	88.61
B	Her2 (페르투주맵 CLC) - CD28 (SA_변이체 8) 1+1	68.16	3.3 / 93.6 / 3.1	80.71
D	Her2 (트라스투주맵 CLC) - CD28 (SA_변이체 8) 1+1	48.1	1.5 / 98.5 / 0	98.35

[0523]

[0524] **실시예 2**

[0525] **Her2- 및 CD28-발현 세포에 대한 Her2를 표적화하는 이중특이적 CD28 작용성 항원 결합 분자의 결합**

[0526] Her2-CD28 이중특이적 항원 결합 분자의 Her2에 대한 결합을 인간 유방암 세포주 KPL-4 (Kawasaki Medical School)를 사용하여 테스트하고 인간 CD28에 대한 결합을 인간 CD28을 발현하는 CHO 세포를 사용하여 테스트하였다(부모 세포주 CHO-k1 ATCC #CCL-61, 인간 CD28을 안정하게 과발현하도록 변형됨).

[0527] 결합을 평가하기 위해 세포를 수확하고, 계수하고, 생존력을 확인하고, PBS에 2 Mio 세포/ml로 재현탁했다. 2x10⁵ 개의 세포들을 둥근 바닥 96웰 플레이트(greiner bio-one, cellstar, 카탈로그 번호 650185)에서 4°C에서 60분 동안 증가하는 농도의 Her2-CD28 구조체 또는 대조군 분자(서열번호 186의 중쇄 및 서열번호 187의 경쇄를 포함하는 DP47 huIgG1 P329G LALA)와 함께 인큐베이션하였다. 이어서, 세포들을 PBS로 2회 세척하고, 4°C에서 Fc γ 단편 특이적인 이차 결합 R-피코에리쓰린 AffiniPure F(ab')₂ 단편 염소 항-인간 IgG(Jackson ImmunoResearch, 카탈로그 번호 109-116-098)와 함께 30분 더 인큐베이션하고, PBS로 2회 세척하고, 원심분리 하고 150 l의 PBS + Dapi (4' -디아미딘-2' -페닐인돌 디하이드로클로라이드, PBS에서 1:10000 희석, 10236276001 Roche)에 재현탁시켰다. 결합은 FACS Fortessa(BD, Software FACS Diva)를 사용하여 유세포 측정 법에 의해 평가되었다. 결합 곡선은 GraphPadPrism 7(Graph Pad Software Inc.)을 사용하여 얻었다.

[0528] 도 4a 및 4b 및 도 6A 및 6B에 나타낸 바와 같이, Her2-CD28 이중특이적 항원 결합 분자는 KPL-4 세포 상의

Her2에 대한 결합 및 인간 CD28을 발현하는 CHO-k1(ATCC #CCL-61) 세포 상의 CD28에 대한 결합을 나타낸다.

- [0529] **실시예 3**
- [0530] **Her2를 표적화하는 이중특이적 CD28 작용성 항원 결합 분자의 시험관내 기능적 특성화**
- [0531] **3.1 IL-2 리포터 분석에 기초한 Her2를 표적으로 하는 이중특이적 CD28 작용성 항원 결합 분자의 시험관 내 기능적 특성화 - CD3-IgG로 자극**
- [0532] 항-CD3-매개 T 세포 활성화를 지원하는 Her2-CD28 이중특이적 항원 결합 분자의 능력을 평가하기 위해, Her2-CD28 이중특이적 항원 결합 분자를 IL-2 리포터 세포 분석에서 테스트하였다. IL-2 리포터 세포(Promega, 카탈로그 번호 J1651)는 효과기 세포(IL-2 프로모터에 의해 구동되는 루시페라제 리포터를 발현하는 Jurkat T 세포주)로 작용했고 KPL-4 세포는 종양 표적으로 작용했다. DP47 huIgG1 P329G LALA 항체는 비결합 대조군으로 포함되었다. 10000개의 종양 표적 세포를 10nM 항-CD3(eBioscience #16-0037-85)의 단독 존재 하에 또는 증가하는 농도의 Her2-CD28 이중특이적 항체(2.44pM - 10nM)와 함께 50000개의 IL-2 리포터 세포(E:T 5:1)가 있는 흰색 및 평평한 바닥 96웰 플레이트(Greiner 655083)에서 37°C에서 6시간 동안 인큐베이션했다. 측정에 앞서 플레이트를 실온에서 15분 동안 인큐베이션한 후 기질(ONE-Glo solution, Promega, Ca No E6120) 100 μl를 세포에 첨가하였다. 어두운 곳에서 상온에서 10분간 인큐베이션한 후 Tecan Spark 10M을 사용하여 발광(수/초)을 측정했다.
- [0533] **도 5 및 도 7A에** 도시된 바와 같이, Her2-CD28 이중특이적 항원 결합 분자는 준최적 CD3 자극에 노출된 T 세포에서 농도 의존적 방식으로 증가된 IL-2 생산으로 판단하였을 때 T 세포 활성화를 향상시킬 수 있었다. T 세포 활성화는 DP47 huIgG1 P329G LALA 항체에 대해 또는 Her2-발현 KPL4 종양 세포의 부재에서는 관찰될 수 없었다(도 7B).
- [0534] **3.2 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 사용하여 Her2를 표적화하는 이중특이적 CD28 작용성 항원 결합 분자에 의한 T 세포 활성화의 시험관내 평가**
- [0535] HER2 TDB 유도된 T 세포 활성화에 대한 Her2-CD28 이중특이적 항원 결합 분자의 효과는 단일- 또는 이중특이적 CD28 작용제 항체의 존재 또는 부재시 건강한 기증자 PBMC 및 Her2 증폭된 KPL-4 유방암 세포를 HER2 TDB로 처리함으로써 테스트되었다. CD4 및 CD8 T 세포의 활성화는 유동 세포분석법으로 측정했다.
- [0536] 인간 PBMC 및 종양 표적 세포(KPL-4)(10:1 비율)를 HER2 TDB(서열번호 174의 중쇄 HC1, 서열번호 175의 경쇄 LC1, 서열번호 176의 제2 중쇄 HC2 및 서열번호 177의 제2 경쇄를 포함하는 Her2-CD3 이중특이적 항체)의 존재 하에 Her2-CD28 이중특이적 항원 결합 분자 Her2(4D5)/CD28 또는 Her2(2C4)/CD28 (500 ng/ml) 또는 단일특이적 항-CD28 항체(CD28 2가, 500 ng/ml)와 함께 평평한 바닥 96-웰 플레이트(BD)에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 세포들을 새로운 V-바닥 96-웰 플레이트로 옮겼다. 세포를 CD4-PE-Cy7, CD8-FITC, CD69-PE 및 CD25-APC로 염색하였다. CD69 및 CD25 표면 발현은 유세포 측정법에 의해 CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포에서 검출되었다. CD4⁺CD69⁺CD25⁺ 및 CD8⁺CD69⁺CD25⁺ T 세포의 백분율은 CD4⁺(도 8A) 및 CD8⁺ T 세포 활성화(도 8B)로서 보고되었다.
- [0537] 예상한 바와 같이, HER2 TDB를 사용한 단일 제제 치료는 CD4 및 CD8 세포 모두를 강력하게 활성화하였다. HER2 TDB와 3개의 CD28 작용제 중 하나를 병용 치료하면 활성화된 T 세포 분획과 T 세포 활성화의 효능 둘 모두가 추가로 증가했다. Her2-표적화된 이중특이적 항원 결합 분자는 비표적화된 2가 CD28 항체와 비교하여 T 세포 활성화를 더 강력하게 향상시켰다.
- [0538] **3.3 Her2 TDB의 존재 하에 Her2를 표적화하는 이중특이적 CD28 작용성 항원 결합 분자에 의한 종양 세포 사멸의 시험관내 평가**
- [0539] 실시예 3.2에서와 동일한 실험 설정을 사용하여 HER2 TDB 유도된 종양 세포 사멸에 대한 CD28 공동 자극의 효과를 분석하였다. 종양 세포 생존력의 손실을 Cell Titer-Glow 발광 세포 생존력 분석에 의해 검출하였다. 종양 세포 사멸을 달성하거나 TDB-매개 종양 세포 사멸을 지원하는 이중특이적 Her2-CD28 항원 결합 분자의 능력을 평가하기 위해, Her2-발현 KPL-4 세포가 종양 표적으로서 기능하였다. 표적 세포 KPL-4를 웰당 10,000개의 세포 밀도로 바닥이 투명한 검은색 96-웰 플레이트에 플레이팅하였다. 인간 PBMC를 10:1 E:T 비율로 웰에 첨가하였다. 표시된 농도의 HER2 TDB를 Her2-CD28 이중특이적 항원 결합 분자 Her2(4D5)/CD28 또는 Her2(2C4)/CD28(500ng/ml)과 함께 웰에 첨가했다. 48시간 후, 플레이트를 PBS로 2회 세척하였다. 100μL Cell

Titer-Glow 발광 세포 생존력 시약(Promega 카탈로그 번호 G7570)을 첨가하고 설명서에 설명된 대로 플레이트를 발광계에서 판독했다.

