



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0130349
(43) 공개일자 2015년11월23일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/46 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07K 16/468 (2013.01)
C07K 16/2803 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2015-7027312</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2014년03월14일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2015년10월02일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2014/028731</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2014/144357
국제공개일자 2014년09월18일</p> <p>(30) 우선권주장
61/793,153 2013년03월15일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
메르크 파텐트 게엠베하
독일 64293 다름스타트 프랑크푸르터 스트라세 250</p> <p>(72) 발명자
로, 킨 밍
미국 02420 매사추세츠 렉싱턴 캐롤 레인 6
지글스퍼거, 노라 에이.이.
미국 02460 매사추세츠 뉴턴 린우드 애비뉴 164</p> <p>(74) 대리인
서만규, 서경민</p> |
|--|--|

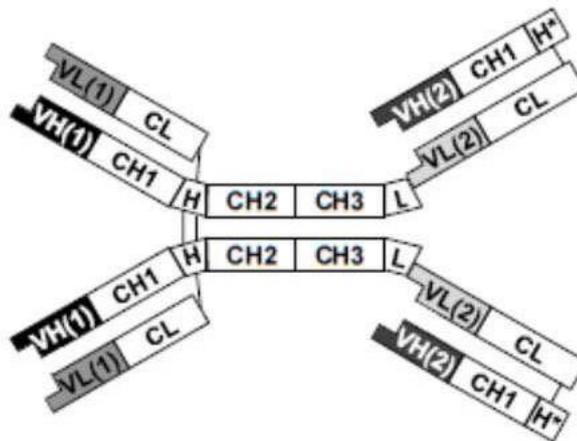
전체 청구항 수 : 총 43 항

(54) 발명의 명칭 4가 이중특이적 항체

(57) 요약

본 발명은 4가 이중특이적 항체들(TetBiAbs), 이를 제조하는 방법 및 암 또는 면역 질환의 진단 및 치료를 위해 이를 사용하는 방법에 관한 것이다. TetBiAbs는 항체의 C-말단에 부착된 제2 항원 특이성을 갖는 Fab 단편의 제2 쌍을 특징으로 하여, 상기 2개 항원 특이성 각각에 대하여 2가인 분자를 제공한다. 상기 4가 항체는 항체 H 사슬(heavy chain)을, 그의 동족, 공발현된 Fab H 사슬과 관련이 있는 Fab L 사슬(light chain)에 공유적으로 연결시키는 것에 의하여 유전 공학 방법으로 제조된다.

대표도



(52) CPC특허분류

C07K 16/283 (2013.01)
C07K 16/2863 (2013.01)
C07K 16/2887 (2013.01)
C07K 16/2893 (2013.01)
C07K 16/32 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/35 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)
C07K 2317/60 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

Fc 영역 폴리펩티드 사슬을 포함하는 폴리펩티드로서, 여기서 상기 사슬은 힌지 및 Fc H 사슬 불변 도메인(Fc heavy chain constant domain)을 포함하고, 여기서 상기 사슬은 공유적으로, 직접적으로 또는 간접적으로, 이의 C-말단에서 펩티드 결합에 의해 Fab L 사슬(Fab light chain)에 연결된 폴리펩티드.

청구항 2

다음을 포함하는 4가 이중특이적 항체 (TetBiAb):

(i) 제1 항체의 항체 H 사슬을 포함하고, 여기서 상기 H 사슬은 상기 제1 항체의 가변 도메인(variable domain) 및 불변 도메인(constant domain)을 포함하고, 상기 H 사슬이 이의 C-말단에서 제2 항체의 항체 L 사슬의 N-말단에 직접적으로 또는 간접적으로 연결되고, 여기서 상기 L 사슬이 상기 제2 항체의 가변 및 불변 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드,

(ii) 상기 제1 항체의 항체 L 사슬을 포함하고, 여기서 상기 제1 항체의 L 사슬이 가변 및 불변 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드, 및

(iii) 상기 제2 항체의 Fab H 사슬을 포함하고, H 사슬 불변 도메인 CH2 및 CH3이 결합하는 제3 폴리펩티드,

여기서 상기 제1 및 제2 항체는 다른 결합 특이성을 가지며, 및

여기서 상기 제2 폴리펩티드 및 상기 제1 폴리펩티드의 동족 Fab H 사슬 도메인은 헤테로다이머(heterodimer)를 형성하여, 상기 제1 항체의 결합 특이성을 제공하며, 및

여기서 상기 제3 폴리펩티드 및 상기 제1 폴리펩티드의 동족 L 사슬 도메인은 헤테로다이머를 형성하여, 상기 제2 항체의 결합 특이성을 제공한다.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 제1 항체의 불변 도메인이 IgG 불변 도메인인 4가 이중특이적 항체(TetBiAb).

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 제1 폴리펩티드가 L 사슬 가변 도메인의 N-말단에 H 사슬 불변 도메인의 C-말단을 연결시키는 링커(linker)를 더 포함하는 4가 이중특이적 항체(TetBiAb).

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 링커가 아미노산 서열 (GGGS)_n을 가지며, 여기서 n이 1 및 10 사이의 정수인 4가 이중특이적 항체(TetBiAb).

청구항 6

제5항에 있어서, 여기서 상기 정수가 4인 4가 이중특이적 항체 (TetBiAb).

청구항 7

제2항에 있어서, 상기 제1 폴리펩티드가 CH2 도메인이 결합된 4가 이중특이적 항체 (TetBiAb).

청구항 8

제2항에 있어서, 상기 제3 폴리펩티드가 SEQ ID NO:10의 아미노산 서열을 포함하는 힌지 영역을 더 포함하는 4가 이중특이적 항체 (TetBiAb).

청구항 9

제2항에 있어서, TetBiAb의 결합 특이성이 2개의 다른 표적 항원에 대한 것이고, 제1 및 제2 항원이 다른 세포 타입 위에 존재하는 4가 이중특이적 항체 (TetBiAb).

청구항 10

제2항에 있어서, TetBiAb의 결합 특이성이 2개 다른 표적 항원에 대한 것이고, 상기 제1 및 제2 항원이 동일 세포 타입 위에 존재하는 4가 이중특이적 항체 (TetBiAb).

청구항 11

제2항에 있어서, TetBiAb의 결합 특이성이 동일 표적 분자 위의 2개의 다른 에피토프에 대한 것인 4가 이중특이적 항체 (TetBiAb).

청구항 12

제2항에 있어서, TetBiAb의 결합 특이성이 2개 다른 표적 항원에 대한 것이고, 여기서 제1 항원이 세포의 표면에 존재하고 제2 항원이 용해성 인자에 존재하는 4가 이중특이적 항체 (TetBiAb).

청구항 13

제2항에 있어서, TetBiAb의 결합 특이성이 2개의 다른 표적 항원에 대한 것이고, 제1 및 제2 항원이 2개의 다른 용해성 인자들에 존재하는 4가 이중특이적 항체 (TetBiAb).

청구항 14

제9항에 있어서, TetBiAb의 결합 특이성이 종양 세포의 제1 표적 항원 및 면역 세포의 제2 표적 항원에 대한 것인 4가 이중특이적 항체 (TetBiAb).

청구항 15

제9항에 있어서, TetBiAb의 결합 특이성이 표적 항원 쌍에 대한 것이고, 상기 쌍이 EGFR/CD16 및 CD20/CD16로부터 선택된 집단으로 이루어지는 4가 이중특이적 항체 (TetBiAb).

청구항 16

제10항에 있어서, TetBiAb의 결합 특이성이 2개의 다른 표적 항원에 대한 것이고, 제1 및 제2 항원이 종양 세포 위에 존재하는 4가 이중특이적 항체 (TetBiAb).

청구항 17

제9항에 있어서, TetBiAb의 결합 특이성이 표적 항원 쌍에 대한 것이고, 상기 쌍이 CD20/CD47 및 CD20/CD52로 이루어진 군으로부터 선택된 4가 이중특이적 항체 (TetBiAb).

청구항 18

제15항에 있어서, 상기 TetBiAb가 EGFR 및 CD16에 결합하는 4가 이중특이적 항체 (TetBiAb).

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 TetBiAb가 SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:14, 및 SEQ ID NO:44의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 사슬을 포함하는 4가 이중특이적 항체 (TetBiAb).

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 TetBiAb가 SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, 및 SEQ ID NO:18의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 사슬을 포함하는 4가 이중특이적 항체 (TetBiAb)..

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 TetBiAb가 SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:14, 및 SEQ ID NO:44의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 유사성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 사슬을 포함하는 4가 이중특이적 항체 (TetBiAb)..

청구항 22

제20항에 있어서, 상기 TetBiAb가 SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, 및 SEQ ID NO:18의 아미노산 서열과 적어도 85% 유사성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 4가 이중특이적 항체 (TetBiAb).

청구항 23

제15항에 있어서, 상기 TetBiAb가 CD20 및 CD16에 결합하는 4가 이중특이적 항체 (TetBiAb).

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 TetBiAb가 SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:28, 및 SEQ ID NO:52의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 사슬을 포함하는 4가 이중특이적 항체(TetBiAb).

청구항 25

제17항에 있어서, 상기 TetBiAb가 CD20 및 CD47와 결합하는 4가 이중특이적 항체 (TetBiAb).

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 TetBiAb가 SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:28, 및 SEQ ID NO:60의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 사슬을 포함하는 4가 이중특이적 항체 (TetBiAb).

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 TetBiAb가 SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:28, 및 SEQ ID NO:60의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 유사성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 사슬을 포함하는 4가 이중특이적 항체 (TetBiAb).

청구항 28

제17항에 있어서, 상기 TetBiAb가 CD20 및 CD52에 결합하는 4가 이중특이적 항체 (TetBiAb).

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 TetBiAb가 SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:28, 및 SEQ ID NO:68의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 사슬을 포함하는 4가 이중특이적 항체 (TetBiAb).

청구항 30

다음을 포함하는 4가 이중특이적 항체:

(i) 제1 항체의 항체 L 사슬을 포함하고, 상기 L 사슬이 상기 제1 항체의 가변 및 불변 도메인을 포함하고, 상기 L 사슬이 이의 C-말단에서 Fc 영역의 N-말단에 연결되고, 상기 Fc 영역이, 제2 항체의 항체 H 사슬의 N-말단에 직접적으로 또는 간접적으로 연결된, 적어도 힌지 및 CH3 도메인을 포함하고, 상기 H 사슬이 상기 제2 항체의 가변 및 CH1 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드,

(ii) 상기 제1 항체의 Fab H 사슬을 포함하고, H 사슬 불변 도메인 CH2 및 CH3이 결합하는, 제2 폴리펩티드, 및

(iii) 상기 제2 항체의 항체 L 사슬을 포함하고, 제2 항체의 L 사슬이 가변 및 불변 도메인을 포함하는 제3 폴리펩티드,

여기서 상기 제1 및 제2 항체는 다른 결합 특이성을 가지며, 및

여기서 상기 제2 폴리펩티드 및 제1 폴리펩티드의 동족 L 사슬 도메인이 헤테로다이머를 형성하여, 상기 제1 항체의 결합 특이성을 제공하고, 및

여기서 상기 제3 폴리펩티드 및 상기 제1 폴리펩티드의 동족 Fab H 사슬 도메인이 헤테로다이머를 형성하여, 상기 제2 항체의 결합 특이성을 제공한다.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 제1 폴리펩티드가 CH3 도메인의 C-말단을 H 사슬 가변 도메인의 N-말단에 연결시키는 링

커를 더 포함하는 4가 이중특이적 항체 (TetBiAb).

청구항 32

제30항에 있어서, 상기 링커가 아미노산 서열 (GGGS)_n을 포함하고, n이 1 및 10 사이의 정수인 4가 이중특이적 항체 (TetBiAb).

청구항 33

제31항에 있어서, 상기 정수가 4인 4가 이중특이적 항체 (TetBiAb).

청구항 34

제30항에 있어서, 상기 제1 폴리펩티드가 CH2 도메인이 결핍한 4가 이중특이적 항체 (TetBiAb).

청구항 35

제30항에 있어서, 상기 제1 폴리펩티드가 SEQ ID NO:10의 아미노산 서열을 포함하는 H 사슬 CH1 도메인에 대해 힌지 영역 C-말단을 더 포함하는 4가 이중특이적 항체 (TetBiAb).

청구항 36

선택적 링커를 통해 제2 항체의 L 사슬(VL(2)-CL)에 유전적으로 융합된 제1 항체의 H 사슬(VH(1)-CH1-힌지-CH2-CH3)을 암호화하는 DNA 서열을 포함하는, 분리된 DNA 분자.

청구항 37

제36항에 있어서, (i) 제1 항체의 L 사슬 (VL(1)-CL)을 암호화하는 서열 및 (ii) 제2 항체의 Fab H 사슬 (VH(2)-CH1)을 암호화하는 서열로부터 선택된 DNA 서열을 더 포함하는 분리된 DNA 분자.

청구항 38

제2항의 4가 항체의 제1, 제2 및 제3 폴리펩티드를 포함하는 4가 이중특이적 항체를 암호화하는 핵산.

청구항 39

제30항의 4가 항체의 제1, 제2 및 제3 폴리펩티드를 포함하는 4가 이중특이적 항체를 암호화하는 핵산.

청구항 40

제36항, 제38항 또는 제39항의 핵산을 포함하는 호스트 세포.

청구항 41

4가 이중특이적 항체의 발현에 적당한 조건하에서 제39항의 호스트 세포를 배양하고, 상기 4가 이중특이적 항체를 회수하는 단계를 포함하는 4가 이중특이적 항체를 제조하는 방법.

청구항 42

제23항의 4가 이중특이적 항체 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 제제.

청구항 43

제23항의 4가 이중특이적 항체의 효과적인 함량을 개인에게 투여하는 단계를 포함하는 암을 갖는 개인을 치료하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 출원은 2013년 3월 15일에 출원된 US 임시 특허출원 제61/793,153호의 우선권과 그의 잇점을 주장하고, 이의 모든 개시 내용은 참조로서 여기 통합된다.

[0001]

[0002] 본 발명은 4가 이중특이적 항체들(TetBiAbs), 이를 제조하는 방법 및 암 또는 면역 질환의 치료 및 진단을 위해서 이를 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 항체 공학에서 최근 기술 진보는, (1) 종양 세포의 전가된 세포 용해(redirected lysis)을 위해 효과기 세포(effector cell)를 사로잡거나, (2) 표적화(targeting)의 결합활성(binding avidity) 및 특이성을 증가시키거나, 또는 (3) 규제적 및 상업적 이유로 2개 약물 후보를 하나로 결합시키는, 이중특이적 접근법을 사용하는데 초점을 맞춰왔다. 제1 접근법으로는, 상기 이중특이적 항체가, 전가된 세포 용해를 위해 CD3(Baeuerle et al, Cancer Res. 69:4941, 2009), CD16(Weiner et al, Cancer Immunol. Immunother. 45:190, 1997), 또는 CD64(Graziano et al, Cancer Immunol. Immunother. 45:124, 1997)의 결합을 통해 상기 질병-유발 세포(disease-causing cell)와 효과기 세포 사이에서 브릿지로서 작용한다. 제2 접근법으로는, 표적 또는 표적 세포의 선택성은, 보통의 결합친화성을 갖는 2개의 항체들을 하나의 바이파라토픽(biparatopic)(동일한 표적 항원 위의 2개의 떨어진 에피토프에 결합함) 또는 이중특이적(동일한 표적 세포 위 2개의 다른 항원에 결합함) 항체로 각각 결합시키는 것에 의해 매우 크게 증가될 수 있다. 제3 접근법은 2개의 세포 용해성 사이토카인들을 동시 결합시키는 것에 의해 예시되며 (Mabry et al, Protein Eng. Des. & Sel. 23:115, 2010; Wu et al, Nature Biotech. 25:1290, 2007), 이는 적당한 질병 세팅에서 이중표적화(dual targeting)의 잠재적 상승작용을 활용하는 것이다. 가변 영역을 통해 정교한 결합 특이성을 제공하는 것 외에, IgG는 또한 효과기(effector) 기능 및 매우 긴 혈청 반감기(serum half-life)를 가지므로, 때때로 이중특이적 항체를 재단하기 위한 바람직한 골격이 된다.

[0004] Fab 포맷에서는 유리 L 사슬이 단지 이것의 동족 H 사슬에만 특이적으로 쌍을 이루게 할 수 있는 기술이 존재하지 않기 때문에, 현재 이중특이적 항체 기술은 대부분 scFv (single-chain fragment of the variable regions) 포맷 (Coloma and Morrison, Nature Biotechnol. 15:159, 1997; Lu et al, J. Biol. Chem. 280:19665, 2005)에 의지하며, 여기서 각 VH[H 사슬(Heavy chain)의 가변영역]는 이것의 동족 VL[L사슬(light chain)의 가변 영역]에 공유적으로 연결되므로, 따라서 다른 항원 특이성의 유리 L 사슬들이 H 사슬들과 무작위로 쌍을 이룬다. 그러나, 단일 사슬(single-chain) 항체의 발현은, 결합친화성의 손실 가능성, 단백질 응집, 낮은 안정성, 및 낮은 제조율로 인하여, 때때로 기술적으로 도전을 받는다 (Demarest et al, Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 11:675, 2008; Michaelson et al, mAbs 1:2, 128-141, 2009). 이는 만약 시작 항체가 하이브리도마(파아지 디스플레이 라이브러리로부터의 단일 사슬 항체에 대조됨)로부터 온 것이어서 단일 사슬 항체로 재포맷되어야만 하는 것이라면 특히 사실이다. 다시 말하면, 파아지로부터 분리된 scFv's는 때때로 포유류 세포에서 잘 발현되지 않는다.

[0005] 몇 가지 혁신적인 기술들은 Fc 헤테로다이머의 거의 독점적인 조립체가 이중특이성을 재단하기 위한 골격, 예를 들어, 노브-인-홀(knob-in-hole) (Ridgway et al, Protein Eng. 9:617, 1996), 정전기적 스티어링(electrostatic steering) (Gunasekaran et al, J. Biol. Chem. 285:19637, 2010) 및 스트랜드-교환 공학 도메인(SEED, strand-exchange engineering domain) (Davis, Protein Eng. Des. & Sel. 23:195, 2010)을 제공할 수 있게 한다. 그러나, 유리 L 사슬을, 이것의 동족 H 사슬에만 특이적으로 쌍을 이루게 하여, 음성 H 사슬-L 사슬 Fab 포맷을 의지하는 이중 특이적 항체의 가공을 가능하게 할 수 있는 기술은 아직 존재하지 않는다. scFv 포맷이 갖는 상기 언급된 문제들로 인하여, 일부 기술들은, 2개의 다른 Fab's에 대한 공통의 L 사슬을 검사하거나(Merchant et al, Nature Biotechnol. 16:677, 1998), 또는 L 사슬을 함께 사용하는 것을 회피하기 위해 단일의 가변 도메인을 사용한다(Shen et al, J. Immunol. Methods 318:65, 2007).

[0006] 이중 가변 도메인(Dual Variable Domain, DVD)-Ig 접근법에서, 상기 제2 항체의 VL 및 VH는 유연한 링커를 통해 제1 항체의 L 및 H 사슬의 N-말단에 각각 융합되어, 2개의 가변 도메인(VD)을 탠덤(tandem)으로 제조하고, 외부 VD 및 내부 VD로 부른다((Wu et al, ibid). 내부 VD의 리간드 결합 사이트에 대한 외부 VD의 인접성으로 야기된 입체적 장애(steric hindrance)로 인하여, 대부분 경험적으로 결정되어야만 하는, 수 많은 이용가능한 모노클론 항체로부터 VD를 선택하는 것과 관련된 광범위한 최적화, VD의 배위, 및 링커 디자인은 내부 VD의 결합 활성을 유지기 위해 필요하다(DiGiammarino et al, Methods Mol. Biol. 899:145, 2012).

[0007] 또 다른 방법은 랫/마우스 쿼드로마(quadroma)에서 우선적 중-제한된 H 및 L 사슬 쌍을 이루는 것을 이용한다(Lindhofer et al, J. Immunol. 155:219, 1995). 그러나, 제조된 이중특이적 항체는 랫/마우스 항체이고, 이는 확실히 치료제로서 면역원성 문제를 갖는다.

[0008] 노브-인투-홀 헤테로다이머화한 H 사슬을 기초로 한, 크로스맵(Crossmab) 접근법은, 추가로 이중특이적 IgG 항

체의 제조를 위한 유전적 접근법으로서 번역글로불린 도메인 크로스오버를 사용한다(Schaefer et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108:11187, 2011). 그럼에도 불구하고, H 사슬 헤테로다имер와 동족 Fv's의 정확한 쌍 이루기는 독점적이지 않고, 원하지 않은 부산물들이 정제 동안 제거되어야만 한다.

[0009] 크로스맵 접근법을 확장하여 크로스맵의 C-말단에 초과 세트의 Fab와 크로스맵 Fab 단편을 꼬리표 붙이는 것으로 4가 이중특이적 항체를 제조하였고(Regula et al, US Patent Application No: 2010/0322,934), H 사슬 헤테로다имер와 동족 Fv's 를 독점적으로 정확하게 쌍을 형성하는 것에 대한 도전은 여전히 남아있다.

[0010] 이중특이성에 대한 또 다른 접근법은 2개의 다른 항원을 표적화하는 단일 결합 사이트를 사용하는 것이며, "투-인-원(two-in-one)" 항체로 표시되었다. 그러한 "투-인-원" 항체 중 하나는 항체 헤르셉틴(Herceptin)의 변이체이고, 이는 Her2 및 VEGF 둘 다와 상호작용한다(Bostrom et al, Science 323:1610, 2009). 이 접근법은 이것이 정상 IgG와 동일한 포켓을 갖는 이중특이적 항체를 제공하기 때문에 임상적용에 매력적이다. 그러나, 그러한 변이체를 검사하는 것은 매우 노동 집약적이고 관심있는 두 개 항원 모두와 결합할 수 있는 단일 결합 사이트가 얻어질 수 있다는 보장이 없다.

[0011] 단일 세트의 Fab 단편을 기초로 한 단일 특이성만을 갖는 안정한 다가 항체는 US 공개된 특허출원 US2011/0076722에 설명되어 있다. 또 다른 기술은 Dock-and-Lock 도메인을 사용하여 다른 특이성의 미리 형성된 Fab 단편을 항체에 연결하여 6가 이중특이적 항체를 형성한다(Rossi et al, Cancer Res. 68:8384, 2008).

[0012] 광범위한 다수의 항체들(즉, 이들은 하이브리도마, Fab 라이브러리 및 B-세포 클로닝으로부터 발생된 것들로, 기원이 정상 마우스, 랫트 및 토끼, 또는 유전자 이식(인간화) 마우스 또는 랫트, 또는 환자들로부터인지 여부와는 무관함)은 동족 H 사슬과 쌍을 이룬 유리 L 사슬을 갖기 때문에, 무작위적 L 사슬 쌍을 이루는 문제를 피하는 이중특이적 항체에 대한 Fab-기초 기술이 조속히 요구된다. 그러한 기술은 2개의 기존 항체로부터 이중특이적 항체를 간단하고 효율적으로 용이하게 제조할 수 있게 할 것이며, 이는 첫번째로 이중 표적화의 잠재적 상승 효과를 탐침하는 다목적 도구 분자로서 사용될 수 있고, 두 번째로 치료할 질병 세팅에서 완전한 항체의 상황에서 이중 표적화를 이용하기 위한 치료제로서 사용될 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명은 4가 이중특이적 항체(TetBiAb)로 특징된다. 본 발명의 일반 실시예에서, 상기 항체는 이의 C-말단에서 Fab L 사슬 수단에 의해 Fab에 공유적으로 연결된 항체 Fc 영역을 포함한다. TetBiAb의 일 실시예에서, 항체는 이의 C-말단에서 Fab L 사슬 수단에 의해 제2 결합 특이성을 갖는 제2 쌍의 Fab들에 공유적으로 연결되며, 여기서 연결된 Fab L 사슬은 유리 동족 Fab H 사슬과 쌍을 이룬다. 반대로, 상기 항체의 N-말단에서 상기 Fab H 사슬은 이것의 동족 유리 L 사슬과 늘 그렇듯이 쌍을 이룬다. 얻어진 항체는 이것의 결합 특이성 각각에 대하여 2가이다. TetBiAb에서 폴리펩티드의 배열은 도 1B에 개략적으로 도시되어 있다.

[0014] TetBiAb의 대안적 실시예에서, 항체 Fc 영역은 이의 N-말단에서 Fab L 사슬의 수단에 의해 제1 특이성의 Fab에 연결되고, 여기서 연결된 Fab L 사슬은 유리 동족 Fab H 사슬과 쌍을 이루고, 추가적으로, 상기 항체 Fc 영역은 이의 C-말단에서 Fab H 사슬의 수단에 의해 제2 특이성의 Fab에 연결된다. 상기 항체의 C-말단에서 상기 연결된 Fab H 사슬은 이의 동족 유리 L 사슬과 평상시처럼 쌍을 이룬다. 다시, 얻어진 항체는 이의 결합 특이성 각각에 대하여 2가이다. 대안적 TetBiAb에서 폴리펩티드 사슬의 배치는 도 1D에 개략적으로 도시된다.

과제의 해결 수단

[0015] 그러므로, 본 발명의 일 실시예에서, TetBiAb는 (i) 제1 항체의 항체 H 사슬을 포함하고, 상기 H 사슬이 제1 항체의 가변 도메인 및 불변 도메인을 포함(VH(1)-CH1-힌지-CH2-CH3)하고, 상기 H 사슬이 이의 C-말단에서 펩티드 결합에 의해 제2 항체의 항체 L 사슬의 N-말단에 직접적으로 또는 간접적으로 연결되고, 상기 L 사슬이 제2 항체의 가변 및 불변 도메인을 포함(VL(2)-CL)하는 제1 폴리펩티드; ii) 상기 제1 항체의 항체 L 사슬을 포함하고, 상기 제1 항체의 L 사슬이 가변 및 불변 도메인을 포함(VL(1)-CL)하는 제2 폴리펩티드; 및 (iii) 제2 항체의 Fab H 사슬을 포함하고 CH2 및 CH3 불변 도메인이 결핍(VH(2)-CH1)된 제3 폴리펩티드;를 포함한다. 제1 및 제2 항체는 다른 결합 특이성을 갖는 것, 즉 항체가 별개의 에피토프에 특이적으로 결합하는 것으로 이해된다. 이들 폴리펩티드는 완전한 4가 이중특이적 항체로 조립된다.

[0016] 본 발명의 추가 실시예에서, TetBiAb (VH(1)-CH1-힌지-CH2-CH3-(L)-VL(2)-CL)의 제1 폴리펩티드는 L 사슬 가변

도메인의 N-말단에 H 사슬 불변 도메인의 C-말단을 작동가능하게 연결시키는 링커를 더 포함한다. 일 실시예에서, 상기 링커는 아미노산 서열 (GGGS)_n (SEQ ID NO:6)을 가지며, 여기서 n은 1 내지 10 사이의 정수이다. 또 다른 실시예에서, 상기 링커는 (GGGS)_n이며, 여기서 n은 4이다.

- [0017] 본 발명의 추가 실시예에서, TetBiAb의 상기 제1 폴리펩티드의 H 사슬 불변 도메인은 IgG 불변 도메인이다.
- [0018] 본 발명의 추가 실시예에서, TetBiAb의 상기 제1 폴리펩티드는 CH2 도메인이 결핍되어 있다.
- [0019] 본 발명의 추가 실시예에서, 제3 폴리펩티드, (VH(2)-CH1)는, 이의 C-말단에 서열 EPKSC (SEQ ID NO:10)을 갖는 상부 힌지 영역을 포함한다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 양상에서, TetBiAb를 형성하는 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 DNA 분자가 제공된다. 일 실시예에서, 제1 DNA 서열을 포함하는 DNA 분자가 제공되고, 여기서 DNA 서열은, 선택적 링커를 통해 제2 항체의 L 사슬(VL(2)-CL)에 유전적으로 융합된 제1 항체의 H 사슬(VH(1)-CH1-힌지-CH2-CH3)을 암호화하여 VH(1)-CH1-힌지-CH2-CH3-(선택적 링커)-VL(2)-CL을 암호화하는 서열을 제공한다. 추가 실시예에서, 제2 DNA 서열이 제1 DNA 서열에 추가적으로 제공되고, 여기서 제2 서열은 제1 항체의 L 사슬(VL(1)-CL)을 암호화한다. 추가 실시예에서, 제3 DNA 서열이 추가적으로 제공되고, 제3 서열은 제2 항체의 Fab H 사슬(VH(2)-CH1)을 암호화하며, 이는 아미노산 서열 EPKSC (SEQ ID NO:10)을 갖는 힌지 영역을 암호화하는 추가적 서열에 선택적으로 연결된다. 추가 실시예에서, 제1, 제2 또는 제3 DNA 서열 중 적어도 하나는 별개 DNA 분자 위에 포함된다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 제1, 제2 및 제3 유전자 구조체를 포함하는 DNA 분자가 제공되며, 여기서 상기 제1 구조체는 선택적 링커를 통해 제2 항체의 L 사슬(VL(2)-CL)에 유전적으로 융합된 제1 항체의 H 사슬(VH(1)-CH1-힌지-CH2-CH3)을 암호화하여 VH(1)-CH1-힌지-CH2-CH3-선택적 링커-VL(2)-CL를 암호화하는 서열을 제공하며; 상기 제2 구조체는 제1 항체의 L 사슬(VL(1)-CL)을 암호화하고; 및 제3 구조체는 제2 항체의 Fab H 사슬(VH(2)-CH1)을 암호화하고, 이는 힌지 영역(아미노산 서열 EPKSC, SEQ ID NO:10; 도 1A 참조)을 암호화하는 추가 서열에 선택적으로 연결된다.
- [0022] 본 발명은 추가로 본 발명의 DNA 분자를 수송하는 호스트 세포를 제공하는 것이다.
- [0023] 본 발명은 추가로 본 발명의 TetBiAbs를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 양상에서, 본 발명의 TetBiAbs에 대한 적당한 표적 결합 특이성을 선택하는 방법이 제공된다.
- [0025] 특이적 TetBiAbs가 또한 제공된다. 일 실시예에서, TetBiAb은 CD20 및 CD16을 표적으로 한다. 또 다른 실시예에서, TetBiAb는 EGFR 및 CD16을 표적으로 한다. 추가 실시예에서, TetBiAb는 CD20 및 CD47을 표적으로 한다. 또 다른 추가 실시예에서 TetBiAB는 CD20 및 CD52를 표적으로 한다. 또 다른 실시예에서, TetBiAb는 EpCam 및 CD47을 표적으로 한다.
- [0026] 본 발명의 일 양상은 암 또는 면역 관련 질병을 갖는 환자를 본 발명의 TetBiAb로 치료하는 방법을 제공하는 것으로, 치료적으로 유효한 함량의 TetBiAb, 예를 들어 상기 나열된 실시예의 TetBiAb들을 질병을 치료할 개인에게 투여하는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 4가 이중특이적 항체들(TetBiAbs)을 개략적으로 설명한다. 도 1A에서, TetBiAbs의 발현을 위한 DNA 구조체가 도시된다. DNA 구조체 1(상부)는 제1 항체의 H 사슬 가변 도메인(VH(1))을 암호화하고, 이어서 선택적 링커(L)를 통해 제2 항체의 L 사슬 가변 도메인(VL(2))에 유전적으로 융합된 H 사슬 불변 도메인(CH1, 힌지(H)-CH2-CH3)을 암호화하고, 이어서 L 사슬 불변 도메인(CL)을 암호화한다. DNA 구조체 2(중앙)는 제1항체의 L 사슬 가변 도메인(VL(1))을 암호화하고, 이어서 L 사슬 불변 도메인(CL)을 암호화한다. DNA 구조체 3(하부)는 제2항체의 H 사슬 가변 도메인(VH(2))을 암호화하고, 이어서 H 사슬 불변 도메인 1(CH1)을 암호화하고, 선택적으로 상부 힌지 영역(H*)을 암호화한다. 도 1B에서, TetBiAb의 개략적 도면은 도 1A에 도시된 DNA 구조체에 의해 암호화된 3개의 폴리펩티드 구성 성분들을 포함하는 헥사머릭 구조를 나타낸다. 내부사슬 디설파이드 결합들은 두 개의 폴리펩티드 사슬들 사이의 짧은 막대로서 도시된다. 도 1C에서, TetBiAb들의 발현을 위한 대안적인 DNA 구조체들이 도시되어 있다. DNA 구조체 1(상부)는 제1 항체의 L 사슬 가변 도메인(VL(1))을 암호화하고, 이어서 L 사슬 불변 도메인(CL)을 암호화하고, 이어서 선택적 링커(L)를 통해 제2 항체의 H 사슬 가변 도메인(VH(2))에 유전적으로 융합된 H 사슬 불변 도메인(힌지 (H)-CH2-CH3)를 암호화하고, 이어서 H 사슬 불변 도메인 1(CH1)을

암호화하고, 선택적으로 상부 힌지 영역(H*)을 암호화한다. DNA 구조체 2(중간)는 제2 항체의 L 사슬 가변 도메인(VL(2))을 암호화하고, 이어서 L 사슬 불변 도메인(CL)을 암호화한다. DNA 구조체 3(하부)는 제1 항체의 H 사슬 가변 도메인(VH(1))을 암호화하고, 이어서 불변 도메인(CH1)을 암호화하고, 선택적으로 상부 힌지 영역(H*)을 암호화한다. 도 1D에서, TetBiAb의 개략적 도면은 도 1C에 도시된 DNA 구조체들에 의해 암호화된 3개의 폴리펩티드 구성성분들을 포함하는 핵사머릭 구조를 나타낸다. 내부사슬 디설파이드 결합들은 2개의 폴리펩티드 사슬들 사이에 짧은 막대로 도시된다.

도 2는, EGF를 사용한 경합 결합 측정법(competition binding assay)을 사용하여, EGFR을 발현하는 인간 A431 편평상피암(epidermoid carcinoma) 세포에 대한 항-EGFR(채워진 원, 굵은 선), Fc-G4S-항-EGFR(VHCH1)(개방 사각, 점선), 및 Fc-G4S-항-EGFR(LC)(채워진 사각, 긴 점선)의 결합력을 나타낸다(실시에 1).

도 3은 SPR 분석에 의한 것으로, 고정된 Fc-G4S-항-EGFR(VHCH1), Fc-G4S-항-EGFR(LC), 및 Fc-(G4S)₄-항-EGFR(LC)에 대해 다양한 농도에서의 EGFR의 결합력을 나타낸다.

