

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 201991207 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2019.12.30

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)  
A61P 37/04 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2017.12.19

(54) НОВЫЕ АГОНИСТЫ TNFR И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 16205108.0

(32) 2016.12.19

(33) EP

(86) PCT/EP2017/083632

(87) WO 2018/115003 2018.06.28

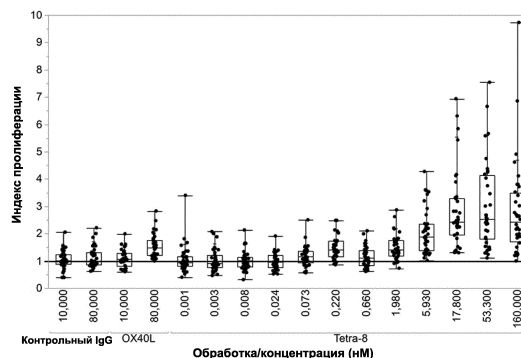
(88) 2018.08.09

(71) Заявитель:  
ГЛЕНМАРК ФАРМАСЬЮТИКАЛС  
С.А. (CH)

(72) Изобретатель:  
Блейн Станислас, Руссо Франсуа,  
Лиссилаа Рами, Бэк Джонатан,  
Макуан Жули, Штуц Сиан (CH)

(74) Представитель:  
Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к новому классу агонистов TNFR, которые содержат несколько связывающих участков для связывания двух различных частей одного и того же TNFR. Настоящее изобретение также относится к способам активации компонентов иммунной системы у пациента посредством введения агониста TNFR согласно настоящему изобретению, а также к применению таких материалов для дополнительных терапевтических и других целей.



A1

201991207

201991207

A1

## НОВЫЕ АГОНИСТЫ TNFR И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к новому классу агонистов суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR), которые содержат множество связывающих участков для связывания по меньшей мере двух различных частей TNFR. Настоящее изобретение также относится к способам активации компонентов иммунной системы у пациента посредством введения агониста TNFR согласно настоящему изобретению, а также к применению таких материалов для терапевтических и других целей.

### Введение

Иммунотерапия стала основным направлением инноваций в разработке противораковой терапии, например в случае, когда у успешных пациентов имеются длительные противоопухолевые иммунные ответы, которые уничтожают не только первичные опухоли, но и метастатические поражения, и могут привести к созданию защитной противоопухолевой иммунологической памяти. Исследователи направили свои усилия и достигли больших успехов в отношении препаратов, которые нейтрализуют ингибиторы контрольных точек, например CTLA-4 и PD-1, что устраняет ингибирование *in vivo* противоопухолевых Т-клеточных ответов посредством опосредованного антителами антагонизма этих рецепторов. Однако становится все более очевидным, что устранение действия одного или нескольких ингибиторов контрольных точек недостаточно для ускорения регрессии опухоли у большинства пациентов. Получение надежного терапевтического иммунного ответа требует не только устранения ингибирующих путей, но также и активации стимулирующих путей.

Внутри опухоли присутствие ингибиторов контрольных точек может ингибировать функцию Т-клеток подавляя противоопухолевые иммунные ответы. Ингибиторы контрольных точек, такие как CTLA-4 и PD-1, ослабляют пролиферацию Т-клеток и продуцирование цитокинов. Ответы Т-клеток CD8 также требуют активации рецептора Т-клеток плюс костимуляции, которая может быть обеспечена путем лигирования членов семейства рецепторов фактора некроза опухоли, включая OX40 (CD134) и 4-1BB (CD137). OX40 представляет особый интерес, так как лечение активирующим (агонистическим) анти-OX40 mAb увеличивает дифференцировку и цитолитическую функцию Т-клеток, что приводит к усилению противоопухолевого иммунитета против различных опухолей. При использовании в качестве отдельных агентов эти препараты могут вызывать сильные клинические и иммунологические реакции у пациентов с метастатическим заболеванием. Однако каждый из этих агентов приносит пользу только подгруппе пациентов, что

подчеркивает критическую потребность в более эффективных комбинированных терапевтических стратегиях, действующих через большее количество путей/компонентов иммунной системы.

- 5 Члены суперсемейства фактора некроза опухоли (TNF)/рецептора фактора некроза опухоли (TNFR) существенным образом вовлечены в поддержание гомеостаза в иммунной системе. Биологические функции иммунной системы включают полезные и защитные эффекты при воспалении и защите хозяина, а также решающую роль в органогенезе.

Члены суперсемейства TNFR перечислены в Таблице 1 ниже.

| Член суперсемейства TNFR            | Синонимы                  | Ген       | Лиганд (ы)               |
|-------------------------------------|---------------------------|-----------|--------------------------|
| Рецептор фактора некроза опухолей 1 | CD120a                    | TNFRSF1A  | TNF-альфа (кахектин)     |
| Рецептор фактора некроза опухолей 2 | CD120b                    | TNFRSF1B  |                          |
| Рецептор лимфотоксина бета          | CD18                      | LTBR      | Лимфотоксин бета (TNF-C) |
| OX40                                | CD134                     | TNFRSF4   | OX40 L                   |
| CD40                                | Bp50                      | CD40      | CD154                    |
| Fas-рецептор                        | Apo-1, CD95               | FAS       | FasL                     |
| Рецептор-приманка 3                 | TR6, M68                  | TNFRSF6B  | FasL, LIGHT, TL1A        |
| CD27                                | S152, Tp55                | CD27      | CD70, Siva               |
| CD30                                | Ki-1                      | TNFRSF8   | CD153                    |
| 4-1BB                               | CD137                     | TNFRSF9   | Лиганд 4-1BB             |
| Рецептор смерти 4                   | TRAILR1, Apo-2, CD261     | TNFRSF10A | TRAIL                    |
| Рецептор смерти 5                   | TRAILR2, CD262            | TNFRSF10B |                          |
| Рецептор-приманка 1                 | TRAILR3, LIT, TRID, CD263 | TNFRSF10C |                          |
| Рецептор-приманка 2                 | TRAILR4, TRUNDD, CD264    | TNFRSF10D |                          |
| RANK                                | CD265                     | TNFRSF11A | RANKL                    |
| Остеопротегерин                     | OCIF, TR1                 | TNFRSF11B |                          |
| TWEAK-рецептор                      | Fn14, CD266               | TNFRSF12A | TWEAK                    |

|                                                          |                          |           |                       |
|----------------------------------------------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|
| TACI                                                     | IGAD2, CD267             | TNFRSF13B | APRIL, BAFF, CAM LG   |
| BAFF-рецептор                                            | CD268                    | TNFRSF13C | BAFF                  |
| Медиатор проникновения герпесвируса                      | ATAR, TR2, CD270         | TNFRSF14  | LIGHT                 |
| Рецептор фактора роста нервов                            | p75NTR, CD271            | NGFR      | NGF, BDNF, NT-3, NT-4 |
| В-клеточный антиген созревания                           | TNFRSF13A, CD269         | TNFRSF17  | BAFF                  |
| Индукцированный глюкокортикоидами TNFR-родственный белок | AITR, CD357              | TNFRSF18  | Лиганд GITR           |
| TROY                                                     | TAJ, TRADE               | TNFRSF19  | неизвестно            |
| Рецептор смерти 6                                        | CD358                    | TNFRSF21  |                       |
| Рецептор смерти 3                                        | Apo-3, TRAMP, LARD, WS-1 | TNFRSF25  | TL1A                  |
| Рецептор эктодисплазина A2                               | XEDAR                    | EDA2R     | EDA-A2                |

Таблица 1

ОХ40 (CD134; TNFRSF4) является членом суперсемейства TNFR и первоначально был охарактеризован как рецептор, в первую очередь экспрессируемый CD4 Т-клетками из тимуса и лимфатических узлов крысы после стимуляции конканавалином А. Последующие исследования показали, что и у мышей, и у человека ОХ40 экспрессируется CD4 и CD8 Т-клетками во время антигенспецифического праймирования, и эта экспрессия ОХ40 индуцируется при взаимодействии TCR/CD3 и присутствием воспалительных цитокинов, включая IL-1, IL-2 и TNF-α. Экспрессия ОХ40 после контакта с антигеном обычно является временной как для CD4, так и для CD8 Т-клеток (24-72 ч), при этом продолжительность экспрессии ОХ40 в CD8 Т-клетках, как сообщается, короче, чем в CD4 Т-клетках. Было показано, что в отсутствие активирующих сигналов относительно немногие субпопуляции зрелых Т-клеток экспрессируют ОХ40 на биологически значимых уровнях. Однако как у мышей, так и у людей была описана конститутивная экспрессия ОХ40 фолликулярными хелперными CD4 Т-клетками (Tfh). Было показано, что в зародышевых центрах субпопуляция клеток Tfh CD4 +/CXCR5 +/CCR7- имеет самый высокий уровень экспрессии ОХ40 и считается важным регулятором продуцирования антител. У мышей ОХ40 также конститутивно экспрессируется на регуляторных Т-



клетках FoxP3<sup>+</sup> (Treg-клетках), в отличие от Treg-клеток человека, где его экспрессия является индуцибельной. В противоположность этому, антигенспецифическая активация может индуцировать экспрессию OX40 многочисленными субпопуляциями дифференцированных CD4 и CD8 Т-клеток. В мышинной модельной системе (ОТ-II) наблюдали одинаково устойчивую индукцию OX40 в клетках Th1 и Th17 в ответ на активацию пептидами. У людей значительная часть инфильтрирующих опухоль CD4 Т-клеток экспрессирует OX40, вероятно, из-за распознавания опухолевых антигенов, и частота OX40<sup>+</sup> CD4 Т-клеток может быть прогностическим параметром для исходов для пациента. Точно так же, было показано, что активированные периферические CD8 Т-клетки экспрессируют OX40 у мышей и людей.

Лигирование OX40 на CD8 и обычных (нерегуляторных) CD4 Т-клетках с использованием либо его природного лиганда (OX40L), либо антител-агонистов способствует их выживанию и размножению. Об этом свидетельствуют исследования с использованием мышей с дефицитом OX40 и OX40L, которые подробно обсуждаются в нескольких недавних обзорах. Эти исследования продемонстрировали, что мыши с нокаутом OX40 или OX40L показывают уменьшенную экспансию как CD4, так и CD8 Т-клеток в сочетании с дефектными ответными реакциями памяти после провокации антигеном, что указывает на важность эндогенной экспрессии OX40 в регуляции размножения Т-клеток. Кроме того, лечение моноклональными антителами-агонистами против OX40 (mAb) наряду со стимуляцией TCR у животных дикого типа вызывало экспансию, дифференцировку и повышенную выживаемость CD4 и CD8 Т-клеток. Аналогичным образом, истощение CD8 или CD4 Т-клеток устраняет способность моноклонального антитела против OX40 (анти-OX40 mAb) индуцировать регрессию опухоли в нескольких моделях опухолей. Одно исследование продемонстрировало, что введение антитела против OX40 является достаточным для преодоления толерантности CD8 Т-клеток к аутоантигену и восстанавливает их цитотоксическую активность, подчеркивая терапевтический потенциал для агонистов OX40. Это особо важно для пациентов с раком, так как толерантность Т-клеток к опухоли является основным препятствием для терапевтических подходов.

Другая группа продемонстрировала, что усиление функции CD8 Т-клеток после обработки антителом против OX40 было опосредовано индукцией экспрессии CD40L на эффекторных Т-клетках, что способствовало созреванию дендритных клеток (DC), потому что у CD40<sup>-/-</sup> мышей значительно меньше CD11c<sup>+</sup> дендритных клеток, мигрирующих в дренирующие лимфоузлы, после обработки анти-OX40 mAb. Фактически, у всех CD40<sup>-/-</sup>

мышей, получавших анти-OX40 mAb, наблюдают возникновение опухолей в отличие от мышей дикого типа, у которых выживаемость составляет 60%, что указывает на важность экспрессии CD40 после стимуляции OX40. В совокупности эти данные показывают, что экзогенные манипуляции с передачей сигналов OX40 способны усиливать стагнирующие Т-клеточные ответы. Несколько исследователей провели исследования, чтобы определить механизм, с помощью которого OX40 способствует выживанию Т-клеток. Было продемонстрировано, что после активации, OX40-дефицитные CD4 Т-клетки не способны поддерживать экспрессию антиапоптотических белков Bcl-xL и Bcl-2. Кроме того, ретровирусная трансдукция Bcl-xL или Bcl-2 восстанавливала выживание активированных CD4 Т-клеток. Устойчивая экспрессия Bcl-xL также оказалась необходима для выживания опухолево-реактивных CD8 Т-клеток после костимуляции OX40. Последующие исследования показали, что передача сигналов OX40 в Т-клетках индуцирует экспрессию сурвивина, и это необходимо для регуляции и поддержания способности Т-клеток к делению с течением времени. Экспрессия сурвивина поддерживалась посредством постоянной активации PI3K и PKB с помощью передачи сигналов OX40. Однако экспрессия сурвивина не отменяет потребность в Bcl-xL и Bcl-2 после передачи сигналов OX40 для ингибирования апоптоза Т-клеток. Усиленная экспрессия членов семейства сурвивина и Bcl-2 опосредуется активацией IKK киназы и NF-KB1 после передачи сигналов OX40. Другие исследователи показали, что TRAF2 необходим после передачи сигналов OX40 в антиген-специфических CD4 Т-клетках, поскольку экспрессия доминантно-негативного TRAF2 в CD4 Т-клетках ингибирует их экспансию, выживание и выработку цитокинов. Одна из функций TRAF2, по-видимому, заключается в предотвращении экспрессии CTLA-4 после костимуляции Т-клеток посредством OX40, поскольку блокада CTLA-4 во время праймирования Т-клеток антигеном и анти-OX40 mAb частично восстанавливает дефектную экспансию у мышей, экспрессирующих доминантно-негативный белок TRAF2. Остается неизвестным, активируются ли те же самые адаптеры TRAF и пути NF-KB в Т-клетках после связывания лиганда другими членами семейства TNFR, такими как CD27 и GITR.

Сходства и различия в сигнальных путях, активируемых костимуляторными рецепторами Т-клеток, включая как членов семейства TNFR, таких как OX40 и CD27, так и членов суперсемейства иммуноглобулинов, таких как семейства CD28 и B7, широко обсуждались в других работах. Активация множественных путей обоими суперсемействами костимулирующих рецепторов приводит к усилению роста клеток и эффекторной функции, а также улучшает выживаемость. Многочисленные исследователи в настоящее

время тестируют модуляцию этих рецепторов для различных клинических применений и иммунотерапии. Доклинические исследования показали, что лечение хозяев с опухолями агонистами OX40, включая слитые белки анти-OX40 mAb и OX40L-Fc, приводит к регрессии опухоли в нескольких доклинических моделях. В недавних работах исследовали механизмы, с помощью которых действуют эти агонисты. В дополнение к стимулированию роста эффекторных Т-клеток, поскольку OX40 конститутивно экспрессируется на клетках Treg, агонисты OX40 обладают способностью непосредственно регулировать клетки Treg. Имеются противоречивые сообщения о том, способствуют ли или уменьшают эти агонисты ответы клеток Treg. Некоторые исследователи наблюдали, что анти-OX40 mAb блокировали подавляющую функцию клеток Treg *in vivo*, тогда как другие наблюдали экспансию клеток Treg. Эти исследования показывают, что анти-OX40 может толкать клетки Treg в обоих направлениях, в зависимости от контекста стимуляции и среды цитокинов. Действительно, важность костостимулирующего пути OX40 в регуляции иммунитета иллюстрируется наличием аутоиммуноподобного заболевания у мышей с конститутивной экспрессией OX40L. Также было показано, что передача сигналов OX40 ингибирует продуцирование IL-10 и подавляет функцию клеток Treg. В подтверждение этих данных, введение mAb против OX40 перед приживлением опухоли делало клетки Treg функционально неактивными за счет ингибирования продуцирования IL-10 и устранения опосредованного Treg-клетками подавления ответов CD8 Т-клеток. В одной недавней публикации сообщается, что клетки, экспрессирующие активирующий FcγR, необходимы для избирательного истощения Treg-клеток из опухолей, в то время как в Treg-клетках в дренирующих лимфатических узлах изменений на 5-й день после терапии анти-OX40 не было. Другие исследования подтверждают, что даже в более поздние моменты времени после введения анти-OX40 не наблюдается изменения количества Treg-клеток в дренирующих лимфатических узлах, поэтому этот эффект может быть локализован в опухоли. Фактически, этот эффект может быть транзиторным, так как в другом сообщении показано, что на 7-й день не было различий в количестве Treg-клеток в опухоли между контролем и мышами, получавшими антитело против OX40, при использовании той же модели рака ободочной кишки СТ26. Это исследование, в частности, также показывает, что иммунологические эффекты терапии против OX40 могут варьироваться в зависимости от исследуемой модели опухоли; таким образом, следует проявлять осторожность при обобщениях относительно точного механизма агонистов OX40. Другие исследования сообщают, что анти-OX40 mAb снижают суппрессорную активность Treg-клеток *in vitro* и *in vivo*. Независимо от того, функционирует ли анти-OX40 посредством супрессии, делеции Treg-клеток или обоих

механизмов, воздействие этих агонистов должно уменьшать ингибирующие эффекты, опосредованные Трег-клетками, и, таким образом, стимулировать противоопухолевые ответы CD8 Т-клеток, необходимые для поддержания долгосрочных противоопухолевых иммунных ответов. Вполне вероятно, что противоопухолевая активность агонистов OX40 опосредуется множеством механизмов.

Учитывая сложность и пластичность иммунной системы человека и дополнительную сложность работы с иммунной системой пациента с раком, которая целенаправленно разрушается опухолевыми клетками с целью избежать индукции лечебного иммунного ответа, все чаще предлагается и проверяются как доклинически, так и у пациентов, комбинированная терапия, модулирующая различные рецепторы иммунной системы/клеточные популяции. Например, исследования в этой области показали, что согласованное применение антагонистических антител PD-1 и агонистических антител OX40 является критическим при одновременном введении, ведущем к подавлению эффектов агониста OX40 (Shrimali et al., Cancer Immunol Res; 5(9); 1-12) и Messenhiemer et., Clin Cancer Res. 2017 Oct 15;23(20):6165-6177).

Эта сложность также означает, что по мере дальнейшего развития области иммуноонкологии и расширения понимания оптимальных способов вызывать терапевтический иммунный ответ с использованием иммуномодулирующих агентов будет необходимо создавать фармакологически активные вещества против как можно более широкого круга соответствующих мишеней, и TNFR представляют собой, возможно, самый важный класс иммуноонкологических мишеней, а создание фармакологически активных агонистов на сегодняшний день оказалось трудной задачей.

### **Краткое описание изобретения**

Настоящее изобретение относится к агонистам TNFR, содержащим участки связывания по меньшей мере для двух различных частях TNFR.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что агонисты, содержащие связывающие участки, которые связываются по меньшей мере с двумя разными частями или эпитопами TNFR, демонстрируют более высокие уровни агонизма, чем действие этих связывающих участков, когда они не содержатся в одном том же агонисте, и по сравнению с нативным лигандом TNFR и другими ранее известными агонистами TNFR.

В соответствии с настоящим изобретением TNFR выбран из группы, показанной в Таблице 1, или любых других членов суперсемейства TNFR.

Предпочтительно, TNFR участвует в костимуляции Т-клеточных ответов.

Предпочтительно TNFR выбран из группы, включающей: CD27, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), HVEM, CD30 и GITR, и наиболее предпочтительно представляет собой OX40.

В соответствии с настоящим изобретением термин "две разные части рецептора TNF" будет означать два участка TNFR, которые могут быть одновременно связаны каждым  
5 одним из указанных связывающих участков, что означает, что они могут связываться одновременно на одном и том же TNFR или образовывать мостик между двумя идентичными TNFR, связываясь с ними одновременно.

В частности, настоящее изобретение относится к связывающим участкам из мишень-специфических связывающих молекул на основе белка, таких как антитела, дарпины  
10 (DARPin), финомеры, аффимеры, рецепторы вариабельных лимфоцитов, антикалин, нанофитин, вариабельный рецептор нового антигена (VNAR), среди прочего.

В частности, агонист TNFR включает связывающие участки, взятые или полученные из антитела, такие как Fab, Fab', Fab'-SH, Fd, Fv, dAb, F(ab')<sub>2</sub>, scFv, Fcab, биспецифичные  
15 одноцепочечные димеры Fv, диатела, триатела. В предпочтительных вариантах реализации агонист содержит связывающие участки, взятые или полученные из Fab, ScFv и dAb.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения связывающие участки, входящие в состав агониста, имеют различные типы, причем в предпочтительном  
20 варианте реализации в одном агонисте объединены связывающие участки Fab и scFv или Fab и dAb.

Известны способы преобразования связывающих участков Fab в другие типы связывающих участков, таких как scFvs, dAbs, scFab, и аналогично - преобразования таких связывающих участков в Fab взаимозаменяемым образом.

В частности, связывающие участки могут быть генетически слиты с каркасом,  
25 содержащим такое же или другое антитело Fc или его часть. В соответствии с этим аспектом настоящего изобретения первое полноразмерное антитело, такое как IgG, может образовывать основу агониста согласно настоящему изобретению, а второй набор связывающих участков может быть привит на исходное антитело в соответствии с настоящим изобретением.

30 В качестве альтернативы, связывающие участки могут быть генетически слиты с каркасом, отличным от полученного из Fc или иммуноглобулина, например, таким каркасом, каркасы на основе SH3-домена Fyn, который используется в финомерах, и те,

которые основаны на ингибиторе протеазы стефин А человека, используемом в аффимерах.

Согласно настоящему изобретению связывающие участки, которые связываются с различными частями TNFR, расположены на С- и N-концах каркаса, содержащегося в  
5 агонисте TNFR, соответственно.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения связывающие участки расположены на С-, либо N-конце и соединены друг с другом.

Предпочтительно связывающие участки, которые связываются с одной и той же частью TNFR, расположены на одном и том же конце агониста. В соответствии с настоящим  
10 изобретением связывающие участки для первой части TNFR расположены на С- или N-конце, а связывающие участки для второй части TNFR расположены на противоположном конце. Авторы изобретения обнаружили, что связывающие участки с одной и той же частью целевого TNFR должны быть предпочтительно расположены на одном и том же конце агониста.

15 В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения связывающий участок может быть на основе нуклеотидов, таким как аптамер.

Предпочтительно агонист содержит более двух связывающих участков.

Более предпочтительно агонист содержит четыре или более связывающих участков.

Предпочтительно агонист содержит по меньшей мере два связывающих участка, которые  
20 связываются с одной и той же частью/эпитопом TNFR.

Наиболее предпочтительно агонист содержит по меньшей мере два набора из двух идентичных связывающих участков. Авторы изобретения обнаружили, что агонисты TNFR, включающие два связывающих участка к каждой из частей/эпитопов TNFR и которые расположены на обоих концах агониста, демонстрируют стабильно высокие  
25 уровни агонизма.

В частности, авторы изобретения обнаружили, что агонисты, содержащие связывающие участки, которые связываются с разными обогащенными цистеином доменами (CRD), одного и того же TNFR, то есть они содержат проксимальные и дистальные по отношению к мембране связывающие участки из разных доменов, обогащенных  
30 цистеином (CRD), этого TNFR.

Предпочтительно агонист связывается с проксимальным и дистальным по отношению к мембране эпитопом.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящее изобретение относится к агонисту рецептора OX40 (OX40), который содержит множество связывающих OX40участков для двух различных частей/эпитопов OX40.

5 В соответствии с настоящим изобретением агонист OX40 связывается с эпитопами в богатом цистеином домене (CRD) 1 и CRD 3 OX40. В качестве альтернативы, агонист OX40 связывается с CRD 1 и CRD 4.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения связывающий участок OX40 выбран из последовательности, выбранной из группы, содержащей: SEQ ID NO: 2, 3, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 35, 36,  
10 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или выделенные полипептиды, аминокислотная последовательность которых по меньшей мере на 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93 %, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична указанным последовательностям. Настоящее изобретение также относится к конструкции, содержащей любой из других OX40-связывающих участков, содержащихся в  
15 спецификации и перечне последовательностей.

В соответствии с предпочтительным вариантом реализации настоящего изобретения агонист OX40 закодирован SEQ ID NO: 45 и 16 или выделенными полипептидами, аминокислотная последовательность которых по меньшей мере 5 на 0%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична  
20 указанным последовательностям.

Настоящее изобретение также относится к способам активации компонентов иммунной системы у пациента посредством введения агониста OX40 в соответствии с настоящим изобретением.

Настоящее изобретение также относится к применению агониста OX40 согласно  
25 настоящему изобретению в качестве лекарственного средства.

Настоящее изобретение также относится к применению агониста OX40 в соответствии с настоящим изобретением в качестве лекарственного средства для лечения рака, иммунологического расстройства или другого заболевания, характеризующегося или вызванного недостаточной активацией иммунной системы пациента.

30 Настоящее изобретение также относится к способу лечения пациента, страдающего раком, включающему введение этому пациенту эффективного количества агониста OX40.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения пациента, страдающего от рака, включающему введение указанному пациенту эффективного количества агониста ОХ40 и одного или нескольких других агентов, таких как низкомолекулярные соединения или биологические лекарственные средства, для дополнительной модуляции иммунной системы пациента. Примеры таких агентов включают антитела против PD-1 и малые противоопухолевые молекулы, такие как ингибиторы мультитикиназ.

Кроме того, настоящее изобретение относится к совместному введению агониста ОХ40 согласно настоящему изобретению и другого лекарственного средства пациенту, когда такое другое лекарственное средство оказывает синергетическое или аддитивное действие.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящее изобретение относится к агонисту рецептора CD40 (CD40), который включает множественные связывающие CD40 участки.

Предпочтительно указанный агонист содержит более двух связывающих участков.

Более предпочтительно агонист содержит четыре связывающих участка

Предпочтительно агонист содержит по меньшей мере два идентичных связывающих участка.

Предпочтительно агонист содержит по меньшей мере два набора из двух идентичных связывающих участков.

В качестве альтернативы, указанный агонист содержит четыре связывающих участка, которые связываются с одним и тем же эпитопом.

Настоящее изобретение также относится к способам активации компонентов иммунной системы у пациента посредством введения агониста CD40 в соответствии с настоящим изобретением.

Применение агониста CD40 по настоящему изобретению в качестве лекарственного средства.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения агонист TNFR содержит два моноклональных антитела, которые распознают и связываются с двумя различными участками одного и того же TNFR и могут совместно вводиться пациенту, нуждающемуся в этом.

Кроме того, настоящее изобретение относится к совместному введению агониста TNFR согласно настоящему изобретению и другого лекарственного средства пациенту, когда



такое другое лекарственное средство оказывает синергетическое или аддитивное действие.

Неисчерпывающий список медикаментов включает перенаправляющие Т-клетки мультиспецифичные антитела, ингибиторы контрольных точек, иммуномодулирующие агенты.

Настоящее изобретение также относится к применению таких материалов для дополнительных терапевтических и других применений.

Если не указано иное, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, будут иметь значения, которые обычно понимают специалисты в данной области техники. Кроме того, если иное не требуется в контексте, термины в единственном числе включают множественное число, а термины во множественном числе включают единственное число. Как правило, номенклатуры, используемые в связи с методами и технологиями клеточной и тканевой культуры, молекулярной биологии и химии и гибридизации белков и олиго- или полинуклеотидов, описанных в настоящем документе, являются хорошо известными и широко используемыми в данной области. Для рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов, а также для культуры и трансформации тканей используют стандартные методики (например, электропорация, липофекция). Ферментативные реакции и методики очистки выполняются в соответствии со рекомендациями производителя или как обычно осуществляются в данной области техники или как описано в настоящем документе. Вышеуказанные методики и процедуры обычно выполняются в соответствии с обычными способами, хорошо известными в данной области техники, и как описано в различных общих и более конкретных ссылках, которые цитируются и обсуждаются в настоящей спецификации. См., например, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Номенклатуры, используемые в связи с описанными в настоящем документе лабораторными процедурами и методами аналитической химии, синтетической органической химии и медицинской и фармацевтической химии, хорошо известны и широко используются в данной области. Для химического синтеза, химического анализа, фармацевтической подготовки, составления и доставки и лечения пациентов используются стандартные методики.

Известно, что основная структурная единица антитела содержит тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, причем каждая пара имеет одну "легкую" (около 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (около 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи включает переменную область примерно от 100 до

110 или более аминокислот, в первую очередь ответственную за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константную область, в первую очередь ответственную за эффекторную функцию. В общем, молекулы антител, полученные от людей, относятся к любому из классов IgG, IgM, IgA, IgE и IgD, которые отличаются друг от друга природой тяжелой цепи, присутствующей в молекуле. Некоторые классы также имеют подклассы (также известные как изотипы), такие как IgG1, IgG2 и другие. Кроме того, у человека легкая цепь может представлять собой каппа-цепь или лямбда-цепь.

Используемый в настоящем документе термин "моноклональное антитело" (MAb) или "композиция моноклонального антитела" относится к популяции молекул антитела, которые содержат только один молекулярный вид молекулы антитела, состоящий из уникального продукта гена легкой цепи и уникального продукта гена тяжелой цепи. В частности, определяющие комплементарность области (CDR) моноклонального антитела идентичны во всех молекулах такой популяции. MAb содержат антигенсвязывающий сайт, способный иммунореагировать с конкретным эпитопом антигена, характеризующимся уникальной аффинностью связывания с ним.

Термин "антигенсвязывающий сайт" или "связывающий участок" относится к той части молекулы иммуноглобулина, которая участвует в связывании антигена. Антигенсвязывающий сайт образован аминокислотными остатками N-концевых переменных ("V") областей тяжелой ("H") и легкой ("L") цепей. Три сильно дивергирующих участка в V-областях тяжелой и легкой цепей, называемых "гиперпеременными областями", расположены между более консервативными фланкирующими участками, известными как "каркасные области" или "FR". Таким образом, термин "FR" относится к аминокислотным последовательностям, которые естественным образом находятся между гиперпеременными областями в иммуноглобулинах и примыкают к ним. В молекуле антитела три гиперпеременных участка легкой цепи и три гиперпеременных участка тяжелой цепи расположены относительно друг друга в трехмерном пространстве, формируя антигенсвязывающую поверхность. Антигенсвязывающая поверхность комплементарна трехмерной поверхности связанного антигена, и три гиперпеременные области каждой из тяжелых и легких цепей называются "определяющими комплементарность областями" или "CDR". Распределение аминокислот по каждому домену соответствует определениям Кабата последовательностей белков, представляющих иммунологический интерес (Национальные институты здоровья, Бетезда, Мэриленд (1987 и 1991)), или Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), Chothia et al. Nature 342:878- 883 (1989).

Части слитых белков по настоящему изобретению, которые представляют собой фрагменты однодоменного антитела (sdAb), упоминаются в данном документе взаимозаменяемо как направленные полипептиды.

Используемый в настоящем документе термин "эпитоп" включает любую детерминанту белка, которую может специфично связывать иммуноглобулин или его фрагмент или Т-клеточный рецептор. Термин "эпитоп" включает любую белковую детерминанту, которую способен специфично связывать иммуноглобулин или Т-клеточный рецептор. Эпитопные детерминанты обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как боковые цепи аминокислот или сахаров, и обычно имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические зарядовые характеристики. Говорят, что антитело специфически связывается с антигеном, когда константа диссоциации составляет  $<1$  мМ, например, в некоторых вариантах реализации  $<1$  мкМ; например,  $<100$  нМ,  $<10$  нМ или  $<1$  нМ.

Используемые в настоящем документе термины "иммунологическое связывание" и "свойства иммунологического связывания" относятся к таким нековалентным взаимодействиям, которые происходят между молекулой иммуноглобулина и антигеном, для которого данный иммуноглобулин является специфическим. Сила или аффинность иммунологических связывающих взаимодействий могут быть выражены через константу диссоциации ( $K_d$ ) взаимодействия, где меньшая  $K_d$  представляет большую аффинность. Свойства иммунологического связывания выбранных полипептидов могут быть определены количественно с использованием способов, хорошо известных в данной области. Один из таких способов включает измерение скоростей образования и диссоциации комплекса антигенсвязывающего сайта/антигена, причем эти скорости зависят от концентраций партнеров, образующих комплекс, аффинности взаимодействия и геометрических параметров, которые в равной степени влияют на скорость в обоих направлениях. Таким образом, как "константа скорости ассоциации" ( $k_{on}$ ), так и "константа скорости диссоциации" ( $k_{off}$ ) могут быть определены путем расчета концентраций и фактических скоростей ассоциации и диссоциации. (См. Nature 361: 186-87 (1993)). Отношение  $k_{off}/k_{on}$  позволяет устранить все параметры, не связанные с аффинностью, и равно константе диссоциации  $K_d$ . (см., в общих чертах, Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59: 439-473). Считается, что антитело согласно настоящему изобретению специфически связывается с антигеном, когда константа равновесного связывания ( $K_d$ ) составляет  $<1$  мМ, в некоторых вариантах реализации  $<1$  мМ  $<100$  нМ,  $<10$  нМ или от  $<100$  пМ до приблизительно 1 пМ, при измерении с помощью таких

анализов, как анализ радиолигандного связывания, поверхностный плазмонный резонанс (SPR), анализ связывания с помощью проточной цитометрии или аналогичные анализы, известные специалистам в данной области.

Термин "выделенный белок", упомянутый в данном документе, означает белок, полученный с применением кДНК, рекомбинантной РНК или синтетического происхождения или некоторую их комбинацию, причем в силу своего происхождения или источника происхождения "изолированный белок" (1) не ассоциирован с белками, встречающимися в природе, (2) не содержит других белков из того же источника, например, не содержит белков из морских продуктов, (3) экспрессируется клеткой другого биологического вида или (4) не встречается в природе.

Термин "полипептид" используется в настоящем документе как общий термин для обозначения нативного белка, фрагментов или аналогов полипептидной последовательности. Следовательно, нативные белковые фрагменты и аналоги являются видами рода полипептидов.

Используемый в настоящем документе термин "встречающийся в природе" применительно к объекту относится к тому факту, что объект можно найти в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, которая присутствует в организме (включая вирусы), которая может быть выделена из источника в природе и которая не была преднамеренно изменена человеком в лаборатории или иным образом, является "встречающейся в природе".

Термин "идентичность последовательности" означает, что две полинуклеотидные или аминокислотные последовательности являются идентичными (при сравнении по принципу нуклеотид к нуклеотиду или остаток к остатку) в окне сравнения. Термин "процент идентичности последовательности" рассчитывается путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей по окну сравнения, с определением количества положений, в которых идентичное основание нуклеиновой кислоты (например, А, Т, С, G, U или I) или остаток встречается в обеих последовательностях, получая количество совпадающих позиций, затем разделив количество совпадающих позиций на общее количество позиций в окне сравнения (т.е. размер окна), и умножив результат на 100, получая в итоге процент идентичности последовательности. Термины "существенная идентичность", используемые в данном документе, обозначают характеристику полинуклеотида или аминокислотной последовательности, когда полинуклеотид или аминокислота содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 85-процентную идентичность последовательности, например, по меньшей

мере от 90 до 95 процентов идентичности последовательности, более обычно, по меньшей мере на 99% идентичность последовательности по сравнению с эталонной последовательностью в окне сравнения длиной по меньшей мере 18 положений нуклеотидов (6 аминокислот), часто в окне длиной по меньшей мере 24-48 положений нуклеотидов (8-16 аминокислот), причем процент идентичности последовательности рассчитывают путем сравнения эталонной последовательности с последовательностью, которая может включать в себя делеции или добавления, которые составляют 20 процентов или менее от эталонной последовательности в окне сравнения. Эталонная последовательность может быть подмножеством большей последовательности.

Используемые в настоящем документе двадцать обычных аминокислот и их аббревиатуры следуют общепринятому использованию. См. Immunology - A Synthesis (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland7 Mass. (1991)). Стереоизомеры (например, D-аминокислоты) двадцати обычных аминокислот, неприродные аминокислоты, такие как  $\alpha$ -,  $\alpha$ -дизамещенные аминокислоты, N-алкиламинокислоты, молочная кислота и другие нетрадиционные аминокислоты, также могут быть подходящими компонентами для полипептидов по настоящему раскрытию. Примеры нетрадиционных аминокислот включают: 4-гидроксипролин,  $\gamma$ -карбоксиглутамат,  $\epsilon$ -N, N, N-триметиллизин,  $\epsilon$ -N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин,  $\sigma$ -N-метиларгинин и другие сходные аминокислоты и иминокислоты (например, 4-гидроксипролин). В используемом в настоящем документе обозначении полипептида левое направление является аминоконцевым направлением, а правое направление является карбоксиконцевым направлением в соответствии со стандартным использованием и соглашением.

Аналогично, если не указано иное, левым концом одноцепочечных полинуклеотидных последовательностей считается 5'-конец, а левое направление двухцепочечных полинуклеотидных последовательностей называется 5'-направлением. Направление присоединения возникающих РНК-транскриптов 5'-3' называется направлением транскрипции, области последовательности на цепи ДНК, имеющие ту же последовательность, что и РНК, и которые идут от 5' к 5'-концу РНК-транскрипта. называются "последовательности апстрим", а области последовательности на цепи ДНК, имеющие ту же последовательность, что и РНК, и которые идут от 3' до 3'-конца РНК-транскрипта, называются "последовательностями даунстрим".

Применительно к полипептидам термин "существенная идентичность" означает, что две пептидные последовательности, при оптимальном выравнивании, например, с помощью

программ GAP или BESTFIT, использующих штраф за делецию по умолчанию, имеют идентичные по меньшей мере на 80% последовательности, например идентичные по меньшей мере на 90% последовательности, идентичные по меньшей мере на 95% последовательности или идентичные по меньшей мере на 99% последовательности.

- 5 В некоторых вариантах реализации положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами.

"Консервативные аминокислотные замены" относятся к взаимозаменяемости остатков, имеющих сходные боковые цепи. Например, группа аминокислот, имеющих алифатические боковые цепи, включает глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; группа аминокислот, имеющих алифатически-гидроксильные боковые цепи, включает серин и треонин; группа аминокислот с амидсодержащими боковыми цепями включает аспарагин и глутамин; группа аминокислот, имеющих ароматические боковые цепи, включает фенилаланин, тирозин и триптофан; группа аминокислот, имеющих основные боковые цепи, включает лизин, аргинин и гистидин; и группа аминокислот, имеющих серосодержащие боковые цепи, включает цистеин и метионин. Подходящими группами с консервативными аминокислотными заменами являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутаминово-аспарагиновый и аспарагин-глутамин.

Как обсуждается в данном документе, небольшие вариации в аминокислотных последовательностях антител или молекул иммуноглобулина рассматриваются как охватываемые настоящим раскрытием, при условии, что вариации в аминокислотной последовательности сохраняют по меньшей мере 75%, например, по меньшей мере на 80%, 90 %, 95% или 99%. В частности, предусматриваются консервативные замены аминокислот. Консервативными заменами являются те, которые происходят в семействе аминокислот, связанных в их боковых цепях. Генетически кодируемые аминокислоты обычно делятся на семейства: (1) кислыми аминокислотами являются аспартат, глутамат; (2) основными аминокислотами являются лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярными аминокислотами являются аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан, и (4) незаряженными полярными аминокислотами являются глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Гидрофильные аминокислоты включают аргинин, аспарагин, аспартат, глутамин, глутамат, гистидин, лизин, серин и треонин. Гидрофобные аминокислоты включают аланин, цистеин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, триптофан, тирозин и валин. Другие семейства аминокислот включают (i) серин и треонин, которые являются алифатическим-

гидроксисемейством; (ii) аспарагин и глутамин, которые являются амидсодержащим семейством; (iii) аланин, валин, лейцин и изолейцин, которые являются алифатическим семейством; и (iv) фенилаланин, триптофан и тирозин, которые являются ароматическим семейством. Например, разумно ожидать, что изолированная замена лейцина на  
5 изолейцин или валин, аспартата на глутамат, треонина на серин или аналогичная замена аминокислоты структурно родственной аминокислотой не будет оказывать большое влияние на связывание или свойства получаемой молекулы, особенно если эта замена не затрагивает аминокислоту в каркасном сайте. Приводит ли замена аминокислоты к функциональному пептиду, может быть легко определено путем анализа специфической  
10 активности производного полипептида. Способы анализа подробно описаны в настоящем документе. Фрагменты или аналоги антител или молекул иммуноглобулина могут быть легко получены специалистами в данной области. Подходящие амино- и карбоксиконцы фрагментов или аналогов встречаются вблизи границ функциональных доменов. Структурные и функциональные домены можно идентифицировать путем сравнения  
15 данных нуклеотидных и/или аминокислотных последовательностей с общедоступными или коммерческими базами данных последовательностей. В некоторых вариантах реализации используют компьютеризированные способы сравнения для идентификации мотивов последовательности или предсказанных доменов конформации белка, которые встречаются в других белках с известной структурой и/или функцией. Методы  
20 идентификации последовательностей белков, которые складываются в известную трехмерную структуру, известны. Bowie et al. Science 253: 164 (1991). Таким образом, приведенные выше примеры показывают, что специалисты в данной области техники способны распознавать мотивы последовательности и структурные конформации, которые могут использоваться для определения структурных и функциональных доменов  
25 в соответствии с изобретением.

Подходящими аминокислотными заменами являются такие, которые: (1) уменьшают восприимчивость к протеолизу, (2) уменьшают восприимчивость к окислению, (3) изменяют аффинность связывания для образования белковых комплексов, (4) изменяют аффинность связывания и (4) наделяют или модифицируют другие физико-химические  
30 или функциональные свойства таких аналогов. Аналоги могут включать различные мутеины с последовательностью, отличной от встречающейся в природе пептидной последовательности. Например, одиночные или множественные аминокислотные замены (например, консервативные аминокислотные замены) могут быть сделаны во встречающейся в природе последовательности (например, в части полипептида вне

домена (доменов), образующего межмолекулярные контакты. Консервативная аминокислотная замена не должна существенно изменять структурные характеристики родительской последовательности (например, замещающая аминокислота не должна стремиться разрушить спираль, которая встречается в родительской последовательности, или нарушить другие типы вторичной структуры, которая характеризует родительскую последовательность). Примеры известных в данной области полипептидных вторичных и третичных структур описаны в *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); и Thornton et al. *Nature* 354:105 (1991).

Используемый в настоящем документе термин "полипептидный фрагмент" относится к полипептиду, который содержит делецию на аминоконце и/или карбоксиконце, но в котором оставшаяся аминокислотная последовательность идентична соответствующим положениям встречающейся в природе последовательности, полученной, например, из полной последовательности кДНК. Фрагменты обычно имеют длину по меньшей мере 5, 6, 8 или 10 аминокислот, например длину по меньшей мере 14 аминокислот, длину по меньшей мере 20 аминокислот, длину по меньшей мере 50 аминокислот или длину по меньшей мере 70 аминокислот. Используемый в настоящем документе термин "аналог" относится к полипептидам, которые состоят из сегмента, длиной по меньшей мере 25 аминокислот, который имеет существенную идентичность части выведенной аминокислотной последовательности и который имеет специфическое связывание с CD47 в подходящих условиях связывания. Обычно полипептидные аналоги содержат консервативную аминокислотную замену (или добавление или делецию) относительно встречающейся в природе последовательности. Аналоги, как правило, имеют длину по меньшей мере 20 аминокислот, например, по меньшей мере 50 аминокислот или более, и часто могут быть такими же длинными, как и полноразмерный встречающийся в природе полипептид.

Аналоги пептидов обычно используются в фармацевтической промышленности в качестве непептидных лекарственных средств со свойствами, аналогичными свойствам матричного пептида. Эти типы непептидных соединений называют "пептидными миметиками" или "пептидомиметиками". Fauchere, J. *Adv. Drug Res.* 15:29 (1986), Veber and Freidinger *TINS* p.392 (1985); и Evans et al. *J. Med. Chem.* 30:1229 (1987). Такие соединения часто разрабатываются с помощью компьютерного молекулярного моделирования. Пептидные миметики, которые структурно аналогичны терапевтически полезным пептидам, могут



быть использованы для получения эквивалентного терапевтического или профилактического действия. Как правило, пептидомиметики структурно аналогичны исходному полипептиду (то есть полипептиду, который обладает биохимическим свойством или фармакологической активностью), такому как антитело человека, но имеют одну или несколько пептидных связей, необязательно замененных связью, выбранной из группы, состоящей из: --CH<sub>2</sub>NH--, --CH<sub>2</sub>S--, --CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>--, --CH=CH-(цис и транс), --COCH<sub>2</sub>--, CH(OH)CH<sub>2</sub>--, и -CH<sub>2</sub>SO--, способами, хорошо известными в данной области. Систематическая замена одной или нескольких аминокислот консенсусной последовательности на D-аминокислоту того же типа (например, D-лизин вместо L-лизина) может использоваться для получения более стабильных пептидов. Кроме того, конформационно ограниченные пептиды, содержащие консенсусную последовательность или по существу идентичное изменение консенсусной последовательности, могут быть получены способами, известными в данной области (Rizo and Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* 61: 387 (1992)); например, путем добавления внутренних цистеиновых остатков, способных образовывать внутримолекулярные дисульфидные мостики, которые циклизуют пептид.

Термин "агент" используют в настоящем документе для обозначения химического соединения, смеси химических соединений, биологической макромолекулы и/или экстракта органа, полученных из биологических материалов.

Используемый в настоящем документе термин "метка" или "меченный" относится к включению детектируемого маркера, например, путем включения радиоактивно меченной аминокислоты или присоединения к полипептиду биотинильных фрагментов, которые могут быть обнаружены с помощью маркированного авидина (например, стрептавидина, содержащего флуоресцентный маркер или обладающего ферментативной активностью, которая может быть обнаружена оптическими или калориметрическими методами). В определенных ситуациях метка или маркер также могут быть терапевтическими средствами. Различные способы мечения полипептидов и гликопротеинов известны в данной области и могут быть использованы. Примеры меток для полипептидов включают, среди прочего, следующие: радиоизотопы или радионуклиды (например, <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>35</sup>S, <sup>90</sup>Y, <sup>99</sup>Tc, <sup>111</sup>In, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I), флуоресцентные метки (например, FITC, родамин, лантаноидные люминофоры), ферментные метки (например, пероксидаза хрена, β-галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза), хемилюминесцентные, биотинильные группы, заранее определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, последовательности пар лейциновой молнии, сайты связывания

для вторичных антител, металл-связывающие домены, эпитопные метки). В некоторых вариантах реализации метки прикреплены спейсерными группами различной длины, чтобы уменьшить потенциальное стерическое препятствие. Термин "фармацевтический агент или лекарственное средство" в контексте настоящего описания относится к химическому соединению или композиции, способным вызывать желаемый терапевтический эффект при надлежащем введении пациенту.

Термин "противоопухолевый агент" используется в данном документе для обозначения агентов, которые обладают функциональным свойством ингибировать развитие или прогрессирование новообразования у человека, в частности злокачественного (ракового) поражения, такого как рак, саркома, лимфома или лейкоз. Ингибирование метастазирования также часто является свойством противоопухолевых агентов.

Используемые в настоящем документе термины "лечить", "лечение" и тому подобное относятся к уменьшению и/или ослаблению расстройства и/или симптомов, связанных с ним. Под терминами "облегчать" и/или "облегчение" подразумевается снижение, подавление, ослабление, уменьшение, остановка и/или стабилизация развития или прогрессирования заболевания, такого как, например, рак. Следует понимать, что, хотя это и не исключается, лечение расстройства или состояния не требует, чтобы расстройство, состояние или ассоциированные с ними симптомы должны быть полностью устранены.

Другие химические термины в данном описании используются в соответствии с общепринятым применением в данной области, примером чего является The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

Используемый в настоящем документе термин "практически чистый" означает, что указанная молекула является преобладающей присутствующей молекулой (то есть, в молярном отношении она является более распространенной, чем любая другая отдельная молекула в композиции), и в некоторых вариантах реализации практически очищенная фракция представляет собой композицию, в которой молекула-объект включает по меньшей мере приблизительно 50 процентов (в молярном отношении) всех присутствующих макромолекулярных компонентов.

Как правило, практически чистая композиция будет содержать более примерно 80 процентов всех макромолекулярных компонентов, присутствующих в композиции, например, более примерно 85%, 90%, 95% и 99%. В некоторых вариантах реализации молекула-объект очищается до существенной гомогенности (компоненты-загрязнители не

могут быть обнаружены в композиции обычными методами обнаружения), когда композиция состоит по существу из одного макромолекулярного компонента.

В этом описании "содержит", "содержащий", "вмещающий", "имеющий" и т.п. может иметь значение, приписываемое им в патентном праве США и/или Европы, и может означать "включает", "включающий" и тому подобное; термины "состоящий по существу из" или "состоит по существу" также имеют значение, указанное в Патентном законе США, и эти термины являются открытыми, что допускает присутствие большего, чем то, что указано, при том условии, что основные или новые характеристики того, что указано, не изменяются из-за наличия большего, чем указано, но исключает варианты реализации предшествующего уровня техники.

Под "эффективным количеством" подразумевается количество, необходимое для ослабления симптомов заболевания по сравнению с нелеченным пациентом. Эффективное количество активного соединения (-й), используемого (-ых) для практического применения настоящего изобретения для терапевтического лечения заболевания, варьируется в зависимости от способа введения, возраста, массы тела и общего состояния здоровья субъекта. В конечном итоге лечащий врач или ветеринар определит подходящее количество и режим дозирования. Такое количество называется "эффективным" количеством.

Под "субъектом" подразумевается млекопитающее, включая, среди прочего, человека или отличное от человека млекопитающее, такое как бык, лошадь, собака, грызун, овца, примат, верблюд или кошачьи. [00152] Используемый в настоящем документе термин "введение" относится к любому способу переноса, доставки, введения или транспортировки терапевтического агента субъекту, нуждающемуся в лечении таким агентом. Такие способы включают, среди прочего, пероральное, местное, внутривенное, внутривенное, внутримышечное, внутрикожное, интраназальное и подкожное введение.

### **Краткое описание фигур**

Фигура 1: SPR-сенсограмма связывания 2H6 scFv-Fc (верхняя линия) и 2H6 M108L scFv-Fc (нижняя линия) при фиксированной концентрации (200 нМ) с OX40R человека, снятая на чипе CM5 с плотностью лиганда 600 RU при 25°C.

Фигура 2: На графике показаны результаты включения нормализованного 3Н-тимидина из 4 независимых экспериментов СКЛ-реакции со средним значением  $\pm$  стандартное отклонение. Каждая точка данных представляет собой среднее из трех значений

отдельных аллогенных комбинаций. Пунктирная линия представляет уровень аллогенной реакции (без антител). Все комбинации различались незначимо (ns).

Фигура 3: МКПК инкубировали в присутствии SEB с антителами или без антител в течение 7 дней; супернатанты собирали в день 5. Графики показывают среднее  $\pm$  СО нормализованного абсолютного количества CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> на лунку (А) и нормализованную концентрацию IL-2 (В) из 5 независимых экспериментов. Каждая точка данных изображает среднее из трех значений и представляет независимого донора МКПК. Пунктирные линии представляют уровень состояния, при котором МКПК инкубировали только с SEB (без антител), ns, незначимо; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  были получены с использованием одностороннего непараметрического критерия Манна-Уитни.

Фигура 4: МКПК инкубировали в присутствии ФГА с антителами или без антител в течение 5 дней. На графике показаны результаты включения нормализованного 3Н-тимидина из 3 независимых экспериментов со средним значением  $\pm$  стандартное отклонение. Каждая точка данных изображает среднее из трех значений и представляет независимого донора МКПК. Пунктирная линия представляет уровень состояния, при котором МКПК инкубировали только с ФГА (без антител), ns - незначимо.

Фигура 5: ДНС-ПААГ анализ Tetra-1 и Tetra-8. Фотография геля ДНС-ПААГ с окрашиванием Tetra-1 и Tetra-8 Кумасси синим в невосстанавливающих условиях, полученная после очистки белка А. (MW) маркеры молекулярной массы, как указано.

Фигура 6: Аналитическая эксклюзионная хроматография Tetra-1 и Tetra-8. Фигуры 6А и 6В представляют собой серию графиков, изображающих профиль элюции из колонки эксклюзионной хроматографии (SEC) для Tetra-1 (фиг. 6А) и Tetra-8 (фиг. 6В). Процент площади пика (%), который указывает % от общих "обнаружимых" пиков на хроматограмме образца (взятых за 100%), рассчитывали для каждого пика в зависимости от времени их удерживания и указывали в таблицах для Tetra-1 (фигура 6С) и Tetra-8 (фигура 6D).

Фигура 7: Катионообменная очистка Tetra-8. На фигуре 7А приведен график, показывающий профиль элюирования Tetra-8 (пунктирная линия) из катионообменной колонки HiTrap SP HP. Градиент ацетата натрия, используемый для разделения белка, обозначен черной линией. Фиг.7В представляет собой фотографию геля ДНС-ПААГ с окрашиванием Кумасси синим в невосстанавливающих условиях для различных фракций, собранных в результате катионообменной хроматографии с очисткой для Tetra-8.

Фигура 8: Оценка термостабильности Tetra-1 и Tetra-8 методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Фигуры 8А и 8В - графики, представляющие измерения термостабильности Tetra-1 и Tetra-8, соответственно, с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Данные выражены как избыточная молярная теплоемкость (сокращенно  $C_p$  [ккал/моль/° C]; ось Y) в зависимости от температуры (° C; ось X). Указаны события разворачивания, соответствующие доменам scFv, Fab, CH2 и CH3.

Фигура 9: Структура внеклеточного домена OX40. Ленточное представление внеклеточного домена человека OX40 (RCSB: 2HEV). Обогащенные цистеином домены (CRD) выделены серым или черным цветом, поочередно. Дисульфидные связи изображены сферами.