[0540] 3가지 CD28 작용제 중 하나와의 병용 치료는 KPL-4 세포의 사멸을 매개하는 HER2 TDB의 효능을 증가시켰다(도 8C). T 세포 활성화와 유사하게, HER2 표적화된 이중특이적 CD28 항원 결합 분자의 효과는 비표적화된 2가 CD28 항체에 비해 더 강했다. 항-HER2 클론 2C4를 사용한 Her2 표적화는 T 세포 활성화 및 종양 세포 사멸 모두에서 항-HER2 클론 4D5를 사용한 Her2 표적화와 비교하여 반응을 향상시켰으며, 이는 4D5 표적화된 HER2 TDB와의 비경쟁적 결합으로 인한 것 같다.

[0541] **3.4 시험관 내 사이토카인 방출 분석**

[0542] 용해성 사이토카인의 분석을 위해 치료 24시간 후 T 세포 활성화 분석으로부터 상층액을 수확하였다. 시험관 내 T 세포 활성화 분석(실시에 3.2에 설명됨)으로부터 수집된 상층액 샘플은 제조업체의 지시에 따라 Bio-Plex Pro 인간 사이토카인 분석(Biorad; Hercules, CA)을 사용하여 연구하였다.

[0543] 2가 CD28 항체의 첨가는 HER2 TDB 유도 사이토카인 방출에 단지 미미한 영향을 주었으나, HER2-표적화 CD28 이중특이적 항원 결합 분자의 첨가는 측정된 모든 사이토카인을 실질적으로 증가시켰다. 도 9a 내지 9g에, GM-CSF(도 9a), IFN-감마(도 9b), IL-10(도 9c), IL-6(도 9d), TNF-알파(도 9e), IL-2(도 9f) 및 IL-1b(도 9g)의 사이토카인 방출이 도시되어 있다.

[0544] **3.5 체외 T 세포 및 NK 세포 수 카운트**

[0545] 면역 세포 수에 대한 CD28 공동 자극의 효과는 HER2-TDB로 치료한 후 최대 수 주차까지 다양한 시점에서 유동 세포 측정법으로 측정되었다. 인간 PBMC는 제조업체의 지시에 따라 카르복시플루오레세인 숙신이미딜 에스테르 (CFSE; ThermoFisher Scientific; Waltham, MA)로 표지되었다. CFSE 표지된 PBMC 및 표적 세포(KPL-4)(10:1 비율)를 50ng의 HER2 TDB 및 500ng/ml의 Her2-CD28 이중특이적 항원 결합 분자 Her2(4D5)/CD28 또는 Her2(2C4)/CD28의 존재 또는 부재 하에 평평한 바닥 96웰 플레이트(BD)에서 3, 7, 10 또는 14일 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 시간 종료 후, CD4-PE-Cy7, CD8-퍼시픽 블루, CD56-APC에 대해 세포를 염색하고 세포 수를 유동 세포 측정법으로 카운팅 비드를 사용하여 계수하였다.

[0546] 3개의 CD28 작용제 분자 중 하나와의 공동-치료는 HER2 TDB만으로 치료된 샘플과 비교하여 7-14일차에 CD4⁺ 세포의 수를 증가시켰다(도 10B). 모든 CD28 작용제 분자는 또한 14일차에 CD8⁺ 세포 수를 명백하게 증가시킨 반면, NK 세포 수는 2개의 Her2-표적화 이중특이적 CD28 항원 결합 분자에 의해서만 약간 증가했다(도 10D). T 세포 활성화, 종양 세포 사멸 및 사이토카인 방출과 유사하게, HER2-표적화된 이중특이적 항원 결합 분자와의 공동-치료는 2가 CD28 항체와 비교하여 면역 세포 수를 보다 강력하게 증가시켰다.

[0547] ***

[0548] **참고문헌:**

[0549] Acuto, O., and Michel, F. (2003). CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol* 3, 939-951.

[0550] Bahlis N.J., King A.M., Kolonias D. Carlson L.M., Liu H.Y., Hussein M.A., Terebello H.R., Byrne G.E. Jr, Levine B.L., Boise L.H., Lee K.P. (2007). CD28-mediated regulation of multiple myeloma cell proliferation and survival. *Blood* 109 (11), 5002-5010.

[0551] Boomer, J.S., and Green, J.M. (2010). An enigmatic tail of CD28 signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a002436.

[0552] Carreno, B.M., and Collins, M. (2002). The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol* 20, 29-53.

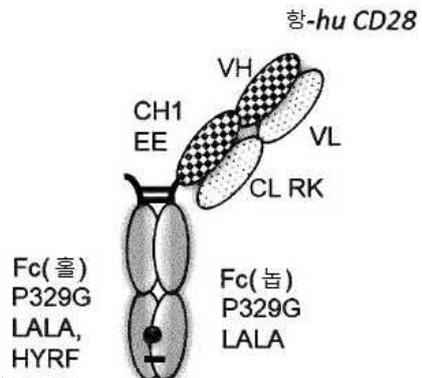
[0553] Chen, L., and Flies, D.B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 13, 227-242.

[0554] Engelhardt, J.J., Sullivan, T.J., and Allison, J.P. (2006). CTLA-4 overexpression inhibits T cell responses through a CD28-B7-dependent mechanism. *J Immunol* 177, 1052-1061.

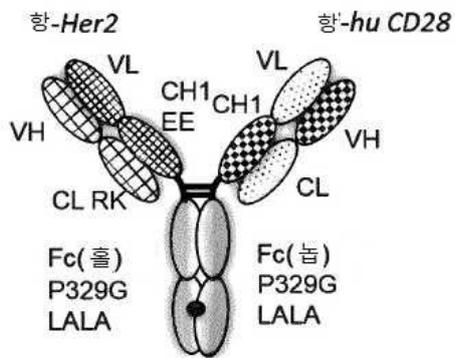
- [0555] Esensten, J.H., Helou, Y.A., Chopra, G., Weiss, A., and Bluestone, J.A. (2016). CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity* 44, 973-988.
- [0556] Fraser, J.D., Irving, B.A., Crabtree, G.R., and Weiss, A. (1991). Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science* 251, 313-316.
- [0557] Gao Y., Wang X., Yan H., Zeng J., Ma S., Niu Y., Zhou G., Jiang Y., Chen Y. (2016). Comparative Transcriptome Analysis of Fetal Skin Reveals Key Genes Related to Hair Follicle Morphogenesis in Cashmere Goats. *PLoS One* 11(3), e0151118.
- [0558] Hui, E., Cheung, J., Zhu, J., Su, X., Taylor, M.J., Wallweber, H.A., Sasmal, D.K., Huang, J., Kim, J.M., Mellman, I., and Vale, R.D. (2017). T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science* 355, 1428-1433.
- [0559] Hunig, T. (2012). The storm has cleared: lessons from the CD28 superagonist TGN1412 trial. *Nat Rev Immunol* 12, 317-318.
- [0560] June, C.H., Ledbetter, J.A., Gillespie, M.M., Lindsten, T., and Thompson, C.B. (1987). T-cell proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporine-resistant interleukin 2 gene expression. *Mol Cell Biol* 7, 4472-4481.
- [0561] Kamphorst, A.O., Wieland, A., Nasti, T., Yang, S., Zhang, R., Barber, D.L., Konieczny, B.T., Daugherty, C.Z., Koenig, L., Yu, K., et al. (2017). Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent. *Science* 355, 1423-1427.
- [0562] Lavin, Y., Kobayashi, S., Leader, A., Amir, E.D., Elefant, N., Bigenwald, C., Remark, R., Sweeney, R., Becker, C.D., Levine, J.H., et al. (2017). Innate Immune Landscape in Early Lung Adenocarcinoma by Paired Single-Cell Analyses. *Cell* 169, 750-765 e717.
- [0563] Linsley, P.S., Clark, E.A., and Ledbetter, J.A. (1990). T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5031-5035.
- [0564] Murray M.E., Gavile C.M., Nair J.R., Koorella C., Carlson L.M., Buac D., Utley A., Chesi M., Bergsagel P.L., Boise L.H., Lee K.P. (2014). CD28-mediated pro-survival signaling induces chemotherapeutic resistance in multiple myeloma. *Blood* 123 (24), 3770 - 3779.
- [0565] Römer, P.S., Berr, S., Avota, E., Na, S.Y., Battaglia, M., ten Berge, I., Einsele, H., and Hunig, T. (2011). Preculture of PBMCs at high cell density increases sensitivity of T-cell responses, revealing cytokine release by CD28 superagonist TGN1412. *Blood* 118, 6772-6782.
- [0566] Tai, X., Van Laethem, F., Sharpe, A.H., and Singer, A. (2007). Induction of autoimmune disease in CTLA-4-/- mice depends on a specific CD28 motif that is required for in vivo costimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 13756-13761.
- [0567] Thompson, C.B., Lindsten, T., Ledbetter, J.A., Kunkel, S.L., Young, H.A., Emerson, S.G., Leiden, J.M., and June, C.H. (1989). CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1333-1337.
- [0568] Zheng, C., Zheng, L., Yoo, J.K., Guo, H., Zhang, Y., Guo, X., Kang, B., Hu, R., Huang, J.Y., Zhang, Q., et al. (2017). Landscape of Infiltrating T Cells in Liver Cancer Revealed by Single-Cell Sequencing. *Cell* 169, 1342-1356 e1316.