도 4는 다우디(Daudi) 세포에 발현된 CD20에 대한, 항-CD20(채워진 원, 굵은 선), Fc-G4S-항-CD20(VHCH1)(개방된 삼각형, 점선), Fc-G4S₄-항-CD20(VHCH1)(개방 사각형, 짧은 점선), Fc-G4S-항-CD20(LC)(채워진 삼각형, 굵은 선) 및 Fc-(G4S)₄-항-CD20(LC)(채워진 사각형, 긴 점선)의 결합력을 나타낸다(실시에 2).

도 5는 SDS-PAGE에 의한, 항-CD16/항-EGFR (레인 2) 및 항-EGFR/항-CD16 (레인 3)의 3개의 폴리펩티드들의 발현 분석(도 5A), 및 사이즈 배제 크로마토그래피(사이즈 배제 크로마토그래피, SEC)에 의한, 항-CD16/항-EGFR (상부 패널) 및 항-EGFR/항-CD16 (하부 패널)의 완전한 핵사머릭 분자의 조립체의 분석을 나타낸다(도 5B, 실시에 3).

도 6은 EGF를 사용한 경쟁 결합 분석에 의한 것으로, EGFR을 발현하는 인간 A431 편평상피암 세포에 대한 항-EGFR (채워진 원, 굵은 선), 항-EGFR/항-CD16 (개방 원, 점선), 및 항-CD16/항-EGFR (개방 사각형, 긴 점선)의 결합력을 나타낸다(실시에 3).

도 7은 휴면 인간 말초혈액단핵세포(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)를 효과기로서 사용하는, 인간 A431 편평상피암 세포에 대한 항-EGFR (채워진 원, 굵은 선), 항-EGFR/항-CD16 (개방 원, 점선), 및 항-CD16/항-EGFR (개방 사각형, 긴 점선)의 항체의존적세포매개세포독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) 활성을 나타낸다(효과기-대-표적 세포 비 100:1)(실시에 4).

도 8은 SDS-PAGE에 의한 항-CD20/항-CD16의 3개의 폴리펩티드들의 발현의 분석(도 8A) 및 사이즈 배제 크로마토그래피(SEC)에 의한 완전한 핵사머릭 분자의 조립체의 분석(도 8B)을 나타낸다.

도 9는 CD20을 발현하는 다우디 세포에 대한 항-CD20/항-CD16 (개방 원, 점선) 및 항-CD20 (채워진 원, 굵은 선)의 결합력을 나타낸다.

도 10은 효과기로서 정제된 인간 자연 살해(NK) 세포를 사용하고, 인간 라모스 부르키트 림프종 세포(Ramos Burkitt's lymphoma cell)에 대한 항-CD20/항-CD16 (개방 원, 점선) 및 항-CD20 (채워진 원, 굵은 선)의 항체의존적세포-매개세포독성 (ADCC) 활성을 나타낸다(효과기-대-표적 세포 비 10:1). 2개 그래프는 다른 공여자들의 효과기 세포들을 사용한 결과를 나타낸다.

도 11은 SDS-PAGE에 의한 항-CD20/항-CD47의 3개 폴리펩티드의 발현을 분석한 것(도 11A)과 사이즈 배제 크로마토그래피(SEC)에 의한 완전한 핵사머릭 분자의 조립체를 분석한 것(도 11B; 실시에 5)을 나타낸다.

도 12는 CD20 (CD20-감염된 NS0 세포; 도 12A), CD47 (U937 세포; 도 12B), 또는 둘 다(SU-DHL4 세포; 도 12C)를 발현하는 세포에 대한, 항-CD20/항-CD47(개방 원, 점선), 항-CD20(채워진 원, 굵은 선), 및 항-CD47(채워진 사각형, 굵은 선)의 결합력을 나타낸다.

도 13은 SDS-PAGE에 의한 항-CD20/항-CD52 (레인 2) 및 항-CD52/항-CD20 (레인 3)의 3개 폴리펩티드의 발현을 분석한 것(도 13A) 및 사이즈 배제 크로마토그래피(SEC)에 의한 항-CD20/항-CD52 (상부 패널) 및 항-CD52/항-CD20 (하부 패널)의 완전한 핵사머릭 분자의 조립체를 분석한 것(도 13B; 실시에 6)을 나타낸다.

도 14는 CD20 (다우디 세포; 도 14A) 또는 CD52 (Kasumi-3 세포, 도 14B)를 발현하는 세포에 대한, 항-CD20/항-CD52(개방 원, 점선), 항-CD52/항-CD20(개방 삼각형, 긴 점선), 항-CD20(채워진 원, 굵은 선), 및 항-CD52(채워진 삼각형, 굵은 선)의 결합력을 나타낸다.

도 15는 ELISA에 의해, 다양한 항체 농도에서 고정된 CD47에 대한, Fc-(G4S)₄-항-CD47(VHCH1) (개방 삼각형, 점선), Fc-(G4S)₄-항-CD47(LC) (채워진 삼각형, 긴 점선), 및 항-CD47의 결합력을 나타낸다(실시에 7).

도 16는 SDS-PAGE에 의한 항-EGFR/항-CD47(레인2) 및 항-CD47/항-EGFR(레인3)의 3개 폴리펩티드의 발현을 분석한 것(도 16A) 및 사이즈 배제 크로마토그래피 (SEC)에 의한 항-EGFR/항-CD47(상부 패널) 및 항-CD47/항-EGFR(하부 패널)의 완전한 헥사머릭 분자의 조립체를 분석한 것(도 16B; 실시예 8)을 나타낸다.

도 17는 ELISA에 의해, 고정된 CD47(도 17A) 또는 고정된 EGFR(도 17B)에 대한, 항-EGFR/항-CD47 (개방 원, 점선), 항-CD47/항-EGFR (open square, 긴 점선), 항-EGFR (채워진 원, 굵은 선), 및 항-CD47 (채워진 사각형, 굵은 선)의 결합력을 나타낸다. A431 세포(고준위로 EGFR을 발현하고 저준위로 CD47을 발현함)에 대한 항-EGFR/항-CD47 (개방 원, 점선), 항-EGFR (채워진 원, 굵은 선) 및 항-CD47 (채워진 사각형, 굵은 선)의 결합력은 도 17C에 도시된다.

도 18은 SDS-PAGE에 의해, 항-HER2/항-CD47 (레인3) 및 항-CD47/항-HER2 (레인3)의 3개 폴리펩티드의 발현을 분석한 것(도 18A)과 사이즈 배제 크로마토그래피 (SEC)에 의해, 항-HER2/항-CD47 (상부 패널) 및 항-CD47/항-HER2 (하부 패널)의 완전한 헥사머릭 분자의 조립체를 분석한 것(도 18B; 실시예 9)을 나타낸다.

도 19는 ELISA에 의해, 고정된 CD47(도 19A), 또는 HER2를 발현하나 CD47을 발현하지는 않는 SK-BR3 세포(도 19B)에 대한, 항-HER2/항-CD47 (개방 삼각형, 점선), 항-CD47/항-HER2 (개방 사각형, 긴 점선), 항-HER2 (채워진 삼각형, 굵은 선), 및 항-CD47 (채워진 사각형, 굵은 선)의 결합력을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 본 발명은 다른 결합특이성을 갖는 2개의 Fab 단편을 포함하는 이중특이적 항체의 세포 발현, 조립체 및 정제에서의 근본적 문제를 극복한 것이다: 유리 L 사슬의 2개 종들은 무작위적으로 Fab H 사슬들과 쌍을 이루어서, 다중의 비정상적 항체 종들을 생성한다. 이들 비정상적 항체는 원하는 생성물로부터 분리 정제하는 것이 어려워 생성물 수율에 영향을 미칠 수 있다. 본 발명의 기술에서는, 유리 L 사슬의 단지 하나의 종들이 존재하고, 원하는 이중특이적 항체 생성물이 용이하게 얻어진다.

[0029] 본 발명의 일반적인 실시예에서, 상기 항체는 항체 Fc 영역을 포함하고, 여기서 Fc H 사슬들이 이의 C-말단에서 Fab L 사슬 수단에 의해 Fab에 연결된다.

[0030] 보다 구체적으로는, 본 발명은 4가 이중특이적 항체 (TetBiAbs)를 제공하며, 여기서 제2 결합 특이성을 갖는 제 2 Fab 단편은 Fab L 사슬 수단에 의해 항체의 C-말단에 연결된다. 이들 연결된 Fab L 사슬들은 이후 유리 동족 L 사슬과 쌍을 이룰 수 있다. 대조적으로, 항체의 N-말단에 정상적으로 존재하는 Fab H 사슬 영역은 이의 동족 유리 L 사슬과 쌍을 이룰 수 있다. 얻어진 항체는 이들 결합 특이성 각각에 대하여 2가이다. TetBiAb에서 폴리펩티드 사슬의 배치는 개략적으로 도 1B에 도시되어 있다.

[0031] TetBiAb의 변화로 TetBiAb의 반대 배치가 얻어진다: L 사슬은 Fc 폴리펩티드 사슬의 N- 말단에 연결되고, 제2 결합 특이성을 갖는 제2 세트의 Fab는 Fab H 사슬 수단에 의해 Fc 영역의 C-말단에 연결된다. TetBiAb에서 폴리펩티드의 배치는 개략적으로 도1D에 도시되어 있다.

[0032] 용어 "Fab 단편" 또는 단순히 "Fab"는 상호 교환적으로 사용되며, 여기서 항체의 항원-결합부를 설명하기 위해 사용되며, IgG 항체의 파파인(papain) 소화에 의해 얻어진다. Fab 단편은 헤테로다이머릭이며, 2개의 폴리펩티드들, 가변(VL)과 불변(CL) 도메인을 갖는 L 사슬, 및 가변(VH) 및 제1불변 도메인(CH1)을 갖는 H 사슬로 구성되며, 또한 특히 만약 Fab가 IgG1 서브클래스의 것이라면 상부 힌지 영역을 포함할 수 있다. 상기 폴리펩티드 사슬은 펩티드 결합에 의해 서로 연결되지는 않으나 비공유 상호작용에 의해, 및 상기 H 사슬의 상부 힌지 영역이 존재한다면 디설파이드 결합에 의해 서로 관련되어 있다.

[0033] 여기 사용된 것처럼, 용어 "Fab H 사슬"은 VH 도메인 및 CH1 도메인으로 구성되거나 CH2 도메인 또는 CH3 도메인을 포함하지는 않는 폴리펩티드를 나타낸다. 상기 폴리펩티드는 특히 만약 Fab가 IgG1 서브클래스라면 상기 항체 힌지의 상부 힌지 영역을 추가로 포함할 수도 있다.

[0034] 여기 사용된 것으로서, 용어 "L 사슬"(LC) 또는 "Fab L 사슬"은 VL 도메인 및 CL 도메인으로 구성된 폴리펩티드를 나타낸다. 항체 L 사슬은 kappa 또는 lambda L 사슬, 또는 kappa로 분류된다.

[0035] 여기 사용된 것처럼, 용어 "유리 L 사슬(free light chain)" 또는 "유리 Fab H 사슬"은 펩티드 결합에 의해 Fc

폴리펩티드 사슬에 연결되지 않은 본 발명의 항체의 폴리펩티드 구성 성분을 설명한다.

- [0036] 여기 사용된, 용어 "Fc 영역"은 Fc 수용체 및 특정 보체 단백질(complement protein)에 결합하는 항체의 부분을 설명하며, 파파인 소화에 의해 전통적으로 얻어지나 상부 힌지 영역을 포함하는 단편에 근본적으로 대응한다. Fc 영역은, 전형적으로 항체 H 사슬, 즉 전형적으로 힌지, CH2 및 CH3 도메인을 포함하나 CH1 도메인을 포함하지 않는 항체 H 사슬로부터 유래된 2개의 동일한 폴리펩티드 사슬로 구성된, 전형적인 호모다이머릭 영역이다 ("Fc H 사슬"; IgG1 폴리펩티드에서, 상기 Fc H 사슬 힌지는 EU 번호 매김 시스템에 의해 정의된 것처럼 잔기 216에서 시작하며, 이는 아미노산 글루타메이트에 대응한다). 특정 실시예에서, CH2 도메인이 결핍될 수 있다. 다른 실시예에서, Fc 영역은 예를 들어 효과기 기능 업무 또는 항체 반감기에 영향을 미치는 돌연변이들을 포함할 수도 있다. 상기 폴리펩티드 사슬들은 CH3 도메인에서의 비공유 상호작용 및 힌지 도메인에서 디설파이드 결합에 의해 서로 관계한다.
- [0037] 여기 사용된, 용어 "도메인"은 예를 들어 단백질 또는 폴리펩티드 사슬의 구조적으로 또는 기능적으로 정의된 소자 또는 구성 부분을 설명한다. Fc H 사슬 불변 도메인의 예는 CH2 도메인 또는 CH3 도메인이다. Fab 도메인의 예는 L 사슬 가변 도메인(VL) 또는 Fab H 사슬 불변 도메인(CH1)이다.
- [0038] 여기 사용된 용어 "1가", "2가", "4가"는 단백질에서 항원 결합 요소들의 수(각각 1, 2 또는 4)를 의미한다.
- [0039] 여기 사용된, 특이적 TetBiAb는 "항-표적(1)" / "항-표적(2)"으로서 지정되고, 여기서 지정된 것에서 표적의 순서는 Fc 영역에 대한 Fab 단편의 순서를 반영한다. 항-표적(1)/항-표적(2)은 Fab(항-표적(1))-Fc-Fab(항-표적(2))의 순서를 갖는다.
- [0040] 본 발명의 일반 실시예에서, TetBiAb는 (i)제1 항체의 항체 H 사슬을 포함하고, 여기서 상기 H 사슬은 제1 항체의 가변 도메인 및 불변 도메인을 포함(VH(1)-CH1-힌지-CH2-CH3)하고, 여기서 H 사슬은 이의 C-말단에서 펩티드 결합에 의해 제2 항체의 항체 L 사슬의 N-말단에 직접적으로 또는 간접적으로 연결되어 있고, L 사슬은 제2 항체의 가변 및 불변 도메인을 포함(VL(2)-CL)하는, 제1 폴리펩티드; (ii)제1 항체의 항체 L 사슬을 포함하고, 여기서 제1 항체의 L 사슬은 가변 및 불변 도메인을 포함(VL(1)-CL)하는 제2 폴리펩티드; 및 (iii) 제2 항체의 Fab H 사슬을 포함하고 CH2 및 CH3 불변 도메인이 결핍(VH(2)-(CH1)되는 제3 폴리펩티드를 포함한다. 상기 제1 및 제2 항체는 다른 결합 특이성을 갖는다는 것, 즉 항체가 별개의 에피토프에 특이적으로 결합한다는 것이 명확하다. 이들 폴리펩티드들은 완전한 4가 이중특이적 항체로 조립된다.
- [0041] 추가 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 H 사슬 불변 도메인의 C-말단과 L 사슬 가변 도메인의 N-말단 사이의 링커를 포함할 수 있다. 일 실시예에서, 상기 링커는 G4S (아미노산 서열 GGGGS, SEQ ID NO:6)이다. 상기 링커는 다중, 연관된 G4S 요소들(G4S)_n을 포함할 수 있으며, 여기서 n은 2 및 10 사이의 정수이다. 추가 실시예에서, n은 2 및 6 사이의 정수이다. 추가 실시예에서 n은 4이다.
- [0042] 추가 실시예에서, 상술된 TetBiAb의 유리 Fab H 사슬 폴리펩티드, VH(2)-CH1은 이의 C-말단에 아미노산 서열 EPKSC (SEQ ID NO:10; "상부 힌지 영역")의 Fc 힌지 영역을 더 포함하며, 이로 인하여 H 사슬 폴리펩티드가 이의 동족 L 사슬과 디설파이드 결합을 형성할 수 있게 한다.
- [0043] 본 발명의 또 다른 양상에서, TetBiAb를 형성하는 3개의 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 DNA 구조체들을 제공한다. 제1 구조체는 선택적 링커를 통해 제2 항체의 L 사슬(VL(2)-CL)에 유전적으로 융합된 제1 항체의 H 사슬(VH(1)-CH1-힌지-CH2-CH3)을 암호화하여 VH(1)-CH1-힌지-CH2-CH3-선택적 링커-VL(2)-CL을 암호화하는 DNA 서열을 제공하고; 제2 구조체는 제1 항체의 L 사슬(VL(1)-CL)을 암호화하고; 및 제3 구조체는 제2 항체의 Fab H 사슬(VH(2)-CH1)을 암호화하며, 선택적으로 힌지 영역을 암호화하는 서열(아미노산 서열 EPKSC, SEQ ID NO:10; 참조도 1A)을 추가로 갖는다.
- [0044] 또 다른 실시예에서, 상기 DNA 구조체는, 힌지-CH2-CH3에 유전적으로 융합된 제1 항체의 L 사슬(VL(1)-CL1), 이어서 선택적 링커 및 제2 항체의 Fab H 사슬(VH(2)-CH1)을 포함하여, 서열 VL(1)-CL1-힌지-CH2-CH3-선택적 링커-VH(2)-CH1를 제조하는 융합 폴리펩티드를 암호화한다(도 1C).
- [0045] 본 발명의 또 다른 양상에서, 본 발명의 TetBiAb들을 제조하는 방법이 제공된다. 호스트 세포에서 분비되기 위한 신호 펩티드를 포함하는 적당한 발현 벡터에서 3개의 DNA 구조체들의 공통 발현이 있으면, 2개의 다른 결합 특이성을 갖는 원하는 TetBiAb(도 1B)가 형성되고 배양 배지로 분비되고, 단백질 A 크로마토그래피와 같은 표준 항체 정제 과정에 따라 정제된다. 일시적 발현(transient expression)을 위한 적당한 호스트 세포의 예는 인간 배아 신장 세포 293E이다. 안정한 발현을 위한 적당한 호스트 세포의 예는 중국 햄스터 난소(Chinese hamster

ovary, CHO) 세포이다.

- [0046] 3개 발현된 폴리펩티드 사슬들이 펩티드 결합으로 서로 연결되어 있지 않다는 것은 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명백하다. 본 발명은 단지 하나의 유리 사슬(VL-CL)만이 있다는 사실을 이용하여, 무작위적 L 사슬 쌍을 이루는 문제를 극복한다.
- [0047] 본 발명의 또 다른 장점은, Fab 단편이 scFv에 비하여 매우 안정하고, 이의 H 사슬의 C-말단에 융합된 추가의 Fab 단편을 갖는 항체가 매우 안정할 것이며 일반적으로 높은 수준으로 생성될 것으로 예상된다는 사실이다. 중요하게, 본 발명은 항체 H 사슬 융합 폴리펩티드 사슬의 하나의 단일 종의 발현을 기초로 한 것으로, 상기 융합 폴리펩티드의 일 말단에서 하나의 동족 유리 L 사슬 폴리펩티드와 특이적으로 쌍을 이루고, 다른 말단에서 하나의 동족 유리 Fab H 사슬 폴리펩티드와 특이적으로 쌍을 이룬다. 그러므로, 헤테로다이머틱 Fc 골격은 이중특이적 항체를 조립할 수단을 제공할 필요가 없다. 그러므로 H 사슬들이 잘못 쌍을 이루는 것이 없다.
- [0048] 본 발명의 목적은, 제1 및 제2 항체의 가변 영역과 관련하여 자연에서 모듈식(modular)인 DNA를 제공하여, 제1 및 제2 항체의 VH 및 VL을 암호화하는 cDNA가, 예를 들어, 이중특이적 항체의 발현을 위해 돌연변이 안정화 및 광범위한 최적화를 도입하지 않고서도 용이하게 조립될 수 있게 하는 것이다. 이중특이적 항체의 제조를 용이하게 하는 그러한 강력한 기술은 특정 질병 세팅화에 상승적 효과를 줄 수 있는 표적 조합들을 발견하는데 매우 유리하다.
- [0049] 본 발명의 또 다른 목적은, 이중특이적 결합력을 달성하기 위한 Fab 단편, 및 원하는 효과기 기능 및 반감기 프로파일을 달성하기 위하여 선택적으로 변경된 Fc 영역으로 특징화되는, 바이오치료제로서 발전되기에 적당한 안정한 항체-기반 융합 단백질을 제공하는 것이다. 효과기 기능 및 반감기에 영향을 미치는 Fc 변이체들은 당해 기술분야에서 잘 이해될 것이다(참조, 예를 들어 WO 2000/042072). Fab 단편은 본질적으로 단일-사슬 Fv's보다 안정하고(Rothlisberger et al, J. Mol. Biol. 347:773, 2005), 이들은 항체의 결합 팔(binding arm)들로서 자연적으로 발생하고, 추가 가공없이 그대로 사용될 수 있다(Schoonjans et al, J. Immunol. 165:7050, 2000).
- [0050] 일 실시예에서, 인간 IgG1 불변 영역 및 kappa 불변 영역들은 TetBiAb의 구축을 위해 사용된다. 지금까지, 모든 승인된 치료적 항체들은, IgG가 지배적인 혈청 변역글로불린이고, 바이오치료제로서 용이하게 제조가능하기 때문에, 변역글로불린 G(IgG) 아이소타입(isotype)의 것들이다. 게다가, IgG는 변역 세포 위의 Fc γ 수용체 Fc γ R)와 결합하여 다양한 효과기 기능들을 이끌어 내고, 보호적 신생아 Fc 수용체 FcRn과 결합하는 단일의 아이소타입이며, 이는 인간에서 긴 혈청 반감기를 갖는 전형적인 Ig를 생성한다. 상기 IgG 아이소타입 내에, 4개의 서브클래스, 즉 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4가 있다. 효과기 기능들을 결정하는, 항체의 IgG 서브클래스는 이의 치료적 응용분야에 맞도록 주의깊게 선택된다. 따라서, 상기 IgG1 서브클래스는 효과기 기능들이 필요해질 때 선택되고, IgG2는 항체-의존 세포의 세포독성(ADCC)을 최소화하기 위해 Fc γ R 결합력의 결핍을 위해 선택되고, IgG4는 낮은 ADCC 활성 및 보체-의존성 세포독성(CDC)의 완전한 결핍을 위해 선택된다. IgA, IgD, IgE 및 IgM과 같은 다른 변역글로불린 아이소타입의 불변 영역은 TetBiAb를 구축하기 위해 또한 사용될 수 있다. 자연 아이소타입 및 IgG 서브클래스로부터의 H 사슬 불변 영역 서열에 추가로, 재조합 하이브리드 아이소타입은 본 발명에 또한 사용될 수 있다(e.g. Gillies, S.D., and Lo, K.-M. Expression technology for proteins containing a hybrid isotype antibody moiety. US Patent 7,148,321). 게다가, C-말단 Fab에 대해 사용된 CH1는 N-말단 Fab에 사용된 CH1과 다른 아이소타입의 것일 수 있다. 만약 IgG1의 CH1이 C-말단 Fab를 위해 사용된다면, CH1은 이의 C-말단에서 IgG1 상부 힌지 영역으로부터의 추가 5 잔기 EPKSC (SEQ ID NO:10)에 의해 연장되어, L 사슬을 갖는 디설파이드 결합을 정상적으로 형성하는 시스템인 잔기를 제공한다(Rothlisberger et al, J Mol Biol. 347:773, 2005). L 사슬 불변 영역을 위하여, 상기 kappa 사슬 불변 영역 또는 상기 lambda 사슬 불변 영역은 N-말단 Fab 또는 C-말단 Fab, 또는 둘 다를 위해 사용된다.
- [0051] 본 발명의 또 다른 목적은 Luminex 및 다른 멀티플렉스 분석과 같은 분석에서 보다 특이적 결손, 연장된 해리 하프타임(dissociation half), 및 개선된 민감성을 갖는 진단제로서 TetBiAb를 제공하고, 형광-활성화된 세포 분류(fluorescence -activated cell sorting, FACS) 분석에서 표적 세포의 특이적 결합력을 증가시키는 것이다.
- [0052] 또 다른 양상에서, 본 발명은 치료 응용분야용 TetBiAb를 제조하는 방법을 제공한다. 본 방법은 (a)그러한 4가 이중특이적 항체를 암호화하는 감염된 DNA 분자들을 포함하는 포유류 세포를 제공하고; (b) 상기 포유류 세포를 배양하여 4가 이중특이적 항체를 제조하고; (c) 당해 기술분야에 잘 알려진 종래 기술을 사용하여 4가 이중특이적 항체를 정제하고; 및 (4) 치료 응용을 위하여 TetBiAb를 제형화하는 단계들을 포함한다. 자연 항체처럼, TetBiAb는 표적 당 2가 결합력을 보유하나, 추가로, 질병-유발 세포에 대한 결합 활성이, 동일 세포에서의 2가

질병-관련된 표적들에 대한 결합력을 통해 증가되어, 보다 특이적 표적화가 되고, 부작용이 낮아지게 된다. 게다가, 그러한 증가된 활성은 수용체의 광범위한 다가 가교를 제공하여, 성장 정지(growth arrest), 아포토시스 및 수용체 내재화 및 열화(degradation)와 같은 생물학적 활성을 때때로 증가시킬 수 있다. 전반적으로, TetBiAb의 다가 결합력 및 높은 활성은 치료 응용분야에서 치료 복용량 감소 및 효능 증가를 이끌어내는 잠재성을 갖는 특성이 있다.

[0053] 4가 이중특이적 항체에 대한 특이적 비제한 예는 항-EGFR/항-CD16(실시예 3), 항-CD20/항-CD16(실시예 4), 항-CD20/항-CD47(실시예 5), 항-CD20/항-CD52(실시예 6), 항-EGFR/항-CD47(실시예 8) 및 항-Her2/항-CD47(실시예 9)를 포함하고, 여기서 제1 항체의 특이성은 N-말단 Fab 위에 포함되고, 제2 항체의 특이성은 C-말단 Fab 위에 포함된다(도 1 참조). 2개 항체의 위치들은 역으로 될 수 있고, 예를 들어, 항-CD16/항-EGFR 대신에 항-EGFR/항-CD16가 될 수 있다.

[0054] 당해 기술 분야의 통상의 기술자는 4가 이중특이적 항체의 2가지 형태 모두를 발현할 수 있고, 이후 발현 수준, N-말단 및 C-말단 Fab의 결합 친화성, 및 다른 생물학적 활성 분석을 기초로 어느 것이 바람직한 형태인지를 결정할 수 있다. 일 방법에서, DNA의 구축 및 융합 단백질 분석을 단순화하기 위하여, 당해 기술분야의 통상의 기술자는 Fab-Fc(정상 항체) 및 비교용 Fc-Fb를 발현시키고, 어느 항체 Fab 도메인이 C-말단 Fab로서 발현되어야만 하는가를 결정한다.

[0055] 당해 기술분야에서 통상의 기술자는 또한 C-말단적으로 연결된 Fab로서 사용하기 위해 어느 Fab를 선택하는 가를 안내하는 데 있어서 표적 항원의 성질을 고려할 수도 있다. 일반적인 규칙으로서, 표적 항원에 대한 접근성은 C-말단 Fab의 결합 사이트에서 보다 제한되므로, 크게 노출된 세포외(extracellular) 도메인을 갖는 용해성 인자 또는 수용체는 C-말단 Fab에 의한 표적화가 보다 용이할 것이다. 반대로, 단지 작게 노출된 세포외 루프 영역 또는 세포막에 밀접한 항원 표면을 갖는 다중-스패닝 막 위의 표적 항원은 C-말단 Fab에 의한 표적화가 덜 용이할 것이다.

[0056] 이론에 의해 구애받지 않고, C-말단 Fab의 결합 사이트에 대한 Fc 영역의 근접성은 입체 장애를 일으킨다. C-말단 Fab의 표적에 대한, 특히 세포 수용체에 대한 결합력을 위하여, 유연한 링커를 결합시키는 것은 입체 장애를 완화시켜 결합친화성을 유지하는 것을 도울 수 있다. 일 실시예에서, 상기 유연한 링커는 아미노산 서열 GGGGS를 갖는다. 당해 기술 분야에서 통상의 기술자는 GGGGS 서열 (SEQ ID NO:6)의 다중 사본을 통합하여 유연한 링커의 최적 길이를 용이하게 시험할 수 있다. 일반적으로 10개 사본 이하가 사용되고, 일 실시예에서 4개 사본이 사용된다.

[0057] 따라서, 일 실시예에서 TetBiAb는 2개 다른 세포 타입의 2개의 별개 표적들을 결합한다. 예시적 실시예는 항-EGFR/항-CD16 또는 항-CD20/항-CD16이고, 여기서 TetBiAb는, 표적 종양 세포의 EGFR 또는 CD20과, 자연 살해 세포의 CD16 사이를 연결하여 자연 살해 세포를 종양에 향하게 한다. 다른 실시예에서, 4가 이중특이적 항체는 동일한 세포의 2개의 별개 표적, 예를 들어 예시적 실시예로서 항-CD20/항-CD47 또는 항-CD20/항-CD52과 결합한다. 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 4가 이중특이적 항체는 동일한 분자 표적의 2개 다른 에피토프들과 결합한다(즉, biparatopic). TetBiAb의 표적들 중 하나 또는 둘 다는 용해가능하거나 또는 하나의 세포 표면 위에 발현될 수 있다는 것이 당해 기술분야에서 통상의 기술자에게 명백하다.

[0058] 일 예시적 실시예에서, 본 발명은, 항-CD20 H 사슬-항-CD47 L 사슬 융합 폴리펩티드, 항-CD20 L 사슬, 및 항-CD47 Fab H 사슬을 포함하는 항-CD20/항-CD47 TetBiAb를 제공하며, 여기서:

[0059] (a) 항-CD20의 VH 및 VL 서열은 각각 SEQ ID NO:24 및 SEQ ID NO:22와 동일하며, 및

[0060] (b) 항-CD47의 VH 및 VL 서열은 각각 SEQ ID NO:56 및 SEQ ID NO:54에 동일하며, 및

[0061] (c) 상기 불변 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE, 및 IgM으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0062] 추가 실시예에서, 본 발명은 항-CD20 H 사슬-항-CD47 L 사슬 융합 폴리펩티드, 항-CD20 L 사슬, 및 항-CD47 Fab H 사슬을 포함하는, 항-CD20/항-CD47 4가 이중특이적 항체를 제공하며, 여기서

[0063] (a) 항-CD20의 VH 및 VL 서열은 각각 SEQ ID NO:24 및 SEQ ID NO:22에 대해 적어도 85% 서열 유사성, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 또는 적어도 98% 유사성을 가지며, 및

[0064] (b) 항-CD47의 VH 및 VL 서열은, 각각 SEQ ID NO:56 및 SEQ ID NO:54에 대해 적어도 85% 서열 유사성, 적어도

90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 또는 적어도 98% 유사성을 갖고, 및

- [0065] (c) 상기 불변 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE, 및 IgM로 이루어진 군으로부터 선택되고, Fc 영역의 효과기 기능을 폐지하는 돌연변이들을 포함한다.
- [0066] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 항-CD20 H 사슬-항-CD47 L 사슬 융합 폴리펩티드, 항-CD20 L 사슬, 및 항-CD47 Fab H 사슬을 포함하는, 항-CD20/항-CD47 4가 이중특이적 항체를 제공하며, 여기서
- [0067] (a) 항-CD20의 VH 및 VL 서열은 각각 SEQ ID NO:24 및 SEQ ID NO:22의 상보성-결정 영역들(CDRs), 및 콘센서스 인간 골격 영역들(FRs)을 포함하고;
- [0068] (b) 항-CD47의 VH 및 VL 서열은 각각 SEQ ID NO:56 및 SEQ ID NO:54의 상보성-결정 영역들(CDRs), 및 콘센서스 인간 골격 영역들 (FRs)을 포함하고; 및
- [0069] (c) 상기 불변 영역들은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE, 및 IgM로 이루어진 군으로부터 선택되고, Fc 영역의 작동 인자 기능들을 폐지하는 돌연변이들을 포함하거나, 또는 상기 군은 쥐과의 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgD, IgE, 및 IgM으로 이루어지는 군으로부터 선택되고, Fc 영역의 효과기 기능들을 폐지하는 돌연변이들을 포함한다.
- [0070] 본 발명의 또 다른 실시예에 따라, TetBiAbs는 질병-유발 표적 세포에서만 바람직하게 발현되는 항원과 결합하고, 건강한 조직에서는 발현되지 않거나 낮은 수준으로 발현된다. 그러한 표적 항원의 비제한적 예들로는 태아성 암 항원, EGFR, EGFRvIII, IGF-1R, HER-2, HER-3, HER-4, MUC1, MUC-1C, EpCAM, PSMA, 및 강글리오시드(ganglioside)들 GD2 및 GD3을 포함하고, 이들 중 많은 것들이 종양-특이적 항원들이다. TetBiAb에서, 종양-특이적 항원들 중 어느 하나에 결합하는 Fab는 효과기 세포 위의 항원, 예를 들어 T 세포 위 항원 CD3, NK 세포 위 CD16, 또는 단핵구 위 CD64를 표적화하는 Fab와 쌍을 이루어 종양 세포의 세포 용해를 촉진하는 TetBiAb를 생성할 수 있다. 그러한 TetBiAbs는 이들 종양 항원들의 발현으로 특징되는 암들의 치료에 사용될 수 있다.
- [0071] 본 발명의 대안 실시예에서, TetBiAb는 질병-유발 세포에서 발현되고 또한 정상 세포류에서 발현될 수도 있는 항원과 결합하고, 예를 들어 정상 및 악성 B 세포에서 발현된 항원 CD19 및 CD20이 그러한 경우이다. 그러한 TetBiAb에서, CD19 또는 CD20에 결합하는 Fab는 효과기 세포를 표적화하는 Fab와 쌍을 이룰 수 있으며, 예를 들어 NK 세포의 CD16를 표적화하는 Fab와 쌍을 이룰 수 있다. 예를 들어, 항-CD20/항-CD16 TetBiAb는 혈액 종양의 치료에 사용될 수도 있다.
- [0072] 또 다른 실시예에서, TetBiAb는 동일한 원하는 표적 세포의 보통의 선택성을 갖는 2개 항체 각각의 Fab들을 포함하여, 각 개별 항체에 비하여 원하는 표적에 대한 선택성을 매우 증가시키게 된다. 동일한 표적 세포의 제2 질병-특이적 항원과 결합하는 또 다른 Fab와 쌍을 이룬 질병-특이적 항원들 중 어느 하나와 결합하는 Fabs를 포함하는 TetBiAb의 예시적 실시예는, 예를 들어 항-Her2/항-Her3 및 항-EGFR/항-IGF-1R이다.
- [0073] 대안적으로, TetBiAb는 질병-특이적 항원 중 어느 하나, 및 정상 세포류에 의해 발현된 항원을 겨누게 된다. 일 실시예에서, TetBiAb는 항-EpCAM/항-CD47이다. 또 다른 실시예에서, TetBiAb는 정상 세포에 의해 발현된 2개의 다른 항원, 예를 들어 항-CD20/항-CD47 또는 항-CD20/항-CD52을 표적으로 한다. 또 다른 실시예에서, TetBiAbs는 Fabs를 포함하며, 여기서 하나 또는 두 개 Fabs 모두 세포 용해성 인자, 예를 들어 임의의 성장 인자, 예를 들어, EGF, HGF, VEGF, 및 CSF-1, 또는 사이토카인, 예를 들어, IL-6, IL-10, IL-12 및 TNF α와 결합한다.
- [0074] 본 발명의 또 다른 양상에서, 본 발명은 TetBiAb를 대상, 바람직하게는 인간에 투여하여 암, 염증성 질환, 자가면역질환 및 감염과 같은 질병을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0075] 본 발명의 4가 이중특이적 항체를 제조하고 대상에 투여하는 방법은 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있거나 용이하게 결정된다. 4가 이중특이적 항체의 투여 경로는, 경구, 비경구, 국부 또는 흡입에 의할 수 있다. 비경구 투여의 예로는 정맥(intravenous), 동맥(intraarterial), 복강내, 근육내, 피하, 직장(rectal) 또는 질(vaginal) 투여를 포함한다. 투여를 위한 바람직한 형태는, 예를 들어 주사용 용액, 특히 정맥 또는 동맥 주사 또는 드립(drip)이다. 통상, 주사용 적당한 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 담체의 예들은 염분(saline), 멸균수, 링거액, 완충식염수(buffered saline), 텍스트로스 용액, 말토텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 등을 포함한다. 선택적으로, 종래 첨가제들, 예를 들어 항산화제, 완충제, 정균제(bacteriostatic agent) 등이 상기 조성물에 추가될 수 있다.
- [0076] 환자 치료를 위한 4가 이중특이적 항체의 효과적인 복용량은 많은 다른 인자들에 따라 달라지며, 이들 다른 인

자들은 투여 경로, 환자의 건강 상태, 질병의 심각성, 환자의 체중, 연령 및 성별 등을 포함한다. 일반적으로, 단일 복용, 매일 복용, 주 복용, 격주 복용, 월 복용 등으로 투여될 수 있다. 복용량은 0.1 mg/kg 내지 100 mg/4가 이중특이적 항체 kg의 범위이다.