Фигура 10: Выравнивание внеклеточных доменов человека, яванского макака и крысы OX40. Выравнивание множественных последовательностей внеклеточных доменов человека (SEQ ID NO: 1), яванского макака (SEQ ID NO: 122) (сокращенно "супо") и крысы OX40 (SEQ ID NO: 121), полученных с использованием программы T-coffee. CRD обозначены прямоугольниками белого или черного цветов. Спаривания дисульфидных связей указаны стрелками. Остатки, которые строго сохраняются между видами, закрашены черным, а остатки с 70% сохранностью закрашены серым.

Фигура 11. Дозозависимый ответ для различных антител, инкубировали на рекомбинантном рецепторе Human OX40, затем детектировали с помощью специфического к Fab фрагмента против человека, сцепленного с ферментом пероксидазы хрена. Графики показывают сигмоидальные кривые нелинейной регрессии связывания (поглощение при 450 нМ) для каждой обработки. Были протестированы следующие виды обработки: Tetra-8 (O), 7H11\_v8 IgG1 (□), Tetra-22 (▼). Каждая точка данных представляет собой среднее значение  $\pm$  СО для дубликатов измерений.

Фигура 12. Дозозависимый ответ для различных антител, инкубировали на клетках JURKAT-NFkB-OX40, затем детектировали с помощью антитела, специфичного для Fc-фрагмента человека, связанного с фикоэритрином. График показывает сигмоидальные кривые нелинейной регрессии связывания (среднее геометрическое значение интенсивности) для каждой обработки. Были протестированы следующие виды обработки: Tetra-8 (O), 7H11\_v8 IgG1 (□), 2H6 IgG1 (Δ), контроль IgG (▼).

Фигура 13. Дозозависимый ответ для различных антител, инкубировали с различными рецепторами, членами семейства рецепторов фактора некроза опухолей, а затем

детектировали с помощью стрептавидина, связанного с ферментом пероксидазы хрена. На всех рецепторах были протестированы одни и те же виды обработки:

Tetra-8 (O), 7H11 IgG1 ( $\square$ ), 2H6 IgG1 (A), контроль IgG (V), соответствующий коммерческий положительный контроль (X). Графики показывают сигмоидальные кривые нелинейной регрессии связывания (поглощение при 450 нМ) для каждой обработки. Каждая точка данных представляет собой среднее значение дубликатов измерений, за исключением контрольных кривых, которые были измерены в одном экземпляре.

Фигура 14. Дозозависимый ответ для антител инкубировали на рекомбинантном OX40 яванского макака, затем детектировали с помощью антитела Fab-фрагмента иммуноглобулина человека, связанного с ферментом пероксидазы хрена. Графики показывают сигмоидальные кривые нелинейной регрессии связывания (поглощение при 450 нМ) для каждого условия. Были протестированы следующие виды обработки: Tetra-8 (O), 7H11 IgG1 ( $\square$ ), Tetra-22 ( $\Delta$ ). Каждая точка данных представляет собой среднее значение  $\pm$  СО для дубликатов.

Фигура 15. Антитела инкубировали на МКПК человека и яванского макака, затем детектировали с помощью антитела Fc-фрагмента иммуноглобулина человека связанного с фикоэритрином. Графики представляют наложение нескольких гистограмм (среднее геометрическое значение флуоресценции) для каждого антитела на CD4<sup>+</sup> Т-клетках человека или резуса.

Фигура 16. Клетки JURKAT-NFkB-OX40 переносили в предварительно покрытые ОКТ3 (5 нг/мл; в течение ночи) или обычные люминесцентные планшеты. Впоследствии Дозозависимый ответ антител или контролей, инкубировали на клетках JURKAT-NFkB-OX40. После 5 ч инкубации в лунки добавляли субстрат люциферазы и измеряли люминесценцию с помощью считывающего устройства для микропланшетов (лента считывающего устройства - конечная точка; время интегрирования - 1 минута; эмиссия - отверстие; положение оптики - верх; коэффициент усиления 135; высота считывания - 1,00 мм). График показывает сигмоидальные кривые нелинейной регрессии связывания (люминесценция) для каждого условия. Были протестированы следующие виды обработки: Tetra-8 (O), 7H11 IgG1 LALA ( $\square$ ), 2H6 IgG1 LALA ( $\Delta$ ), контроль IgG (V), OX40L (X). Каждая точка данных представляет собой среднее значение  $\pm$  СО для дубликатов.

Фигура 17. Дендритные клетки (DC) дифференцировали в течение 6 дней, затем совместно культивировали со свежевыделенными CD4<sup>+</sup> Т-клетками. Дозозависимый ответ антител или контролей инкубировали на таких клетках, затем после 6 дней

инкубации добавляли тритированный тимидин в течение 18-20 дополнительных часов инкубации. Индекс пролиферации рассчитывали по следующей методике: для каждого образца вычитали фоновый уровень включения тимидина, индуцированный в аутологичных условиях (только CD4<sup>+</sup> Т-клетки) (специфичный для каждого донора CD4<sup>+</sup> Т-клеток), затем эти результаты делили на сигнал включения тимидина, индуцированного в аллогенных условиях. Графики показывают индекс пролиферации для каждой обработки. Каждая точка данных представляет собой среднее из трех повторностей, полученных для каждой комбинации DC-CD4 + Т-клеток. N = 36 комбинаций. Линия Y = 1 представляет нормализованный аллогенный ответ.

Фигура 18. МКПК выделяли из фильтратов и инкубировали с суперантигеном стафилококкового энтеротоксина В (SEB) в присутствии антител или контролей. После 5 дней инкубации супернатанты собирали и выполняли количественный анализ на Luminex для определения высвобождения IL-2. Нормализованное высвобождение IL-2 рассчитывали по следующему методу: для каждого образца вычитали результат количественного определения IL-2, индуцированного в нестимулированных клетках (МКПК без SEB) (специфичного для каждого донора МКПК), затем эти результаты делили на уровень высвобождения IL-2, индуцированного в SEB-стимулированных клетках (без обработки). Сплошная жирная линия представляет порог ответа. Графики показывают нормализованное высвобождение IL-2 для каждой обработки. Каждая точка данных представляет собой среднее из трех повторностей, полученных для каждого донора МКПК. N = 17 доноров МКПК. Линия Y = 1 представляет нормализованный ответ, индуцированный только SEB.

Фигура 19. МКПК выделяли из фильтратов и инкубировали с суперантигеном стафилококкового энтеротоксина В (SEB) в присутствии антител или контролей в концентрации 80 и 10 нМ. После 5 дней инкубации супернатанты собирали и выполняли количественный анализ на Luminex для определения высвобождения IL-2. Нормализованное высвобождение IL-2 рассчитывали по следующему методу: для каждого образца вычитали результат количественного определения IL-2, индуцированного в нестимулированных клетках (МКПК без SEB) (специфичного для каждого донора МКПК), затем эти результаты делили на уровень высвобождения IL-2, индуцированного в SEB-стимулированных клетках (без обработки). Сплошная жирная линия представляет порог ответа. Графики показывают нормализованное высвобождение IL-2 для каждой обработки. Каждая точка данных представляет собой среднее из трех повторностей,

полученных для каждого донора МКПК. Линия  $Y = 1$  представляет нормализованный ответ, индуцированный только SEB.

Фигура 20: Схематическое изображение молекул с учетом связывающих звеньев 7H11 и 2H6, имеющих различные валентности и архитектуры.

5 Фигура 21: Анализ связывания 7H11 и 2H6 с OX40 при слиянии на С-конце в формате Fab или scFv. Измерения методом поверхностно-плазмонного резонанса (SPR) протеолитически расщепленных четырехвалентных молекул вблизи их шарнирных областей (Fc-2H6 Fab/2H6 Fab, Fc-2H6 Fab/7H11 scFv, Fc-7H11 Fab/7H11 Fab и Fc-7H11 Fab/2H6 scFv, как указано) для химерных молекул OX40 chiOX40 R-Fc NHRH (фиг. 21A) 10 или chiOX40 R-Fc RRHH (фиг. 21B). Данные выражены в виде количества единиц ответа (сокращенно RU; ось Y) в зависимости от времени (ось X). Фиг.21C показывает схематическое представление агонистов, использованных в этом анализе.

Фигура 22: Определение совместного связывания OX40 с помощью 7H11 Fab и 2H6 scFv при слиянии на С-конце. Измерения совместного связывания с помощью SPR фрагмента 15 Fc-7H11 Fab/2H6 scFv с химерными молекулами OX40, chiOX40R-Fc NHRH (фиг. 22A) или chiOX40R-Fc RRHH (фиг. 22B), иммобилизованными на CHIP и последовательным введением OX40 человека (NHHH), chiOXR -Fc (NHRH) и chiOX40R-Fc (RRHH). Данные выражены в виде количества единиц ответа (сокращенно RU; ось Y) в зависимости от времени (ось X). На фиг 22.C показано схематическое представление агонистов, 20 использованных в этом анализе.

Фигура 23: Определение совместного связывания OX40 с помощью 7H11 scFv и 2H6 Fab при слиянии на С-конце. Измерения совместного связывания с помощью SPR фрагмента Fc-2H6 Fab/7H11 scFv с химерными молекулами OX40 chiOX40R-Fc NHRH (фиг. 23A) 25 или chiOX40R-Fc RRHH (фиг. 23B), иммобилизованными на CHIP и последовательным введением OX40 человека (NHHH), chiOXR -Fc (NHRH) и chiOX40R-Fc (RRHH). Данные выражены в виде количества единиц ответа (сокращенно RU; ось Y) в зависимости от времени (ось X). На фиг.23C показано схематическое представление агонистов, использованных в анализе.

Фигура 24: МКПК выделяли из фильтратов и инкубировали с суперантигеном 30 стафилококкового энтеротоксина В (SEB) в присутствии антител или контролей в концентрации 80 и 10 нМ. После 5 дней инкубации супернатанты собирали и выполняли количественный анализ на Luminex для определения высвобождения IL-2. Нормализованное высвобождение IL-2 рассчитывали по следующему методу: для каждого



образца вычитали результат количественного определения IL-2, индуцированного в нестимулированных клетках (МКПК без SEB) (специфичного для каждого донора МКПК), затем эти результаты делили на уровень высвобождения IL-2, индуцированного в SEB-стимулированных клетках (без обработки). Сплошная жирная линия представляет порог ответа. Графики показывают нормализованное высвобождение IL-2 для каждой обработки. Каждая точка данных представляет собой среднее из трех повторностей, полученных для каждого донора МКПК. Линия  $Y = 1$  представляет нормализованный ответ, индуцированный только SEB.

Фигура 25: МКПК выделяли из фильтратов и инкубировали с суперантигеном стафилококкового энтеротоксина В (SEB) в присутствии антител или контролей в концентрации 80 и 10 нМ. После 5 дней инкубации супернатанты собирали и выполняли количественный анализ на Luminex для определения высвобождения IL-2. Нормализованное высвобождение IL-2 рассчитывали по следующему методу: для каждого образца вычитали результат количественного определения IL-2, индуцированного в нестимулированных клетках (МКПК без SEB) (специфичного для каждого донора МКПК), затем эти результаты делили на уровень высвобождения IL-2, индуцированного в SEB-стимулированных клетках (без обработки). Сплошная жирная линия представляет порог ответа. Графики показывают нормализованное высвобождение IL-2 для каждой обработки. Каждая точка данных представляет собой среднее из трех повторностей, полученных для каждого донора МКПК. Линия  $Y = 1$  представляет нормализованный ответ, индуцированный только SEB.

Фигура 26: Наложение аналитических гель-фильтрационных хроматограмм. Наложены хроматограммы для Tetra-8 отдельно, hOX440 и комплексов антитело-hOX440 в соотношении 1: 4. Стрелки, указывающие ожидаемые молекулярные массы, соответствуют пикам калибровочного прогона и представляют ферритин (440 кДа), альдолазу (158 кДа) и карбоангидразу (29 кДа). Обратите внимание на различия между Tetra-8 и обращенным Tetra-8 (обозначены стрелками) – у Tetra-8 наблюдается плечо в VO, а второй пик смещен в сторону более высокой молекулярной массы по сравнению с таковым у обращенного Tetra-8.

Фигура 27: Кристаллическая решетка Tetra-8-hO X40. Показана возможность большой двумерной структуры решетки. Два hOX40 на каждую TETRA-8 были использованы для построения, теоретически, бесконечно большой структуры.

Фигура 28. Интервальная фотосъемка OX40-GFP на клеточной линии Jurkat OX40-GFP после обработки Tetra-8. Экспрессирующие eGFP OX40 клетки линии Jurkat

инкубировали в течение ночи при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> на чашках для культивирования клеток Fluorodish (WPI) (20000 клеток/см<sup>2</sup>), предварительно покрытых фибронектином (1 мкг/см<sup>2</sup> в PBS). Затем к клеточной среде добавляли Tetra-8 при конечной концентрации 80 нМ в течение различных временных интервалов (в диапазоне от 2,5 до 27,5 мин) и клетки визуализировали с использованием инвертированного микроскопа Zeiss Z1, оборудованного конфокальным модулем LSM 800, с увеличением 63х.

Фигура 29. Конфокальные изображения кластеров OX40, индуцированных Tetra-8 и другими молекулами, нацеленными на OX40. Клетки Jurkat OX40-GFP обрабатывали в течение 5, 10 или 20 минут различными молекулами, нацеленными на OX40 (Tetra-8, 1A7, OX40L и Tetra-14), используемыми в концентрациях 20 нМ (А) или 80 нМ (В).

Фигура 30. Количественный анализ кластеризации OX40, индуцированной различными анти-OX40 молекулами на клеточной линии GFP Jurkat-OX40. Конфокальные изображения кластеров OX40, индуцированных Tetra-8 и другими нацеленными на OX40 молекулами на клетках Jurkat OX40-GFP анализировали с использованием метода эксцесса, как описано в примере.

Фигура 31. Анализ активации дендритных клеток (DC). Дендритные клетки (DC) выделяли из МКПК (у 3 доноров - из фильтратов и одного донора - из цельной крови) и дифференцировали в течение 6 дней, затем культивировали в течение двух дополнительных дней в присутствии антител или контролей. После инкубации клетки собирали и окрашивали анти-CD1c-APC, анти-CD80-PE, анти-CD86-PerCP-eF710 для панели 1 или анти-CD1c-APC, анти-CD83-FITC, анти-HLA-DR- PerCP5.5 для панели 2. График показывает процент сверхэкспрессирующих клеток для маркеров CD83 и CD86, по сравнению с DC без обработки, которые также экспрессируют некоторые из этих маркеров конститутивно. Каждая точка данных является значением для одного донора DC. N = 4 донора.

Фигура 32. Дозозависимый ответ для антител или контролей инкубировали на клетках NFkB-Luc2P/U20S, пригодных для использования после размораживания. После 4 ч инкубации в лунки добавляли субстрат люциферазы и измеряли люминесценцию с помощью считывающего устройства для микропланшетов (лента считывающего устройства - конечная точка; время интегрирования - 1 минута; эмиссия - отверстие; положение оптики - верх; усиление 135; высота считывания - 1,00 мм).

График показывает сигмоидальные кривые нелинейной регрессии связывания (люминесценция) для каждого условия. Были протестированы следующие виды

обработки: селикрелумаб IgG (O), IgG1 ADC-1013 (□), LALA IgG1 3х56 (Δ), селикрелумаб\_3h56 (•), ADC-1013\_3h56 (■), CD40L (X). Каждая точка данных представляет собой среднее значение ± СО для дубликатов.

### Пример 1.

#### 5 Получение и скрининг мышинных антител против OX40 человека

Для получения рекомбинантного белка человека OX40-his внеклеточную область (аминокислоты 1-214, как указано в SEQ ID NO: 1) TNFRSF4 человека амплифицировали с помощью ПЦР, добавляя 3' GSG-6xHis линкер и сайты рестрикции для клонирования. Продукт ПЦР впоследствии клонировали в модифицированной плазмиде pcDNA3.1(-), описанной выше. Эта рекомбинантная плаزمида позволяла экспрессировать OX40 человека с his сеткой в клетках млекопитающих с секрецией в среду для культивирования клеток, управляемой нативным сигнальным пептидом TNFRSF4 человека. Для получения белка рекомбинантный вектор трансфицировали в адаптированные к суспензии клетки НЕК 293 (номер ATCC CRL 1573) с использованием реагента для трансфекции jetPEI™ (Polyplus-transfection S.A., Страсбург, Франция; дистрибьютор: Brunschwig, Базель, Швейцария). Супернатант клеточной культуры собирали через пять дней после трансфекции и очищали с использованием колонки для аффинной очистки Ni<sup>2+</sup>-NTA (колонка с сефарозой HiTrap Ni<sup>2+</sup> -NTA; GE Healthcare Europe GmbH, Глаттбругг, Швейцария), работающей на системе АКТА FPLC (GE Healthcare Europe GmbH, Швейцария, Швейцария).

Было установлено, что рекомбинантные белки человека OX40-Fc и OX40-his имеют чистоту 95% по данным ДНС-ПААГ, и затем перед использованием была выполнена замена буфера фосфатным буферным солевым раствором (PBS).

Для получения рекомбинантного белка человека OX40L-Fc, приобретали кДНК TNFSF4 человека у производителя imaGenes (клон: IOH46203, Берлин, Германия) и внеклеточную часть (аминокислоты 51-183) лиганда TNFSF4 человека (нумерация согласно базе данных последовательностей Uniprot Q.6FGS4) амплифицировали с фланкирующими сайтами рестрикции для последующего клонирования в модифицированный вектор экспрессии млекопитающих на основе плазмиды pcDNA3.1(-) производителя Invitrogen (Invitrogen AG, Базель, Швейцария, кат. № V795-20), содержащий область Fc IgG1 человека (положения ЕС 223-451), промотор CMV человека с донорно-акцепторным фрагментом Ig (первый интрон), описанный в патенте США 5924939, последовательность OriP (Koons et al. 2001, J. Virol. 75 (22): 10582-92.), энхансер SV40 и полиА SV40, слитый с терминатором

гастрина, как описано Kim et al. (2003, Biotechnol Prog. 19 (5), p. 1620-2). Эта рекомбинантная плазмида позволила экспрессировать слитый белок внеклеточный домен TNFSF4-Fc человека в клетках млекопитающих с секрецией в среду для культивирования клеток, управляемую лидерным пептидом VJ2C. Для получения рекомбинантного белка вышеупомянутый рекомбинантный вектор трансфицировали в адаптированные к суспензии клетки НЕК 293 (номер ATCC CRL 1573) с использованием катионных полимеров. Супернатант клеточной культуры собирали через пять дней и дополнительно очищали партиями с использованием аффинных микросфер CaptivA™ primAB (Repligen, Уолтем, Массачусетс, США) и затем заменяли буфер фосфатным буферным солевым раствором (PBS) перед использованием.

Для получения рекомбинантного белка макака OX40-Fc был создан синтетический ген, соответствующий внеклеточной части макаки OX40 (аминокислоты 29-214 последовательности NCBI XP\_001090870.1) (GeneArt, ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс) с сайтами рестрикции для последующего клонирования в модифицированный вектор экспрессии млекопитающих на основе плазмиды pcDNA3.1(-) производителя Invitrogen (Invitrogen AG, Базель, Швейцария, кат. № V795-20), содержащей область Fc IgG1 человека (положения EC 223 -451), промотор CMV человека с донорно-акцепторным фрагментом Ig (первый интрон), описанный в патенте США 5924939, последовательность OriP (Koons et al. 2001, J Virol. 75 (22): 10582-92.), энхансер SV40, и полиА SV40, слитый с терминатором гастрина, как описано Kim et al. (2003, Biotechnol Prog. 19 (5), p. 1620-2). Эта рекомбинантная плазмида позволяла экспрессировать белок слияния внеклеточный домен макака OX40- Fc в клетках млекопитающих с секрецией в среду для культивирования клеток, управляемую лидерным пептидом VJ2C. Для получения рекомбинантного белка вышеупомянутый рекомбинантный вектор трансфицировали в адаптированные к суспензии клетки НЕК 293 (номер ATCC CRL 1573) с использованием катионных полимеров. Супернатант клеточной культуры собирали через пять дней и дополнительно очищали партиями, используя аффинные микросферы CaptivA™ primAB (Repligen, Уолтем, Массачусетс, США), и затем заменяли буфер фосфатным буферным солевым раствором (PBS) перед использованием.

Для получения рекомбинантного белка OX40-Fc человека кДНК для TNFRSF4 человека была приобретена у imaGenes (номер клона: RZPDB737H0329D; Берлин, Германия). Эту кДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР-амплификации ДНК-кодирующей области внеклеточного домена TNFRSF4 человека (аминокислоты 1-214, как указано в SEQ ID NO: 1). В отдельной ПЦР-реакции амплифицировали Fc-область IgG1 человека

(положения ЕС 223-451). Затем два полученных продукта были слиты с использованием ПЦР с удлинением внахлест с фланкирующими праймерами, добавляя сайты рестрикции для последующего клонирования в модифицированный вектор экспрессии млекопитающих на основе плазмиды pcDNA3.1(-) от Invitrogen (Invitrogen AG, Базель, Швейцария, кат. № V795-20V795-20), содержащий промотор CMV человека с донорно-акцепторным фрагментом Ig (первый интрон), описанный в патенте США 5924939, последовательность OriP (Koons et al. 2001, J Virol. 75 (22): 10582-92.) энхансер SV40 и полиА SV40, слитые с терминатором гастринина, как описано Kim et al. (2003, Biotechnol Prog. 19 (5), p. 1620-2). Эта рекомбинантная плазмида позволяла экспрессировать слитый белок внеклеточный домен TNFRSF4 - Fc человека в клетках млекопитающих с секрецией в среду для культивирования клеток, управляемую нативным сигнальным пептидом белка TNFRSF4 человека. Для получения рекомбинантного белка вышеупомянутый рекомбинантный вектор трансфицировали в адаптированные к суспензии клетки НЕК 293 (номер ATCC CRL 1573) с использованием реагента для трансфекции jetPEI™ (Polyplus-transfection S.A., Страсбург, Франция; дистрибьютор: Brunschwig, Базель, Швейцария). Супернатант клеточной культуры собирали через пять дней и дополнительно очищали с использованием аффинной колонки для очистки на основе связывания с белком А (колонка с сефарозой HiTrap Protein A; GE Healthcare Europe GmbH, Глаттбругг, Швейцария), работающей в системе АКТА FPLC (GE Healthcare Europe GmbH, Глаттбругг, Швейцария).

Рекомбинантный белок ОХ40-Fc человека, растворенный в PBS, смешивали с равным объемом адьюванта Stimune (Prionics, Швейцария, ref: 7925000) и получали эмульсию. Эмульсию переносили в 0,5 мл инсулиновые шприцы (BD Pharmingen, Алышвилль, Швейцария) и животных BALB/c (Harlan, Нидерланды) иммунизировали подкожно в подушечки задних лап, основание хвоста и шею 50 мкг эмульгированного белка. Иммунизацию повторяли через две недели тем же количеством антигена и тем же путем инъекции.

Присутствие циркулирующих антител против ОХ40 человека в сыворотке иммунизированных мышей оценивали с помощью прямого ИФА с использованием планшетов, покрытых рекомбинантным белком ОХ40-his человека. В планшеты добавляли серийные разведения (от 1:10<sup>0</sup> до 1:10<sup>9</sup>) различных сывороток мыши и определяли связанные антитела с использованием конъюгата козьего анти-мышинного антитела (Н + L) цельной молекулы-HRP (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Бухс, Швейцария).

У животных, демонстрирующих лучший сывороточный титр IgG против ОХ40 человека, проводили финальную подкожную бустер-инъекцию 50 мкг антигена без адъюванта за 3 дня до умерщвления.

- Животных умерщвляли и собирали паховые, подмышечные, плечевые, подколенные и седалищные лимфатические узлы для приготовления суспензии отдельных клеток, разрушая архитектуру лимфатических узлов двумя 25G-иглами в растворе ДНКазы (Roche Diagnostics (Schweiz) AG, Роткройц, Швейцария) и коллагеназы (Roche Diagnostics (Schweiz) AG, Роткройц, Швейцария). Суспензии отдельных клеток сливали с линией клеток миеломы X63AG8.653 (линия клеток миеломы мышей BALB/c; номер доступа ATCC: CRL 1580; J Immunol. 1979, 123: 1548-1550)) в соотношении 7:1 с полиэтиленгликолем. 1500 (Roche Diagnostics (Schweiz) AG, Роткройц, Швейцария). Слитые клетки высевали в 96-луночные планшеты с плоским дном, содержащие мышинные макрофаги, в среду DMEM-10 (Invitrogen AG, Базель, Швейцария) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS, PAA Laboratories, Пашинг, Австрия), 2 mM L-глутамина, 100 мкл/мл (Biochrom AG, Германия) пенициллина, 100 нг/мл стрептомицина (Biochrom AG, Германия), 10 mM HEPES (Invitrogen AG, Базель, Швейцария), 50 мкМ β-меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Букс, Швейцария), НАТ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Букс, Швейцария) и фактор роста 1% (Hybridokine, Interchim/Uptima, Монлюсон, Франция).
- Приблизительно 800 сотен лунок от слияний подвергали скринингу с помощью ИФА на наличие мышинового IgG, который распознает ОХ40 человека. Положительные лунки после экспансии подвергали двум циклам субклонирования. Клетки собирали, а тяжелые и легкие цепи клонировали и секвенировали.

## **Пример 2.**

- Клонирование и секвенирование цепей VH и VL антител против ОХ40 из клеток гибридомы**

- Для каждой положительно отобранной гибридомы получали общую РНК, обратную транскрибировали в кДНК, и гены VH и VL соответственно амплифицировали с помощью ПЦР. Эти продукты ПЦР лигировали в спасательный вектор (вектор pDrive; QIAGEN AG, Хомбрехтikon, Швейцария; кат. № 231124), что позволяет выполнить секвенирование ДНК отдельных продуктов ПЦР и определение моно- или поликлональности отобранных гибридом. Этот вектор позволял выполнить отбор по синему или белому цвету на чашках с LB-агаром, содержащих IPTG и X-gal (колонии без вставки были синими из-за

деградации X-gal под действием LacZ  $\alpha$ -пептида). Рекombинантные плазмиды из положительных (белых) бактериальных клонов получали и секвенировали с использованием стандартных праймеров для секвенирования ДНК, специфичных для остова вектора (M13rev, M13fwd, T7 или SP6). Наконец, последовательности ДНК субклонировали в вектор экспрессии для рекombинантной экспрессии целевого антитела в клетках млекопитающих.

### **Выделение РНК**

Суммарную РНК выделяли из  $2-10 \times 10^6$  клеток с использованием набора RNeasy Mini Kit производителя QIAGEN (QIAGEN AG, Хомбрехтikon, Швейцария; кат. № 74106) в соответствии с протоколом производителя; образцы количественно определяли с использованием спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (WITEC AG, Литтау, Швейцария)

### **Одностадийная ОТ-ПЦР**

Препараты суммарной РНК, описанные выше, затем подвергали обратной транскрипции в кДНК, и VH- и VL- фрагменты амплифицировали с помощью ПЦР с использованием двух различных смесей вырожденных праймеров, каждый из которых позволял восстанавливать все различные подсемейства переменных фрагментов тяжелой цепи мышиногo иммуноглобулина и переменные области соединения тяжелой цепи или восстановления всех переменных фрагментов каппа легкой цепи мышиногo иммуноглобулина и переменные области соединения каппа легкой цепи. Праймеры, использованные для обратной транскрипции и амплификации, были синтезированы с помощью Microsynth (Бальгах, Швейцария) и очищены ВЭЖХ (Таблицы 1-4). И обратную транскрипцию, и амплификацию ПЦР проводили одновременно с использованием набора для одностадийной ОТ-ПЦР QIAGEN (QIAGEN AG, Хомбрехтikon, Швейцария; кат. № 210212). Поскольку в данной методике использовали специфические праймеры, каждый образец мРНК затем обрабатывали в двух повторностях, позволяя выполнить индивидуальную обратную транскрипцию и амплификацию VH- или VL-фрагментов. 2 мкг суммарной РНК, растворенной в воде без РНКазы до конечного объема 30 мкл, смешивали с: 10 мкл 5х исходного раствора буфера QIAGEN OneStep RT-PCR, 2 мкл смеси дНТФ в концентрации 10 мМ, 3 мкл смеси праймеров в концентрации 10 мкМ и 2 мкл смеси QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix. Затем конечную смесь помещали в пробирку для ПЦР и подвергали циклической обработке в термоциклере для ПЦР (BioRad iCycler версия 4.006, Bio-rad Laboratories AG, Рейнах, Швейцария) с использованием следующих настроек:

30 мин при 50°C

15 мин при 95°C

40 циклов: 30 секунд при 94°C

30 с при 55°C

5 1 мин при 72°C

10 мин при 72°C

Выдержка при 4°C

### **Клонирование с помощью pDrive**

- Продукты ПЦР подвергали электрофорезу на 2% агарозных гелях. После электрофореза
- 10 ДНК представляющие интерес фрагменты (~ 450 п.н.) вырезали из агарозных гелей и затем экстрагировали с использованием набора 250 Macherey-Nagel NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Онсинген, Швейцария; кат. № 740609.250). Для секвенирования ДНК экстрагированные продукты ПЦР клонировали в спасательный вектор, описанный выше (вектор pDrive, QJAGEN AG, Хомбрехтикон, Швейцария; кат. № 231124), и
- 15 трансформировали в штамм E.coli TOP10 (Invitrogen AG, Базель, Швейцария; кат. № C404006)

### **Экстракция минипрепаратов**

- Положительные колонии культивировали в течение ночи при 37°C (на шейкере 250 об/мин) в 1,5 мл среды Luria Bertani (LB), дополненной 100 мкг/мл ампициллина,
- 20 высеянного на блочные планшеты с квадратными лунками Macherey-Nagel (Macherey-Nagel, Онсинген, Швейцария); кат. № 740488.24). На следующий день минипрепараты ДНК экстрагировали с использованием набора NucleoSpin Multi-8 Plasmid (Macherey-Nagel, Онсинген, Швейцария; кат. № 740620.5).

### **Секвенирование**

- 25 Образцы отправляли для секвенирования ДНК в специализированную компанию по секвенированию ДНК Fasteris (План-ле-Уат, Швейцария). Использовали стандартные праймеры: M13rev, M13fwd, T7, SP6 (Таблица 5)..

### **Анализ последовательности**

- Для анализа последовательностей ДНК использовали Clone Manager 9 Professional Edition
- 30 (Scientific & Educational Software, Северная Каролина, США) и редактор выравнивания последовательностей BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-



friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98).

### **Клонирование вектора экспрессии для экспрессии рекомбинантного химерного антитела**

- 5 Для рекомбинантной экспрессии в клетках млекопитающих выделенные VH- и VL-фрагменты мыши форматировали в виде химерных иммуноглобулинов с использованием методов ПЦР на основе сборки. Эти химерные антитела состоят из тяжелой цепи, в которой переменный домен тяжелой цепи мыши слит с константными доменами тяжелой цепи IgG1 человека (области  $\gamma 1$ , шарнир,  $\gamma 2$  и  $\gamma 3$ ) и легкой цепи, в которой
- 10 переменный домен легкой цепи мыши слит с константным доменом человека каппа (СК). Переменные и константные части иммуноглобулинов человека, собранные с помощью ПЦР, затем клонировали в модифицированный экспрессирующий вектор млекопитающих на основе модифицированного вектора pcDNA3.1(-) производства Invitrogen, упомянутого в примере 1, с той разницей, что каппа-лидерный пептид легкой
- 15 цепи иммуноглобулина человека использовали для стимулирования секреции белка. Для белкового производства иммуноглобулинов-кандидатов равные количества векторной ДНК тяжелой и легкой цепи совместно трансфицировали в адаптированные к суспензии клетки НЕК-293 (номер ATCC: CRL-1573). Супернатант клеточной культуры собирали через пять дней и очищали с использованием аффинной колонки для очистки на основе
- 20 белка А (колонка с сефарозой HiTrap Protein A; GE Healthcare Europe GmbH, Глаттбругг, Швейцария), работающей в системе АКТА FPLC (GE Healthcare Europe GmbH, Глаттбругг, Швейцария).

Таблица 2: Смесь праймеров VH - обратный (SEQ ID NO: 50-68)

- 25 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAK GTR MAG CTT CAG GAG TC  
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTB CAG CTB CAG CAG TC  
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTG CAG CTG AAG SAR TC  
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTC CAR CTG CAA CAR TC  
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTY CAG CTB CAG CAR TC
- 30 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTY CAR CTG CAG CAR TC  
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTC CAC GTG AAG CAR TC

GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG AAS STG GTG GAR TC  
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAV GTG AWG STG GTG GAG TC  
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG CAG STG GTG GAR TC  
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAK GTG CAM CTG GTG GAR TC  
 5 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG AAG CTG ATG GAR TC  
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG CAR CTT GTT GAR TC  
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAR GTR AAG CTT CTC GAR TC  
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAA GTG AAR STT GAG GAR TC  
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTT ACT CTR AAA SAR TC  
 10 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTC CAA CTV CAG CAR CC  
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAT GTG AAC TTG GAA SAR TC  
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG AAG GTC ATC GAR TC

Таблица 3: Смесь праймеров VH - прямой (SEQ ID NO: 69-72)

15  
 CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA AAC GGT GAC CGT GGT  
 CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA GAC TGT GAG AGT GGT  
 CCTCCACCACTCGAGCC CGC AGA GAC AGT GAC CAG AGT  
 CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA GAC GGT GAC TGA GGT

20

Таблица 4: Смесь праймеров VL - обратный (SEQ ID NO: 73-92)

GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATC CAG CTG ACT CAG CC  
 GGCGGTGGC GCT AGC CAA ATT GTT CTC ACC CAG TC  
 25 GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT GTG MTM ACT CAG TC  
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG YTR ACA CAG TC  
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTR ATG ACM CAG TC  
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT MAG ATR AMC CAG TC

GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT CAG ATG AYD CAG TC  
GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATY CAG ATG ACA CAG AC  
GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTT CTC AWC CAG TC  
GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT GWG CTS ACC CAA TC  
5 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT STR ATG ACC CAR TC  
GGCGGTGGC GCT AGC GAY RTT KTG ATG ACC CAR AC  
GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT GTG ATG ACB CAG KC  
GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG ATA ACY CAG GA  
GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG ATG ACC CAG WT  
10 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG ATG ACA CAA CC  
GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT TTG CTG ACT CAG TC  
GGCGGTGGC GCT AGC GAA ACA ACT GTG ACC CAG TC  
GGCGGTGGCGCT AGC GAA AAT GTK CTS ACC CAG TC  
GGCGGTGGCGCT AGC CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TC  
15

Таблица 5: Смесь праймеров VL - прямой (SEQ ID NO: 93-96)

ATG CTG AC GC GGC CGC ACG TTT KAT TTC CAG CTT GG  
ATG CTG AC GC GGC CGC ACG TTT TAT TTC CAA CTT TG  
20 ATG CTG AC GC GGC CGC ACG TTT CAG CTC CAG CTT GG  
ATG CTG AC GC GGC CGC ACC TAG GAC AGT CAG TTT GG

Таблица 6: Праймеры для секвенирования (SEQ ID NO: 97-100)

|    |             |                     |
|----|-------------|---------------------|
| 25 | M13- прямой | GTAAAACGACGGCCAGT   |
|    | M13-обр.    | AACAGCTATGACCATG    |
|    | T7          | TAATACGACTCACTATAGG |

**Пример 3:****Определение биологических характеристик антител против OX40 человека.****5 ИФА для обнаружения OX40-специфического антитела**

Титры антител, специфичность и продуцирование гибридами и рекомбинантными антителами-кандидатами определяли прямым ИФА. В кратком изложении, 96-луночные планшеты для микротитрования (Costar USA, дистрибьютор VWR AG, Ньон, Швейцария) покрывали 100 мкл рекомбинантного OX40-his человека в концентрации 2 нг/мл в PBS (см. в Примере 1 описание получения белка OX40-his). Планшеты инкубировали в течение 10 ночи при 4°C и затем блокировали PBS 2% BSA (бычий сывороточный альбумин, PAA Laboratories, Пашинг, Австрия) при комнатной температуре (RT) в течение одного часа. Блокирующий раствор удаляли и добавляли супернатанты гибридомы или очищенные антитела. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут, затем 15 девять раз промывали PBS 0,01% Tween-20 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Бухс, Швейцария) и добавляли меченное пероксидазой (HRP) козье анти-мышинное антитело для детектирования (H+L) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Бухс, Швейцария) в разведении 1:1000. Для обнаружения рекомбинантных химерных антител (см. Пример 2), которые обладают Fc человека, в качестве детектирующего антитела использовали кроличье 20 антитело против IgG человека, меченное HRP (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Бухс, Швейцария), в разведении 1:1000. Планшеты инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре, промывали девять раз PBS 0,01% Твин-20 и в планшеты добавляли субстрат TMB (Bio-rad Laboratories AG, Райнах, Швейцария) и через шесть минут реакцию прекращали добавлением H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Затем абсорбцию считывали на длине 25 волны 450 нм с помощью устройства для считывания микропланшетов (Biotek, США; дистрибьютор: WITTEC AG, Литтау, Швейцария). Среди положительных клонов были отобраны гибридомы 7H11 и 2H6, затем получали кодирующие последовательности ДНК их вариабельных доменов и готовили химеры мыши- IgG1 человека, как описано в примере 2.

**30 Пример 4:****Гуманизация и оптимизация мышинового антитела 7H11**

В настоящем документе описана гуманизация мышиногo антитела 7H11 против OX40 человека, включающая отбор акцепторных каркасов иммуноглобулинов человека, обратных мутаций и мутаций, которые существенно сохраняют и/или улучшают связывание и свойства CDR-привитых акцепторных каркасов человека при удалении потенциальных посттрансляционных модификаций. Мышиное антитело 7H11 содержит вариабельную последовательность домена тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 2, и вариабельную последовательность домена легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 3.

## Методы

### 10 Рекомбинантное получение антител

Кодирующие последовательности ДНК (кДНК) для разных VH- и VL-доменов синтезировали в формате scFv с помощью компании GENEART AG (Регенсбург, Германия), что позволило с помощью единственной последовательности ДНК охватить оба вариабельных домена. Отдельные кДНК вариабельного домена извлекали из этой конструкции scFv с помощью ПЦР, а затем собирали "апстрим" (против хода транскрипции) от их соответствующих последовательностей кДНК константного домена с использованием методов сборки ПЦР. Наконец, полные кДНК тяжелой и легкой цепей лигировали в независимых векторах, основанных на модифицированном векторе pcDNA3.1 (Invitrogen, Калифорния, США), несущем промотор CMV и сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста. Специфичный для легкой цепи вектор позволял экспрессировать легкие цепи изотипа каппа путем лигирования целевой вариабельной области вариабельного домена легкой цепи перед кДНК константной области легкой цепи каппа с использованием сайтов рестрикции ферментов BamHI и BsiWI; в то время как вектор, специфичный для тяжелой цепи, был сконструирован так, чтобы позволить лигирование кДНК вариабельного домена тяжелой цепи перед последовательностью кДНК, кодирующей константную областьIGHG1 CH1, шарнирную областьIGHG1,IGHG1 CH2 иIGHG1 CH3, с использованием сайтов рестрикции ферментов BamHI и Sail. В векторах экспрессии как тяжелой, так и легкой, цепи секрецию стимулировали лидерным пептидом VJ2C мыши, содержащим сайт BamHI. Сайт рестриктазы BsiWI расположен в константном домене каппа; в то время как сайт рестриктазы Sail находится в доменеIGHG1 CH1.

Антитела транзиторно продуцировали путем совместной трансфекции равных количеств векторов тяжелых и легких цепей в адаптированные к суспензии клетки HEK293-EBNA1 (номер по каталогу ATCC®: CRL-10852) с использованием полиэтиленимина (PEI, Sigma,

Бухс, Швейцария). Обычно 100 мл клеток в суспензии с плотностью 0,8-1,2 млн. клеток на мл трансфицируют смесью ДНК-PEI, содержащей 50 мкг вектора экспрессии, кодирующего тяжелую цепь, и 50 мкг вектора экспрессии, кодирующего легкую цепь. Когда рекомбинантные векторы экспрессии, кодирующие гены антител, введены в клетки-хозяева, антитела получают путем дополнительного культивирования клеток в течение от 4 до 5 дней, чтобы обеспечить секрецию в культуральную среду (EX-CELL 293, бессывороточная среда для HEK293 ; Sigma, Бухс, Швейцария), с добавлением 0,1% плуроновой кислоты, 4 мМ глутамина и 0,25 нг/мл генетицина).

Гуманизированные антитела очищали от бесклеточного супернатанта с использованием среды рекомбинантного белка A Streamline (GE Healthcare Europe GmbH, Глаттбругг, Швейцария) и затем заменяли буфер фосфатным буферным солевым раствором перед анализами.

### **Измерения аффинности на клетках HPB-ALL методом FACS**

Клетки HPB-ALL (DSMZ, Брауншвейг, Германия, кат. №: ACC483) использовали в качестве линии положительных клеток человека OX40 для окрашивания в методе FACS. Клетки HPB-ALL поддерживали в RPMI1640 с добавлением 10% FCS и 100 ед/мл пенициллина и 100 нг/мл стрептомицина.  $4 \times 10^5$  клеток HPB-ALL в буфере FACS (PBS с добавлением 1% BSA и 0,1% азида натрия) инкубировали в течение 45 минут на льду с представляющим интерес анти-OX40-антителом, сохраненным в концентрации 10 нг/мл. Нерелевантный IgG1 человека использовали в качестве контроля изотипа; клетки инкубировали с разведением 1/200 антитела против человеческого Fc-PE (EBioscience, Вена, Австрия) в течение 45 минут на льду. Затем клетки снова промывали и ресуспендировали в 200 мкл буфера FACS. Относительную среднюю флуоресценцию каждого образца измеряли на приборе FACSCalibur (BD Biosciences, Альшвилль, Швейцария).

### **Измерения аффинности методом SPR**

Для измерения констант скорости ассоциации и диссоциации для кинетики связывания антител против OX40 использовали SPR-анализ. Кинетику связывания измеряли на BIAcore 2000 (BIAcore-GE Healthcare Europe GmbH, Глаттбругг, Швейцария) при комнатной температуре и анализировали с помощью программного обеспечения BiaEvaluation (v4.1, GE Healthcare Europe GmbH).

Измерения проводили на сенсорных чипах CM5 (Biacore 2000, GE Healthcare Europe GmbH, кат. №: BR-1000-14), индивидуально сцепленных с белком A (Sigma, Бухс,

Швейцария, кат. №: P7837), с использованием коммерческого набора для сцепления с амином (GE Healthcare Europe GmbH, кат. №: BR-1000-50). Было захвачено 200-600 RU гуманизированных антител. Ряд разбавлений OX40-his вводили со скоростью потока 10 мкл/мин в буфере HBS-EP (GE Healthcare Europe GmbH, кат. №: BR1001-88). После каждого события сцепления поверхность регенерировали 10 мкл глицинового буфера, pH 1,5. Экспериментальные данные обрабатывали с использованием модели Ленгмюра 1:1 с локальным R<sub>max</sub>. Время диссоциации составляло около 7 мин. Измерения проводились в двух или трех повторностях и включали образцы нулевой концентрации в качестве эталонов. Chi<sup>2</sup> и остаточные значения использовали для оценки качества соответствия между экспериментальными данными и отдельными моделями связывания.

### **Оценка термостабильности методом дифференциальной сканирующей калориметрии**

Термическую стабильность гуманизированных антител измеряли с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Профили плавления моноклональных антител зависят от их изотипов (Garber and Demarest (2007), BBRC 355: 751-7), однако температуру плавления в средней точке для фрагмента FAB можно легко определить даже в контексте полноразмерного IgG. Такое измерение плавления в средней точке для FAB-части использовали для мониторинга стабильности гуманизированных моноклональных антител-кандидатов.

Калориметрические измерения проводили на дифференциальном сканирующем микрокалориметре VP-DSC (Malvern Instruments Ltd, Малверн, Великобритания). Объем ячейки составлял 0,128 мл, скорость нагревания составляла 200°C/ч, а избыточное давление поддерживали на уровне 65 psi. Все антитела использовали в концентрации 1 мг/мл в PBS (pH 7,4). Молярную теплоемкость антитела оценивали путем сравнения с дублирующими образцами, содержащими идентичный буфер, из которого антитело было исключено. Парциальные молярные теплоемкости и кривые плавления анализировали с использованием стандартных процедур. Термограммы были скорректированы с учетом фонового значения и нормализованы на концентрацию перед дальнейшим анализом с использованием модели Non-Two State в программном обеспечении Origin v7.0.

## **Результаты**

### **Схема реконструированных переменных областей**

Использовали гомологичное сопоставление для отбора человеческих акцепторных каркасов для CDR мышиного антитела 7H11. Базы данных (например, база данных

вариабельных генов зародышевой линии из локусов иммуноглобулинов человека и мыши, база данных IMGT (международная информационная система ImMunoGeneTics8; Lefranc MP et al., Nucleic Acids Res, 27 (1): 209-12 (1999)); Ruiz M et al., Nucleic Acids Res, 28 (1): 219-21 (2000); Lefranc MP, Nucleic Acids Res, 29 (1): 207-9 (2001); Lefranc MP, Nucleic  
5 Acids Res, 31 (1): 307-10 (2003); Lefranc MP et al., Dev Comp Immunol, 29 (3): 185-203 (2005); Kaas Q et al., Briefings in Functional Genomics & Proteomics, 6 (4): 253 -64 (2007)) или VBASE2 (Retter I. et al, 2005, Nucleic Acids Res., 33, выпуск базы данных D671-D674) или база данных Kabat (Johnson G. et al, 2000, Nucleic Acids Res., 28, p214-218)) или публикации (например, Kabat et al., Sequence of the Immunological Interest, 1992)) могут  
10 быть использованы для идентификации подсемейств иммуноглобуллинов человека, к которым принадлежат V-области тяжелой и легкой цепи мыши, и определения наиболее подходящего каркаса зародышевой линии человека для использования в качестве молекулы-акцептора для CDR мыши. Выбор вариабельных последовательностей тяжелой и легкой цепей (VH и VL) в пределах этих подсемейств для использования в качестве  
15 акцептора может быть основан на гомологии последовательностей и/или совпадении структуры областей CDR1 и CDR2, чтобы помочь сохранить соответствующее относительное представление шести CDR после прививки.

Например, использование базы данных IMGT указывает на хорошую гомологию между каркасной областью вариабельного домена тяжелой цепи 7H11 и членами подсемейства 1  
20 вариабельного домена тяжелой цепи человека. Наиболее высокие гомологии и идентичности как CDR, так и каркасных последовательностей наблюдались для последовательностей зародышевой линии: IGHV1-3\*01 (SEQ ID NO: 4), IGHV1-2\*02 (SEQ ID NO: 5) и IGHV1-46\*01 (SEQ ID NO: 6), причем все они имеют идентичность последовательностей выше 68% для всей последовательности до CDR3. IGHV1-8\*01 (SEQ  
25 ID NO: 7) имела более низкую идентичность последовательности (66,3%).

Используя тот же подход, последовательность вариабельного домена легкой цепи 7H11 показала хорошую гомологию с членами подсемейства каппа 3 и 4 вариабельного домена легкой цепи человека. Наиболее высокие гомологии и идентичности как CDR, так и каркасных последовательностей наблюдались для последовательностей зародышевой  
30 линии: IGKV4-1\*01 (SEQ ID NO: 8) (гомология 81,2%), IGKV3D-7\*01 (SEQ ID NO: 9) (гомология 67,3%), IGKV3D-15\*01 (SEQ ID NO: 10) (гомология 67,3%), и IGKV3-20\*01 (SEQ ID NO: 11) (гомология 65,3%).

Из поисков IMGT, упомянутых выше, были выявлены наилучшие совпадения последовательностей JH и JK сегментов с акцепторной структурой человека.



В качестве отправной точки процесса гуманизации четыре переменных домена тяжелой и легкой цепей, указанные выше, были выбраны в качестве акцепторов для CDR мыши 7H11. Был получен первый набор из 16 гуманизированных антител человека изотипа гамма-один. Эти первые гуманизированные кандидаты были оценены на предмет транзитной экспрессии в клетках HEK293E и связывания с клеткой NB-ALL с помощью проточной цитометрии (Таблица 7).

| VL                 |       | VL1        | VL2         | VL3          | VL4         |
|--------------------|-------|------------|-------------|--------------|-------------|
| VH                 |       | IGKV4-1*01 | IGKV3D-7*01 | IGKV3D-15*01 | IGKV3-20*01 |
| VH1                | Выход | 41         | 45          | 3            | 2           |
| IGHV1-3*01         | MFI   | 119,7      | 60          | 79,2         | 69,7        |
| VH2                | Выход | 51         | 7           | 2            | 26          |
| IGHV1-2*02         | MFI   | 120        | 67,8        | 82,5         | 185,5       |
| VH3                | Выход | 31         | 17          | 2            | 35          |
| IGHV1-46*01        | MFI   | 121,3      | 19,7        | 44,9         | 34,3        |
| VH4                | Выход | 34         | 8           | 1,5          | 20          |
| IGHV1-8*01         | MFI   | 34,1       | 17,8        | 30,3         | 20,2        |
| Изотип-контроль    |       | MFI        | 16,9        |              |             |
| Химерный 7H11 IgG1 |       | MFI        | 132,2       |              |             |

Таблица 7: Характеристики первых гуманизированных антител-кандидатов 7H11 (IgG1).

Окрашивание FACS антителами против OX40 на клеточной линии NB-ALL. Значения MFI соответствуют средней точке флуоресценции антител, измеренной с помощью проточной цитометрии с использованием 10 нг/мл антитела-кандидата. Значения выхода транзитного экспресса указаны в мг на л культуры. Приведены каркасные последовательности оригинальной зародышевой линии человека.

Лучшими гуманизированными кандидатами были антитела VH1/VL1, VH2/VL1 и VH3/VL1. Эти антитела демонстрировали уровни окрашивания FACS, близкие к уровню, наблюдаемому для родительского антитела мыши с выходом экспрессии выше, чем у остальных кандидатов.

Эти три кандидата были дополнительно проанализированы с помощью SPR на предмет ранжирования по аффинности (Таблица 8). Неожиданно было обнаружено, что гуманизированное антитело против VH2/VL1 IgG1 имеет более высокую аффинность (то есть более низкую KD) по сравнению с химерным антителом 7H11. Кроме того, выход экспрессии, кажущаяся аффинность с клетками HBP-ALL и стабильность Fab были сопоставимы с двумя другими вариантами.

| X           | Химерный 7H11 IgG1   | Химерный VH1-VL1 IgG1 | Химерный VH2-VL1 IgG1 | Химерный VH3-VL1 IgG1 |
|-------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| KD (нмоль)  | 50                   | 35                    | 21                    | 80                    |
| ka (1/мс)   | $1,16 \times 10^4$   | $1,67 \times 10^4$    | $5,85 \times 10^4$    | $6,25 \times 10^4$    |
| kd (1/с)    | $6,6 \times 10^{-4}$ | $5,8 \times 10^{-4}$  | $1,3 \times 10^{-3}$  | $5,5 \times 10^{-3}$  |
| Tm Fab (°C) | 68                   | 76,9                  | 77                    | 77,4                  |

Таблица 8: Характеристики лучших первично привитых гуманизированных антител. Показаны константы аффинности, измеренные с помощью среднеточечной температуры денатурации SPR и Fab, измеренной с помощью ДСК.

На основании своего хорошего связывания, экспрессии и стабильности Fab, антитело VH2/VL1 было отобрано для дальнейшего улучшения аффинности посредством процесса, известного как обратный мутагенез, при котором аминокислоты из последовательности мышинового антитела вводят в последовательность гуманизированного антитела. Предполагалось, что аффинность может быть дополнительно улучшено с помощью этого процесса, несмотря на тот факт, что антитело VH2/VL1 обладает лучшей аффинностью, чем его родительское мышинное антитело.

### Обратные мутации привитых человеческих каркасных участков

Процесс обратной мутации требует идентификации и отбора критических остатков каркасного участка из мышинового антитела, которые необходимо сохранить, чтобы сохранить или улучшить аффинность, одновременно минимизируя потенциальную иммуногенность гуманизированного антитела. Чтобы идентифицировать остатки, которые могут влиять на наибольшую конформацию CDR и/или упаковку между переменными доменами, рассчитывали 3D-модель для пары переменных доменов VH2/VL1 с использованием сервера моделирования гомологии структуры SWISS-MODEL (Arnold K

et al., (2006) Bioinformatics 22 (2): 195-201; <http://swissmodel.expasy.org>), установленного в автоматическом режиме. Модельный анализ позволил выбрать подмножество положений исходя из их предполагаемого влияния на области CDR и/или упаковку переменных доменов легкой цепи-тяжелой цепи. Это подмножество положений было выбрано из 26 возможных обратных мутаций, обнаруженных в переменной тяжелой цепи, и состояло из положений: 37, 58, 60, 61, 85, 89 и 91 (нумерация по Кабату) (Таблица 9).

| Номер VH по Кабату | Антитело    | Аминокислота | Пространственное расположение на границе раздела VH/VL |
|--------------------|-------------|--------------|--------------------------------------------------------|
| 37                 | 7H11<br>VH2 | M<br>V       | Средняя граница                                        |
| 58                 | 7H11<br>VH2 | K<br>N       | Средняя граница                                        |
| 60                 | 7H11<br>VH2 | N<br>A       | Нижняя граница                                         |
| 61                 | 7H11<br>VH2 | E<br>O       | Нижняя граница                                         |
| 85                 | 7H11<br>VH2 | E<br>D       | Нижняя граница                                         |
| 89                 | 7H11<br>VH2 | I<br>V       | Средняя/нижняя граница                                 |
| 91                 | 7H11<br>VH2 | F<br>Y       | Средняя граница                                        |

Таблица 9: Подробные характеристики положений, выбранных для обратной мутации между гуманизированным кандидатом VH2/VL1 и мышинным антителом 7H11.