도면

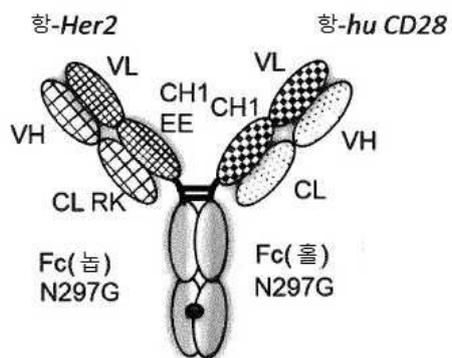
도면1a



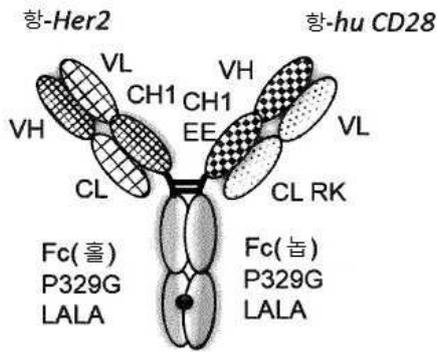
도면1b



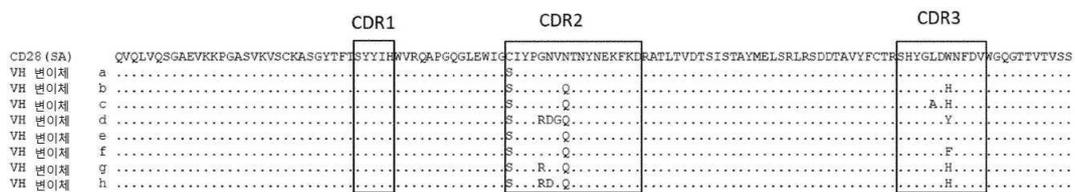
도면1c



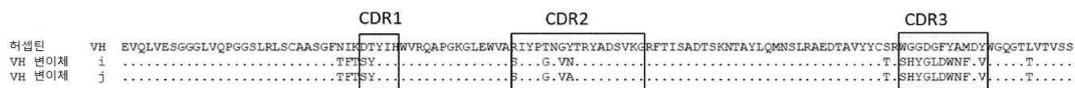
도면1d



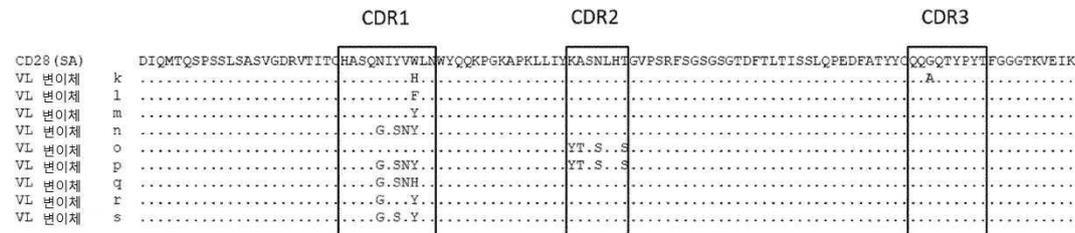
도면2a



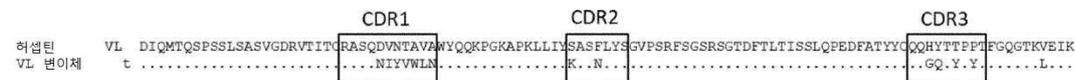
도면2b



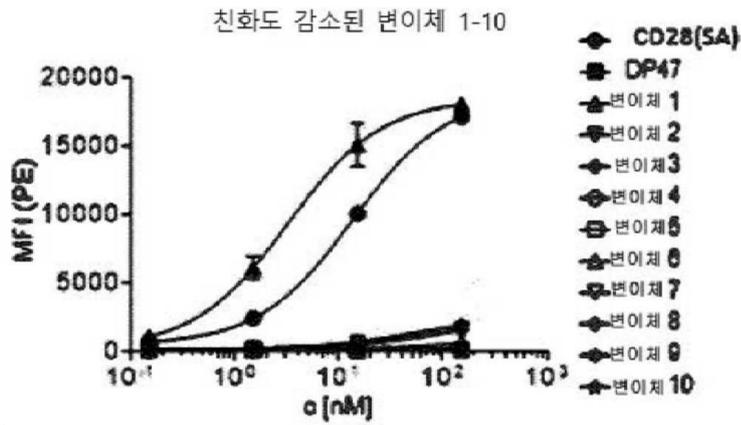
도면2c



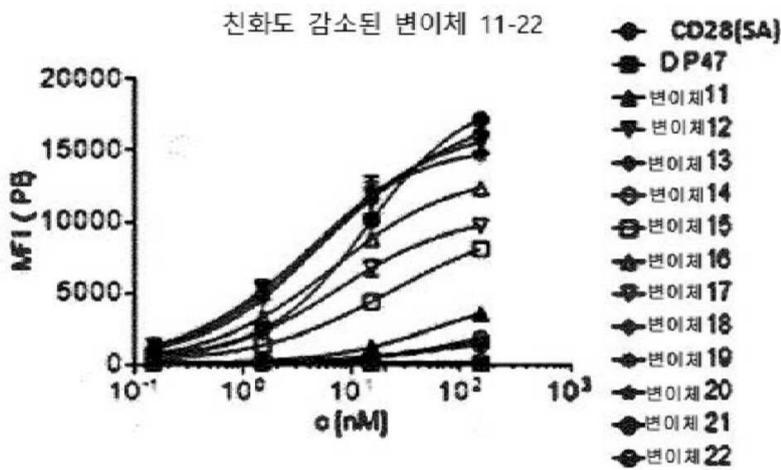
도면2d



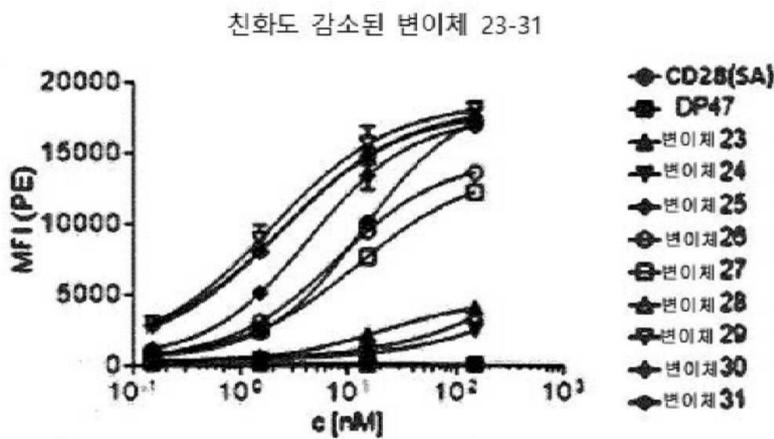
도면3a



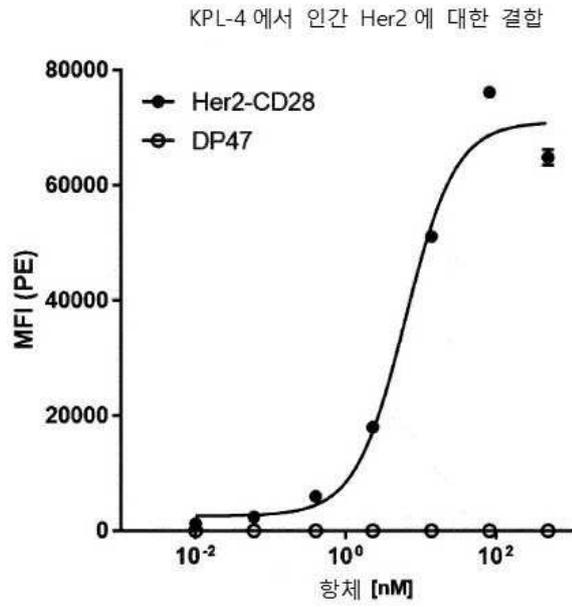
도면3b



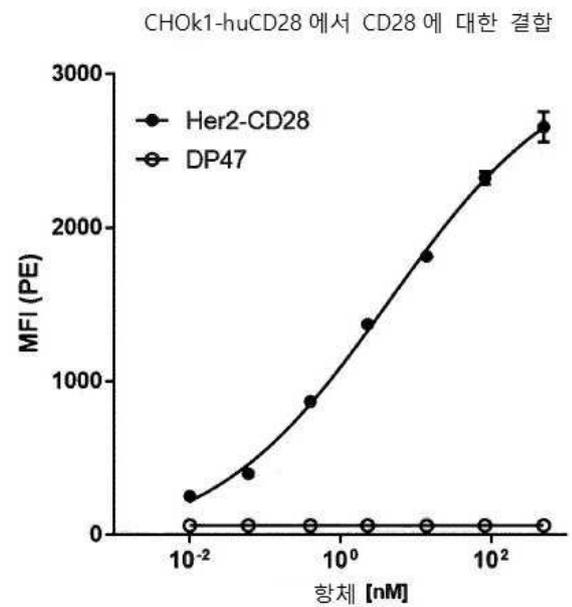
도면3c