[0077] 예시적 실시예에서, TetBiAb 항-CD20/항-CD47의 효과적인 복용량으로 전형적으로 1 내지 10mg/kg가, 정맥으로 B 세포 질병, 예를 들어 비호지킨 림프종, 류마티스 관절염, 또는 전신 홍반 루프스(systemic lupus erythematosus)로 고통받는 환자들에 투여된다.

[0078] 또 다른 실시예에서, 1 내지 10mg/kg의 전형적 범위로 4가 이중특이적 항체 항-EGFR/항-CD16의 효과적인 함량이 결장 또는 폐암과 같은 EGFR을 과발현하는 고형 종양을 갖는 환자에게 정맥으로 투여된다.

[0079] 암 치료에 있어서, 4가 이중특이적 항체가 환자 내 종양성 세포의 성장을 제거, 감축 또는 제어하는 임의의 화학치료제 또는 식이요법과 병행 또는 함께 사용될 수 있다. 예시적 화학치료제는 알칼로이드(vinca alkaloid), 탁산(taxane), 항대사물질(antimetabolite), 니트로소우레아제, 토포아이스머라제 저해제, 아로마타제 저해제, P-글리코프로테인 저해제, 플래티늄 복합체 유도제, 호르몬 길항제, 세포독성 항생제 등을 포함한다. 4가 이중특이적 항체와 병행하여 사용되는 화학치료제의 함량은 대상, 질병의 종류 및 심각성에 따라 변화할 수 있으며, 당해 기술분야에서 알려진 바에 따라 투여될 수 있다. 예를 들어 Chabner *et al.*, *Antineoplastic Agents*, in Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics* 1233-1287 (Joel G. Hardman *et al.*, eds., 9th ed. 1996)을 참조한다.

[0080] 본 발명의 다른 장점 및 특징은 이하의 실시예, 도면, 및 청구범위로부터 명백해질 것이다.

[0081] **실시예**

[0082] 다음 실시예는 어떤 바람직한 실시예 및 본 발명의 양상을 설명하기 위한 것이고 그의 범위를 제한하려는 것은 아니다.

[0083] 달리 지정하지 않으면, IgG H 사슬의 아미노산 잔기의 번호 매김은 EU 인덱스의 것과 같다[Kabat *et al.*, *Sequences of 단백질s of Immunological Interest*, 5th Ed., Public Health Service, NIH, Bethesda, Md (1991)].

[0084] 표 1은 이하 설명된 서열을 제공한다. 분비된 분자들의 모든 폴리펩티드 서열들은 신호 서열없이 도시된다. 가변 도메인은 밑줄로 표시된다.

표 1

SEQ ID NO:	설명	서열
[0085] 1	항-EGFR Fab L 사슬	GACATCTGCTGACTCAGTCTCCAGTCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAGAGTCAGTTTCTCTGCAGGGCCAGTCA GAGTATTGGCACAAACATACACTGGTATCAGCAAAAGAACAAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGT CTATCTCTGGAATCCCTTCCAGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCT GAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAATAAATAACTGGCCAACCCAGTTCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAA AACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTGAATCTGGAAGTGGCTGTGTGTGTGCC TGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAA ACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG
2	항-EGFR Fab L 사슬	DILLTQSPVILSVSPGERVVSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVES EDIADYQCQNNWPTTFGAGTKLELKRITVAAPSVFIFPPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYERHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
3	항-EGFR Fab H 사슬	caggtgcagctgaagcagtcaggacctggcctagtcagcctcacagagcctgtccatcacctgcacagctctctggttt ctcattaactaactatggtgtacactgggttcgccagctctccaggaagggtctggagtggctgggagtgatggagtgt ggaaacacagactataatacacctttcacatccagactgagcatcaacaaggacaattccaagagccaagtttcttt aaaatgaacagctctgcaatctaatgacacagccatattactgtgccagagcctcacctactatgatacagagtgtgc ttactgggccaaggactctggtcactgtctctgcaGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCTCT CCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGCGCCCTGGGTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCCTGACGGTGTGCTGG AACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCTGCACACCTTCCCGCTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGT GGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGCCACCCAGACTACATCGCAACGTGAATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTGT
4	항-EGFR Fab H 사슬	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSICTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKLEWLVIVSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSVVFF KMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGGTLVTVSAASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKKVEPKSC
5	링커	ggaggaggtgggagc

6	링커	GGGGS
7	돌연변이된 힌지 영역	GAGCCCAAATCTTCT
8	돌연변이된 힌지 영역	EPKSS
9	힌지 영역	GAGCCCAAATCTTGT
10	힌지 영역 H*	EPKSC
11	H-CH2-CH3-L-VH(항-EGFR)-CH1-H* (L = G4S)	atgaagcttctgttaggctgttggtgctgatgttctggatccctgctagcttaagcgagcccaaatcttctgacaaaac tcacacatgccaccctgcccagcacctgaactcctggggggccctcagctcttctctteccccaaaacccaaggaca ccctcatgatctctagaaccctgaggtcacatcgctggtggtggactgagccacgaagaccctgaggtcaagtcaac tggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaagccgaggagagcagtaacaacagcagctaccgtgtggt cagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaagccctcccag ccccatcgagaaaacgatatccaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcacgggag gagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaggctctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagag caatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctcctcttctctatagcaagc tcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcggtgatgagctctgcacaaccactac acgcagaagagcgcaccgcgaccccggtgaggtggaggtgggagcCAGGTGACAGTGAAGCAGTCAGGACCTGGCCT AGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACCTGCACAGTCTCTGGTTTCTCATTAACTAACTATGGTGTACTCTGGTTC GCCAGTCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTGATATGGAGTGGTGGAAACACAGACTATAATACACCTTTCACA TCCAGACTGAGCATCAACAAGGACAATTCCAAGGCCAAGTTTTCTTTAAATGAACAGTCTGCAATCTAATGACACAGC CATATATTACTGTGCCAGAGCCCTCACCTACTATGATTACGAGTTTGCTTACTGGGGCCAAAGGACTCTGGTCACTGTCT CTGCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCAGAACCGGTGACGGTGTCTGGAATCAGGCGCCCTGACCAGCGGCTGCACAC CTTCCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGCTGCCCTCCAGCAGCTTGGGACCC AGACCTACATCTGCAACGTGAATCAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGTA
12	VL(항-EGFR)-CL	ATGGAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCTGCTTCCTTAAGCGACATCTTGCTGACTCAGTCTCC AGTCATCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGTTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTGGCACAAACATACT GGTATCAGCAAAGAACAAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGAATCCCTTCCAGG TTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCTGAAGATATTGCAGATTACTG TCAACAAAATAATAACTGGCCAACCCAGTTCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTG TCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAATGCCTCTGTTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCC AGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAG CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACACAAGTCTACGCCTGCG AAGTACCCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG
13	H-CH2-CH3-L-VH(항-EGFR)-CH1-H* (L = G4S)	EPKSSDKTHTCPPAPPVAGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKLSLSFGAGGGGSGVQL KQSGPGLVQPSQSLSTCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKLEWLGVISGGNTDYNPTFSTRLSINKDNSKQVFFKMNS LQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGGTLVTVSAASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKRVPEPKSC
14	VL(항-EGFR)-CL	DILLTQSPVILSVSPGERVFSFCRASQSIGTNIHWYQORTNGSPRLLIKYASEISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVES EDIADYQCQNNWPTTFGAGTKLELKRITVAAPSVIFIPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
15	H-CH2-CH3-L-VL(항-EGFR)-CL (L = G4S)	atgaagcttctgttaggctgttggtgctgatgttctggatccctgctagcttaagcgagcccaaatcttctgacaaaac tcacacatgccaccctgcccagcacctgaactcctggggggccctcagctcttctctteccccaaaacccaaggaca ccctcatgatctctagaaccctgaggtcacatcgctggtggtggactgagccacgaagaccctgaggtcaagtcaac tggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaagccgaggagagcagtaacaacagcagctaccgtgtggt cagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaagccctcccag ccccatcgagaaaacgatatccaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcacgggag gagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaggctctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagag caatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctcctcttctctatagcaagc tcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcggtgatgagctctgcacaaccactac acgcagaagagcgcaccgcgaccccggtgaggtggaggtgggagcGACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGTCACTCT GTCGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGTTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTGGCACAAACATACCTGGTATCAGC AAAGAACAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGAATCCCTTCCAGGTTAGTGGC AGTGGATCAGGGACAGATTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCTGAAGATATTGCAGATTACTGTCAACAAA TAATAACTGGCCAACCCAGTTCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTCATCT TCCCAGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAATGCCTCTGTTGTGCTGCTGGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCC AAAGTACAGTGAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG CACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACACAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACC ATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG

16	VH(항-EGFR)-CH1-H*	ATGGAGTTGCCTGTTAGGCTGTGGTGTGATGTTCTGGATTCTGCTTCCAGCAGCagagtgacagctgaagcagtcaggacctggcctagtgacgacctcacagagcctgtccatcacctgcacagctctctgggttctcattaactaactatgggtgacactgggttcgccagctctccagaaagggtctggagtggctgggagtgatggagtggggaacacagactataatacctttcacatccagactgagcatcaacaaggacaattccaagagccaagtttctttaaataagaacagctctgcaatctaatgacacagccatataactgtgccagagccctcacctactatgattacagagtttgcttactggggccaagggactctggctactgtctctgcaGCTAGCACAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCTCTCCAAGAGCACCTTGGGGGACAGCGCCCTGGGCTGCTGCTCAAGGACTACTTCCCAGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCTGACCAGCGCGTGACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCTCCAGCAGCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAACGCCAGCAACCAAGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAATCTTGTTAG
17	H-CH2-CH3-L-VL(항-EGFR)-CL(L = G4S)	EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGAGGGGSDILLTQSPVILSVSPGERVFSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASEISGIPSRFSGSGGTDFTLSINSVESEDIADYYCQNNWPTTFGAGTKLELKRITVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
18	VH(항-EGFR)-CH1-H*	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSTCTVSGFSLTNYGVHWVRSQSPGKLEWLVISWGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSOVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWQGITLVTVSAASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC
19	H-CH2-CH3-L-VL(항-EGFR)-CL(L = (G4S)4)	atgaagcttctgttaggctgttggtgctgatgttctggatccctgctagcttaagcgagcccaaatcttctgacaaaactcacacatgccaccctgccagcactgaactcctgggggggacctcagcttctcttcccccaaaaccaaggacacctcatgatctctagaaccctgaggtcacatcgctggtggtgagcagcaagaccctgaggtcaagtctcaactggtagcggcagcagctggaggtgcataatgccaagacaagccgaggaggagcagcaaacacagcagctcaagctggtcagcgtcctcacctcctgaccagagctggctgaatggcaaggagtacaagtgcaagctctccaacaagccctcccagccccatcgagaaaacgatatccaagccaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcacgggagagagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtaagagcttctatcccagcagatcgccgtggagtgggagagaatggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccagcagctccttctctctatagcaagctcacctggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgtagctgactgcaacaaccactacacgagaagagcgcaccgcgacccgggtgcaggcggcggagggaagcggaggaggtggcagcgggtggcgggtggctcggcggaggtggctcgggaGACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGTATCCTGCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAAGTTCTCTGACAGGGCCAGTCAAGTATTGGCACAAACATACACTGGTATCAGCAAAGAAATAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTTGAATCCCTTCCAGGTTTGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCTGAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAATAATAACTGGCCAACCAAGTTCGGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAATGCTCTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGACAAAGCAGACTACGAGAACAACAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG
20	H-CH2-CH3-L-VL(항-EGFR)-CL(L = (G4S)4)	EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGAGGGGSGGGSGGGGGSGGGSDILLTQSPVILSVSPGERVFSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASEISGIPSRFSGSGGTDFTLSINSVESEDIADYYCQNNWPTTFGAGTKLELKRITVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
21	항-CD20 Fab L 사슬	CAAATTGTTCTCCCAGTCTCCAGCAATCTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTACAATGCAAGGCGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATCCACTGGTTCACAGAGAAGCCAGGTTCTCCCCCAACCTGGATTATGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTCTGCTTCAAGTGGCAGTGGGCTGGGACTTCTTACTCTCTACCATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAATGCTGCCACTTACTGCCAGCAGTGGACTAGTAACCCACCCAGCTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATCAAACGTGGCTGCACCATCTGTCTTATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAATGCTCTGTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCAAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGAGACTACGAGAACAACAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG
22	항-CD20 Fab L 사슬	QIVLSQSPAILSASPGKEVTMTCRASSVSYSIHWVQKPGSSPKPIYATSNLASGVPVRFSGSGSSTYSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
23	항-CD20 Fab H 사슬	caggtacaactgcaacagcctggggctgagctggtgaagcctggggcctcagtgaaatgtcctgcaagccttctggctacacatctaccagttacaatatacactgggtaaaacagacacctggtcggggcctggaatggaatggagctatttatcccgaagtggatgacttctacaatcagaagtcaaaaggcaaggccacatgactgctgacaactcctcagcacagcctacatgagcctcagcagcctgacatctgaggactctgggtctattactgtgcaagatcgacttactacggcggctggtacttcaatgtctggggcgcagggaccaggtcacctctccgcaGCTAGCACAAGGGCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTTGGGGGACAGCGCCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCGTGAAGTCAAGGCGCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCTCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAACGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCAAATCT
24	항-CD20 Fab H 사슬	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYFTSYNHHWKQTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDAVYYCARSTYYGGDYFNWVWAGTIVTVSAASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC

25	H-CH2-CH3-L-V H(항-CD20)-CH1- H* (L = G4S)	atgaagcttctctgttaggctgttggtgctgatgttctggatccctgctagcttaagcgagcccaaatcttctgacaaaac tcacacatgcccaccgtgccagcactgaactcctggggggccctcagctcttctcttcccccaaaaccaaggaca ccctcatgatctctagaacctgaggtcacatgcgtggtggtagctgagccacgaagacctgaggtcaagtcaac tggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaagccgcgggaggagcagtaacaacagcagctaccgtgtggt cagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctcccag ccccatcgagaaaacgatatccaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcacgggag gagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaggttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagag caatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactcgcagcggctccttcttctctatagcaagc tcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaactcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactac acgcagaagagcgcaccgcgaccccgggtgcaggtggaggtgggagccaggtacaactgcaacagcctggggctgagct ggtgaagcctggggcctcagtgaaatgtcctgcaagcttctggctacacatttaccagttacaatagcactgggtaa aacagacacctggtcggggcctggaatggattggagctattatcccggaatggtgatacttctacaatcagaagttc aaaggcaaggccacattgactgctgacaaatcctccagcacagcctacatgcagctcagcagcctgacatctgaggactc tgcggtctattactgtgcaagatcgacttactacggcggtagctggtacttcaatgtctggggccagggaccacggctca ccgtctccgcaGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCTCCTCAAGAGCACCTTGGGGGCACAGCG GCCCTGGGCTGCCTGCTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGCGCCCTGACCAGCGCGT GCACACCTTCCCGCTGTCTACAGTCTCAGGACTACTTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCTCCAGCAGCTTG GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGT TGA
26	VL(항-CD20)-CL	ATGGAGTTGCCTGTTAGGCTGTGGTGTGATGTTCTGGATTCTGCTTCCTTAAGCCAAATGTTCTCTCCAGTCTCC AGCAATCCTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACAATGACTTGCAGGGCCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATCCACTGGT TCCAGCAGAAGCCAGGTTCTCTCCCAAAACCTGGATTTATGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTCCGCTC AGTGGCAGTGGGTCTGGGACTTCTTACTTCTCACCATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATGTGCCACTTATTAAGTCCA GCAGTGGACTAGTAAACCACCCACGTTCCGAGGGGGACCAAGCTGGAATCAAAAATGTGGCTGCACCATCTGTCTTCA TCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGTAATAACTTCTATCCAGAGAG GCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGCACAGAGCAGGACAGCAAGGA CAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAGTCTACGCTGCGAAGTCA CCCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
27	H-CH2-CH3-L-V H(항-CD20)-CH1- H* (L = G4S)	EPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGAGGGGSGVQ LQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYFTSYNMHWVKQTPGRLGLEWIGAIYIPGNGDTSYINQKFKGKATLTADKSSSTAYMQL SSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNWVWAGTITVTVSAASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEVPEKSC
28	VL(항-CD20)-CL	QIVLSQSPAILSASPGKEVTMTCRASSVSYIHWFOQKPGSSPKPW IYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAE DAATYYCQQTWSNPPTFGGGTKLEIKRGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREARVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
29	H-CH2-CH3-L-V H(항-CD20)-CH1- H* (L = (G4S)4)	atgaagcttctctgttaggctgttggtgctgatgttctggatccctgctagcttaagcgagcccaaatcttctgacaaaac tcacacatgcccaccgtgccagcactgaactcctggggggccctcagctcttctcttcccccaaaaccaaggaca ccctcatgatctctagaacctgaggtcacatgcgtggtggtagctgagccacgaagacctgaggtcaagtcaac tggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaagccgcgggaggagcagtaacaacagcagctaccgtgtggt cagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctcccag ccccatcgagaaaacgatatccaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcacgggag gagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaggttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagag caatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactcgcagcggctccttcttctctatagcaagc tcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaactcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactac acgcagaagagcgcaccgcgaccccgggtgcagggcggcggggaagcggaggaggtggcagcgggtggcgggtggctccgg cggaggtggctccggacaggtacaactgcaacagcctggggctgagctggtgaagcctggggcctcagtgaaatgtcct gcaaggttctggctacacatttaccagttacaatagcactgggtaaaacagacacctggtcggggcctggaatggatt ggagctattatcccggaatggtgatacttctacaatcagaagttcaaaaggcaaggccacattgactgctgacaaatc ctccagcacagcctacatgcagctcagcagcctgacatctgaggactctgcggtctattactgtgcaagatcgacttact acggcggtagctggtacttcaatgtctggggcgcaggaccacggctcaccgtctccgcaGCCTCCACCAAGGGCCCATCG GTCTTCCCCTGGCACCCCTCCTCAAGAGCACCTTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC CGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCCTGCTTACAGTCTCAG GACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTGTGA
30	H-CH2-CH3-L-V H(항-CD20)-CH1- H* (L = (G4S)4)	EPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGAGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGVQLQPGAELVKPGASVKMSCKASGYFTSYNMHWVKQTPGRLGLEWIGAIYIPGNGDTSYINQKFKGK ATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNWVWAGTITVTVSAASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEVPEKSC

<p>31</p> <p>H-CH2-CH3-L-V L(항-CD20)-CL (L = G4S)</p>	<p>atgaagcttctgttaggctgttggtgctgatgttctggatccctgctagcttaagcgagcccaaatcttctgacaaaac tcaacatgcccaccgtgccagcactgaactcctggggggccctcagcttctcttcccccaaaaccaaggaca ccctcatgatctctagaacctgaggtcacatgcgtggtggtggactgagccacgaagacctgaggtcaagtcaac tggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaagccgcgggaggagcagtaacaacagcagctaccgtgtggt cagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaagccctccag ccccatcgagaaaacgatatccaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcacgggag gagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaagcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagag caatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctatagcaagc taccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaactcttctcatgctccgtgatgcatgagctctgcacaaccctac acgcagaagagcgcaccgcgaccccggtgcaggtggaggtgggagcCAAATTGTTCTCTCCAGTCTCCAGCAATCCT GTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGTCAACAATGACTGCAGGGCCAGCTCAAGTGAAGTTACATCCACTGGTTCAGCAGA AGCCAGGTTCTCCCAAAACCTGGATTATGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTTCAGTGGCAGT GGTCTGGGACTTCTTACTCTCTCACCATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATGTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAC TAGTAACCCACCCAGCTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAATCAAACGAAGTGTGGCTGACCATCTGTCTTATCTTCC CGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAATGCCTCTGTGTGTGCTGCTGTAATACTCTATCCAGAGGGCCAAA GTACAGTGAAGGTGATAACGCCCTCCAATCGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC CTACAGCTCAGCAGCACCTGACGTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTACCCATC AGGGCTGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG</p>
<p>32</p> <p>VH(항-CD20)-CH1- H*</p>	<p>ATGGAGTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCTGCTTCCAGCAGCCAGGTACAACGCAACAGCCTGG GGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTCAGTGAAGATGCTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACAGTTACAATATGC ACTGGGTAAAACAGACACTGGTTCGGGGCTGGAATGGATTGGAGCTATTATCCCGGAAATGGTGATCTCTACAAT CAGAAGTCAAAGGCAAGGCCACATTGACTGCTGACAAAATCTCCAGCAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCTGACATC TGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCGACTTACTACGGCGGTGACTGGTACTTCAATGCTGGGGCGCAGGGA CCACGGTCACCGTCTCCAGCTAGCACAAGGGCCATCGGTCTTCCCTCCAGCAGCTTCCAGAGCAGCTTGGG GGCACAGCGCCCTGGCTGCTGCAAGGACTACTCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAAGTCAAGCGCCCTGAC CAGCGCGTGCACACCTTCCCGGTGCTCCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCTGGTACCGCTGCCCTCCA GCAGCTTGGCACCCAGACTACATCTGCGCGTGATCAGCAGCGCGCAGCTCCATCACTACAAGAAAGTTAGCCCC AAATCTTGTTAA</p>
<p>33</p> <p>H-CH2-CH3-L-V L(항-CD20)-CL (L = G4S)</p>	<p>EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFVMSHEALHNHYTQKLSLSLPGAGGGGSGQIVL SQSPAILSASPGEKVTMTCRASSVSYIHWFOQKPGSSPKPWYIATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVAEDAAT YYCQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKSTYSLSSLTTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
<p>34</p> <p>VH(항-CD20)-CH1- H*</p>	<p>QVQLQOPGAEELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGDDWYFNWVAGTIVTVSAASTKGPSVFLPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSC</p>
<p>35</p> <p>H-CH2-CH3-L-V L(항-CD20)-CL (L = (G4S)4)</p>	<p>atgaagcttctgttaggctgttggtgctgatgttctggatccctgctagcttaagcgagcccaaatcttctgacaaaac tcaacatgcccaccgtgccagcactgaactcctggggggccctcagcttctcttcccccaaaaccaaggaca ccctcatgatctctagaacctgaggtcacatgcgtggtggtggactgagccacgaagacctgaggtcaagtcaac tggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaagccgcgggaggagcagtaacaacagcagctaccgtgtggt cagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaagccctccag ccccatcgagaaaacgatatccaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcacgggag gagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaagcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagag caatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctatagcaagc taccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaactcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccctac acgcagaagagcgcaccgcgaccccggtgcagggcgggaggaagcggaggaggtggcagcgggtggcgggtggctcggg cggaggtggctcgggaCAAATTGTTCTCTCCAGTCTCCAGCAATCTGCTGCTGCTCCTCCAGGGGAGAAGGTCACAATGA CTTGACGGCCAGCTCAAGTGAAGTTACATCCACTGGTTCAGCAGAAGCCAGGTTCTCCCAAAACCTGGATTTAT GCCACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTCCGCTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACTTCTACTCTCTCACCATCAG CAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGACTAGTAACCCACCCAGTTCGGAGGGGGACCA AGCTGGAATCAAACGAAGTGTGGTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGT GCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC GGGTAATCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCA AAGCAGACTACGAGAAACAAAAGTCTACGCCGCGAAGTCAACCATCAGGGCTGAGCTCGCCCTCACAAGAGCTTC AACAGGGGAGAGTGTAG</p>
<p>36</p> <p>H-CH2-CH3-L-V L(항-CD20)-CL (L = (G4S)4)</p>	<p>EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFVMSHEALHNHYTQKLSLSLPGAGGGGSGGGG SGGGSGGGGSGQIVLSQSPA ILSASPGEKVTMTCRASSVSYIHWFOQKPGSSPKPWYIATSNLASGVPVRFSGSGSGT SYSLTI SRVAEDAATYYCQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>

37	항-CD16 Fab L 사슬	gacattgtgctgaccaatctccagcttcttggctgtgtctctagggcagaggccaccatctcctgcaaggccagcca aagtgttgattttgatggatgattttatgaactggtaaccaagaaaccaggacagccccaactcctcatctata ctacatcaatctagaatctggcatcccagccaggtttagtccagtggtctgggacagacttaccctcaacatccat cctgtggaggaggagatactgcaacctattactgtcagcaaatatgaggaccctacacgttccggagggggacc gctggagctgaaaACTGTGGCTGCACCATCTGCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCTCTGTGTGTGCTGTGAATAAATTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAAC GCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAG CAGCACCTGACCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGC CTGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACA GGGAGAG
38	항-CD16 Fab L 사슬	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDFDGSFMNHWYQQKPGQPPKLLIYTTSNLESGIPARFSA SGSGTDFTLNIHPVEEDTATYYCQSNEDPYTFGGGKLELKRITVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
39	항-CD16 Fab H 사슬	CAGGTACAACCTGCAACAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTG CAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTAAACAGACACCTGGTCGGG CCTGGAATGGATTGGAGCTATTATCCCGGAAATGGTGATACTTCTACAATCAGAAGTTCAAAGG CAAGGCCACATTGACTGCTGACAAATCTCCAGCACAGCCTATGCAGCTCAGCAGCCTGACATG CAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCAGCTACTACG GCGGTGACTCTTCAATGTCTGGGGCGCAGGACCAGGTCACCGTCTCCGAGCTAGCACCAAGG GCCCATCGGTCTTCCCGCTGGCACCTCTCCAAGAGCACCTTGGGGCACAGCGCCCTGGGCTG CCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTGCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAG CGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAC CGTGCCTCCAGCAGCTTGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAAGCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTGT
40	항-CD16 Fab H 사슬	QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGSLRTSMGMVGIWIRQPSGKLEWLAIHWDDDKRYNPAL KSRLTISKDTSNQVFLKIASVDTADTATYYCAQINPAWFAYWQGLVTVSAASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVVVTP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSC
41	VH(항-EGFR)-CH1-H-CH2-CH3-L-VL(항-CD16)-CL(L = G4S)	atggagtgcctgttaggctgttggctgtgatgtctggattcctgctagctccagccaggtgcagctgaagcagtcagg acctggcctagtgcagccctcacagaccctgtccatcacctgcacagctctctggtttctcattaactaactatggtgtac actgggttccgcagctctccagaaaagggtctggagtggctgggagtgatatggagtggggaaacacagactataataca cctttcacatccagactgagcatcaacaaggacaattccaagagccaagtttctttaaactgaacagctctgcaatctaa tgacacagccatataactgtgccagagccctcacctactatgattacagagtttgcttactggggcaaggagactctgg tcaactgtctctgcagcctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcactctgggggca cagccctgggctgctgctgctcaaggactacttccccgaaccggtagcgtgtcgtggaactcaggccctgaccagcgg cgtgcacaccttcccgctgctctacagctcctcaggactctactccctcagcagcgtggtagcctgacctcagcagct tgggcacccagacctacatctgcaactggaatcacaagccagcaacaccaaggtggacaagagagttagcccaaatct tgtgacaaaactcacatgcccaccgtgcccagcactccagtggccggaccctcagcttctctctcccccaaac caaggacacctcatgatctccggaccctgaggtcacatcgctgggtggagcgtgagccacgaagacctgaggtca agttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcatatgccaagacaagccgaggaggagcagtaacaacagcagctac cgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccagcagctggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggctcacaacaagc cctccatccagcatcgagaaaacctctccaagccaaaggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccat cagggaggagatgaccaagaaccaggtcagctgacctgctgggtcaaaggcttctatccagcagactcgcctggag tgggagagcaatgggcagccgggaacaactacaagaccagcctccgtgctggactcagcagcctctctctctca tagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaactctctcatgctccgtgatgaggtctgcaca accatcacacagaagacctctcctgtccccgggtgcaggtggaggtgggagcagacttctgctgacccaatctcca gcttcttggctgtgtcttagggcagagggccaccatctcctgcaaggccagccaaagtgtgattttgatggtgatag ttttatgaactggtaccaacagaaaccaggacagccaccaactcctcatctatactacatccaatctagaactctggca tccagccaggtttagtgccagtggtctgggacagacttaccctcaacatccatcctgtggaggaggagactgca acctatfactgtcagcaagtaatgaggaccctacagcttccggaggggggaccaagctggagctgaaacgaactgtggc tgaccatctgtctctctcccccatctgatgagcagttgaaatctggactgctctgttgtgtgctgctgata acttctatccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgcctccaatcgggttaactccagagagagtg cagcagcagcaagcagcagcactacagcctcagcagcaccctgacgtgagcaaaagcagactacgagaacacaag ctacgcctgcgaagtcaacctcaggcctgagctgcacctcacaagagctcaacaggggagaggtgtga
42	VH(항-CD16)-CH1-H*	ATGAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGTGATGTTCTGGATTCTGCTCCAGCAGCCAGGTAACAACCTG CAACAGCCTGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATGCTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACAT TTACCAGTTACAATATGCACTGGTAAAACAGACACTGGTCGGGGCCTGGAATGGATTGGAGCTATTTAT CCCGGAAATGGTGATACTTCTACAATCAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACATTGACTGCTGACAAATCCT CCAGCACAGCCTACATGCAAGCTCAGCAGCCTGACATCAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAT CGACTTACTACGGCGGTGACTGGTACTTCAATGTCTGGGGCGCAGGGA CCACGGTACCGTCTCCCGAGCTAGCACCAAGGCCATCGGTCTTCCCGTGGCACCTCCTCCAAGAGCA CCTCTGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTG GAACTCAGGCGCCCTGACAGCGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTC AGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCA AACTCTGTTAG
43	VH(항-EGFR)-CH1-H-CH2-CH3-L-VL(항-CD16)-CL(L = G4S)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHVVWQSPGKLEWLVGIWSSGNTDYNTPFTSRLS INKDNSKQVFFKMNLSQNDTAIYYCARALTYDYEFAYWQGLVTVSAASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVVVTPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKRVFEPKSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEVESNGQPENNYKTTPPVLDSG SFLLYSKLVTDKSRWQQGNVFSVMEALHNHYTQKSLSPGAGGGSDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQ SVDFDGSFMNHWYQQKPGQPPKLLIYTTSNLESGIPARFSA SGSGTDFTLNIHPVEEDTATYYCQSNEDPYTFGGGKLELKRITVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