Дополнительные гуманизированные кандидаты на основе этих одиночных обратных мутаций получали в контексте последовательностей антител VH2/VL1 с использованием стандартного ПЦР-мутагенеза и способов, описанных выше. Затем гуманизированные антитела-кандидаты анализировали на предмет их аффинности связывания с помощью SPR и термостабильности Fab с помощью ДСК. Выход продукции, аффинность связывания и средние точки термического разворачивания Fab показаны в Таблице 10. Из семи протестированных антител обратная мутация N58K значительно улучшала аффинность, сохраняя при этом хорошую термическую стабильность и экспрессию Fab. Поэтому гуманизированное антитело VH2-N58K/VL1 было отобрано для дальнейшей оптимизации.

| Антитело        | Экспрессия (мг/л) | KD (нмоль) | Tm Fab (°C) |
|-----------------|-------------------|------------|-------------|
| 7H11 (химерное) | Не измерено       | 50         | 68,0        |
| VH2 V37M/VL1    | 12                | 2,87       | 70,3        |
| VH2 N58K/VL1    | 24                | 0,77       | 72,0        |
| VH2 A60N/VL1    | 14                | ND         | 72,5        |
| VH2 Q61E/VL1    | 23                | ND         | 71,3        |
| VH2 D85E/VL1    | 26                | ND         | 71,5        |
| VH2 V89I/VL1    | 21                | ND         | 70,8        |
| VH2 Y91F/VL1    | 9                 | ND         | 72,0        |

Таблица 10: Характеристики гуманизированных обратно мутированных антител VH2/VL1.

#### Удаление потенциального сайта изомеризации.

Анализ последовательности 7H11 VH2 N58K выявил наличие предполагаемого сайта изомеризации аспартата (DG) в 7H11 CDRH2 в положениях 54 и 55 (нумерация по Кабату). Чтобы удалить этот сайт изомеризации, был проведен сайт-направленный мутагенез для замены аспартатного остатка 54 в 7H11 отрицательно заряженными или нейтральными полярными аминокислотами, такими как глутамат, серин и треонин, и глицина 55 в 7H11 - аланином. Используя методики сборки ПЦР, мутации D54E, D54S, D54T и G55A были введены в кДНК в 7H11 VH перед лигированием в векторе на основе модифицированного вектора pcDNA3.1 (Invitrogen, Калифорния, США), несущего промотор CMV и сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста..

Используя этот подход, было получено несколько векторов кодирующих гуманизированные 7H11 VH D54E (гуманизированное 7H11-VH2 N58K-D54E), 7H11 VH D54S (гуманизированное 7H11-VH2 N58K-D54S), 7H11 VH D54T (гуманизированное 7H11-VH2 N58K-D54T) и 7H VH G55A (гуманизированное 7H11-VH2 N58K-G55A). Родительская последовательность и варианты гуманизированного 7H11 VH ко-трансфицировали легкой цепью 7H11 в клетках HEK293-EBNA1. Клеточный супернатант затем собирали через 4 дня после трансфекции для дальнейшей очистки с использованием белка А. Протестированные мутации не изменяли экспрессию 7H11 в клетке млекопитающего по сравнению с родительским антителом (Таблица 10).

Чтобы определить, могли ли эти мутации изменить термостабильность антител, выполняли дифференциальную сканирующую флуориметрию. Антитела в PBS сначала

смешивали с 10х концентрированным раствором SYPRO orange (Thermo Fisher Scientific, Экублан, Швейцария) в концентрации 250 нг/мл в конечном объеме 20 мкл. Для регистрации разворачивания белка образцы затем подвергали постепенному увеличению температуры в HRM R2-Rlex-Gene Q2 (QJAGEN, Хильден, Германия), термическое разворачивание отслеживали по наличию оранжевого красителя SYPRO orange, флуоресценция которого затухает в полярных средах, но флуоресцентный сигнал усиливается при воздействии гидрофобного окружения, такого как гидрофобное ядро белков при разворачивании. Зарегистрированные флуоресцентные сигналы были сходными для родительской и для мутированных форм 7H11, показывая, что мутации, введенные в гуманизированном VH 7H11, не изменяли термостабильность антител (Таблица 11).

В заключение применяли анализ поверхностного плазмонного резонанса для контроля аффинности вариантов антитела, описанных ранее. Результаты в Таблице 11 показывают, что мутации, введенные в 7H11, не изменяют аффинность антител.

| Антитело                             | Экспрессия (мг/л) | KD (нмоль) | Tm Fab (°C) |
|--------------------------------------|-------------------|------------|-------------|
| Гуманизированное 7H11- VH2 N58K      | 39                | 16         | 74,2        |
| Гуманизированное 7H11- VH2 N58K-D54E | 44                | 9          | 73,5        |
| Гуманизированное 7H11- VH2 N58K-D54S | 37                | 49         | 73,5        |
| Гуманизированное 7H11- VH2 N58K-D54T | 44                | 32         | 73,5        |
| Гуманизированное 7H11- VH2 N58K-G55A | 44                | ND         | 74          |

Таблица 11: Сводка гуманизированных вариантов 7H11 после удаления сайта изомеризации.

## Пример 5.

### Гуманизация и оптимизация мышинных антител 2H6.

#### Гуманизация мышинных моноклональных антител 2H6

В настоящем документе описана гуманизация мышинного антитела 2H6 против OX40 человека, включающая отбор человеческих акцепторных каркасных участков и мутаций, которые в значительной степени сохраняют свойства связывания человеческих CDR-

привитых акцепторных каркасных участков при удалении потенциальных посттрансляционных модификаций.

Человеческие акцепторные каркасные участки, выбранные для трансплантации CDR 2H6, были отобраны для придания максимальной экспрессии и/или стабильности гуманизированной версии 2H6. Выбор переменных последовательностей тяжелой и легкой цепей человека (VH и VL) для использования в качестве акцептора может быть основан на зародышевых линиях с хорошими биофизическими свойствами (как документировано описано в Ewert S et al., (2003) J.Mol.Biol, 325, 531 -553) и/или спариванием, обнаруживаемом в репертуаре природных антител (как описано в Glanville J et al., (1999) Proc Natl Acad Sci USA, 106(48):20216-21; DeKosky BJ et al., (2015) Nat Med, 21(1):86-91). Последовательностями каркасного участка, известными в данной области для хорошего спаривания и/или стабильности, являются IGHV3-23\*01 (SED ID NO: 33) и IGKV1-16\*01 (SED ID NO: 34), которые использовались в качестве акцепторных каркасных участков для гуманизации 2H6.

Было получено первое гуманизированное антитело человека изотипа гамма-один. Это антитело включало в себя переменный домен тяжелой цепи гибрида человека и мыши и переменный домен легкой цепи гибрида человека и мыши. Гибридный переменный домен тяжелой цепи был основан на переменном домене тяжелой цепи человека IGHV3-23\*01, в котором зародышевая линия CDRH1 и H2, соответственно, заменены на CDRH1 и CDRH2 2H6. Последовательность с наилучшим соответствием сегмента JH человеческому акцепторному каркасному участку определяли из базы данных IMGT с использованием поиска гомологии. Получающаяся в результате переменная последовательность гибридной тяжелой цепи человека и мыши, имеющая области каркасного участка IGHV3-23 \* 01 человека, CDR мыши 2H6 и JH с наилучшим соответствием акцептору человека, упоминается в настоящем документе как переменный домен тяжелой цепи VH1 с SEQ ID NO: 31.

Аналогично, переменный домен гибридной легкой цепи человека и мыши, используемый для этого первого кандидата на гуманизированное антитело, имел области каркасного участка IGKV1-16\*01 человека, CDR мыши 2H6 и наилучшее соответствие JK с акцептором человека, и упоминается в настоящем документе как переменный домен легкой цепи VL1 с SEQ ID NO: 32. Первое гуманизированное антитело, включающее в себя VH1 и VL1, в настоящем документе сокращенно обозначают антитело 2H6VH1/VL1.

#### **Получение гуманизированного scFv-Fc2H6**

Кодирующие последовательности ДНК (кДНК) для VH1 и VL1 были синтезированы в формате scFv компанией GENEART AG (Регенсбург, Германия), что позволяет одной последовательности ДНК охватывать оба переменных домена (SEQ. ID NO: 35). scFv кДНК лигировали в векторе на основании модифицированного вектора pcDNA3.1 (Invitrogen, Калифорния, США), описанного ранее. Специфический вектор scFv-Fc был сконструирован для лигирования представляющей интерес кДНК scFv перед последовательностью кДНК, кодирующей шарнирную область IGHC1 человека, константные домены CH2 IGHC1 и CH3 IGHC1 с использованием сайтов рестрикции ферментов BamHI и KpnI. Секрецию стимулировал лидерный пептид VJ2C мыши, содержащий сайт BamHI. В С-концевую часть scFv, которая содержит сайт KpnI, был введен искусственный глицин-треониновый линкер.

ScFv-Fc транзиторно продуцировали путем трансфекции вектора scFv-Fc в адаптированные к суспензии клетки HEK293-EBNA1 (кат. номер ATCC®: CRL-10852), как описано ранее. Затем scFv-Fc очищали от бесклеточного супернатанта с использованием среды рекомбинантного белка A Streamline (GE Healthcare Europe GmbH, Глаттбругг, Швейцария) и перед анализом затем заменяли буфер фосфатным буферным солевым раствором. Связывание с OX40 человека и яванского макака измеряли с помощью поверхностного плазмонного резонанса, как описано ниже. Гуманизированный 2H6 scFv, включающий VH1 и VL1, сокращенно обозначен здесь 2H6 scFv1.

#### **Кинетические константы аффинности связывания гуманизированного 2H6 scFv1-Fc для внеклеточного домена рецептора OX40 человека и яванского макака данным методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR)**

Кинетические константы аффинности связывания (KD) измеряли с использованием рекомбинантного меченого гистидином внеклеточного домена рецептора OX40 человека и внеклеточного домена рекомбинантного Fc слитого рецептора OX40 яванского макака, захваченного на чипе CM5 и 2H6 scFv1-Fc и мышинных 2H6 scFv-Fc в качестве аналитов. Измерения проводили на BIAcore T200 (GE Healthcare-BIAcore, Упсала, Швеция) при комнатной температуре и анализировали с помощью программного обеспечения BIAcore T200 Evaluation. Сенсорный чип исследовательского класса CM5 (GE Healthcare Europe GmbH, Глаттбругг, Швейцария; BR100530) активировали путем введения 35 мкл 1:1 раствора N-гидроксисульфосукцинимид (NHS)/1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодиимида гидрохлорида (EDC) (объем/объем; скорость потока 5 мкл/мин; на проточных каналах 1, 2, 3 и 4).

ОХ40R-Fc яванского макака разбавляли до конечной концентрации 25 нМ в ацетатном буфере pH 4,0 (GE, BR-1003-49) и впоследствии иммобилизована на ранее активированном сенсорном чипе CM5 с помощью введения 10 мкл на проточном канале 2 (10) мкл/мин), что соответствует примерно 600 единицам ответа (RU). ОХ40R-His человека разводили до конечной концентрации 25 нМ в ацетатном буфере с pH 4,0 (GE, BR-1003-49) и затем иммобилизовали на ранее активированном сенсорном чипе CM5 путем введения 45 мкл на пути потока 4 (10 мкл/мин), что соответствует приблизительно 400 единицам ответа (RU). Чип датчика ОХ40R-CM5 затем дезактивировали путем введения 35 мкл раствора этаноламина (5 мкл/мин). Наконец, выполняли два ввода 10 мкг раствора глицина (GE, ref. BR-1003-54; 10 mM; pH 1,5) для высвобождения несшитых (человека и яванского макака) молекул ОХ40R.

2H6 scFv-Fc вводили в различных концентрациях (от 0,78 нМ до 0,2 мкМ) на 4 проточных каналах (каналы 1 и 3 использовали в качестве эталонов) при скорости потока 30 мкл/мин. После каждого события связывания поверхность регенерировали глициновым буфером pH 1,5, вводимым в течение 30 секунд (10 мкл/мин).

Измерения (сенсограмма: fc2-fc1 и fc4-fc3) наилучшим образом аппроксимируются моделью двухвалентного аналита 2:1 с массопереносом. Значения времени диссоциации составляли по меньшей мере 300-600 секунд. Значение Chi2 представляет собой сумму квадратов различий между экспериментальными данными и эталонными данными в каждой точке; в то время как графики остатков показывают разницу между экспериментальными и эталонными данными для каждой точки в подгонке. И Chi2, и остаточные значения были использованы для оценки качества подгонки между экспериментальными данными и отдельными моделями связывания.

Результаты, показанные в Таблице 12, указывают на то, что гуманизированный 2H6 scFv1 имеет сходную аффинность с ОХ40 человека и яванского макака, по сравнению с родительской мышью 2H6 scFv.

|           | мышинный<br>химерный 2H6<br>scFv-Fc | гуманизированный 2H6 scFv1-Fc | мышинный<br>химерный 2H6<br>scFv-Fc | гуманизированный 2H6 scFv1-Fc |
|-----------|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| Аналит    | ОХ40 человека                       |                               | ОХ40 Cynomolgus                     |                               |
| KD (нМ)   | 62                                  | 27                            | 39                                  | 18                            |
| ka (1/мс) | $6,8 \times 10^5$                   | $1,55 \times 10^5$            | $5,79 \times 10^5$                  | $2,06 \times 10^5$            |
| kd (1/с)  | $2,2 \times 10^{-2}$                | $7,41 \times 10^{-4}$         | $3,19 \times 10^{-4}$               | $5,86 \times 10^{-4}$         |



Таблица 12: Характеристики гуманизированного 2H6-scFv по данным SPR

### 2H6 Met, удаленный из JH

Анализ последовательности 2H6 scFv выявил наличие предполагаемого сайта окисления (метионин 108) в области 2H6 VH JH. Чтобы удалить этот потенциальный сайт окисления, был проведен сайт-направленный мутагенез для замены остатка метионина 108 2H6 VH аминокислотой лейцин. Используя метод ПЦР-сборки, мутацию VH M108L (нумерация Кабат) вводили в кДНК 2H6 scFv перед лигированием в вектор на основе модифицированного вектора pCDNA3.1, как описано ранее. Используя этот подход, был создан вектор, кодирующий гуманизированный 2H6scFv M108L (сокращенно 2H6 scFv2).

Родительские и мутированные формы 2H6 scFv-Fc трансфицировали в клетки НЕК293-EBNA1, как описано ранее. Клеточный супернатант затем собирали через 4 дня после трансфекции для дальнейшей очистки с использованием белка А. Протестированные мутации не изменяли экспрессию scFv-Fc 2H6 в клетке млекопитающего по сравнению с родительским антителом (Таблица 13). Чтобы определить, способна ли мутация M108L изменить термостабильность scFv, проводили дифференциальную сканирующую флуориметрию, как описано ранее. Зарегистрированные флуоресцентные сигналы были одинаковыми как для родительской, так и для мутированной формы 2H6, показывая, что мутация M108L не изменяет термостабильность scFv (Таблица 12). Наконец, применяли анализ поверхностного плазмонного резонанса для контроля связывающих свойств варианта 2H6 scFv2, как описано ранее. Результаты на фигуре 1 показывают, что мутации, введенные в 2H6 scFv, не изменили его связывание.

| Антитело     | Экспрессия<br>(мг/л) | Tm scFv (°C) |
|--------------|----------------------|--------------|
| 2H6 scFv1-Fc | 40                   | 63           |
| 2H6 scFv2-Fc | 40                   | 62,7         |

Таблица 13: Характеристики влияния мутации M108L на гуманизированный 2H6-scFv.

### Пример 7.

#### Разработка и получение четырехвалентных антител против человека OX40

##### Первые четырехвалентные молекулы

Используемый четырехвалентный формат представляет собой целый IgG, с которым scFv были связаны через (Gly4Thr) линкер на С-конце тяжелой цепи. Для получения четырехвалентного антитела, содержащего 7H11 IgG1, слитый с 2H6 scFv, кодирующие последовательности ДНК (кДНК) для гуманизированного 7H11-VH2 N58K (SEQ. ID NO:

21), VL1 (SEQ ID NO: 16) и 2H6 scFv1, амплифицировали с помощью ПЦР перед расщеплением и лигированием в векторах на основе модифицированного вектора pcDNA3.1 (Invitrogen, Калифорния, США), описанного ранее. Специфичный вектор легкой цепи был сконструирован так, чтобы позволить лигирование представляющей  
5 интерес кДНК VL перед последовательностью кДНК, кодирующей константный домен каппа человека, с использованием сайтов рестриктазы BamHI и BsiWI. Специфичный вектор тяжелой цепи был сконструирован так, чтобы позволить лигирование представляющей интерес кДНК VH перед кДНК, кодирующей шарнирную область IGHG1, модифицированный домен CH2 IGHG1 с двойной мутацией L234A/L235A (LALA,  
10 нумерация Eu, Hezareh M et al., (2001) J Virol, 75: 12161-8), который уменьшает взаимодействия Fc-FcγR, и модифицированный константный домен CH3 IGHG1, содержащий (Gly4Thr) линкер в своей С-концевой части, с использованием сайтов рестрикции ферментов BamHI и SalI. Затем представляющую интерес кДНК scFv лигировали после константного домена CH3 IGHG1 и линкера (Gly4Thr) специфического  
15 вектора тяжелой цепи, используя сайты рестрикционных ферментов KpnI и NotI. В векторах экспрессии как тяжелой, так и легкой цепи секрецию стимулировал лидерный пептид VJ2C мыши, содержащий сайт BamHI. Сайт рестриктазы BsiWI расположен в константном домене каппа; тогда как сайт рестриктазы SalI находится в домене IGHG1 CH1. Глицин-треониновый линкер содержит сайт KpnI, тогда как сайт NotI присутствует  
20 перед сигналом полиаденилирования бычьего гормона роста, находящегося в модифицированном векторе pcDNA3.1, кодирующем тяжелую цепь.

Это четырехвалентное антитело (сокращенно Tetra-1) транзитивно получали путем ко-трансфекции равных количеств векторов легкой цепи 7H11VL1 и тяжелой цепи Tetra-1 в адаптированные к суспензии клетки HEK293-EBNA1, как описано ранее. Это  
25 четырехвалентное антитело очищали от бесклеточного супернатанта с использованием среды рекомбинантного белка A Streamline (GE Healthcare Europe GmbH, Глаттбругг, Швейцария) и затем заменяли буфер фосфатным буферным солевым раствором до анализов.

#### **Оптимизированные четырехвалентные антитела 7H11X2H6:**

30 В описанной выше четырехвалентной молекуле scFv слит с С-концом IgG. Поэтому последний С-концевой остаток антитела представляет собой лизин, естественным образом присутствующий в области JK. Чтобы избежать отрезания С-конец-лизина четырехвалентной молекулы в кровообращении, что может оказать влияние на биологию антитела, использовали сайт-направленный мутагенез для замены С-концевого лизина

2H6 scFv на лейцинрвый остаток. Используя метод сборки ПЦР, вводили мутацию VL K107L (нумерация по Каббату) в кДНК 2H6 scFv перед лигированием в векторе, кодирующем четырехвалентное антитело, описанное выше. Родительские и мутированные формы четырехвалентных антител трансфицировали в клетках HEK293-EBNA1, как описано ранее. Затем через 4 дня после трансфекции собирали клеточный супернатант для дальнейшей очистки с использованием белка А. Тестируемая мутация не изменяла экспрессию четырехвалентного антитела в клетке млекопитающего по сравнению с родительским антителом (Таблица 14). Чтобы определить, способна ли мутация K107L изменить термостабильность С-концевого scFv, выполняли дифференциальную сканирующую флуориметрию, как описано ранее. Зарегистрированные флуоресцентные сигналы были сходными как для родительской, так и для мутированной формы 2H6 scFv, показывая, что мутация K107L не изменила термостабильность scFv (Таблица 13).

| Антитело      | Экспрессия<br>(мг/л) | Tm С-концевого 2H6scFv (°C) |
|---------------|----------------------|-----------------------------|
| Tetra-1       | 33                   | 60,5                        |
| Tetra-1-K107L | 32                   | 59,7                        |

Таблица 14: Характеристики влияния мутации K107L на гуманизированное антитело Tetra-1

Чтобы завершить оптимизацию четырехвалентного антитела, мутация D54E 7H11, мутация VH 2H6 M108L и мутация V10 KL7L были введены в вектор, кодирующий тяжелую цепь четырехвалентной молекулы (сокращенно Tetra-6) с помощью сайт-направленного мутагенеза, как описано ранее. Tetra-6 получали путем совместной трансфекции векторов легкой цепи и тяжелой цепи 7H11VL1, как показано ранее, и очищали от бесклеточного супернатанта с использованием среды рекомбинантного белка A Streamline.

## Пример 8: Определение *in vitro* характеристик четырехвалентных антител против ОХ40 человека

### Пример 8.1 Tetra-1 и Tetra-6 проявляют пролиферативный эффект в анализе с реакцией смешанных лимфоцитов (СКЛ-реакцией)

МКПК выделяли из цитратной цельной крови здоровых доноров с использованием градиента плотности фикола. Моноциты выделяли из МКПК с использованием набора для выделения моноцитов (Miltenyi) и культивировали с GM-CSF в концентрации 50 нг/мл (R&D) и rhIL-4 в концентрации 20 нг/мл (R&D) в течение 7 дней, чтобы

дифференцировать их в дендритные клетки (DC). Фенотип дендритных клеток подтверждали проточной цитометрией с использованием CD1c APC (eBioScience). На 7-й день CD4 T-клетки (от аллогенного донора) выделяли из МКПК с использованием набора EasySep (StemCell Technologies). Т-клетки CD4 (40 000 клеток/лунку) и DC (8 000 клеток/лунку) совместно культивировали с антителами в концентрации 80 нМ в течение 6 дней в полной среде в 96-луночном круглодонном планшете в трех повторностях. На 13 день добавляли <sup>3</sup>H-тимидин (Perkin Elmer, 0,5 мкКи на лунку). Через двадцать часов после стимуляции клетки собирали и определяли включенную радиоактивность на бета-счетчике Wallac. Нормализованный индекс стимуляции (СИ) определяли с использованием следующей формулы:

$$(\text{Sample} - \text{Только Resp})/(\text{Alio} - \text{Resp only})$$

"Образец" обозначает количество импульсов для условий, в которых были культивированы совместно DC + CD4 Т-клетки + тестируемое антитело. "Только Resp" обозначает количество импульсов для условий, в которых были добавлены только клетки-респондеры (CD4 Т-клетки). "Алио" соответствует состоянию, при были инкубированы совместно которым DC (клетки-стимуляторы) и аллогенные CD4 Т-клетки (клетки-респондеры). Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения Graphpad Prism 7; статистический анализ проводили с помощью критерия Манна-Уитни (непараметрический критерий) или критерия Уилкоксона для связанных пар. Р < 0,05 считалось статистически значимым.

ОХ40L-Fc является сильной агонистической молекулой, которая способна эффективно связывать и перекрестно сшивать ОХ40 на поверхности Т-клеток (Muller FEBS J. 2008 May; 275 (9): 2296-304). В соответствии с этой особенностью ОХ40L-Fc был способен усиливать реакцию со смешанными лимфоцитами. В этом анализе Tetra-1 и Tetra-6 усиливали аллогенный ответ до уровня, близкого к ОХ40L-Fc (различия между этими тремя молекулами не являются статистически значимыми; фигура 1). Критерий Уилкоксона для связанных пар, со сравнением SI Tetra-1 и Tetra-6, протестированных в одном и том же эксперименте, показал, что эти две четырехвалентные молекулы одинаково улучшали пролиферацию (данные не показаны). Поэтому эти результаты подчеркивают, что нацеливание на ОХ40 с помощью Tetra-1 и Tetra-6 обеспечивает соответствующий иммуностимулирующий потенциал.

#### **Пример 8.2 Tetra-1 и Tetra-6 вызывают сильный иммуностимулирующий эффект в анализе стимуляции стафилококковым энтеротоксином В**

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) собирали из фильтратов крови, полученных из Центра переливания крови Ла-Шо-де-Фон, с помощью выделения в градиенте плотности фиколла. МКПК (105) распределяли в 96-луночном круглодонном планшете в трех повторностях. В лунки добавляли стафилококковый энтеротоксин В (SEB) в конечной концентрации 50 или 100 нг/мл (субоптимальные концентрации) и антитела в конечной концентрации 80 нМ. Планшеты инкубировали в течение 7 дней при 37°C в инкубаторе с CO<sub>2</sub>. Выработку IL-2 в культуральных супернатантах измеряли с помощью Luminesx с использованием набора ProcartaPlex (eBiosciences) на 5-й день. На 7-й день клетки собирали и метили с помощью антител, против CD4 человека и против CD25 человека? конъюгированных с ECD и Pacific Blue (eBioSciences). Окрашенные клетки ресуспендировали в 100 мкл буфера FACS и анализировали проточной цитометрией на CytoFLEX S (Beckman). Данные проточной цитометрии анализировали с использованием CytExpert (Beckman). Стратегия гейтинга заключалась в гейтинге на живых клетках (с учетом графиков FSC и SSC), CD4-положительных клетках, а затем на CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>.  
Общее количество клеток на лунку в этой рассматриваемой субпопуляции рассчитывали по следующей формуле:

(Объем, используемый для ресуспендирования клеток \* Количество событий в гейте)/Полученный объем образца

Каждую точку данных нормализовали к условию, при котором МКПК инкубировали только с SEB (без антител). Данные анализировали с использованием программного обеспечения Graphpad Prism 7, а статистический анализ проводили с помощью критерия Манна-Уитни (непараметрический критерий). P < 0,05 считалось статистически значимым.

В этом анализе Tetra-1 было способно значительно увеличить количество клеток CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (91% протестированных доноров достиг 1,2-кратной индукции по сравнению с только SEB; порог определен произвольно), тогда как OX40L-Fc и Tetra-6 сделали это. в меньшей степени (67% и 88% соответственно). Определяет активированные Т-клетки экспрессия CD25. Увеличение CD4 Т-клеток, экспрессирующих CD25, может быть обусловлено увеличением в активации Т-клеток и/или увеличением пролиферации активированных Т-клеток. Точно так же добавление Tetra-1, Tetra-6 и OX40-Fc также значительно увеличивало выработку IL-2 по сравнению с только SEB. Выработка IL-2 также указывает на активацию Т-клеток и напрямую связана с пролиферацией Т-клеток. Статистической разницы между этими тремя молекулами с такими данными и на этой стадии эксперимента (день 5) не было.

В целом, нацеленность на ОХ40 при этой стимуляции, опосредованной суперантигеном МКПК, поразительно улучшает ответы Т-клеток, что визуализируется усиленной выработкой цитокинов (IL-2) или повышенной активацией Т-клеток (CD25).

**Пример 8.3. Tetra-1 демонстрирует сильный иммуностимулирующий эффект в анализе стимуляции ФГА (фитогемагглютинин)**

МКПК готовили так же, как и для анализа SEB. МКПК (105) распределяли в 96-луночном круглодонном планшете в трех повторностях. Добавляли ФГА в конечной концентрации 2 или 1 нг/мл и антитела в конечной концентрации 80 нМ. Планшеты инкубировали в течение 7 дней при 37°C в инкубаторе с CO<sub>2</sub>. Через шесть дней после начала анализа клетки обрабатывали 0,5 мКи на лунку <sup>3</sup>H-тимидина (Perkin Elmer). Через двадцать часов после стимуляции клетки собирали и определяли количественную радиоактивность на бета-счетчике Wallac. Индекс стимуляции определяли по следующей формуле:

Образец/только ФГА

"Образец" обозначает количество импульсов для случая добавления МКПК + ФГА + тестируемого антитела. "Только ФГА" обозначает количество импульсов для случая, когда МКПК культивировали только с ФГА (без антител). Каждая точка данных была нормализована к условиям, когда МКПК инкубировали только с ФГА (без антител). Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения Graphpad Prism 7. Статистический анализ проводили с помощью критерия Манна-Уитни (непараметрический критерий).  $P < 0,05$  считалось статистически значимым.

В этом анализе Tetra-1 и Tetra-6 увеличивали пролиферацию клеток в ответ на субоптимальную концентрацию ФГА. Существенных различий между Tetra-1, Tetra-6 и ОХ40L-FC обнаружено не было.

**Пример 9: Получение молекулы Tetra-8, стабилизированной дисульфидной связью**

Чтобы дополнительно усилить молекулу Tetra-6, был сконструирован домен 2H6 scFv, несущий VH-мутацию M108L и VL-мутацию K107L, с целью повышения стабильности путем введения дисульфидной связи между доменами VH и VL (Reiter Y et al., Nat Biotechnol., 14 (10): 1239-45, Oct 1996). Используя метод ПЦР-сборки, мутации VH G44C и VL Q100C вводили в кДНК мутированного 2H6 scFv перед лигированием в векторе, кодирующем тяжелую цепь новой четырехвалентной молекулы (сокращенно Tetra-8). Затем получали Tetra-8 путем ко-трансфекции векторов 7H11 VL1 легкой цепи (SEQ ID NO: 16) и векторов тяжелой цепи Tetra-8 (SEQ ID NO: 45), как описано ранее. После очистки с помощью белка А молекулу анализировали с помощью ДНС-ПААГ в

невосстанавливающих условиях (фигура 5) и SEC-ВЭЖХ (фигура 6). Оба аналитических метода показали, что инженерия четырехвалентной молекулы с помощью дисульфидной связи вызывает образование ковалентных мультимеров. Чтобы отделить мультимеры от мономера, был выполнен дополнительный этап катионообменной очистки. В кратком изложении, колонку HiTrap SP HP (GE Healthcare Europe GmbH, Глаттбругг, Швейцария) сначала уравнивали с использованием 50 mM буфера ацетата натрия pH 5,5. Затем загружали образец белка и разделяли молекулы, используя градиент 50 mM ацетат натрия + 1 M NaCl, pH 5,5, от 5% до 20% и 100% (фигура 7). Фракции, содержащие мономерную форму Tetra-8, затем объединяли в пул и выполняли замену буфера на PBS (Gibco, ThermoFischer Scientific, Массачусетс, США). Наконец, оценивали термостабильность мономерного Tetra-8 с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) и сравнивали с Tetra-1 (фигура 8). Было выявлено явное повышение термостабильности (3°C) мутированного домена 2H6 scFv в Tetra-8, что указывает на то, что инженерия дисульфидной связи эффективно повышает температуру плавления 2H6 scFv.

#### **Определение биофизических характеристик антител Tetra-8**

Аффинность связывающего домена 2H6 scFv в Tetra-8 определяли с помощью Biacore. Чтобы обеспечить точное измерение, молекулу Tetra-8 расщепляли протеазой FabALACTICA (Genovis AB, Лунд, Швеция) для удаления Fab 7H11. В кратком изложении, молекулу Tetra-8 сначала подвергали замене буфера в 150 mM фосфата натрия, pH 7,0, перед добавлением 1 единицы FabALACTICA на мкг антитела. Смесь антитело/протеаза инкубировали в течение ночи при 37°C. Затем этот материал дополнительно очищали с использованием смолы Affinity Matrix CaptureSelect™ FcXL (ThermoFischer Scientific, Массачусетс, США), чтобы удалить Fab 7H11 и протеазу из смеси при захвате фрагментов scFv Fc-2H6. Смолу промывали PBS, а затем элюировали специфический фрагмент Fc-2H6 с 0,1 M глицина, pH 3,0, и, наконец, смешивали в PBS, pH 7,4. Используя IgG против Fc человека, иммобилизованный на чипе CM5, измеряли кинетику путем захвата 600 RU фрагмента Fc-2H6 и инъекции серии разведений OX40-CRD-Avi-his (SEQ. ID NO: 159) при скорости потока 30 мкл/мин в буфере HBS-EP (GE Healthcare Europe GmbH, кат. номер: BR1001-88). После каждого события связывания поверхность регенерировали 10 мкл буфера MgCl<sub>2</sub> (3 M). Экспериментальные данные обрабатывали с использованием модели Ленгмюра 1:1 с локальным R<sub>max</sub>. Время диссоциации составляло около 7 мин. Измеренную аффинность 2H6 scFv (сконструированного VH/M108L-VL/K107L-дисульфид), слитого с C-концом молекулы Tetra-8, составляет 60 nM, что представляет собой лишь двукратную потерю по

сравнению с гуманизированным 2H6 scFv1-Fc (Таблица 6) и указывает на то, что связывающие плечи 2H6 являются функциональными.

### **Антитела против OX40**

Для оценки агонистической активности Tetra-8 было получено несколько известных агонистов анти-OX40. Последовательности тяжелой и легкой цепей 11D4 IgG2 (US 2012/0225086 A1), 9B12 IgG1 (OX40mab24, US 2016/0137740 A1), 106-222 IgG1 (US 2016/0068604 A1), 1A7 IgG1 (WO 2015/153513 A1) и pab1949 (US 2016/0347847 A1) были взяты из соответствующих заявок на патенты и были синтезированы методами генной инженерии в виде кДНК компанией Geneart AG (ThermoFischer Scientific, Массачусетс, США). Последовательности тяжелой и легкой цепей затем лигировали в независимых векторах, основанных на модифицированном векторе pcDNA3.1, описанном ранее. Векторы, кодирующие соответствующие тяжелые и легкие цепи каждого антитела, котрансфицировали в клетки HEK293-EBNA1, как описано ранее (Таблица 15). Затем через 4 дня после трансфекции собирали клеточный супернатант для дальнейшей очистки с использованием белка А. Также были синтезированы последовательности доменных антител (dAb) Tetra-hzG3V9, Tetra-hz1DI0vl, Hexa-hzG3V9 и Hexa-hz1DI0vl (WO 2017/123673 A2) компанией Geneart AG перед клонированием в рамке мутированной последовательности Fc IgG1 (LALA) в модифицированный вектор pcDNA3.1. Векторы, кодирующие соответствующие молекулы, затем трансфицировали отдельно в клетках HEK293-EBNA1, и супернатанты собирали с последующей очисткой белком А. Наконец, 7H11-VH2 N58K-D54E клонировали в рамке последовательностей IgG1 человека или IgG1 LALA и объединяли с получением 7H11 IgG1 или IgG1 LALA (Таблица х). ScHv1 2H6 клонировали в рамке домена LALA IgG1-Fc с получением 2H6 scFv-Fc LALA. 2H6 VH1 клонировали в рамке последовательностей IgG1 человека или IgG1LALA. Эти последовательности котрансфицировали 2H6 LC с получением 2H6 IgG1 и IgG1 LALA (Таблица 15).

### **Тяжелые и легкие цепи, используемые для получения антител**

| IgG/dAb-Fc   | Тяжелая цепь                 | Легкая цепь             |
|--------------|------------------------------|-------------------------|
| 11D4 IgG2    | 11D4 IgG2 HC (SEQ. ID: 101)  | 11D4 LC (SEQ ID:102)    |
| 9B12 IgG1    | 9B12 IgG1 HC (SEQ ID:103)    | 9B12 LC (SEQ ID:104)    |
| 106-222 IgG1 | 106-222 IgG1 HC (SEQ ID:105) | 106-222 LC (SEQ ID:106) |
| 1A7          | 1A7 IgG1 HC (SEQ ID: 107)    | 1A7 LC (SEQ ID:108)     |
| pab1949      | pab1949 IgG1 HC (SEQ ID:109) | pab 1949 LC (SEQID:110) |



|                |                                  |                                       |
|----------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| Tetra-hzIDIOvl | Tetra-hzIDIOvl HC (SEQ ID:111) - |                                       |
| Tetra-hzG3V9   | Tetra-hzG3V9 HC (SEQ ID:112) -   |                                       |
| Hexa-hzIDIOvl  | Hexa-hzIDIOvl HC (SEQ ID:113) -  |                                       |
| Hexa-hzG3V9    | Hexa-hzG3V9 HC (SEQ ID:114) -    |                                       |
| 2H6 IgG1       | 2H6 IgG1 HC (SEQ ID:115)         | 2H6LC (SEQ ID:116)                    |
| 2H6 IgG1 LALA  | 2H6 IgG1 LALA HC (SEQ ID:117)    | 2H6LC (SEQ ID:116)                    |
| 2H6 scFv-Fc    | 2H6 scFv-Fc LALA HC (SEQ ID:118) |                                       |
| LALA           |                                  |                                       |
| 7H11 IgG1      | 7H11_v8 IgG1 HC (SEQ ID: 119)    | Гуманизированная 7H11-VL1 (SEQ ID:16) |
| 7H11 IgG1 LALA | 7H11 IgG1 LALA HC (SEQ ID: 120)  | Гуманизированная 7H11-VL1 (SEQ ID:16) |

Таблица 15: Сочетание тяжелых и легких цепей для получения антител.

#### **Химерные молекулы OX40 для картирования эпитопов антител**

OX40 является членом суперсемейства TNFR, характеризующимся наличием четырех доменов, определяемых как богатый цистеином домен (CRD) в его внеклеточной части (фиг.9). Чтобы определить домены, на которые нацелены антагонистические антитела, необходимо спроектировать и экспрессировать химеры OX40 для использования в качестве инструментов для картирования эпитопов. Последовательности внеклеточных доменов OX40 человека, крысы и яванского макака были взяты из базы данных Uniprot (SEQ ID NO: 1,121,122, соответственно), синтезированы компанией Geneart перед клонированием в виде Fc-слитых белков (SEQ ID NO: 123, 124, 125 соответственно). Эти конструкции были экспрессированы в клетках HEK293-EBNA1 и очищены с использованием белка А. Затем OX40-Fc человека и крысы были протестированы с помощью ИФА и Вiascore для определения перекрестной реактивности антител. Для ИФА 96-луночные планшеты для микротитрования (Costar USA, дистрибьютор VWR AG, Ньон, Швейцария) покрывали 100 мкл рекомбинантного OX40-Fc человека или крысы с концентрацией 2 нг/мл в PBS. Планшеты инкубировали в течение ночи при 4°C и затем блокировали PBS 2% BSA (бычий сывороточный альбумин, PAA Laboratories, Пашинг, Австрия) при комнатной температуре (RT) в течение одного часа. Блокирующий раствор удаляли и очищенные антитела добавляли в концентрации 10 нг/мл в PBS 2% BSA. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа, затем 5 раз

промывали PBS 0,01% Твин-20 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Бухс, Швейцария). Для обнаружения рекомбинантных антител, которые обладают Fab человека, в качестве детектирующего антитела использовали козий IgG, конъюгированный с пероксидазой, специфичный к Fab-фрагменту человека (Jackson ImmunoResearch, 109-035-006), разведенный 1:2000 в PBS 2% BSA. Планшеты инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре, промывали 5 раз PBS 0,01% Твин-20 и к планшетах добавляли субстрат TMB (Bio-rad Laboratories AG, Райнах, Швейцария) и через 5 минут реакцию прекращали добавлением H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Затем абсорбцию считывали на 450 нм с помощью устройства для считывания микропланшетов (Biotek, США; дистрибьютор: WITTEC AG, Литтау, Швейцария). Эксперименты Bioscore были специально проведены с Hexa-hzG3V9 и Hexa-hzIDIOv1, которые являются слитыми белками dAb-Fc. В кратком изложении, 5 мкл Tetra-hzIDIOv1 (5 мкл, г/мл) иммобилизовали на ранее активированном сенсорном чипе CM5 путем введения в проточный канал 2 со скоростью потока 10 мкл/мин, что соответствует приблизительно 206 RU. Аналогично 15 мкл Tetra-hzG3V9 (5 мкг/мл) вводили в канал 4 при скорости потока 10 мкл/мин, что соответствует приблизительно 251 RU. Связывание молекул OX40-Fc человека и яванского макака определяли путем последовательного введения этих белков по 4 каналам (каналы 1 и 3 используются в качестве эталонов) при концентрации 200 нМ и скорости потока 30 мкл/мин в течение 240 секунд. Регенерацию между двумя введениями осуществляли с использованием 3 М MgCl<sub>2</sub> в концентрации 30 мкл/мин в течение 60 секунд. Используя эти два подхода, оценивали связывание OX40 человека/крысы (Таблица 16).

---

Перекрестная реактивность анти-OX40 антител

---

|              | Связывание OX40-Fc человека | Связывание OX40-Fc крысы |
|--------------|-----------------------------|--------------------------|
| 2H6          | Да                          | Нет                      |
| 7H11         | Да                          | Нет                      |
| 9B12         | Да                          | Нет                      |
| 11D4         | Да                          | Нет                      |
| 106-222      | Да                          | Нет                      |
| 1A7          | Да                          | Да                       |
| pab1949      | Да                          | Нет                      |
| Tetra-hzG3V9 | Да                          | Нет                      |

Таблица 16: Характеристики перекрестной реактивности анти-OX40-антител

Эти эксперименты ясно продемонстрировали, что у большинства из этих антител (за исключением 1A7) отсутствовала перекрестная реактивность с OX40 крысы, что указывает на то, что этот белок можно использовать для создания химер с последовательностью OX40 человека для целей картирования эпитопов.

### Эпитопное картирование

Выравнивание последовательностей внеклеточных доменов OX40 человека (SEQ ID NO: 1) человека, яванского макака (SEQ ID NO: 122) и крысы (SEQ ID NO: 121) проводили с помощью T-coffee (Notredame C. et al. J Mol Biol, 302 (205-217) 2000) (фигура 10). CRD идентифицировали на основе паттернов дисульфидных связей в последовательности OX40. Теоретические последовательности химер OX40 человека/крысы устанавливали путем смешивания CRD следующим образом: CRD1, CRD2, CRD3 человека и CRD4 крысы (HHHR) (SEQ ID NO: 126); CRD1, CRD2 человека, CRD3 крысы, CRD4 человека (HHRH) (SEQ ID NO: 127); CRD1, CRD2 человека, CRD3, CRD4 крысы (HHRR) (SEQ ID NO: 128); CRD1, CRD2 человека, CRD3, CRD4 крысы (HRRR) (SEQ ID NO: 129); CRD1, CRD2 крысы, CRD3, CRD4 человека (RRHH) (SEQ ID NO: 130); CRD1 крысы, CRD2 человека, CRD3, CRD4 крысы (RHRR) (SEQ ID NO: 131). Разработанные последовательности затем были синтезированы компанией Geneart AG, и полученную кДНК клонировали в рамке области IgG1-Fc человека в модифицированный вектор pсDNA3.1. Затем белки получали и очищали, как описано ранее. Затем эти молекулы использовали в ранее описанных экспериментах ИФА и Вiascore для определения доменов OX40, на которые нацелены эти антитела. Результаты приведены в Таблице 17.

Доменная специфичность анти-OX40-антител

|              | CRD1 | CRD2 | CRD3 | CRD4 |
|--------------|------|------|------|------|
| 2H6          |      |      | X    |      |
| 7H11         | X    |      |      |      |
| 9B12         |      | X    |      |      |
| 11D4         | X    |      |      |      |
| 106-222      |      | X    |      |      |
| pab1949      |      |      | X    |      |
| Tetra-hzG3V9 |      |      |      | X    |

Таблица 17: Характеристики специфичности домена анти-OX40 антитела

Используя химеры OX40, мы обнаружили, что 7H11 и 11D4 в основном связываются с CRX1 OX40. 9B12 и 106-222 в основном связываются с CRD2 OX40. 2H6 и pAB1949 в основном связываются с CRD3. DAb hzG3V9 и IDIOv1 в основном связываются с CRD4. Поскольку 1A7 перекрестно реагирует с OX40 крысы, эпитоп этого антитела не характеризовали.

### Пример 10: Определение биологических характеристик Tetra-8 in vitro

#### 10.1 Tetra-8 специфически связывается с OX40

Связывающую активность Tetra-8 на растворимом OX40 оценивали прямым ИФА, следуя методу, подробно описанному выше в примере 3. В кратком изложении, Tetra-8 тестировали при различных концентрациях (в диапазоне от 10 до 0,00017 мкг/мл) в 96-луночных. Планшетах для микротитрования, предварительно покрытых в течение ночи рекомбинантным белком OX40 His человека, разведенным до 2 нг/мл в PBS (см. в примере 1 получение белка OX40-his). Чтобы протестировать две связывающие единицы Tetra-8 по отдельности, в один и тот же анализ были включены молекулы 7H11\_v8 IgG1 и Tetra-22. Tetra-22, как описано позже, представляет собой контрольную молекулу, которая состоит из нерелевантной IgG1 LALA, где 2H6 ScFv слиты с C-концом. Результаты на фиг.11 показывают, что молекулы Tetra-8, 7H11\_v8 IgG1 и Tetra-22 распознают рекомбинантный белок OX40 человека с эквивалентными профилями связывания.

Связывание Tetra-8 с мембраносвязанным OX40 оценивали с помощью проточной цитометрии с использованием клеточной линии GloResponse<sup>TM</sup> NFkB luc2/OX40-Jurkat (Promega). В кратком изложении, клетки собирали, подсчитывали и высевали в количестве 100000 клеток/лунку в 96-луночный круглодонный планшет. Планшет центрифугировали при 350g в течение 3 минут и клетки ресуспендировали в 50 мкл буфера FACS (PBS + 10% версен + 2% FBS), содержащего различные концентрации (в диапазоне от 100 до 0,00056 г/мл) антител Tetra-8, 7H11\_v8 IgG1, либо 2H6 IgG1. Окрашенные клетки инкубировали в течение 20 минут при 4°C, дважды промывали буфером FACS при 350g в течение 3 минут и ресуспендировали в 100 л вторичного антитела против IgG человека с PE (Thermofischer), разведенного в буфере FACS. Затем клетки дважды промывали и ресуспендировали в 200 л буфера FACS, и получали образцы на приборе FACSCalibur (BD Biosciences, Альшвилль, Швейцария). Клетки подвергали гейтингу исходя из размера на

FSC в сравнении SSC и анализировали на среднюю геометрическую интенсивность флуоресценции PE с использованием программного обеспечения FlowJo. Как показано на фигуре 12, антитела Tetra-8, 7H11\_v8 IgG1 и 2H6 IgG1 распознают мембраносвязанный OX40, экспрессированный на трансфицированных клетках Jurkat. Эти 3 молекулы были также непосредственно помечены красителем AF647 в соответствии с инструкциями производителя (ThermoFischer) и впоследствии оценены на связывание с другими клетками, экспрессирующими различные уровни OX40. Значения Kd для всех протестированных молекул и клеточных линий суммированы в Таблице 18.

|           | HPB-ALL | JURKAT<br>OX40 | Активирован<br>ные Т-<br>клетки | Активирован<br>ные Т-<br>клетки | Активирован<br>ные Т-клетки |
|-----------|---------|----------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
|           |         |                | Донор 1                         | Донор 2                         | Донор 3                     |
| 2H6 IgG1  | 15,97   | 17,65          | 3,12                            | 8,45                            | 8,89                        |
| 7H11 IgG1 | 3,57    | 4,47           | 3,58                            | 5,40                            | 4,80                        |
| OX40L-FC  | 5,30    | 5,46           | 9,27                            | 19,32                           | 13,54                       |
| Tetra-8   | 2,47    | 3,62           | 2,03                            | 2,28                            | 3,40                        |

Таблица 18

Чтобы дополнительно продемонстрировать селективное связывание Tetra-8 с OX40, выполняли прямой ИФА для изучения связывания с другими членами TNFR. Эксперимент проводили по тому же протоколу, что и описанный ранее. В этом анализе серийное разведение Tetra-8 (в диапазоне от 10 до 100 мкг/мл) тестировали против рекомбинантных молекул BAFF, CD40, DR3, DR6, GITR и TWEAK (R&D). Все эти молекулы наносили в концентрации 2 нг/мл в PBS в течение ночи при 4°C. Результаты на фигуре 13 показывают, что Tetra-8 избирательно связывается с молекулой OX40 и не распознает других членов семейства TNFR, включая тех, которые демонстрируют до 40% идентичности в своей аминокислотной последовательности.

## 10.2 Tetra-8 связывается с OX40 яванского макака посредством его части 2H6

Чтобы оценить перекрестную реактивность Tetra-8 с OX40 яванского макака, выполняли прямой ИФА, следуя протоколу, описанному ранее. В этом анализе Tetra-8 и ритуксимаб-2H6 (который является контрольной молекулой, эквивалентной Tetra-22, в которой нерелевантная часть IgG1 LALA происходит из ритуксимаба) связываются с рекомбинантным белком OX40 яванского макака, но не с 7H11\_v8 IgG1 (фигура 14). Эти

данные показывают, что Tetra-8 распознает OX40 яванского макака посредством его части 2H6. Результаты связывания с OX40 человека и яванского макака и значения EC50 суммированы в Таблице 19.

|           | OX40 человека | OX40 яванского<br>макака | OX40 человека | OX40 яванского<br>макака |
|-----------|---------------|--------------------------|---------------|--------------------------|
| Единица   | мкг/мл        |                          | нмоль         |                          |
| Tetra-8   | 0,041         | 0,237                    | 0,207         | 1,185                    |
| 7H11 IgG1 | 0,014         | NA                       | 0,093         | NA                       |
| Tetra-24  | 0,015         | 0,076                    | 0,097         | 0,509                    |

Таблица 19

- 5 Перекрестная реактивность Tetra-8 с OX40 яванского макака была дополнительно продемонстрирована с помощью проточной цитометрии. В этой процедуре МКПК яванского макака из коммерческого источника (Silabe) разводили в cRPMI и высевали в колбу T-25 в концентрации  $10 \times 10^6$  клеток/мл в присутствии 5 мкг/мл ФГА при 37°C в инкубаторе с CO<sub>2</sub>. Тот же эксперимент был проведен с использованием МКПК человека,
- 10 выделенных, как описано ранее. Через два дня активированные клетки собирали и метили антителом с APC против CD4 человека (ThermoFischer). Далее проводили окрашивание антителом Tetra-8, 7H11\_v8 IgG1 или 2H6 IgG1 с последующим обнаружением с помощью IgG с PE против иммуноглобулина человека (ThermoFischer). Окрашенные клетки промывали и ресуспендировали в 100 мкл буфера FACS и анализировали проточной
- 15 цитометрией с использованием CytExpert (Beckman). Стратегия гейтинга заключалась в гейтинге живых клеток (на основании графиков FSC и SSC) и CD4-положительных клеток. Результаты на фигуре 15 показывают, что Tetra-8, 2H6 IgG1, но не 7H11\_v8 IgG1, связываются с мембраносвязанным OX40 яванского макака, экспрессируемым на CD4-положительных клетках. Эти данные подтверждают, что перекрестно-реактивная
- 20 активность Tetra-8 с рецептором яванского макака опосредована его частью 2H6.

### 10.3 Tetra-8 индуцирует значительную активацию линии клеток-репортеров люциферазы OX40-NFkB FcγR-независимым образом

- Чтобы оценить способность Tetra-8 активировать OX40-сигнализацию, выполняли анализ на люциферазу с использованием клеточной линии GloResponse™ NFkB luc2/OX40-
- 25 Jurkat, экспрессирующей OX40, в соответствии с инструкциями производителя (Promega). В кратком изложении, клетки Jurkat NFkB собирали, подсчитывали и ресуспендировали в

концентрации  $2 \times 10^6$  клеток/мл в полной среде RPMI (RPMI 1640 + 10% FBS + 1% NEAA + 1% NaPyг + гигромицин 500 мкг/мл + G418 800 мкг/мл). Пятьдесят мкл клеток распределяли в 96-луночном люминесцентном планшете и инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> с 25 мкл Tetra-8, либо 7H11 IgG1 LALA, либо 2H6 IgG1 LALA, серийно разбавленных в среде для анализа (RPMI 1640+0% FBS). Параллельно эти молекулы тестировали в условиях, когда применялась стимуляция TCR, путем иммобилизации 5 мкг/мл анти-CD3 антитела (клон ОКТ3) на 96-луночных люминесцентных планшетах. Спустя пять часов в лунки добавляли 75 мкл раствора Bio-Glo, и сигналы для всех планшетов считывали в считывающем устройстве для люминесцентных микропланшетов (Synergy HT2-Spectrophotometer, Biotek). Анализ на люциферазу проводили без условий какого-либо перекрестного сшивания, то есть в отсутствие вторичного антитела или клеток, экспрессирующих FcγR. Как показано на фигуре 16, Tetra-8 индуцирует дозозависимую активацию клеточной линии Jurkat NXkB OX40 с репортерным геном люциферазы в двух разных экспериментальных условиях (со стимуляцией TCR или без нее) и способствует более высокой передаче сигнала OX40, чем его отдельные связывающие единицы (7H11 IgG1 LALA и 2H6 IgG1 LALA). Важно отметить, что Tetra-8 был дополнительно протестирован в анализе ADCC и не показал, как и ожидалось, значительной активности (данные не представлены). Эти данные подчеркивают важные различия между Tetra-8 и другими моноклональными антителами-агонистами OX40, которые, как описано, проявляют свою активность посредством Fc R-опосредованного сшивания.