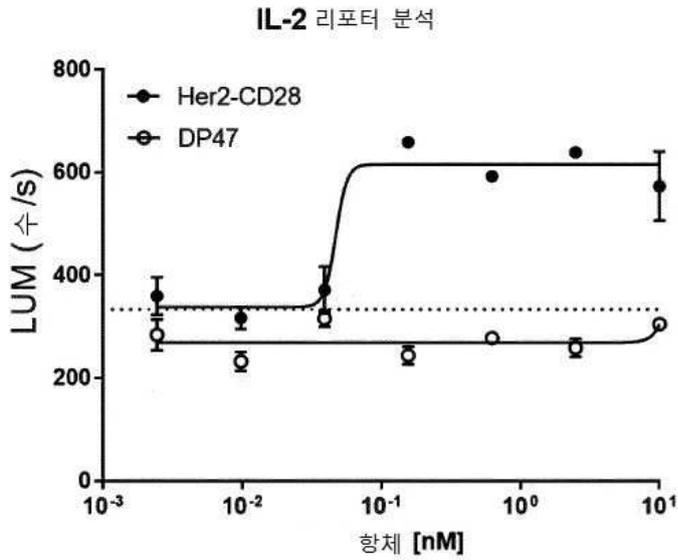
도면4a



도면4b

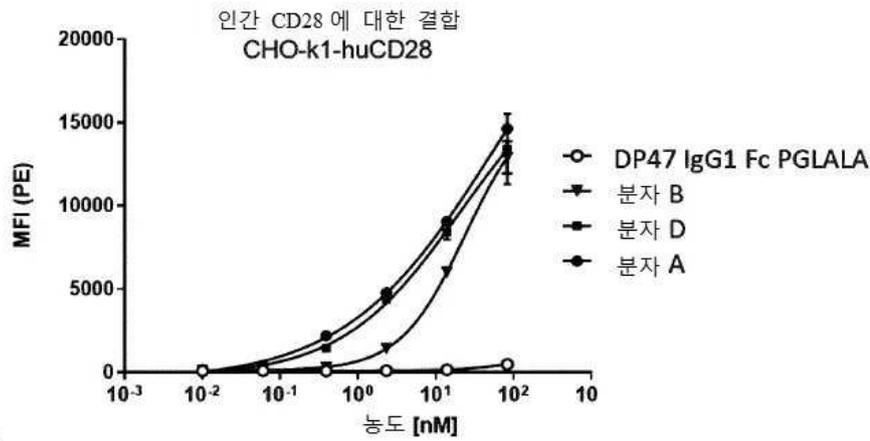


도면5

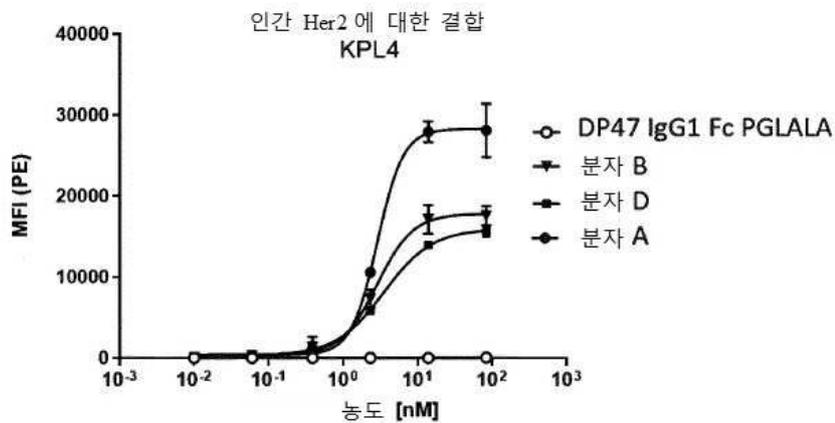


도면6

도. 6A

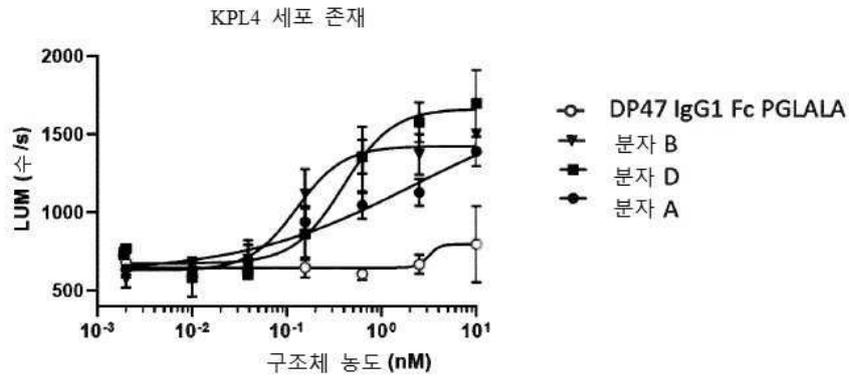


도. 6B

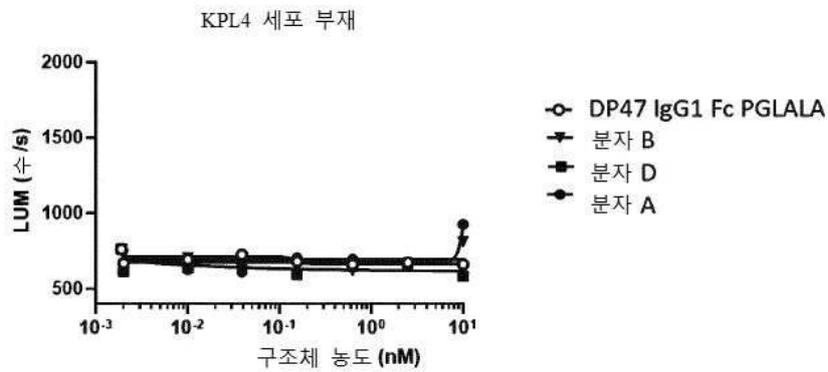


도면7

도. 7A

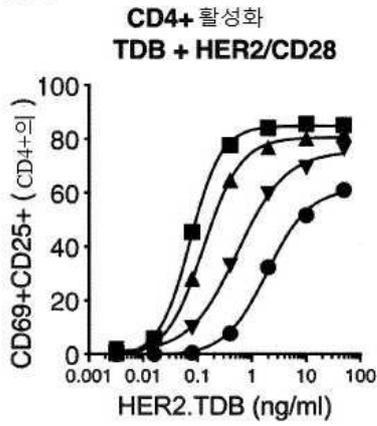


도. 7B

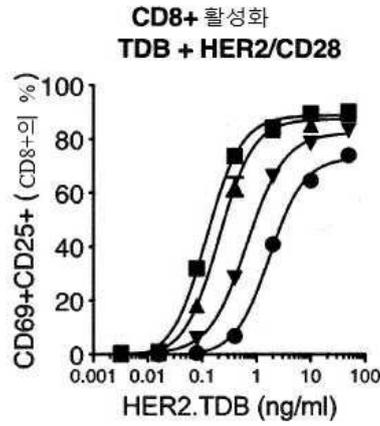


도면8

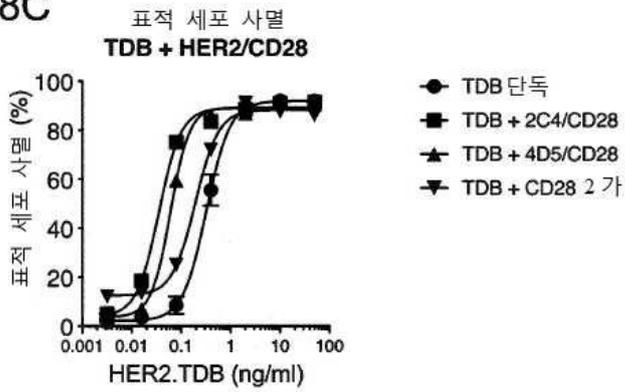
도. 8A



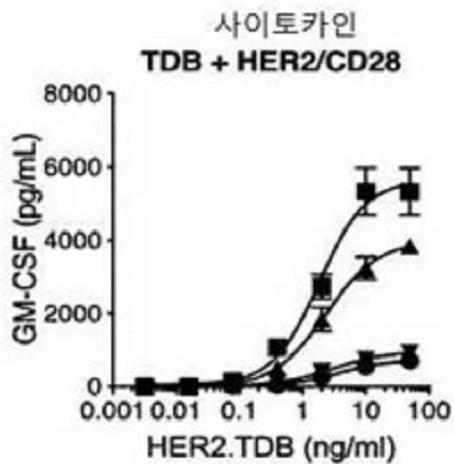
도. 8B



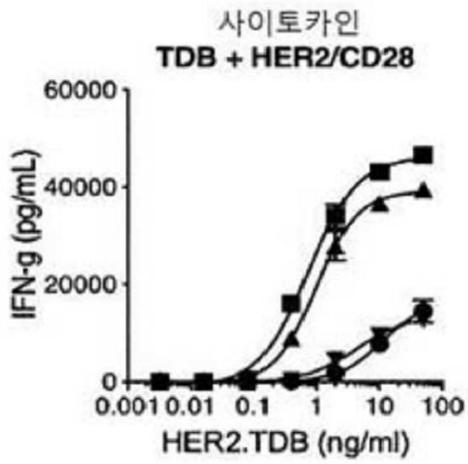
도. 8C



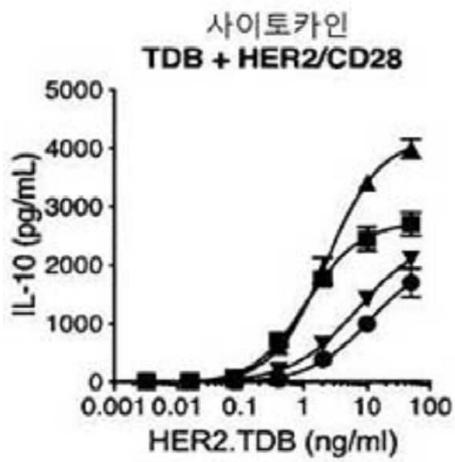