44	VH(항-CD16)-CH1-H*	QVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLRTSGMGVGIWIRQPSGKLEWLAIHWDDDKRYNPALKSRLTISKDTSSNQVFLKIASVDTADTATYYCAQINPAWFAYWQGGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKRVEPKSC
45	VH(항-CD16)-CH1-H-CH2-CH3-L-VL(항-EGFR)-CL(L = G4S)	atggagtgcctgttagctgttggctgatgtctggattctgctagctccageCAGGTACAACAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATGCTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATATGCCTGGTAAAACAGACACCTGGTCCGGCCCTGGAATGGATTGGAGCTATTTATCCCGGAAATGGTGATACTTCTACAATCAGAAGTCAAAGGCAAGGCCACATTGACTGCTGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCGACTTACTACGGCGGTGACTGGTACTTCAATGTCTGGGGCGCAGGGAACACGGTCACCGTCTCCGCAgctccaacaagggeccatcggtcttccccggcaccctctccaagagcaccctctggggcacagcggcctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcagcgcctgacagcggcgtgcacaccttccccggtgctctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccaagcgttgggaccagacctacatctgcaactggaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttagcccgaatcttgacaaaactcacacatgccaccgtgccaccacctccagtgccggaccgtcagctctctcttccccaaaaccaaggacacctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgctggtggtggactgagccacgaagacctgaggtcaagtcaactggtcagtgagcggcgtggaggtgcaatgccaagcaaaagccggggaggagcagtaacaagcagctaccgtggtgagcagctcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtccaaggtccaacaaagccctcccatccagcatcgagaaaacctctccaaagccaaggcagccccgagaaccacaggtgacacctgccccatcacgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaagctctctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggagccggagaacaactacaagaccacgctcccgtgctggactccagcgctctctctctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaactctctcatgctcctgtagatgagctcagccttgcacaaccctacacacagaagagcctctcctgtccccgggtgaggtggagtgaggcGACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGTCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGTTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTGGCACAAACATACACTGTTATCAGCAAAGAACAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTTGGAATCCCTTCCAGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCTGAAGATATTGAGATTATTACTGTCAACAAAATAAATAACTGGCAACCACGTTTCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAcgaactgtggctgaccatctgtcttcatcttcccgcctctgatgagcagtgaaatctggaactgcctctgtgtgctgctgcaatctctatcccagagggccaagtagtaccagtggaaggtgagataacgcctccaatcgggtaaccccagagaggtgtcacagagcagacagcaaggacagcaccacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaaagcagactacgagaaaacacaagctctacgcctgcaaggtcaccatcagggcctgagctcgccctcacaagagcttcaacaggggagagtggtga
46	VL(항-CD16)-CL	ATGGAGTTCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCTGCTTCCTTAAGCgacatctgtgctgacccaatctccagctctcttggctgtgtctctagggcagagggccaccatctcctgcaaggccagccaaggtgtgatctttagtggatgagatgattttagaactggtaccacagaaaccaggacagccaccaactcctcatctatactacatccaatctagaactcggcctcccagccaggttagtgccagtggtctgggacagacttaccctcaacatccatctctggaggaggagatactgcaacctatactgtcagcaagtaaatgaggaccgtacacgttccggaggggggaccaagctggagctgaaaCGAACTGTGGCTGCACCATCTGCTTTCATCTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGTGTAATACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG
47	VH(항-CD16)-CH1-H-CH2-CH3-L-VL(항-EGFR)-CL(L = G4S)	QVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLRTSGMGVGIWIRQPSGKLEWLAIHWDDDKRYNPALKSRLTISKDTSSNQVFLKIASVDTADTATYYCAQINPAWFAYWQGGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDITLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCVMHEALHNYHQSLSLSPGAGGGSDILLTQSPYILSVSPGERVFSFCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSDFTLINSVESEDIADYYCQNNNWPPTFGAGTKLELKRVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLISKADYEYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
48	VL(항-CD16)-CL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDFDGSFMNYYQKPGQPKLLIYTTSNLESGIPARFASASGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYCQSNEDPYTFGGGKLELKRITVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLISKADYEYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

<p>49</p> <p>VH(항-CD20)-CH1-H-CH2-CH3-L-V L(항-CD16)-CL(L = G4S)</p>	<p>atggagttgcctgttaggctgttggctgatgtcttggattcctgctagctccagccaggatcaactgcaacagcctgggctgagctggtagagcctggggcctcagtggaagatgctcctgcaagccttctggctacacattaccagttacaatatgactgggtaaaacagacacctggtcggggcctggaatggatggagctatctccggaaatggtgatacttctacaatcagaagttcaaaaggcaaggccacatfgactgctgacaaatcctccagccagcagctacaagcagctcagcagctgacatctgaggactctgaggctcttactgtgcaagatcgacttactacggcggtagctggtacttcaatgtctggggcgcagggaacacggctcaccgtctccgagcctccaccaagggeccatcggctctccccggcaccctctccaagagcactctggggcagcagcggcctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtagcgggtgctgctggaactcaggcggcctgacagcggcgtgcacaccttcccggctgctctacagctcctcaggactctactcctcagcagcgtggtgaccgtgccctgacagcttgggaccagacacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaagttgagcccacatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctggggggacgtcagctctctcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggaccctgaggtcacatcgctggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaagccgaggaggagcagtaaacagcagctaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaagccctccagccccatcgagaaaacctctccaaagccaagggcagcccagagaccacaggtgacacctgcccccatcaggggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaggcttctatcccagcgcacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagacaacctacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctcttcttctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacctcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcaacaaccactacagcagaagagcctctccctgtccccgggtgcaggtggaggtgggagcatgtgctgacccaa</p> <p>tctccagcttcttggctgtgctcttagggcagagggccaccatctcctgcaagggcagccaaagttgat</p> <p>ttagtgatggtagatgttttagaactggtaccaacagaaccaggacagccccaactcctcatctatactacaactcaatctagaactctgggatcccagccaggtttagtgccagtggtctgggacagacttaccctcaacatccatcctgtggaggaggaggtactgcaacctatctgtcagcaagtaatgaggatccgtacacgttcggaggggggaccaagctggagctgaaacgtggaactgtggctgcaccatctgtctcatcttcccgcatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgccgtgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtactcccagagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcactacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaacgagactacgagaaacaaaagtctacgctgcgaagtcaccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagaagcttcaacaggggagagtg</p>
<p>50</p> <p>VH(항-CD16)-CH1</p>	<p>ATGGAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGTGATGTTCTGGATTCTGCTTCCAGCAGCCAGGTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTCAGCCCTCCAGACCCCTCAGTCTGACTTGTCTTCTCTGGGTTTTACTGAGGACTTCTGGTATGGTGTAGGCTGGATTTCGTCAGCCTTCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGTGGCACACATTTGGTGGGATGATGACAAGCCGATATCCAGCCCTGAAAGCCGACTGACAATCTCCAGGATACCTCCAGCAACCAGGTATCTCCAAATCCGACTGTGGA</p> <p>CACTGCAGATACTGCCACATACTACTGTGCTCAAATAAACCCCGCTGGTTTACTGGGGCCAAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCGGCTAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGCGGCCCTGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGCGCCCTGACCAGCGCGGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTTAG</p>
<p>51</p> <p>VH(항-CD20)-CH1-H-CH2-CH3-L-V L(항-CD16)-CL(L = G4S)</p>	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPRGLIEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPVSSSLGTQTYICNVNHPKSNKTKVDDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG</p> <p>GPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDFGLYSKLVDRSRWQGNVSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGAGGGGIVLTQSPASLAVSLQRATISCKASQSVDFDGDSEFMNYYQKPPGQPKLLIYTTSNLESGIPARFASGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYCQSNEDPYTFGGG</p> <p>TKLELKRGTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
<p>52</p> <p>VH(항-CD16)-CH1</p>	<p>QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFLRSTSGMVGWIRQPSGKLEWLAIHWDDDKRYNPALKSRLTISKDTSSNOVFLKIASVDTADTATYYCAQINPAWFAYWGGGLVTVSAASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPVSSSLGTQTYICNVNHPKSNKTKVDDK</p>
<p>53</p> <p>항-CD47 Fab L 사슬</p>	<p>gatattgtgatgactcagctctccagccacctgtctgtgactccaggagatagagtctctcttctcctgcagggccagcca</p> <p>gactattagcgaacttactggtatcacaaaaaatcacatgagctccaaggtctctcaaatgtcttccaatccat</p> <p>cttctggaaatccccccaggtcagtgccagtggtcaggtcagatctcagctatcaacagtggtggaacct</p> <p>gaagatgtggagtgatctactgtcaaaatggtcacgcttctcctcggagcttcggtggagggaccaagctggaaat</p> <p>aaaacgtggaactgtggctgcaccatctgtctcatcttcccgcctctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgt</p> <p>gtgctcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggt</p> <p>aactccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcactacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaacgagact</p> <p>acgagaaacaaaagtctacgctgcgaagtcaccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagaagcttcaacaggggagag</p>
<p>54</p> <p>항-CD47 Fab L 사슬</p>	<p>DIVMTQSPATLSVTPGDRVLSRASQTI SDYLHWYQKSHESPRLLIKFASQISIGIPSRFSGSGSDFTLINSVVEPEDVGVYYCQNGHGFPRTFGGGKLEIKRGTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS</p> <p>QESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
<p>55</p> <p>항-CD47 Fab H 사슬</p>	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGACGCTCTGGATT</p> <p>CACITTCAGTGGCTATGGCATGCTTGGGTTCCGACAGCTCCAGACAAGAGGCTGGAGTGGTTCGCAACCATTAAGTGTG</p> <p>GTGGTACTTACACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACCCTGTACT</p> <p>CTGCAAATAGACAGTCTGAAGTCTGAGGATACAGCCATATATTTCTGTGCAAGATCCCTCGCGGAAATGCTATGGACTA</p> <p>CTGGGGTCAAGGGACCAGCGTACCCTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGCTTCCCCCTGGCACCCCTCCCA</p> <p>AGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCAACCGGTGACGGTGTCTGTGAAC</p> <p>TCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGCTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGTG</p> <p>GACCGTCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGCCTACATCTGCAACGTGAATCACAGCCAGCAACACCAAGGTGGACA</p> <p>AGAAAGTTGAGCCCAATCT</p>

<p>65</p> <p>VH(항-CD20)-CH1-H-CH2-CH3-L-VL(항-CD52)-CL(L = G4S)</p>	<p>atggagttgcctgttaggctgttggigtgatgttctggattcctgctagctccagccaggtacaactgcaacagcctgg <u>ggctgagctggtgaagcctggggcctcagtgaagatgtcctgcaaggcttctggctacacatttaccagttacaatagc</u> <u>actgggtaaaacagacacctggtcggggcctggaatggatggagctatttatccggaaatggtgatacttctacaat</u> <u>cagaagttaaaggcaaggccacattgactgctgacaaatcctccagcacagcctacatgcagctcagcagcctgacatc</u> <u>tgaggactctcgggtctattactgtgcaagatcgacttactacggcggtagctggtacttcaatgtctggggcgaggga</u> <u>ccacggtcaccgtctccgcagcctccaccaagggeccatcggcttccccctggcaccctctccaagagcacctctggg</u> <u>ggcacagcggcctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgcctgac</u> <u>cagcggcgtgcacacctcccggctgctctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctcca</u> <u>gcagcttgggcaccagacctacatctgcaactggaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaagttagccc</u> <u>aaatcttgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaaactctggggggaccgtcagctcttctctccc</u> <u>cccaaaaccaaggacacctcatgatctccggaccctgaggtcacatcgctggtggtggacgtgagccacgaagacc</u> <u>ctgaggtcaagttaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaagccgaggaggagcagtaaac</u> <u>agcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctc</u> <u>caacaaagcctccagcccccacgagaaaacctctccaaagcaaaaggcagcccagagaccacaggtgtacacc</u> <u>tgccccatcacgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggctctatcccagcgacatc</u> <u>gccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctctt</u> <u>cttctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggaaactcttctcatgctccgtgatgcatgagg</u> <u>ctctgcacaaccactacagcgagaagagcctctccctgtccccgggtcgaggtggaggtgggagcgacatccagatgacc</u> <u>cagagcccaagcagcctgagcggcagcgtgggtgacagagtaccatcacctgtaaagcaagtgagaatattgacaatat</u> <u>cttaaaactggtaccagcagaagcaggtgaggctcctcaaaagctgctgatctacaatacaacaatttgaaacgggtgtgc</u> <u>caagcagattcagcggtagcggtagcggtagcggtagcggtagcggtagcggtagcggtagcggtagcggtagcggtagc</u> <u>tactactgcttgcagcatataagtaggcccgcacgttccgccaagggaaccaggtggaatcaaacgtggaactgtggc</u> <u>tgcacctctgtcttcatctcccggcctctgatgagcagtgaaatctggaactgcctctgttgtgtcctctgtaata</u> <u>acttctatcccagagggccaagtacagtggaaggtggaataacgcctccaatcgggtaacccagagagctgacaca</u> <u>gagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagaccctgacgctgagcaagcagactacgagaagaacaagt</u> <u>ctacgcctgcgaagtcaacctcaggcctgagctcgcccgtcacaagagcttcaacaggggagaggtgtga</u></p>
<p>66</p> <p>VH(항-CD52)-CH1-H*</p>	<p>ATGGAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGTGATGTTCTGGATTCTCGCTTCCAGCAGCCAGGTACAACAGCCTGG <u>GGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATATGC</u> <u>ACTGGGTAAAACAGACACCTGGTCGGGGCCTGGAATGGATTGGAGCTATTTATCCCGGAAATGGTGATACTTCTTACAAT</u> <u>CAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACATTGACTGTGACAAAATCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATC</u> <u>TGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCGACTTACTACGGCGGTGACTGGTACTTCAATGTCTGGGGCGCAGGGA</u> <u>CCACGGTACCCTCTCCGCAGCTAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG</u> <u>GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCCCTGAC</u> <u>CAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCTGGTGACCGTGCCTCCCA</u> <u>GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCCTGTATCAGCAGCGGCGGACGCTCCATCAACTACAAGAAAGTTGAGCCC</u> <u>AAATCTTGTTAA</u></p>
<p>67</p> <p>VH(항-CD20)-CH1-H-CH2-CH3-L-VL(항-CD52)-CL(L = G4S)</p>	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAY <u>MLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV</u> <u>SWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEVPSKCDKTHTCPPCPAPPELLG</u> <u>GPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG</u> <u>KEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP</u> <u>VLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSMHEALHNHYTQKLSLSLSPGAGGGSDIQMTQSPSSLASVSGDRVTITCK</u> <u>ASQNIKRYLNWYQQKPKAPKLLIYNTNLTGTGVPSTRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCLOHISRPRTFGQGTKV</u> <u>EIKGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTL SKA</u> <u>DYKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC</u></p>
<p>68</p> <p>VH(항-CD52)-CH1-H*</p>	<p>QVQLQESGPGLVSRPSQTLSTCTVSGFTTDFYMNWVRQPPGRGLEWIGFIRDKAKGYTTEYNPSVKGRVTMLVDTSKNO <u>FSLRLSSVTAADTAIVYICAREGHTAAPPDYWGQSLVTVSAASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV</u> <u>SWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEVPSK</u></p>

<p>69</p> <p>VH(항-CD52)-CH1-H-CH2-CH3-L-VL(항-CD20)-CL(L = G4S)</p>	<p>atggagt tgcctgt taggctgt tgggtgct gatgt tctggat tctgct agct ccagccagggt ccaactgcaggagagcgg tccagggtcttgtgagacctagccagaccctgagcctgacctgcaccgtgtctggcttcaccttcaccgat t tctacatga actgggtgagacagccacctggacgaggtctttagtggattggatttat tagagacaagctaaaggttacacaacagag tacaatccatctgtgaaggggagagtgacaatgctgtagacaccagcaagaaccagttcagcctgagactcagcagcgt gacagccgccgacaccgctctat tttgtgcaagagagggcccaactgctgctcct tttgattactgggtcaaggca gcctcgtcacagtctcctcagcctccaccaagggeccatcggtcttccccggcaccctctccaagagcaccctctggg ggcaacagcggcctgggctgctggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctggtggaactcaggcgccctgac cagcggcgtgcacacctcccggctgctctacagtctcaggactctactcctcagcagcgtggtgacctgcccctcca gcagcttggcaccagacctacatctgcaactggaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaggtgagccc aaatcttgtgacaaaactcacatgccaccgtgccagcaccgtaactctgggggacgtcagctctctctccc cccaaaaccaaggacacctcatgatctcccggaccctgaggtcacatcgctggtggtggactgagccacgaagacc ctgaggtcaagt tcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcat aatgccaaagcaagccgaggaggagcagtaaac agcagctaccgtgtggtcagcctctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctc caacaaagcctccagccccatcgagaaaacctctccaaagcaaaaggcagccccgagaaaccaggtgtacacc tcccccatcacgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaggcttctatcccagcagctc gccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctcct tcttctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgagg ctctgcacaaccactacagcagaagagcctctcctgtccccgggtgaggtggaggtgggagccaaatgttctctcc cagctctccagcaatcctgtctgcatctccaggggagaaggtcacaatgactgcaggggcagctcaagtgaagtacat ccactggttccagcagaagccaggttctccccaaaccctggatttatgccacatccaacctggcttctggagctccctg ttcgcttcagtgagcagtggtctgggacttcttactctctcaccatcagcagagtgaggctgaagatgctgccacttat tactgccagcagtgagctagt aaccaccacgttccgaggggggaccaagctggaatcaaacgtggaactgtggctgc accatctgtcttcatctcccaccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgctgctgtaataact tctatcccagagaggccaagactacagtggaaggtgataaacgccctccaatcgggtactcccagagagctcacagag caggacagaaggacagcactacagcctcagcagcaccctgacgtgagcaaacagcagactacgagaacacaaggtcta cgctgcgaagt caccatcagggctgagctcgccctcacaagaagcttcaacaggggagaggtgtga</p>
<p>70</p> <p>VL(항-CD52)-CL</p>	<p>ATGGAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCTGCTTCCTTAAGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCC AAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGTGACAGAGTGACCATCACCTGTAAGCAAGTCAGAATATTGACAAATACTTAACT GGTACCAGCAGAAGCCAGGTAAGGCTCCAAAGCTGCTGATCTACAATACAACAATTTGCAAACGGGTGTGCCAAGCAGA TTCAGCGGTAGCGGTAGCGGTACCGACTTACCCTTACCATCAGCAGCCTCCAGCAGGAGGACCTCCGACCTACTACTG CTTCGACGATATAAGTAGGCCCGCGCAGTTTCGGCCAAGGACCAAGGTGGAATCAAAACTTGGCTGACACCTCTCT TCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCGAGA GAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAA GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAGTCTACGCCTGCGAAG TCACCCATCAGGGCTGAGCTCGCCGTCACAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT</p>
<p>71</p> <p>VH(항-CD52)-CH1-H-CH2-CH3-L-VL(항-CD20)-CL(L = G4S)</p>	<p>QVQLQESGPGLVSRPSTLSLCTVSGFTTDFYMNWVRQPPGRGLEWIGFIRDKAKGYTTEYNPSVKGRVMTLVDTSKNO FSLRLSSVTAADTAVYYCAREGHTAAPFDYWGQSLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVKVEPKSCKDHTCTPPCAPPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGAGGGGSGIYVLSQSPA ILSASPGKEVMTCR ASSVSYIHWFOQKPGSSPKPW IYATSNLASGVPVRFSGSGSTSYSLTI SRVEAEDAATYYCQWTSNPTFGGGTKLE IKGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTL SKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
<p>72</p> <p>VL(항-CD52)-CL</p>	<p>DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNIIDKYLNWYQKPKGKAPKLLIYNTNQLQTVPSRFSGSGSGTDFDTFTISSLQPE DIATYYCLOHISRPRTFGQGTKVEIKGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSTYLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
<p>73</p> <p>H-CH2-CH3-L-VH(항-CD47)-CH1-H*(L = (G4S)4)</p>	<p>atgaagcttctgttaggctgttgggtgctgatgttctggatccctgctagcttaagcagcccaaatcttctgacaaaac tcaacatgcccaccgtgccagcaccctgacctcctgggggggcccctcagctcttctcttcccccaaaaaccaaggaca cctcatgatctctagaaccctgaggtcacatgctggtggtggactgagccacgaagaccctgaggtcaagt tcaac tggtagctggacggcgtggaggtgcat aatgccaaagcaaaagccgaggaggagcagtaacaacagcagctaccgtgtggt cagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagcctcccag cccccatcgagaaaacgatccaagcaaaaggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatcacgggag gagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaggcttctatcccagcagatcgccgtggagtgggagag caatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctcctcttctctatagcaage tcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactac acgcagaagagcgcaccaccgacccgggtgcaggcggcggaggaagcggaggaggtggcagcgggtggcgggtggctccgg cggaggtggctccggaGAGGTGACGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCT GTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTGGCTATGGCATGTCTTGGGTTCCGACACTCCAGCAAGAGGCTGGAGTGGGT GCAACCATTACTAGTGGTGGTACTTACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGGGGATCCACACTCTCCAGAGCAATGC CAAGAACCCTGTACTGCAAAATAGACAGTCTGAAGTCTGAGGATACAGCCATATTTCTGTGTCAGCTCCGCGG GAAATGCTATGGACTACTGGGTCAAGGGACCAGCGTACCCTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCC CTGGCACCTCTCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGCGCCCTGGGTGCTGCTGTAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT GACGGTGTGTTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTTACT CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAAGCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTGTGA</p>

74	VL(항-CD47)-CL	ATGGAGTTGCCTGTTAGGCTGTGGTGTGATGTTCTGGATTCTGCTTCCTTAAGCgat at tgt gat gact cagt ct cc agccaccctgtctgtgactccaggagatagagctctctcttccctgcagggccagccagactat tagcgactact tacact ggtatcaacaaaaatcacatgagctccaaggctctcatcaaat t t gct t cccaatccat t tct ggaatcccctccagg ttcagtgccagctggatcaggctcagatttcaactctcagatcaacagctgtggaacctgaagatgttggagtgattactgt tcaaaaatggtcacggcttccctcggagcttcggtggaggaccacaagctggaataaaaCGAACTGTGGCTGCACCATCTG TCTTCATCTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAATGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCC AGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAATCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAG CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAAGCAGACTACGAGAAAACAAGTCTACGCCTGCG AAGTACCCTACGAGGCTGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG
75	H-CH2-CH3-L-VH(항-CD47)-CH1-H*(L=(G4S)4)	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGAGGGGSGGG GSGGGGSGGGSGEVQLVESGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSGYGMSSWVROTPDKRLEWVATITSGGTYTYYPDSVKGR FTISRDNAKNTLYLQIDSLKSEDTAIFYCARSLAGNAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKKSC
76	VL(항-CD47)-CL	DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQTI SDYLHWYQKSHESPRLLIKFASQISGIPSRFSGSGSDFTLSINSVEP EDVGVVYQNGHGFPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
77	H-CH2-CH3-L-VL(항-CD47)-CL(L=(G4S)4)	atgaagcttctgttaggctgttggctgatgttctggatccctgctagcttaagcgagcccaaatcttctgacaaaac tcaacacatgccaccctgcccagcactgaactcctgggggggcccctcagctcttctcttcccccaaaaccaaggaca ccctcatgatctctagaaccctgaggtcacatgctggtggtggactgagccacgaagaccctgaggtcaagtccaac tggtagctgagcggctggaggtgcaatgccaagacaaagccggaggagcagactacaacagcagctaccgtggtggt cagcgtcctcaccgtcctgcaccagactggtgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaagcctccag cccccatcgagaaaaagatatacaaaagcaaaagggcagcccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcacgggag gagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagag caatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctatagcaagc taccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaactcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactac acgcagaagagcgcaccgcgaccccggtgtagggcggaggaggaagcggaggaggtggcagcgggtggcggctccgg cggaggtggtcggagatattgtgatgactcagctctccagccaccctgtctgtgactccagagagatagagttctctt tctgcagggccagccagactatagcgactacttacactggtatcaacaaaaatcacatgagctccaaggctctcatc aaat t t gct t cccaatccat t t c t ggaatcccctccaggttcagtgccagtgatcaggtcagat t t cactctcagat caacagtggtgaacctgaagatgttggagtgatfactgtcaaaaatggtcacggcttctcctcggagcttcggtggagga ccaagctggaataaaaCGAACTGTGGCTGCACCATCTGCTTCATCTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ATCTGCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCA ATCGGGTAATCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAAACAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCTACAGGCTGAGCTCGCCGTCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGTAG
78	H-CH2-CH3-L-VL(항-CD47)-CL(L=(G4S)4)	EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGAGGGGSGGGG SGGGGSGGGSGDI VMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQTI SDYLHWYQKSHESPRLLIKFASQISGIPSRFSGSGSG SDFTLINSVEPEDVGVVYQNGHGFPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
79	VH(항-EGFR)-CH1-H-CH2-CH3-L-VL(항-CD47)-CL(L=(G4S)4)	atggagttgctgttaggctgttggctgatgttctggatcctgctagctccagccaggtgcagctgaagcagtcagg acctggcctagtgcagccctcacagagcctgccaactcactgcacagctctctggttctcattaactaactatggtgtac actgggttcgccagctctccaggaagaggtctggagtgctggagtgatagggagtggtggaacacagactataataca ccttcaacatccagactgagcatcaacaaggacaatccaagagccaagtttctttaaatagaacagctgcaactctaa tgacacagccatataactgtgccagagccctcacctactatgattacgagttgcttactgggccaagggactctgg tcaactgtctctgcacggaggtcggcgaggagggtcggagatattgtgatgactcagctccagccaccctgtctgt gactccaggagatagagttctcttcttgcagggccagccagactatagcgactacttacactggtatcaacaaaaat cacatgagctccaagcttctcatcaaat t t gct t cccaatccat t t c t ggaatcccctccaggttcagtgccagtgga tcaaggtcagatttcaactctcagatcaacagtggtgaacctgaagatgttggagtgatataactgtcaaaaatggtcacgg ct t t cctcggagcttcggtggaggaccacaagctggaataaaactggaactgtggtgacccatctgtcttcatctcc cgccatctgatgagcagtgaaactcggactgcctctgttgtgctgctgcaat aactctatcccagagaggccaaa gtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggt aactcccaggagagtgacagagcaggacagcaaggacagcac ctacagcctcagcagcaccctgagctgagcaagcagactacgagaacacaaaagctacgctgcgaagt caccatc agggcctgagctcgccctgcacaaagagcttcaacaggggagagtggtga
80	VH(항-EGFR)-CH1-H-CH2-CH3-L-VL(항-CD47)-CL(L=(G4S)4)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLVGIVSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKQVFF KMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVAASSTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGAGGGGSGGGGSGGGGSGDI VMTQSPAT LSVTPGDRVSLSCRASQTI SDYLHWYQKSHESPRLLIKFASQISGIPSRFSGSGSGSDFTLINSVEPEDVGVVYQNG HGFPRTFGGGTKLEIKRGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

81	VH(항-CD47)-CH1-H-CH2-CH3-L-VL(항-EGFR)-CL(L = (G4S)4)	atggagt tgcctgt taggctgt tgggtgct gatgt tctggat tctgct agct ccagcGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGACTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTGGCTATGGCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGACAAGAGGCTGGAGTGGGTGCGCAACCATTACTAGTGGTGGTACTTACACCTACTATCCA GACAGTGTGAAGGGGCGATTCCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATAGACAGTCTGAAGTCTGAGGATACAGCCATATATTTCTGTGCAAGATCCCTCGCGGGAATGCTATGGACTACTGGGTCAAGGGACCAGCGTCA CCGTCTCCTCAgcttccaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctctccaagagcaccctgggggacacagcg gccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacgggtgctggtgaaactcaggcgcctgaccagcggcgt gcacaccttccccgctgctcctacagtctcaggactctactcctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgg gcaccagacctacatctgcaactggaatcacaagcccagcaaccacaaaggtggacaagagagtggcccaaatcttgt gacaaaaactcacatgcccaccgtgcccagcaccctccagtggcggaccgtcagctcttctcttcccccaaaaccaa ggacacctcatgatctccggaccctgaggtcacatgctggtggtggactgagccacaagacctgaggtcaagt tcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaagccgcccggaggagcagtaaacagcagctaccgt gtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactgctggaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaagacct cccatccagcatcgagaaaacctctccaagccaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcac gggaggagatgaccaagaaccaggtgacctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcagatcgccgtggagtg gagagcaatgggagcccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccagcggctcctcttctctctatag caagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaactcttctcatgctcctgcatgaggtctgcacaacc actacacagaagacctctccctgctccccgggtgacaggtggaggtgggagcGACACTTGTGACTCAGTCTCCAGTC ATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTGGCACAACATACACTGGTA TCAGCAAAGAACAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGAATCCCTTCCAGGTTTA GTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCTGAAGATATTGCAGATTACTGTCAA CAAAATAAATACTGGCCAACCAGTTCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAcaactgtgctgacatctgtctt catcttcccccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgctgctgtaataactctatcccagag agggcaaatgacagtggaaggtggaataacgcctccaatcgggtaacccaggagagtgacagagcaggacagcaag gacagacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaagcagactacgagaacacaaagtctacgctgcaaggt caccatcagggcctgagctcgccgtcacaagagcttcaacagggagaggttga
82	VH(항-CD47)-CH1-H-CH2-CH3-L-VL(항-EGFR)-CL(L = (G4S)4)	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSYGYMSWVRQTPDKRLEWVATITSGGTYTYYPDSVKGFRFTISRDNKNTLY LQIDSLKSEDTAIFYCARSLAGNAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDRVEPKSCDKTHCTPPCPAPPVAGPSV FLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK KCVSNKALPSSIEKTI SAKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGAGGGGSDILLTQSPVILSVSPGERVSPSCRASQS IGTNIHWYQRTNGSPRLLIKVASESISGIPSRFSGSGSGTDFLTSINSVSESDIADYYCQQNNWPTTFGAGTKLELKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWVVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLISKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
83	항-HER2 Fab L 사슬	gatattgtgatgactcagcttccagccacctgtctgtgactccaggagatagagttctcttcttctgaggccagcca gactattagcgactacttacactggtatcacaaaaaatcacatgagttccaaggttctcatcaaatgtcttccaat ccatttctggaatccccccaggttcaagtgagcagtgagctcaggtcagatttcaactcagtatcaacaggtggaaacct gaagatgttggagtgtattactgtcaaaatggtcagcgttctctcggacttccgtggagggaccaagctggaaataaa acgtggaactgtggctgacatctgtcttcatcttcccccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttg tgtgctgctgtaataacttctatcccagagagccaaagtacagtggaaggtggaataacgcctccaatcgggtaaccc caggagagtgacacagcaggacagcaaggacagcaccctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaacagcagacta cgagaacacaaagtctacgctgcaaggtcaccatcagggcctgagctcgccctcacaagagcttcaacaggggag ag
84	항-HER2 Fab L 사슬	DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQTSIDYLHWYQKSHESPRLLIKFASQISGIPSRFSGSGSGSDFLTSINSVEP EDVGVVYQCNGHGFPRTFGGGTKLEIKRGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWVVDNALQSGNS QESVTEQDSKSTYSLSSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
85	항-HER2 Fab H 사슬	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT CACTTTCAGTGGCTATGGCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGACAAGAGGCTGGAGTGGGTGCGCAACCATTACTAGTG GTGGTACTTACACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTAC CTGCAAATAGACAGTCTGAAGTCTGAGGATACAGCCATATATTTCTGTGCAAGATCCCTCGCGGGAATGCTATGGACTA CTGGGTCAAGGGACCAGCGTACCGTCTCCTCAGTAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCGTCACCCCTCTCCA AGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGTGCTGTCAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAC TCAGGCGCCCTGACCAGCGCGGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGT GACCGTGCCTCCAGCAGCTGGGCACCCAGACTACATCTGCACAGTGAATCAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACA AGAAAGTTGAGCCCAATCT
86	항-HER2 Fab H 사슬	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSYGYMSWVRQTPDKRLEWVATITSGGTYTYYPDSVKGFRFTISRDNKNTLY LQIDSLKSEDTAIFYCARSLAGNAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDRVEPKSC

87	VH(향-HER2)-CH1-H-CH2-CH3-L-VL(향-CD47)-CL(L = (G4S)4)	atggagt tgcctgt taggctgt tggctgt gatgt tctggat tctgct agct ccagcggaggt gcaactggg ggagagcggg agggagcctcgt gcaaccggaggat ccctcagact gagctgt gccccagcggct tcaat at caaggat acct at at cc actgggt gagcagcggccccggaaaaggact ggagt gggggccaggat ct at ccccaaacggct acaccaggt acgccc gat tccgt gaagggcagat tccat cagcggcagat acc tccaaaaaccggct at cccagat gaaccgct cagagc cgaggacaccggct ct at t actgt tccagat gggggcggcagggct tttacgt at ggat t act gggggcagggaaacc tggtagcctgagcagcggaggct cggcggaggaggct cggagat at t gtagact cagt ct ccagccacctgtc t gtagct ccaggagat agagt ct ct t t cct gcaggggccagccagact at tagcact act tacact ggt at caaaaa aat cacat gact ct ccaaggct tct cat caaat t t gct t cccaat ccaat t t ct ggaat cccct ccagg t cagt ggaggt ggat caggct cagat t t cact ct cagt at caacagt gt ggaacct gaagat gt tggagt gt at t act gt caaat ggct ca cggct t t cct cggagct t cgggggggaccaagct ggaat aaaaact ggaact gt ggct caccat ct gt ct cat ct tcccgcct ct gat gacgagt t gaaat ct ggaact gcct ct gt t g t g t g c t g c t g a a t a a c t t c t a t c c c a g a g a g g c a a a g t a c a g t g g a a g g t g g a t a a c g c c t c c a a t c g g g t a a c t c c c a g g a g a g t g t c a c a g a g c a g g a c a g c a c c t a c a g c c t c a g c a g c a c c t g a c g t g a g c a a a g c a g a c t a c g a a a c a a a a g t c t a c g c c t g c g a a g t c a c c a t c a g g g c c t g a g c t c g c c c t c a c a a a g a g c t t c a a c a g g g a g a g t g t g a
88	VL(향-HER2)-CL	ATGGAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCATGTTCTGGATTCTGCTTCTTAAAGCgacat ccagat gaccagagccc tagcagcctgagcggcagcgtggcgacagagtgaacaatcaccctgcaggggccagccagagctgaat accgcccgtggcct ggtaccagcagaaacccggcaaggcccct aagctgctgatctactccgctcct t cct ct acagcggcgtgccagcagg tttagcggcagcaggagcggcacagat t t caccct gaccat cagcagcctgcagcccaggact t c g c c a c c t a c t a c t g c c a g c a g a t t a c a c c a c c c c c c a c c t t c g g c c a g g g a a c a a a g g t g g a g a t c a a g C G A A C T G T G G C T G C A C C A T C T G T C T C A T C T T C C C G C C A T C T G A T G A C A G T T G A A A T C T G G A A C T G C C T C T G T G T G C C T G C T G A A T A A C T C T A T C C A G A G A G C C A A A G T A C A G T G G A A G G T G G A T A A C G C C C T C C A A T C G G G T A A C C C A G G A G A G T G T C A C A G A C A G G A C A G C A A G G A C A G C A C C T A C A G C C T C A G C A G C A C C C T G A C G C T G A G C A A A G C A G A C T A C G A G A A C A C A A A G T C T A C G C T G C G A A G T C A C C C A T C A G G C C T G A G C T G C C C G T C A C A A A G A G C T T C A A C A G G G A G A G T G T T A G
89	VH(향-HER2)-CH1-H-CH2-CH3-L-VL(향-CD47)-CL(L = (G4S)4)	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTPSGYGMSWVRQTPDKRLEWVATITSGGTYTYPDSVKGRFTISRDNKNTLY LQIDSLKSEDTAIFYCARSLAGNAMYDYGQGTSVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKVEPKSCDKHTHTCPPAPPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALTHNHYTQKLSLSPGAGGGGSGGGGSGGGGSGD I V M T Q S P A T L S V T P G D R V S L S C R A S Q T I S D Y L H W Y Q O K S H E S P R L L I K F A S Q S I S G I P S R F S G S G S D F T L S I N S V E P E D V G V Y Y C Q N G H G F P R T F G G G T K L E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C
90	VL(향-HER2)-CL	D I V M T Q S P A T L S V T P G D R V S L S C R A S Q T I S D Y L H W Y Q O K S H E S P R L L I K F A S Q S I S G I P S R F S G S G S D F T L S I N S V E P E D V G V Y Y C Q N G H G F P R T F G G G T K L E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C
91	VH(향-CD47)-CH1-H-CH2-CH3-L-VL(향-HER2)-CL(L = (G4S)4)	atggagt tgcctgt taggctgt tggctgt gatgt tctggat tctgct agct ccagcGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG GGGAGACTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTGGCTATGGCATGT CTTGGGTTCCGACACTCCAGACAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTACTAGTGGTGGTACTTACACTACTATCCA GACAGTGTGAAGGGCGATTCCACATCTCCAGAGACAAATGCCAAGAACCCTGTACTGCAAAATCAGACTGGAAGT TGAGGATACAGCCATATATTTCTGTGCAAGATCCCTCGCGGAAATGCTATGGACTACTGGGTCAGAGGACAGCGTCA CCGTCTCCTCAgectccaccaagggcccactcggtct tccccctggcaccctcctccaagagcaccctctgggggcacagcg gccctgggctgcttggtaaggactactccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcggcctgaccagcggcgt gcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactcctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgg gcaccagacctacatctgcaactggaatcacaagcccagcaaccaaggtggacaagagagttagcccaaatctgt gacaaaactcacatgcccaccgtgcccagcaccctcagtgccggaccgtcagctcttctcttcccccaaaaccaa ggacacctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgctggtggtggagctgagccacgaagacctgaggtcaagt tcaactggtactggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccggaggagcagtaacaagcagctaccgt gtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccagactgctgaatggcaagagtaacaagtgcaaggtctccaacaagccct cccatccagcatcgagaaaacctctccaagccaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatcac gggaggagatgaccaagaaccaggtcagctgacctgcctggtcaaaggctctatcccagcagatcgccgtggagtgg gagagcaatgggagcgggagaaacaatcaagaccagcctccgctgctggactccagcggctccttcttctctatag caagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaactcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaacc actacacagaagagcctctcctgtccccgggtgacaggtggaggtgggagcagatccagatgaccagagaccctagc agcctgagcgcgagcgtggcgacagagtgacaaatcaccctgcaggggccagccagagcgtgaataccgcccgtggcctggt a ccagcagaaaaccggcaaggcccct aagctgctgatctactccgctccttctctacagcggcgtgccagcaggttta cggcagcaggagcggcacagat t t c a c c c t g a c c a t c a g c a g c c t g c a g c c c a g g a c t t c g c c a c c t a c t a c t g c c a g c a g c a t t a c a c c a c c c c c c a c c t t c g g c c a g g g a a c a a a g g t g g a g a t c a a g c g a a c t g t g g c t g a c c a t c t g t c t t c c c g c c a t c t g a t g a c g a g t t g a a t c t g g a a c t g c c t c t g t g t g c t g c t g a a t a a c t t c t a t c c c a g a g a g g c c a a a g t a c a g t g g a a g g t g g a t a a c g c c c t c c a a t c g g g t a a c t c c a g g a g a g t g t c a c a g a g c a g g a c a g c a a g g a c a c c t a c a g c c t c a g c a g c a c c c t g a c g t g a g c a a a g c a g a c t a c g a g a a c a c a a a g t c t a c g c c t g c g a a g t c a c c a t c a g g g c c t g a g c t c g c c c t c a c a a a g a g c t t c a a c a g g g a g a g t g t g a