#### 10.4 Tetra-8 повышает аллогенную активность Т-клеток в анализе СКЛ-реакции

Анализ СКЛ-реакции обычно используют для оценки способности иммуномодуляторов, нацеленных на костимулирующие молекулы, такие как OX40, усиливать аллогенные ответы Т-клеток (Keli L. Hippen et al. Blood 2008). Чтобы оценить способность Tetra-8 усиливать ответы Т-клеток, был проведен аллогенный анализ СКЛ-реакции, следуя протоколу, описанному в примере 3. В этом анализе Tetra-8 тестировали в 6 различных концентрациях (в диапазоне от 160 до 0,001 нМ) и OX40L тестировали при концентрациях 80 и 10 нМ. Результаты, изображенные на фигуре 17, показывают, что Tetra-8 сильно и значимо (в 2-3 раза) усиливает аллореактивную пролиферацию Т-клеток в анализе СКЛ-реакции. Этот эффект является дозозависимым и даже более сильным, чем для OX40L, как показано в Таблице 20.

| Молекула | % доноров<br>респондеров | Среднее (кратное<br>увеличение пролиферации<br>по сравнению с | Число<br>протестир<br>ованных | р-<br>значени | Значимость |
|----------|--------------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------------------|---------------|------------|
|----------|--------------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------------------|---------------|------------|

|                                |       |            |         |        |       |
|--------------------------------|-------|------------|---------|--------|-------|
|                                | (> 2) | контролем) | доноров | e      |       |
| OX40 L-Fc                      | 14%   | 1,54       | 37      | <,0001 | * * * |
| Tetra-8                        | 71%   | 2,99       | 38      | <,0001 | ***   |
| Tetra-8 по сравнению с OX40-Fc | /     | /          | /       | <,0001 | ***   |

Таблица 20

### 10.5 Tetra-8 вызывает сильный иммуностимулирующий эффект в анализе стимуляции стафилококковым энтеротоксином В

- 5 Анализ стимуляции SEB также широко используется для оценки способности иммуномодуляторов, нацеленных на OX40 и другие члены семейства TNFR, усиливать ответы Т-клеток. Этот анализ, протокол которого описан в примере 8.2, использовали для оценки функциональной активности Tetra-8. Tetra-8 тестировали в различных концентрациях в диапазоне от 80 до 0,01 нМ. Как показано на фигуре 18, инкубация
- 10 МКПК человека с Tetra-8 приводит к значительному увеличению пролиферативной активности Т-клеток в ответ на антиген SEB. Tetra-8 также тестировали по сравнению с другими моноклональными агонистами анти-OX40, используемыми при концентрациях 80 и 10 нМ. Результаты на фигуре 19 демонстрируют, что 7H11\_v8 IgG1, 2H6 IgG1 и другие моноклональные агонистические антитела против OX40, протестированные в том
- 15 же анализе SEB, усиливают SEB-индуцированную пролиферацию Т-клеток по сравнению с контрольным изотипом. Однако Tetra-8 демонстрирует значительно более высокий уровень агонизма по сравнению со всеми протестированными моноспецифическими двухвалентными анти-OX40 молекулами. В целом, результаты анализов SEB и СКЛ-реакции показывают, что Tetra-8 усиливает ответы Т-клеток и демонстрирует более
- 20 высокую активность, чем другие агонистические молекулы анти-OX40. В отличие от моноклональных агонистических анти-OX40-антител, которые, как описано, работают по существу посредством FcγR-опосредованного сшивания, активность Tetra-8 является FcγR-независимой, как показано ранее. Кроме того, тестирование 9B12 в анализах SEB приводит к повышению уровней IL-2, но снижает количество активированных CD4<sup>+</sup> Т-
- 25 клеток (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>). Напротив, Tetra-8 стимулирует экспансию этой Т-клеточной



субпопуляции, одновременно вызывая высокие уровни IL-2 (данные не показаны). Эта сильная FcγR-независимая агонистическая активность Tetra-8, вероятно, связана с более высокой валентностью и/или его архитектурой. Эта гипотеза была дополнительно исследована в примерах 12 и 14.

## 5 Пример 11: Создание альтернативных архитектур Tetra-8

### Молекулярный дизайн и экспрессия

Чтобы контролировать влияние FcγR-связывания на биологическую активность Tetra-8, был клонирован и получен модифицированный вариант Tetra-8, содержащий Fc IgG1 wt (Tetra-13), как описано ранее. Затем, чтобы определить влияние архитектуры Tetra-8 на его агонистические свойства, было создано несколько конструкций, имеющих различную комбинацию связывающего домена, ориентацию и валентность (фигура 20).

Молекула Tetra-14 представляет собой четырехвалентное антитело, где последовательности 7H11-VH2 N58K-D54E и 7H11 VL1 были отформатированы как scFv, сконструированные с дисульфидной связью (ген, синтезированный Geneart AG), и затем клонированы в модифицированном векторе pcDNA3.1 в 3' последовательности тяжелой цепи 2H6 IgG1 LALA, как описано ранее для Tetra-8. 2H6 VL клонировали в рамке константной области каппа человека (2H6-LC) в модифицированном векторе pcDNA3.1. Tetra-14 получали путем ко-трансфекции векторов, кодирующих Tetra-14 HC и 2H6 LC в клетках HEK293-EBNA1 (Таблица 21). Затем собирали клеточный супернатант и очищали молекулы, используя колонку для аффинной очистки белком А, как описано ранее. Затем была проведена дополнительная стадия катионообменной очистки для удаления ковалентных мультимерных загрязнений, как описано ранее для Tetra-8. Таким образом, эта молекула состоит из тех же связывающих доменов, которые используются в Tetra-8, но в обратной ориентации.

Также были сконструированы четырехвалентные молекулы, имеющие те же 4 связывающих компонента, и синтезированы компанией Geneart AG. Антитело Tetra-15 состоит из связывающих доменов 2H6, тогда как Tetra-16 состоит из связывающих доменов 7H11. В этом формате последовательности scFv 2H6 и 7H11, сконструированные с дисульфидной связью, были слиты с последовательностями тяжелой цепи 2H6 и 7H11 IgH1 LALA соответственно. Tetra-15 и Tetra-16 получали путем трансфекции векторов, кодирующих тяжелую цепь Tetra-15 и Tetra-16, с векторами, кодирующими 2H6 LC и 7H11 VL1 соответственно. Белки очищали с использованием хроматографии с белком А и дополнительно «шлифовали» катионным обменом, как описано ранее. Таким образом,

Tetra-15 и Tetra-16 имеют формат, который подобен молекуле Tetra-8, при этом имея 4 связанных плеча связывания. Кроме того, антитела Tetra-17 и Tetra-18 были сконструированы так, чтобы иметь 4 идентичных связывающих плеча. В формате Tetra-17 и 18, Fab слиты в С-конце тяжелой цепи IgG1. Последовательность тяжелой цепи Tetra-17 состоит из тяжелой цепи 7H11-VH2 N58K-D54E IgG1, несущей мутацию LALA, где последовательность 7H11-VH2 N58K-D54E-IgG1 CHI слита с доменом IgG1 CH3 через короткий линкер Gly4Thr (G4T). Аналогичным образом, тяжелая цепь Tetra-18 состоит из последовательности 2H6 IgG1 LALA, связанной с последовательностью, кодирующей Fab 2H6. Используя ту же методологию, которая описана ранее, векторы, кодирующие тяжелые цепи Tetra-17 и Tetra-18, совместно трансфицировали векторами, кодирующими 7H11VL1 и 2H6 LC, соответственно, в клетках HEK293-EBNA1 получая антитела Tetra-17 и Tetra-18 (Таблица 21).

Были сконструированы и другие четырехвалентные антитела, объединяющие три идентичных связывающих домена с одним неродственным связывающим доменом, и синтезированы компанией Geneart AG. Антитело Tetra-19 представляет собой комбинацию трех Fab 7H11 с одним 2H6 scFv. В этом формате требуется гетеродимеризация тяжелой цепи. Поэтому была использована технология BEAT (Skegro D., et al., J Biol Chem., 292 (23): 9745-59, июнь 2017) для получения и очистки Fc-гетеродимера. Две разные тяжелые цепи были построены и клонированы в двух разных векторах. Первая тяжелая цепь (Tetra-19 HC1) содержит от N- до С-конца доменные последовательности 7H11-VH2 N58K-D54E, IgG1 CHI, шарнир IgG1, IgG1 CH2, содержащий мутацию LALA, IgG3 CH3 BEAT (A), линкер G4T и 2H6 scFv, сконструированные с дисульфидной связью. Вторая цепь (Tetra-19 HC2) состоит, от N- до С-конца, из доменных последовательностей 7H11-VH2 N58K-D54E, IgG1 CHI, шарнира IgG1, IgG1 CH2, содержащего мутацию LALA, IgG1 CH3 BEAT (B) линкера G4T, 7H11-VH2 N58K-D54E и IgG1 CHI. Векторы, кодирующие эти две разные тяжелые цепи, трансфицировали в эквимольном соотношении с вектором, кодирующим легкую цепь 7H11 VL1 в клетках HEK293-EBNA1, используя тот же протокол, который был описан ранее (Таблица 21). Технология BEAT индуцирует предпочтительную гетеродимеризацию цепей, содержащих BEAT (A) и BEAT (B). Однако все равно могут быть получены и некоторые гомодимерные примеси. Тем не менее, технология BEAT была разработана для асимметричного связывания с белком А тяжелой цепи, что позволяет эффективно очищать гетеродимер от примесей гомодимеров, присутствующих в супернатанте экспрессирующих клеток. В кратком изложении, осветленный супернатант

трансфицированных клеток загружали в колонку HiTrap™ MabSelect SuRe™ с белком А, предварительно уравновешенную в 0,2 М цитрат/фосфатном буфере, pH 6, и работали на хроматографической системе очистки АКТА™ (обе производства GE Healthcare Europe GmbH) при скорости потока 1 мл/мин. Рабочий буфер представлял собой 0,2 М цитрат/фосфатный буфер, pH 6. Промывочный буфер представлял собой 0,2 М цитрат/фосфатный буфер, pH 5. Элюирование гетеродимера проводили с использованием 20 mM натрий-ацетатного буфера, pH 4,1. После элюирования измеряли оптическую плотность на 280 нм; соответствующие фракции, содержащие гетеродимер, Tetra-19, объединяли в пул и нейтрализовали 0,1 объема 1 М трис-HCl, pH 8. Затем проводили дополнительную стадию катионообменной очистки для удаления ковалентных мультимеров. Антитело Tetra-20, которое представляет собой комбинацию трех 2H6 Fab с одним 7H11 scFv, получали и очищали с использованием того же протокола. Tetra-20 HC1 содержит от N- до C-конца доменные последовательности 2H6 VH, IgG1 CH1, шарнир IgG1, IgG1 CH2, содержащие мутацию LALA, IgG3 CH3 BEAT (A), линкер G4T и 7H11 scFv, сконструированные с дисульфидной связью. Tetra-20 HC2 состоит от N- до C-конца из доменных последовательностей 2H6 VH, IgG1 CH1, шарнира IgG1, IgG1 CH2, содержащего мутацию LALA, IgG1 CH3 BEAT (B), линкера G4T, 2H6 VH и IgG1 CH1. Эти две цепи коэкспрессировали с легкой цепью 2H6 с получением Tetra-20 (Таблица 21), которое очищали с использованием дифференциальной хроматографии с белком А и катионообменной хроматографии.

Антитело Tetra-21 было сконструировано так, чтобы оно содержало четыре связывающих домена антитела с одним 2H6 scFv и одним 7H11 Fab, слитым с N-концом Fc-области, и одним 2H6 scFv и одним 7H11 Fab, слитым с C-концом той же Fc-области. Этот гетеродимер был получен, как описано ранее, путем совместной экспрессии Tetra-19 HC1 с Tetra-21 HC2 и легкой цепью 7H11 VL1 (Таблица 21). Tetra-21 HC2 была сконструирована так, чтобы содержать от N- до C-конца 2H6 scFv, связанный с IgG1 CH2, содержащей мутацию LALA, за которой следует IgG1 CH3 BEAT (B), линкер G4T, 7H11-VH2 N58K-D54E и IgG1 CH1. Эта цепь была синтезирована Geneart AG и клонирована в модифицированный вектор pcDNA3.1. Затем Tetra-21 очищали с использованием дифференциальной хроматографии на белке А с последующей дополнительной стадией катионообменной очистки, как описано ранее.

Tetra-22 было сконструировано так, чтобы оно объединило Fab трастузумаба с 2H6 scFv, слитого с C-концом области Fc, в качестве контроля только агонистической активности 2H6 scFv. HC Tetra-22 была сконструирована так, чтобы содержать от N- до C-конца VH

трастузумаба, IgG1 CH1, шарнирную область IgG1, IgG1 CH2, содержащую мутацию LALA, IgG1 CH3, линкер G4T и 2H6 scFv с дисульфидными связями. Эта тяжелая цепь была синтезирована Geneart AG, как и VL трастузумаба (LC Tetra-22), после чего обе цепи были клонированы в модифицированный вектор pcDNA3.1. Затем Tetra-22 производили и очищали, как описано ранее для тетра -8 (Таблица 21). Подобно С-концевому слиянию 2H6 scFv с IgG1 LALA трастузумаба, ритуксимаб использовали в качестве нерелевантного связывающего компонента, и получали четырехвалентную молекулу ритуксимаб-2H6 с использованием архитектуры Tetra-8 и Tetra-22 в качестве матриц.

Наконец, была создана молекула Tri-8 для получения трехвалентной молекулы, содержащей два 7H11 Fab и только один 2H6scFv, слитые на С-конце. Этот гетеродимер был получен путем объединения Tetra-19 HC1 с Tri-8 HC2 и легкой цепью 7H11 VL1 (Таблица 21). Tri-8 HC2 состоит от N- до С-конца из 7H11-VH2 N58K-D54E, IgG1 CH1, IgG1 CH2, содержащего мутацию LALA, за которой следует IgG1 CH3 BEAT (B). Эта цепь была синтезирована Geneart AG и клонирована в модифицированный вектор pcDNA3.1. Затем молекулу Tri-8 производили и очищали, как описано ранее для Tetra-19, 20 и 21.

---

Тяжелые и легкие цепи, используемые для производства четырехвалентных антител

---

| Четырехвалентное антитело | Тяжелая цепь 1            | Тяжелая цепь 2 | Легкая цепь                            |
|---------------------------|---------------------------|----------------|----------------------------------------|
| Tetra-8                   | Tetra-8 HC (SEQ ID: 45)   | -              | Гуманизированная 7H11-VL1 (SEQ ID: 16) |
| Tetra-13                  | Tetra-13 HC (SEQ ID: 132) | -              | Гуманизированная 7H11-VL1 (SEQ ID: 16) |
| Tetra-14                  | Tetra-14 HC (SEQ ID: 133) | -              | 2H6 LC (SEQ ID: 116)                   |
| Tetra-15                  | Tetra-15 HC (SEQ ID: 134) | -              | 2H6 LC (SEQ ID: 116)                   |
| Tetra-16                  | Tetra-16 HC (SEQ ID: 135) | -              | Гуманизированная 7H11-VL1 (SEQ ID: 16) |
| Tetra-17                  | Tetra-17 HC (SEQ ID: 136) | -              | Гуманизированная 7H11-VL1 (SEQ ID: 16) |
| Tetra-18                  | Tetra-18 HC (SEQ ID: 137) | -              | 2H6 LC (SEQ ID: 116)                   |

|          |                            |                            |                                        |
|----------|----------------------------|----------------------------|----------------------------------------|
| Tetra-19 | Tetra-19 HC1 (SEQ ID: 138) | Tetra-19 HC2 (SEQ ID: 139) | Гуманизированная 7H11-VL1 (SEQ ID: 16) |
| Tetra-20 | Tetra-20 HC1 (SEQ ID: 140) | Tetra-20 HC2 (SEQ ID: 141) | 2H6 LC (SEQ ID: 116)                   |
| Tetra-21 | Tetra-19 HC1 (SEQ ID: 138) | Tetra-21 HC2 (SEQ ID: 142) | Гуманизированная 7H11-VL1 (SEQ ID: 16) |
| Tetra-22 | Tetra-22 HC (SEQ ID: 143)  | -                          | Tetra-22 LC (SEQ ID: 144)              |
| Tri-8    | Tetra-19 HC1 (SEQ ID: 138) | Tri-8 HC2 (SEQ ID: 145)    | Гуманизированная 7H11-VL1 (SEQ ID: 16) |

Таблица 21: Комбинация тяжелых и легких цепей для получения четырехвалентного и трехвалентного антитела.

Определение характеристик антител, имеющих альтернативную архитектуру Tetra-8

- 5 Молекулы были дополнительно охарактеризованы с помощью Biacore методом, описанным ранее. Белки расщепляли с использованием FabALACTICA, и F-слитые C-концевые связывающие домены, полученные после протеолиза, очищали с использованием CaptureSelect™ FcXL. Полученный материал затем использовали для изучения активности C-концевых связывающих доменов с помощью Biacore.
- 10 Аффинность 7H11 scFv, слитого с C-концом молекулы Tetra-14, с OX40 измеряли с использованием того же подхода, описанного ранее для измерения аффинности scHv 2H6 с OX40 в Tetra-8. Была определена аффинность величиной 19 нМ (Таблица 22), что указывает на то, что связывающие плечи Tetra-14, слитые с C-концом, являются функциональными, хотя было измерено 2-кратное снижение аффинности 7H11.

Аффинность 2H6 и 7H11 с OX40 человека в зависимости от их ориентации

|                    | N-конец | C-конец |
|--------------------|---------|---------|
| 2H6                | 27 нМ   | 60 нМ   |
| 7H11-VH2 N58K-D54E | 9 нМ    | 19 нМ   |

- 15 Таблица 22: Характеристики аффинности 7H11 и 2H6 при слиянии в N- или C-конце.

Tetra-17, Tetra-18, Tetra-19 и Tetra-20 также были расщеплены для исследования с помощью Biacore с использованием химер OX40. Компоненты chiOX40R NHRH-Fc и chiOX40R RRHH-Fc иммобилизовали на ранее активированном сенсорном чипе CM5

(3000 RU) путем введения их в проточный канал 2 и 4 соответственно, чтобы достичь 3000 RU для обеих молекул. Затем очищенные продукты расщепления Tetra-17, Tetra-18, Tetra-19 и Tetra-20 использовали в качестве аналитов и вводили в 4 канала (каналы 1 и 3 использовали в качестве эталонов) при концентрации 200 нМ и скорости потока 30 мкл/мин в течение 240 секунд. Затем выполняли вторую инъекцию с использованием буфера HBS-EP в течение 3 минут с последующей диссоциацией в течение 5 минут. Регенерацию между инъекциями проводили с использованием глицинового буфера pH 1,5 в течение 1 мин (фигура 21 и Таблица 23). Связывающий компонент 7H11 специфичен для OX40 CRD1, поэтому он может связываться только с chiOX40R HHRH-Fc, но не с chiOX40R RRHH-Fc (Таблица 23). В этих условиях мы наблюдали, что связывание 7H11 с chiOX40R HHRH-Fc, когда он слит с С-концом в виде Fab, примерно в 4 раза лучше, чем в формате scFv (сравнение Fc-7H11Fab/2H6 scFv с Fc-7H11 scFv/2H6 fab, 450 единиц ответа (RU) по сравнению с 100 RU соответственно), показывая, что 7H11 функционален независимо от его формата. Мы также определили, что в двухвалентном формате связывание 7H11 Fab с OX40 CRD1 в 2 раза лучше, чем в моновалентном формате (сравнение Fc-7H11Fab/7H11 Fab с Fc-7H11 Fab/2H6 scFv, 870 RU и 450 RU, соответственно), предполагая, что эти два Fab-фрагмента, слитые в С-конце, оба являются функциональными и могут потенциально связывать две молекулы OX40. Связывающие домены 2H6 специфично для OX40 CRD3, поэтому оно может связываться только с chiOX40R RRHH-Fc, но не с chiOX40R HHRH-Fc. Мы также наблюдали, что связывание с chiOX40R RRHH-Fc 2H6, слитого с С-концом в виде Fab, лучше, чем в формате scFv (сравнение Fc-7H11Fab/2H6 scFv с Fc-7H11 scFv/2H6 fab), подтверждая, что 2H6 является функциональным когда он отформатирован как Fab или scFv. Мы также наблюдали, что в двухвалентном формате связывание 2H6 Fab с OX40 CRD3 было лучше, чем в моновалентном формате (сравнение Fc-2H6 Fab/2H6 Fab с Fc-7H11 scFv/2H6 Fab), предполагая, что связывающие единицы 2H6, слитые в С-конце, являются функциональными и могут потенциально связывать две молекулы OX40.

Связывание С- концевых 2H6 и 7H11 с CRD1 и CRD3 в зависимости от их валентности и формата, выраженное в количестве единиц ответа

|                      | chiOX40R HHRH-Fc | chiOX40R RRHH-Fc |
|----------------------|------------------|------------------|
| FC-7H11 Fab/7H11 Fab | 870 RU           | 0 RU             |
| FC-7H11 Fab/2H6 scFv | 450 RU           | 320 RU           |
| Fc-7H11 scFv/2H6 Fab | 100 RU           | 380 RU           |

Таблица 23: Характеристики связывания 7H11 и 2H6 при слиянии на С-конце с различной валентностью и/или форматом.

Чтобы четко продемонстрировать события совместного связывания, мы слегка модифицировали установку Biacore, описанную ранее, используя только Fc-7H11 Fab/2H6-scFv или Fc-7H11 scFv/2H6 Fab в качестве аналитов для первого ввода и вводя буфер, OX40-Fc человека, химеры chiOX40R NHRH-Fc (специфичный для 7H11) и chiOX40R RRHH-Fc (специфичный для 2H6) на 400 нМ в течение 3 минут с последующей диссоциацией в течение 5 минут в качестве второй стадии ввода. Регенерацию между вводами выполняли с использованием глицинового буфера pH 1,5 в течение 1 мин (фиг.22 и 23). Используя эти подходы, можно отслеживать события совместного связывания. Фактически, часть Fc-7H11- Fab/2H6 scFv, когда она захвачена на чипе посредством связывания 7H11 с OX40 CRD1, по-прежнему может взаимодействовать с OX40-Fc человека, но также и с chiOX40R RRHH-Fc (специфичным для 2H6) (фигура 22a). Аналогично, часть Fc-7H11 Fab/2H6 scFv, которая захвачена на чипе посредством связывания 2H6 с OX40 CRD3, может взаимодействовать с OX40 человека и chiOX40R OX40 NHRH-Fc (специфичным для 7H11) (фигура 22b). Аналогичные результаты были получены с Fc-7H11 scFv/2H6 Fab (фиг. 23a и 23b). Взятые в совокупности, эти данные показывают, что связывающие единицы 7H11 или 2H6, слитые на С-конце, являются функциональными, независимо от их форматов Fab или scFv, и что они могут одновременно связывать две различные единицы OX40.

### **Пример 13: Агонистическая активность Tetra-8 связана с его архитектурой и валентностью**

Tetra-8, которое обладает четырьмя связывающими единицами, проявляет более высокую агонистическую активность по сравнению с моноклональным бивалентным 7H11\_v8 IgG1 или 2H6 IgG1, как показано в примере 10. Чтобы оценить вклад архитектуры Tetra-8 в его биологические функции, было создано несколько вариантов Tetra-8, демонстрирующих различные архитектуры и валентности, и протестировано в анализе SEB. Эти молекулы перечислены на фигуре 20. Как показано на фигуре 24, Tetra-8, который состоит из 4 связывающих участков, полученных из 2 разных клонов, запускает более высокую агонистическую активность, чем молекулы, состоящие из I) 2 связывающих участков, полученных из одного клона (либо 7H11, либо 2H6), II) 3 связывающих участков, полученных из 2 разных клонов (Tri-8); III) четырехвалентные молекулы, состоящие из 4

одинаковых связывающих участков (Tetra-15 и Tetra-16). Две другие четырехвалентные молекулы анти-OX40 вариантов с архитектурой, отличной от Tetra-8, были протестированы в том же анализе: Tetra-21 и Tetra-14. Эти две молекулы состоят из тех же OX40-связывающих участков, что и Tetra-8 (полученных из клонов 7H11 и 2H6), но с другими ориентациями. Как показано на фигуре 24, обе четырехвалентные молекулы демонстрируют в анализах SEB слабые агонистические потенциалы по сравнению с антителом Tetra-8. Кроме того, Tetra-8 индуцирует более высокие уровни IL-2, чем комбинация 7H11 и 2H6 (7H11 IgG1 LALA + Tetra-22), как видно из Таблицы 24, показывающей, что присутствие четырех OX40-связывающих единиц в одной и той же молекуле является ключевым фактором, управляющим активностью Tetra-8. Взятые в совокупности, результаты на фигуре 24 демонстрируют, что сильные агонистические свойства Tetra-8 связаны с его четырехвалентностью и с его архитектурой.

| Молекула                     | %<br>доноров-<br>респондер<br>ов (> 2) | Средн<br>нее | Количес<br>тво<br>протест<br>ированн<br>ых<br>доноров | Отличаетс<br>я ли<br>обработка<br>X от<br>отсутствия<br>лечения? | Значимость | Отличаетс<br>я ли<br>обработка<br>X от Tetra-<br>8 | Значимость |
|------------------------------|----------------------------------------|--------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------|----------------------------------------------------|------------|
| Контрольный<br>IgG           | 5%                                     | 0,88         | 85                                                    | 0,0263                                                           | *          | <,0001                                             | ***        |
| OX40 L                       | 83%                                    | 4,26         | 90                                                    | <,0001                                                           | * * *      | 0,0013                                             | **         |
| Tetra-8                      | 68%                                    | 3,61         | 84                                                    | <,0001                                                           | * * *      | /                                                  | /          |
| 7H11 IgG1 LALA<br>+ Tetra-22 | 0%                                     | 1,02         | 10                                                    | 0,9098                                                           | NS         | 0,0004                                             | ***        |
| 2H6 IgG1 LALA                | 25%                                    | 1,45         | 16                                                    | 0,0239                                                           | *          | 0,0003                                             | ***        |
| 7H11 IgG1 LALA               | 6%                                     | 0,81         | 16                                                    | 0,4646                                                           | NS         | 0,0001                                             | ***        |
| Tetra-13                     | 64%                                    | 2,60         | 11                                                    | 0,0079                                                           | **         | 0,0473                                             | *          |
| Tetra-14                     | 40%                                    | 1,65         | 10                                                    | 0,0373                                                           | *          | 0,0064                                             | **         |
| Tetra-15                     | 0%                                     | 0,93         | 6                                                     | 0,406                                                            | NS         | 0,0083                                             | **         |
| Tetra-16                     | 33%                                    | 1,72         | 6                                                     | 0,0932                                                           | NS         | 0,0026                                             | **         |
| Tetra-17                     | 8%                                     | 1,05         | 12                                                    | 0,8024                                                           | NS         | 0,0088                                             | **         |
| Tetra-18                     | 0%                                     | 0,88         | 12                                                    | 0,187                                                            | NS         | 0,0124                                             | *          |
| Tetra-19                     | 0%                                     | 1,00         | 12                                                    | 0,9546                                                           | NS         | 0,0006                                             | ***        |
| Tetra-20                     | 0%                                     | 1,14         | 12                                                    | 0,2581                                                           | NS         | 0,0009                                             | ***        |



|              |     |      |    |        |    |        |     |
|--------------|-----|------|----|--------|----|--------|-----|
| Tetra-21     | 8%  | 1,32 | 12 | 0,0349 | *  | 0,001  | *** |
| Tetra-22     | 0%  | 1,00 | 15 | 0,987  | NS | <,0001 | *** |
| Tetra-23     | 33% | 1,66 | 12 | 0,0287 | *  | <,0001 | *** |
| Tri-8        | 0%  | 0,96 | 6  | 0,6304 | NS | 0,0045 | **  |
| 106-222 IgG1 | 6%  | 0,86 | 17 | 0,3101 | NS | 0,0036 | **  |
| 11D4 IgG2    | 18% | 1,87 | 11 | 0,1372 | NS | 0,0261 | *   |
| 1A7 IgG1     | 36% | 1,93 | 11 | 0,0178 | *  | 0,0911 | NS  |

|                |      |       |    |        |       |        |     |
|----------------|------|-------|----|--------|-------|--------|-----|
| 9B12 IgG1      | 50%  | 2,36  | 12 | 0,0005 | * * * | 0,0198 | *   |
| pab1949 IgG1   | 80%  | 4,74  | 5  | 0,0884 | NS    | 0,6301 | NS  |
| Tetra-hz1D1Ov1 | 50%  | 1,89  | 12 | 0,0022 | **    | 0,0114 | *   |
| Tetra-hzG3V9   | 50%  | 1,93  | 12 | 0,006  | **    | 0,0068 | **  |
| Hexa-hz1D1Ov1  | 0%   | 1,14  | 12 | 0,4894 | NS    | 0,0025 | **  |
| Hexa-hzG3V9    | 33%  | 1,82  | 12 | 0,0033 | **    | 0,0053 | **  |
| 106-222_1949   | 9%   | 0,84  | 11 | 0,3347 | NS    | 0,0068 | **  |
| 106-222_2H6_8  | 9%   | 1,30  | 11 | 0,1412 | NS    | 0,0002 | *** |
| 106-222_hzG3v9 | 0%   | 0,51  | 11 | 0,0018 | **    | 0,0115 | *   |
| 11D4_1949      | 100% | 11,86 | 11 | 0,0164 | *     | 0,0275 | *   |
| HD4_hzG3v9     | 100% | 22,65 | 11 | 0,0557 | NS    | 0,063  | NS  |
| 1A7_1949       | 9%   | 1,43  | 11 | 0,2819 | NS    | 0,0054 | **  |
| 1A7_2H6_8      | 0%   | 0,79  | 11 | 0,0281 | *     | 0,0002 | *** |
| 2H6_hzG3v9_8   | 100% | 48,39 | 11 | 0,087  | NS    | 0,0935 | NS  |
| 7H11_1949_8    | 100% | 11,89 | 11 | 0,024  | *     | 0,0504 | NS  |
| 7H11_9B12_8    | 73%  | 6,47  | 11 | 0,0368 | *     | 0,0844 | NS  |
| 7H11_hzG3v9_8  | 100% | 30,34 | 11 | 0,0798 | NS    | 0,0894 | NS  |
| 9B12_1949      | 18%  | 1,60  | 11 | 0,119  | NS    | 0,0081 | **  |
| 9B12_hzG3v9    | 91%  | 12,42 | 11 | 0,0154 | *     | 0,0169 | *   |

Таблица 24

### Пример 13. Четырехвалентное антитело, нацеленное на домены OX40.

Агонистическое антитело Tetra-8 связывает CRD1 и CRD3 OX40 посредством его связывающих единиц 7h11 и 2H6, соответственно. Четырехвалентная архитектура Tetra-8,

состоящая из scFv, сконструированного с использованием дисульфида, слитого с С-концевой частью тяжелой цепи IgG1 LALA, по-видимому, является оптимальной для его агонистической активности. Кроме того, данные, полученные с антителами, имеющими сходные связывающие единицы с Tetra-8, но имеющими разные архитектуры, также позволяют предположить, что N-концевая Fab-часть должна нацеливаться на дистальный мембранный домен OX40, тогда как С-концевой scFv должен взаимодействовать с проксимальным мембранным доменом OX40. Связывающие единицы 2H6, 7H11, 9B12, 11D4, 1A7, 106-222, pab1949 и hzG3V9 OX40 были использованы для определения того, могут ли другие связывающие домены OX40, объединенные в четырехвалентном формате, оказывать агонистическое воздействие на OX40. Последовательности анти-OX40 антител собирали, используя в качестве матрицы специфический формат Tetra-8 (т.е. состоящий из VH, IgG1 CHI, IgG1-шарнир, IgG1 CH2 LALA, IgG1 CH3, линкер, дисульфидно-сконструированный scFv или dAb от N- до С-конца). На N-конце были выбраны VH 7H11, 11D4, 1A7, 9B12, 106-222 и 2H6, в то время как на С-конце были выбраны scFv 9B12, 2H6, pab1949 и hzG3v9 dAb. Комбинация связывающих доменов была разработана таким образом, чтобы исследовать различное связывание эпитопов OX40 четырехвалентными молекулами (Таблица 25). Затем компанией GeneArt были синтезированы кДНК, кодирующие сконструированные тяжелые цепи 1A7\_2H6\_8, 106-222\_2H6\_8, 7H11\_1949\_8, 11D4\_1949, 1A7\_1949, 9B12\_1949, 106-222\_1949, 7H11\_9B12\_8, 7H11\_hzG3v9\_8, HD4\_hzG3v9, 106-222\_hzG3v9, 9B12\_hzG3v9 и 2H6\_hzG3v9\_8, с последующим клонированием в модифицированной вектор pCDNA3.1, как описано ранее. Для получения этих четырехвалентных антител тяжелые цепи ко-транслировали их соответствующими легкими цепями (Таблица 26) в клетках HEK293-EBNA1, и супернатанты собирали с последующей очисткой белком А. Затем применяли дополнительную стадию катионообменной очистки для удаления ковалентных мультимеров, образованных с четырехвалентными молекулами, имеющими слитый на С-конце scFv с дисульфидными связями.

Связывающие OX40 домены, скомбинированные в четырехвалентном формате

|      | CRD2      | CRD3            | CRD4           | С-конец |
|------|-----------|-----------------|----------------|---------|
| CRD1 | 7H11/9B12 | 7H11/pab1949    | 7H11/hzG3v9    |         |
|      |           | HD4/pab1949     | HD4/hzG3v9     |         |
|      |           | 106-222/2H6     | 106-222/hzG3v9 |         |
| CRD2 |           | 106-222/pab1949 | 9B12/hzG3v9    |         |
|      |           | 9B12/pab1949    |                |         |

|         |            |
|---------|------------|
| CRD3    | 2H6/hzG3v9 |
| N-конец |            |

Таблица 25: Комбинация связывающих доменов OX40 в формате четырехвалентных антител с учетом их эпитопа.

| Тяжелые и легкие цепи, используемые для получения четырехвалентных антител |                                     |                                        |
|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------|
| Четырехвалентное антитело                                                  | Тяжелая цепь                        | Легкая цепь                            |
| 1A7_2H6_8                                                                  | 1A7_2H6_8 HC (SEQ ID: 146)          | 1A7 LC (SEQ ID: 108)                   |
| 106-222_2H6_8                                                              | 106-222_2H6_8 HC (SEQ ID: 147)      | 106-222 LC (SEQ ID: 106)               |
| 7H11_1949_8                                                                | 7H11_1949_8 HC (SEQ ID: 148)        | Гуманизированная 7H11-VL1 (SEQ ID: 16) |
| 11D4_1949                                                                  | 11D4_1949 HC (SEQ ID: 149)          | 11D4 LC (SEQ ID: 152)                  |
| 1A7_1949                                                                   | 1A7_1949 HC (SEQ ID: 150)           | 1A7 LC (SEQ ID: 108)                   |
| 9B12_1949                                                                  | 9B12_1949 HC (SEQ ID: 151)          | 9B12LC (SEQ ID: 104)                   |
| 106-222_1949                                                               | 106-222_1949 HC (SEQ ID: 152)       | 106-222 LC (SEQ ID: 106)               |
| 7H11_9B12_8                                                                | 7H11_9B12_8 HC (SEQ ID: 153)        | Гуманизированная 7H11-VL1 (SEQ ID: 16) |
| 7H11_hzG3v9_8                                                              | 7H11_hzG3v9_8 HC (SEQ ID: 15554444) | Гуманизированная 7H11-VL1 (SEQ ID: 16) |
| HD4_hzG3v9                                                                 | HD4_hzG3v9 HC (SEQ ID: 1555)        | 11D4 LC (SEQ ID: 102)                  |
| 106-222_hzG3v9                                                             | 106-222_hzG3v9 HC (SEQ ID: 156)     | 106-222 LC (SEQ ID: 106)               |
| 9B12_hzG3v9                                                                | 9B12_hzG3v9 HC (SEQ ID: 157)        | 9B12LC (SEQ ID: 104)                   |
| 2H6_hzG3v9_8                                                               | 2H6_hzG3v9_8 HC (SEQ ID: 158)       | 2H6LC (SEQ ID: 116)                    |

- 5 Таблица 26: Сочетание тяжелых и легких цепей для производства четырехвалентных антител

Определение характеристик аффинности раb1949 при слиянии на N или C-конце.

Аффинность scFv pab1949, слитого на С-конце, измеряли с использованием того же подхода, который описан для измерения аффинности scFv 2H6 с OX40 в Tetra-8. Измерения аффинности дали величину 460 нМ (Таблица 27). Чтобы определить аффинность pab1949 IgG1 с OX40, приблизительно 600 RU этого антитела захватывали на чипе CM5, на котором был ранее иммобилизован IgG против Fc человека. Затем вводили серию разведений hsOX40\_CRD\_Avi\_His (SED ID NO: 159). В этом формате результаты измерений аффинности для pab1949 составили 304 нМ.

Аффинность pab1949 к OX40 человека

|         | IgG1   | scFv, слитый на С-конце |
|---------|--------|-------------------------|
| pab1949 | 304 нМ | 460 нМ                  |

Таблица 27: Аффинность pab1949 в формате IgG1 или scFv, слитого на С-конце.

#### **Пример 14: Связывание нескольких эпитопов OX40 увеличивает агонистический потенциал**

Функциональные различия, наблюдаемые между Tetra-8 и Tetra-16 или между Tetra-8 и Tetra-15, убедительно свидетельствуют о том, что молекулы, состоящие из нескольких связывающих единиц, нацеленных на разные эпитопы OX40, проявляют более высокий агонистический потенциал, чем поливалентные моноспецифичные молекулы. Чтобы подтвердить эту гипотезу, были созданы молекулы, состоящие из связывающих единиц, распознающих различные эпитопы OX40, и протестированы в анализе SEB. Как показано на фигуре 25, молекулы Tetra-8, 7H11\_1949\_8 и 11D4\_1949, которые являются четырехвалентными молекулами, состоящими из связывающих единиц, специфичных для доменов 1 и 3 рецептора OX40, проявляют более высокий агонизм, чем четырехвалентные моноспецифичные антитела Tetra-15 или Tetra-16. Аналогично, четырехвалентные 7H11\_hzG3v9\_8 и HD4\_hzG3v9, которые нацелены на домены 1 и 4 OX40, вызывают более сильную агонистическую активность, чем их двухвалентные аналоги. Эти данные показывают, что Tetra-8 проявляет сильную агонистическую активность OX40 посредством мультивалентного и биэпитопного нацеливания на мембранные дистальные и проксимальные домены OX40. Кроме того, комбинация 7H11 IgG1 LALA + Tetra-22 индуцирует более высокие уровни IL-2 по сравнению с отдельными молекулами, но не воспроизводит уровни IL-2, индуцированные Tetra-8, как показано в Таблице 24. Это демонстрирует, что биэпитопное нацеливание на OX40, опосредованное четырехвалентным антителом против Tetra-8, запускает более высокую агонистическую

активность, чем биэпитопное нацеливание, опосредованное комбинацией двух двухвалентных молекул.

**Пример 15. Мультимеризация Tetra-8 + hOX40 коррелирует с активностью *in vitro*.**

5 Для определения стехиометрии комплекса Tetra-8 + hOX40 выполняли аналитическую гель-фильтрационную хроматографию на колонке Superdex 200 10/300 GL Increase, подключенной к системе AktaPurifier (обе компании GE Healthcare Europe GmbH, Глаттбругг, Швейцария). Подвижный буфер представлял собой PBS pH 7,4 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Райнах, Швейцария), а скорость потока составляла 0,5 мл/мин. Объем

10 вводимой пробы не превышал 2% объема колонки и обычно составлял 0,3-0,5 мл. В первом опыте вводили 2500 пмоль (1 часть) антитела. Во втором опыте вводили 5000 пмоль (2 части) hOX40 (SEQ. ID NO: 160). В третьем опыте 2500 пмоль антитела (1 часть) смешивали с 10000 пмоль hOX40 (4 части) и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре перед вводом. Предварительно выполняли калибровочный анализ

15 с использованием наборов для калибровки с высокой и низкой молекулярной массой (28-4038-41, 28-4038- 42, GE Healthcare). Хроматограммы для одного Tetra-8, одного hOX40 и Tetra-8/hOX40 в соотношении 1: 4 показаны на фигуре 26. Вместо того, чтобы наблюдать пик для комплекса, минимально смещенный в сторону более раннего объема элюирования в форме одного пика, наблюдался ряд новых пиков при значительно более высокой

20 молекулярной массе, чем ожидалось, учитывая связывание лиганда 16 кДа. Было обнаружено, что пики для этого скопления элюируют раньше, чем калибровочный маркер 440 кДа, что предполагает образование комплексов, состоящих из более чем одного антитела. Избыток несвязанного hOX40 около 5000 пмоль (получено из площади под кривой) и тот факт, что в смесь комплексов были добавлены 10 000 пмоль, означали, что

25 две молекулы hOX40 были связаны каждым Tetra-8. Учитывая теоретическую молекулярную массу 198 кДа для Tetra-8 и 16 кДа для hOX40, можно сделать вывод, что второй пик содержал 2-3 молекулы Tetra-8 в комплексе с hOX40, а первый пик и его плечо содержали мультимеры более высокого порядка. (комплексы, состоящие из более чем

30 двух антител и нескольких hOX40). Мы постулируем, что благодаря своей бипаратопической природе Tetra-8 способно мультимеризоваться с hOX40 с образованием больших кристалло-подобных решеток (фиг. 27). Одного hOX40 на каждое Tetra-8 было бы достаточно, чтобы создать теоретически бесконечно большую решетку, хотя, как упоминалось выше, по-видимому, два рецептора связаны каждым антителом. Несколько контрольных молекул были протестированы в том же эксперименте для того, чтобы

соотнести мультимеризацию с активностью *in vitro*. Контрольные молекулы, содержащие только домены 7H11, показали пик на ~ 440 кДа, что указывает на образование неспецифических димеров, индуцированных связыванием hOX40 (пики для контрольных антител по отдельности для простоты не показаны). Мультимеров высшего порядка не наблюдалось. В соответствии с этим результатом никакой активности *in vitro* для этих молекул не наблюдалось. Tri-8 показало пик на ~440 кДа, что указывает на образование димера, но значительных количеств мультимеров более высокого порядка не наблюдалось. В соответствии с этим результатом Tri-8 не проявляло активности *in vitro*. Tetra-14 показало два пика, первый из которых, вероятно, содержал мультимеры более высокого порядка, а второй, элюируемый до маркера 440 кДа, мог содержать димеры или одно антитело в комплексе с несколькими молекулами hOX40. Tetra-14 не проявляло активности *in vitro*, что, как мы предполагаем, является результатом его более низкой склонности к мультимеризации по сравнению с Tetra-8. Tetra-8 не обнаружило пика на или до маркера 440 кДа, а только на пиках для мультимеров более высокого порядка. Кроме того, комплекс Tetra-8/hOX40 показал плечо, элюирующее в объеме пустот (VO); это наблюдение, которое нельзя было сделать для Tetra-14. 7H11\_1949\_8 показало наивысшую активность *in vitro* и в то же время показало наивысшую величину мультимеризации при аналитической гель-фильтрации по сравнению с любыми другими протестированными молекулами, причем большая часть белка элюировалась в VO. 7H11\_v8 IgG1 также был включен в эксперимент и показал пик на ~ 440 кДа, что потенциально является результатом образования неспецифического димера. Как и ожидалось, пиков для мультимеризации более высокого порядка для этой молекулы не наблюдалось. С учетом совокупности этих данных, мы предполагаем, что комбинация архитектуры эпитопа и антитела определяет склонность к мультимеризации, а мультимеризация высшего порядка коррелирует с активностью *in vitro*.

#### **Пример 16. Tetra-8 вызывает локальную кластеризацию OX40 на клеточной поверхности.**

##### **16.1. Получение стабильной клеточной линии Jurkat, экспрессирующей OX40-eGFP человека**

Клетки Jurkat E6.1 (ECACC 88042803) трансфицировали плазмидой pT1-hsOX40-eGFP\_fusion\_IRES\_Puromycin (GSY935a) с помощью электропорации (система трансфекции Neon®), где hsOX40-eGFP представляет собой белок слияния с eGFP, слитым на С-концевой части hsOX40. На следующий день было выполнено ограничивающее разведение в ростовой среде, содержащей пурамицин (RPMI 1640 с

глутамином + 10% FBS + 0,25 мкг/мл пурамицина). После 2 недель инкубации при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>, отдельные пулы анализировали на экспрессию eGFP с использованием проточного цитометра Guava® easyCyte и отбирали 19 пулов. Через пять дней эти пулы были проанализированы на экспрессию hsOX40 с использованием FACS, и было  
5 сохранено 7 гомогенных пулов с различными уровнями экспрессии слитого белка hsOX40-eGFP. Их амплифицировали и замораживали в 90% FBS, содержащем 10% ДМСО. Экспрессия слитого белка OX40-eGFP на клеточной поверхности позволила визуализировать агрегацию OX40 при клеточной активации.

## **16.2 Tetra-8 индуцирует кластеризацию мембраносвязанного OX40 на клеточной 10 линии Jurkat OX40-eGFP**

### **16.2.1. Интервальная конфокальная микроскопия на клетках Jurkat OX40-GFP, обработанных Tetra-8**

Что касается других членов TNFRSF, активация нисходящей передачи сигналов зависит от мультимеризации OX40. Тот факт, что Tetra-8 запускает передачу сигнала OX40  
15 независимым от FcγR образом, убедительно свидетельствует о прямом влиянии антитела на мультимеризацию OX40. Чтобы детально исследовать способность Tetra-8 запускать мембраносвязанную кластеризацию OX40, был проведен эксперимент с интервальной конфокальной микроскопией на клетках Jurkat, экспрессирующих eGFP OX40, предварительно инкубированных с Tetra-8. В кратком изложении, чашки для  
20 культивирования клеток Fluorodish (WPI) предварительно покрывали 1 мл фибронектина (при концентрации 1 мкг/см<sup>2</sup> в PBS) в течение 45 минут при комнатной температуре. Затем чашки 2 раза промывали PBS и в чашки выливали 3 мл суспензии клеток в RPMI и пурамицине (20000 клеток/см<sup>2</sup>). Клетки инкубировали в течение ночи при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Чашки помещали под микроскоп, фокусировку устанавливали на типичную клетку, и  
25 делали снимки каждые 30 секунд. Через 1,5 мин в среду добавляли раствор, содержащий Tetra-8 при конечной концентрации 80 нМ. Изображения клеток получали с использованием инвертированного микроскопа Zeiss Z1, снабженного конфокальным модулем LSM 800 с увеличением 63х. Как показано на фигуре 28, после обработки клеток Jurkat OX40-eGFP антителом Tetra-8 картина флуоресценции OX40-GFP со временем  
30 переключается с равномерного окрашивания плазматической мембраны на четкую агрегацию в отдельных участках на плазматической мембране.

### **16.2.2. Тестирование кластеризации OX40, индуцированной Tetra-8, по сравнению с другими OX40-специфичными молекулами**

Как показано в предыдущих разделах, Tetra-8 проявляет более сильную FcγR-независимую агонистическую активность, чем многие другие моноклональные агонисты OX40. Эти различия были дополнительно исследованы в экспериментах по кластеризации OX40 с использованием флуоресцентной конфокальной микроскопии. В этих экспериментах эффект Tetra-8 по индукции локальной кластеризации мембраносвязанного OX40 тестировали в сравнении с молекулами Tetra-14, 1A7 и OX40L. В кратком изложении, эти молекулы были протестированы в двух концентрациях, 20 и 80 нМ, на клетках eGFP Jurkat-OX40 в соответствии с протоколом, описанным в предыдущем параграфе. На основании результатов предыдущего конфокального эксперимента, чтобы контролировать влияние тестируемых соединений на кластеризацию OX40, были выбраны временные точки 5, 10 и 20 мин. Результаты на фигуре 29 показывают, что 20 или 80 нМ Tetra-8 значительно влияют на флуоресцентную картину OX40-GFP уже после 5 минут инкубации при 37°C. Для сравнения, эффект других протестированных молекул менее заметен, даже через 20 минут: 1A7, по-видимому, не оказывает какого-либо качественного эффекта, тогда как OX40L и Tetra-14 вызывают очень слабую концентрацию OX40-GFP. Для более точной оценки этих различий был разработан количественный метод. Первый шаг состоял в картировании интенсивности флуоресценции клеточной мембраны на основе трехмерного стека флуоресценции OX40-GFP, полученного с помощью конфокальной микроскопии. Эту интенсивность флуоресценции отображали в системе координат 0-z, где 0 - угол от произвольной точки мембраны клетки по отношению к центру клетки, а z - высота от покровного стекла. В качестве второго шага из этой карты флуоресценции извлекали одно числовое значение: эксцесс поверхности. Этот параметр, обычно используемый в метрологии поверхности, был выбран среди прочих из-за того, что он является мерой распределения шипов выше и ниже средней линии (для колючих поверхностей  $R_{ku} > 3$ ; для неровных поверхностей  $R_{ku} < 3$ ; эксцесс совершенно случайных поверхностей = 3). Значение эксцесса измеряли для каждой клетки-образца, в результате чего получали среднее значение эксцесса со стандартной ошибкой среднего значения для каждого экспериментального условия клетки (то есть тип препарата, концентрация препарата, время после инъекции). Стандартная ошибка от среднего определяется как  $\sigma_x = \sigma/\sqrt{n}$ , где  $\sigma$  - стандартное отклонение популяции, а n - количество наблюдений; n обычно равнялось 4 образцам клеток в каждом экспериментальном условии. Как видно из фигуры 30, результаты количественного анализа кластеризации OX40 показали, что значения эксцесса увеличиваются со временем после обработки клеток Jurkat-OX40-GFP антителом Tetra-8 по сравнению с другими обработками (1A7, OX40L и Tetra-14).



### Пример 17. Четырехвалентные антитела, нацеленные на разные домены CD40

OX40 является членом суперсемейства TNFR, которое включает TNFR1, TNFR2, BAFFR, BCMA, TACI, GITR, CD27, 4-1BB, CD40, DR3, HVEM, LTpR, RANK, Fnl4, FAS, TRAILR1 и TRAILR2. Эти рецепторы характеризуются общим структурным доменом в их  
5 внеклеточных частях - богатым цистеином доменом (CRD). Наши данные показали, что механизм действия четырехвалентных антител, которые активируют OX40, по-видимому, основан на совместном связывании двух различных CRD OX40. Чтобы определить, может ли этот механизм действия найти более широкое применение в суперсемействе TNFR, мы создали четырехвалентные анти-CD40 молекулы в качестве проверки концепции. Анти-  
10 CD40 антитела были выявлены из литературного поиска, а их соответствующие последовательности были получены из патентной заявки или поиска в базе данных. Анти-CD40 антитела 2C10 (WO 2017/040932 A1), ADC-1013 (US 2014/0348836 A1), CD40.1 (US 2016/0376371 A1), селикрелумаб (US 8388971 B2), тенелексимаб (RCSB, 5DMI) и 3h56-5 (US 2017/0015754 A1) были выбраны, поскольку были известны их эпитопы на CD40, и  
15 потому что также сообщалось об их антагонистической или агонистической активности. Известно, что 2C10, CD40.1, ADC-1013 и тенелексимаб нацелены на CD40 CRD1. Селикрелумаб связывается с CRD1 и 2 CD40, в то время как 3h56-5 взаимодействует с CRD3. 2C10 и 3h56-5 описаны как антагонисты, тогда как другие антитела являются агонистами. Большинство из этих антител нацелены на дистальный домен мембраны  
20 CD40, за исключением 3h56-5 dAb, которое связывается с проксимальным доменом мембраны этого рецептора. Поэтому четырехвалентные анти-CD40 молекулы были получены путем слияния последовательности 3h56-5 dAb с С-концом тяжелых цепей 2C10, селикрелумаба, CD40.1, ADC-1013 и тенелексимаба. Последовательности этих антител VH, VL и dAb были синтезированы Geneart AG. Формат, используемый для этих  
25 четырехвалентных антител, подобен четырехвалентным антителам, описанным ранее. Последовательности кДНК VH были клонированы в модифицированном векторе pcDNA3.1 в рамке каркаса IgG1-LALA человека, за которым следуют короткая линкерная последовательность G4T и последовательность 3h56-5 dAb. Последовательности кДНК VL клонировали в рамке константных доменов каппа или лямбда в модифицированных  
30 векторах pcDNA3.1. Кроме того, последовательности VH селикрелумаба и ADC-1013 клонировали в рамке каркаса IgG1 человека LALA или IgG1 человека, соответственно, тогда как последовательность 3h56-5 клонировали в рамке фрагментов IgG1 Fc человека, содержащих мутацию LALA. Четырехвалентные молекулы селикрелумаба IgG1 LALA и 3h56 IgG1 LALA получали либо путем ко-трансфекции тяжелой и легкой цепей (Таблица

28), либо одной тяжелой цепи в клетках HEK293-EBNA1. Супернатанты собирали перед очисткой белком А.