도면9a



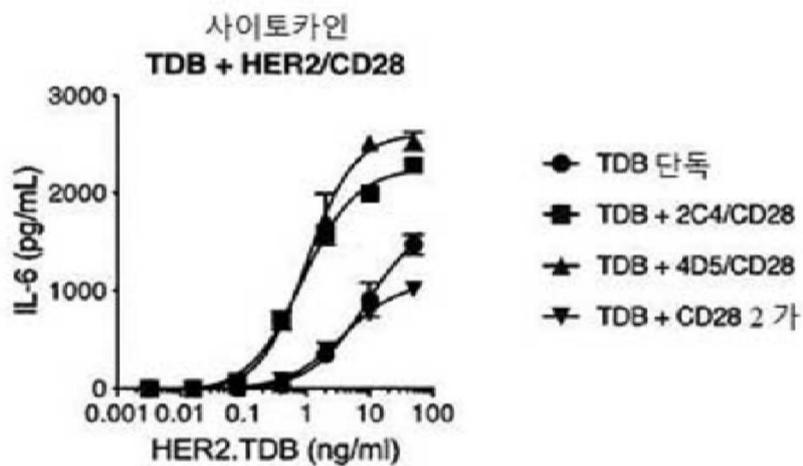
도면9b



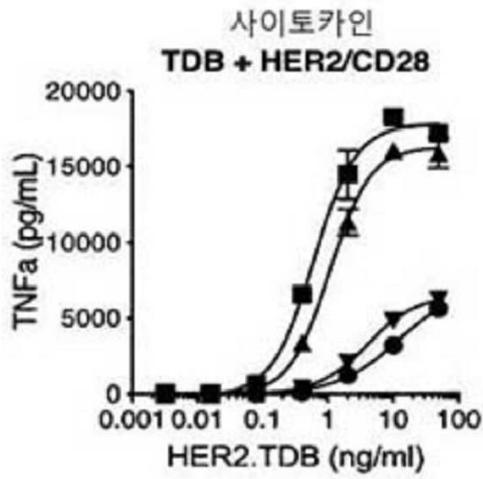
도면9c



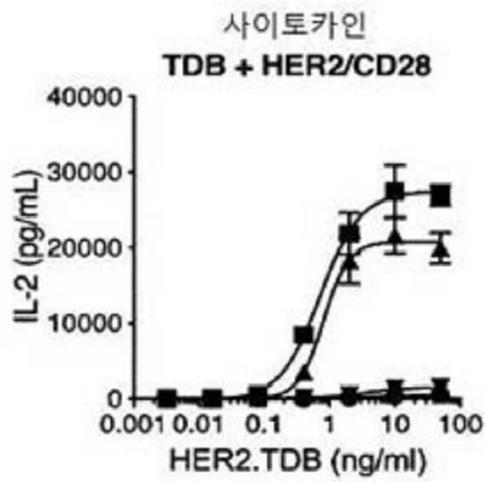
도면9d



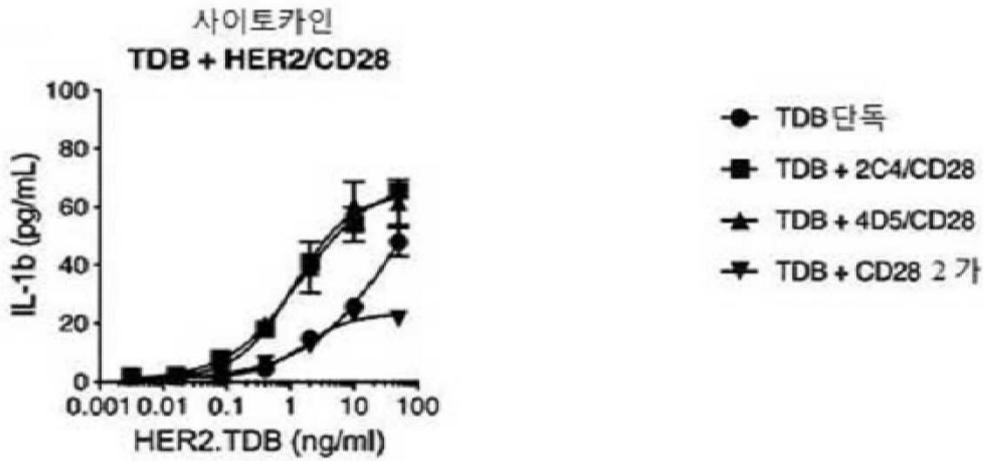
도면9e



도면9f

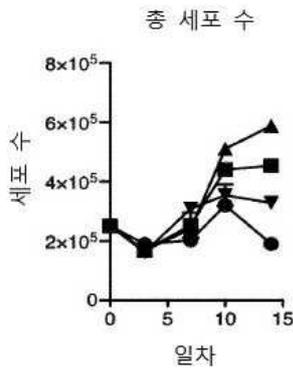


도면9g

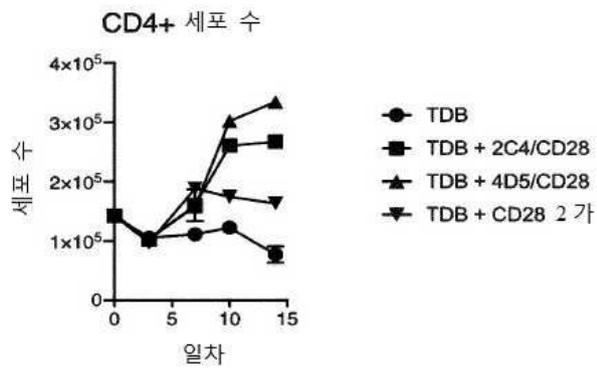


도면10

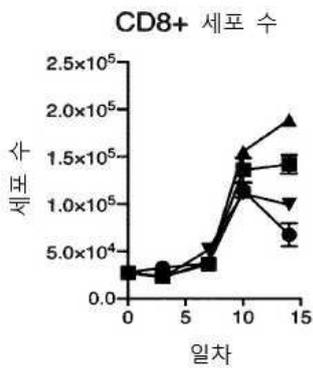
도. 10A



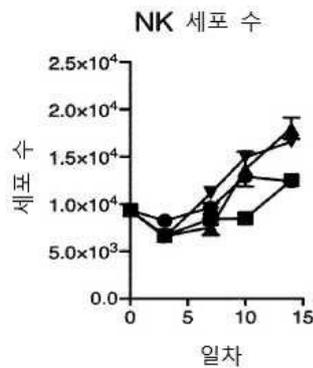
도. 10B



도. 10C



도. 10D



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Agonistic CD28 antigen binding molecules targeting Her2