92	VH(항-HER2)-CH1-H*	ATGGAGTTGCCTGTTAGGCTGTGGTGCATGTTCTGGATTCTCGTCCAGCAGCgaggtgcaactggtggagagcggaggagcctcgtgcaaccggaggatccctcagactgagctgtgccccagcggcttcaatatcaaggatacctatccactgggtgagcagcggccccggaaaaggactggagtgggtggccaggatctatcccacaacggctacaccaggtacggcgattccgtgaagggcagattcaccatcagcggcgcgatacctcaaaaacaccgcctatctccagatgaacagcctcagagccgaggacaccgcccgtctattactgttccagatggggcggcgacggcttttagctatggattactggggccaggggaacccctggtagcctgagcagcGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTTGGCACCTCTCCAAGACACCTTGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCGCGGTGATCAGCAGCGGGCAGCTCCATCAACTACAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTGTTAA
93	VH(항-CD47)-CH1-H-CH2-CH3-L-VL(항-HER2)-CL(L = (G4S)4)	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSGYGMSWVROTPDKRLEWVATITSGGTYTYYPDSVKGFRFTISRDNAKNTLYLQIDSLKSEDTAIYFCARSLAGNAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCKDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGFFLYSKLTVDKSRWQQGVNFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGAGGGGSDIVMTQSPATLSVTPGDRVLSLRASQTI SDYLHWYQQKSHESPRLLIKFASQISGIPSRFSGSGSGSDFTLINSVEPEDVGVVYVYQNGHGFPRTFGGGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
94	VH(항-HER2)-CH1-H*	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSGYGMSWVROTPDKRLEWVATITSGGTYTYYPDSVKGFRFTISRDNAKNTLYLQIDSLKSEDTAIYFCARSLAGNAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKS

[0086] 실시예 1

[0087] Fc-항-EGFR 전구체 분자

[0088] 1A) Fc-Fab 전구체의 구성 및 발현

[0089] 완전한 TetBiAb 분자들을 창조하기 위하여, 수 많은 Fc-Fab 전구체들이 제조되었고 Fab의 항원 결합력이, Fab가 Fc의 C-말단으로 이동되어도 여전히 발생할 수 있는지 여부를 보기 위하여 시험되었다. Fc-항-EGFR의 제조는 항-EGFR C225 (cetuximab) 단일클론성 항체를 기초로 한다(Kawamoto, PNAS 80:1337, 1983). C225에 대한 Fab L 사슬의 DNA 및 단백질 서열은 각각 SEQ ID NO:1 및 SEQ ID NO:2으로 제공된다. C225에 대한 Fab H 사슬에 대한 DNA 및 단백질 서열은 각각 SEQ ID NO:3 및 SEQ ID NO:4로 제공된다. 3개의 다른 Fc-EGFR 분자들이 제조되었다: (i) Fc-G4S-항-EGFR(VHCH1), 여기서 Fc 영역 H 사슬의 C-말단은 항-EGFR Fab H 사슬의 N-말단에 G4S 링커(GGGGS)를 통해 연결되고, H 사슬은 항-EGFR Fab L 사슬의 N-말단에 G4S 링커를 통해 연결되고; 및 (iii) Fc-(G4S)₄-항-EGFR(LC), 이는 (ii)와 같은 분자이나 링커가 4배 반복된다.

[0090] Fc-G4S-항-EGFR(VHCH1)의 발현을 위하여, 다음 2개 유전자 구조체들은 표준 재조합 DNA 기술로 조립되고 포유류 발현 벡터 pTT5(분비를 위하여 마우스 L 사슬 신호 펩타이드 서열을 포함)로 복제되었다: 1) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 H-CH2-CH3-G4S-VH(항-EGFR)-CH1-H (SEQ ID NO:11): 세린으로 돌연변이된 시스테인 (이는 선천적으로 L 사슬과 디설파이드 결합을 형성한다)을 갖는 인간 H 사슬 힌지 영역, (EPKSS, SEQ ID NO:8), 이어서 불변 도메인 2 및 3, 이어서 G4S 링커, 및 항-EGFR H 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 H 사슬 불변 도메인 1, 이어서 힌지 영역 (EPKSC, SEQ ID NO:10, 항-EGFR L 사슬과 디설파이드 브릿지를 형성하게 함); 및 2) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VL(항-EGFR)-CL (SEQ ID NO:12): 항-EGFR L 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 kappa L 사슬 불변 도메인. 이들 2개 구조체들에 대응하는 아미노산 서열들이 각각 SEQ ID NO:13 및 SEQ ID NO:14로 보여진다.

[0092] Fc-G4S-항-EGFR(LC)의 발현을 위하여, 다음 2개 유전자 구조체들이 표준 재조합 DNA 기술들로 조립되었고, 포유류 발현 벡터 pTT5(분비를 위하여 마우스 L 사슬 신호 펩타이드 서열을 포함) 안으로 복제되었다: 1) 다음 요소들을 암호화하는, 구조체 H-CH2-CH3-G4S-VL(항-EGFR)-CL (SEQ ID NO:15): 인간 H 사슬 힌지 영역 EPKSC (SEQ ID NO:8), 이어서 불변 도메인 2 및 3, 이어서 G4S 링커, 및 항-EGFR L 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 kappa L 사슬 불변 도메인; 및 2) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VH(항-EGFR)-CH1-H (SEQ ID NO:16): 항-EGFR H 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 H 사슬 불변 도메인 1, 이어서 힌지 영역 EPKSC (SEQ ID NO:10). 이들 2개 구조체들에 대응하는 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO:17 및 SEQ ID NO:18로 나타난다.

[0093] Fc-(G4S)₄-항-EGFR(LC)의 발현을 위하여, 다음 2개 유전자 구조체들이 표준 재조합 DNA 기술들에 의해 조립되었

고, 포유류 발현 벡터 pTT5(분비를 위하여 마우스 L 사슬 신호 펩티드 서열 포함) 내로 복제되었다: 1) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 H-CH2-CH3-(G4S)₄-VL(항-EGFR)-CL(SEQ ID NO:19): 인간 H 사슬 힌지 영역 EPKSC (SEQ ID NO:8), 이어서 불변 도메인 2 및 3, 이어서 (G4S)₄ 링커, 및 항-EGFR L 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 kappa L 사슬 불변 도메인; 및 2) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VH(항-EGFR)-CH1-H (SEQ ID NO:16): 항-EGFR H 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 H 사슬 불변 1, 이어서 힌지 영역 EPKSC (SEQ ID NO:10). 이들 2개 구조체들에 대한 대응하는 아미노산 서열이 각각 SEQ ID NO:20 및 SEQ ID NO:18에 나타난다.

[0094] 2 벡터들의 각 세트는, Fc-G4S-항-EGFR(VHCH1), Fc-G4S-항-EGFR(LC), 및 Fc-G4S₄-항-EGFR(LC)의 발현을 위하여 Genejuice (Life Technologies, Grand Island, NY) 또는 폴리에틸렌이민 (PEI, Polysciences, Warrington, PA)을 사용하여, HEK 293-6EFH 안으로 일시적으로 함께 감염되었다. 단백질들은 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 단일 단계로 정제되었다. 2개 폴리펩티드의 발현 및 완전한 테트라머릭 분자의 조립체가 소듐 도데실 설포네이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE) 및 사이즈 배제 크로마토그래피 (SEC)으로 확인되었다.

[0095] 게다가, 표준 단일클론성 항체 포맷(항-EGFR IgG1)으로 대조군 항-EGFR을 제조하여 다른 Fc-Fab 포맷과 비교하였다.

[0096] **1B)항원에 대한 Fc-Fab 전구체의 결합력**

[0097] 1Bi) A431 막 위의 EGF에 대한 Fc-EGFR의 경쟁 결합력

[0098] EGFR에 대한 결합력을 유지하기 위한 Fc-G4S-항-EGFR(VHCH1) 및 Fc-G4S-항-EGFR(LC)의 능력은 경쟁적 라디오리간드 결합 분석법(competitive radioligand binding assay)에 의해 보여졌다. 경쟁 항체는 ¹²⁵I-EGF (Perkin Elmer, Waltham, MA)과 혼합되고, EGFR을 과발현하는 인간 A431 편평상피암 세포로부터 제조된 막 2mg를 첨가하였다. A431 세포 막들은 질소 캐비테이션(nitrogen cavitation)에 의해 제조되었다. 상기 세포들은 900psi의 질소가스로 30min 동안 방해되었고, 이후 세포 용해물들이 4°C에서 1000g으로 10min 동안 원심분리되었다. 상청액이 수집되었고 4°C에서 100,000g으로 1h 동안 원심분리되었다. 얻어진 펠렛을 다운스 호모지나이저(dounce homogenizer)로 재현탁하였다. 샘플의 단백질 농도는 BioRad 단백질 분석 시약을 사용하여 결정되었고, 상기 샘플들은 나중 사용을 위해 -80°C에서 냉동 저장되었다. 비특이적 결합력은 모든 EGFR 결합 사이트들을 포화시키는 초과대량의 비표지된 EGF(100nM)의 존재 하에서 결정되었다. 이 반응액들을 37°C에서 90min 동안 흔들면서 배양되었고, 유리섬유 필터(EMD Millipore, Billerica, MA)를 통해 여과되어 종료되었다. 상기 필터들은 세척되고 감마 계수기에서 계수되어 A431 세포 막 위에 결합된 ¹²⁵I-EGF의 함량을 결정하였다.

[0099] 상기 결과들은, Fc-G4S-항-EGFR(VHCH1)가 항-EGFR로서 A431 세포막의 EGFR에 대한 ¹²⁵I-EGF의 결합을 저해하는 유사한 능력을 갖는다는 것을 나타낸다(도 2). 약간 더 높은 저해 상수(Ki)을 가지고 있음에도 불구하고, Fc-G4S-항-EGFR(LC)가 또한 EGFR에 결합되었다(도 2). 이들 결과들은 VH 또는 VL의 N-말단을 통해 Fc의 C-말단에 융합된 항-EGFR Fab가 EGFR에 대한 결합력을 유지하였다는 것을 나타낸다.

[0100] **1Bii) SPR 분석**

[0101] EGFR에 대한 결합력을 유지하는 Fc-G4S-항-EGFR(VHCH1), Fc-G4S-항-EGFR(LC), 및 Fc-(G4S)₄-항-EGFR(LC)에 대한 능력은 표면 플라즈몬 공명 (surface plasmon resonance, SPR)에 의해 결정되었다. 정제된 염소 항-인간 IgG Fc (Jackson Immuno Research Laboratories)는, Biacore 4000 instrument (GE Healthcare)을 사용하여 아민 결합 화학법을 사용하여 CM5 칩에 고정되었다. Biacore CM-5 칩들, 에탄올아민, NHS/EDC 결합 시약 및 완충제들은 Biacore (GE Healthcare)로부터 얻었다. 고정화 단계들은 HEPES 완충제 (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA 및 0.005% P20 계면활성제)에서 30µl/min의 흐름 속도로 수행되었다. 센서 표면은 NHS (0.05 M) 및 EDC (0.2 M)의 혼합물로 7min 동안 활성화되었다. 염소 항-인간 IgG Fc가 pH 5.0, 10 mM 소듐 아세테이트를 ~30µg/ml의 농도로 7min 동안 주입되었다. 에탄올아민 (1 M, pH 8.5)은 7min 동안 주입되어 어느 정도라도 남아 있는 활성화된 기들을 차단하였다. 평균 12,000 반응단위(RU)의 포획 항체가 각 흐름 세포에 고정되었다. 동일한 HEPES 완충제(20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA 및 0.005% P20 계면활성제)을 사용하여 동적 결합력 (Kinetic binding) 실험들이 수행되었고, 25°C에서 평형되었다. 시험 및 대조 항체를 2분 동안 30µl/min의 흐름 속도로 0.5 및 1µg/ml로 주입하고, 이어서 동일한 흐름 속도로 30초 동안 완충제로 세척하여 동적 데이터를 수집하였다. 인간 EGFR-1 (R&D 시스템 제조함 인간 EGF 수용체 (1095-ER))가 3min 동안 40, 20, 10, 5, 2.5 및 0 nM로 결합되었고, 이어서 30µl/min의 흐름 속도로 10분간 해리 단계를 진행하였다. 상기 데이터는 BIA 평가

소프트웨어를 가지고 1:1 Langmuir 결합 모델을 사용하여 맞춰졌다. 동적 속도 상수가 결합 및 해리 상들을 맞추는 것들(fits)로부터 결정되었고, K_D 가 이들 상수들의 비로부터 유도되었다.

[0102] 이 결과들은 Fc-G4S-항-EGFR(VHCH1)가 항-EGFR보다 약간 더 높은 K_D 를 갖는 EGFR과 결합했다는 것을 나타내며, 각각, ~ 2 nM vs ~ 1 nM 이었다(도 3). Fc-G4S-항-EGFR(LC) 또한 EGFR에 결합되었으나, ~ 6 nM의 K_D 를 가진다(도 3). 링커가 (G4S)₄까지 길어질 때, Fc-(G4S)₄-항-EGFR(LC)의 K_D 가 ~ 2 nM까지 떨어졌다(도 3). 이들 결과는 부분적으로 1Bi에서 경쟁 결합 분석법과 다르며 가능한 한가지 설명은 Fc-항-EGFR이 항-Fc을 통해 Biacore 칩에 포획될 때 항-EGFR Fab에 대한 접근가능성이 결핍될 수 있다는 것이다. 이 가설은 링커가 길어질 때, 잠재적으로 EGFR에 결합하는 항-EGFR Fab의 접근가능성이 증가하는 것에 의해 친화성이 증가하는 것에 의해 뒷받침된다.

[0103] **실시예 2**

[0104] **Fc-항-CD20 전구체 분자**

[0105] 2A) Fc-Fab 전구체의 구성 및 발현

[0106] Fc-항-CD20의 제조는 항-CD20 2B8 (리투시맵, rituximab) 단일클론성 항체 (Reff et al, Blood 83:435, 1994)를 기초로 한다. 2B8을 위한 Fab L 사슬의 DNA 및 단백질 서열은 각각 SEQ ID NO:21 및 SEQ ID NO:22로 제공된다. 2B8을 위한 Fab H 사슬의 DNA 및 단백질 서열은 각각 SEQ ID NO:23 및 SEQ ID NO:24로 제공된다. 4개 다른 Fc-CD20 분자들이 제조되었다: (i) Fc-G4S-항-CD20(VHCH1), 여기서 Fc 영역 H 사슬의 C-말단은 항-CD20 Fab H 사슬의 N-말단에 G4S 링커 (GGGGS, SEQ ID NO:6)을 통해 연결되고; (ii) Fc-(G4S)₄-항-CD20(VHCH1), 이는 (i)와 동일한 분자이나, 링커가 4배 사본을 갖고; (iii) Fc-G4S-항-CD20(LC), 여기서 Fc 영역 H 사슬의 C-말단은 항-CD20 Fab L 사슬에 G4S 링커를 통해 연결되고; 및 (iv) Fc-(G4S)₄-항-CD20(LC), 이는 (iii)와 동일한 분자이나 링커가 4배 사본을 갖는다.

[0107] Fc-G4S-항-CD20(VHCH1)의 발현을 위하여, 다음 2개 유전자 구조체들이 표준 재조합 DNA 기술에 의해 조립되고 포유류 발현 벡터 pTT5 (분비를 위하여 마우스 L 사슬 신호 펩타이드 서열을 포함) 안으로 복제되었다: 1) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 H-CH2-CH3-G4S-VH(항-CD20)-CH1-H (SEQ ID NO:25): 인간 H 사슬 힌지 영역 EPKSC (SEQ ID NO:8), 이어서 불변 도메인 2 및 3, 이어서 G4S 링커, 및 항-CD20 H 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 H 사슬 불변 도메인 1, 이어서 힌지 영역 EPKSC (SEQ ID NO:10); 및 2) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VL(항-CD20)-CL (SEQ ID NO:26): 항-CD20 L 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 kappa L 사슬 불변 도메인.). 이들 2개 구조체들에 대응하는 아미노산 SEQ ID NO:는 각각 SEQ ID NO:27 및 SEQ ID NO:28로 나타난다.

[0108] Fc-(G4S)₄-항-CD20(VHCH1)의 발현을 위하여, 다음 2개 유전자 구조체들은 표준 재조합 DNA 기술에 의해 조립되었고, 포유류 발현 벡터 pTT5 (분비를 위하여 마우스 L 사슬 신호 펩타이드 서열을 포함) 안으로 복제되었다: 1) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 H-CH2-CH3-(G4S)₄-VH(항-CD20)-CH1-H (SEQ ID NO:29): 인간 H 사슬 힌지 영역 EPKSC (SEQ ID NO:8), 이어서 불변 도메인 2 및 3, 이어서 (G4S)₄ 링커, 및 항-CD20 H 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 H 사슬 불변 도메인 1, 이어서 힌지 영역 EPKSC (SEQ ID NO:10); 및 2) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VL(항-CD20)-CL (SEQ ID NO:26): 항-CD20 L 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 kappa L 사슬 불변 도메인.). 이들 2개 구조체들에 대응하는 아미노산 SEQ ID NO:는 각각 SEQ ID NO:30 및 SEQ ID NO:28으로 보여진다.

[0109] Fc-G4S-항-CD20(LC)의 발현을 위하여, 다음 2개 유전자 구조체가 표준 재조합 DNA 기술에 의해 조립되었고, 포유류 발현 벡터 pTT5 (분비를 위하여 마우스 L 사슬 신호 펩타이드 서열을 포함) 안으로 복제되었다: 1) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 H-CH2-CH3-G4S-VL(항-CD20)-CL (SEQ ID NO:31): 인간 H 사슬 힌지 영역 EPKSC (SEQ ID NO:8), 이어서 불변 도메인 2 및 3, 이어서 G4S 링커, 및 항-CD20 L 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 kappa L 사슬 불변 도메인; 및 2) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VH(항-CD20)-CH1-H (SEQ ID NO:32): 항-CD20 H 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 H 사슬 불변 도메인 1, 이어서 힌지 영역 EPKSC (SEQ ID NO:10). 이들 2개 구조체에 대응하는 아미노산 SEQ ID NO:는 각각 SEQ ID NO:33 및 SEQ ID NO:34로 나타난다.

[0110] Fc-(G4S)₄-항-CD20(LC)의 발현을 위하여, 다음 2개 유전자 구조체들이 표준 재조합 DNA 기술에 의해 조립되었고, 포유류 발현 벡터 pTT5 (분비를 위하여 마우스 L 사슬 신호 펩타이드 서열을 포함)안으로 복제되었다: 1) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 H-CH2-CH3-(G4S)₄-VL(항-CD20)-CL (SEQ ID NO:35): 인간 H 사

슬 힌지 영역 EPKSC (SEQ ID NO:8), 이어서 불변 도메인 2 및 3, 이어서 (G4S)₄ 링커, 및 항-CD20 L 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 kappa L 사슬 불변 도메인; 및 2) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VH(항-CD20)-CH1-H (SEQ ID NO:32): 항-CD20 H 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 H 사슬 불변 도메인 1, 이어서 힌지 영역 EPKSC (SEQ ID NO:10). 이들 2개 구조체들에 대응하는 아미노산 SEQ ID NO:는 각각 SEQ ID NO:36 및 SEQ ID NO:34로 나타낸다.

[0111] 상기 2개 벡터 각각의 세트는, Fc-G4S-항-CD20(VHCH1), Fc-(G4S)₄-항-CD20(VHCH1), Fc-G4S-항-CD20(LC), 및 Fc-(G4S)₄-항-CD20(LC)의 발현을 위하여, Genejuice (Life Technologies, Grand Island, NY) 또는 폴리에틸렌 이민 (PEI, Polysciences, Warrington, PA)을 이용하여 HEK 293-6E 세포 안으로 일시적으로 함께 감염되었다. 상기 단백질들은 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 단일 단계로 정제되었다. 상기 2개 폴리펩티드의 발현 및 완전한 테트라머릭 분자의 조립체는 소듐 도데실설포네이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE) 및 사이즈 배제 크로마토그래피 (SEC)으로 확인되었다.

[0112] 추가로, 표준 단일클론성 항체 포맷(항-CD20 IgG1)으로 대조군 항-CD20을 제조하여 다른 Fc-Fab 포맷들과 비교하였다.

[0113] **2B)항원에 대한 Fc-Fab 전구체의 결합력**

[0114] 세포 표면의 CD20에 대한 결합력을 유지하는 Fc-G4S-항-CD20(VHCH1), Fc-G4S₄-항-CD20(VHCH1), Fc-G4S-항-CD20(LC), 및 Fc-G4S₄-항-CD20(LC)의 능력은, 인간 다우디 Burkitt's 림프종 세포에서 측정되었고, 웰 당 CD20. 1×10^5 다우디 세포를 발현하는 이 세포는 얼음 위에서 30min 동안 96 웰 플레이트 내에 PBS + 1% FBS으로 희석된 항-CD20/항-CD16 및 항-CD20의 농도를 변화시키면서 배양되었다. PBS + 1% FBS으로 세척한 후, 세포들을 얼음 위에서 30min 동안 PBS + 1% FBS 으로 1:200으로 희석된, TRITC F(ab')₂ 염소 항-인간 IgG, Fc γ (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)으로 배양하였다. 다시 세척한 후, 세포를 PBS의 1% 포름알데히드로 고정하였다. 세포들을 유세포 분석기(flow cytometry, Guava, EMD Millipore, Billerica, MA)로 분석하였다.

[0115] 결과들은, Fc-G4S-항-CD20(VHCH1) 및 Fc-G4S₄-항-CD20(VHCH1)이, 항-CD20 IgG1만큼은 작은 아닐지라도, CD20에 대한 결합력을 유지한다는 것을 나타낸다(도 4). 링커 길이를 증가시키는 것은 결합력을 증가시키는 것으로 나타나지만, 항-EGFR와 같은 정도로 증가시키는 것은 아니다(도 3). Fc-G4S-항-CD20(LC) 또는 Fc-G4S₄-항-CD20(LC) 중 어느 것도 CD20에 대한 결합력을 유지하지 않는다(도 4). 항-CD20 Fab는, Fc의 C-말단에 부착될 때, 특히 VL에 의해 부착될 때 세포 막에 발현된 CD20에 잘 결합하지 않는다. CD20는 막관통 단백질이고, 항-CD20만 세포의 루프에 결합한다. Fc는 작은 루프에 결합하는 C-말단 Fab의 접근성을 저해하는 경향이 있다. 보다 큰 세포의 도메인에 대한 항체, 예를 들어 항-EGFR에 대한 항체는 4가 이중특이적 항체를 위한 보다 나은 후보들이다.

[0116] **실시예 3**

[0117] **항-EGFR/항-CD16 및 항-CD16/항-EGFR**

[0118] **3A) TetBiAbs의 구성과 발현**

[0119] EGFR 및 CD16에 대한 TetBiAbs의 제조는 항-EGFR C225 (cetuximab) 단일클론성 항체 (Kawamoto, PNAS 80:1337, 1983) 및 항-CD16 3G8 단일클론성 항체 (Fleit et al, PNAS 79:3275, 1982)을 기초로 한다. C225를 위한 Fab L 사슬의 DNA 및 단백질 서열은 각각 SEQ ID NO:1 및 SEQ ID NO:2으로 제공된다. C225를 위한 Fab H 사슬의 DNA 및 단백질 서열은 각각 SEQ ID NO:3 및 SEQ ID NO:4으로 제공된다. 3G8을 위한 Fab L 사슬의 DNA 및 단백질 서열은 각각 SEQ ID NO:37 및 SEQ ID NO:38으로 제공된다. 3G8을 위한 Fab H 사슬의 DNA 및 단백질 서열은 각각 SEQ ID NO:39 및 SEQ ID NO:40으로 제공된다. EGFR 및 CD16 분자에 대한 2개 다른 TetBiAbs들이 제조되었다: (i) 항-EGFR/항-CD16, 여기서 항-EGFR H 사슬 폴리펩티드의 C-말단이 항-CD16 Fab L 사슬의 N-말단에 G4S 링커를 통해 연결되고 및 (ii) 항-CD16/항-EGFR, 여기서 항-CD16 H 사슬 폴리펩티드의 C-말단이 항-EGFR Fab L 사슬의 N-말단에 G4S 링커를 통해 사용가능하게 연결되었다.

[0120] 항-EGFR/항-CD16 TetBiAb의 발현을 위하여, 도 1에서처럼 다음 3개 유전자 구조체가 표준 재조합 DNA 기술에 의해 조립되었고, 포유류 발현 벡터 pTT5 (분비를 위한 마우스 L 사슬 신호 펩티드 서열을 포함) 안으로 복제되었다: 1) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VH(항-EGFR)-CH1-H-CH2-CH3-링커-VL(항-CD16)-CL (SEQ ID NO:41): 항

-EGFR H 사슬 가변 도메인, 이어서 효과기 침묵 IgG1.4로부터의 인간 H 사슬 불변 도메인 1-3(Armour et al, Eur J. Immunol. 29:2613, 1999에 설명된 돌연변이들을 가짐), 이어서 G4S 링커 및 항-CD16 L 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 kappa L 사슬 불변 도메인. 2) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VL(항-EGFR)-CL (SEQ ID NO:12): 항-EGFR L 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 kappa L 사슬 불변 도메인. 3) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VH(항-CD16)-CH1-H (SEQ ID NO:42): 항-CD16 H 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 H 사슬 불변 도메인 1, 이어서 힌지 영역 EPKSC (SEQ ID NO:10). 이들 3개 구조체들에 대응하는 아미노산 서열이 각각 SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:14, 및 SEQ ID NO:44로 나타낸다.

[0121]

항-CD16/항-EGFR TetBiAb의 발현을 위하여, 다음 3개 유전자 구조체가 표준 재조합 DNA 기술에 의해 조립되었고, 포유류 발현 벡터 pTT5 안으로 도 1에서 처럼 복제되었다: 1) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VH(항-CD16)-CH1-H-CH2-CH3-링커-VL(항-EGFR)-CL (SEQ ID NO:45): 항-CD16 H 사슬 가변 도메인, 이어서 효과기 침묵 IgG 1.4로부터의 인간 H 사슬 불변 도메인, 이어서 G4S 링커 및 항-EGFR L 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 kappa L 사슬 불변 도메인. 2) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VL(항-CD16)-CL (SEQ ID NO:46): 항-CD16 L 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 kappa L 사슬 불변 도메인. 3) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VH(항-EGFR)-CH1-H (SEQ ID NO:16): 항-EGFR H 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 H 사슬 불변 도메인 1, 이어서 힌지 영역 EPKSC (SEQ ID NO:10). 이들 3개 구조체들에 대응하는 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, 및 SEQ ID NO:18로 나타낸다.

[0122]

상기 3개 벡터의 각 세트는 항-EGFR/항-CD16 및 항-CD16/항-EGFR의 발현을 위하여 Genejuice (Life Technologies, Grand Island, NY) 또는 폴리에틸렌민 (PEI, Polysciences, Warrington, PA)을 사용하여 HEK 293-6E 세포 안으로 일시적으로 함께 감염되었다. 2개 TetBiAb는 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 단일 단계로 정제되었다. 3개 폴리펩티드의 발현 및 완전한 핵사머릭 분자의 조립체는 소듐 도데실설포네이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE) 및 사이즈 배제 크로마토그래피 (SEC)으로 확인되었다. SDS-PAGE을 위하여, 정제된 TetBiAbs 샘플이 DTT로 환원되고 NuPAGE MES 4-12% Gel, 200V으로 35min 동안 운전된 후 쿠마시 스테이닝(Coomassie staining)을 하였다.

[0123]

겔 상의 3개 주된 밴드들은 예상된 분자량(MW) 및 > 95% 순도를 갖는 정확한 화학양론 비를 갖는다 (도 5A). 도 5A에서, 레인 1은 분자량(MW) 마커를 나타내고, 레인 2는 항-CD16/항-EGFR의 3개 폴리펩티드의 예상된 MW (73.6, 23.8, 23.8 kDa) 및 정확한 화학양론 비(1:1:1)를 나타내고, 레인 3은 항-EGFR/항-CD16의 3개 폴리펩티드의 예상된 MW (73.3, 23.6, 23.3 kDa) 및 정확한 화학양론 비(1:1:1)를 나타낸다. SEC를 위해서, 정제된 TetBiAbs 샘플을, 50 mM 소듐 포스페이트, 400 mM 소듐 퍼클로레이트, pH 6.3 + 0.1 및 38+2.0 mS/cm²로 평형된 TSK-GEL Super SW3000 SEC column 4.6 x 300 mm (Tosoh Biosciences, Tokyo, Japan)으로 분석하였다. 사이즈 배제 크로마토그래피는 모노머릭 항-EGFR/항-CD16 및 항-CD16/항-EGFR 둘 다에 대해 약 250kDa의 예상 MW에서 피크를 나타내었다(도 5B).

[0124]

게다가, 수 많은 대조군들을 제조하여 TetBiAb 포맷과 비교 또는 최적화하였다. 이들은 표준 단일클론성 항체 포맷 (항-EGFR IgG1)의 항-EGFR 및 효과기 침묵 포맷 (항-EGFR IgG1.4)의 항-EGFR을 포함한다.

[0125]

3B) 항원에 대한 TetBiAb의 결합력

[0126]

EGFR에 대한 결합력을 유지하는 항-EGFR/항-CD16 및 항-CD16/항-EGFR의 능력은 경쟁 라디오리간드 결합 분석법에 의해 나타났다. 경쟁 항체는 ¹²⁵I-EGF (Perkin Elmer, Waltham, MA)과 혼합하고, EGFR을 과발현하는 인간 A431 편평상피암 세포로부터 제조된 막 2mg를 첨가하였다. A431 세포막은 질소 케비테이션에 의해 제조되었다. 세포들은 30min 동안 900psi의 N₂ 기체로 방해되었고, 이후 세포 용해물을 4°C에서 10min 동안 1000g으로 원심분리하였다. 상청액을 수집하고 4°C에서 1h 동안 100,000 g으로 원심분리하였다. 얻어진 펠렛을 다운스 호모지나이저로 재현탁하였다. 샘플의 단백질 농도는 BioRad 단백질 분석 시약을 사용하여 결정하였고, 샘플들을 나중 사용을 위해 -80°C에서 냉동 저장하였다. 비특이적-결합은 모든 EGFR 결합 사이트를 포화시키는 초대과량의 비표지된 EGF (100 nM)의 존재 내에서 결정되었다. 반응물들을 37°C에서 90min 동안 흔들면서 배양하였고, 유리 섬유 필터(EMD Millipore, Billerica, MA)를 통해 여과하여 중결하였다. 필터들을 세척하고 감마 계수기에서 계수하여 A431 세포막에 결합된 ¹²⁵I-EGF의 함량을 결정하였다.

[0127]

상기 결과들은 항-EGFR/항-CD16가 항-EGFR로서 A431 세포막 상의 EGFR에 대한 ¹²⁵I-EGF의 결합을 저해하는 유사 능력을 갖는다는 것을 나타낸다. 약간 더 높은 저해 상수(Ki)을 가지고 있음에도 불구하고, 항-CD16/항-EGFR가

또한 EGFR에 결합하였고, 또 다른 항체의 C-말단에 융합된 항-EGFR Fab가 EGFR에 대한 결합력을 유지하였다는 것을 나타낸다(도 6).