Тяжелые и легкие цепи, используемые для производства антител

| Четырехвалентное антитело | Тяжелая цепь                            | Легкая цепь                    |
|---------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------|
| 2C10_3h56                 | 2C10_3h56 HC (SEQ ID: 162)              | 2C10 LC (SEQ ID: 167)          |
| ADC-1013_3h56             | ADC-1013_3h56 HC (SEQ ID: 163)          | ADC-1013 LC (SEQ ID: 168)      |
| CD40.1_3h56               | CD40.1_3h56 HC (SEQ ID: 164)            | CD40.1 LC (SEQ ID: 169)        |
| селикрелумаб_3h56         | селикрелумаб_3h56 HC (SEQ ID: 165)      | LC селикрелумаба (SEQ ID: 220) |
| тенелексимаб_3h56         | тенелексимаб_3h56 HC (SEQ ID: 166)      | LC тенелексимаба (SEQ ID: 171) |
| Селикрелумаб IgG1 LALA    | Селикрелумаб IgG1 LALA HC (SEQ ID: 172) | LC селикрелумаба (SEQ ID: 170) |
| ADC-1013 IgG1             | ADC-1013 IgG1 HC (SEQ ID: 173)          | ADC-1013 LC (SEQ ID: 168)      |
| 3h-56 IgG1 LALA           | 3h-56 IgG1 LALA HC (SEQ ID: 174)        | -                              |

Таблица 28: сочетание тяжелых и легких цепей для производства антител

## 5 Пример 18: Биэпитопное нацеливание CD40 приводит к увеличению агонистической активности

Подход, использующий усиление агонизма OX40 посредством биэпитопного нацеливания, был далее распространен на CD40, другой член суперсемейства TNFR, который проявляет структурную гомологию с OX40. С этой целью были получены различные молекулы, сочетающие связывающие звенья, полученные из моноклональных анти-CD40 антител, указанные в Таблице 28, и протестированы в анализе созревания DC. В этом анализе МКПК человека выделяли, как описано ранее, и моноциты очищали с использованием набора для очистки моноцитов в соответствии с инструкциями производителя (Stem Cell). Для получения DC очищенные моноциты культивировали в течение 6 дней при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в присутствии GM-CSF в концентрации 50 нг/мл (R&D) и rhIL-4 в концентрации 20 нг/мл (R&D) в течение 6 дней. Фенотип дендритных клеток подтверждали проточной цитометрией с использованием CD1c APC (ThermoFischer). Затем клетки культивировали в присутствии анти-CD40-антител или контролей. Два дня спустя

DC собирали и окрашивали анти-CD1c-APC, анти-CD80-PE, анти-CD86-PerCP-eF710, анти-CD83-FITC, анти-HLA-DR-PerCP5.5 (ThermoFischer). Клетки промывали 100 л буфера FACS и анализировали на цитометре Cytotflex. Чтобы оценить способность тестируемых анти-CD40-антител повышать регуляцию CD83 и CD86 на DC, проводили анализ процентного содержания клеток, экспрессирующих CD83 и CD86, с использованием CytExpert. Как показано на фигуре 31, обработка моноцитарных DC моноклональными моноспецифическими или биэпитопными анти-CD40-антителами приводит к активации маркеров созревания DC, CD83 и CD86. Аналогичным образом, CD40 и HLA-DR также показывали положительную регуляцию (данные не показаны). В то время как большинство протестированных антител вызывают агонистический эффект, эквивалентный растворимому CD40L (IgG1 LALA селикрелумаба, ADC-1013\_3h56, 2C10\_3h56 и CD40.1\_3h56), два биэпитопных анти-CD40 антитела проявляют еще более высокую агонистическую активность (селикрелумаб\_3h56 и тенелексимаб\_3h56).

Агонистический потенциал анти-CD40 молекул, ранее протестированных в анализе созревания DC, дополнительно оценивали с использованием набора для биоанализа CD40 в соответствии с инструкциями производителя (Promega). В этом анализе NFkB-Luc2P/U20 ресуспендировали при концентрации  $3 \times 10^5$  клеток/мл в полной среде RPMI (RPMI1640, 10% FBS) и 100 мл этой клеточной суспензии распределяли в 96 люминесцентных планшетах. Затем планшеты инкубировали в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. На следующий день все протестированные анти-CD40-антитела серийно разводили в буфере для анализа (RPMI1640 + 1% FBS), и 75 мл этого препарата добавляли к клеткам. После 5-часовой инкубации при 37°C 5% CO<sub>2</sub> в лунки добавляли 75 мкл раствора Bio-Glo и сигналы с планшетов измеряли в считывающем устройстве для микропланшетов. Люминесценцию измеряли при следующих настройках: лента считывающего устройства - конечная точка. Результаты на фигуре 32 показывают, что анти-CD40-антитела демонстрируют разные уровни CD40-зависимой активности люциферазы. В этом анализе 3h56 IgG1 LALA, рассматриваемое антагонистическое антитело против CD40, не активирует CD40-сигналы, как и ожидалось. Однако комбинация его связывающих единиц с частями, полученными либо из селикрелумаба (Selicrelumab\_3h56), либо из ADC-1013 (ADC-1013\_3h56), приводит к увеличению активности по сравнению с селикрелумабом или ADC-1013 по отдельности, соответственно.

Взятые в совокупности, результаты на фигурах 31 и 32 показывают, что, как это наблюдается и с OX40, подход нацеливания на CD40 с использованием

четырехвалентного бипитопного антитела способствует усилению агонистической активности по сравнению с соответствующими моноспецифическими аналогами.

# ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Glenmark Pharmaceuticals S.A.

<120> НОВЫЕ АГОНИСТЫ TNFR И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

<130> GBR8383

<160> 174

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 186

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Leu His Cys Val Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His  
1 5 10 15

Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln  
20 25 30

Asn Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val  
35 40 45

Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly  
50 55 60

Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg  
65 70 75 80

Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp  
85 90 95

Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala  
100 105 110

Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln  
115 120 125

Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro  
130 135 140

Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr  
145 150 155 160

Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr  
165 170 175

Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg Ala

180

185

<210> 2  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Mouse 7H11 VH

<400> 2

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

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

Tyr Ile His Trp Met Asn Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

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

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

Met Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys  
 85 90 95

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
 100 105 110

Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 3  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Mouse 7H11 VL

<400> 3

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

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

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

35

40

45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn  
85 90 95

Asp His Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
100 105 110

Lys

<210> 4

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IGHV1-3\*01

<400> 4

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 5

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IGHV1-2\*02

<400> 5

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 6

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IGHV1-46\*01

<400> 6

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
65 70 75 80



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

Ala Arg

<210> 7  
<211> 98  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> IGHV1-8\*01

<400> 7

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 8  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> IGKV4-1\*01

<400> 8

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

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

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

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

Tyr Tyr Ser Thr Pro  
100

<210> 9  
<211> 96  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> IGKV3D-7\*01

<400> 9

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

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

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Leu Pro  
85 90 95

<210> 10  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> IGKV3D-15\*01

<400> 10

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro  
85 90 95

<210> 11  
<211> 96  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> IGKV3-20\*01

<400> 11

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

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

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

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

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

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

<210> 12  
<211> 446  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized 7H11-VH1

<400> 12

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
325 330 335

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

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

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
385 390 395 400

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
420 425 430

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

<210> 13  
<211> 446  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Humanized 7H11-VH2

<400> 13

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| 1   |     | 5   |     | 10  |     | 15  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Ser | Val | Lys | Val | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Arg | Tyr |  |  |
|     |     | 20  |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |  |  |
| Tyr | Met | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Met |  |  |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |  |  |
| Gly | Trp | Ile | Tyr | Pro | Gly | Asp | Gly | Ser | Thr | Asn | Tyr | Ala | Gln | Lys | Phe |  |  |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |  |
| Gln | Gly | Arg | Val | Thr | Met | Thr | Arg | Asp | Thr | Ser | Ile | Ser | Thr | Ala | Tyr |  |  |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |  |
| Met | Glu | Leu | Ser | Arg | Leu | Arg | Ser | Asp | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |  |  |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |  |
| Ala | Arg | Glu | Tyr | Gly | Asn | Tyr | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val |  |  |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |  |
| Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala |  |  |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |  |
| Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu |  |  |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |  |
| Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly |  |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |  |
| Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser |  |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |  |
| Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu |  |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |  |
| Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr |  |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |  |
| Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr |  |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |  |
| Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe |  |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |  |
| Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro |  |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |  |
| Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val |  |  |

260

265

270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 325 330 335

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

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

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 385 390 395 400

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 420 425 430

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

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 446

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humanized 7H11-VH3

&lt;400&gt; 14

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

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Met | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Met | 35  | 40  | 45  |     |
| Gly | Ile | Ile | Tyr | Pro | Gly | Asp | Gly | Ser | Thr | Ser | Tyr | Ala | Gln | Lys | Phe | 50  | 55  | 60  |     |
| Gln | Gly | Arg | Val | Thr | Met | Thr | Arg | Asp | Thr | Ser | Thr | Ser | Thr | Val | Tyr | 65  | 70  | 75  | 80  |
| Met | Glu | Leu | Ser | Ser | Leu | Arg | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | 85  | 90  | 95  |     |
| Ala | Arg | Glu | Tyr | Gly | Asn | Tyr | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | 100 | 105 | 110 |     |
| Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | 115 | 120 | 125 |     |
| Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | 130 | 135 | 140 |     |
| Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | 165 | 170 | 175 |     |
| Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | 180 | 185 | 190 |     |
| Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | 195 | 200 | 205 |     |
| Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr | 210 | 215 | 220 |     |
| Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | 245 | 250 | 255 |     |
| Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | 260 | 265 | 270 |     |
| Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | 275 | 280 | 285 |     |



Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
325 330 335

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

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

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
385 390 395 400

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
420 425 430

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

<210> 15  
<211> 446  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Humanized 7H11-VH4

<400> 15

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

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

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

|                           |                     |                     |                 |     |  |     |
|---------------------------|---------------------|---------------------|-----------------|-----|--|-----|
| 305                       |                     | 310                 |                 | 315 |  | 320 |
| Lys Val Ser Asn           | Lys Ala Leu Pro Ala | Pro Ile Glu Lys Thr | Ile Ser         |     |  |     |
|                           | 325                 | 330                 | 335             |     |  |     |
| Lys Ala Lys Gly           | Gln Pro Arg Glu     | Pro Gln Val Tyr Thr | Leu Pro Pro     |     |  |     |
|                           | 340                 | 345                 | 350             |     |  |     |
| Ser Arg Asp Glu           | Leu Thr Lys Asn     | Gln Val Ser Leu Thr | Cys Leu Val     |     |  |     |
|                           | 355                 | 360                 | 365             |     |  |     |
| Lys Gly Phe Tyr           | Pro Ser Asp Ile     | Ala Val Glu Trp     | Glu Ser Asn Gly |     |  |     |
|                           | 370                 | 375                 | 380             |     |  |     |
| Gln Pro Glu Asn           | Asn Tyr Lys Thr     | Thr Pro Pro Val     | Leu Asp Ser Asp |     |  |     |
|                           | 385                 | 390                 | 395             | 400 |  |     |
| Gly Ser Phe Phe           | Leu Tyr Ser Lys     | Leu Thr Val Asp     | Lys Ser Arg Trp |     |  |     |
|                           | 405                 | 410                 | 415             |     |  |     |
| Gln Gln Gly Asn           | Val Phe Ser Cys     | Ser Val Met His     | Glu Ala Leu His |     |  |     |
|                           | 420                 | 425                 | 430             |     |  |     |
| Asn His Tyr Thr           | Gln Lys Ser Leu     | Ser Leu Ser Pro     | Gly Lys         |     |  |     |
|                           | 435                 | 440                 | 445             |     |  |     |
| <210> 16                  |                     |                     |                 |     |  |     |
| <211> 220                 |                     |                     |                 |     |  |     |
| <212> PRT                 |                     |                     |                 |     |  |     |
| <213> Artificial Sequence |                     |                     |                 |     |  |     |
| <220>                     |                     |                     |                 |     |  |     |
| <223> Humanized 7H11-VL1  |                     |                     |                 |     |  |     |
| <400> 16                  |                     |                     |                 |     |  |     |
| Asp Ile Val Met           | Thr Gln Ser Pro     | Asp Ser Leu Ala     | Val Ser Leu Gly |     |  |     |
| 1                         | 5                   | 10                  | 15              |     |  |     |
| Glu Arg Ala Thr           | Ile Asn Cys Lys     | Ser Ser Gln Ser     | Leu Leu Asn Ser |     |  |     |
|                           | 20                  | 25                  | 30              |     |  |     |
| Gly Asn Gln Lys           | Asn Tyr Leu Ala     | Trp Tyr Gln Gln     | Lys Pro Gly Gln |     |  |     |
|                           | 35                  | 40                  | 45              |     |  |     |
| Pro Pro Lys Leu           | Leu Ile Tyr Gly     | Ala Ser Thr Arg     | Glu Ser Gly Val |     |  |     |
|                           | 50                  | 55                  | 60              |     |  |     |
| Pro Asp Arg Phe           | Ser Gly Ser Gly     | Ser Gly Thr Asp     | Phe Thr Leu Thr |     |  |     |
|                           | 65                  | 70                  | 75              | 80  |  |     |

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn  
85 90 95

Asp His Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
130 135 140

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

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr  
180 185 190

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215 220

<210> 17  
<211> 220  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Humanized 7H11-VL2

<400> 17

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

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

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
35 40 45

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile  
50 55 60

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

|                           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 65                        |     | 70  |     | 75  |     | 80  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ile                       | Ser | Ser | Leu | Gln | Pro | Glu | Asp | Phe | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Gln | Asn |
|                           |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Asp                       | His | Ser | Tyr | Pro | Tyr | Thr | Phe | Gly | Gln | Gly | Thr | Lys | Leu | Glu | Ile |
|                           |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Lys                       | Arg | Thr | Val | Ala | Ala | Pro | Ser | Val | Phe | Ile | Phe | Pro | Pro | Ser | Asp |
|                           |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Glu                       | Gln | Leu | Lys | Ser | Gly | Thr | Ala | Ser | Val | Val | Cys | Leu | Leu | Asn | Asn |
|                           | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Phe                       | Tyr | Pro | Arg | Glu | Ala | Lys | Val | Gln | Trp | Lys | Val | Asp | Asn | Ala | Leu |
| 145                       |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Gln                       | Ser | Gly | Asn | Ser | Gln | Glu | Ser | Val | Thr | Glu | Gln | Asp | Ser | Lys | Asp |
|                           |     |     | 165 |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Ser                       | Thr | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Thr | Leu | Thr | Leu | Ser | Lys | Ala | Asp | Tyr |
|                           |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Glu                       | Lys | His | Lys | Val | Tyr | Ala | Cys | Glu | Val | Thr | His | Gln | Gly | Leu | Ser |
|                           |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Ser                       | Pro | Val | Thr | Lys | Ser | Phe | Asn | Arg | Gly | Glu | Cys |     |     |     |     |
|                           | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| <210> 18                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <211> 220                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <212> PRT                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <213> Artificial Sequence |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <220>                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <223> Humanized 7H11-VL3  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <400> 18                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Glu                       | Ile | Val | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Ala | Thr | Leu | Ser | Val | Ser | Pro | Gly |
| 1                         |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Glu                       | Arg | Ala | Thr | Leu | Ser | Cys | Arg | Ala | Ser | Gln | Ser | Leu | Leu | Asn | Ser |
|                           |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Gly                       | Asn | Gln | Lys | Asn | Tyr | Leu | Ala | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln |
|                           | 35  |     |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Ala                       | Pro | Arg | Leu | Leu | Ile | Tyr | Gly | Ala | Ser | Thr | Arg | Ala | Thr | Gly | Ile |
|                           | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |

Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn  
85 90 95

Asp His Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
130 135 140

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

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr  
180 185 190

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215 220

<210> 19  
<211> 220  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Humanized 7H11-VL4

<400> 19

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

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

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

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

50

55

60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn  
85 90 95

Asp His Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
130 135 140

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

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr  
180 185 190

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215 220

<210> 20

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized 7H11-VH2 V37M

<400> 20

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
290 295 300



Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
325 330 335

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

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

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
385 390 395 400

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
420 425 430

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

<210> 21  
<211> 446  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Humanized 7H11-VH2 N58K

<400> 21

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |
| Met | Glu | Leu | Ser | Arg | Leu | Arg | Ser | Asp | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Ala | Arg | Glu | Tyr | Gly | Asn | Tyr | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser |

|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                         |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------------------|--|--|--|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|-----|--|--|--|--|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| 325   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 330                     |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 335 |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Lys   | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro |                         |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |     |     | 340 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                         |  |  |  | 345 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  | 350 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Ser   | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val |                         |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |     |     | 355 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                         |  |  |  | 360 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  | 365 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Lys   | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly |                         |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |     |     | 370 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                         |  |  |  | 375 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  | 380 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Gln   | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp |                         |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |     |     | 385 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                         |  |  |  | 390 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  | 395 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Gly   | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp |                         |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |     |     | 405 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                         |  |  |  | 410 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  | 415 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Gln   | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | His |                         |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |     |     | 420 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                         |  |  |  | 425 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  | 430 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Asn   | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly | Lys |     |     |                         |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |     |     | 435 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                         |  |  |  | 440 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  | 445 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <210> |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 22                      |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <211> |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 446                     |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <212> |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | PRT                     |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <213> |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | Artificial Sequence     |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <220> |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                         |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <223> |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | Humanized 7H11-VH2 A60N |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <400> |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 22                      |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Gln   | Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Val | Lys | Lys | Pro | Gly | Ala |                         |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |     |     | 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     | 15  |                         |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Ser   | Val | Lys | Val | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Arg | Tyr |                         |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |     |     | 20  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                         |  |  |  | 25  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  | 30  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Tyr   | Met | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Met |                         |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |     |     | 35  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                         |  |  |  | 40  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  | 45  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Gly   | Trp | Ile | Tyr | Pro | Gly | Asp | Gly | Ser | Thr | Asn | Tyr | Asn | Gln | Lys | Phe |                         |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |     |     | 50  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                         |  |  |  | 55  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  | 60  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Gln   | Gly | Arg | Val | Thr | Met | Thr | Arg | Asp | Thr | Ser | Ile | Ser | Thr | Ala | Tyr |                         |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |     |     | 65  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                         |  |  |  | 70  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  | 75  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Met   | Glu | Leu | Ser | Arg | Leu | Arg | Ser | Asp | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |                         |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |     |     | 85  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                         |  |  |  | 90  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  | 95  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
325 330 335

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

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

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
385 390 395 400

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
420 425 430

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

<210> 23

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized 7H11-VH2 Q61E

<400> 23

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Glu Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

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

|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|            | 115        |            |            |            |            | 120        |            |            |            |            | 125        |            |            |            |            |
| Pro        | Ser<br>130 | Ser        | Lys        | Ser        | Thr        | Ser<br>135 | Gly        | Gly        | Thr        | Ala        | Ala<br>140 | Leu        | Gly        | Cys        | Leu        |
| Val<br>145 | Lys        | Asp        | Tyr        | Phe        | Pro<br>150 | Glu        | Pro        | Val        | Thr        | Val<br>155 | Ser        | Trp        | Asn        | Ser        | Gly<br>160 |
| Ala        | Leu        | Thr        | Ser        | Gly<br>165 | Val        | His        | Thr        | Phe        | Pro<br>170 | Ala        | Val        | Leu        | Gln        | Ser<br>175 | Ser        |
| Gly        | Leu        | Tyr        | Ser<br>180 | Leu        | Ser        | Ser        | Val        | Val<br>185 | Thr        | Val        | Pro        | Ser        | Ser<br>190 | Ser        | Leu        |
| Gly        | Thr        | Gln<br>195 | Thr        | Tyr        | Ile        | Cys        | Asn<br>200 | Val        | Asn        | His        | Lys        | Pro<br>205 | Ser        | Asn        | Thr        |
| Lys        | Val<br>210 | Asp        | Lys        | Lys        | Val        | Glu<br>215 | Pro        | Lys        | Ser        | Cys        | Asp<br>220 | Lys        | Thr        | His        | Thr        |
| Cys<br>225 | Pro        | Pro        | Cys        | Pro        | Ala<br>230 | Pro        | Glu        | Leu        | Leu        | Gly<br>235 | Gly        | Pro        | Ser        | Val        | Phe<br>240 |
| Leu        | Phe        | Pro        | Pro        | Lys<br>245 | Pro        | Lys        | Asp        | Thr        | Leu<br>250 | Met        | Ile        | Ser        | Arg        | Thr<br>255 | Pro        |
| Glu        | Val        | Thr        | Cys<br>260 | Val        | Val        | Val        | Asp        | Val<br>265 | Ser        | His        | Glu        | Asp        | Pro<br>270 | Glu        | Val        |
| Lys        | Phe        | Asn<br>275 | Trp        | Tyr        | Val        | Asp        | Gly<br>280 | Val        | Glu        | Val        | His        | Asn<br>285 | Ala        | Lys        | Thr        |
| Lys        | Pro<br>290 | Arg        | Glu        | Glu        | Gln        | Tyr<br>295 | Asn        | Ser        | Thr        | Tyr        | Arg<br>300 | Val        | Val        | Ser        | Val        |
| Leu<br>305 | Thr        | Val        | Leu        | His        | Gln<br>310 | Asp        | Trp        | Leu        | Asn        | Gly<br>315 | Lys        | Glu        | Tyr        | Lys        | Cys<br>320 |
| Lys        | Val        | Ser        | Asn<br>325 | Lys        | Ala        | Leu        | Pro        | Ala        | Pro<br>330 | Ile        | Glu        | Lys        | Thr        | Ile<br>335 | Ser        |
| Lys        | Ala        | Lys        | Gly<br>340 | Gln        | Pro        | Arg        | Glu        | Pro<br>345 | Gln        | Val        | Tyr        | Thr        | Leu<br>350 | Pro        | Pro        |
| Ser        | Arg        | Asp<br>355 | Glu        | Leu        | Thr        | Lys        | Asn<br>360 | Gln        | Val        | Ser        | Leu        | Thr<br>365 | Cys        | Leu        | Val        |
| Lys        | Gly        | Phe        | Tyr        | Pro        | Ser        | Asp        | Ile        | Ala        | Val        | Glu        | Trp        | Glu        | Ser        | Asn        | Gly        |

370

375

380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 385 390 395 400

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 420 425 430

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

<210> 24

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized 7H11-VH2 D85E

<400> 24

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
325 330 335

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

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

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
385 390 395 400



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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
420 425 430

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

<210> 25  
<211> 446  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Humanized 7H11-VH2 V89I

<400> 25

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
145 150 155 160

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

165

170

175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
325 330 335

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

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

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
385 390 395 400

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420

425

430

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

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 446

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humanized 7H11-VH2 Y91F

&lt;400&gt; 26

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
 165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
 180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
325 330 335

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

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

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
385 390 395 400

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
420 425 430

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

<210> 27  
<211> 446  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Humanized 7H11-VH2 N58K-D54E

<400> 27

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Glu Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
195 200 205

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

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

<210> 28  
 <211> 446  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized 7H11-VH2 N58K-D54S

<400> 28

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
325 330 335

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

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

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
385 390 395 400

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
420 425 430

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

<210> 29

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized 7H11-VH2 N58K-D54T

<400> 29

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



|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| 1   |     | 5   |     | 10  |     | 15  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Ser | Val | Lys | Val | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Arg | Tyr |  |  |
|     |     | 20  |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |  |  |
| Tyr | Met | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Met |  |  |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |  |  |
| Gly | Trp | Ile | Tyr | Pro | Gly | Thr | Gly | Ser | Thr | Lys | Tyr | Ala | Gln | Lys | Phe |  |  |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |  |
| Gln | Gly | Arg | Val | Thr | Met | Thr | Arg | Asp | Thr | Ser | Ile | Ser | Thr | Ala | Tyr |  |  |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |  |
| Met | Glu | Leu | Ser | Arg | Leu | Arg | Ser | Asp | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |  |  |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |  |
| Ala | Arg | Glu | Tyr | Gly | Asn | Tyr | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val |  |  |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |  |
| Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala |  |  |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |  |
| Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu |  |  |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |  |
| Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly |  |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |  |
| Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser |  |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |  |
| Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu |  |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |  |
| Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr |  |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |  |
| Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr |  |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |  |
| Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe |  |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |  |
| Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro |  |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |  |
| Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val |  |  |

260

265

270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 325 330 335

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

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

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 385 390 395 400

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 420 425 430

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

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 446

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humanized 7H11-VH2 N58K-G55A

&lt;400&gt; 30

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

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Met | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Met | 35  | 40  | 45  |     |
| Gly | Trp | Ile | Tyr | Pro | Gly | Asp | Ala | Ser | Thr | Lys | Tyr | Ala | Gln | Lys | Phe | 50  | 55  | 60  |     |
| Gln | Gly | Arg | Val | Thr | Met | Thr | Arg | Asp | Thr | Ser | Ile | Ser | Thr | Ala | Tyr | 65  | 70  | 75  | 80  |
| Met | Glu | Leu | Ser | Arg | Leu | Arg | Ser | Asp | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | 85  | 90  | 95  |     |
| Ala | Arg | Glu | Tyr | Gly | Asn | Tyr | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | 100 | 105 | 110 |     |
| Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | 115 | 120 | 125 |     |
| Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | 130 | 135 | 140 |     |
| Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | 165 | 170 | 175 |     |
| Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | 180 | 185 | 190 |     |
| Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | 195 | 200 | 205 |     |
| Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr | 210 | 215 | 220 |     |
| Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | 245 | 250 | 255 |     |
| Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | 260 | 265 | 270 |     |
| Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | 275 | 280 | 285 |     |

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
325 330 335

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

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

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
385 390 395 400

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
420 425 430

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

<210> 31  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Mouse 2H6 VH

<400> 31

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
20 25 30

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

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Pro Ser Leu

50

55

60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Pro Tyr Asn Tyr Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 32  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Mouse 2H6 VL

<400> 32

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
 20 25 30

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Lys Ser Gly Val Pro Ala  
 50 55 60

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

Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys  
 85 90 95

Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 33  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> IGHV3-23\*01

<400> 33

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Lys

<210> 34

<211> 95

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IGKV1-16\*01

<400> 34

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

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

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro  
85 90 95

<210> 35  
<211> 475  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Mouse 2H6 scFv-Fc

<400> 35

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
20 25 30

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

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Pro Ser Leu  
50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe  
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Pro Tyr Asn Tyr Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
100 105 110

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

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

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

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

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Lys Ser  
180 185 190

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser  
195 200 205

Leu Asn Ile His Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys

|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 210        |            |            |            | 215        |            |            |            | 220        |            |            |            |            |            |            |            |
| Gln<br>225 | Gln        | Ser        | Lys        | Glu        | Val<br>230 | Pro        | Leu        | Thr        | Phe        | Gly<br>235 | Ala        | Gly        | Thr        | Lys        | Leu<br>240 |
| Glu        | Ile        | Lys        | Gly        | Gly<br>245 | Gly        | Gly        | Thr        | Asp        | Lys<br>250 | Thr        | His        | Thr        | Cys        | Pro<br>255 | Pro        |
| Cys        | Pro        | Ala        | Pro<br>260 | Glu        | Leu        | Leu        | Gly        | Gly<br>265 | Pro        | Ser        | Val        | Phe        | Leu<br>270 | Phe        | Pro        |
| Pro        | Lys        | Pro<br>275 | Lys        | Asp        | Thr        | Leu        | Met<br>280 | Ile        | Ser        | Arg        | Thr        | Pro<br>285 | Glu        | Val        | Thr        |
| Cys        | Val<br>290 | Val        | Val        | Asp        | Val        | Ser<br>295 | His        | Glu        | Asp        | Pro        | Glu<br>300 | Val        | Lys        | Phe        | Asn        |
| Trp<br>305 | Tyr        | Val        | Asp        | Gly<br>310 | Val        | Glu        | Val        | His        | Asn        | Ala<br>315 | Lys        | Thr        | Lys        | Pro        | Arg<br>320 |
| Glu        | Glu        | Gln        | Tyr        | Asn<br>325 | Ser        | Thr        | Tyr        | Arg        | Val<br>330 | Val        | Ser        | Val        | Leu        | Thr<br>335 | Val        |
| Leu        | His        | Gln        | Asp<br>340 | Trp        | Leu        | Asn        | Gly        | Lys<br>345 | Glu        | Tyr        | Lys        | Cys        | Lys<br>350 | Val        | Ser        |
| Asn        | Lys        | Ala<br>355 | Leu        | Pro        | Ala        | Pro        | Ile<br>360 | Glu        | Lys        | Thr        | Ile        | Ser<br>365 | Lys        | Ala        | Lys        |
| Gly<br>370 | Gln        | Pro        | Arg        | Glu        | Pro        | Gln<br>375 | Val        | Tyr        | Thr        | Leu        | Pro<br>380 | Pro        | Ser        | Arg        | Asp        |
| Glu<br>385 | Leu        | Thr        | Lys        | Asn<br>390 | Gln        | Val        | Ser        | Leu        | Thr        | Cys<br>395 | Leu        | Val        | Lys        | Gly        | Phe<br>400 |
| Tyr        | Pro        | Ser        | Asp        | Ile<br>405 | Ala        | Val        | Glu        | Trp        | Glu<br>410 | Ser        | Asn        | Gly        | Gln        | Pro<br>415 | Glu        |
| Asn        | Asn        | Tyr        | Lys<br>420 | Thr        | Thr        | Pro        | Pro        | Val<br>425 | Leu        | Asp        | Ser        | Asp        | Gly<br>430 | Ser        | Phe        |
| Phe        | Leu        | Tyr<br>435 | Ser        | Lys        | Leu        | Thr        | Val<br>440 | Asp        | Lys        | Ser        | Arg        | Trp<br>445 | Gln        | Gln        | Gly        |
| Asn        | Val<br>450 | Phe        | Ser        | Cys        | Ser        | Val<br>455 | Met        | His        | Glu        | Ala        | Leu<br>460 | His        | Asn        | His        | Tyr        |
| Thr        | Gln        | Lys        | Ser        | Leu        | Ser        | Leu        | Ser        | Pro        | Gly        | Lys        |            |            |            |            |            |



465

470

475

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 475

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 2H6 scFv1-Fc

&lt;400&gt; 36

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

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

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

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Pro Tyr Asn Tyr Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met  
 100 105 110

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

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

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

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

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Lys Ser  
 180 185 190

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

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys  
210 215 220

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val  
225 230 235 240

Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro  
245 250 255

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro  
260 265 270

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn  
290 295 300

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
305 310 315 320

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
325 330 335

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
340 345 350

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
355 360 365

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp  
370 375 380

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
385 390 395 400

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
405 410 415

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
420 425 430

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
435 440 445

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
450 455 460

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
465 470 475

<210> 37  
<211> 475  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 2H6 scFv2-Fc

<400> 37

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

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

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

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Pro Ser Leu  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Pro Tyr Asn Tyr Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
100 105 110

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

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

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

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

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Lys Ser  
180 185 190

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

195

200

205

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys  
 210 215 220

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val  
 225 230 235 240

Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro  
 245 250 255

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro  
 260 265 270

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn  
 290 295 300

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
 305 310 315 320

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
 325 330 335

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
 340 345 350

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
 355 360 365

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp  
 370 375 380

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
 385 390 395 400

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 405 410 415

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
 420 425 430

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
 435 440 445

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

450

455

460

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470 475

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 693

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Tetra-1 HC

&lt;400&gt; 38

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
 165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
 180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe  
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
325 330 335

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

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

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
385 390 395 400

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
420 425 430

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

Gly Thr Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro  
450 455 460

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr  
465 470 475 480

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
485 490 495

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Pro  
500 505 510

Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr  
515 520 525

Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
530 535 540

Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Tyr Asn Tyr Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
545 550 555 560

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
565 570 575

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
580 585 590

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser  
595 600 605

Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln  
610 615 620

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln  
625 630 635 640

Lys Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
645 650 655

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
660 665 670

Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr  
675 680 685

Lys Val Glu Ile Lys  
690

<210> 39  
<211> 693  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Tetra-6 HC

<400> 39

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Glu Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
195 200 205

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



|         |     |         |         |         |
|---------|-----|---------|---------|---------|
| 210     |     | 215     |         | 220     |
| Cys 225 | Pro | Pro     | Cys     | Pro     |
|         |     | Ala 230 | Pro     | Glu     |
|         |     |         | Ala     | Ala     |
|         |     |         | Gly 235 | Gly     |
|         |     |         | Pro     | Ser     |
|         |     |         | Val     | Phe 240 |
| Leu     | Phe | Pro     | Pro     | Lys 245 |
|         |     |         | Lys     | Asp     |
|         |     |         | Thr     | Leu 250 |
|         |     |         | Met     | Ile     |
|         |     |         | Ser     | Arg     |
|         |     |         | Thr     | Pro 255 |
| Glu     | Val | Thr     | Cys 260 | Val     |
|         |     |         | Val     | Val     |
|         |     |         | Val     | Asp     |
|         |     |         | Val     | Ser 265 |
|         |     |         | His     | Glu     |
|         |     |         | Asp     | Pro 270 |
|         |     |         | Glu     | Val     |
| Lys     | Phe | Asn 275 | Trp     | Tyr     |
|         |     |         | Val     | Asp     |
|         |     |         | Gly 280 | Val     |
|         |     |         | Glu     | Val     |
|         |     |         | His     | Asn 285 |
|         |     |         | Ala     | Lys     |
|         |     |         | Thr     |         |
| Lys     | Pro | Arg     | Glu     | Glu     |
|         | 290 |         | Gln     | Tyr     |
|         |     |         | Asn 295 | Ser     |
|         |     |         | Thr     | Tyr     |
|         |     |         | Arg     | Val 300 |
|         |     |         | Val     | Ser     |
|         |     |         | Val     |         |
| Leu 305 | Thr | Val     | Leu     | His     |
|         |     |         | Gln     | Asp     |
|         |     |         | Trp     | Leu     |
|         |     |         | Asn     | Gly 315 |
|         |     |         | Lys     | Glu     |
|         |     |         | Tyr     | Lys     |
|         |     |         | Cys     | 320     |
| Lys     | Val | Ser     | Asn     | Lys     |
|         |     |         | Ala 325 | Leu     |
|         |     |         | Pro     | Ala     |
|         |     |         | Pro     | Ile     |
|         |     |         | Glu     | Lys     |
|         |     |         | Thr     | Ile     |
|         |     |         | Ser     | 335     |
| Lys     | Ala | Lys     | Gly     | Gln     |
|         |     |         | Pro     | Arg     |
|         |     |         | Glu     | Pro     |
|         |     |         | Gln     | Val     |
|         |     |         | Tyr     | Thr     |
|         |     |         | Leu     | Pro     |
|         |     |         | Pro     | 340     |
| Ser     | Arg | Asp     | Glu     | Leu     |
|         |     | 355     | Thr     | Lys     |
|         |     |         | Asn     | Gln     |
|         |     |         | Val     | Ser     |
|         |     |         | Leu     | Thr     |
|         |     |         | Cys     | Leu     |
|         |     |         | Val     | 365     |
| Lys     | Gly | Phe     | Tyr     | Pro     |
|         | 370 |         | Ser     | Asp     |
|         |     |         | Ile     | Ala     |
|         |     |         | Val     | Glu     |
|         |     |         | Trp     | Glu     |
|         |     |         | Ser     | Asn     |
|         |     |         | Gly     | 380     |
| Gln     | Pro | Glu     | Asn     | Asn     |
|         |     |         | Tyr     | Lys     |
|         |     |         | Thr     | Thr     |
|         |     |         | Pro     | Pro     |
|         |     |         | Val     | Leu     |
|         |     |         | Asp     | Ser     |
|         |     |         | Asp     | 400     |
| Gly     | Ser | Phe     | Phe     | Leu     |
|         |     |         | Tyr     | Ser     |
|         |     |         | Lys     | Leu     |
|         |     |         | Thr     | Val     |
|         |     |         | Asp     | Lys     |
|         |     |         | Ser     | Arg     |
|         |     |         | Trp     | 415     |
| Gln     | Gln | Gly     | Asn     | Val     |
|         |     |         | Phe     | Ser     |
|         |     |         | Cys     | Ser     |
|         |     |         | Val     | Met     |
|         |     |         | His     | Glu     |
|         |     |         | Ala     | Leu     |
|         |     |         | His     | 420     |
| Asn     | His | Tyr     | Thr     | Gln     |
|         |     | 435     | Lys     | Ser     |
|         |     |         | Leu     | Ser     |
|         |     |         | Leu     | Ser     |
|         |     |         | Pro     | Gly     |
|         |     |         | Gly     | Gly     |
|         |     |         | Gly     | Gly     |
|         |     |         | Leu     | Val     |
|         |     |         | Gln     | Pro     |
|         |     |         | 450     | 460     |
| Gly     | Thr | Glu     | Val     | Gln     |
|         |     |         | Leu     | Val     |
|         |     |         | Glu     | Ser     |
|         |     |         | Gly     | Gly     |
|         |     |         | Gly     | Gly     |
|         |     |         | Leu     | Val     |
|         |     |         | Gln     | Pro     |
|         |     |         | 455     | 460     |
| Gly     | Gly | Ser     | Leu     | Arg     |
|         |     |         | Leu     | Ser     |
|         |     |         | Cys     | Ala     |
|         |     |         | Val     | Ser     |
|         |     |         | Gly     | Tyr     |
|         |     |         | Ser     | Ile     |
|         |     |         | Thr     |         |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 465 |     | 470 |     | 475 |     | 480 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser | Asp | Tyr | Ala | Trp | Asn | Trp | Ile | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |
| Glu | Trp | Met | Gly | Tyr | Ile | Ser | Tyr | Ser | Gly | Ser | Thr | Ala | Tyr | Asn | Pro |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |
| Ser | Leu | Lys | Ser | Arg | Ile | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Thr | Ser | Lys | Asn | Thr |
|     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |
| Phe | Tyr | Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu | Arg | Ala | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr |
|     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |
| Tyr | Cys | Ala | Arg | Gly | Pro | Tyr | Asn | Tyr | Leu | Ala | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |
| Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |
| Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Asp | Ile | Gln | Leu | Thr | Gln | Ser | Pro | Ser | Ser |
|     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |
| Leu | Ser | Ala | Ser | Val | Gly | Asp | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Cys | Arg | Ala | Ser |
|     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |
| Glu | Ser | Val | Asp | Asn | Tyr | Gly | Ile | Ser | Phe | Met | Asn | Trp | Phe | Gln | Gln |
|     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |
| Lys | Pro | Gly | Lys | Ala | Pro | Lys | Leu | Leu | Ile | Tyr | Ala | Ala | Ser | Asn | Gln |
| 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |
| Lys | Ser | Gly | Val | Pro | Ser | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |
| Phe | Thr | Leu | Thr | Ile | Ser | Ser | Leu | Gln | Pro | Glu | Asp | Phe | Ala | Thr | Tyr |
|     |     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |
| Phe | Cys | Gln | Gln | Ser | Lys | Glu | Val | Pro | Leu | Thr | Phe | Gly | Gln | Gly | Thr |
|     |     | 675 |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     | 685 |     |     |     |
| Lys | Val | Glu | Ile | Leu |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     | 690 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 40  
 <211> 693  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Tetra-2 HC

<400> 40

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
225 230 235 240

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val |  |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro |  |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val |  |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly |  |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp |  |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp |  |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | His |  |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly | Gly | Gly | Gly |  |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Gly | Thr | Glu | Val | Gln | Leu | Val | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro |  |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Gly | Gly | Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Ala | Val | Ser | Gly | Tyr | Ser | Ile | Thr |  |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Ser | Asp | Tyr | Ala | Trp | Asn | Trp | Ile | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu |  |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |  |

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Pro  
500 505 510

Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr  
515 520 525

Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
530 535 540

Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Tyr Asn Tyr Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
545 550 555 560

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
565 570 575

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
580 585 590

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser  
595 600 605

Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln  
610 615 620

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln  
625 630 635 640

Lys Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
645 650 655

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
660 665 670

Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr  
675 680 685

Lys Val Glu Ile Lys  
690

<210> 41  
<211> 695  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Tetra-3 HC

<400> 41

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

|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |  |  |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--|--|
| 1          | 5          |            |            |            |            |            |            | 10         |            |            |            |            | 15         |            |            |  |  |
| Ser        | Leu        | Arg        | Leu<br>20  | Ser        | Cys        | Ala        | Val        | Ser<br>25  | Gly        | Tyr        | Ser        | Ile        | Thr<br>30  | Ser        | Asp        |  |  |
| Tyr        | Ala        | Trp<br>35  | Asn        | Trp        | Ile        | Arg        | Gln<br>40  | Ala        | Pro        | Gly        | Lys        | Gly<br>45  | Leu        | Glu        | Trp        |  |  |
| Met        | Gly<br>50  | Tyr        | Ile        | Ser        | Tyr        | Ser<br>55  | Gly        | Ser        | Thr        | Ala        | Tyr<br>60  | Asn        | Pro        | Ser        | Leu        |  |  |
| Lys<br>65  | Ser        | Arg        | Ile        | Thr        | Ile<br>70  | Ser        | Arg        | Asp        | Thr        | Ser<br>75  | Lys        | Asn        | Thr        | Phe        | Tyr<br>80  |  |  |
| Leu        | Gln        | Met        | Asn<br>85  | Ser        | Leu        | Arg        | Ala        | Glu        | Asp<br>90  | Thr        | Ala        | Val        | Tyr        | Tyr<br>95  | Cys        |  |  |
| Ala        | Arg        | Gly        | Pro<br>100 | Tyr        | Asn        | Tyr        | Leu        | Ala<br>105 | Tyr        | Trp        | Gly        | Gln        | Gly<br>110 | Thr        | Met        |  |  |
| Val        | Thr        | Val<br>115 | Ser        | Ser        | Ala        | Ser        | Thr<br>120 | Lys        | Gly        | Pro        | Ser        | Val<br>125 | Phe        | Pro        | Leu        |  |  |
| Ala        | Pro<br>130 | Ser        | Ser        | Lys        | Ser        | Thr<br>135 | Ser        | Gly        | Gly        | Thr        | Ala<br>140 | Ala        | Leu        | Gly        | Cys        |  |  |
| Leu<br>145 | Val        | Lys        | Asp        | Tyr        | Phe<br>150 | Pro        | Glu        | Pro        | Val        | Thr<br>155 | Val        | Ser        | Trp        | Asn        | Ser<br>160 |  |  |
| Gly        | Ala        | Leu        | Thr        | Ser<br>165 | Gly        | Val        | His        | Thr        | Phe<br>170 | Pro        | Ala        | Val        | Leu        | Gln<br>175 | Ser        |  |  |
| Ser        | Gly        | Leu        | Tyr<br>180 | Ser        | Leu        | Ser        | Ser        | Val<br>185 | Val        | Thr        | Val        | Pro        | Ser<br>190 | Ser        | Ser        |  |  |
| Leu        | Gly        | Thr<br>195 | Gln        | Thr        | Tyr        | Ile        | Cys<br>200 | Asn        | Val        | Asn        | His        | Lys<br>205 | Pro        | Ser        | Asn        |  |  |
| Thr        | Lys<br>210 | Val        | Asp        | Lys        | Lys        | Val<br>215 | Glu        | Pro        | Lys        | Ser        | Cys<br>220 | Asp        | Lys        | Thr        | His        |  |  |
| Thr<br>225 | Cys        | Pro        | Pro        | Cys        | Pro<br>230 | Ala        | Pro        | Glu        | Ala        | Ala<br>235 | Gly        | Gly        | Pro        | Ser        | Val<br>240 |  |  |
| Phe        | Leu        | Phe        | Pro        | Pro<br>245 | Lys        | Pro        | Lys        | Asp        | Thr<br>250 | Leu        | Met        | Ile        | Ser        | Arg<br>255 | Thr        |  |  |
| Pro        | Glu        | Val        | Thr        | Cys        | Val        | Val        | Val        | Asp        | Val        | Ser        | His        | Glu        | Asp        | Pro        | Glu        |  |  |

260

265

270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 325 330 335

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

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

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

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 420 425 430

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

Gly Gly Thr Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 450 455 460

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 465 470 475 480

Thr Arg Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 485 490 495

Glu Trp Met Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala  
 500 505 510

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

515

520

525

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val  
 530 535 540

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 545 550 555 560

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 565 570 575

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser  
 580 585 590

Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser  
 595 600 605

Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr  
 610 615 620

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser  
 625 630 635 640

Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
 645 650 655

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala  
 660 665 670

Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp His Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln  
 675 680 685

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 690 695

<210> 42

<211> 694

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Tetra-4 HC

<400> 42

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

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



|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Met | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Met | 35  | 40  | 45  |     |
| Gly | Trp | Ile | Tyr | Pro | Gly | Asp | Gly | Ser | Thr | Lys | Tyr | Ala | Gln | Lys | Phe | 50  | 55  | 60  |     |
| Gln | Gly | Arg | Val | Thr | Met | Thr | Arg | Asp | Thr | Ser | Ile | Ser | Thr | Ala | Tyr | 65  | 70  | 75  | 80  |
| Met | Glu | Leu | Ser | Arg | Leu | Arg | Ser | Asp | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | 85  | 90  | 95  |     |
| Ala | Arg | Glu | Tyr | Gly | Asn | Tyr | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | 100 | 105 | 110 |     |
| Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | 115 | 120 | 125 |     |
| Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | 130 | 135 | 140 |     |
| Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | 165 | 170 | 175 |     |
| Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | 180 | 185 | 190 |     |
| Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | 195 | 200 | 205 |     |
| Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr | 210 | 215 | 220 |     |
| Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | 245 | 250 | 255 |     |
| Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | 260 | 265 | 270 |     |
| Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | 275 | 280 | 285 |     |

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
325 330 335

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

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

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
385 390 395 400

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
420 425 430

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

Gly Thr Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro  
450 455 460

Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
465 470 475 480

Arg Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu  
485 490 495

Trp Met Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln  
500 505 510

Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr  
515 520 525

Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr  
530 535 540

Tyr Cys Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
545 550 555 560

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
565 570 575

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu  
580 585 590

Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln  
595 600 605

Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln  
610 615 620

Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr  
625 630 635 640

Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
645 650 655

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val  
660 665 670

Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp His Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly  
675 680 685

Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
690

<210> 43  
<211> 694  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Tetra-5 HC

<400> 43

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

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

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

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Pro Ser Leu

50

55

60

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

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

Ala Arg Gly Pro Tyr Asn Tyr Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met  
100 105 110

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

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys  
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser  
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser  
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser  
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn  
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His  
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val  
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
290 295 300

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

|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |  |  |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--|--|
| 305        |            |            |            | 310        |            |            |            |            | 315        |            |            |            |            | 320        |            |  |  |
| Cys        | Lys        | Val        | Ser        | Asn<br>325 | Lys        | Ala        | Leu        | Pro        | Ala<br>330 | Pro        | Ile        | Glu        | Lys        | Thr<br>335 | Ile        |  |  |
| Ser        | Lys        | Ala        | Lys<br>340 | Gly        | Gln        | Pro        | Arg        | Glu<br>345 | Pro        | Gln        | Val        | Tyr        | Thr<br>350 | Leu        | Pro        |  |  |
| Pro        | Ser        | Arg<br>355 | Asp        | Glu        | Leu        | Thr        | Lys<br>360 | Asn        | Gln        | Val        | Ser        | Leu<br>365 | Thr        | Cys        | Leu        |  |  |
| Val        | Lys<br>370 | Gly        | Phe        | Tyr        | Pro        | Ser<br>375 | Asp        | Ile        | Ala        | Val        | Glu<br>380 | Trp        | Glu        | Ser        | Asn        |  |  |
| Gly<br>385 | Gln        | Pro        | Glu        | Asn        | Asn<br>390 | Tyr        | Lys        | Thr        | Thr        | Pro<br>395 | Pro        | Val        | Leu        | Asp        | Ser<br>400 |  |  |
| Asp        | Gly        | Ser        | Phe        | Phe<br>405 | Leu        | Tyr        | Ser        | Lys        | Leu<br>410 | Thr        | Val        | Asp        | Lys        | Ser<br>415 | Arg        |  |  |
| Trp        | Gln        | Gln        | Gly<br>420 | Asn        | Val        | Phe        | Ser        | Cys<br>425 | Ser        | Val        | Met        | His        | Glu<br>430 | Ala        | Leu        |  |  |
| His        | Asn<br>435 | His        | Tyr        | Thr        | Gln        | Lys<br>440 | Ser        | Leu        | Ser        | Leu        | Ser        | Pro<br>445 | Gly        | Gly        | Gly        |  |  |
| Gly        | Gly<br>450 | Thr        | Glu        | Val        | Gln        | Leu<br>455 | Val        | Glu        | Ser        | Gly        | Gly<br>460 | Gly        | Leu        | Val        | Gln        |  |  |
| Pro<br>465 | Gly        | Gly        | Ser        | Leu        | Arg<br>470 | Leu        | Ser        | Cys        | Ala        | Val<br>475 | Ser        | Gly        | Tyr        | Ser        | Ile<br>480 |  |  |
| Thr        | Ser        | Asp        | Tyr        | Ala<br>485 | Trp        | Asn        | Trp        | Ile        | Arg<br>490 | Gln        | Ala        | Pro        | Gly        | Lys<br>495 | Gly        |  |  |
| Leu        | Glu        | Trp        | Met<br>500 | Gly        | Tyr        | Ile        | Ser        | Tyr<br>505 | Ser        | Gly        | Ser        | Thr        | Ala<br>510 | Tyr        | Asn        |  |  |
| Pro        | Ser<br>515 | Leu        | Lys        | Ser        | Arg        | Ile        | Thr<br>520 | Ile        | Ser        | Arg        | Asp        | Thr<br>525 | Ser        | Lys        | Asn        |  |  |
| Thr        | Phe<br>530 | Tyr        | Leu        | Gln        | Met        | Asn<br>535 | Ser        | Leu        | Arg        | Ala        | Glu<br>540 | Asp        | Thr        | Ala        | Val        |  |  |
| Tyr<br>545 | Tyr        | Cys        | Ala        | Arg        | Gly<br>550 | Pro        | Tyr        | Asn        | Tyr        | Leu<br>555 | Ala        | Tyr        | Trp        | Gly        | Gln<br>560 |  |  |
| Gly        | Thr        | Met        | Val        | Thr        | Val        | Ser        | Ser        | Gly        | Gly        | Gly        | Gly        | Ser        | Gly        | Gly        | Gly        |  |  |

565

570

575

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser  
580 585 590

Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala  
595 600 605

Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln  
610 615 620

Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn  
625 630 635 640

Gln Lys Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
645 650 655

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr  
660 665 670

Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly  
675 680 685

Thr Lys Val Glu Ile Lys  
690

<210> 44  
<211> 693  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Tetra-7 HC

<400> 44

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

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

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

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
385 390 395 400

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
420 425 430

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

Gly Thr Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro  
450 455 460

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr  
465 470 475 480

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu  
485 490 495

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Pro  
500 505 510

Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr  
515 520 525

Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
530 535 540

Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Tyr Asn Tyr Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
545 550 555 560

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
565 570 575

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
580 585 590



Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser  
595 600 605

Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln  
610 615 620

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln  
625 630 635 640

Lys Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
645 650 655

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
660 665 670

Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr  
675 680 685

Lys Val Glu Ile Lys  
690

<210> 45  
<211> 693  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Tetra-8 HC

<400> 45

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Glu Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

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

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |
| Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |
| Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val |     |     |

355

360

365

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 385 390 395 400

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 420 425 430

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

Gly Thr Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro  
 450 455 460

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr  
 465 470 475 480

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu  
 485 490 495

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Pro  
 500 505 510

Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr  
 515 520 525

Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 530 535 540

Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Tyr Asn Tyr Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
 545 550 555 560

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 565 570 575

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
 580 585 590

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser  
 595 600 605

Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln

610

615

620

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln  
 625 630 635 640

Lys Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
 645 650 655

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
 660 665 670

Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr  
 675 680 685

Lys Val Glu Ile Leu  
 690

<210> 46  
 <211> 693  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Tetra-9 HC

<400> 46

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Glu Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe  
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
325 330 335

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

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

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
385 390 395 400

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
420 425 430

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

Gly Thr Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro  
450 455 460

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr  
465 470 475 480

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
485 490 495

Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Pro  
500 505 510

Ser Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr  
515 520 525

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
530 535 540

Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Tyr Asn Tyr Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
545 550 555 560

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
565 570 575

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
580 585 590

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser  
595 600 605

Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln  
610 615 620

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln  
625 630 635 640

Lys Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
645 650 655

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
660 665 670

Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr  
675 680 685

Lys Val Glu Ile Leu  
690

<210> 47

<211> 693

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Tetra-10 HC

<400> 47

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Glu Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 145 |     | 150 |     | 155 |     | 160 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     | 190 |     |
| Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp |



|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     |     |     | 405 |     |     |     | 410 |     |     |     | 415 |     |     |     |
| Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | His |
|     |     |     | 420 |     |     |     | 425 |     |     |     |     |     | 430 |     |     |
| Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly | Gly | Gly | Gly |
|     |     |     | 435 |     |     |     | 440 |     |     |     |     |     | 445 |     |     |
| Gly | Thr | Glu | Val | Gln | Leu | Val | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro |
|     |     |     | 450 |     |     |     | 455 |     |     |     |     |     | 460 |     |     |
| Gly | Gly | Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Ala | Val | Ser | Gly | Tyr | Ser | Ile | Thr |
|     |     |     | 465 |     |     |     | 470 |     |     |     |     |     | 475 |     |     |
| Ser | Asp | Tyr | Ala | Trp | Asn | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Cys | Leu |
|     |     |     | 485 |     |     |     | 490 |     |     |     |     |     | 495 |     |     |
| Glu | Trp | Val | Ser | Tyr | Ile | Ser | Tyr | Ser | Gly | Ser | Thr | Ala | Tyr | Asn | Pro |
|     |     |     | 500 |     |     |     | 505 |     |     |     |     |     | 510 |     |     |
| Ser | Leu | Lys | Ser | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Thr | Ser | Lys | Asn | Thr |
|     |     |     | 515 |     |     |     | 520 |     |     |     |     |     | 525 |     |     |
| Leu | Tyr | Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu | Arg | Ala | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr |
|     |     |     | 530 |     |     |     | 535 |     |     |     |     |     | 540 |     |     |
| Tyr | Cys | Ala | Arg | Gly | Pro | Tyr | Asn | Tyr | Leu | Ala | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly |
|     |     |     | 545 |     |     |     | 550 |     |     |     |     |     | 555 |     |     |
| Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly |
|     |     |     | 565 |     |     |     | 570 |     |     |     |     |     | 575 |     |     |
| Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Asp | Ile | Gln | Leu | Thr | Gln | Ser | Pro | Ser | Ser |
|     |     |     | 580 |     |     |     | 585 |     |     |     |     |     | 590 |     |     |
| Leu | Ser | Ala | Ser | Val | Gly | Asp | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Cys | Arg | Ala | Ser |
|     |     |     | 595 |     |     |     | 600 |     |     |     |     |     | 605 |     |     |
| Glu | Ser | Val | Asp | Asn | Tyr | Gly | Ile | Ser | Phe | Met | Asn | Trp | Phe | Gln | Gln |
|     |     |     | 610 |     |     |     | 615 |     |     |     |     |     | 620 |     |     |
| Lys | Pro | Gly | Lys | Ala | Pro | Lys | Leu | Leu | Ile | Tyr | Ala | Ala | Ser | Asn | Gln |
|     |     |     | 625 |     |     |     | 630 |     |     |     |     |     | 635 |     |     |
| Lys | Ser | Gly | Val | Pro | Ser | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp |
|     |     |     | 645 |     |     |     | 650 |     |     |     |     |     | 655 |     |     |
| Phe | Thr | Leu | Thr | Ile | Ser | Ser | Leu | Gln | Pro | Glu | Asp | Phe | Ala | Thr | Tyr |