<130> P36196-WO
 <140> PCT/EP2021/066901
 <141> 2021-06-22
 <150> EP 20181730.1
 <151> 2020-06-23
 <160> 189
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val
 1 5 10 15
 Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr
 20 25 30
 Asp Asn Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser
 35 40 45
 Arg Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu
 50 55 60
 Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser
 65 70 75 80
 Lys Thr Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr
 85 90 95
 Phe Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys
 100 105 110
 Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser
 115 120 125
 Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro
 130 135 140
 Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly
 145 150 155 160

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

210 215 220
 <210> 2
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> heavy chain CDR-H1, pertuzumab CLC
 <400> 2

Asp Tyr Thr Met Asp
 1 5
 <210> 3
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> heavy chain CDR-H2, pertuzumab CLC
 <400> 3

Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Val Asn Arg Arg Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> heavy chain CDR-H3, pertuzumab CLC
 <400> 4

Asn Leu Gly Pro Phe Phe Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10
 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> light chain CDR-L1, pertuzumab CLC
 <400> 5

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

1 5
 <210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> light chain CDR-L2, pertuzumab CLC
 <400> 6

Ser Ala Ser Phe Arg Tyr Thr

1 5
 <210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> light chain CDR-L3, pertuzumab CLC
 <400> 7

Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr

1 5
 <210> 8
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> heavy chain variable domain VH, pertuzumab CLC
 <400> 8

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asn Leu Gly Pro Phe Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain VL, pertuzumab CLC

<400> 9

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

1 5 10 15

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

50 55 60

Ser Arg 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 His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain CDR-H1, trastuzumab CLC

<400> 10

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His

1 5 10

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> heavy chain CDR-H2, trastuzumab CLC

<400> 11

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

1 5 10 15

Gly

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain CDR-H3, trastuzumab CLC

<400> 12

Trp Gly Gly Glu Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain CDR-L1, trastuzumab CLC

<400> 13

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

1 5

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain CDR-L2, trastuzumab CLC

<400> 14

Ser Ala Ser Phe Arg Tyr Thr

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain CDR-L3, trastuzumab CLC

<400> 15

Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr

1 5

<210> 16

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain VH, trastuzumab CLC

<400> 16

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 Asn Ile Lys Asp Thr

 20 25 30

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

 35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg 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

Ser Arg Trp Gly Gly Glu Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 17

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain VL, trastuzumab CLC

<400> 17

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 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 Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Arg 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 His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28(SA) CDR-H1

<400> 18

Ser Tyr Tyr Ile His

1 5

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28(SA) CDR-H2

<400> 19

Cys Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28(SA) CDR-H3

<400> 20

Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val

1 5 10

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28(SA) CDR-L1

<400> 21

His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Val Trp Leu Asn

1 5 10

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28(SA) CDR-L2

<400> 22

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28(SA) CDR-L3

<400>

> 23

Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 24

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28(SA) VH

<400> 24

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 Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Cys Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val 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 Phe Cys

85 90 95
 Thr Arg Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Gln

100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28(SA) VL

<400> 25

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 His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Val Trp
 20 25 30

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

35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr 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 Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 CDR-H1 consensus

<400> 26

Ser Tyr Tyr Ile His

1 5

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 CDR-H2 consensus

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> Gly or Arg

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> Asn or Asp

<220><221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> Val or Gly

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> Asn, Gln or Ala

<400> 27

Ser Ile Tyr Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 CDR-H3 consensus

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> Leu or Ala

<220><221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> Trp, His, Tyr or Phe

<400> 28

Ser His Tyr Gly Xaa Asp Xaa Asn Phe Asp Val

1 5 10

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 CDR-L1 consensus

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> His or Arg

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> Asn or Gly

<220><221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> Tyr or Ser

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> Val or Asn

<220><221> VARIANT

<222> (9)..(9)

<223> Trp, His, Phe or Tyr

<400> 29

Xaa Ala Ser Gln Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Leu Asn

1 5 10

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 CDR-L2 consensus

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> Lys or Tyr
 <220><221> VARIANT
 <222> (2)..(2)
 <223> Ala or Gly
 <220><221> VARIANT
 <222> (4)..(4)
 <223> Asn or Ser
 <220><221> VARIANT
 <222> (6)..(6)
 <223> His or Tyr
 <220><221> VARIANT
 <222> (7)..(7)
 <223> Thr or Ser
 <400> 30
 Xaa Xaa Ser Xaa Leu Xaa Xaa

1 5
 <210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223>
 CD28 CDR-L3 consensus
 <220><221> VARIANT
 <222> (3)..(3)
 <223> Gly or Ala
 <400> 31

Gln Gln Xaa Gln Thr Tyr Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 32
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD28 VH variant a

<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 Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val 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 Phe Cys
 85 90 95

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 33

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 VH variant b

<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 Ser Tyr
 20 25 30

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

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

Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val 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 Phe Cys

85 90 95

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 34

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 VH variant c

<400> 34

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 Ser Tyr
 20 25 30

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

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

Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val 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 Phe Cys
 85 90 95

Thr Arg Ser His Tyr Gly Ala Asp His Asn Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 35

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 VH variant d

<400> 35

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 Ser Tyr
 20 25 30

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

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

Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val 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 Phe Cys
 85 90 95

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 36

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 VH variant e

<400> 36

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 Ser Tyr
 20 25 30

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

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

Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val 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 Phe Cys
 85 90 95

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 37

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 VH variant f

<400> 37

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 Ser Tyr
 20 25 30

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

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

Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val 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 Phe Cys
 85 90 95

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 38

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 VH variant g

<400> 38

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 Ser Tyr

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val 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 Phe Cys

 85 90 95

Thr Arg Ser His Tyr Gly Leu Asp His Asn Phe Asp Val Trp Gly Gln

 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

 115 120

<210> 39

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 VH variant h

<400> 39

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 Ser Tyr

 20 25 30

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

 35 40 45

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

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 VH variant j

<400> 41

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

Ala Ser Ile Tyr Pro Gly Asn Val Ala Thr Arg 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

Thr Arg Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Gln

 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

 115 120

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 VL variant k

<400> 42

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 His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Val His

 20 25 30

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

35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr 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 Gln Thr Tyr Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 43

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 VL variant 1

<400> 43

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 His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Val Phe
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr 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 Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 44

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 VL variant m

<400> 44

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 His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Val Tyr

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

 100 105

<210> 45

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 VL variant n

<400> 45

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

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 VL variant o

<400> 46

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

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

<210> 47

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 VL variant p

<400> 47

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 His Ala Ser Gln Gly 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 Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 48
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD28 VL variant q
 <400> 48
 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 His Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn His
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr 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 Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 49

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 VL variant r

<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 His Ala Ser Gln Gly Ile Tyr Val Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 50

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 VL variant s

<400> 50

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 His Ala Ser Gln Gly Ile Ser Val Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 51

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 VL variant t

<400> 51

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 Asn Ile Tyr Val Trp

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Arg 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 Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 52

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28(variant 8) CDR-H1

<400> 52

Ser Tyr Tyr Ile His

1 5

<210> 53

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28(variant 8) CDR-H2

<400> 53

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

1 5 10 15

Asp

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28(variant 8) CDR-H3

<400> 54

Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val

1 5 10

<210> 55

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28(variant 8) CDR-L1

<400> 55

His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Val Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 56