[0128] 3C) TetBiAb의 생물학적 활성

[0129] 항-EGFR/항-CD16 및 항-CD16/항-EGFR의 기능 및 유용성은, Mueller et al (J. Immunol. 144:1382, 1990)에 설명된 바와 같이 항체-의존적세포-매개세포독성 (ADCC) 분석법으로 더 나타났다. 3×10^6 인간 A431 편평상피암 세포는 37°C에서 45min 동안 300 μ Ci의 Na ⁵¹Cr (Perkin Elmer, Waltham, MA)으로 표지되었다. 세포를 세척한 후, 500 세포는, 0.25 - 1000 ng/ml의 농도로 제조항체의 계단 희석액(serial dilution)과 함께 96-웰 플레이트의 각 웰로 이송되었다. 특이적 세포 용해는 효과기 세포로 4시간 배양 후 측정하였다. 효과기 세포는 휴면 인간 말초혈액단핵세포(human peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) (효과기-대-표적 세포 비 100:1) 또는 자연 살해 (NK) 세포 (효과기-대-표적 세포 비 10:1)이었다. NK 세포는 MACS NK 세포 분리 Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany)을 가지고 PBMC들로부터 분리되었다. 총 방출가능한 방사능(최대 세포 용해)은 Triton 100 세제를 가지고 표적 세포를 세포 용해시켜 측정되었다. 배후 자발적 방출의 방사능이 단지 표적 세포만을 포함하는 웰에서 측정되었다. 특이적 세포 용해의 퍼센트는 실험값들로부터 배후 세포 용해를 빼고, 최대 세포 용해로 나누고, 100을 곱해서 계산되었다.

[0130] 효과기 침묵 IgG1.4의 Fc가 NK 세포상의 Fc γ RIII (CD16)와 결합할 수 없기 때문에, 이 분석법은 ADCC가 발생하는 2개 다른 세포 타입의 항원에 대한 TetBiAb의 동시 결합이 필요하다. 특히, 항-EGFR/항-CD16 및 항-CD16/항-EGFR가, 표적 A431 세포 상의 EGFR 및 효과기 NK 세포상의 CD16와 모두 결합하려면 A431 세포로부터의 Cr 방출 및 살해가 일어난다.

[0131] 상기 결과들은 효과기 침묵 Fc를 갖는 항-EGFR/항-CD16 및 항-CD16/항-EGFR 모두가 낮은 항체 농도에서 양성 대조군 항-EGFR IgG1보다 더 강력한 ADCC를 유도하였다는 것을 나타낸다(도 7). 두 개의 TetBiAbs에서 효과기 침묵 Fc가 관찰된 ADCC에 기여할 수 없기 때문에, 이 결과는 항-CD16에 의한 Fc γ RIII의 효과적인 결합을 암시한다. 실제로, 음성 대조군 항-EGFR IgG1.4는 또한 동일한 효과기-침묵 Fc를 포함하나 ADCC를 유도할 수 없었다(도 7). Fc γ RIII만을 특이적으로 그리고 선택적으로 결합하는 능력을 갖는 치료적 TetBiAb는, 지금까지 치료소에서 많은 치료적 IgG 1항체 투여가 투여 관련 반응의 "제1 복용 효과"를 야기할 수 있기 때문에 유리하다. 이들 반응들은 Fc γ RIII 및 다른 활성 수용체, 예를 들어 Fc γ RIIA에 대한 Fc의 동시 결합으로 인한 것으로 여겨지며, 가교 및 침투성 활성화(systemic activation)를 유도한다 (McCall et al, J Immunol. 166:6112, 2001).

[0132] **실시예4**

[0133] **항-CD20/항-CD16**

[0134] 4A) TetBiAb의 구성 및 발현

[0135] CD20 및 CD16에 대한 TetBiAb의 제조는 항-CD20 2B8 (rituximab) 단일클론성 항체 (Reff et al, Blood 83:435, 1994) 및 항-CD16 3G8 단일클론성 항체 (Fleit et al, PNAS 79:3275, 1982)을 기초로 한다. 2B8에 대한 Fab L 사슬의 DNA 및 단백질 서열은 각각 SEQ ID NO:21 및 SEQ ID NO:22로 나타낸다. 2B8에 대한 Fab H 사슬의 DNA 및 단백질 서열은 각각 SEQ ID NO:23 및 SEQ ID NO:24로 나타낸다. 3G8에 대한 Fab L 사슬의 DNA 및 단백질 서열이 SEQ ID NO:37 및 SEQ ID NO:38로 각각 나타낸다. 3G8에 대한 Fab H 사슬의 DNA 및 단백질 서열이 각각 SEQ ID NO: 39 및 SEQ ID NO:40으로 나타낸다. CD20 및 CD16에 대한 하나의 TetBiAb가 제조되었다: 항-CD20/항-CD16, 여기서 항-CD20 H 사슬 폴리펩티드의 C-말단이 항-CD16 Fab L 사슬의 N-말단에 G4S 링커를 통해 연결된다.

[0136] 항-CD20/항-CD16 TetBiAb의 발현을 위하여, 다음 3개 유전자 구조체들이 표준 제조항 DNA 기술로 조립되었고, 포유류 발현 벡터 pTT5 (분비를 위해 마우스 L 사슬 신호 펩티드 서열을 포함) 안으로, 도 1에서와 같이 복제되었다: 1) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VH(항-CD20)-CH1-H-CH2-CH3-링커-VL(항-CD16)-CL (SEQ ID NO:49): 항-CD20 H 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 H 사슬 불변 도메인 1-3 아이소타입 IgG1, 이어서 G4S 링커 및 항-CD16 L 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 kappa L 사슬 불변 도메인. 2) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VL(항-CD20)-CL (SEQ ID NO:26): 항-CD20 L 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 kappa L 사슬 불변 도메인. 3) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VH(항-CD16)-CH1-H (SEQ ID NO:50): 항-CD16 H 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 H 사슬 불변 도메인 1, 이어서 힌지 영역 EPKSC (SEQ ID NO:10). 이들 3개 구조체에 대응하는 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:28, 및 SEQ ID NO:52로 나타낸다.

[0137] 상기 3개 벡터들은 항-CD20/항-CD16의 발현을 위하여 Genejuice (Life Technologies, Grand Island, NY) 또는 PEI (Polysciences, Warrington, PA)을 사용하여 HEK 293-6E 세포 안으로 일시적으로 함께 감염되었다. 2개 TetBiAb가 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 단일 단계로 정제되었다. 3개 폴리펩티드의 발현 및 완전한 헥사머릭 분자의 조립체는 SDS-PAGE 및 SEC에서 확인되었다. SDS-PAGE를 위하여, 정제된 TetBiAbs 샘플은 DTT으로 환원되었고, NuPAGE MES 4-12% Gel, 200V으로 35 min 동안 운전하고, 이후 쿠마시 스테이닝을 행하였다. 겔 상의 3개의 주된 밴드들은 예상된 MW 및 > 95% 순도의 정확한 화학양론 비를 가졌다(도 8A). 도 8A에서, 라인 1은 분자량(MW) 마커를 나타내고, 라인 2는 항-CD20/항-CD16의 3개 폴리펩티드의 예상 MW(73.2, 23.1, 22.9 kDa) 및 정확한 화학양론비 (1:1:1)를 나타낸다. SEC를 위하여, 정제된 TetBiAbs 샘플은, 50 mM 소듐 포스페이트, 400 mM 소듐 퍼클로레이트, pH 6.3 + 0.1 및 38±2.0 mS/cm²으로 평형된 TSK-GEL Super SW3000 SEC column 4.6 _ 300 mm (Tosoh Biosciences, Tokyo, Japan)으로 분석되었다. 사이즈 배제 크로마토그래피는 모노머릭 항-CD20/항-CD16에 대해 약 250kDa의 예상 MW에서 피크를 나타냈다(도 8B).

[0138] 게다가, 표준 단일클론성 항체 포맷의 항-CD20(항-CD20 IgG1)가 대조군으로 제조되어 TetBiAb 포맷과 비교되었다.

[0139] **4B) 항원에 대한 TetBiAb의 결합력**

[0140] 세포 표면 상의 CD20에 대한 결합력을 유지하는 항-CD20/항-CD16의 능력은, 인간 라모스 부르크리트 림프종 세포에서 측정되었고, 이 세포는 CD20을 발현하나, CD16은 발현하지 않는다. 웰 당 1 x 10⁵ 라모스 세포는 얼음 위에서 30min 동안 96 웰 플레이트에서 PBS + 1% FBS으로 희석된 항-CD20/항-CD16 및 항-CD20의 농도를 변화시키면서 배양되었다. PBS + 1% FBS으로 세척한 후, 세포들은 얼음 위에서 30min 동안 PBS + 1% FBS으로 1:200으로 희석된 TRITC F(ab')₂ 염소 항-인간 IgG, Fc γ (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)으로 배양되었다. 다시 세척한 후, 세포들은 PBS의 1% 포름알데히드로 고정되었다. 세포들은 유세포 분석기(Guava, EMD Millipore, Billerica, MA)로 분석되었다.

[0141] 결과들은, 양성 대조군 항-CD20만큼은 아닐지라도, 항-CD20/항-CD16가 다우디 세포에 발현된 CD20에 결합한다는 것을 나타낸다(도 9). C-말단에서 항-CD16는 N-말단에서 다우디 세포에 대한 항-CD20의 결합력에 영향을 미쳤다는 것이 이론적으로 가능하지만, 보다 그럴듯한 설명은 C-말단에서 항-CD16 Fab가 검출 TRITC F(ab')₂ 염소 항-인간 IgG, Fc γ 에 대한 Fc의 접근성에 영향을 미쳤다는 기술적 설명이다.

[0142] **4C) TetBiAb의 생리 활성**

[0143] 항-CD20/항-CD16의 기능 및 이용성은 인간 라모스 부르크리트 림프종 세포를 이용하여 항체-의존적세포-매개세포독성 (ADCC) 분석법에 의해 더 나타났다. 2000 세포들은 0.05 ~ 200ng/ml 사이의 농도로 재조합 항체의 계단식 희석액과 함께 96-웰 플레이트의 각각에 옮겼다. 특이적 세포 용해는 자연 살해 (NK) 효과기세포 (작동 효과기-대-표적 세포 비 10:1)로 4-시간 배양 후 젖산 탈수소 효소(LDH) 방출을 통해 측정되었다. 상기 NK 세포는 MACS NK 세포 분리 Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany)를 가지고 휴면 인간 말초혈액단핵세포 세포들 (PBMCs)로부터 분리하였다. 총 방출가능한 LDH(최대 세포 용해)는 Triton 100 세제로 표적 세포들을 용해시켜 측정되었다. LDH의 배후 자발적 방출은 단지 표적 세포들만을 포함하는 웰 내에서 측정되었다. 특이적 세포 용해의 퍼센트는 실험값들로부터 배경 세포 용출을 빼고, 최대 세포 용해로 나눈 후 100을 곱해 계산되었다.

[0144] ADCC 결과들의 2개 그래프는 효과기 세포의 다른 공여체들을 사용한 것을 제외하고 유사하게 실행된 다른 실험들로부터의 데이터를 나타낸다. 항-EGFR/항-CD16과 달리 항-CD20/항-CD16는, 이의 IgG1 포맷으로 인하여, 효과기 세포 상의 CD16과 항-CD16의 결합없이 ADCC를 유도할 수 있었다. 그러나, 항-CD20/항-CD16으로 배양된 라모스 세포의 ADCC 유도가 10 배 증가된 것이 7개 공여체 중 4개 공여체로부터 효과기 세포를 갖는 항-CD20에 비교하여 관찰되었다(도 10, 상부 패널). 다른 3개 공여체를 가지고는, 항-CD20에 비교하여 항-CD20/항-CD16의 ADCC 증가는 미미하였다(도 10, 하부 패널). 이론과 결합없이, 이것은 FcRIIIA에서 다형성에 의한 것일 수 있다 (Cartron et al, 2002 Blood). Fc에 대한 결합친화성이 증가한, FcRIIIA의 158-발달에 대해 동형인 공여체에 대해, 이들의 FcRIIIA-갖는 NK 세포는, 도 10, 하부패널에 나타난 것처럼, ADCC 분석에서 항-CD16 결합보다 덜 이로우 것이라는 것이 가능하다.

[0145] **실시예 5**

[0146] **항-CD20/항-CD47**

- [0147] 5A) TetBiAb들의 구성 및 발현
- [0148] CD20 및 CD47에 대한 TetBiAb들의 제조는 항-CD20 2B8 (rituximab) 단일클론성 항체 (Reff et al, Blood 83:435, 1994) 및 항-CD47 B6H12 단일클론성 항체(Lindberg et al, JBC 269: 1567, 1994)을 기초로 한다. 2B8에 대한 Fab L 사슬의 DNA 및 단백질 서열이 각각 SEQ ID NO: 21 및 SEQ ID NO:22로 제공된다. 2B8에 대한 Fab H 사슬의 DNA 및 단백질 서열은 각각 NO:23 및 SEQ ID NO:24로 제공된다. B6H12에 대한 Fab L 사슬의 DNA 및 단백질 서열은 각각 SEQ ID NO: 53 및 SEQ ID NO:54으로 제공된다. B6H12에 대한 Fab H 사슬의 DNA 및 단백질 서열은 각각 SEQ ID NO: 55 및 SEQ ID NO:56으로 제공된다. CD20 및 CD47 분자에 대한 하나의 TetBiAb가 제조되었다: 항-CD20/항-CD47, 여기서 항-CD20 H 사슬 폴리펩티드의 C-말단이 항-CD47 Fab L 사슬의 N-말단에 G4S 링커를 통해 연결된다.
- [0149] 항-CD20/항-CD47 TetBiAb의 발현을 위하여, 도 1에서처럼, 다음 3개 유전자 구조체가 표준 재조합 DNA 기술에 의해 조립되고 포유류 발현 벡터 pTT5 (분비를 위해 마우스 L 사슬 신호 펩티드 서열을 포함) 안으로 복제되었다: 1) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VH(항-CD20)-CH1-H-CH2-CH3-링커-VL(항-CD47)-CL (SEQ ID NO:57): 항-CD20 H 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 H 사슬 불변 도메인 1-3 아이소타입 IgG1, 이어서 G4S 링커 및 항-CD47 L 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 kappa L 사슬 불변 도메인. 2) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VL(항-CD20)-CL (SEQ ID NO:26): 항-CD20 L 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 kappa L 사슬 불변 도메인. 3) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VH(항-CD47)-CH1-H (SEQ ID NO:58): 항-CD47 H 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 H 사슬 불변 도메인 1, 이어서 힌지 영역 EPKSC (SEQ ID NO:10). 이들 3개 구조체에 대응하는 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:28, 및 SEQ ID NO:60로 나타난다.
- [0150] 3개 벡터들은, 항-CD20/항-CD47의 발현을 위하여, Genejuice(Life Technologies, Grand Island, NY) 또는 폴리에틸렌이민(PEI, Polysciences, Warrington, PA)을 사용하여 HEK 293-6E 세포 안으로 일시적으로 함께 감염되었다. TetBiAb는 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 단일 단계로 정제되었다. 3개 폴리펩티드의 발현 및 완전한 핵사머릭 분자의 조립체는 SDS-PAGE 및 SEC에서 확인되었다. SDS-PAGE을 위해서, 정제된 TetBiAbs 샘플들은 DTT으로 환원되었고 NuPAGE MES 4-12% Gel, 200V으로 35 min 동안 운전되고, 쿠마시 스테이닝을 진행하였다. 겔 상의 3개의 주요 밴드는 >95% 순도를 갖고 예상한 MW 및 정확한 화학양론 비를 가졌다(도 11A). 도 11A에서, 레인 1은 분자량(MW) 마커를 나타내고, 레인 2는 항-CD20/항-CD47의 3개 폴리펩티드의 예상 MW(73.8, 23.4, 23.0 kDa) 및 정확한 화학양론비 (1:1:1)를 나타낸다. SEC를 위하여, 정제된 TetBiAbs 샘플은, 50 mM 소듐 포스페이트, 400 mM 소듐 퍼클로레이트, pH 6.3 + 0.1 및 38+2.0 mS/cm²으로 평형화된, TSK-GEL Super SW3000 SEC column 4.6 x 300 mm (Tosoh Biosciences, Tokyo, Japan)으로 분석되었다. 사이즈 배제 크로마토그래피는 모노머릭 항-CD20/항-CD47의 약 250 kDa의 예상 MW에서 피크를 나타내었다(도 11B).
- [0151] 게다가, 표준 단일클론성 항체 포맷의 항-CD20 및 항-CD47(항-CD20 IgG1 및 항-CD47 IgG1)는 TetBiAb 포맷과 비교하기 위해 대조군으로서 제조되었다.
- [0152] **5B) TetBiAb들의 결합력**
- [0153] (i) 항원에 대한 TetBiAb의 결합력
- [0154] 세포 표면에 발현된 두 개 항원들에 결합하는 항-CD20/항-CD47의 능력이 측정되었고, 2개 대조군 분자 항-CD20 및 항-CD47과 비교되었다. 웰 당 1×10^5 의 CD20으로 감염된 마우스 NS0 골수종 세포 또는 인간 U937 조직구 림프종 세포를, 얼음 위에서 30min 동안 96 웰 플레이트에서 PBS + 1% FBS으로 희석된 항체의 농도를 변화시키면서 배양되었다. PBS + 1% FBS으로 세척한 후, 얼음 위에서 30min 동안 PBS + 1% FBS으로 1:200으로 희석된 TRITC F(ab')₂ 염소 항-인간 IgG, Fc γ (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)으로 배양되었다. 다시 세척한 후, 세포들은 PBS의 1% 포르말데히드로 고정되었다. 세포들은 유세포 분석기(Guava, EMD Millipore, Billerica, MA)으로 분석되었다.
- [0155] 결과들은, CD47이 발현되지 않기 때문에, 항-CD20/항-CD47 및 항-CD20가 CD20-감염된 NS0 세포에 발현된 CD20에 결합하지만, 항-CD47이 NS0/CD20 세포에 결합하지는 않는다는 것을 나타낸다(도 12A). 실시예 4B에서 CD20에 대한 항-CD20/항-CD16의 결합력이 명백하게 감소된 이전에 관찰된 경우와 유사하게, C-말단의 항-CD47이 CD20에 대해 N-말단에서 항-CD20의 결합력에 영향을 미칠 것 같지 않다(도 12A). 보다 개연성 있는 설명은, C-말단의 항-CD47 Fab가 검출 TRITC F(ab')₂ 염소 항-인간 IgG, Fc γ 에 대한 Fc의 접근성에 영향을 미치게 되어, 도 12A에서 상기 관찰된 명백히 감소된 결합력의 결과를 가져온다. 항-CD20/항-CD47 및 항-CD47는 U937 세포에 결합하고 항-CD20은 U937 세포에 결합하지 않으며, U937 세포는 CD47을 발현하나 CD20을 발현하지 않는다(도 12B).

U937 세포에 대한 항-CD20/항-CD47의 결합력은 L 사슬 수단으로 Fc의 C-말단에 부착된, C-말단 Fab로서 항-CD47이 여전히 이의 항원을 인식할 수 있다는 것을 나타낸다(도 12B). 관찰된 결합력이 약간 감소된 것은 Fc의 C-말단에 부착될 때 항-EGFR Fab에 대해 관찰된 감소와 유사하다 (도 2 및 3).

[0156] (ii) 두 개 항원들을 발현하는 세포의 항-CD20/항-CD47 TetBiAb의 결합 활성

[0157] 세포 표면 상의 CD20 및 CD47에 대한 항-CD20/항-CD47의 결합력은 CD20을 과발현하고 CD47을 낮은 수준으로 발현하는 인간 SU-DHL4 B 세포 림프종 세포에서 측정되었다. 항-CD20/항-CD47, 항-CD20, 및 항-CD47는 Alexa Fluor® 488 카복실산, TFP 에스테르, bis (트리에틸암모늄 염) (Life Technologies, Grand Island, NY)으로 접합(conjugate)되었다. 웰 당 1×10^5 의 SU-DHL4 세포는 얼음 위에서 60min 동안 96웰 플레이트에서 PBS + 1% FBS으로 희석되고 Alexa 488-표지된 항-CD20/항-CD47, 항-CD20, 및 항-CD47의 농도를 변화시키면서 배양되었다. PBS + 1% FBS을 가지고 세척한 후, 세포들은 PBS의 1% 포름알데히드로 고정되었다. 세포들은 유세포 분석기(MACSQuant, Miltenyi Biotec, Cologne, Germany)으로 분석되었다.

[0158] 결과들은 SU-DHL4 세포에 대한 항-CD20/항-CD47 결합력이, 개별적으로 또는 조합하여 SU-DHL4 세포에 대한 항-CD20 또는 항-CD47의 결합력에 비하여 증가된 것을 보여주고 있으며(도 12C), 이는 결합 활성에 대한 강력한 증거를 제시한다. 낮은 중간값의 형광으로 증거된 것처럼, SU-DHL4 세포에 발현된 낮은 수준의 CD47가 항-CD47의 결합력을 얻었기 때문에 매우 놀랍다. 동일한 세포 상의 2개의 중앙 표적에 결합하는 것에 의해 중앙 세포에 대한 결합 활성을 제한하는 TetBiAb의 능력은 보다 특이적 표적화를 할 수 있게 하고 인비보(*in vivo*)에서 부작용을 낮추는 결과를 가져온다.

[0159] 5C) TetBiAb의 생리 활성

[0160] 항-CD20/항-CD47의 유용성은 인비보 실험에 의해 보여진다. 과증성 림프종 모델(disseminated lymphoma mode 1)에서, SCID 마우스에 5×10^6 CD20+ 인간 Raji 림프종 세포를 정맥 주사하고, 이어서 200 mg/마우스의 함량으로 항체 아이소타입 대조군(집단 1), 200 mg/마우스의 항-CD20(집단 2), 200 mg/마우스의 항-CD47 (집단 3), 200 mg/마우스의 항-CD20 및 200 mg/마우스의 항-CD47의 조합 (집단 4), 또는 4가 이중특이적 항체의 동일 몰 함량인 333 mg/마우스의 함량으로 항-CD20/항-CD47(집단 5)를 정맥 주사하였다. 모든 집단들(n=10)에 주마다 주사하였고 결과들은 마우스가 일반 건강, 예를 들어, 10-14일 앞서 죽기전 마비, 및 생존된 것으로 보고된다. 항-CD20/항-CD47 4가 이중특이적 항체 (집단 5)로 치료하는 것은, 적어도 병행 치료(집단 4)만큼 효능적이나 2개 단일치료법(집단 2 및 3)보다는 우수한 것으로 밝혀졌다.

[0161] 실시예 6

[0162] 항-CD20/항-CD52 및 항-CD52/항-CD20

[0163] 6A)TetBiAb의 구성 및 발현

[0164] CD20 및 CD52에 대한 TetBiAb의 제조는 항-CD20 2B8 (리튜시맵) 단일클론성 항체 (Reff et al, Blood 83:435, 1994) 및 항-CD52 Campath 단일클론성 항체 (James et al, JMB 289:293, 1999)를 기초로 한다. 2B8에 대한 Fab L 사슬의 DNA 및 단백질 서열은 각각 SEQ ID NO:21 및 SEQ ID NO:22로 제공된다. 2B8에 대한 Fab H 사슬의 DNA 및 단백질 서열은 각각 SEQ ID NO:23 및 SEQ ID NO:24으로 제공된다. Campath에 대한 Fab L 사슬의 DNA 및 단백질 서열은 각각 SEQ ID NO:61 및 SEQ ID NO:62으로 제공된다. Campath에 대한 Fab H 사슬의 DNA 및 단백질 서열은 각각 SEQ ID NO: 63 및 SEQ ID NO:64로 제공된다. CD20 및 CD52 분자에 대한 2개 다른 TetBiAb가 제조되었다: (i) 항-CD20/항-CD52, 여기서 항-CD20 H 사슬 폴리펩티드의 C-말단은 항-CD52 Fab L 사슬의 N-말단에 G4S 링커를 통해 연결되고, 및 (ii) 항-CD52/항-CD20, 여기서 항-CD52 H 사슬 폴리펩티드의 C-말단은 항-CD20 Fab L 사슬의 N-말단에 G4S 링커를 통해 연결된다.

[0165] 항-CD20/항-CD52 TetBiAb의 발현을 위하여, 다음 3개 유전자 구조체들은 표준 재조합 DNA 기술에 의해 조립되고, 포유류 발현 벡터 pTT5 (분비를 위해 마우스 L 사슬 신호 펩티드 서열을 포함)안으로 복제되었고, 도 1에 도시된 바와 같다: 1) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VH(항-CD20)-CH1-H-CH2-CH3-링커-VL(항-CD52)-CL (SEQ ID NO:65): 항-CD20 H 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 H 사슬 불변 도메인 1-3 아이소타입 IgG1, 이어서 G4S 링커 및 항-CD52 L 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 kappa L 사슬 불변 도메인. 2) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VL(항-CD20)-CL (SEQ ID NO:26): 항-CD20 L 사슬 가변 도메인, 인간 kappa L 사슬 불변 도메인. 3) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VH(항-CD52)-CH1-H (SEQ ID NO:66): 항-CD52 H 사슬 가변 도메인, 인간 H 사슬 불변 도메인 1, 이어서 힌지 영역 EPKSC (SEQ ID NO:10). 이들 3개 구조체들에 대응하는 아미노산 서열은 각

각 SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:28, 및 SEQ ID NO:68로 나타낸다.

[0166] 항-CD52/항-CD20 TetBiAb의 발현을 위하여, 다음 3개 유전자 구조체는 표준 재조합 DNA 기술에 의해 조립되고, 포유류 발현 벡터 pTT5 (분비를 위하여 마우스 L 사슬 신호 펩티드 서열을 포함) 안으로 복제되고, 도 1에 도시된 바와 같다: 1) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VH(항-CD52)-CH1-H-CH2-CH3-링커-VL(항-CD20)-CL (SEQ ID NO:69): 항-CD52 H 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 H 사슬 불변 도메인 1-3 아이소타입 IgG1, 이어서 G4S 링커 및 항-CD20 L 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 kappa L 사슬 불변 도메인. 2) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VL(항-CD52)-CL (SEQ ID NO:70): 항-CD52 L 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 kappa L 사슬 불변 도메인. 3) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VH(항-CD20)-CH1-H (SEQ ID NO:32): 항-CD20 H 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 H 사슬 불변 도메인 1, 이어서 힌지 영역 EPKSC (SEQ ID NO:10). 이들 3개 구조체에 대응하는 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, 및 SEQ ID NO:34로 나타낸다.

[0167] 상기 3개 벡터들 각 세트는, 항-CD20/항-CD52 및 항-CD52/항-CD20의 발현을 위하여, Genejuice (Life Technologies, Grand Island, NY) 또는 폴리에틸렌민 (PEI, Polysciences, Warrington, PA)을 사용하여 HEK 293-6E 세포들 안으로 일시적으로 함께 감염되었다. 2개 TetBiAb는 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 단일 단계로 정제되었다. 이 3개 폴리펩티드의 발현 및 완전한 헥사머릭 분자의 조립체는 소듐 도데실설포네이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE) 및 사이즈 배제 크로마토그래피 (SEC)로 확인되었다. SDS-PAGE을 위하여, 정제된 TetBiAbs 샘플은 DTT으로 환원되었고, NuPAGE MES 4-12% Gel, 200V으로 35 min 동안 운전되고, 이어서 쿠마시 스테이닝을 진행하였다. 겔 상의 3개 주요 밴드는 > 95%의 순도를 가지고 예상된 분자량(MW) 및 정확한 화학양론비를 가졌다(도 13A). 도 13A에서, 레인 1은 분자량 (MW) 마커를 나타내고, 레인 2는 항-CD20/항-CD52의 3개 폴리펩티드의 예상된 MW(73.0, 23.4, 23.1 kDa) 및 정확한 화학양론비 (1:1:1)를 나타내고, 레인 3은 항-CD52/항-CD20의 3개 폴리펩티드의 예상된 MW (72.7, 23.5, 23.2 kDa) 및 정확한 화학양론비 (1:1:1)를 나타낸다. SEC를 위해, 정제된 TetBiAbs 샘플은 a TSK-GEL Super SW3000 SEC 컬럼 4.6 _ 300 mm (Tosoh Biosciences, Tokyo, Japan)으로 분석되었고, 이는 50 mM 소듐 포스페이트, 400 mM 소듐 퍼클로레이트, pH 6.3 + 0.1 및 38±2.0 mS/cm²으로 평형되었다. 사이즈 배제 크로마토그래피는 모노머릭 항-CD20/항-CD52 및 항-CD52/항-CD20 둘 다에 대하여 약 250 kDa의 예상된 MW에서 피크를 나타내었다(도 13B).

[0168] 게다가, 수 많은 대조군들을 제조하여 TetBiAb 포맷과 비교 또는 최적화하였다. 이들은 표준 단일클론성 항체 포맷으로 항-CD20 및 항-CD52(항-CD20 IgG1 및 항-CD52 IgG1)를 포함한다.

[0169] **6B) 항원에 대한 TetBiAb의 결합력**

[0170] 세포 표면 위에 발현된 CD20 및 CD52 둘 다와 결합하는 항-CD20/항-CD52 및 항-CD52/항-CD20의 능력이 측정되었고, 2개의 대조군 분자 항-CD20 및 항-CD52와 비교되었다. 웰 당 1×10^5 의 인간 다우디 Burkitt's 림프종 세포 또는 인간 Kasumi-3 급성 골수아구성 백혈병 세포(myeloblastic leukemia cell)는 얼음 위에서 30min 동안 96 웰 플레이트에 PBS + 1% FBS으로 희석된 항체의 농도를 변화시키면서 배양되었다. PBS + 1% FBS으로 세척한 후, 세포들은, 얼음 위에서 30분 동안 PBS + 1% FBS으로 1:200으로 희석된 TRITC F(ab')₂ 염소 항-인간 IgG, Fc γ (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)으로 배양되었다. 다시 세척한 후, 세포들이 PBS의 1% 포름알데히드로 고정되었다. 세포들은 유세포 분석기(Guava, EMD Millipore, Billerica, MA)로 분석되었다.

[0171] 상기 결과들은 CD20은 발현하나 CD52는 발현하지 않는 다우디 세포에, 항-CD20/항-CD52 및 항-CD20은 결합하고, 항-CD52/항-CD20 및 항-CD52는 결합하지 않는다는 것을 나타낸다(도 14A). 더욱이, CD52는 발현하나 CD20은 발현하지 않는 Kasumi-3 세포에 항-CD52/항-CD20 및 항-CD52는 결합하고, 항-CD20/항-CD52 및 항-CD20은 결합하지 않는 것을 나타낸다(도 14B).

[0172] 이들 결과들은, 항-CD20 Fab가 Fab L 사슬을 통해 Fc 영역의 C-말단에서 부착될 때 세포막에 발현된 CD20과 결합하지 않는다는 것을 나타내는 도 4의 결과와 일치한다. CD52 및 CD20 둘 다는 작은 세포외 도메인을 포함하는 막관통 단백질이고, 항-CD20 및 항-CD52는 단지 세포외 루프(extracellular loop)에 결합한다. Fc 영역이 상기 작은 루프에 결합하는 C-말단 Fab의 접근성을 방해하는 경향이 있다. 실시예를 통해, 이 표적들의 조합은 도 1C 및 도 1D에 설명된 다른 형태의 TetBiAb에 대한 우수한 후보자일 수 있다. 실시예 2에서, 이것은 Fab H 사슬을 통해 Fc 영역의 C-말단에 부착될 때 항-CD20 Fab가 결합성을 유지하였으나 L 사슬을 통해 부착되었을 때는 그렇지 않았다는 것을 보여줬다. 그러므로, 항-CD20 Fab는 Fab H 사슬을 통해 Fc 영역의 C-말단에 부착되고, 항-CD52 Fab는 L 사슬(표준 단일클론성 항체 포맷에서처럼 CH1을 통해서 보다는)을 통해 Fc 영역의 N-말단에 부착된다. 양 항원에 대한 얻어진 항-CD52/항-CD20의 결합력이 시험된다. L 사슬을 통해 Fc 영역의 N-말단에 부착된

항-CD20 Fab(Schaefer et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 108:11187, 2011) 및 Fab H 사슬을 통해 Fc 영역의 C-말단에 부착된 항-CD52 Fab를 가지고 추가 가공 및 시험을 또한 진행하였다.

실시예 7

Fc-항-CD47 전구체 분자

7A) Fc-Fab 전구체의 구성 및 발현

Fc-항-CD47의 제조는 항-CD47 B6H12 단일클론성 항체 (Lindberg et al, JBC 269: 1567, 1994)을 기초로 한다. B6H12에 대한 Fab L 사슬의 DNA 및 단백질 서열은 각각 SEQ ID NO:53 및 SEQ ID NO:54으로 제공된다. B6H12에 대한 Fab H 사슬의 DNA 및 단백질 서열은 각각 SEQ ID NO:55 및 SEQ ID NO:56으로 제공된다. 2개의 다른 Fc-CD47 분자가 제조되었다: (i) Fc-(G4S)₄-항-CD47(VHCH1), 여기서 Fc H 사슬의 C-말단이 항-CD47 Fab H 사슬의 N-말단에 (G4S)₄ 링커를 통해 연결되고, 및 (ii) Fc-(G4S)₄-항-CD47(LC), 여기서 Fc 영역 H 사슬의 C-말단이 항-CD47 Fab L 사슬의 N-말단에 (G4S)₄ 링커를 통해 연결된다.

Fc-(G4S)₄-항-CD47(VHCH1)의 발현을 위하여, 다음 2개 유전자 구조체가 표준 재조합 DNA 기술에 의해 조립되고, 포유류 발현 벡터 pTT5 (분비를 위해 마우스 L 사슬 신호 펩티드 서열을 포함)으로 복제되었다: 1) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 H-CH2-CH3-(G4S)₄-VH(항-CD47)-CH1-H (SEQ ID NO:73): 세린으로 돌연변이된 시스테인(자연적으로 L 사슬과 디설파이드 결합을 형성함)을 갖는 인간 H 사슬 힌지 영역, (EPKSS, SEQ ID NO:8), 이어서 불변 도메인 2 및 3, 이어서 (G4S)₄ 링커, 및 항-CD47 H 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 H 사슬 불변 도메인 1, 이어서 힌지 영역 (EPKSC, SEQ ID NO:10, 항-CD47 L 사슬과 디설파이드 브릿지를 형성할 수 있게 함); 및 2) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VL(항-CD47)-CL (SEQ ID NO:74): 항-CD47 L 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 kappa L 사슬 불변 도메인. 이들 2개 구조체들에 대응하는 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO:75 및 SEQ ID NO:76로 나타난다.