660

665

670

Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr  
 675 680 685

Lys Val Glu Ile Leu  
 690

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 693

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Tetra-11 HC

&lt;400&gt; 48

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Glu Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
 165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe  
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
325 330 335

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

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

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
385 390 395 400

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
420 425 430

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

Gly Thr Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro  
450 455 460

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr  
465 470 475 480

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
485 490 495

Glu Trp Val Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Pro  
500 505 510

Ser Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr  
515 520 525

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
530 535 540

Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Tyr Asn Tyr Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
545 550 555 560

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
565 570 575

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
580 585 590

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser  
595 600 605

Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln  
610 615 620

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln  
625 630 635 640

Lys Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
645 650 655

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
660 665 670

Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr  
675 680 685

Lys Val Glu Ile Leu  
690

<210> 49  
<211> 693  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Tetra-12 HC

<400> 49

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Glu Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
180 185 190

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| 195 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr |  |  |
| 210 |     |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |  |
| Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe |  |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |  |
| Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro |  |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |  |
| Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val |  |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |  |
| Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr |  |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |  |
| Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val |  |  |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |  |
| Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys |  |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |  |  |
| Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser |  |  |
|     |     |     | 325 |     |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |  |  |
| Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro |  |  |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |  |  |
| Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val |  |  |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |  |  |
| Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly |  |  |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |  |  |
| Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp |  |  |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |  |  |
| Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp |  |  |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |  |  |
| Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | His |  |  |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |  |  |
| Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly | Gly | Gly | Gly |  |  |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |  |  |
| Gly | Thr | Glu | Val | Gln | Leu | Val | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro |  |  |

450

455

460

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr  
 465 470 475 480

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu  
 485 490 495

Glu Trp Val Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Pro  
 500 505 510

Ser Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr  
 515 520 525

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 530 535 540

Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Tyr Asn Tyr Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
 545 550 555 560

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 565 570 575

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
 580 585 590

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser  
 595 600 605

Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln  
 610 615 620

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln  
 625 630 635 640

Lys Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
 645 650 655

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
 660 665 670

Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr  
 675 680 685

Lys Val Glu Ile Leu  
 690

<210> 50

<211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer Mix VH - BACK\_1  
  
 <400> 50  
 gtgatcgcca tggcgctcgac cgakgtrmag cttcaggagt c 41  
  
 <210> 51  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer Mix VH - BACK\_2  
  
 <400> 51  
 gtgatcgcca tggcgctcgac cgagggtbcag ctbcagcagt c 41  
  
 <210> 52  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer Mix VH - BACK\_3  
  
 <400> 52  
 gtgatcgcca tggcgctcgac ccagggtgcag ctgaagsart c 41  
  
 <210> 53  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer Mix VH - BACK\_4  
  
 <400> 53  
 gtgatcgcca tggcgctcgac cgagggtccar ctgcaacart c 41  
  
 <210> 54  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer Mix VH - BACK\_5  
  
 <400> 54  
 gtgatcgcca tggcgctcgac ccagggtycag ctbcagcart c 41  
  
 <210> 55  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence



<220>  
 <223> Primer Mix VH - BACK\_6  
  
 <400> 55  
 gtgatcgcca tggcgtcgac ccaggtycar ctgcagcart c 41  
  
 <210> 56  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer Mix VH - BACK\_7  
  
 <400> 56  
 gtgatcgcca tggcgtcgac ccagggtccac gtgaagcart c 41  
  
 <210> 57  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer Mix VH - BACK\_8  
  
 <400> 57  
 gtgatcgcca tggcgtcgac cgagggtgaas stggtggart c 41  
  
 <210> 58  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer Mix VH - BACK\_9  
  
 <400> 58  
 gtgatcgcca tggcgtcgac cgavgtgawg stggtggagt c 41  
  
 <210> 59  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer Mix VH - BACK\_10  
  
 <400> 59  
 gtgatcgcca tggcgtcgac cgagggtgcag stggtggart c 41  
  
 <210> 60  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer Mix VH - BACK\_11  
  
 <400> 60

gtgatcgcca tggcgtcgac cgakgtgcam ctggtggart c 41

<210> 61

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer Mix VH - BACK\_12

<400> 61

gtgatcgcca tggcgtcgac cgaggtgaag ctgatggart c 41

<210> 62

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer Mix VH - BACK\_13

<400> 62

gtgatcgcca tggcgtcgac cgaggtgcar cttgttgart c 41

<210> 63

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer Mix VH - BACK\_14

<400> 63

gtgatcgcca tggcgtcgac cgargtraag cttctcgart c 41

<210> 64

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer Mix VH - BACK\_15

<400> 64

gtgatcgcca tggcgtcgac cgaagtgaar sttgaggart c 41

<210> 65

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer Mix VH - BACK\_16

<400> 65

gtgatcgcca tggcgtcgac ccaggttact ctraaasart c 41

<210> 66

<211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer Mix VH - BACK\_17  
  
 <400> 66  
 gtgatcgcca tggcgtcgac ccaggtccaa ctvcagcarc c 41  
  
 <210> 67  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer Mix VH - BACK\_18  
  
 <400> 67  
 gtgatcgcca tggcgtcgac cgatgtgaac ttggaasart c 41  
  
 <210> 68  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer Mix VH - BACK\_19  
  
 <400> 68  
 gtgatcgcca tggcgtcgac cgaggtgaag gtcacgcart c 41  
  
 <210> 69  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer Mix VH - FOR\_1  
  
 <400> 69  
 cctccaccac tcgagcccga ggaaacggtg accgtggt 38  
  
 <210> 70  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer Mix VH - FOR\_2  
  
 <400> 70  
 cctccaccac tcgagcccga ggagactgtg agagtgggt 38  
  
 <210> 71  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Primer Mix VH - FOR\_3  
  
 <400> 71  
 cctccaccac tcgagcccg c agagacagt accagagt 38  
  
 <210> 72  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer Mix VH - FOR\_4  
  
 <400> 72  
 cctccaccac tcgagcccg ggagacggtg actgaggt 38  
  
 <210> 73  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer Mix VL - BACK\_1  
  
 <400> 73  
 ggcggtggcg ctagcgayat ccagctgact cagcc 35  
  
 <210> 74  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer Mix VL - BACK\_2  
  
 <400> 74  
 ggcggtggcg ctagccaaat tgttctcacc cagtc 35  
  
 <210> 75  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer Mix VL - BACK\_3  
  
 <400> 75  
 ggcggtggcg ctagcgayat tgtgmtmact cagtc 35  
  
 <210> 76  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer Mix VL - BACK\_4  
  
 <400> 76

ggcgggtggcg ctagcgayat tgtgytraca cagtc 35

<210> 77  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Primer Mix VL - BACK\_5

<400> 77  
 ggcgggtggcg ctagcgayat tgtratgacm cagtc 35

<210> 78  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Primer Mix VL - BACK\_6

<400> 78  
 ggcgggtggcg ctagcgayat tmagatramc cagtc 35

<210> 79  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Primer Mix VL - BACK\_7

<400> 79  
 ggcgggtggcg ctagcgayat tcagatgayd cagtc 35

<210> 80  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Primer Mix VL - BACK\_8

<400> 80  
 ggcgggtggcg ctagcgayat ycagatgaca cagac 35

<210> 81  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Primer Mix VL - BACK\_9

<400> 81  
 ggcgggtggcg ctagcgayat tgttctcawc cagtc 35

<210> 82

<211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer Mix VL - BACK\_10  
  
 <400> 82  
 ggcggtggcg ctagcgayat tgggctsacc caatc 35  
  
 <210> 83  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer Mix VL - BACK\_11  
  
 <400> 83  
 ggcggtggcg ctagcgayat tstratgacc cartc 35  
  
 <210> 84  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer Mix VL - BACK\_12  
  
 <400> 84  
 ggcggtggcg ctagcgayrt tktgatgacc carac 35  
  
 <210> 85  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer Mix VL - BACK\_13  
  
 <400> 85  
 ggcggtggcg ctagcgayat tgtgatgacb cagkc 35  
  
 <210> 86  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer Mix VL - BACK\_14  
  
 <400> 86  
 ggcggtggcg ctagcgayat tgtgataacy cagga 35  
  
 <210> 87  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Primer Mix VL - BACK\_15  
  
 <400> 87  
 ggcggtggcg ctagcgayat tgtgatgacc cagwt 35  
  
 <210> 88  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer Mix VL - BACK\_16  
  
 <400> 88  
 ggcggtggcg ctagcgayat tgtgatgaca caacc 35  
  
 <210> 89  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer Mix VL - BACK\_17  
  
 <400> 89  
 ggcggtggcg ctagcgayat tttgctgact cagtc 35  
  
 <210> 90  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer Mix VL - BACK\_18  
  
 <400> 90  
 ggcggtggcg ctagcgaaac aactgtgacc cagtc 35  
  
 <210> 91  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer Mix VL - BACK\_19  
  
 <400> 91  
 ggcggtggcg ctagcgaaaa tgtktsacc cagtc 35  
  
 <210> 92  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer Mix VL - BACK\_20  
  
 <400> 92

ggcgggtggcg ctagccaggc tgttgtgact caggaatc 38

<210> 93  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Primer Mix VL - FOR\_1

<400> 93  
 atgctgacgc ggccgcacgt ttkatttcca gcttgg 36

<210> 94  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Primer Mix VL - FOR\_2

<400> 94  
 atgctgacgc ggccgcacgt tttatttcca actttg 36

<210> 95  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Primer Mix VL - FOR\_3

<400> 95  
 atgctgacgc ggccgcacgt ttcagctcca gcttgg 36

<210> 96  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Primer Mix VL - FOR\_4

<400> 96  
 atgctgacgc ggccgcacct aggacagtca gtttgg 36

<210> 97  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> M13-Fwd

<400> 97  
 gtaaaacgac ggccagt 17

<210> 98



<211> 16  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> M13-Rev

<400> 98  
aacagctatg accatg

16

<210> 99  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> T7

<400> 99  
taatacgact cactatagg

19

<210> 100  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> SP6

<400> 100  
gatttaggtg acactatag

19

<210> 101  
<211> 444  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 11D4 IgG2 HC

<400> 101

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

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

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
355 360 365

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

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
385 390 395 400

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

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
435 440

<210> 102  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 11D4 LC

<400> 102

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Phe Asn Arg Gly Glu Cys                                         |     |     |
| 210                                                             |     |     |

<210> 103  
 <211> 451  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 9B12 IgG1 HC

<400> 103

|                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------|
| Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln |
| 1 5 10 15                                                       |
| Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly |
| 20 25 30                                                        |
| Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile |
| 35 40 45                                                        |
| Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys |
| 50 55 60                                                        |
| Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu |
| 65 70 75 80                                                     |
| Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala |
| 85 90 95                                                        |

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
325 330 335

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

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

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
420 425 430

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

Pro Gly Lys  
450

<210> 104  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 9B12 LC

<400> 104

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp  
85 90 95

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

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Phe Asn Arg Gly Glu Cys                                         |     |     |
| 210                                                             |     |     |

<210> 105  
 <211> 452  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 106-222 IgG1 HC

<400> 105

|                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------|
| Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala |
| 1 5 10 15                                                       |
| Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr |
| 20 25 30                                                        |
| Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met |
| 35 40 45                                                        |
| Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe |
| 50 55 60                                                        |
| Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr |
| 65 70 75 80                                                     |
| Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys |
| 85 90 95                                                        |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Asn | Pro | Tyr | Tyr | Asp | Tyr | Val | Ser | Tyr | Tyr | Ala | Met | Asp | Tyr | Trp |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro |
|     |     |     | 165 |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr |
|     |     | 180 |     |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |



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

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
420 425 430

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

Ser Pro Gly Lys  
450

<210> 106  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 106-222 LC

<400> 106

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

|       |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
|-------|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
| 100   | 105                 | 110 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Pro   | Ser                 | Val | Phe | Ile | Phe | Pro | Pro | Ser | Asp | Glu | Gln | Leu | Lys | Ser | Gly |  |  |  |  |
|       |                     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |  |  |  |
| Thr   | Ala                 | Ser | Val | Val | Cys | Leu | Leu | Asn | Asn | Phe | Tyr | Pro | Arg | Glu | Ala |  |  |  |  |
|       | 130                 |     |     |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Lys   | Val                 | Gln | Trp | Lys | Val | Asp | Asn | Ala | Leu | Gln | Ser | Gly | Asn | Ser | Gln |  |  |  |  |
|       | 145                 |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |  |  |  |
| Glu   | Ser                 | Val | Thr | Glu | Gln | Asp | Ser | Lys | Asp | Ser | Thr | Tyr | Ser | Leu | Ser |  |  |  |  |
|       |                     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     | 175 |  |  |  |  |
| Ser   | Thr                 | Leu | Thr | Leu | Ser | Lys | Ala | Asp | Tyr | Glu | Lys | His | Lys | Val | Tyr |  |  |  |  |
|       |                     | 180 |     |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     | 190 |     |  |  |  |  |
| Ala   | Cys                 | Glu | Val | Thr | His | Gln | Gly | Leu | Ser | Ser | Pro | Val | Thr | Lys | Ser |  |  |  |  |
|       |                     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |  |  |  |
| Phe   | Asn                 | Arg | Gly | Glu | Cys |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
|       | 210                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <210> | 107                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <211> | 447                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <212> | PRT                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <213> | Artificial Sequence |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <220> |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <223> | 1A7 IgG1 HC         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <400> | 107                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Glu   | Val                 | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Val | Lys | Lys | Pro | Gly | Ala |  |  |  |  |
| 1     |                     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |  |  |  |  |
| Ser   | Val                 | Lys | Val | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Asp | Ser |  |  |  |  |
|       |                     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |  |  |  |  |
| Tyr   | Met                 | Ser | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Ile |  |  |  |  |
|       | 35                  |     |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |  |  |  |  |
| Gly   | Asp                 | Met | Tyr | Pro | Asp | Asn | Gly | Asp | Ser | Ser | Tyr | Asn | Gln | Lys | Phe |  |  |  |  |
|       | 50                  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Arg   | Glu                 | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Arg | Asp | Thr | Ser | Thr | Ser | Thr | Ala | Tyr |  |  |  |  |
| 65    |                     |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     |     |     | 80  |  |  |  |  |
| Leu   | Glu                 | Leu | Ser | Ser | Leu | Arg | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |  |  |  |  |
|       |                     |     |     | 85  |     |     |     | 90  |     |     |     |     |     | 95  |     |  |  |  |  |

Val Leu Ala Pro Arg Trp Tyr Phe Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
100 105 110

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

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys  
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser  
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser  
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser  
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn  
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His  
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
325 330 335

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

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

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

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
420 425 430

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

<210> 108  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 1A7 LC

<400> 108

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

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

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

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

115

120

125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 109  
 <211> 451  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> pab1949 IgG1 HC

<400> 109

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser  
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala  
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser |
| 115 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 120 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala |
| 130 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 135 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 140 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val |
| 145 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 150 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 155 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala |
| 165 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 170 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 175 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val |
| 180 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 185 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 190 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His |
| 195 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 200 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 205 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys |
| 210 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 215 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 220 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly |
| 225 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 230 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 235 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met |
| 245 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 250 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 255 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His |
| 260 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 265 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 270 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val |
| 275 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 280 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 285 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr |
| 290 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 295 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 300 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly |
| 305 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 310 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 315 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile |
| 325 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 330 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 335 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val |
| 340 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 345 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 350 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser |
| 355 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 360 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 365 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
420 425 430

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

Pro Gly Lys  
450

<210> 110  
<211> 219  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> pab1949 LC

<400> 110

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala  
85 90 95

Leu Gln Thr Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

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

115

120

125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215

<210> 111  
 <211> 468  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Tetra-hz1D10v1 HC

<400> 111

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

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

Phe Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Asn Arg Gly Leu Lys Thr Ala Tyr Ala Glu Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ser Arg Asp Val Asp Gly Asp Phe Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110



|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Lys | Pro | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Ser | Glu | Val | Gln | Leu | Leu | Glu | Ser | 115 | 120 | 125 |     |
| Gly | Gly | Gly | Glu | Val | Gln | Pro | Gly | Gly | Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Ala | 130 | 135 | 140 |     |
| Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Ser | Asp | Ala | Phe | Met | Tyr | Trp | Val | Arg | Gln | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp | Val | Ser | Ser | Ile | Ser | Asn | Arg | Gly | 165 | 170 | 175 |     |
| Leu | Lys | Thr | Ala | Tyr | Ala | Glu | Ser | Val | Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | 180 | 185 | 190 |     |
| Arg | Asp | Asn | Ala | Lys | Asn | Thr | Leu | Tyr | Leu | Gln | Met | Ser | Ser | Leu | Arg | 195 | 200 | 205 |     |
| Ala | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Ser | Arg | Asp | Val | Asp | Gly | Asp | 210 | 215 | 220 |     |
| Phe | Arg | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Lys | Pro | Gly | Gly | Gly | Gly | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Thr | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala | 245 | 250 | 255 |     |
| Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | 260 | 265 | 270 |     |
| Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | 275 | 280 | 285 |     |
| His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | 290 | 295 | 300 |     |
| Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | 305 | 310 | 315 | 320 |
| Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | 325 | 330 | 335 |     |
| Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | 340 | 345 | 350 |     |
| Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | 355 | 360 | 365 |     |

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val  
370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
450 455 460

Ser Pro Gly Lys  
465

<210> 112  
<211> 470  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Tetra-hzG3V9 HC

<400> 112

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

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

Phe Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Asn Arg Gly Leu Lys Thr Ala Tyr Ala Glu Ser Val  
50 55 60

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

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

Val Glu Gly Asp Trp Asn Leu Gly Pro Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
| 100 | 105 | 110 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Thr | Val | Lys | Pro | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Ser | Glu | Val | Gln | Leu | Leu | Glu |  |  |  |  |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |  |  |  |
| Ser | Gly | Gly | Gly | Glu | Val | Gln | Pro | Gly | Gly | Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys |  |  |  |  |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Ala | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Ser | Asp | Ala | Phe | Met | Tyr | Trp | Val | Arg |  |  |  |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |  |  |  |
| Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Glu | Arg | Glu | Trp | Val | Ser | Ser | Ile | Ser | Asn | Arg |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |  |  |  |
| Gly | Leu | Lys | Thr | Ala | Tyr | Ala | Glu | Ser | Val | Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile |  |  |  |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |  |  |  |
| Ser | Arg | Asp | Asn | Ala | Lys | Asn | Thr | Leu | Tyr | Leu | Gln | Met | Ser | Ser | Leu |  |  |  |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |  |  |  |
| Arg | Ala | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Val | Glu | Gly | Asp | Trp | Asn |  |  |  |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Leu | Gly | Pro | Arg | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Lys | Pro | Gly | Gly |  |  |  |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |  |  |  |
| Gly | Gly | Thr | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |  |  |  |
| Ala | Ala | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp |  |  |  |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |  |  |  |
| Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp |  |  |  |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |  |  |  |
| Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly |  |  |  |  |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn |  |  |  |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |  |  |  |  |
| Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |  |  |  |  |
| Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro |  |  |  |  |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |  |  |  |  |
| Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu |  |  |  |  |

355

360

365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn  
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470

<210> 113  
 <211> 594  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Hexa-hz1D10v1 HC

<400> 113

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

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

Phe Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Asn Arg Gly Leu Lys Thr Ala Tyr Ala Glu Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ser Arg Asp Val Asp Gly Asp Phe Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
100 105 110

Val Lys Pro Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser  
115 120 125

Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala  
130 135 140

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Phe Met Tyr Trp Val Arg Gln  
145 150 155 160

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Asn Arg Gly  
165 170 175

Leu Lys Thr Ala Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser  
180 185 190

Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg  
195 200 205

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Asp Val Asp Gly Asp  
210 215 220

Phe Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro Gly Gly Ser Gly  
225 230 235 240

Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro  
245 250 255

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
260 265 270

Asp Ala Phe Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
275 280 285

Trp Val Ser Ser Ile Ser Asn Arg Gly Leu Lys Thr Ala Tyr Ala Glu  
290 295 300

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr  
305 310 315 320

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
325 330 335

Tyr Cys Ser Arg Asp Val Asp Gly Asp Phe Arg Gly Gln Gly Thr Leu  
340 345 350

Val Thr Val Lys Pro Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Thr Asp  
355 360 365

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly  
370 375 380

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
405 410 415

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
420 425 430

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

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
450 455 460

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
465 470 475 480

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
485 490 495

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
500 505 510

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
515 520 525

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
530 535 540

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
545 550 555 560

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
565 570 575

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
580 585 590

Gly Lys

<210> 114  
<211> 597  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Hexa-hzG3V9 HC

<400> 114

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

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

Phe Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Asn Arg Gly Leu Lys Thr Ala Tyr Ala Glu Ser Val  
50 55 60

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

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

Val Glu Gly Asp Trp Asn Leu Gly Pro Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

Thr Val Lys Pro Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu  
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys  
130 135 140

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Phe Met Tyr Trp Val Arg  
145 150 155 160

Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Asn Arg  
165 170 175

Gly Leu Lys Thr Ala Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile  
180 185 190

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu  
195 200 205

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Glu Gly Asp Trp Asn

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
| 210 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Leu | Gly | Pro | Arg | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Lys | Pro | Gly | Gly |  |  |  |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |  |  |  |
| Ser | Gly | Gly | Ser | Glu | Val | Gln | Leu | Leu | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Glu | Val |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |  |  |  |
| Gln | Pro | Gly | Gly | Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 260 |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |  |  |  |
| Phe | Ser | Asp | Ala | Phe | Met | Tyr | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Glu |  |  |  |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |  |  |  |
| Arg | Glu | Trp | Val | Ser | Ser | Ile | Ser | Asn | Arg | Gly | Leu | Lys | Thr | Ala | Tyr |  |  |  |  |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Ala | Glu | Ser | Val | Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Ala | Lys |  |  |  |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |  |  |  |  |
| Asn | Thr | Leu | Tyr | Leu | Gln | Met | Ser | Ser | Leu | Arg | Ala | Glu | Asp | Thr | Ala |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |  |  |  |  |
| Val | Tyr | Tyr | Cys | Val | Glu | Gly | Asp | Trp | Asn | Leu | Gly | Pro | Arg | Gly | Gln |  |  |  |  |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |  |  |  |  |
| Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Lys | Pro | Gly | Gly | Gly | Gly | Thr | Gly | Gly | Gly |  |  |  |  |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |  |  |  |  |
| Gly | Thr | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Ala |  |  |  |  |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Ala | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr |  |  |  |  |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     | 395 |     |     |     |     |     | 400 |  |  |  |  |
| Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |  |  |  |  |
| Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val |  |  |  |  |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |  |  |  |  |
| Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser |  |  |  |  |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |  |  |  |  |
| Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu |  |  |  |  |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala |  |  |  |  |



465                      470                      475                      480  
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
                                  485                      490                      495  
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
                                  500                      505                      510  
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
                                  515                      520                      525  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
                                  530                      535                      540  
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
                                  545                      550                      555                      560  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
                                  565                      570                      575  
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
                                  580                      585                      590  
 Leu Ser Pro Gly Lys  
                                  595  
 <210> 115  
 <211> 447  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> 2H6 IgG1 HC  
 <400> 115  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1                      5                      10                      15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
                                  20                      25                      30  
 Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
                                  35                      40                      45  
 Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Pro Ser Leu  
                                  50                      55                      60  
 Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Phe Tyr  
 65                      70                      75                      80

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

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

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

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

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
420 425 430

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

<210> 116  
<211> 218  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 2H6 LC

<400> 116

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
20 25 30

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro  
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Lys Ser Gly Val Pro Ser  
50 55 60

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

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

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

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys                         |     |     |
| 210                                                             | 215 |     |
| <210> 117                                                       |     |     |
| <211> 447                                                       |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |
| <213> Artificial Sequence                                       |     |     |
| <220>                                                           |     |     |
| <223> 2H6 IgG1 LALA HC                                          |     |     |
| <400> 117                                                       |     |     |
| Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly |     |     |
| 1                                                               | 5   | 10  |
| Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp |     |     |
| 20                                                              | 25  | 30  |
| Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp |     |     |
| 35                                                              | 40  | 45  |
| Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Pro Ser Leu |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Phe Tyr |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Ala | Arg | Gly | Pro | Tyr | Asn | Tyr | Leu | Ala | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Met |  |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu |  |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys |  |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala | Gly | Gly | Pro | Ser | Val |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser |  |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro |  |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |  |

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

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

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
420 425 430

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

<210> 118  
<211> 475  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 2H6 scFv-Fc LALA HC

<400> 118

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

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

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

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Pro Ser Leu  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Pro Tyr Asn Tyr Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met  
100 105 110

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

115

120

125

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

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Asp | Asn | Tyr | Gly | Ile | Ser | Phe | Met | Asn | Trp | Phe | Gln | Gln | Lys | Pro |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Lys Ser  
180 185 190

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

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys  
210 215 220

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val  
225 230 235 240

Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro  
245 250 255

Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro  
260 265 270

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn  
290 295 300

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
305 310 315 320

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
325 330 335

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
340 345 350

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
355 360 365

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

370

375

380

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
 385 390 395 400

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 405 410 415

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
 420 425 430

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
 435 440 445

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
 450 455 460

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470 475

<210> 119  
 <211> 446  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 7H11\_v8 IgG1 HC

<400> 119

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Glu Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110



|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala |  |  |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |  |
| Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu |  |  |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |  |
| Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly |  |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |  |
| Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser |  |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |  |
| Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu |  |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |  |
| Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr |  |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |  |
| Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr |  |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |  |
| Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe |  |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |  |
| Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro |  |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |  |
| Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val |  |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |  |
| Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr |  |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |  |
| Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val |  |  |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |  |
| Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys |  |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |  |  |
| Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser |  |  |
|     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     |     | 335 |     |  |  |
| Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro |  |  |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |  |  |
| Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val |  |  |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |  |  |

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
385 390 395 400

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
420 425 430

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

<210> 120  
<211> 446  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 7H11 IgG1 LALA HC

<400> 120

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

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

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

130

135

140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
 165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
 180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
 260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 325 330 335

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

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

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

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

|       |     |                   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|-------|-----|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| 385   |     |                   |     | 390 |     |     |     | 395 |     |     |     | 400 |     |     |     |  |  |
| Gly   | Ser | Phe               | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp |  |  |
|       |     |                   |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |  |  |
| Gln   | Gln | Gly               | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | His |  |  |
|       |     |                   |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |  |  |
| Asn   | His | Tyr               | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly | Lys |     |     |  |  |
|       |     |                   |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |  |  |
| <210> |     | 121               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| <211> |     | 187               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| <212> |     | PRT               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| <213> |     | Rattus norvegicus |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| <400> |     | 121               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Leu   | Asn | Cys               | Val | Lys | Asp | Thr | Tyr | Pro | Ser | Gly | His | Lys | Cys | Cys | Arg |  |  |
| 1     |     |                   |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |  |  |
| Glu   | Cys | Gln               | Pro | Gly | His | Gly | Met | Val | Ser | Arg | Cys | Asp | His | Thr | Arg |  |  |
|       |     |                   |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |  |  |
| Asp   | Thr | Val               | Cys | His | Pro | Cys | Glu | Pro | Gly | Phe | Tyr | Asn | Glu | Ala | Val |  |  |
|       |     |                   |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |  |  |
| Asn   | Tyr | Asp               | Thr | Cys | Lys | Gln | Cys | Thr | Gln | Cys | Asn | His | Arg | Ser | Gly |  |  |
|       |     |                   |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |  |  |
| Ser   | Glu | Leu               | Lys | Gln | Asn | Cys | Thr | Pro | Thr | Glu | Asp | Thr | Val | Cys | Gln |  |  |
| 65    |     |                   |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |  |
| Cys   | Arg | Pro               | Gly | Thr | Gln | Pro | Arg | Gln | Asp | Ser | Ser | His | Lys | Leu | Gly |  |  |
|       |     |                   |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |  |
| Val   | Asp | Cys               | Val | Pro | Cys | Pro | Pro | Gly | His | Phe | Ser | Pro | Gly | Ser | Asn |  |  |
|       |     |                   |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |  |  |
| Gln   | Ala | Cys               | Lys | Pro | Trp | Thr | Asn | Cys | Thr | Leu | Ser | Gly | Lys | Gln | Ile |  |  |
|       |     |                   |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |  |  |
| Arg   | His | Pro               | Ala | Ser | Asn | Ser | Leu | Asp | Thr | Val | Cys | Glu | Asp | Arg | Ser |  |  |
|       |     |                   |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |  |  |
| Leu   | Leu | Ala               | Thr | Leu | Leu | Trp | Glu | Thr | Gln | Arg | Thr | Thr | Phe | Arg | Pro |  |  |
| 145   |     |                   |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |  |
| Thr   | Thr | Val               | Pro | Ser | Thr | Thr | Val | Trp | Pro | Arg | Thr | Ser | Gln | Leu | Pro |  |  |
|       |     |                   |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |  |

Ser Thr Pro Thr Leu Val Ala Pro Glu Gly Pro  
180 185

<210> 122  
<211> 186  
<212> PRT  
<213> Macaca fascicularis

<400> 122

Leu His Cys Val Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys Gln  
1 5 10 15

Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Asn Arg Ser Gln  
20 25 30

Asn Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val  
35 40 45

Ser Ala Lys Pro Cys Lys Ala Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly  
50 55 60

Ser Glu Arg Lys Gln Pro Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg  
65 70 75 80

Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp  
85 90 95

Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala  
100 105 110

Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln  
115 120 125

Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro  
130 135 140

Pro Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Thr Thr  
145 150 155 160

Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Arg Pro Ser Thr  
165 170 175

Arg Pro Val Glu Val Pro Arg Gly Pro Ala  
180 185

<210> 123  
<211> 424  
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> hsOX40 (ECD)-Fc-His

<400> 123

Leu His Cys Val Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His  
1 5 10 15

Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln  
20 25 30

Asn Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val  
35 40 45

Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly  
50 55 60

Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg  
65 70 75 80

Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp  
85 90 95

Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala  
100 105 110

Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln  
115 120 125

Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro  
130 135 140

Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr  
145 150 155 160

Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr  
165 170 175

Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg Ala Gly Ser Gly Gly Gly Thr  
180 185 190

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
195 200 205

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
210 215 220

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

|                           |                         |                     |             |     |  |     |
|---------------------------|-------------------------|---------------------|-------------|-----|--|-----|
| 225                       |                         | 230                 |             | 235 |  | 240 |
| Glu Val Lys Phe           | Asn Trp Tyr Val Asp     | Gly Val Glu Val His | Asn Ala     |     |  |     |
|                           | 245                     | 250                 | 255         |     |  |     |
| Lys Thr Lys Pro           | Arg Glu Glu Gln Tyr     | Asn Ser Thr Tyr     | Arg Val Val |     |  |     |
|                           | 260                     | 265                 | 270         |     |  |     |
| Ser Val Leu Thr           | Val Leu His Gln Asp     | Trp Leu Asn Gly     | Lys Glu Tyr |     |  |     |
|                           | 275                     | 280                 | 285         |     |  |     |
| Lys Cys Lys Val           | Ser Asn Lys Ala Leu Pro | Ala Pro Ile Glu     | Lys Thr     |     |  |     |
|                           | 290                     | 295                 | 300         |     |  |     |
| Ile Ser Lys Ala           | Lys Gly Gln Pro Arg Glu | Pro Gln Val Tyr Thr | Leu         |     |  |     |
| 305                       | 310                     | 315                 | 320         |     |  |     |
| Pro Pro Ser Arg           | Glu Glu Met Thr Lys     | Asn Gln Val Ser     | Leu Thr Cys |     |  |     |
|                           | 325                     | 330                 | 335         |     |  |     |
| Leu Val Lys Gly           | Phe Tyr Pro Ser Asp     | Ile Ala Val Glu Trp | Glu Ser     |     |  |     |
|                           | 340                     | 345                 | 350         |     |  |     |
| Asn Gly Gln Pro           | Glu Asn Asn Tyr Lys Thr | Thr Pro Pro Val     | Leu Asp     |     |  |     |
|                           | 355                     | 360                 | 365         |     |  |     |
| Ser Asp Gly Ser           | Phe Phe Leu Tyr Ser     | Lys Leu Thr Val     | Asp Lys Ser |     |  |     |
|                           | 370                     | 375                 | 380         |     |  |     |
| Arg Trp Gln Gln           | Gly Asn Val Phe Ser Cys | Ser Val Met His Glu | Ala         |     |  |     |
| 385                       | 390                     | 395                 | 400         |     |  |     |
| Leu His Asn His           | Tyr Thr Gln Lys Ser     | Leu Ser Leu Ser Pro | Gly Lys     |     |  |     |
|                           | 405                     | 410                 | 415         |     |  |     |
| Ser Ala His His           | His His His His         |                     |             |     |  |     |
|                           | 420                     |                     |             |     |  |     |
| <210> 124                 |                         |                     |             |     |  |     |
| <211> 416                 |                         |                     |             |     |  |     |
| <212> PRT                 |                         |                     |             |     |  |     |
| <213> Artificial Sequence |                         |                     |             |     |  |     |
| <220>                     |                         |                     |             |     |  |     |
| <223> cynoOX40R(ECD) -Fc  |                         |                     |             |     |  |     |
| <400> 124                 |                         |                     |             |     |  |     |
| Leu His Cys Val           | Gly Asp Thr Tyr Pro     | Ser Asn Asp Arg     | Cys Cys Gln |     |  |     |
| 1                         | 5                       | 10                  | 15          |     |  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Cys | Arg | Pro | Gly | Asn | Gly | Met | Val | Ser | Arg | Cys | Asn | Arg | Ser | Gln | 20  | 25  | 30  |     |
| Asn | Thr | Val | Cys | Arg | Pro | Cys | Gly | Pro | Gly | Phe | Tyr | Asn | Asp | Val | Val | 35  | 40  | 45  |     |
| Ser | Ala | Lys | Pro | Cys | Lys | Ala | Cys | Thr | Trp | Cys | Asn | Leu | Arg | Ser | Gly | 50  | 55  | 60  |     |
| Ser | Glu | Arg | Lys | Gln | Pro | Cys | Thr | Ala | Thr | Gln | Asp | Thr | Val | Cys | Arg | 65  | 70  | 75  | 80  |
| Cys | Arg | Ala | Gly | Thr | Gln | Pro | Leu | Asp | Ser | Tyr | Lys | Pro | Gly | Val | Asp | 85  | 90  | 95  |     |
| Cys | Ala | Pro | Cys | Pro | Pro | Gly | His | Phe | Ser | Pro | Gly | Asp | Asn | Gln | Ala | 100 | 105 | 110 |     |
| Cys | Lys | Pro | Trp | Thr | Asn | Cys | Thr | Leu | Ala | Gly | Lys | His | Thr | Leu | Gln | 115 | 120 | 125 |     |
| Pro | Ala | Ser | Asn | Ser | Ser | Asp | Ala | Ile | Cys | Glu | Asp | Arg | Asp | Pro | Pro | 130 | 135 | 140 |     |
| Pro | Thr | Gln | Pro | Gln | Glu | Thr | Gln | Gly | Pro | Pro | Ala | Arg | Pro | Thr | Thr | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Val | Gln | Pro | Thr | Glu | Ala | Trp | Pro | Arg | Thr | Ser | Gln | Arg | Pro | Ser | Thr | 165 | 170 | 175 |     |
| Arg | Pro | Val | Glu | Val | Pro | Arg | Gly | Pro | Ala | Gln | Ala | Ser | Gly | Gly | Thr | 180 | 185 | 190 |     |
| His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | 195 | 200 | 205 |     |
| Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | 210 | 215 | 220 |     |
| Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | 245 | 250 | 255 |     |
| Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | 260 | 265 | 270 |     |



Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
275 280 285

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
290 295 300

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
305 310 315 320

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
325 330 335

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
340 345 350

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
355 360 365

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
385 390 395 400

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
405 410 415

<210> 125  
<211> 421  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> rnOX40 (ECD) -Fc

<400> 125

Val Thr Val Lys Leu Asn Cys Val Lys Asp Thr Tyr Pro Ser Gly His  
1 5 10 15

Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met Val Ser Arg Cys  
20 25 30

Asp His Thr Arg Asp Thr Val Cys His Pro Cys Glu Pro Gly Phe Tyr  
35 40 45

Asn Glu Ala Val Asn Tyr Asp Thr Cys Lys Gln Cys Thr Gln Cys Asn  
50 55 60

His Arg Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Asn Cys Thr Pro Thr Glu Asp

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |
| Thr | Val | Cys | Gln | Cys | Arg | Pro | Gly | Thr | Gln | Pro | Arg | Gln | Asp | Ser | Ser |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| His | Lys | Leu | Gly | Val | Asp | Cys | Val | Pro | Cys | Pro | Pro | Gly | His | Phe | Ser |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Pro | Gly | Ser | Asn | Gln | Ala | Cys | Lys | Pro | Trp | Thr | Asn | Cys | Thr | Leu | Ser |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Gly | Lys | Gln | Ile | Arg | His | Pro | Ala | Ser | Asn | Ser | Leu | Asp | Thr | Val | Cys |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Glu | Asp | Arg | Ser | Leu | Leu | Ala | Thr | Leu | Leu | Trp | Glu | Thr | Gln | Arg | Thr |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Thr | Phe | Arg | Pro | Thr | Thr | Val | Pro | Ser | Thr | Thr | Val | Trp | Pro | Arg | Thr |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Ser | Gln | Leu | Pro | Ser | Thr | Pro | Thr | Leu | Val | Ala | Pro | Glu | Gly | Pro | Gln |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Ala | Ser | Gly | Gly | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Glu | Glu | Met | Thr | Lys | Asn | Gln |

325

330

335

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 340 345 350

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

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

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

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

Leu Ser Pro Gly Lys  
 420

<210> 126  
 <211> 415  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> chiOX40R(ECD)-HHHR-Fc

<400> 126

Leu His Cys Val Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His  
 1 5 10 15

Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln  
 20 25 30

Asn Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val  
 35 40 45

Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly  
 50 55 60

Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg  
 65 70 75 80

Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp  
 85 90 95

Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Ser Asn Gln Ala  
 100 105 110

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Cys | Lys | Pro | Trp | Thr | Asn | Cys | Thr | Leu | Ser | Gly | Lys | Gln | Ile | Arg | His |     |  |
|     |     | 115 |     |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |
| Pro | Ala | Ser | Asn | Ser | Leu | Asp | Thr | Val | Cys | Glu | Asp | Arg | Ser | Leu | Leu |     |  |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |  |
| Ala | Thr | Leu | Leu | Trp | Glu | Thr | Gln | Arg | Thr | Thr | Phe | Arg | Pro | Thr | Thr |     |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     |     | 160 |  |
| Val | Pro | Ser | Thr | Thr | Val | Trp | Pro | Arg | Thr | Ser | Gln | Leu | Pro | Ser | Thr |     |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     | 175 |     |  |
| Pro | Thr | Leu | Val | Ala | Pro | Glu | Gly | Pro | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Thr | His |     |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     | 190 |     |     |  |
| Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val |     |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |     |  |
| Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr |     |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |     |  |
| Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu |     |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |     |  |
| Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys |     |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |     |  |
| Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser |     |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     |     | 270 |     |     |  |
| Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys |     |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |     |  |
| Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile |     |  |
|     |     | 290 |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |     |  |
| Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro |     |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |     |  |
| Pro | Ser | Arg | Glu | Glu | Met | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu |     |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |     |  |
| Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn |     |  |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |     |  |
| Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser |     |  |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |     |  |

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
370 375 380

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
385 390 395 400

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
405 410 415

<210> 127  
<211> 418  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chiOX40R(ECD)-HHRH-Fc

<400> 127

Leu His Cys Val Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His  
1 5 10 15

Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln  
20 25 30

Asn Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val  
35 40 45

Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly  
50 55 60

Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg  
65 70 75 80

Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg Gln Asp Ser Ser His Lys Leu Gly  
85 90 95

Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn  
100 105 110

Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr  
115 120 125

Leu Gln Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp  
130 135 140

Pro Pro Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro  
145 150 155 160

Ile Thr Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro

[illegible]

<210> 128  
<211> 428  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chiOX40R(ECD)-HHRR-Fc

<400> 128

Leu His Cys Val Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His  
1 5 10 15

Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln  
20 25 30

Asn Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val  
35 40 45

Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly  
50 55 60

Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Gln  
65 70 75 80

Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg Gln Asp Ser Ser His Lys Leu Gly  
85 90 95

Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Ser Asn  
100 105 110

Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ser Gly Lys Gln Ile  
115 120 125

Arg His Pro Ala Ser Asn Ser Leu Asp Thr Val Cys Glu Asp Arg Ser  
130 135 140

Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu Thr Gln Arg Thr Thr Phe Arg Pro  
145 150 155 160

Thr Thr Val Pro Ser Thr Thr Val Trp Pro Arg Thr Ser Gln Leu Pro  
165 170 175

Ser Thr Pro Thr Leu Val Ala Pro Glu Gly Pro Ala Ala Ala Leu Glu  
180 185 190

Val Leu Phe Gln Gly Pro Leu Gly Ser Gly Ser Thr His Thr Cys Pro  
195 200 205

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
210 215 220

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
225 230 235 240

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
245 250 255

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
260 265 270

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
275 280 285

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
290 295 300

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
305 310 315 320

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
325 330 335

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
340 345 350

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

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
370 375 380

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
420 425

<210> 129  
<211> 428  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chiOX40R(ECD)-HRRR-Fc



<400> 129

Leu His Cys Val Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His  
1 5 10 15

Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln  
20 25 30

Asn Thr Val Cys His Pro Cys Glu Pro Gly Phe Tyr Asn Glu Ala Val  
35 40 45

Asn Tyr Asp Thr Cys Lys Gln Cys Thr Gln Cys Asn His Arg Ser Gly  
50 55 60

Ser Glu Leu Lys Gln Asn Cys Thr Pro Thr Glu Asp Thr Val Cys Gln  
65 70 75 80

Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg Gln Asp Ser Ser His Lys Leu Gly  
85 90 95

Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Ser Asn  
100 105 110

Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ser Gly Lys Gln Ile  
115 120 125

Arg His Pro Ala Ser Asn Ser Leu Asp Thr Val Cys Glu Asp Arg Ser  
130 135 140

Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu Thr Gln Arg Thr Thr Phe Arg Pro  
145 150 155 160

Thr Thr Val Pro Ser Thr Thr Val Trp Pro Arg Thr Ser Gln Leu Pro  
165 170 175

Ser Thr Pro Thr Leu Val Ala Pro Glu Gly Pro Ala Ala Ala Leu Glu  
180 185 190

Val Leu Phe Gln Gly Pro Leu Gly Ser Gly Ser Thr His Thr Cys Pro  
195 200 205

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
210 215 220

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
225 230 235 240

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

|       |     |                       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|-------|-----|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
|       |     |                       |     | 245 |     |     |     | 250 |     |     |     | 255 |     |     |     |     |  |  |
| Asn   | Trp | Tyr                   | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro |     |  |  |
|       |     |                       | 260 |     |     |     | 265 |     |     |     |     |     | 270 |     |     |     |  |  |
| Arg   | Glu | Glu                   | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr |     |  |  |
|       |     |                       | 275 |     |     |     | 280 |     |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |  |
| Val   | Leu | His                   | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val |     |  |  |
|       |     |                       | 290 |     |     |     | 295 |     |     |     |     |     | 300 |     |     |     |  |  |
| Ser   | Asn | Lys                   | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala |     |  |  |
| 305   |     |                       |     | 310 |     |     |     |     |     | 315 |     |     | 320 |     |     |     |  |  |
| Lys   | Gly | Gln                   | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg |     |  |  |
|       |     |                       | 325 |     |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     |     | 335 |     |  |  |
| Glu   | Glu | Met                   | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly |     |  |  |
|       |     |                       | 340 |     |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     |     | 350 |     |  |  |
| Phe   | Tyr | Pro                   | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro |     |  |  |
|       |     |                       | 355 |     |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     |     | 365 |     |  |  |
| Glu   | Asn | Asn                   | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser |     |  |  |
|       |     |                       | 370 |     |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     |     | 380 |     |  |  |
| Phe   | Phe | Leu                   | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln |     |  |  |
| 385   |     |                       |     | 390 |     |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     |     | 400 |  |  |
| Gly   | Asn | Val                   | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His |     |  |  |
|       |     |                       | 405 |     |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     |     | 415 |     |  |  |
| Tyr   | Thr | Gln                   | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly | Lys |     |     |     |     |     |  |  |
|       |     |                       | 420 |     |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|       |     |                       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| <210> |     | 130                   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| <211> |     | 430                   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| <212> |     | PRT                   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| <213> |     | Artificial Sequence   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|       |     |                       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| <220> |     |                       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| <223> |     | chiOX40R(ECD)-RRHH-Fc |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|       |     |                       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| <400> |     | 130                   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|       |     |                       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Val   | Thr | Val                   | Lys | Leu | Asn | Cys | Val | Lys | Asp | Thr | Tyr | Pro | Ser | Gly | His |     |  |  |
| 1     |     |                       |     | 5   |     |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |  |  |
|       |     |                       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Lys   | Cys | Cys                   | Arg | Glu | Cys | Gln | Pro | Gly | His | Gly | Met | Val | Ser | Arg | Cys |     |  |  |
|       |     |                       | 20  |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |     | 30  |     |  |  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | His | Thr | Arg | Asp | Thr | Val | Cys | His | Pro | Cys | Glu | Pro | Gly | Phe | Tyr | 35  | 40  | 45  |     |
| Asn | Glu | Ala | Val | Asn | Tyr | Asp | Thr | Cys | Lys | Gln | Cys | Thr | Gln | Cys | Asn | 50  | 55  | 60  |     |
| His | Arg | Ser | Gly | Ser | Glu | Leu | Lys | Gln | Asn | Cys | Thr | Pro | Thr | Glu | Asp | 65  | 70  | 75  | 80  |
| Thr | Val | Cys | Arg | Cys | Arg | Ala | Gly | Thr | Gln | Pro | Leu | Asp | Ser | Tyr | Lys | 85  | 90  | 95  |     |
| Pro | Gly | Val | Asp | Cys | Ala | Pro | Cys | Pro | Pro | Gly | His | Phe | Ser | Pro | Gly | 100 | 105 | 110 |     |
| Asp | Asn | Gln | Ala | Cys | Lys | Pro | Trp | Thr | Asn | Cys | Thr | Leu | Ala | Gly | Lys | 115 | 120 | 125 |     |
| His | Thr | Leu | Gln | Pro | Ala | Ser | Asn | Ser | Ser | Asp | Ala | Ile | Cys | Glu | Asp | 130 | 135 | 140 |     |
| Arg | Asp | Pro | Pro | Ala | Thr | Gln | Pro | Gln | Glu | Thr | Gln | Gly | Pro | Pro | Ala | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Arg | Pro | Ile | Thr | Val | Gln | Pro | Thr | Glu | Ala | Trp | Pro | Arg | Thr | Ser | Gln | 165 | 170 | 175 |     |
| Gly | Pro | Ser | Thr | Arg | Pro | Val | Glu | Val | Pro | Gly | Gly | Arg | Ala | Ala | Ala | 180 | 185 | 190 |     |
| Leu | Glu | Val | Leu | Phe | Gln | Gly | Pro | Leu | Gly | Ser | Gly | Ser | Thr | His | Thr | 195 | 200 | 205 |     |
| Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | 210 | 215 | 220 |     |
| Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | 245 | 250 | 255 |     |
| Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | 260 | 265 | 270 |     |
| Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | 275 | 280 | 285 |     |

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
290 295 300

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
305 310 315 320

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
325 330 335

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
340 345 350

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
370 375 380

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

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

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

<210> 131  
<211> 432  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chioX40R(ECD)-RHRR-Fc

<400> 131

Val Thr Val Lys Leu Asn Cys Val Lys Asp Thr Tyr Pro Ser Gly His  
1 5 10 15

Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met Val Ser Arg Cys  
20 25 30

Asp His Thr Arg Asp Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr  
35 40 45

Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn  
50 55 60

Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |
| Thr | Val | Cys | Gln | Cys | Arg | Pro | Gly | Thr | Gln | Pro | Arg | Gln | Asp | Ser | Ser |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| His | Lys | Leu | Gly | Val | Asp | Cys | Val | Pro | Cys | Pro | Pro | Gly | His | Phe | Ser |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Pro | Gly | Ser | Asn | Gln | Ala | Cys | Lys | Pro | Trp | Thr | Asn | Cys | Thr | Leu | Ser |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Gly | Lys | Gln | Ile | Arg | His | Pro | Ala | Ser | Asn | Ser | Leu | Asp | Thr | Val | Cys |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Glu | Asp | Arg | Ser | Leu | Leu | Ala | Thr | Leu | Leu | Trp | Glu | Thr | Gln | Arg | Thr |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Thr | Phe | Arg | Pro | Thr | Thr | Val | Pro | Ser | Thr | Thr | Val | Trp | Pro | Arg | Thr |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Ser | Gln | Leu | Pro | Ser | Thr | Pro | Thr | Leu | Val | Ala | Pro | Glu | Gly | Pro | Ala |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Ala | Ala | Leu | Glu | Val | Leu | Phe | Gln | Gly | Pro | Leu | Gly | Ser | Gly | Ser | Thr |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     | 235 |     |     |     |     |     | 240 |
| Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu |

325

330

335

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 340 345 350

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 355 360 365

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 370 375 380

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

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

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

<210> 132  
 <211> 693  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Tetra-13 HC

<400> 132

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Glu Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala |  |  |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |  |
| Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu |  |  |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |  |
| Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly |  |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |  |
| Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser |  |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |  |
| Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu |  |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |  |
| Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr |  |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |  |
| Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr |  |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |  |
| Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe |  |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |  |
| Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro |  |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |  |
| Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val |  |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |  |
| Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr |  |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |  |
| Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val |  |  |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |  |
| Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys |  |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |  |  |
| Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser |  |  |
|     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     |     | 335 |     |  |  |
| Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro |  |  |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |  |  |
| Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val |  |  |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |  |  |

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
385 390 395 400

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
420 425 430

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

Gly Thr Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro  
450 455 460

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr  
465 470 475 480

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu  
485 490 495

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Pro  
500 505 510

Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr  
515 520 525

Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
530 535 540

Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Tyr Asn Tyr Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
545 550 555 560

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
565 570 575

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
580 585 590

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser  
595 600 605

Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln  
610 615 620



Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln  
625 630 635 640

Lys Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
645 650 655

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
660 665 670

Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr  
675 680 685

Lys Val Glu Ile Leu  
690

<210> 133  
<211> 695  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Tetra-14 HC

<400> 133

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

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

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

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Pro Ser Leu  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Pro Tyr Asn Tyr Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
100 105 110

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

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| 130 |     |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     |     | 140 |     |     |     |  |
| Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |
| Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |
| Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |
| Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |
| Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |
| Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala | Gly | Gly | Pro | Ser | Val |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |
| Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |
| Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |
| Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |
| Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser |  |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |
| Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |  |
| Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |  |
| Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro |  |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |  |
| Pro | Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu |  |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |  |
| Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn |  |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |  |
| Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser |  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     |     | 395 |     |     |     | 400 |
| Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |
| Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |
| His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly | Gly | Gly |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Gly | Gly | Thr | Gln | Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Val | Lys | Lys |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |
| Pro | Gly | Ala | Ser | Val | Lys | Val | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |
| Thr | Arg | Tyr | Tyr | Met | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Cys | Leu |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |
| Glu | Trp | Met | Gly | Trp | Ile | Tyr | Pro | Gly | Glu | Gly | Ser | Thr | Lys | Tyr | Ala |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |
| Gln | Lys | Phe | Gln | Gly | Arg | Val | Thr | Met | Thr | Arg | Asp | Thr | Ser | Ile | Ser |
|     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |
| Thr | Ala | Tyr | Met | Glu | Leu | Ser | Arg | Leu | Arg | Ser | Asp | Asp | Thr | Ala | Val |
|     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |
| Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg | Glu | Tyr | Gly | Asn | Tyr | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |
| Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |
| Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Asp | Ile | Val | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Asp | Ser |
|     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |
| Leu | Ala | Val | Ser | Leu | Gly | Glu | Arg | Ala | Thr | Ile | Asn | Cys | Lys | Ser | Ser |
|     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |
| Gln | Ser | Leu | Leu | Asn | Ser | Gly | Asn | Gln | Lys | Asn | Tyr | Leu | Ala | Trp | Tyr |
|     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |
| Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Pro | Pro | Lys | Leu | Leu | Ile | Tyr | Gly | Ala | Ser |
| 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |
| Thr | Arg | Glu | Ser | Gly | Val | Pro | Asp | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly |

645

650

655

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala  
 660 665 670

Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp His Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Cys  
 675 680 685

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Leu  
 690 695

<210> 134  
 <211> 694  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Tetra-15 HC

<400> 134

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

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

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

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Pro Tyr Asn Tyr Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110

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

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys  
 130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser  
 145 150 155 160

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala | Gly | Gly | Pro | Ser | Val |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser |  |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro |  |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Pro | Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu |  |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn |  |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser |  |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg |  |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |  |

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
420 425 430

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

Gly Gly Thr Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
450 455 460

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile  
465 470 475 480

Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys  
485 490 495

Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ala Tyr Asn  
500 505 510

Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn  
515 520 525

Thr Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
530 535 540

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Tyr Asn Tyr Leu Ala Tyr Trp Gly Gln  
545 550 555 560

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
565 570 575

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser  
580 585 590

Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala  
595 600 605

Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln  
610 615 620

Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn  
625 630 635 640

Gln Lys Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
645 650 655

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr  
660 665 670

Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly  
675 680 685

Thr Lys Val Glu Ile Leu  
690

<210> 135  
<211> 694  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Tetra-16 HC

<400> 135

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Glu Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
165 170 175

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

180

185

190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
 260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 325 330 335