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28(variant 8) CDR-L2

<400> 56

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr

1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28(variant 8) CDR-L3

<400> 57

Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 58

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28(variant 15) CDR-H1

<400> 58

Ser Tyr Tyr Ile His

1 5

<210> 59

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28(variant 15) CDR-H2

<400> 59

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

1 5 10 15

Asp

<210> 60

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28(variant 15) CDR-H3

<400> 60

Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val

1 5 10

<210> 61

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28(variant 15) CDR-L1

<400> 61

His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Val Phe Leu Asn

1 5 10

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28(variant 15) CDR-L2

<400> 62

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr

1 5

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28(variant 15) CDR-L3

<400> 63

Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 64

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28(variant 29) CDR-H1

<400> 64

Ser Tyr Tyr Ile His

1 5

<210> 65

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28(variant 29) CDR-H2

<400> 65

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

1 5 10 15

Asp

<210> 66

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28(variant 29) CDR-H3

<400> 66

Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val

1 5 10

<210> 67

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28(variant 29) CDR-L1

<400> 67

His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Val Trp Leu Asn

1 5 10

<210> 68

<211

> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28(variant 29) CDR-L2

<400> 68

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr

1 5

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28(variant 29) CDR-L3

<400> 69

Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 70

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fc hole PGLALA

<400> 70

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
 225
 <210> 71
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Fc knob PGLALA
 <400> 71
 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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Cys Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val 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 Phe Cys
 85 90 95
 Thr Arg Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Glu 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 Glu 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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ser Ile Tyr Pro Arg Asn Val Gln Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val 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 Phe Cys
 85 90 95
 Thr Arg Ser His Tyr Gly Leu Asp His Asn Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Glu 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 Glu 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

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

Trp 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

<210> 75
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> VH (CD28 variant j) CH1- Fc knob PGLALA
 <400> 75

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

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

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

Ala Ser Ile Tyr Pro Gly Asn Val Ala Thr Arg 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

Thr Arg Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Glu 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 Glu 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 Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365
 Trp 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

<210> 76

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH (CD28 variant e) CH1- Fc knob PGLALA

<400> 76

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 Ser Tyr
 20 25 30

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

35

40

45

Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asn Val Gln Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val 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 Phe Cys
 85 90 95
 Thr Arg Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Glu 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 Glu 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

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 Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Trp 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
 <210> 78
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH (CD28 variant a) CH1- Fc knob PGLALA
 <400> 78
 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 Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Val Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr 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 Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp 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> 84

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL (CD28 variant r)-CL (RK)

<400> 84

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

 Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr 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 Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp 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> 85
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> VL (CD28 variant s)-CL (RK)

<400> 85

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 His Ala Ser Gln Gly Ile Ser Val Tyr
 20 25 30

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

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr 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 Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp 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> 86

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL (CD28 variant t)-CL (RK)

<400> 86

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 Asn Ile Tyr Val Trp
 20 25 30

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

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

Ser Arg 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 Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu 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> 87

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fc hole PGLALA, HYRF

<400> 87

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

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 355 360 365
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 370 375 380
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 385 390 395 400
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 405 410 415
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 420 425 430
 Leu Ser Leu Ser Pro
 435
 <210> 90
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD28(SA) VH-Ckappa
 <400> 90
 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 Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Cys Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val 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 Phe Cys
 85 90 95
 Thr Arg Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val
 115 120 125

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

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 145 150 155 160

Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
 165 170 175

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 180 185 190

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 195 200 205

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 210 215 220

Gly Glu Cys
 225

<210> 91
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD28(SA_Variant 8) VL-CH1 hu IgG1 Fc knob PGLALA
 <400> 91

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 His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Val Tyr
 20 25 30

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

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

325 330 335
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys

340 345 350
 Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

355 360 365
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

370 375 380
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

385 390 395 400
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser

405 410 415
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

420 425 430
 Leu Ser Leu Ser Pro

435
 <210> 92

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28(SA_Variant 8) VH-Ckappa

<400> 92

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 Ser Tyr

20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45
 Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asn Val Gln Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60
 Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val 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 Phe Cys
 85 90 95
 Thr Arg Ser His Tyr Gly Leu Asp Phe Asn Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 130 135 140
 Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 145 150 155 160
 Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
 165 170 175
 Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 180 185 190
 Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 195 200 205
 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 210 215 220
 Gly Glu Cys
 225
 <210> 93
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD28(SA_Variant 15) VL-CH1 hu IgG1 Fc knob PGLALA
 <400> 93
 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 His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Val Phe
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

Leu Ser Leu Ser Pro

435

<210> 94

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28(SA_Variant 15) VH-Ckappa

<400> 94

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 Ser Tyr

20 25 30

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

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

 50 55 60
 Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val 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 Phe Cys
 85 90 95
 Thr Arg Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val

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

 180 185 190
 Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 195 200 205
 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 210 215 220
 Gly Glu Cys
 225
 <210> 96
 <211> 447
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Her2 (pertuzumab CLC) hu IgG1 VH-CH1 "EE" Fc hole wildtype

<400> 96

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 Asn Asp Tyr

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Ala Arg Asn Leu Gly Pro Phe Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

 100 105 110

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

 115 120 125

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

 130 135 140

Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

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

 165 170 175

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

 180 185 190

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

 195 200 205

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

 210 215 220

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

 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

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

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

<210> 97

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Her2 (pertuzumab CLC) VL-Ckappa "RK"

<400> 97

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 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 Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

 50 55 60

Ser Arg 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 His Tyr Thr Thr Pro Pro

 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> 98

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Her2 (pertuzumab CLC) hu IgG1 VH-CH1 "EE" Fc hole PGLALA

<400> 98

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 Asn Asp Tyr

 20 25 30
Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

 35 40 45
Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Val Asn Arg Arg Phe

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

65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95
Ala Arg Asn Leu Gly Pro Phe Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

 100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

 115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

 130 135 140
Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

 165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

 180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
 355 360 365
 Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 <210> 99
 <211> 437

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Her2 (pertuzumab CLC) VL-CH1 hu IgG1 Fc knob PGLALA

<400> 99

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 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 Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Arg 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 His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Her2 (pertuzumab CLC) VH-Ckappa

<400> 100

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 Asn Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asn Leu Gly Pro Phe Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Glu Cys

225

<210> 101

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Her2 (trastuzumab CLC) hu IgG1 VH-CH1 "EE" Fc hole PGLALA

<400> 101

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 Asn Ile Lys Asp Thr

 20 25 30

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

 35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg 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

Ser Arg Trp Gly Gly Glu Gly Phe Tyr Ala Met 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 Glu 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

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

<210> 102

<211> 437

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Her2 (trastuzumab CLC) VL-CH1 hu IgG1 Fc knob PGLALA

<400> 102

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 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 Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Arg 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 His Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr
 100 105 110

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

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

Leu Ser Leu Ser Pro

435

<210> 103

<211> 1245

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 103

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

Arg Glu Leu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu
 450 455 460
 Cys Phe Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His
 465 470 475 480
 Gln Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly
 485 490 495

 Glu Gly Leu Ala Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly
 500 505 510
 Pro Gly Pro Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln
 515 520 525
 Glu Cys Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr
 530 535 540
 Val Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln
 545 550 555 560

 Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala
 565 570 575
 Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser
 580 585 590
 Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp
 595 600 605
 Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys
 610 615 620

 Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro
 625 630 635 640
 Leu Thr Ser Ile Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val
 645 650 655
 Leu Gly Val Val Phe Gly Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile
 660 665 670
 Arg Lys Tyr Thr Met Arg Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu
 675 680 685

 Pro Leu Thr Pro Ser Gly Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile

Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg
 945 950 955 960

Glu Leu Val Ser Glu Phe Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe
 965 970 975

Val Val Ile Gln Asn Glu Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser
 980 985 990

Thr Phe Tyr Arg Ser Leu Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val
 995 1000 1005

Asp Ala Glu Glu Tyr Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro
 1010 1015 1020

Asp Pro Ala Pro Gly Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg
 1025 1030 1035

Ser Ser Ser Thr Arg Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu
 1040 1045 1050

Glu Pro Ser Glu Glu Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser
 1055 1060 1065

Glu Gly Ala Gly Ser Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly
 1070 1075 1080

Ala Ala Lys Gly Leu Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro
 1085 1090 1095

Leu Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu
 1100 1105 1110

Thr Asp Gly Tyr Val Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu
 1115 1120 1125

Tyr Val Asn Gln Pro Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg
 1130 1135 1140

Glu Gly Pro Leu Pro Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu
 1145 1150 1155

Arg Pro Lys Thr Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp
 1160 1165 1170

Val Phe Ala Phe Gly Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr

1175 1180 1185

Pro Gln Gly Gly Ala Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe

1190 1195 1200

Ser Pro Ala Phe Asp Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro

1205 1210 1215

Glu Arg Gly Ala Pro Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala

1220 1225 1230

Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Gly Leu Asp Val Pro Val

1235 1240 1245

<210> 104

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

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> 105

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 105

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> 106

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 106

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

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

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

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

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

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

85

90

95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

100

105

<210> 107

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

Glu Pro Lys Ser Cys

1

5

<210> 108

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> X is S or P

<400> 108

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Xaa Cys Pro

1

5

10

<210> 109

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<

222> (5)..(5)