Fc-(G4S)₄-항-CD47(LC)의 발현을 위하여, 다음 2개 유전자 구조체가 표준 재조합 DNA 기술로 조립되고, 포유류 발현 벡터 pTT5 (분비를 위하여 마우스 L 사슬 신호 펩티드 서열을 포함) 안으로 복제되었다: 1) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 H-CH2-CH3-(G4S)₄-VL(항-CD47)-CL (SEQ ID NO:77): 인간 H 사슬 힌지 영역 EPKSC (SEQ ID NO:8), 이어서 불변 도메인 2 및 3, 이어서 (G4S)₄ 링커, 및 항-CD47 L 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 kappa L 사슬 불변 도메인; 및 2) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VH(항-CD47)-CH1-H (SEQ ID NO:58): 항-CD47 H 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 H 사슬 불변 도메인 1, 이어서 힌지 영역 EPKSC (SEQ ID NO:10). 이들 2개 구조체에 대응하는 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO:78 및 SEQ ID NO:60로 나타난다.

2개 벡터들의 각 세트는, Fc-(G4S)₄-항-CD47(VHCH1) 및 Fc-(G4S)₄-항-CD47(LC)의 발현을 위하여, Genejuice (Life Technologies, Grand Island, NY) 또는 폴리에틸렌이민 (PEI, Polysciences, Warrington, PA)을 사용하여 HEK 293-6E 세포 안으로 일시적으로 함께 감염되었다. 단백질은 단백질 A 친화성 크로마토그래피로 단일 단계로 정제되었다. 2개 폴리펩티드의 발현 및 완전한 테트라머릭 분자의 조립체는 소듐 도데실설포네이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE) 및 사이즈 배제 크로마토그래피 (SEC)에서 확인되었다.

게다가, 표준 단일클론성 항체 포맷의 대조군 항-CD47(항-CD47 IgG1)을 제조하여 다른 Fc-Fab 포맷들과 비교하였다.

7B) 항원에 대한 Fab 전구체의 결합력

CD47에 결합하는 Fc-(G4S)₄-항-CD47(VHCH1) 및 Fc-(G4S)₄-항-CD47(LC)의 능력은 ELISA를 통해 측정되고, 대조군 분자 항-CD47와 비교되었다. 인간 CD47은 4°C에서 밤새 96 웰 플레이트 위에 코팅되었다. PBST로 세척한 후, 웰들은 실온에서 1hr 동안 PBST + 2% BSA으로 차단되었다. PBST로 세척한 후, PBST + 2% BSA으로 희석된 항체의 농도를 변화시키면서 웰에 첨가되었고 1hr 동안 실온에서 배양되었다. PBST로 세척한 후, PBST + 2% BSA 으로 1:10000으로 희석된 HRP-접합된 염소 항-인간 IgG Fc γ (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)을 상기 웰에 첨가하고, 실온에서 1hr 동안 배양하였다. 결합된 항체는 HRP 기질, 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (TMB)로 가시화되었다. 플레이트는 45nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과들은 Fc-(G4S)₄-항-CD47(VHCH1) 및 Fc-(G4S)₄-항-CD47(LC)가, 항-CD47 IgG1만큼은 아니라 할지라도, CD47에 대한 결합력을 유지하는 것을 나타낸다(도 15).

[0183]

실시예 8

[0184]

항-EGFR/항-CD47 및 항-CD47/항-EGFR

[0185]

8A) TetBiAb의 구성 및 발현

[0186]

EGFR 및 CD47에 대한 TetBiAb의 제조는 항-EGFR C225 (cetuximab) 단일클론성 항체 (Kawamoto, PNAS 80:1337, 1983) 및 항-CD47 B6H12 단일클론성 항체 (Lindberg et al, JBC 269: 1567, 1994)를 기초로 한다. C225에 대한 Fab L 사슬의 DNA 및 단백질 서열은 각각 SEQ ID NO:1 및 SEQ ID NO:2로 제공된다. C225에 대한 Fab H 사슬의 DNA 및 단백질 서열은 각각 SEQ ID NO:3 및 SEQ ID NO:4로 제공된다. B6H12에 대한 Fab L 사슬의 DNA 및 단백질 서열은 각각 SEQ ID NO:53 및 SEQ ID NO:54로 제공된다. B6H12에 대한 Fab H 사슬의 DNA 및 단백질 서열은 각각 SEQ ID NO:55 및 SEQ ID NO:56로 제공된다. EGFR 및 CD47 분자에 대한 2개의 다른 TetBiAb가 발생되었다: (i) 항-EGFR/항-CD47, 여기서 항-EGFR H 사슬 폴리펩티드의 C-말단은 항-CD47 Fab L 사슬의 N-말단에 (G4S)₄ 링커를 통해 연결되고, 및 (ii) 항-CD47/항-EGFR, 여기서 항-CD47 H 사슬 폴리펩티드의 C-말단은 항-EGFR Fab L 사슬의 N-말단에 (G4S)₄ 링커를 통해 연결된다.

[0187]

항-EGFR/항-CD47 TetBiAb의 발현을 위하여, 다음 3개 유전자 구조체가 표준 재조합 DNA 기술에 의해 조립되었고, 포유류 발현 벡터 pTT5 (분비를 위해 마우스 L 사슬 신호 펩티드 서열을 포함) 안으로 복제되었으며, 도 1에 도시된 바와 같다: 1) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VH(항-EGFR)-CH1-H-CH2-CH3-(G4S)₄-VL(항-CD47)-CL (SEQ ID NO:79): 항-EGFR H 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 H 사슬 불변 도메인 1-3, 이어서 (G4S)₄ 링커 및 항-CD47 L 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 kappa L 사슬 불변 도메인. 2) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VL(항-EGFR)-CL (SEQ ID NO:12): 항-EGFR L 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 kappa L 사슬 불변 도메인. 3) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VH(항-CD47)-CH1-H (SEQ ID NO:58): 항-CD47 H 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 H 사슬 불변 도메인 1, 이어서 힌지 영역 EPKSC (SEQ ID NO:10). 이들 3개 구조체에 대응하는 아미노산 SEQ ID NO:는 각각 SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:14, 및 SEQ ID NO:60로 나타낸다.

[0188]

항-CD47/항-EGFR TetBiAb의 발현을 위하여, 다음 3개 유전자 구조체가 표준 재조합 DNA 기술에 의해 조립되었고, 포유류 발현 벡터 pTT5안으로 복제되었으며, 도 1에 도시된 바와 같다: 1) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VH(항-CD47)-CH1-H-CH2-CH3-(G4S)₄-VL(항-EGFR)-CL (SEQ ID NO:81): 항-CD47 H 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 H 사슬 불변 도메인 1-3, 이어서 (G4S)₄ 링커 및 항-EGFR L 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 kappa L 사슬 불변 도메인. 2) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VL(항-CD47)-CL (SEQ ID NO:74): 항-CD47 L 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 kappa L 사슬 불변 도메인. 3) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VH(항-EGFR)-CH1-H (SEQ ID NO:16): 항-EGFR H 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 H 사슬 불변 도메인 1, 이어서 힌지 영역 EPKSC (SEQ ID NO:10). 이들 3개 구조체에 대응하는 아미노산 SEQ ID NO:는 각각 SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:76, 및 SEQ ID NO:18로 나타낸다.

[0189]

상기 3개 벡터들의 각 세트는 항-EGFR/항-CD47 및 항-CD47/항-EGFR의 발현을 위하여, Expi293fectin (Life Technologies, Grand Island, NY)을 사용하여 Expi293 세포 안으로 일시적으로 함께 감염되었다. 2개 TetBiAb는 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 단일 단계로 정제되었다. 3개 폴리펩티드의 발현 및 완전한 헥사머릭 분자의 조립체는 소듐 도데실설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE) 및 사이즈 배제 크로마토그래피 (SEC)에서 확인되었다. SDS-PAGE을 위하여, 정제된 TetBiAbs 샘플은 DTT 으로 환원되었고, NuPAGE MES 4-12% Gel, 200V으로 35 min 동안 운전되고, 이어서 쿠마시 스테이닝을 행하였다. 겔 상의 3개 주요 밴드들은 > 95% 순도를 갖고 예상된 분자량(MW) 및 정확한 화학양론비를 가졌다(도 16A). 도 16A에서, 레인 1은 분자량(MW) 마커, 레인 2는 항-CD47/항-EGFR의 3개 폴리펩티드의 예상된 MW (74, 24, 23 kDa) 및 정확한 화학양론비 (1:1:1)를 나타내고, 및 레인 3는 항-EGFR/항-CD47의 3개 폴리펩티드의 예상된 MW (74, 23, 23 kDa) 및 정확한 화학양론비 (1:1:1)를 나타낸다. SEC를 위하여, 정제된 TetBiAbs 샘플은 TSK-GEL Super SW3000 SEC column 4.6 - 300 mm (Tosoh Biosciences, Tokyo, Japan)으로 분석되었고, 50 mM 소듐 포스페이트, 400 mM 소듐 클로라이드, pH 6.3 + 0.1 및 38+2.0 mS/cm²으로 평형화되었다. 사이즈 배제 크로마토그래피는 모노머릭 항-EGFR/항-CD47 및 항-CD47/항-EGFR 둘 다에 대하여 약 250kDa의 예상된 MW에서 피크를 나타냈다 (도 16B).

[0190]

게다가, 수 많은 대조군들을 제조하여 TetBiAb 포맷과 비교하거나 또는 최적화하였다. 이들은 표준 단일클론성 항체 포맷의 항-EGFR(항-EGFR IgG1) 및 표준 단일클론성 항체 포맷의 항-CD47(항-CD47 IgG1)을 포함한다.

- [0191] **8B) TetBiAb의 결합력**
- [0192] **(i) 항원에 대한 TetBiAb의 결합력**
- [0193] CD47에 대한 결합력을 유지하는 항-EGFR/항-CD47 및 항-CD47/항-EGFR의 능력은 ELISA에 의해 측정되었다. 인간 CD47는 4°C에서 밤새 96 웰 플레이트 위에 코팅되었다. PBST로 세척한 후, 상기 웰들은 실온에서 1hr 동안 PBST + 2% BSA으로 차단되었다. PBST로 세척한 후, PBST + 2% BSA 으로 희석된 항체의 농도를 변화시키면서 상기 웰에 첨가되었고, 실온에서 1h 동안 배양되었다. PBST으로 세척한 후, PBST + 2% BSA 으로 1: 10000으로 희석된 HRP-접합된 염소 항-인간 IgG Fc γ (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)을 웰에 첨가하고 실온에서 1hr 동안 배양하였다. 결합된 항체는 HRP 기질, 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (TMB)으로 가시화되었다. 상기 플레이트는 450nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0194] 상기 결과들은 항-CD47와 유사하게 항-CD47/항-EGFR가 CD47에 대한 결합력을 유지하는 것을 나타낸다. 항-EGFR/항-CD47는 또한 항-CD47만큼 잘 결합하는 것은 아닐지라도 CD47에 대한 결합력을 유지한다(도 17A).
- [0195] EGFR에 대한 결합력을 유지하는 항-EGFR/항-CD47 및 항-CD47/항-EGFR의 능력은 ELISA으로 측정되었다. 인간 EGFR은 4°C에서 밤새 96 웰 플레이트 위에 코팅되었다. PBST로 세척한 후, 상기 웰들은 실온에서 1hr 동안 PBST + 2% BSA으로 차단되었다. PBST으로 세척한 후, PBST + 2% BSA으로 희석된 항체의 농도를 변화시키면서 상기 웰에 첨가되었고, 실온에서 1hr 동안 배양되었다. PBST으로 세척한 후, PBST + 2% BSA으로 1: 10000으로 희석된 HRP-접합된 염소 항-인간 IgG Fc γ (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)을 각 웰에 첨가하고 실온에서 1hr 동안 배양하였다. 결합된 항체는 HRP 기질, 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (TMB)으로 가시화되었다. 상기 플레이트는 450nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0196] 결과들은, 항-EGFR과 유사하게, 항-EGFR/항-CD47가 EGFR에 대한 결합력을 유지한다는 것을 나타낸다. 항-CD47/항-EGFR은 또한, 항-EGFR만큼 잘 결합하는 것은 아닐지라도, EGFR에 대한 결합력을 유지한다(도 17B).
- [0197] (ii) 양 항원들을 발현하는 세포 상의 항-EGFR/항-CD47 TetBiAb 의 결합 활성.
- [0198] 세포 표면 상의 EGFR 및 CD47에 대한 결합 활성을 갖는 항-EGFR/항-CD47의 능력은 인간 A431 편평상피암 세포에서 측정되었고, 이 세포는 EGFR을 과발현하고 CD47을 발현한다. 항-EGFR/항-CD47, 항-EGFR, 및 항-CD47는 Alexa Fluor® 488 카복실산, TFP 에스테르, bis (트리에틸암모늄 염) (Life Technologies, Grand Island, NY)과 접합되었다. 웰 당 1×10^5 A431 세포는 얼음 위에서 60분 동안 PBS + 1% FBS으로 희석된, Alexa 488-표지된 항-EGFR/항-CD47, 항-EGFR, 및 항-CD47의 농도를 변화시키면서 배양되었다. PBS + 1% FBS으로 세척한 후, 세포들은 PBS의 1% 포름알데히드로 고정되었다. 세포들은 유세포 분석기(MACSQuant, Miltenyi Biotec, Cologne, Germany)로 분석되었다.
- [0199] 결과들은 A431 세포에 대한 항-EGFR/항-CD47 결합력이, 개별적 또는 조합하여 A431 세포에 대한 항-EGFR 또는 항-CD47의 결합력에 비하여 증가되어, 결합 활성의 강력한 증거를 제시한다. 동일 세포 상의 2개 종양 표적들에 결합하는 것에 의해 종양 세포에 대한 결합 활성을 저지하는 TetBiAb의 능력은 인비오에서 보다 특이적 표적화와 낮은 부작용이라는 결과를 가져온다.
- [0200] **실시예 9**
- [0201] **항-HER 2/항-CD47 및 항-CD47/항-HER 2**
- [0202] **9A) TetBiAb의 구성 및 발현**
- [0203] HER2 및 CD47에 대한 TetBiAb의 제조는 항-HER2 4D5 (trastuzumab) 단일클론성 항체(Carter et al, PNAS 89: 4285, 1992) 및 the 항-CD47 B6H12 단일클론성 항체(Lindberg et al, JBC 269: 1567, 1994)를 기초로 한다. 4D5에 대한 Fab L 사슬의 DNA 및 단백질 서열은 각각 SEQ ID NO:83 및 SEQ ID NO:84으로 제공된다. 4D5에 대한 DNA 및 단백질 서열은 각각 SEQ ID NO:85 및 SEQ ID NO:86으로 제공된다. B6H12에 대한 Fab L 사슬의 DNA 및 단백질 서열은 각각 SEQ ID NO:53 및 SEQ ID NO:54으로 제공된다. B6H12에 대한 Fab H 사슬의 DNA 및 단백질 서열은 각각 SEQ ID NO:55 및 SEQ ID NO:56으로 제공된다. HER2 및 CD47 분자에 대한 2개 다른 TetBiAb가 제조되었다: (i) 항-HER2 H 사슬 폴리펩티드의 C-말단이 항-CD47 Fab L 사슬의 N-말단에 (G4S)₄ 링커를 통해 연결된, 항-HER2/항-CD47, 및 (ii) 항-CD47 H 사슬 폴리펩티드의 C-말단이 항-HER2 Fab L 사슬의 N-말단에 (G4S)₄ 링커를 통해 연결된, 항-CD47/항-HER2.

[0204] 항-HER2/항-CD47 TetBiAb의 발현을 위하여, 다음 3개 유전자 구조체가 표준 재조합 DNA 기술로 조합되었고, 포유류 발현 벡터 pTT5 (분비를 위하여 마우스 L 사슬 신호 펩티드 서열을 포함) 안으로 복제되었고, 도 1에 도시된 바와 같다: 1) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VH(항-HER2)-CH1-H-CH2-CH3-(G4S)₄-VL(항-CD47)-CL (SEQ ID NO:87): 항-HER2 H 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 H 사슬 불변 도메인 1-3, 이어서 (G4S)₄ 링커 및 항-CD47 L 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 kappa L 사슬 불변 도메인; 2) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VL(항-HER2)-CL (SEQ ID NO:88): 항-HER2 L 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 kappa L 사슬 불변 도메인. 3) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VH(항-CD47)-CH1-H (SEQ ID NO:58): 항-CD47 H 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 H 사슬 불변 도메인 1, 이어서 힌지 영역 EPKSC (SEQ ID NO:10). 이들 3개 구조체에 대응하는 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:90, 및 SEQ ID NO:60로 나타난다.

[0205] 항-CD47/항-HER2 TetBiAb의 발현을 위하여, 다음 3개 유전자 구조체는 표준 재조합 DNA 기술에 의해 조립되었고, 포유류 발현 벡터 pTT5 안으로 복제되었고, 도 1에 도시된 것과 같다: 1) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VH(항-CD47)-CH1-H-CH2-CH3-(G4S)₄-VL(항-HER2)-CL (SEQ ID NO:91): 항-CD47 H 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 H 사슬 불변 도메인 1-3, 이어서 (G4S)₄ 링커 및 항-HER2 L 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 kappa L 사슬 불변 도메인. 2) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VL(항-CD47)-CL (SEQ ID NO:74): 항-CD47 L 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 kappa L 사슬 불변 도메인. 3) 다음 요소들을 암호화하는 구조체 VH(항-HER2)-CH1-H (SEQ ID NO:92): 항-HER2 H 사슬 가변 도메인, 이어서 인간 H 사슬 불변 도메인 1, 이어서 힌지 영역 EPKSC (SEQ ID NO:10). 이들 3개 구조체에 대응하는 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO:93, SEQ ID NO:76 및 SEQ ID NO: 94로 나타난다.

[0206] 상기 3개 벡터의 각 세트는 항-HER2/항-CD47 및 항-CD47/항-HER2의 발현을 위하여, Expi293fectin (Life Technologies, Grand Island, NY)을 사용하여 Expi293 세포 안으로 일시적으로 함께 감염되었다. 2개 TetBiAb는 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 단일 단계로 정제되었다. 3개 폴리펩티드의 발현 및 완전한 헥사머릭 분자의 조립체는 소듐 도데실설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE) 및 사이즈 배제 크로마토그래피 (SEC)에서 확인되었다. SDS-PAGE를 위해서, 정제된 TetBiAbs 샘플은 DTT으로 환원되고, NuPAGE MES 4-12% Gel, 200V으로 35 min 동안 운전되고, 이어서 쿠마시 스테이닝이 진행되었다. 겔 상의 3개의 주요 밴드는 > 95% 순도를 갖고 예상된 분자량 (MW) 및 정확한 화학양론비를 갖는다 (도 18A). 도 18A에서, 라인 1은 분자량 (MW) 마커를 나타내고, 라인 2는 항-HER2/항-CD47의 3개 폴리펩티드의 예상된 MW (74, 23, 23 kDa) 및 정확한 화학양론비 (1:1:1)를 나타내고, 및 라인 3는 항-CD47/항-HER2의 3개 폴리펩티드의 예상된 MW (74, 24, 23 kDa) 및 정확한 화학양론비 (1:1:1)를 나타낸다. SEC를 위하여, 정제된 TetBiAbs 샘플은 TSK-GEL Super SW3000 SEC column 4.6 x 300 mm (Tosoh Biosciences, Tokyo, Japan)에서 분석되었고, 이는 50 mM 소듐 포스페이트, 400 mM 소듐 퍼클로레이트, pH 6.3 + 0.1 및 38±2.0 mS/cm²으로 평형화되었다. 사이즈 배제 크로마토그래피는 모노머릭 항-HER2/항-CD47 및 항-CD47/항-HER2 둘 다에 대해 약 260kDa의 예상된 MW에서 피크를 나타내었다(도 18B).

[0207] 게다가, 수 많은 대조군들을 제조하여 TetBiAb 포맷과 비교하거나 또는 최적화하였다. 이들은 표준 단일클론성 항체 포맷 (항-HER2 IgG1)에서 항-HER2 및 표준 단일클론성 항체 포맷 (항-CD47 IgG1)에서 항-CD47을 포함한다.

[0208] **9B) 항원에 대한 TetBiAb의 결합력**

[0209] CD47에 대한 결합력을 유지하는 항-HER2/항-CD47 및 항-CD47/항-HER2의 능력은 ELISA에 의해 측정되었다. 인간 CD47가 4°C에서 밤새 96웰 플레이트 상에 코팅되었다. PBST로 세척한 후, 상기 웰들은 실온에서 1hr 동안 PBST + 2% BSA으로 차단되었다. PBST로 세척한 후, PBST + 2% BSA으로 희석된 항체의 농도를 변화시키면서 상기 웰에 첨가되었고, 실온에서 1hr 동안 배양되었다. PBST로 세척한 후, PBST + 2% BSA으로 1:10000으로 희석된 HRP-접합된 염소 항-인간 IgG Fc γ (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)을 상기 웰들에 첨가하였고, 실온에서 1hr 동안 배양하였다. 결합된 항체를 HRP 기질, 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (TMB)으로 가시화하였다. 상기 플레이트들의 흡광도를 450nm에서 측정하였다.

[0210] 결과들은 항-CD47과 유사하게, 항-CD47/항-HER2가 CD47에 대한 결합력을 유지한다는 것을 나타낸다. 항-HER2/항-CD47은 또한, 항-CD47만큼 잘 결합하지는 않을지라도 CD47에 대한 결합력을 유지한다 (도 19A).

[0211] 세포 표면 위의 HER2에 대한 결합력을 유지하는 항-HER2/항-CD47 및 항-CD47/항-HER2의 능력은 인간 SK-BR-3

젖샘/유방 선암(breast adenocarcinoma) 세포에서 측정되었고, 이 세포는 HER2를 과발현한다. 웰 당 1×10^5 SK-BR-3 세포는 얼음 위에서 60분 동안 96웰 플레이트 내에 PBS + 1% FBS으로 희석된 항-HER2/항-CD47, 항-CD47/항-HER2, 항-HER2, 및 항-CD47의 농도를 변화시키면서 배양되었다. PBS + 1% FBS로 세척 후, 세포들을 얼음 위에서 60분 동안 PBS + 1% FBS으로 1:200으로 희석된 FITC F(ab')₂ 염소 항-인간 IgG, Fc γ (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)으로 배양되었다. 다시 세척한 후, 세포들을 PBS 내 1% 포름알데히드로 고정하였다. 세포들을 유세포 분석기(MACSQuant, Miltenyi Biotec, Cologne, Germany)로 분석하였다.

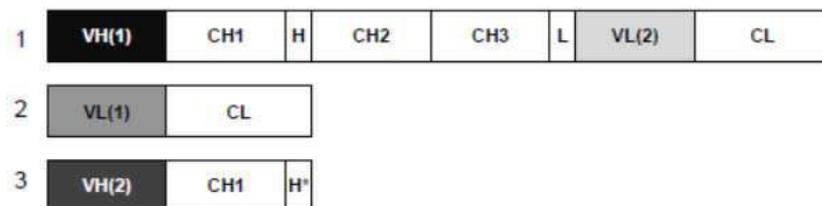
[0212] 상기 결과들은 항-HER2와 유사하게, 항-HER2/항-CD47가 Her2을 발현하는 SK-BR-3 세포에 대한 결합력을 유지하는 것을 나타낸다. 항-CD47/항-HER2는 또한 항-HER2만큼 잘 결합하는 것은 아닐지라도, HER2에 대한 결합력을 유지한다. 항-CD47는, CD47이 SK-BR-3 세포에서 발현되지 않기 때문에, SK-BR-3 세포에 결합하지 않는다(도 19B).

[0213] 등가물

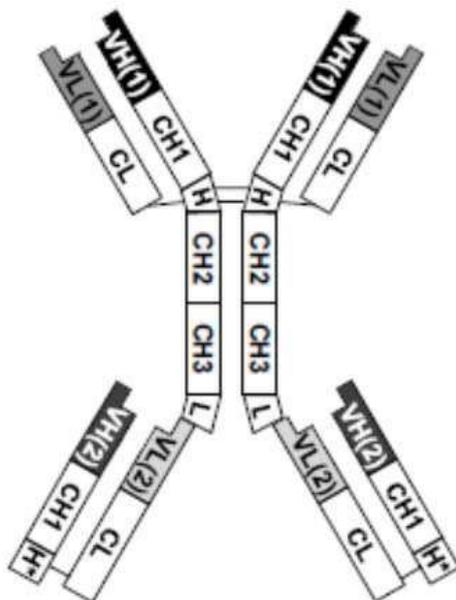
[0214] 본 발명은 이의 기술적 사상 및 주요 특성으로부터 벗어나지 않는 다른 특이적 형태로 구현될 수 있다. 앞선 실시예들은 그러므로 여기 설명된 본 발명을 제한하는 것보다는 설명적으로 고려되는 것이다. 본 발명의 범위는 앞선 설명에 의해서보다는 첨부된 청구항에 의해 정해지고, 청구항의 의미 및 범위 내의 모든 범위들은 여기 포함되는 것으로 의도된다.

도면

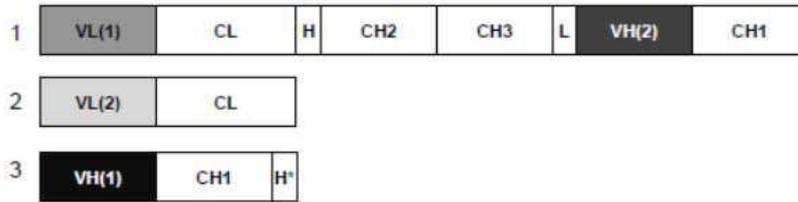
도면1a



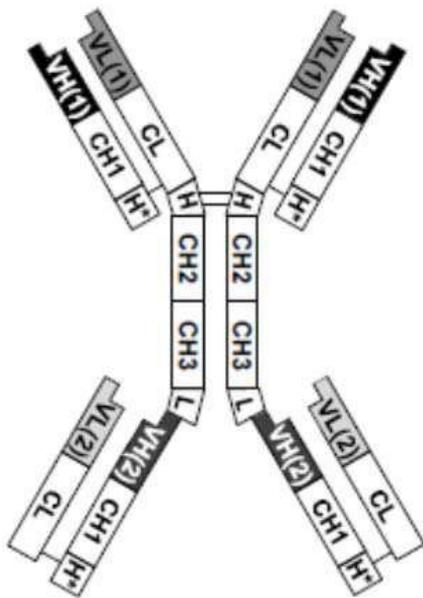
도면1b



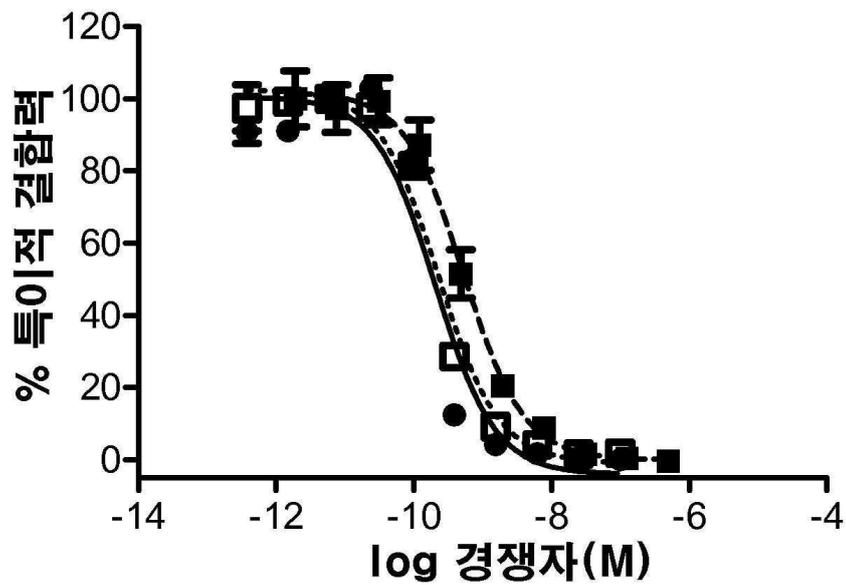
도면1c



도면1d

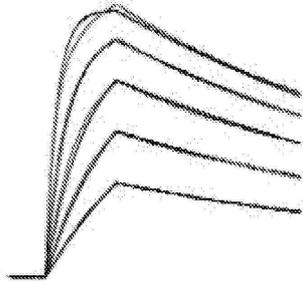


도면2



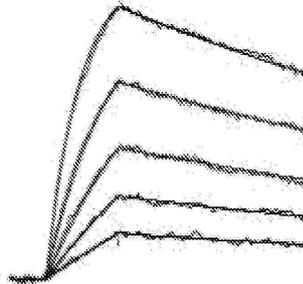
도면3

anti-EGFR IgG1



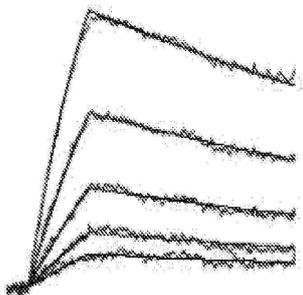
ka: 1.290e+6 M⁻¹s⁻¹
 kd: 1.240e-3 s⁻¹
KD: 9.615e-10 M
 AvgRmax_1: 170.9 RU
 Chi2: 4.246 RU2

Fc-G4S-anti-EGFR(VHCH1)



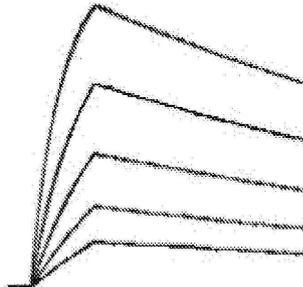
ka: 4.438e+5 M⁻¹s⁻¹
 kd: 8.880e-4 s⁻¹
KD: 2.002e-9 M
 AvgRmax_1: 57.6 RU
 Chi2: 0.1981 RU2

Fc-G4S-anti-EGFR(LC)



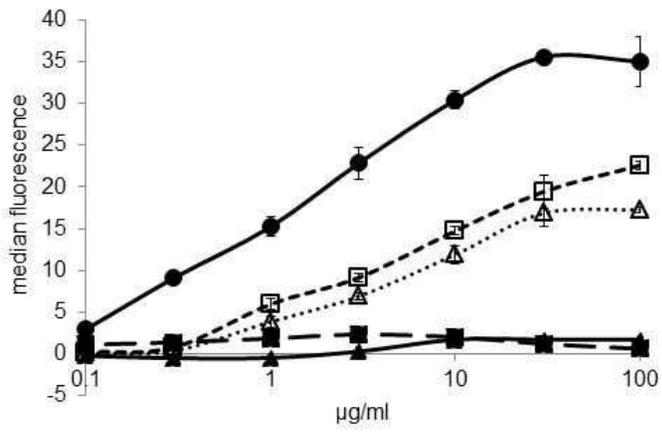
ka: 8.906e+4 M⁻¹s⁻¹
 kd: 5.195e-4 s⁻¹
KD: 5.833e-9 M
 AvgRmax_1: 60.6 RU
 Chi2: 0.0677 RU2

Fc-(G4S)₄-anti-EGFR(LC)

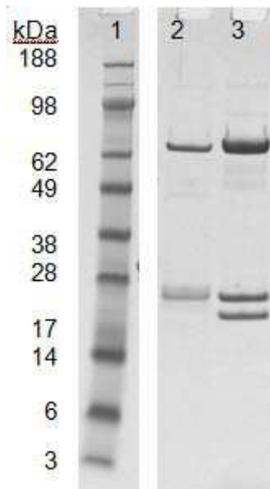


ka: 2.793e+5 M⁻¹s⁻¹
 kd: 5.305e-4 s⁻¹
KD: 1.932e-9 M
 AvgRmax_1: 152.9 RU
 Chi2: 0.3093 RU2

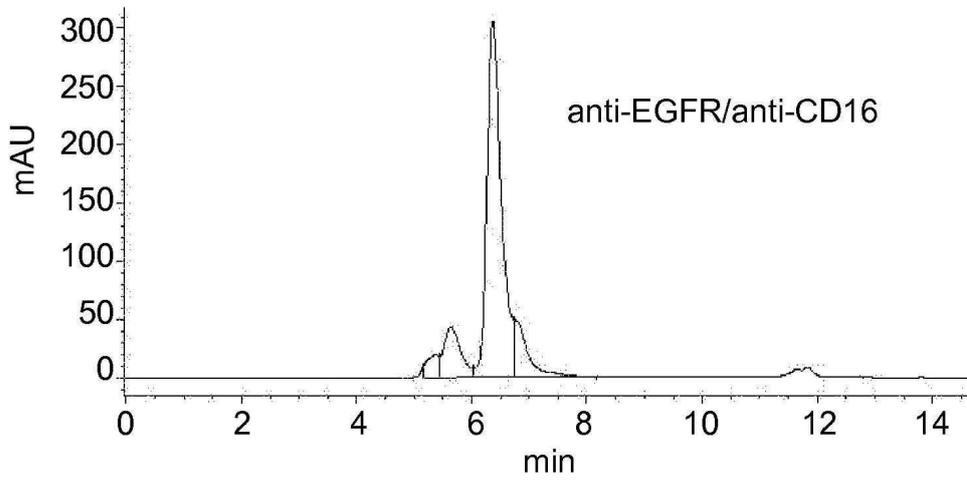
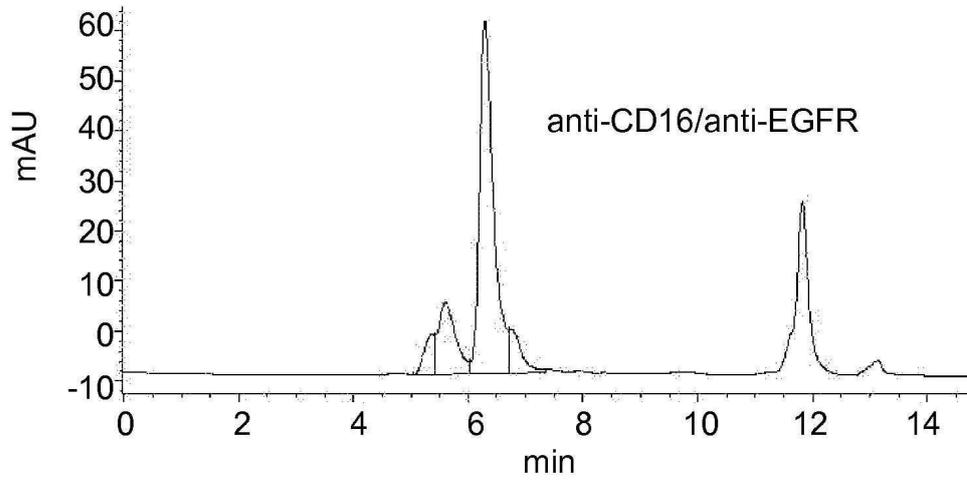
도면4