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

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

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 385 390 395 400

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 420 425 430

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



435

440

445

Gly Thr Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro  
 450 455 460

Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
 465 470 475 480

Arg Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu  
 485 490 495

Trp Met Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Glu Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln  
 500 505 510

Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr  
 515 520 525

Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr  
 530 535 540

Tyr Cys Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 545 550 555 560

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 565 570 575

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu  
 580 585 590

Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln  
 595 600 605

Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln  
 610 615 620

Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr  
 625 630 635 640

Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
 645 650 655

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val  
 660 665 670

Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp His Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Cys Gly  
 675 680 685

Thr Lys Leu Glu Ile Leu

<210> 136  
 <211> 669  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Tetra-17 HC

<400> 136

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Glu Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
 165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
 180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe  
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
325 330 335

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

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

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
385 390 395 400

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
420 425 430

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

Gly Thr Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro  
450 455 460

Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
465 470 475 480

Arg Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu  
485 490 495

Trp Met Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Glu Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln  
500 505 510

Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr  
515 520 525

Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr  
530 535 540

Tyr Cys Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
545 550 555 560

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
565 570 575

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
580 585 590

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
595 600 605

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
610 615 620

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
625 630 635 640

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
645 650 655

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
660 665

<210> 137  
<211> 671  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Tetra-18 HC

<400> 137

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| 1   |     | 5   |     | 10  |     | 15  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Ala | Val | Ser | Gly | Tyr | Ser | Ile | Thr | Ser | Asp |  |  |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |  |  |
| Tyr | Ala | Trp | Asn | Trp | Ile | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp |  |  |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |  |  |
| Met | Gly | Tyr | Ile | Ser | Tyr | Ser | Gly | Ser | Thr | Ala | Tyr | Asn | Pro | Ser | Leu |  |  |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     |     | 60  |     |     |     |  |  |
| Lys | Ser | Arg | Ile | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Thr | Ser | Lys | Asn | Thr | Phe | Tyr |  |  |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |  |
| Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu | Arg | Ala | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |  |  |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |  |
| Ala | Arg | Gly | Pro | Tyr | Asn | Tyr | Leu | Ala | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu |  |  |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |  |
| Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu |  |  |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     | 125 |     |     |  |  |
| Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys |  |  |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |  |
| Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser |  |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |  |
| Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser |  |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |  |
| Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser |  |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |  |
| Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn |  |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |  |
| Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His |  |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |  |
| Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala | Gly | Gly | Pro | Ser | Val |  |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |  |
| Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr |  |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |  |
| Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu |  |  |

260

265

270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 325 330 335

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

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

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

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 420 425 430

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

Gly Gly Thr Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 450 455 460

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile  
 465 470 475 480

Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly  
 485 490 495

Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ala Tyr Asn  
 500 505 510

Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn

515

520

525

Thr Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
 530 535 540

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Tyr Asn Tyr Leu Ala Tyr Trp Gly Gln  
 545 550 555 560

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 565 570 575

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 580 585 590

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 595 600 605

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 610 615 620

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 625 630 635 640

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 645 650 655

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 660 665 670

<210> 138  
 <211> 693  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Tetra-19 HC1

<400> 138

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Glu Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe  
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
260 265 270

Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val  
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
305 310 315 320



Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
325 330 335

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

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

Thr Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly  
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Tyr Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp  
385 390 395 400

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

Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
420 425 430

Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly  
435 440 445

Gly Thr Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro  
450 455 460

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr  
465 470 475 480

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu  
485 490 495

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Pro  
500 505 510

Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr  
515 520 525

Phe Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
530 535 540

Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Tyr Asn Tyr Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
545 550 555 560

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
565 570 575

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
580 585 590

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser  
595 600 605

Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln  
610 615 620

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln  
625 630 635 640

Lys Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
645 650 655

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
660 665 670

Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr  
675 680 685

Lys Val Glu Ile Leu  
690

<210> 139  
<211> 669  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Tetra-19 HC2

<400> 139

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Glu Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

85

90

95

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
 165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
 180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
 260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Glu Val Ala Thr Phe Pro Pro

340

345

350

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

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Asp Pro Pro Leu Leu Glu Ser Gln  
 385 390 395 400

Gly Ser Phe Ala Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Asp Lys Ser Arg Trp  
 405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 420 425 430

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

Gly Thr Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro  
 450 455 460

Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
 465 470 475 480

Arg Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu  
 485 490 495

Trp Met Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Glu Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln  
 500 505 510

Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr  
 515 520 525

Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr  
 530 535 540

Tyr Cys Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 545 550 555 560

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 565 570 575

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
 580 585 590

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

595

600

605

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 610 615 620

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 625 630 635 640

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 645 650 655

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 660 665

<210> 140  
 <211> 695  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Tetra-20 HCl

<400> 140

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

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

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

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Pro Tyr Asn Tyr Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110

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

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys  
 130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser  
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser  
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser  
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn  
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His  
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val  
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
260 265 270

Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser  
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
325 330 335

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

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

Val Thr Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser  
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Tyr Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser  
385 390 395 400

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Gly | Ser | Phe | Ser | Leu | Val | Ser | Trp | Leu | Asn | Val | Asp | Lys | Ser | Arg |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Ile | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| His | Asn | Arg | Phe | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly | Gly | Gly |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Gly | Thr | Gln | Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Val | Lys | Lys |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Pro | Gly | Ala | Ser | Val | Lys | Val | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Thr | Arg | Tyr | Tyr | Met | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Cys | Leu |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Glu | Trp | Met | Gly | Trp | Ile | Tyr | Pro | Gly | Glu | Gly | Ser | Thr | Lys | Tyr | Ala |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gln | Lys | Phe | Gln | Gly | Arg | Val | Thr | Met | Thr | Arg | Asp | Thr | Ser | Ile | Ser |
|     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Thr | Ala | Tyr | Met | Glu | Leu | Ser | Arg | Leu | Arg | Ser | Asp | Asp | Thr | Ala | Val |
|     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg | Glu | Tyr | Gly | Asn | Tyr | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Asp | Ile | Val | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Asp | Ser |
|     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Leu | Ala | Val | Ser | Leu | Gly | Glu | Arg | Ala | Thr | Ile | Asn | Cys | Lys | Ser | Ser |
|     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gln | Ser | Leu | Leu | Asn | Ser | Gly | Asn | Gln | Lys | Asn | Tyr | Leu | Ala | Trp | Tyr |
|     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Pro | Pro | Lys | Leu | Leu | Ile | Tyr | Gly | Ala | Ser |
| 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Thr | Arg | Glu | Ser | Gly | Val | Pro | Asp | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala  
660 665 670

Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp His Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Cys  
675 680 685

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Leu  
690 695

<210> 141  
<211> 671  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Tetra-20 HC2

<400> 141

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

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

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

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Pro Ser Leu  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Pro Tyr Asn Tyr Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
100 105 110

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

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys  
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser  
145 150 155 160

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



|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|     |     |     |     | 165 |     |     |     | 170 |     |     |     | 175 |     |     |     |  |
| Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     | 190 |     |     |  |
| Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn |  |
|     |     |     | 195 |     |     |     | 200 |     |     |     |     |     | 205 |     |     |  |
| Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His |  |
|     |     | 210 |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |
| Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala | Gly | Gly | Pro | Ser | Val |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |
| Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr |  |
|     |     |     | 245 |     |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |
| Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |
| Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |
| Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser |  |
| 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |     |  |
| Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |  |
| Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile |  |
|     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     |     | 335 |     |  |
| Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Glu | Val | Ala | Thr | Phe | Pro |  |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |  |
| Pro | Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Thr | Leu | Val | Cys | Leu |  |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |  |
| Val | Thr | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn |  |
| 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |     |  |
| Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Asp | Pro | Pro | Leu | Leu | Glu | Ser |  |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     |     |  |
| Asp | Gly | Ser | Phe | Ala | Leu | Ser | Ser | Arg | Leu | Arg | Val | Asp | Lys | Ser | Arg |  |
|     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |     |  |
| Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu |  |

420

425

430

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

Gly Gly Thr Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 450 455 460

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile  
 465 470 475 480

Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly  
 485 490 495

Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ala Tyr Asn  
 500 505 510

Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn  
 515 520 525

Thr Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
 530 535 540

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Tyr Asn Tyr Leu Ala Tyr Trp Gly Gln  
 545 550 555 560

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 565 570 575

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 580 585 590

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 595 600 605

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 610 615 620

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 625 630 635 640

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 645 650 655

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 660 665 670

&lt;210&gt; 142

<211> 700  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Tetra-21 HC2

<400> 142

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

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

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

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Pro Ser Leu  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Pro Tyr Asn Tyr Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
100 105 110

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

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

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

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

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Lys Ser  
180 185 190

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

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys  
210 215 220

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val  
225 230 235 240

Glu Ile Lys Arg Thr Gly Gly Gly Gly Thr Asp Lys Thr His Thr Cys  
245 250 255

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu  
260 265 270

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

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys  
290 295 300

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
305 310 315 320

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
325 330 335

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
340 345 350

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
355 360 365

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Glu Val Ala Thr Phe Pro Pro Ser  
370 375 380

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Thr Leu Val Cys Leu Val Thr  
385 390 395 400

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
405 410 415

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Asp Pro Pro Leu Leu Glu Ser Gln Gly  
420 425 430

Ser Phe Ala Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
435 440 445

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
450 455 460

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly  
465 470 475 480

Thr Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly  
485 490 495

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg  
500 505 510

Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp  
515 520 525

Met Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Glu Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys  
530 535 540

Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala  
545 550 555 560

Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
565 570 575

Cys Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
580 585 590

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu  
595 600 605

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys  
610 615 620

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser  
625 630 635 640

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser  
645 650 655

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser  
660 665 670

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn  
675 680 685

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
690 695 700

<210> 143  
<211> 684  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Tetra-22 HC

<400> 143

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr  
20 25 30

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

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

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

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
130 135 140

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

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly  
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     |     |     | 245 |     |     |     | 250 |     |     |     | 255 |     |     |     |
| Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val |
| 260 |     |     |     |     |     |     |     | 265 |     |     |     | 270 |     |     |     |
| Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser |
| 275 |     |     |     |     |     |     |     | 280 |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu |
| 290 |     |     |     |     |     |     |     | 295 |     |     |     | 300 |     |     |     |
| Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala |
| 305 |     |     |     | 310 |     |     |     | 315 |     |     |     | 320 |     |     |     |
| Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     | 330 |     |     |     | 335 |     |     |     |
| Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln |
|     |     |     |     | 340 |     |     |     | 345 |     |     |     | 350 |     |     |     |
| Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala |
|     |     |     |     |     |     |     |     | 360 |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr |
| 370 |     |     |     | 375 |     |     |     | 380 |     |     |     |     |     |     |     |
| Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu |
| 385 |     |     |     | 390 |     |     |     | 395 |     |     |     | 400 |     |     |     |
| Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     | 410 |     |     |     | 415 |     |     |     |
| Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser |
|     |     |     |     | 420 |     |     |     | 425 |     |     |     | 430 |     |     |     |
| Leu | Ser | Pro | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Thr | Glu | Val | Gln | Leu | Val | Glu | Ser |
|     |     |     |     | 435 |     |     |     | 440 |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro | Gly | Gly | Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Ala |
| 450 |     |     |     | 455 |     |     |     | 460 |     |     |     |     |     |     |     |
| Val | Ser | Gly | Tyr | Ser | Ile | Thr | Ser | Asp | Tyr | Ala | Trp | Asn | Trp | Ile | Arg |
| 465 |     |     |     | 470 |     |     |     | 475 |     |     |     | 480 |     |     |     |
| Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Cys | Leu | Glu | Trp | Met | Gly | Tyr | Ile | Ser | Tyr | Ser |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     | 490 |     |     |     | 495 |     |     |     |
| Gly | Ser | Thr | Ala | Tyr | Asn | Pro | Ser | Leu | Lys | Ser | Arg | Ile | Thr | Ile | Ser |

500

505

510

Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg  
 515 520 525

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Tyr Asn Tyr  
 530 535 540

Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly  
 545 550 555 560

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln  
 565 570 575

Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val  
 580 585 590

Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser  
 595 600 605

Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu  
 610 615 620

Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Lys Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser  
 625 630 635 640

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
 645 650 655

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro  
 660 665 670

Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Leu  
 675 680

&lt;210&gt; 144

&lt;211&gt; 214

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Tetra-22 LC

&lt;400&gt; 144

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala  
 20 25 30



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

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

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

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 145  
<211> 446  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Tri-8 HC2

<400> 145

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

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

20

25

30

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Glu Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
 165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
 180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
 260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275

280

285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Glu Val Ala Thr Phe Pro Pro  
 340 345 350

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

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Asp Pro Pro Leu Leu Glu Ser Gln  
 385 390 395 400

Gly Ser Phe Ala Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Asp Lys Ser Arg Trp  
 405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 420 425 430

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

&lt;210&gt; 146

&lt;211&gt; 694

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 1A7\_2H6\_8 HC

&lt;400&gt; 146

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

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

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Gly | Asp | Met | Tyr | Pro | Asp | Asn | Gly | Asp | Ser | Ser | Tyr | Asn | Gln | Lys | Phe |  |
| 50  |     |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |
| Arg | Glu | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Arg | Asp | Thr | Ser | Thr | Ser | Thr | Ala | Tyr |  |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |
| Leu | Glu | Leu | Ser | Ser | Leu | Arg | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |  |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |
| Val | Leu | Ala | Pro | Arg | Trp | Tyr | Phe | Ser | Val | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu |  |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |
| Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu |  |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |
| Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys |  |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |
| Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |
| Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |
| Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |
| Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |
| Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |
| Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala | Gly | Gly | Pro | Ser | Val |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |
| Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |
| Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |
| Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |
| Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser |  |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
325 330 335

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

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

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

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
420 425 430

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

Gly Gly Thr Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
450 455 460

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile  
465 470 475 480

Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys  
485 490 495

Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ala Tyr Asn  
500 505 510

Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn  
515 520 525

Thr Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
530 535 540

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Tyr Asn Tyr Leu Ala Tyr Trp Gly Gln  
545 550 555 560

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
565 570 575

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser  
580 585 590

Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala  
595 600 605

Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln  
610 615 620

Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn  
625 630 635 640

Gln Lys Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
645 650 655

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr  
660 665 670

Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly  
675 680 685

Thr Lys Val Glu Ile Leu  
690

<210> 147  
<211> 699  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 106-222\_2H6\_8 HC

<400> 147

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

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

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met  
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe  
50 55 60

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

|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 65         |            |            |            | 70         |            |            |            | 75         |            |            |            | 80         |            |            |            |
| Leu        | Gln        | Ile        | Ser        | Ser<br>85  | Leu        | Lys        | Ala        | Glu        | Asp<br>90  | Thr        | Ala        | Val        | Tyr        | Tyr<br>95  | Cys        |
| Ala        | Asn        | Pro        | Tyr<br>100 | Tyr        | Asp        | Tyr        | Val        | Ser<br>105 | Tyr        | Tyr        | Ala        | Met        | Asp<br>110 | Tyr        | Trp        |
| Gly        | Gln        | Gly<br>115 | Thr        | Thr        | Val        | Thr        | Val<br>120 | Ser        | Ser        | Ala        | Ser        | Thr<br>125 | Lys        | Gly        | Pro        |
| Ser        | Val<br>130 | Phe        | Pro        | Leu        | Ala        | Pro<br>135 | Ser        | Ser        | Lys        | Ser        | Thr<br>140 | Ser        | Gly        | Gly        | Thr        |
| Ala<br>145 | Ala        | Leu        | Gly        | Cys        | Leu<br>150 | Val        | Lys        | Asp        | Tyr        | Phe<br>155 | Pro        | Glu        | Pro        | Val        | Thr<br>160 |
| Val        | Ser        | Trp        | Asn        | Ser<br>165 | Gly        | Ala        | Leu        | Thr        | Ser<br>170 | Gly        | Val        | His        | Thr        | Phe<br>175 | Pro        |
| Ala        | Val        | Leu        | Gln<br>180 | Ser        | Ser        | Gly        | Leu        | Tyr<br>185 | Ser        | Leu        | Ser        | Ser        | Val<br>190 | Val        | Thr        |
| Val        | Pro<br>195 | Ser        | Ser        | Ser        | Leu        | Gly        | Thr<br>200 | Gln        | Thr        | Tyr        | Ile        | Cys<br>205 | Asn        | Val        | Asn        |
| His        | Lys<br>210 | Pro        | Ser        | Asn        | Thr        | Lys<br>215 | Val        | Asp        | Lys        | Lys        | Val<br>220 | Glu        | Pro        | Lys        | Ser        |
| Cys<br>225 | Asp        | Lys        | Thr        | His        | Thr<br>230 | Cys        | Pro        | Pro        | Cys        | Pro<br>235 | Ala        | Pro        | Glu        | Ala        | Ala<br>240 |
| Gly        | Gly        | Pro        | Ser        | Val<br>245 | Phe        | Leu        | Phe        | Pro<br>250 | Pro        | Lys        | Pro        | Lys        | Asp<br>255 | Thr        | Leu        |
| Met        | Ile        | Ser        | Arg<br>260 | Thr        | Pro        | Glu        | Val        | Thr<br>265 | Cys        | Val        | Val        | Val        | Asp<br>270 | Val        | Ser        |
| His        | Glu        | Asp<br>275 | Pro        | Glu        | Val        | Lys        | Phe<br>280 | Asn        | Trp        | Tyr        | Val        | Asp<br>285 | Gly        | Val        | Glu        |
| Val        | His<br>290 | Asn        | Ala        | Lys        | Thr        | Lys<br>295 | Pro        | Arg        | Glu        | Glu        | Gln<br>300 | Tyr        | Asn        | Ser        | Thr        |
| Tyr<br>305 | Arg        | Val        | Val        | Ser        | Val<br>310 | Leu        | Thr        | Val        | Leu        | His<br>315 | Gln        | Asp        | Trp        | Leu        | Asn<br>320 |
| Gly        | Lys        | Glu        | Tyr        | Lys        | Cys        | Lys        | Val        | Ser        | Asn        | Lys        | Ala        | Leu        | Pro        | Ala        | Pro        |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     |     |     | 325 |     |     |     | 330 |     |     |     | 335 |     |     |     |
| Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln |
| 340 |     |     |     |     |     |     |     | 345 |     |     |     | 350 |     |     |     |
| Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val |
| 355 |     |     |     |     |     |     |     | 360 |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val |
| 370 |     |     |     |     |     |     |     | 375 |     |     |     | 380 |     |     |     |
| Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro |
| 385 |     |     |     | 390 |     |     |     | 395 |     |     |     | 400 |     |     |     |
| Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     | 410 |     |     |     | 415 |     |     |     |
| Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val |
|     |     |     |     | 420 |     |     |     | 425 |     |     |     | 430 |     |     |     |
| Met | His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu |
| 435 |     |     |     |     |     |     |     | 440 |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Ser | Pro | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Thr | Glu | Val | Gln | Leu | Val | Glu | Ser | Gly |
| 450 |     |     |     | 455 |     |     |     | 460 |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro | Gly | Gly | Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Ala | Val |
| 465 |     |     |     | 470 |     |     |     | 475 |     |     |     | 480 |     |     |     |
| Ser | Gly | Tyr | Ser | Ile | Thr | Ser | Asp | Tyr | Ala | Trp | Asn | Trp | Ile | Arg | Gln |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     | 490 |     |     |     | 495 |     |     |     |
| Ala | Pro | Gly | Lys | Cys | Leu | Glu | Trp | Met | Gly | Tyr | Ile | Ser | Tyr | Ser | Gly |
|     |     |     |     | 500 |     |     |     | 505 |     |     |     | 510 |     |     |     |
| Ser | Thr | Ala | Tyr | Asn | Pro | Ser | Leu | Lys | Ser | Arg | Ile | Thr | Ile | Ser | Arg |
| 515 |     |     |     |     |     |     |     | 520 |     |     |     | 525 |     |     |     |
| Asp | Thr | Ser | Lys | Asn | Thr | Phe | Tyr | Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu | Arg | Ala |
| 530 |     |     |     | 535 |     |     |     | 540 |     |     |     |     |     |     |     |
| Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg | Gly | Pro | Tyr | Asn | Tyr | Leu |
| 545 |     |     |     | 550 |     |     |     | 555 |     |     |     | 560 |     |     |     |
| Ala | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Gly | Gly | Gly |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     | 570 |     |     |     | 575 |     |     |     |
| Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Asp | Ile | Gln | Leu |



580

585

590

Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr  
 595 600 605

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe  
 610 615 620

Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 625 630 635 640

Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Lys Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 645 650 655

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 660 665 670

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Leu  
 675 680 685

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Leu  
 690 695

<210> 148  
 <211> 699  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 7H11\_1949\_8 HC

<400> 148

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Glu Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe  
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
325 330 335

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | 355 | 360 | 365 |     |
| Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | 370 | 375 | 380 |     |
| Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp | 385 | 390 | 395 | 400 |
| Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | 405 | 410 | 415 |     |
| Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | His | 420 | 425 | 430 |     |
| Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly | Gly | Gly | Gly | 435 | 440 | 445 |     |
| Gly | Thr | Glu | Val | Gln | Leu | Val | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro | 450 | 455 | 460 |     |
| Gly | Gly | Ser | Leu | Lys | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Ser | 465 | 470 | 475 | 480 |
| Gly | Ser | Ala | Met | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Ser | Gly | Lys | Cys | Leu | Glu | 485 | 490 | 495 |     |
| Trp | Val | Gly | Arg | Ile | Arg | Ser | Lys | Ala | Asn | Ser | Tyr | Ala | Thr | Ala | Tyr | 500 | 505 | 510 |     |
| Ala | Ala | Ser | Val | Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asp | Ser | Lys | 515 | 520 | 525 |     |
| Asn | Thr | Ala | Tyr | Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu | Lys | Thr | Glu | Asp | Thr | Ala | 530 | 535 | 540 |     |
| Val | Tyr | Tyr | Cys | Thr | Ser | Gly | Ile | Tyr | Asp | Ser | Ser | Gly | Tyr | Asp | Tyr | 545 | 550 | 555 | 560 |
| Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | 565 | 570 | 575 |     |
| Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Thr | Asp | Ile | Val | Met | Thr | 580 | 585 | 590 |     |
| Gln | Ser | Pro | Leu | Ser | Leu | Pro | Val | Thr | Pro | Gly | Glu | Pro | Ala | Ser | Ile | 595 | 600 | 605 |     |

Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr  
610 615 620

Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile  
625 630 635 640

Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
645 650 655

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala  
660 665 670

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Leu  
675 680 685

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
690 695

<210> 149  
<211> 701  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 11D4\_1949 HC

<400> 149

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

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

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

|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|            | 115        |            |            |            |            | 120        |            |            |            |            | 125        |            |            |            |            |
| Leu        | Ala<br>130 | Pro        | Ser        | Ser        | Lys        | Ser<br>135 | Thr        | Ser        | Gly        | Gly        | Thr<br>140 | Ala        | Ala        | Leu        | Gly        |
| Cys<br>145 | Leu        | Val        | Lys        | Asp        | Tyr<br>150 | Phe        | Pro        | Glu        | Pro        | Val<br>155 | Thr        | Val        | Ser        | Trp        | Asn<br>160 |
| Ser        | Gly        | Ala        | Leu        | Thr<br>165 | Ser        | Gly        | Val        | His        | Thr<br>170 | Phe        | Pro        | Ala        | Val        | Leu<br>175 | Gln        |
| Ser        | Ser        | Gly        | Leu<br>180 | Tyr        | Ser        | Leu        | Ser        | Ser<br>185 | Val        | Val        | Thr        | Val        | Pro<br>190 | Ser        | Ser        |
| Ser        | Leu        | Gly<br>195 | Thr        | Gln        | Thr        | Tyr<br>200 | Ile        | Cys        | Asn        | Val        | Asn        | His<br>205 | Lys        | Pro        | Ser        |
| Asn        | Thr<br>210 | Lys        | Val        | Asp        | Lys        | Lys<br>215 | Val        | Glu        | Pro        | Lys        | Ser<br>220 | Cys        | Asp        | Lys        | Thr        |
| His<br>225 | Thr        | Cys        | Pro        | Pro        | Cys<br>230 | Pro        | Ala        | Pro        | Glu        | Ala<br>235 | Ala        | Gly        | Gly        | Pro        | Ser<br>240 |
| Val        | Phe        | Leu        | Phe        | Pro<br>245 | Pro        | Lys        | Pro        | Lys        | Asp<br>250 | Thr        | Leu        | Met        | Ile        | Ser<br>255 | Arg        |
| Thr        | Pro        | Glu        | Val<br>260 | Thr        | Cys        | Val        | Val        | Val        | Asp<br>265 | Val        | Ser        | His        | Glu<br>270 | Asp        | Pro        |
| Glu        | Val        | Lys<br>275 | Phe        | Asn        | Trp        | Tyr<br>280 | Val        | Asp        | Gly        | Val        | Glu        | Val<br>285 | His        | Asn        | Ala        |
| Lys        | Thr<br>290 | Lys        | Pro        | Arg        | Glu        | Glu<br>295 | Gln        | Tyr        | Asn        | Ser        | Thr<br>300 | Tyr        | Arg        | Val        | Val        |
| Ser<br>305 | Val        | Leu        | Thr        | Val        | Leu<br>310 | His        | Gln        | Asp        | Trp        | Leu<br>315 | Asn        | Gly        | Lys        | Glu        | Tyr<br>320 |
| Lys        | Cys        | Lys        | Val        | Ser<br>325 | Asn        | Lys        | Ala        | Leu        | Pro<br>330 | Ala        | Pro        | Ile        | Glu        | Lys<br>335 | Thr        |
| Ile        | Ser        | Lys        | Ala<br>340 | Lys        | Gly        | Gln        | Pro        | Arg<br>345 | Glu        | Pro        | Gln        | Val        | Tyr<br>350 | Thr        | Leu        |
| Pro        | Pro        | Ser<br>355 | Arg        | Asp        | Glu        | Leu        | Thr<br>360 | Lys        | Asn        | Gln        | Val        | Ser<br>365 | Leu        | Thr        | Cys        |
| Leu        | Val        | Lys        | Gly        | Phe        | Tyr        | Pro        | Ser        | Asp        | Ile        | Ala        | Val        | Glu        | Trp        | Glu        | Ser        |

370

375

380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 420 425 430

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

Gly Gly Gly Thr Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val  
 450 455 460

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr  
 465 470 475 480

Phe Ser Gly Ser Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Cys  
 485 490 495

Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr  
 500 505 510

Ala Tyr Ala Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp  
 515 520 525

Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp  
 530 535 540

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr  
 545 550 555 560

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly  
 565 570 575

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Asp Ile Val  
 580 585 590

Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala  
 595 600 605

Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr  
 610 615 620

Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu

|                           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 625                       |     | 630 |     | 635 |     | 640 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Leu                       | Ile | Tyr | Leu | Gly | Ser | Asn | Arg | Ala | Ser | Gly | Val | Pro | Asp | Arg | Phe |
|                           |     |     | 645 |     |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |
| Ser                       | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Lys | Ile | Ser | Arg | Val |
|                           |     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |
| Glu                       | Ala | Glu | Asp | Val | Gly | Val | Tyr | Tyr | Cys | Met | Gln | Ala | Leu | Gln | Thr |
|                           |     | 675 |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     | 685 |     |     |     |
| Pro                       | Leu | Thr | Phe | Gly | Cys | Gly | Thr | Lys | Val | Glu | Ile | Lys |     |     |     |
|                           | 690 |     |     |     |     | 695 |     |     |     |     | 700 |     |     |     |     |
| <210> 150                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <211> 720                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <212> PRT                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <213> Artificial Sequence |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <220>                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <223> 1A7_1949 HC         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <400> 150                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Met                       | Glu | Thr | Asp | Thr | Leu | Leu | Leu | Trp | Val | Leu | Leu | Leu | Trp | Val | Pro |
| 1                         |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Gly                       | Ser | Thr | Gly | Glu | Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Val | Lys |
|                           |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Lys                       | Pro | Gly | Ala | Ser | Val | Lys | Val | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Thr |
|                           |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Phe                       | Thr | Asp | Ser | Tyr | Met | Ser | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly |
|                           | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Leu                       | Glu | Trp | Ile | Gly | Asp | Met | Tyr | Pro | Asp | Asn | Gly | Asp | Ser | Ser | Tyr |
| 65                        |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Asn                       | Gln | Lys | Phe | Arg | Glu | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Arg | Asp | Thr | Ser | Thr |
|                           |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Ser                       | Thr | Ala | Tyr | Leu | Glu | Leu | Ser | Ser | Leu | Arg | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala |
|                           |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Val                       | Tyr | Tyr | Cys | Val | Leu | Ala | Pro | Arg | Trp | Tyr | Phe | Ser | Val | Trp | Gly |
|                           |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Gln                       | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser |
|                           | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly  
245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
385 390 395 400



|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | 405 | 410 | 415 |
| Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | 420 | 425 | 430 |
| Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | 435 | 440 | 445 |
| His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | 450 | 455 | 460 |
| Pro | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Thr | Glu | Val | Gln | Leu | Val | Glu | Ser | Gly | Gly | 465 | 470 | 475 |
| Gly | Leu | Val | Gln | Pro | Gly | Gly | Ser | Leu | Lys | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | 485 | 490 | 495 |
| Gly | Phe | Thr | Phe | Ser | Gly | Ser | Ala | Met | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Ser | 500 | 505 | 510 |
| Gly | Lys | Cys | Leu | Glu | Trp | Val | Gly | Arg | Ile | Arg | Ser | Lys | Ala | Asn | Ser | 515 | 520 | 525 |
| Tyr | Ala | Thr | Ala | Tyr | Ala | Ala | Ser | Val | Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | 530 | 535 | 540 |
| Arg | Asp | Asp | Ser | Lys | Asn | Thr | Ala | Tyr | Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu | Lys | 545 | 550 | 555 |
| Thr | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Thr | Ser | Gly | Ile | Tyr | Asp | Ser | 565 | 570 | 575 |
| Ser | Gly | Tyr | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | 580 | 585 | 590 |
| Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Thr | 595 | 600 | 605 |
| Asp | Ile | Val | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Leu | Ser | Leu | Pro | Val | Thr | Pro | Gly | 610 | 615 | 620 |
| Glu | Pro | Ala | Ser | Ile | Ser | Cys | Arg | Ser | Ser | Gln | Ser | Leu | Leu | His | Ser | 625 | 630 | 635 |
| Asn | Gly | Tyr | Asn | Tyr | Leu | Asp | Trp | Tyr | Leu | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Ser | 645 | 650 | 655 |

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
660 665 670

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
675 680 685

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala  
690 695 700

Leu Gln Thr Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
705 710 715 720

<210> 151  
<211> 704  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 9B12\_1949 HC

<400> 151

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

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

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile  
35 40 45

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

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

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

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
130 135 140

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |     |  |  |
| Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala |  |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |  |
| Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val |  |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |  |
| Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His |  |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |  |
| Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys |  |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |  |
| Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala | Gly |  |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |  |
| Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met |  |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |  |
| Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His |  |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |  |
| Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val |  |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |  |
| His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr |  |  |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |  |
| Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly |  |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |  |  |
| Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile |  |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |  |  |
| Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val |  |  |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |  |  |
| Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser |  |  |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |  |  |
| Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu |  |  |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |  |  |
| Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro |  |  |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |  |  |
| Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val |  |  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     |     |     | 405 |     |     |     | 410 |     |     |     | 415 |     |     |     |
| Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met |
|     |     |     |     | 420 |     |     |     | 425 |     |     |     | 430 |     |     |     |
| His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser |
|     |     |     |     | 435 |     |     |     | 440 |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Pro | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Thr | Glu | Val | Gln | Leu | Val | Glu | Ser | Gly | Gly |
|     |     |     |     | 450 |     |     |     | 455 |     |     |     | 460 |     |     |     |
| Gly | Leu | Val | Gln | Pro | Gly | Gly | Ser | Leu | Lys | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser |
|     |     |     |     | 465 |     |     |     | 470 |     |     |     | 475 |     |     |     |
| Gly | Phe | Thr | Phe | Ser | Gly | Ser | Ala | Met | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Ser |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     | 490 |     |     |     | 495 |     |     |     |
| Gly | Lys | Cys | Leu | Glu | Trp | Val | Gly | Arg | Ile | Arg | Ser | Lys | Ala | Asn | Ser |
|     |     |     |     | 500 |     |     |     | 505 |     |     |     | 510 |     |     |     |
| Tyr | Ala | Thr | Ala | Tyr | Ala | Ala | Ser | Val | Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser |
|     |     |     |     | 515 |     |     |     | 520 |     |     |     | 525 |     |     |     |
| Arg | Asp | Asp | Ser | Lys | Asn | Thr | Ala | Tyr | Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu | Lys |
|     |     |     |     | 530 |     |     |     | 535 |     |     |     | 540 |     |     |     |
| Thr | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Thr | Ser | Gly | Ile | Tyr | Asp | Ser |
|     |     |     |     | 545 |     |     |     | 550 |     |     |     | 555 |     |     |     |
| Ser | Gly | Tyr | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     | 570 |     |     |     | 575 |     |     |     |
| Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Thr |
|     |     |     |     | 580 |     |     |     | 585 |     |     |     | 590 |     |     |     |
| Asp | Ile | Val | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Leu | Ser | Leu | Pro | Val | Thr | Pro | Gly |
|     |     |     |     | 595 |     |     |     | 600 |     |     |     | 605 |     |     |     |
| Glu | Pro | Ala | Ser | Ile | Ser | Cys | Arg | Ser | Ser | Gln | Ser | Leu | Leu | His | Ser |
|     |     |     |     | 610 |     |     |     | 615 |     |     |     | 620 |     |     |     |
| Asn | Gly | Tyr | Asn | Tyr | Leu | Asp | Trp | Tyr | Leu | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Ser |
|     |     |     |     | 625 |     |     |     | 630 |     |     |     | 635 |     |     |     |
| Pro | Gln | Leu | Leu | Ile | Tyr | Leu | Gly | Ser | Asn | Arg | Ala | Ser | Gly | Val | Pro |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     | 650 |     |     |     | 655 |     |     |     |
| Asp | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Lys | Ile |

660

665

670

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala  
 675 680 685

Leu Gln Thr Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 690 695 700

&lt;210&gt; 152

&lt;211&gt; 705

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 106-222\_1949 HC

&lt;400&gt; 152

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

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

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met  
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe  
 50 55 60

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

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

Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp  
 100 105 110

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

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
 130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
 165 170 175

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | 180 | 185 | 190 |     |
| Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | 195 | 200 | 205 |     |
| His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | 210 | 215 | 220 |     |
| Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | 245 | 250 | 255 |     |
| Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | 260 | 265 | 270 |     |
| His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | 275 | 280 | 285 |     |
| Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | 290 | 295 | 300 |     |
| Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | 305 | 310 | 315 | 320 |
| Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | 325 | 330 | 335 |     |
| Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | 340 | 345 | 350 |     |
| Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | 355 | 360 | 365 |     |
| Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | 370 | 375 | 380 |     |
| Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | 385 | 390 | 395 | 400 |
| Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | 405 | 410 | 415 |     |
| Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | 420 | 425 | 430 |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| Met | His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu |  |  |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |  |  |
| Ser | Pro | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Thr | Glu | Val | Gln | Leu | Val | Glu | Ser | Gly |  |  |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |  |  |
| Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro | Gly | Gly | Ser | Leu | Lys | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala |  |  |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |  |  |
| Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Ser | Gly | Ser | Ala | Met | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala |  |  |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |  |  |
| Ser | Gly | Lys | Cys | Leu | Glu | Trp | Val | Gly | Arg | Ile | Arg | Ser | Lys | Ala | Asn |  |  |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |  |  |
| Ser | Tyr | Ala | Thr | Ala | Tyr | Ala | Ala | Ser | Val | Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile |  |  |
|     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |  |  |
| Ser | Arg | Asp | Asp | Ser | Lys | Asn | Thr | Ala | Tyr | Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu |  |  |
|     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |  |  |
| Lys | Thr | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Thr | Ser | Gly | Ile | Tyr | Asp |  |  |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |  |  |
| Ser | Ser | Gly | Tyr | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser |  |  |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |  |  |
| Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser |  |  |
|     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |  |  |
| Thr | Asp | Ile | Val | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Leu | Ser | Leu | Pro | Val | Thr | Pro |  |  |
|     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |  |  |
| Gly | Glu | Pro | Ala | Ser | Ile | Ser | Cys | Arg | Ser | Ser | Gln | Ser | Leu | Leu | His |  |  |
|     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |  |  |
| Ser | Asn | Gly | Tyr | Asn | Tyr | Leu | Asp | Trp | Tyr | Leu | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln |  |  |
| 625 |     |     |     | 630 |     |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |  |  |
| Ser | Pro | Gln | Leu | Leu | Ile | Tyr | Leu | Gly | Ser | Asn | Arg | Ala | Ser | Gly | Val |  |  |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |  |  |
| Pro | Asp | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Lys |  |  |
|     |     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |  |  |
| Ile | Ser | Arg | Val | Glu | Ala | Glu | Asp | Val | Gly | Val | Tyr | Tyr | Cys | Met | Gln |  |  |
|     |     | 675 |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     | 685 |     |     |     |  |  |

Ala Leu Gln Thr Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile  
690 695 700

Lys  
705

<210> 153  
<211> 693  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 7H11\_9B12\_8 HC

<400> 153

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Glu Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
165 170 175

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



180

185

190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
 260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 325 330 335

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

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

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 385 390 395 400

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 420 425 430

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

435

440

445

Gly Thr Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro  
 450 455 460

Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser  
 465 470 475 480

Ser Gly Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Cys Leu Glu  
 485 490 495

Tyr Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser  
 500 505 510

Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr  
 515 520 525

Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 530 535 540

Cys Ala Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr  
 545 550 555 560

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 565 570 575

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln  
 580 585 590

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr  
 595 600 605

Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln  
 610 615 620

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu  
 625 630 635 640

His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
 645 650 655

Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
 660 665 670

Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr  
 675 680 685

Lys Val Glu Ile Lys

<210> 154  
 <211> 566  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 7H11\_hzG3v9\_8 HC

<400> 154

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Glu Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
 165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
 180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe  
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
325 330 335

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

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

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
385 390 395 400

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
420 425 430

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

Gly Thr Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro  
450 455 460

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
465 470 475 480

Asp Ala Phe Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu  
485 490 495

Trp Val Ser Ser Ile Ser Asn Arg Gly Leu Lys Thr Ala Tyr Ala Glu  
500 505 510

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr  
515 520 525

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
530 535 540

Tyr Cys Val Glu Gly Asp Trp Asn Leu Gly Pro Arg Gly Gln Gly Thr  
545 550 555 560

Leu Val Thr Val Lys Pro  
565

<210> 155  
<211> 568  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 11D4\_hzG3v9 HC

<400> 155

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |
| Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |
| Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys |     |     |

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

<210> 156  
 <211> 572  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 106-222\_hzG3v9 HC  
 <400> 156

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Gln | Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Ser | Glu | Leu | Lys | Lys | Pro | Gly | Ala |  |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |  |
| Ser | Val | Lys | Val | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Asp | Tyr |  |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |  |
| Ser | Met | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Lys | Trp | Met |  |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |  |
| Gly | Trp | Ile | Asn | Thr | Glu | Thr | Gly | Glu | Pro | Thr | Tyr | Ala | Asp | Asp | Phe |  |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |
| Lys | Gly | Arg | Phe | Val | Phe | Ser | Leu | Asp | Thr | Ser | Val | Ser | Thr | Ala | Tyr |  |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |
| Leu | Gln | Ile | Ser | Ser | Leu | Lys | Ala | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |  |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |
| Ala | Asn | Pro | Tyr | Tyr | Asp | Tyr | Val | Ser | Tyr | Tyr | Ala | Met | Asp | Tyr | Trp |  |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |
| Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro |  |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |
| Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr |  |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |
| Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |
| Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |
| Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |
| Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |
| His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |
| Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |
| Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |



Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
325 330 335

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

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

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
420 425 430

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

Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Thr Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly  
450 455 460

Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala  
465 470 475 480

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Phe Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala  
485 490 495

Pro Gly Lys Glu Arg Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Asn Arg Gly Leu  
500 505 510

Lys Thr Ala Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg  
515 520 525

Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala  
530 535 540

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Glu Gly Asp Trp Asn Leu Gly  
545 550 555 560

Pro Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro  
565 570

<210> 157  
<211> 571  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 9B12\_hzG3v9 HC

<400> 157

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

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

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile  
35 40 45

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

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

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

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
130 135 140

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |     |
| Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala | Gly |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val |

405

410

415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430

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

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Thr Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly  
 450 455 460

Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
 465 470 475 480

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Phe Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro  
 485 490 495

Gly Lys Glu Arg Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Asn Arg Gly Leu Lys  
 500 505 510

Thr Ala Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp  
 515 520 525

Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu  
 530 535 540

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Glu Gly Asp Trp Asn Leu Gly Pro  
 545 550 555 560

Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro  
 565 570

<210> 158  
 <211> 567  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 2H6\_hzG3v9\_8 HC

<400> 158

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

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

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

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Pro Ser Leu  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Pro Tyr Asn Tyr Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
100 105 110

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

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys  
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser  
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser  
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser  
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn  
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His  
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val  
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
325 330 335

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

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

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

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
420 425 430

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

Gly Gly Thr Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln  
450 455 460

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
465 470 475 480

Ser Asp Ala Phe Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg  
485 490 495

Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Asn Arg Gly Leu Lys Thr Ala Tyr Ala  
500 505 510

Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn  
515 520 525

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
530 535 540

Tyr Tyr Cys Val Glu Gly Asp Trp Asn Leu Gly Pro Arg Gly Gln Gly  
545 550 555 560

Thr Leu Val Thr Val Lys Pro  
565

<210> 159  
<211> 163  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> hsOX40-CRD(29-168)-Avi-his

<400> 159

Leu His Cys Val Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His  
1 5 10 15

Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln  
20 25 30

Asn Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val  
35 40 45

Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly  
50 55 60

Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg  
65 70 75 80

Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp  
85 90 95

Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala  
100 105 110

Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln  
115 120 125

Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Gly Leu  
130 135 140

Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu His His His  
145 150 155 160

His His His

<210> 160  
<211> 148  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> hsOX40-CRD(29-168)-His

<400> 160

Leu His Cys Val Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His  
1 5 10 15

Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln  
20 25 30

Asn Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val  
35 40 45

Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly  
50 55 60

Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg  
65 70 75 80

Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp  
85 90 95

Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala  
100 105 110

Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln  
115 120 125

Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Ser Ala His His  
130 135 140

His His His His  
145

<210> 161

<211> 497

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> hsOX40-eGFP

<400> 161

Leu His Cys Val Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His  
1 5 10 15

Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln  
20 25 30

Asn Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val



35

40

45

Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly  
50 55 60

Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg  
65 70 75 80

Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp  
85 90 95

Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala  
100 105 110

Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln  
115 120 125

Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro  
130 135 140

Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr  
145 150 155 160

Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr  
165 170 175

Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly  
180 185 190

Leu Gly Leu Val Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala  
195 200 205

Leu Tyr Leu Leu Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys  
210 215 220

Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala  
225 230 235 240

Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Gly Gly Ser Ala Thr Thr Ser  
245 250 255

Ala Thr Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro  
260 265 270

Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val  
275 280 285

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

290

295

300

Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val  
 305 310 315 320

Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His  
 325 330 335

Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val  
 340 345 350

Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg  
 355 360 365

Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu  
 370 375 380

Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu  
 385 390 395 400

Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln  
 405 410 415

Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp  
 420 425 430

Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly  
 435 440 445

Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser  
 450 455 460

Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu  
 465 470 475 480

Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr  
 485 490 495

Lys

<210> 162  
 <211> 561  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 2C10\_3h56 HC

<400> 162

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Val | Lys | Lys | Pro | Gly | Ala |  | 1   | 5   | 10  | 15  |
| Ser | Val | Lys | Val | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Asn | Tyr |  | 20  | 25  | 30  |     |
| Trp | Met | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Arg | Leu | Glu | Trp | Ile |  | 35  | 40  | 45  |     |
| Gly | Tyr | Ile | Asn | Pro | Ser | Asn | Asp | Tyr | Thr | Lys | Tyr | Asn | Gln | Lys | Phe |  | 50  | 55  | 60  |     |
| Lys | Asp | Arg | Ala | Thr | Leu | Thr | Ala | Asp | Lys | Ser | Ala | Asn | Thr | Ala | Tyr |  | 65  | 70  | 75  | 80  |
| Met | Glu | Leu | Ser | Ser | Leu | Arg | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |  | 85  | 90  | 95  |     |
| Ala | Arg | Gln | Gly | Phe | Pro | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val |  | 100 | 105 | 110 |     |
| Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Ser |  | 115 | 120 | 125 |     |
| Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys |  | 130 | 135 | 140 |     |
| Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu |  | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu |  | 165 | 170 | 175 |     |
| Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr |  | 180 | 185 | 190 |     |
| Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val |  | 195 | 200 | 205 |     |
| Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro |  | 210 | 215 | 220 |     |
| Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe |  | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val |  | 245 | 250 | 255 |     |

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
275 280 285

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

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
305 310 315 320

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
325 330 335

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

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

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

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
385 390 395 400

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

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Thr Glu Val Gln  
435 440 445

Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg  
450 455 460

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asp Tyr Glu Met Trp  
465 470 475 480

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Arg Val Ser Ala Ile  
485 490 495

Asn Pro Gln Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Met Gly Arg  
500 505 510

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met  
515 520 525

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Leu  
530 535 540

Pro Phe Thr Phe Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
545 550 555 560

Ser

<210> 163  
<211> 566  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ADC-1013\_3h56 HC

<400> 163

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Gly Gly Ser Ser Tyr Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Ile Leu Arg Gly Gly Ser Gly Met Asp Leu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
130 135 140

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala | Gly | Gly | Pro |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys |

405

410

415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
420 425 430

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

Gly Thr Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro  
450 455 460

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg  
465 470 475 480

Asp Tyr Glu Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
485 490 495

Arg Val Ser Ala Ile Asn Pro Gln Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp  
500 505 510

Ser Val Met Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr  
515 520 525

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
530 535 540

Tyr Cys Ala Lys Leu Pro Phe Thr Phe Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr  
545 550 555 560

Leu Val Thr Val Ser Ser  
565

<210> 164  
<211> 566  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> CD40.1\_3h56 HC

<400> 164

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

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

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
130 135 140

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

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro  
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
290 295 300



Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
325 330 335

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

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

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
420 425 430

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

Gly Thr Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro  
450 455 460

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg  
465 470 475 480

Asp Tyr Glu Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
485 490 495

Arg Val Ser Ala Ile Asn Pro Gln Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp  
500 505 510

Ser Val Met Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr  
515 520 525

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
530 535 540

Tyr Cys Ala Lys Leu Pro Phe Thr Phe Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr  
545 550 555 560

Leu Val Thr Val Ser Ser  
565

<210> 165  
<211> 573  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> selicrelumab\_3h56 HC

<400> 165

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asp Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr  
100 105 110

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser  
115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr  
130 135 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro  
145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val  
165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser  
180 185 190

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

|                                                                 |     |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| 195                                                             |     | 200 |     | 205 |
| Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val | 210 | 215 | 220 |     |
| Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro | 245 | 250 | 255 |     |
| Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val | 260 | 265 | 270 |     |
| Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val | 275 | 280 | 285 |     |
| Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln | 290 | 295 | 300 |     |
| Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln | 305 | 310 | 315 | 320 |
| Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala | 325 | 330 | 335 |     |
| Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro | 340 | 345 | 350 |     |
| Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr | 355 | 360 | 365 |     |
| Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser | 370 | 375 | 380 |     |
| Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr | 385 | 390 | 395 | 400 |
| Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr | 405 | 410 | 415 |     |
| Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe | 420 | 425 | 430 |     |
| Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys | 435 | 440 | 445 |     |
| Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Thr Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser |     |     |     |     |

450

455

460

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala  
 465 470 475 480

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asp Tyr Glu Met Trp Trp Val Arg Gln  
 485 490 495

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Arg Val Ser Ala Ile Asn Pro Gln Gly  
 500 505 510

Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Met Gly Arg Phe Thr Ile Ser  
 515 520 525

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg  
 530 535 540

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Leu Pro Phe Thr Phe  
 545 550 555 560

Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 565 570

<210> 166  
 <211> 569  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> teneleximab\_3h56 HC

<400> 166

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys  
 85 90 95

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Arg | Ser | Gly | Asn | Gly | Asn | Tyr | Asp | Leu | Ala | Tyr | Phe | Ala | Tyr | Trp | 100 | 105 | 110 |     |
| Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | 115 | 120 | 125 |     |
| Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | 130 | 135 | 140 |     |
| Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | 165 | 170 | 175 |     |
| Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | 180 | 185 | 190 |     |
| Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | 195 | 200 | 205 |     |
| His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | 210 | 215 | 220 |     |
| Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | 245 | 250 | 255 |     |
| Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | 260 | 265 | 270 |     |
| His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | 275 | 280 | 285 |     |
| Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | 290 | 295 | 300 |     |
| Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | 305 | 310 | 315 | 320 |
| Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | 325 | 330 | 335 |     |
| Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | 340 | 345 | 350 |     |

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

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
420 425 430

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

Ser Pro Gly Gly Thr Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu  
450 455 460

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe  
465 470 475 480

Thr Phe Arg Asp Tyr Glu Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys  
485 490 495

Gly Leu Glu Arg Val Ser Ala Ile Asn Pro Gln Gly Thr Arg Thr Tyr  
500 505 510

Tyr Ala Asp Ser Val Met Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser  
515 520 525

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr  
530 535 540

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Leu Pro Phe Thr Phe Asp Asp Trp Gly  
545 550 555 560

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
565

<210> 167  
<211> 213  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 2C10 LC

<400> 167

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
65 70 75 80

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

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

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr  
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu  
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser  
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala  
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 168

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ADC-1013 LC

<400> 168

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly  
20 25 30

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

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

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

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Lys Ser  
85 90 95

Ile Ser Gly Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105 110

Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe  
130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val  
145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys  
165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser  
180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu  
195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
210 215

<210> 169

<211> 219

<212> PRT



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD40.1 LC

<400> 169

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
20 25 30

Asn Ala Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser  
85 90 95

Ile His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

<210> 170

<211> 214  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Selicrelumab LC

<400> 170

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

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

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

Tyr Thr Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 171  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Teneleximab LC

<400> 171

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

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr  
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile  
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser His Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln His Gly His Ser Phe Pro Trp  
85 90 95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

<210> 172  
 <211> 455  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> selicrelumab IgG1 LALA HC

<400> 172

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asp Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr  
 100 105 110

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser  
 115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr  
 130 135 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro  
 145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val  
 165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser  
 180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile  
 195 200 205



<210> 173  
<211> 448  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ADC-1013 IgG1 HC

<400> 173

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Gly Gly Ser Ser Tyr Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Ile Leu Arg Gly Gly Ser Gly Met Asp Leu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
130 135 140

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

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
195 200 205

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



<220>

<223> 3h-56 IgG1 LALA HC

<400> 174

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

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

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

Ser Ala Ile Asn Pro Gln Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Lys Leu Pro Phe Thr Phe Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro  
115 120 125

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
130 135 140

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
145 150 155 160

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
165 170 175

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
180 185 190

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
195 200 205

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
210 215 220

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
225 230 235 240



Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
245 250 255

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
260 265 270

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
275 280 285

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
290 295 300

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln  
305 310 315 320

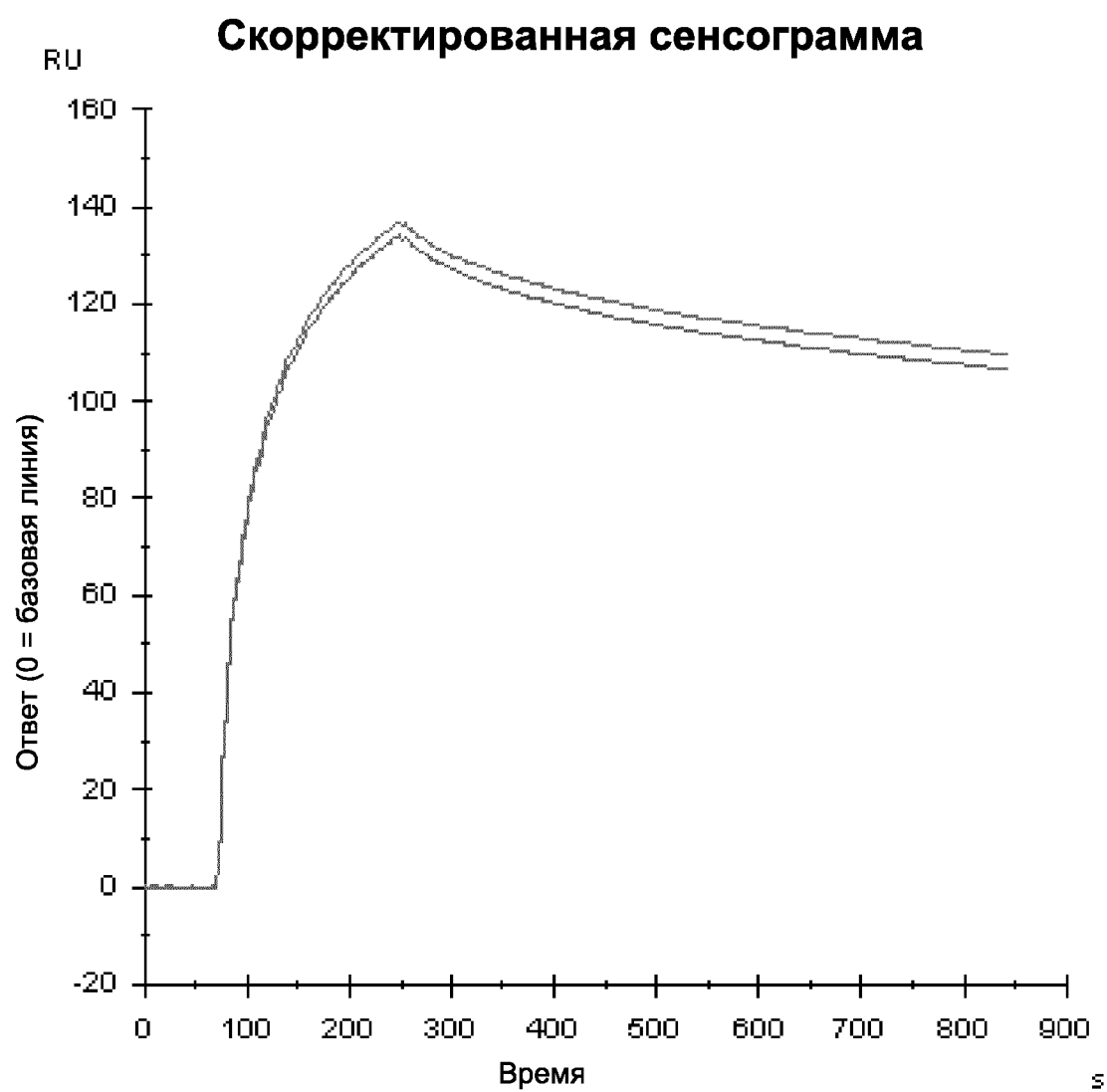
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
325 330 335

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
340 345

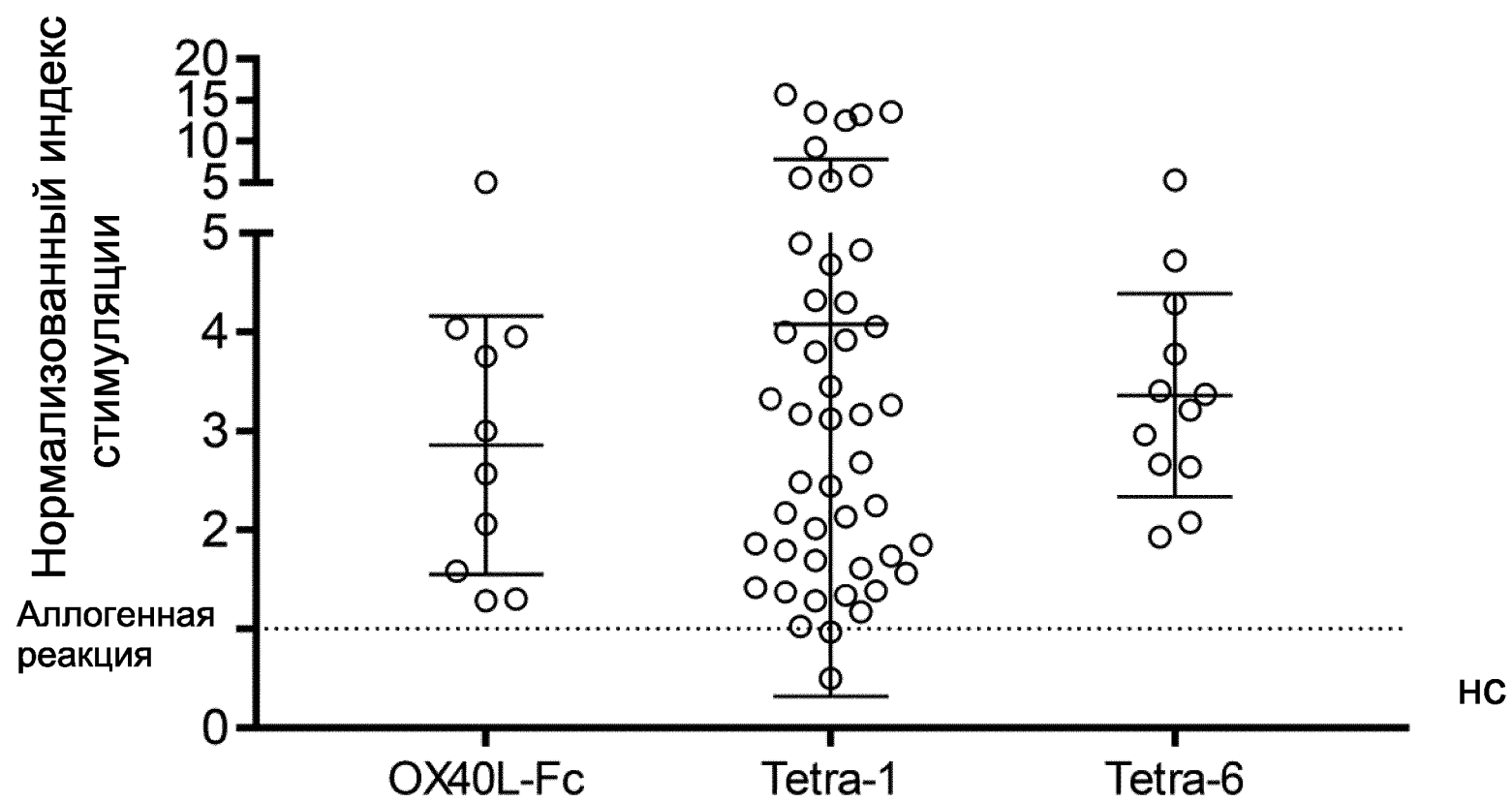
## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Агонист TNFR, содержащий связывающие участки, специфичные по меньшей мере к двум различным частям указанного TNFR.
2. Агонист TNFR по п.1, отличающийся тем, что указанный TNFR участвует в  
5 костимуляции Т-клеточных ответов.
3. Агонист TNFR по п.1 или 2, отличающийся тем, что указанный TNFR выбран из группы, включающей: CD27, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), HVEM, CD30 и GITR.
4. Агонист TNFR по любому из пп.1-3, в котором указанные связывающие участки могут связываться с указанным TNFR одновременно.
- 10 5. Агонист TNFR по любому из пп.1-4, содержащий по меньшей мере два связывающих участка для каждой части указанного TNFR, которую связывает указанный агонист.
6. Агонист TNFR по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что указанные связывающие участки выбраны из группы, включающей антитела, дарпины, финомеры, аффимеры, рецепторы вариабельных лимфоцитов, антикалин, нанофитин, вариабельный  
15 рецептор нового антигена (VNAR) и их производные, такие как Fab, Fab', Fab'-SH, Fd, Fv, dAb, F(ab')<sub>2</sub>, scFv, Fcab, биспецифичные одноцепочечные димеры Fv, диатела, триатела.
7. Агонист TNFR по п.5 или 6, отличающийся тем, что указанные по меньшей мере  
20 два связывающих участка, которые связываются с одной и той же частью указанного TNFR, расположены на одном и том же пептидном конце указанного агониста.
8. Агонист TNFR по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что указанные связывающие участки связываются с различными доменами, обогащенными цистеином, (CRD) указанного TNFR.
- 25 9. Агонист TNFR по любому из пп.1-8, который оказывает агонистическое действие на OX40 и связывается с эпитопами в CRD 1 и CRD 3 или CRD 1 и CRD 4 в OX40.
10. Агонист TNFR по п.9, в котором по меньшей мере один OX40-связывающий участок выбран из группы, включающей: SEQ ID NO: 2, 3, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47,  
30 48, 49, или выделенные полипептиды, аминокислотная последовательность которых по меньшей мере на 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична указанным последовательностям.