<223> X is S or P

<400> 109

His Thr Cys Pro Xaa Cys Pro

1

5

<210> 110

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> X is S or P
 <400> 110
 Cys Pro Xaa Cys Pro
 1 5
 <210> 111
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 111
 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 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

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

 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 112
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 112
 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

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

 <210> 113
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 113
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser 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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

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

165 170 175
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp

180 185 190
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro

195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

245 250 255
 Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr

260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

- <210> 114
- <211> 377
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 114

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

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile

340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln

355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

370 375

<210> 115

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 115

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

1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro

100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325
 <210> 116
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 116

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala
 1 5 10 15
 Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
 20 25 30
 Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
 35 40 45
 Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
 50 55 60
 Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
 65 70 75 80
 Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
 85 90 95
 Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
 100 105 110
 Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
 115 120 125
 His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
 130 135 140
 Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro
 145 150 155 160
 Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Phe
 165 170 175
 Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
 180 185 190
 Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln
 195 200 205
 Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly
 210 215 220
 Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp
 225 230 235 240

Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys

245

250

<210> 117

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker G4S

<400> 117

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 118

<211> 10

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker (G4S)2

<400> 118

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 119

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker (SG4)2

<400> 119

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5 10

<210> 120

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker G4(SG4)2

<400> 120

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

1 5 10

<210> 121

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker

<400> 121

Gly Ser Pro Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser

1 5 10

<210> 122

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker (G4S)3

<400> 122

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

1 5 10 15

<210> 123

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker (G4S)4

<400> 123

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> 124

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker

<400> 124

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5
<210> 125
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223
> Peptide linker
<400> 125
Gly Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser

1 5
<210> 126
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Peptide linker
<400> 126
Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5
<210> 127
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Peptide linker
<400> 127
Gly Gly Ser Gly Ser Gly

1 5
<210> 128
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223
> Peptide linker
<400> 128
Gly Gly Ser Gly

1

<210> 129

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker

<400> 129

Gly Gly Ser Gly Asn Gly Ser Gly

1 5

<210> 130

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker

<400> 130

Gly Gly Asn Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 131

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker

<400> 131

Gly Gly Asn Gly Ser Gly

1 5

<210> 132

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H1, pertuzumab

<400> 132

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Met Asp

1 5 10

<210> 133

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H2, pertuzumab

<400> 133

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

1 5 10 15

Gly

<210> 134

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H3, pertuzumab

<400> 134

Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 135

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L1, pertuzumab

<400> 135

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly Val Ala

1 5 10

<210> 136

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L2, pertuzumab

<400>

> 136

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr

1 5

<210> 137

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L3, pertuzumab

<400> 137

Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 138

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain VH, pertuzumab

<400> 138

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 139

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain VL, pertuzumab

<400> 139

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 Gln Asp Val Ser Ile Gly
 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 Tyr Thr 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 Tyr Ile Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 140

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H1, trastuzumab

<400> 140

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His

1 5 10

<210> 141

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H2, trastuzumab

<400> 141

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

1 5 10 15

Gly

<210> 142

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H3, trastuzumab

<400> 142

Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 143

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> CDR-L1, trastuzumab

<400> 143

Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 144

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L2, trastuzumab

<400> 144

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 145

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L3, trastuzumab

<400> 145

Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr

1 5

<210> 146

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain VH, trastuzumab

<400> 146

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 Asn Ile Lys Asp Thr

 20 25 30

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

 35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg 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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

 115 120

<210> 147

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain VL, trastuzumab

<400> 147

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 Asn 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 Arg 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 His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 148

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H1, CD3

<400> 148

Asn Tyr Tyr Ile His

1 5

<210> 149

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H2, CD3

<400> 149

Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 150

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H3, CD3

<400> 150

Asp Ser Tyr Ser Asn Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 151

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L1, CD3

<400> 151

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 152

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L2, CD3

<400> 152

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 153

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L3, CD3

<400> 153

Thr Gln Ser Phe Ile Leu Arg Thr

1 5

<210> 154

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain VH, CD3

<400> 154

Glu 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 Asn Tyr

 20 25 30

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

 35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

 50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

 85 90 95

Ala Arg Asp Ser Tyr Ser Asn Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

 115

<210> 155

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain VL, CD3

<400> 155

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDR-L1, Her2 (7C2)
 <400> 159
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Gly Ser Arg Phe Thr Tyr Met His
 1 5 10 15
 <210> 160
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 > CDR-L2, Her2 (7C2)
 <400> 160
 Tyr Ala Ser Ile Leu Glu Ser
 1 5
 <210> 161
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDR-L3, Her2 (7C2)
 <400> 161
 Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Pro Trp Thr
 1 5 10
 <210> 162
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> heavy chain variable domain VH, Her2 (7C2)
 <400> 162
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

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

 Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Thr Tyr Asp Gly Gly Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 163
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> light chain variable domain VL, Her2 (7C2)
 <400> 163
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Val Val Ser Leu Gly

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

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

<210> 164

<211> 290

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 164

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

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 166

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL (PD-L1)

<400> 166

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> 167

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH (PD-L1) 2

<400> 167

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> 168

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL (PD-L1) 2

<400> 168

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> 169

<211> 288

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 169

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> 170
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH (PD-1)
 <400> 170
 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> 171

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL (PD-1)

<400> 171

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> 172

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH (PD-1) 2

<400> 172

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> 173

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL (PD-1) 2

<400> 173

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> 174

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Her2-CD3 (4D5/40G5c) HC1 (Fc knob)

<400> 174

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 Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg 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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met 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

<213> Artificial Sequence

<220><223> Her2-CD3 (4D5/40G5c) LC1

<400> 175

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 Asn 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 Arg 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 His Tyr Thr Thr Pro Pro

 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 Glu Gln Leu Lys Ser Gly

 115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

 130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

 165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

 180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

 195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 176

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Her2-CD3 (4D5/40G5c) HC2 (Fc hole)

<400> 176

Glu 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 Asn Tyr

 20 25 30

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

 35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

 50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

 85 90 95

Ala Arg Asp Ser Tyr Ser Asn Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

 100 105 110

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

 115 120 125

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

 130 135 140

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

145 150 155 160

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

 165 170 175

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

 180 185 190

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

 195 200 205

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Her2-CD3 (4D5/40G5c) LC2

<400> 177

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

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Phe Ile Leu Arg 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> 178

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28(SA_Variant 8) hu IgG1 Fc hole N297G

<400> 178

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 Ser Tyr

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val 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 Phe Cys

 85 90 95

Thr Arg Ser His Tyr Gly Leu Asp Phe Asn Phe Asp Val Trp Gly Gln

 100 105 110

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

 115 120 125

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

 130 135 140

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

145 150 155 160

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

 165 170 175

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

 180 185 190

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

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

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

 Ser Cys Ala 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 Val 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

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Trp 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

<210> 181

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Her2 (4D5) VL-Ckappa

<400> 181

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 Asn 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 Arg 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 His Tyr Thr Thr Pro Pro

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 Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 182
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Her2 (2C4) hu IgG1 knob N297G
 <400> 182
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

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

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

 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

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> 184

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 IgG4 Fc

<400> 184

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 Ser Tyr

20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45
 Gly Cys Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60
 Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val 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 Phe Cys

85 90 95
 Thr Arg Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Gln

100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 210 215 220
 Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

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

 405 410 415
 Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

 420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

 435 440 445

<210> 185

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 kappa light chain

<400> 185

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 His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Val Trp
 20 25 30

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

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr 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 Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 186

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DP47 huIgG1 PGLALA heavy chain

<400> 186

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

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

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

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

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

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

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> 188
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 188
 Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser

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

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

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

130 135 140

Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys

145 150 155 160

Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn

165 170 175

Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg

180 185 190

Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile

195 200 205

<210> 189

<211> 198

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 189

Met Gln Ser Gly Thr Arg Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Cys Ser Gln His Leu Gly Ser Glu Ala Gln Trp Gln His Asn Gly Lys

50 55 60

Asn Lys Glu Asp Ser Gly Asp Arg Leu Phe Leu Pro Glu Phe Ser Glu

65 70 75 80

Met Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Asn Pro

85 90 95

Glu Asp Ala Ser His His Leu Tyr Leu Lys Ala Arg Val Cys Glu Asn

100 105 110

Cys Met Glu Met Asp Val Met Ala Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp

115 120 125

Ile Cys Ile Thr Leu Gly Leu Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys
130 135 140

Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly
145 150 155 160

Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn
165 170 175

Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Gln Asp Leu Tyr Ser Gly
180 185 190

Leu Asn Gln Arg Arg Ile
195