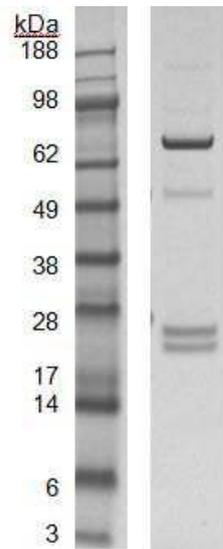
도면5a



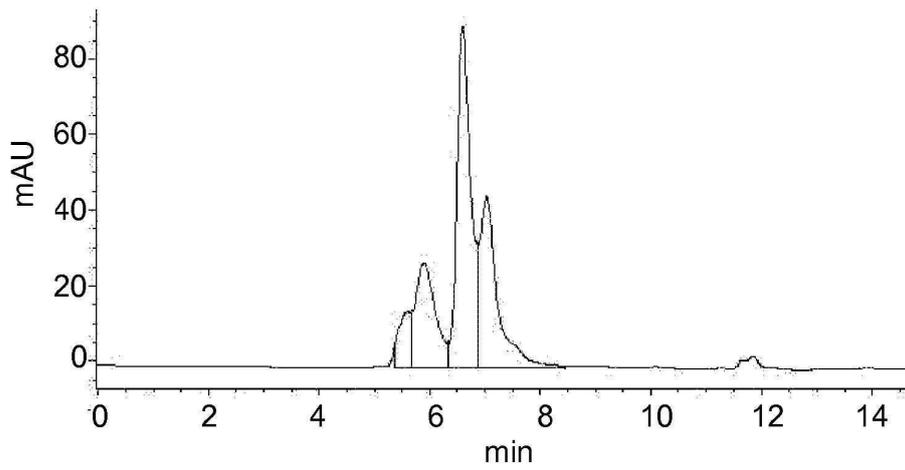
도면5b



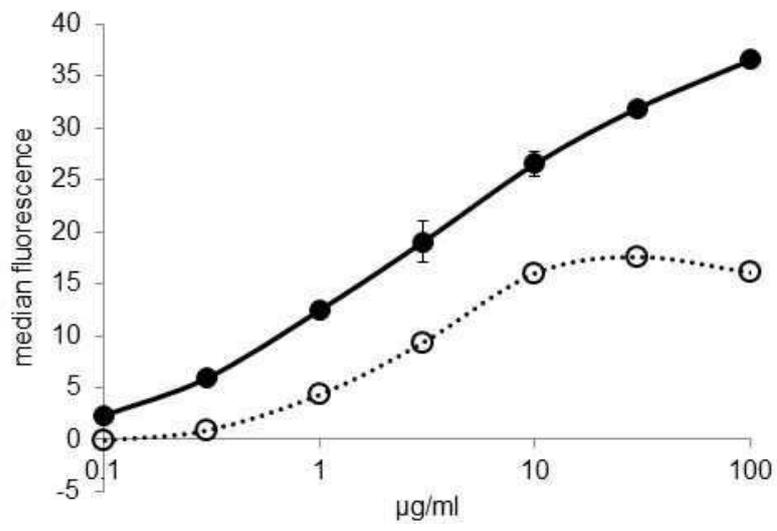
도면8a



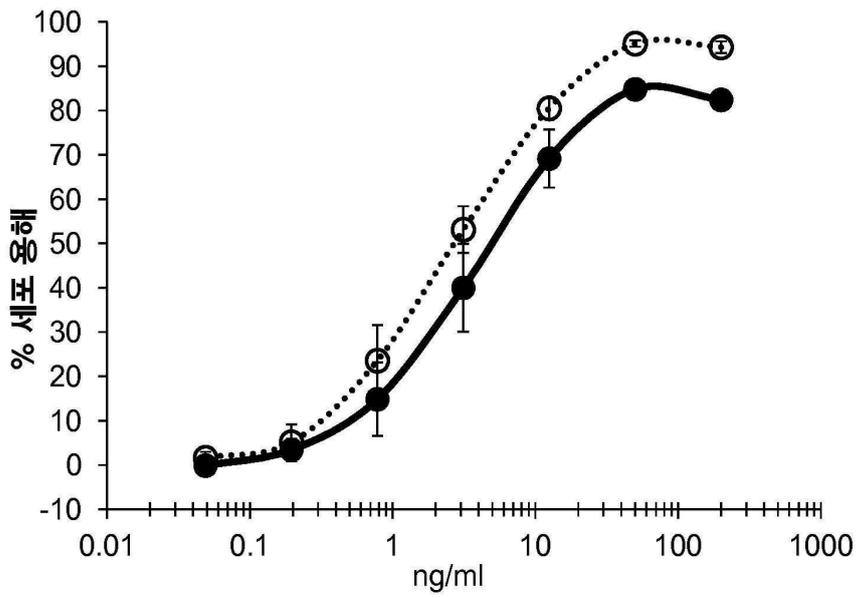
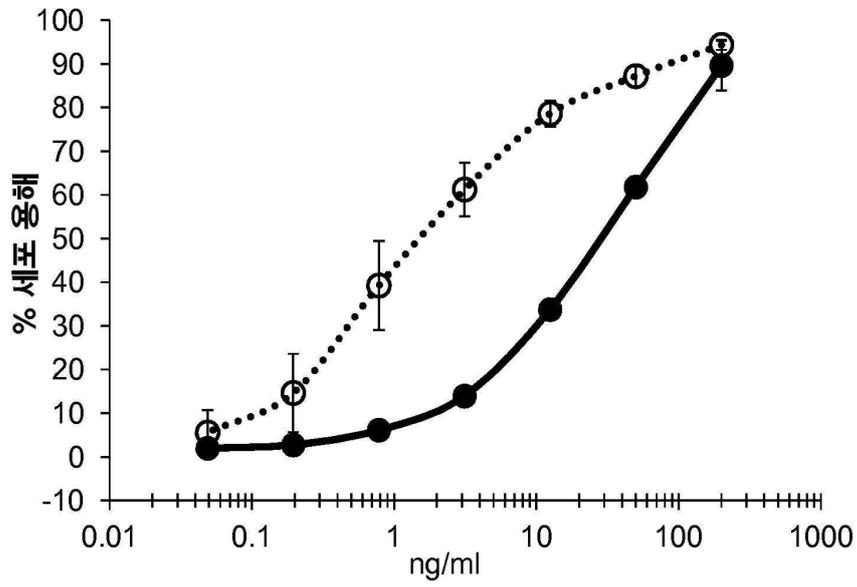
도면8b



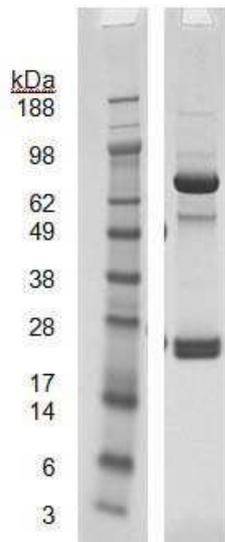
도면9



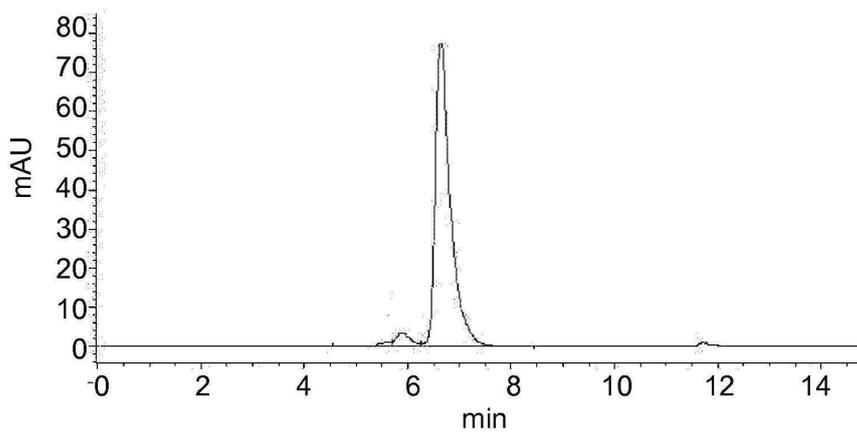
도면10



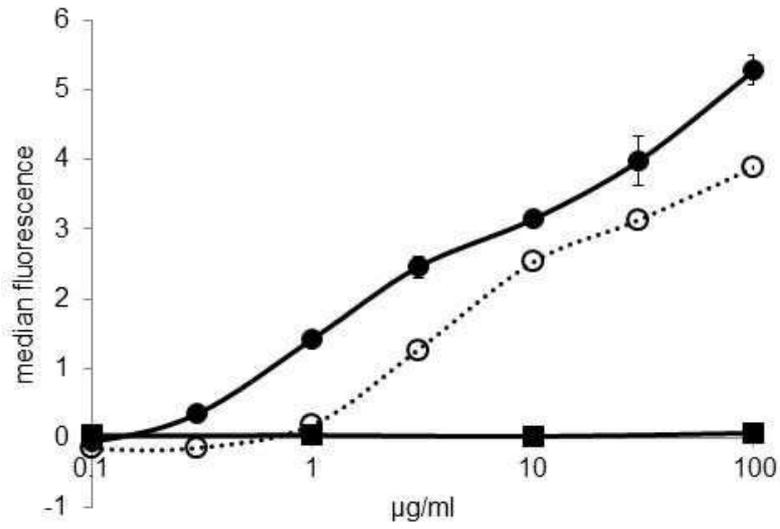
도면11a



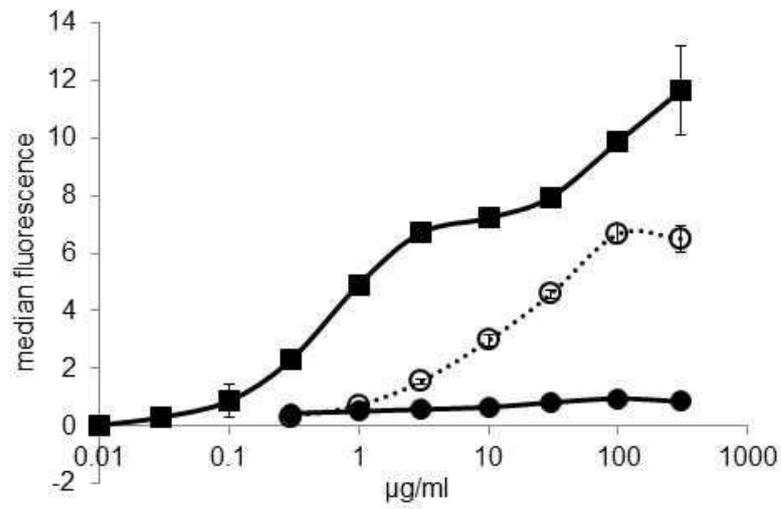
도면11b



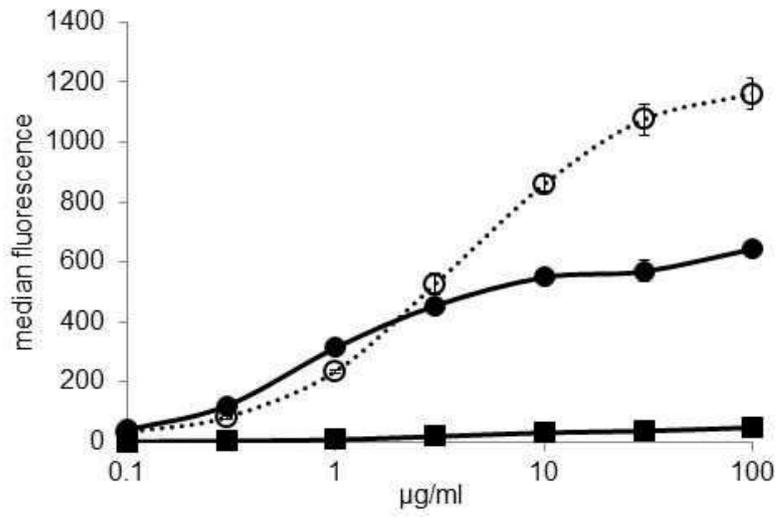
도면12a



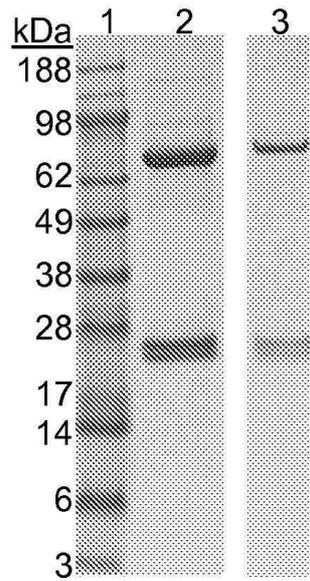
도면12b



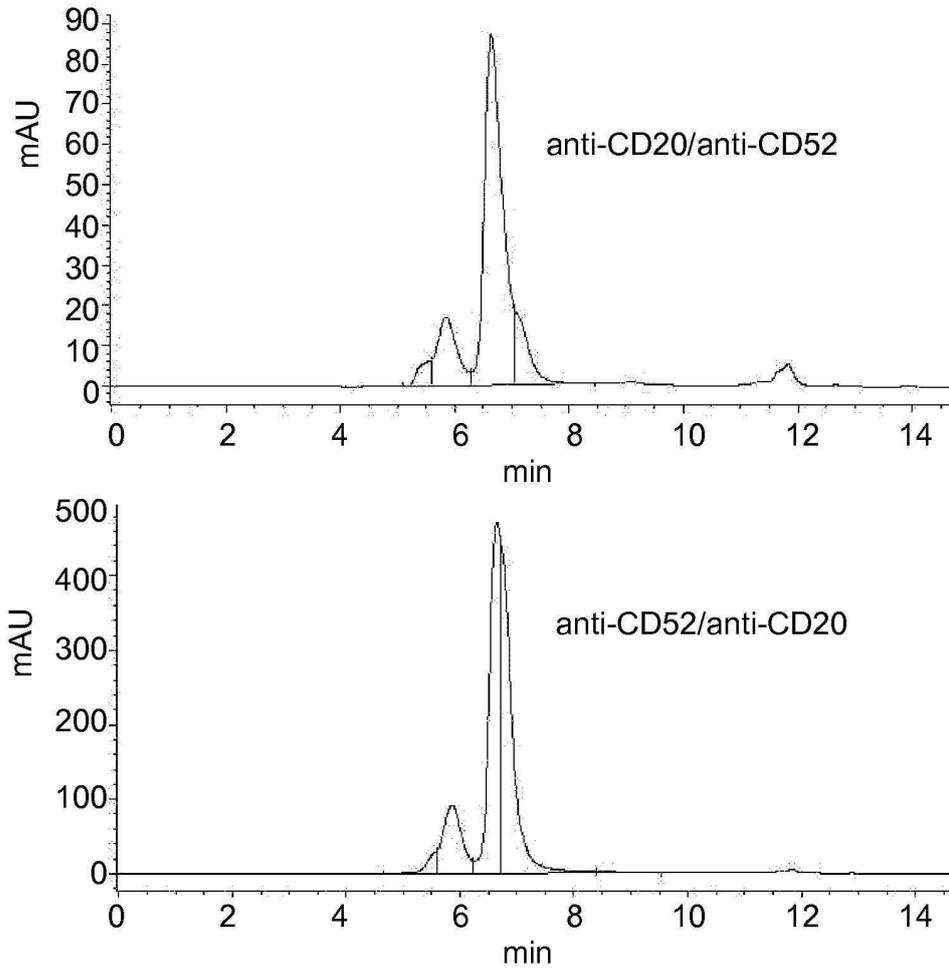
도면12c



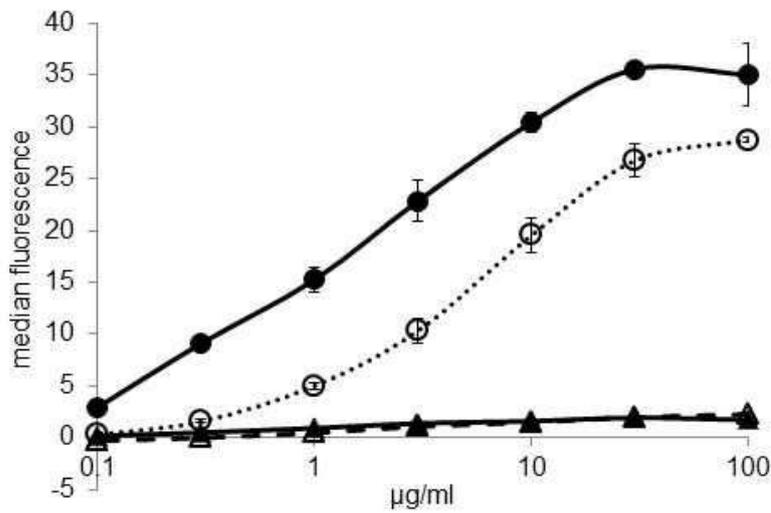
도면13a



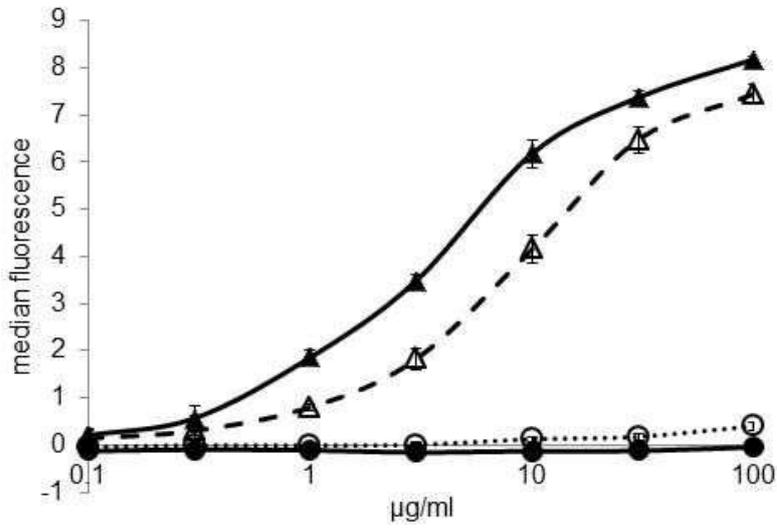
도면13b



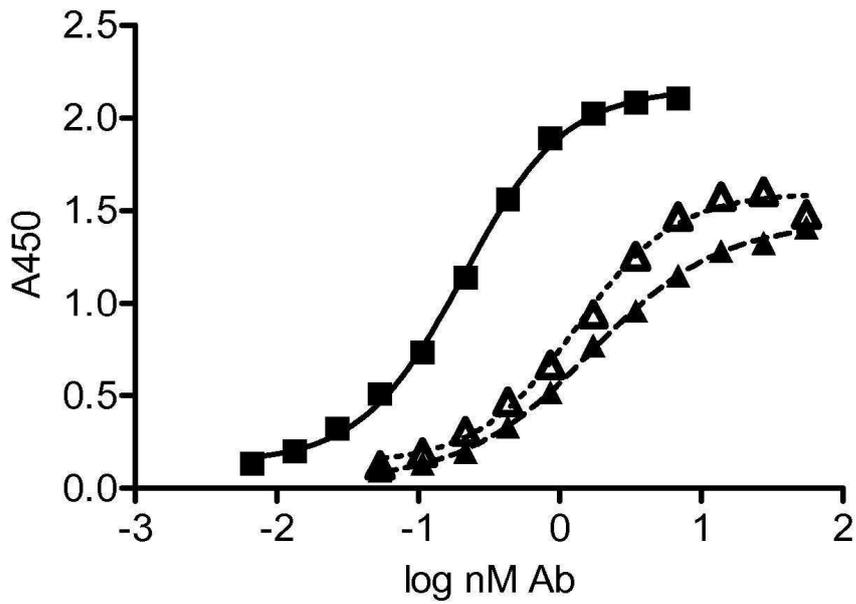
도면14a



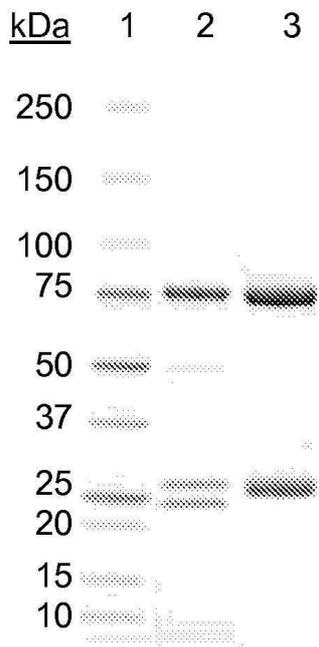
도면14b



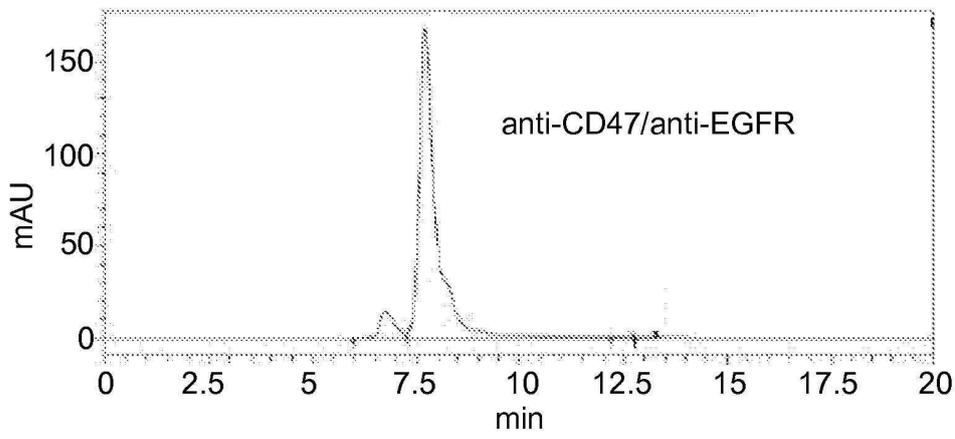
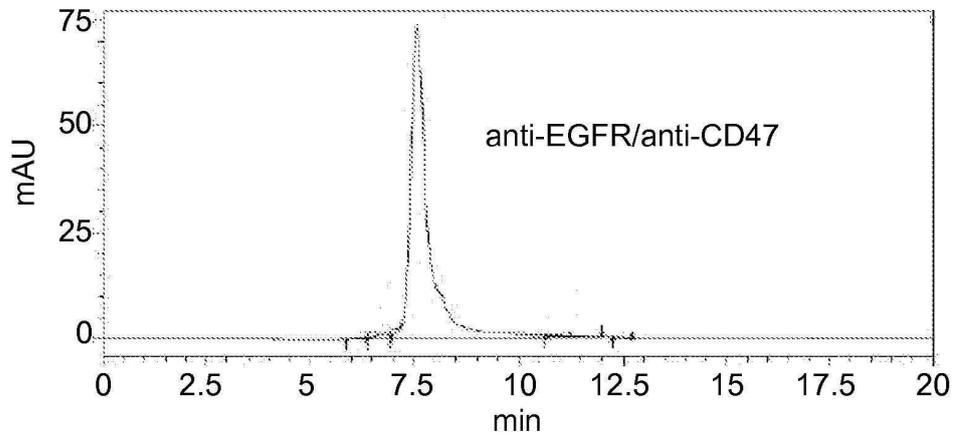
도면15



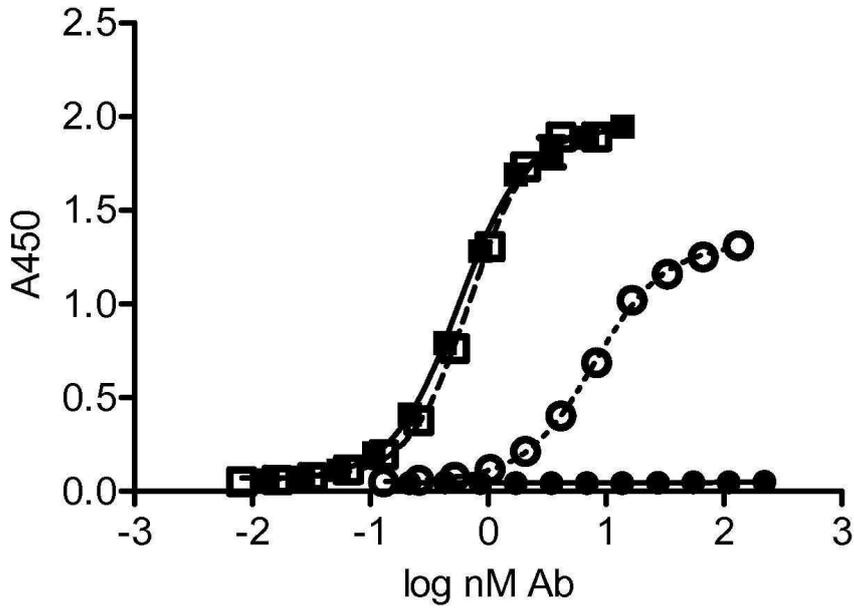
도면16a



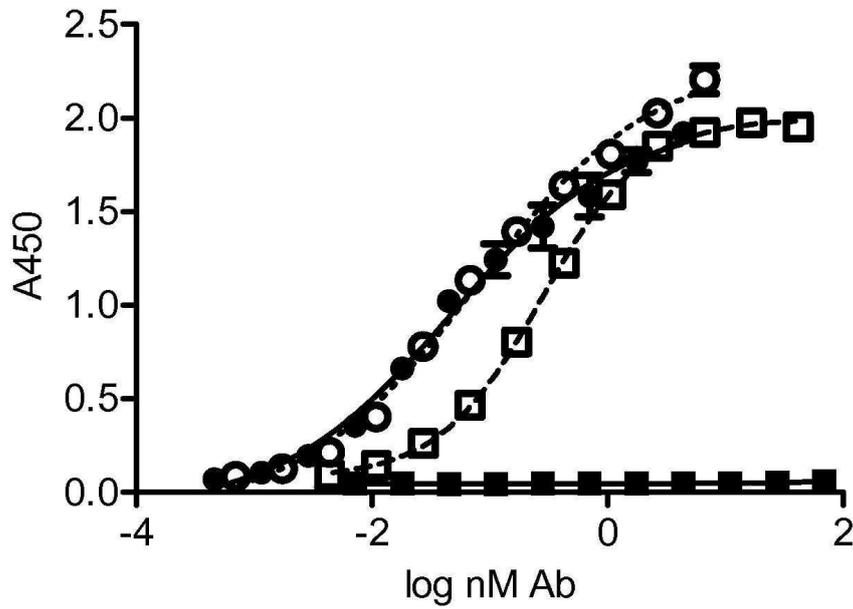
도면16b



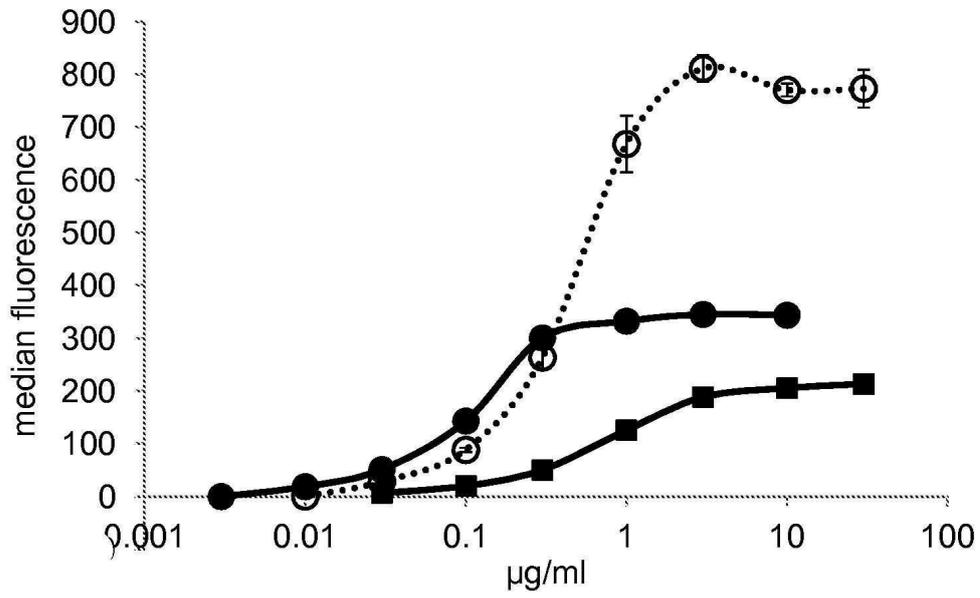
도면17a



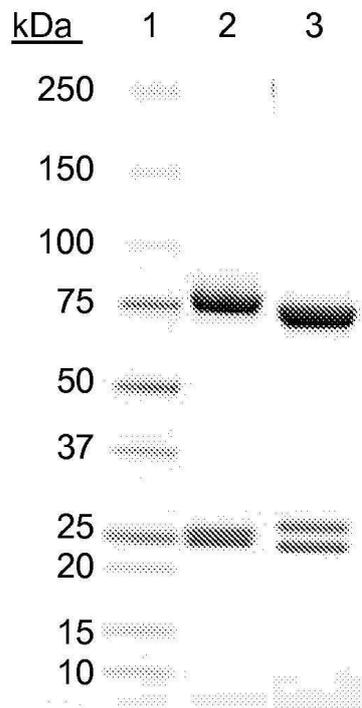
도면17b



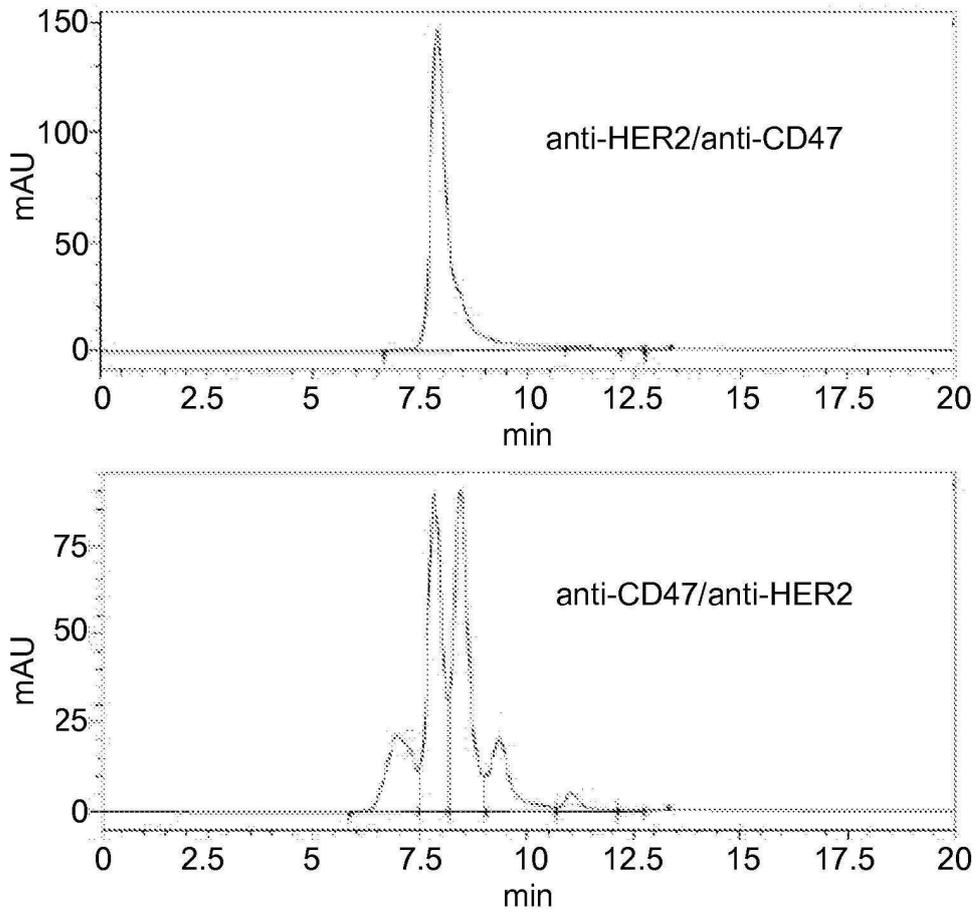
도면17c



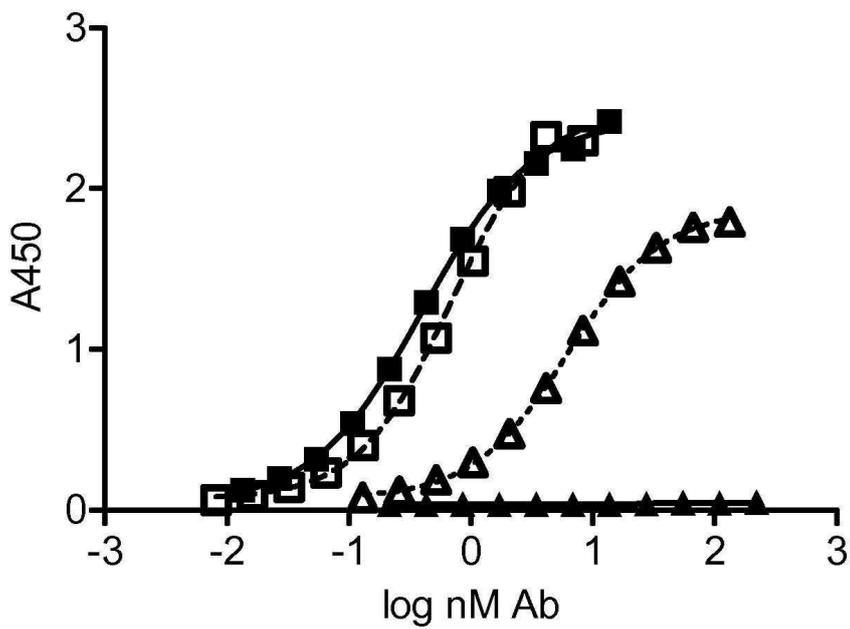
도면18a



도면18b



도면19a



도면19b