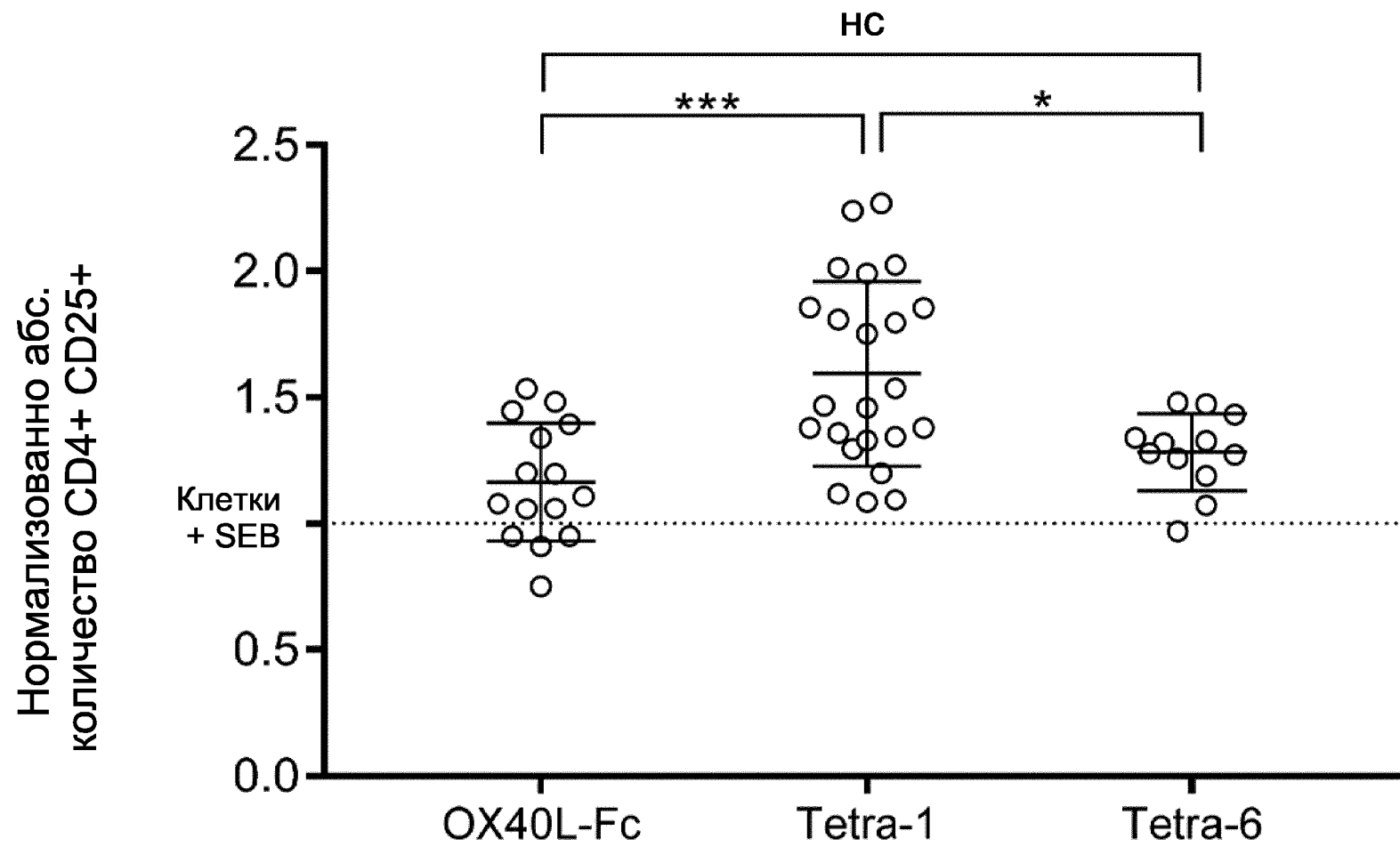
11. Агонист OX40, кодируемый SEQ ID NO: 45 и 16 или выделенными полипептидами, аминокислотная последовательность которых, по меньшей мере на 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична указанным последовательностям.
- 5 12. Применение агониста по любому из пп.1-11 в качестве лекарственного средства.
13. Применение агониста по любому из пп.1-11 для активации компонентов иммунной системы человека.
14. Применение агониста OX40 по любому из пп.1-11 в качестве лекарственного средства.
- 10 15. Применение по любому из пп.12-14 в сочетании с другим лекарственным средством.

**Фиг. 1**

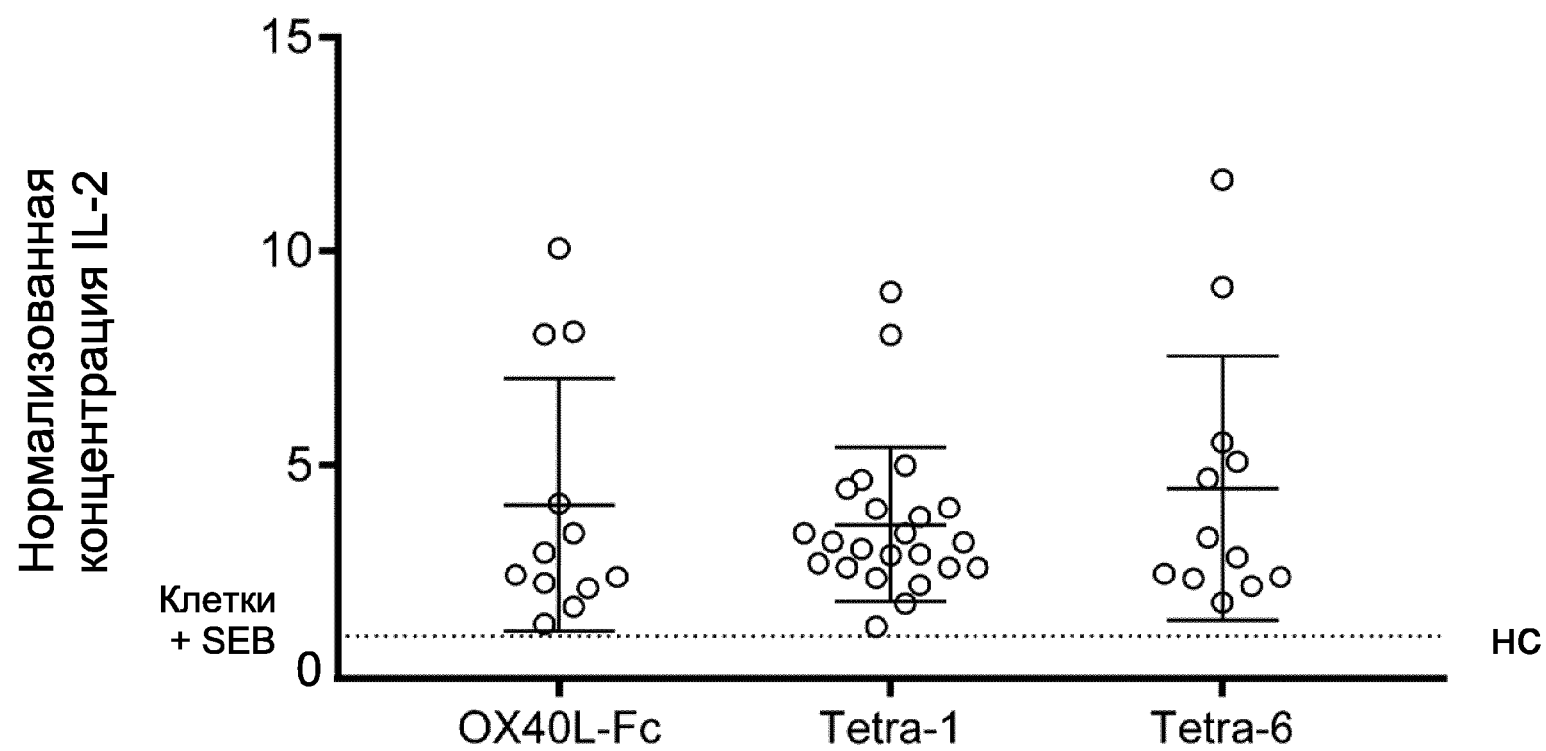
Фиг. 2



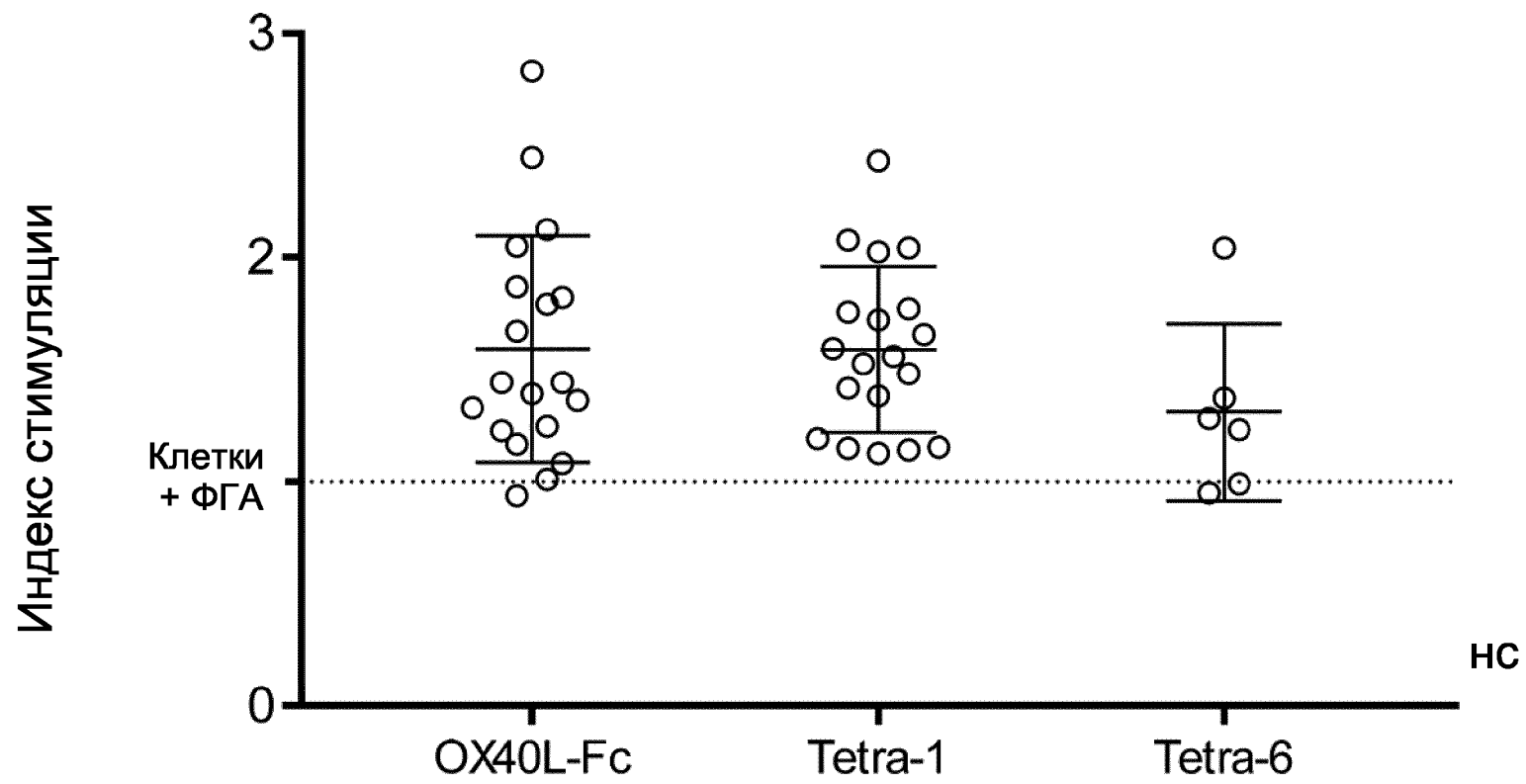
Фиг. 3А



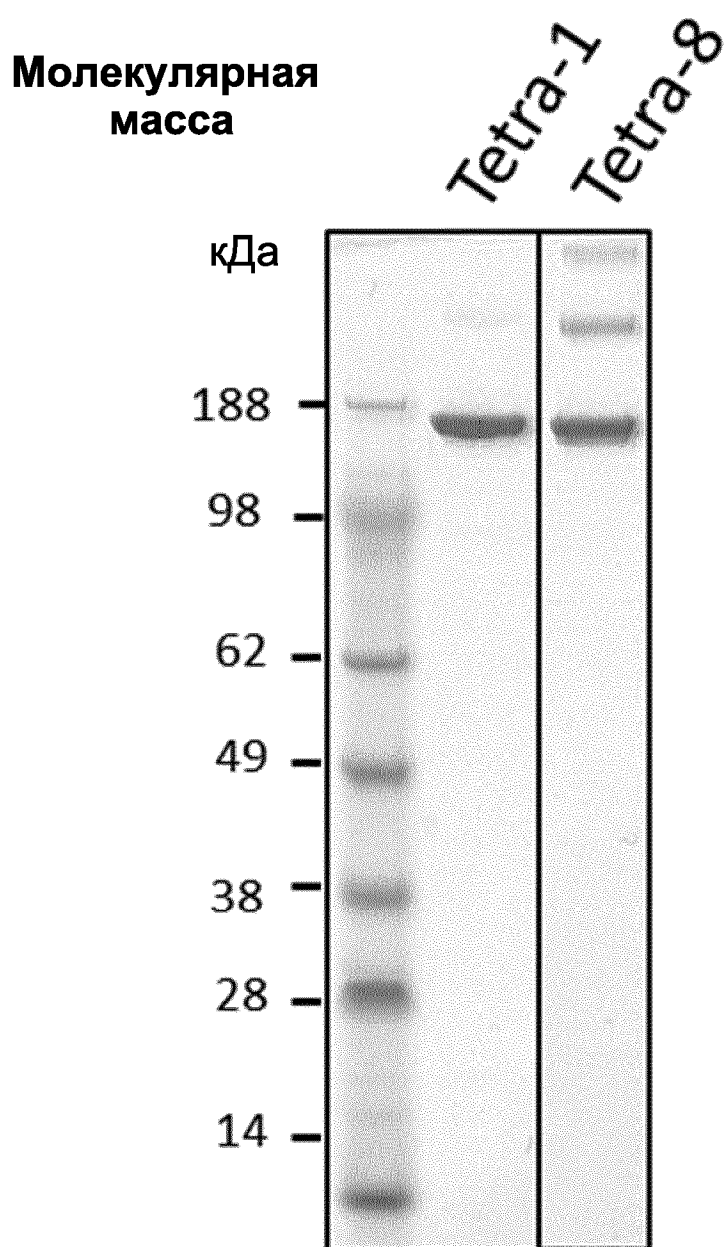
Фиг. 3В



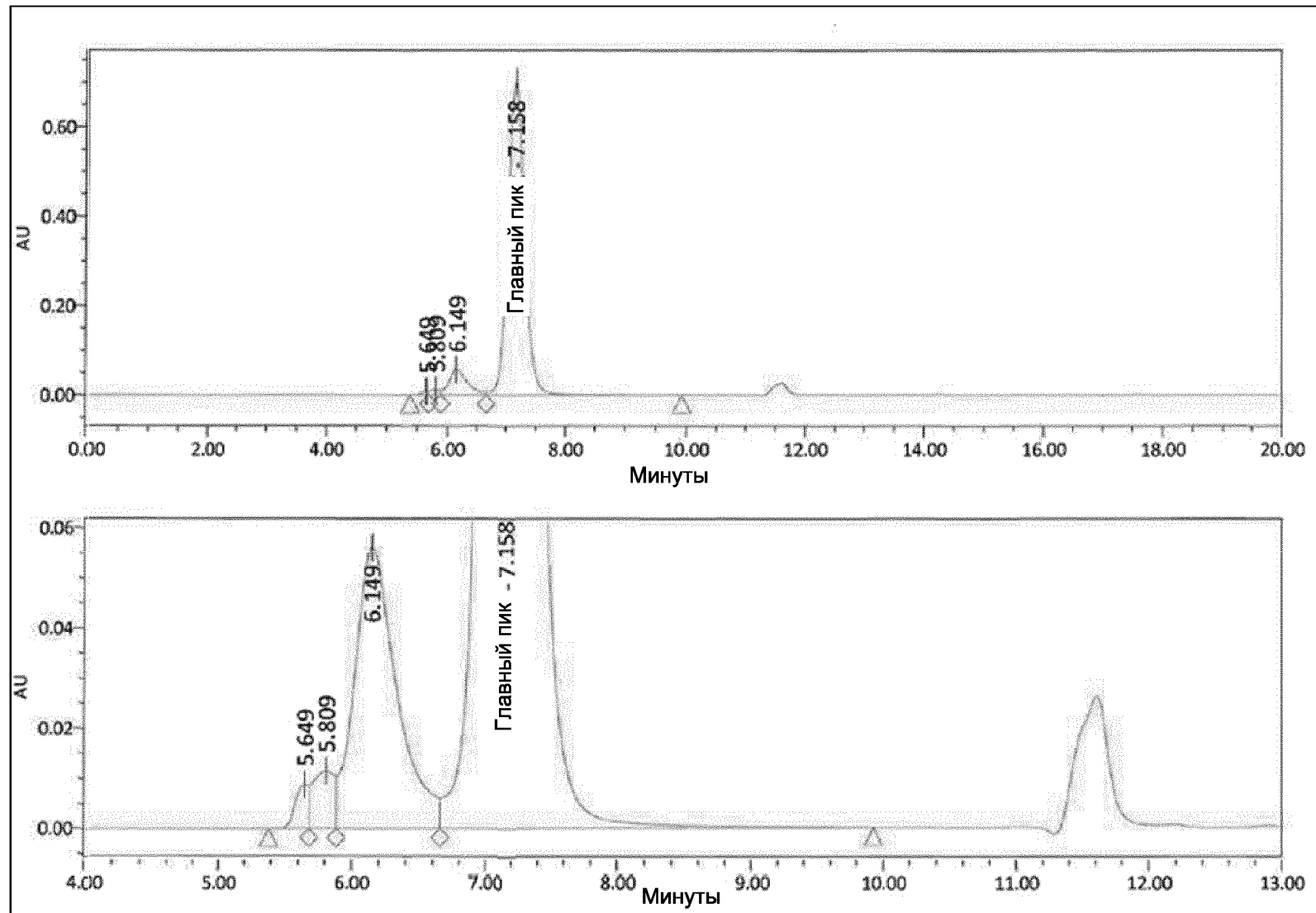
Фиг. 4



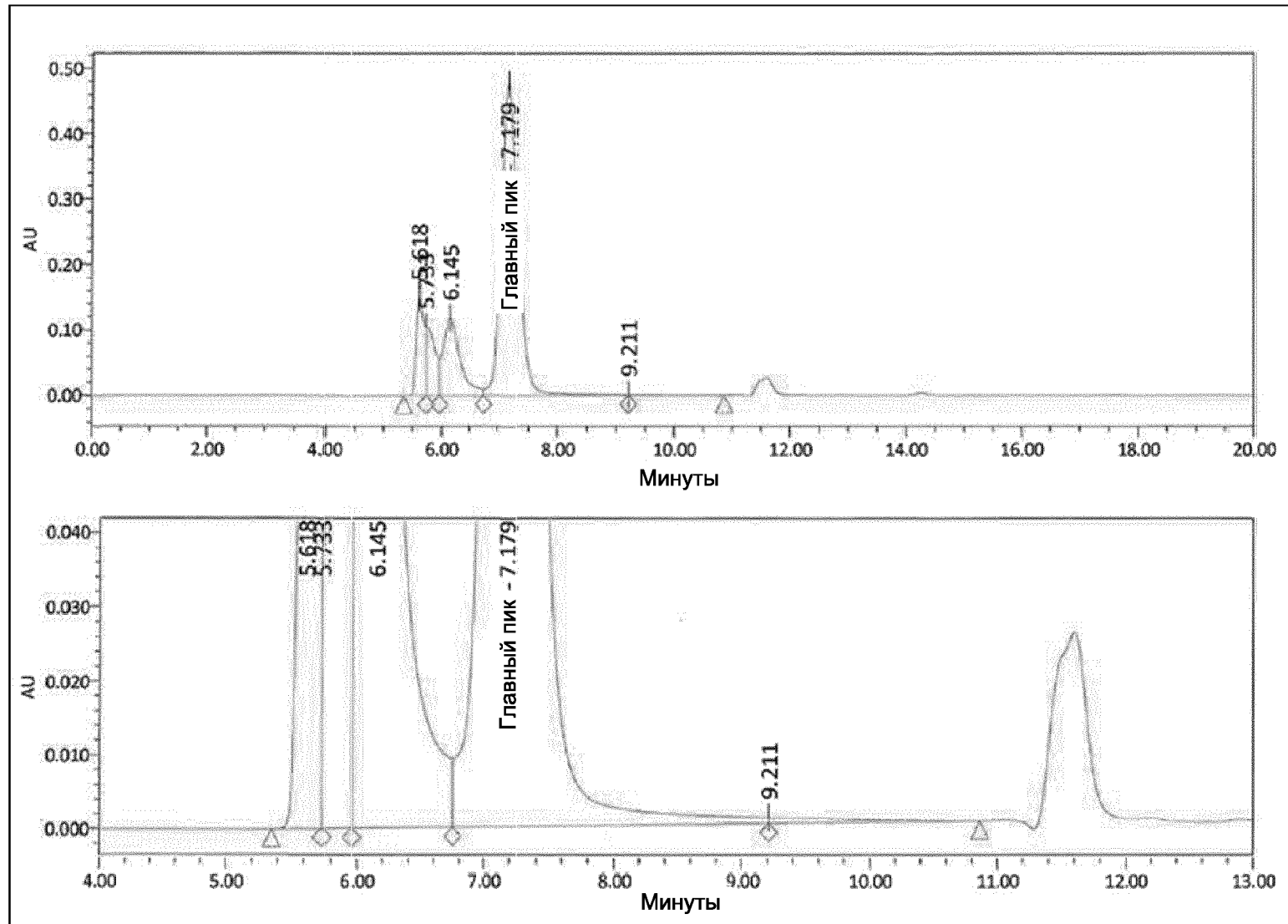


**Фиг. 5**

Фиг. 6А



Фиг. 6В



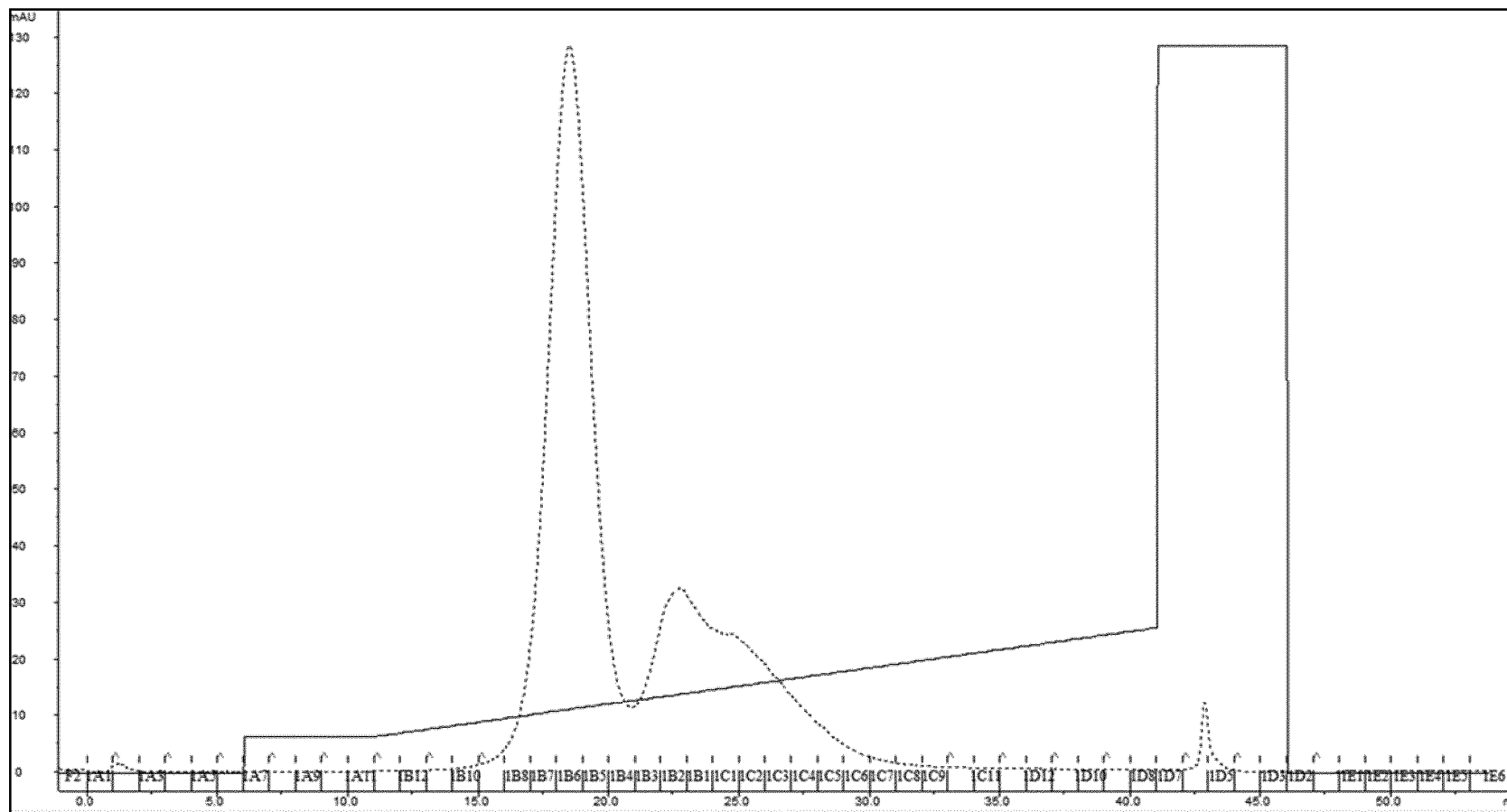
**Фиг. 6С**

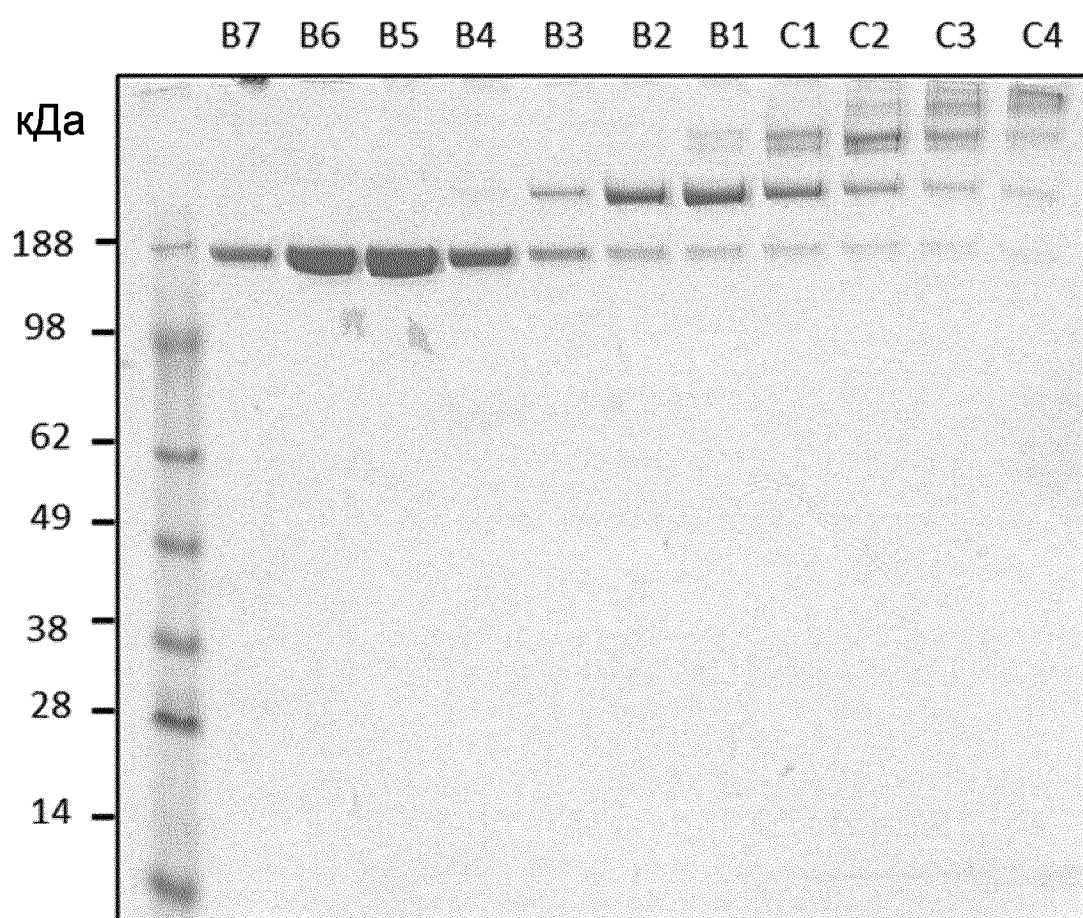
| Tetra-1                  |                         |                 |
|--------------------------|-------------------------|-----------------|
| Название                 | Время удерживания (мин) | Площадь пика, % |
| Мультимеры               | 5.649                   | 0.4             |
| Мультимеры               | 5.809                   | 0.9             |
| Мультимеры               | 6.149                   | 8.3             |
| Мономер<br>(главный пик) | 7.158                   | 90.4            |

**Фиг. 6D**

| Tetra-8                  |                         |                 |
|--------------------------|-------------------------|-----------------|
| Название                 | Время удерживания (мин) | Площадь пика, % |
| Мультимеры               | 5.618                   | 9.9             |
| Мультимеры               | 5.733                   | 7.8             |
| Мультимеры               | 6.145                   | 17.4            |
| Мономер<br>(главный пик) | 7.179                   | 64.6            |
| Фрагменты                | 9.211                   | 0.3             |

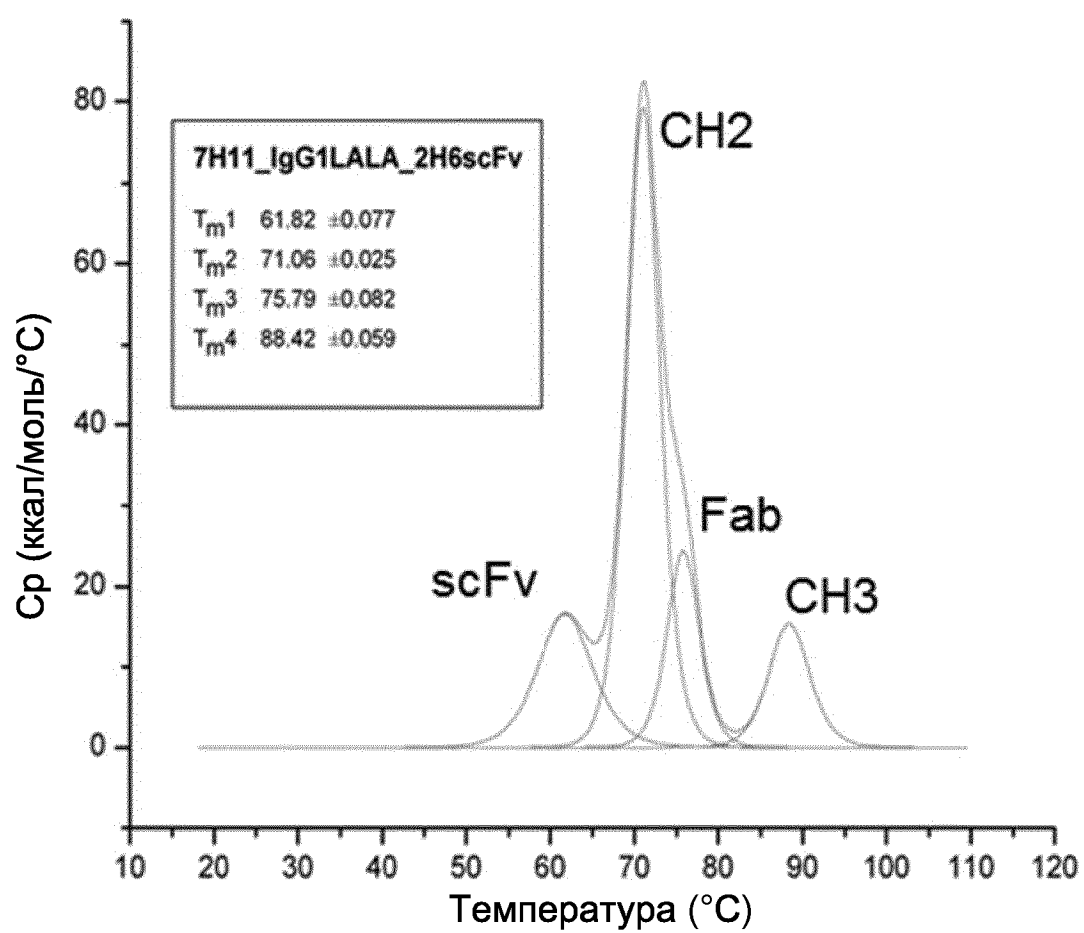
Фиг. 7А



**Фиг. 7В**

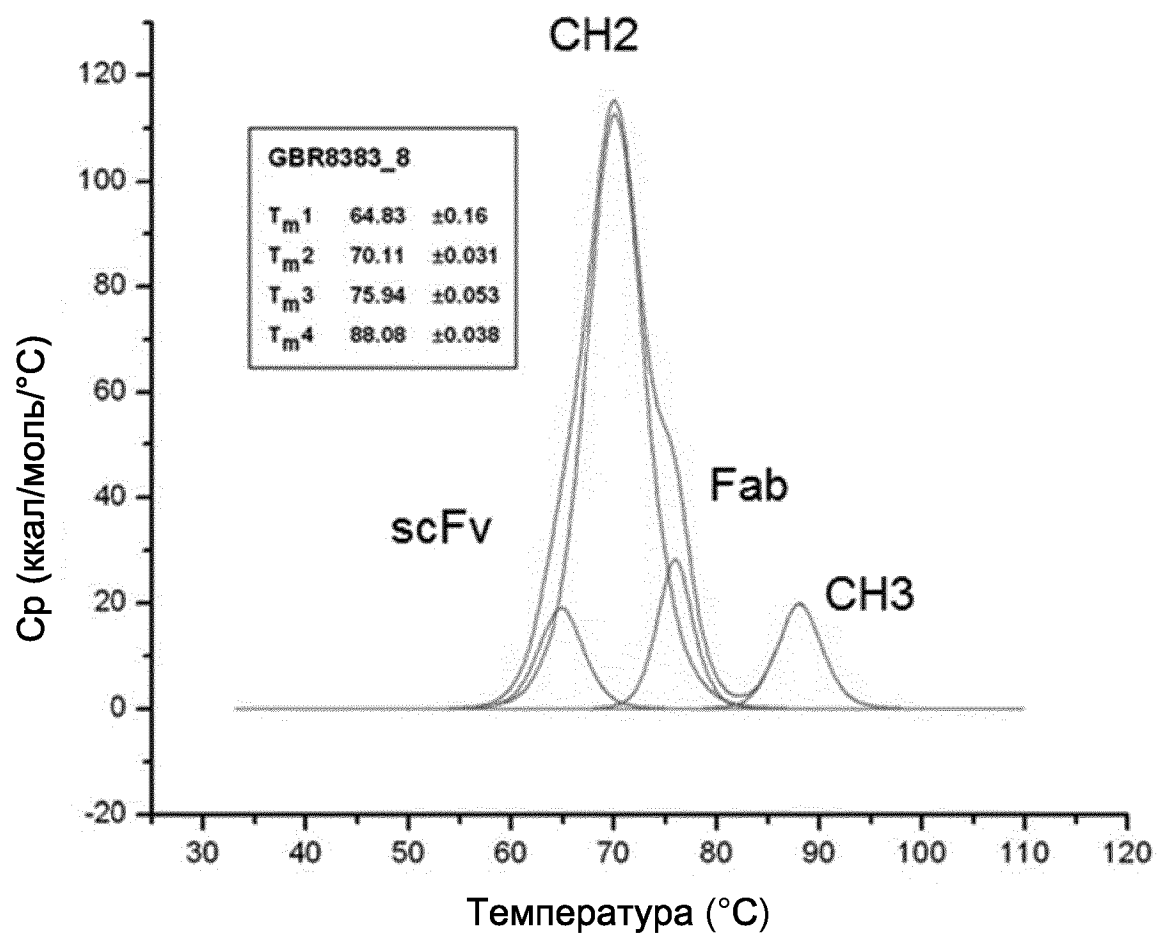
**Фиг. 8А**

Tetra-1



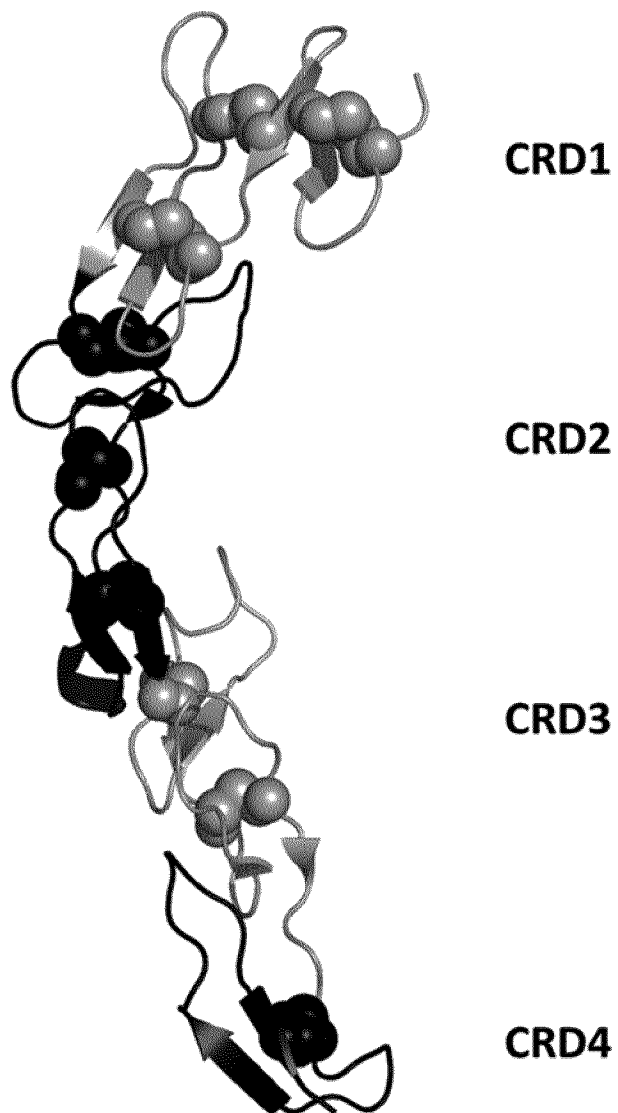
**Фиг. 8В**

Tetra-8

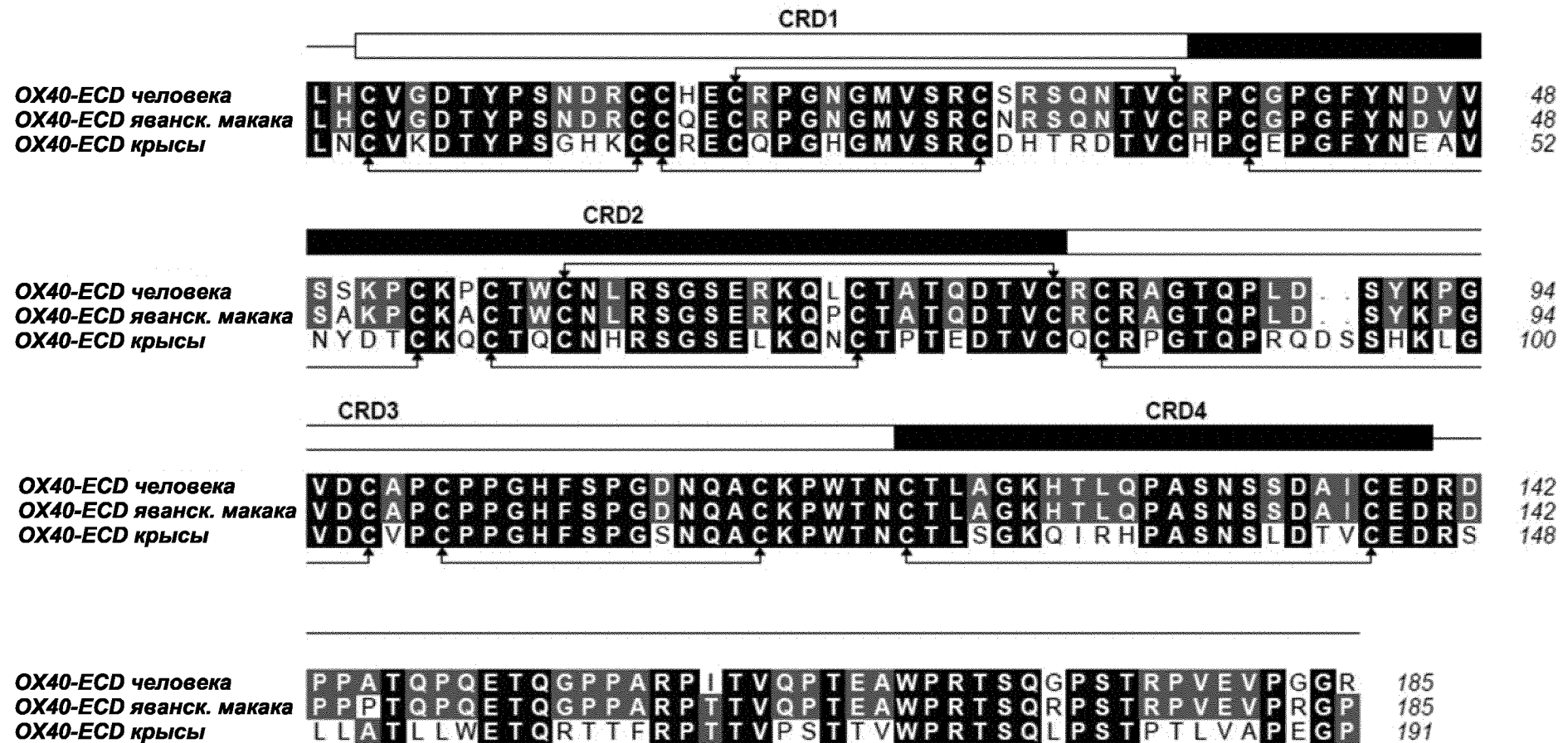


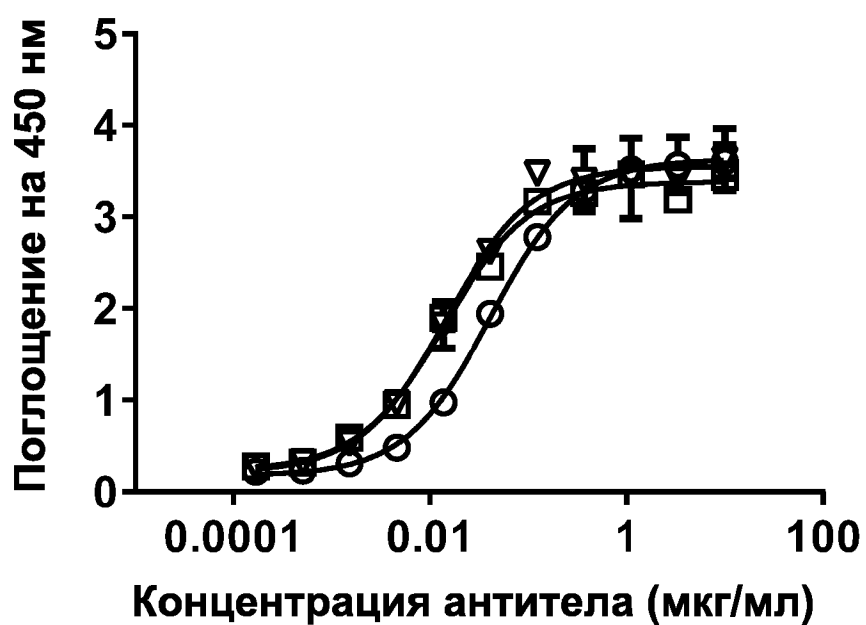
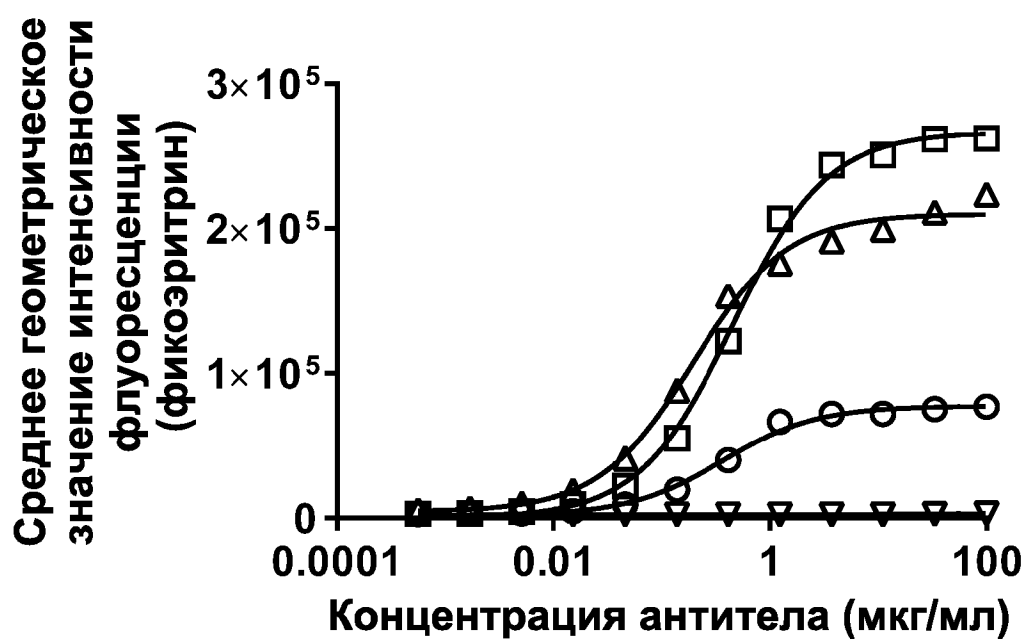


**Фиг. 9**

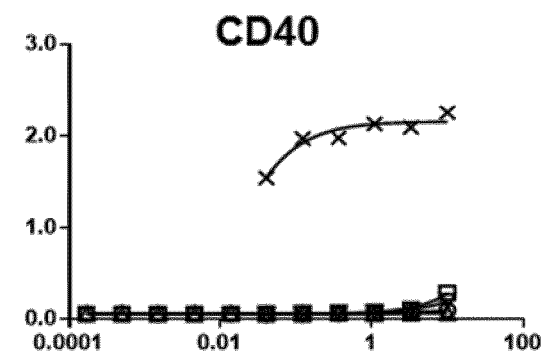
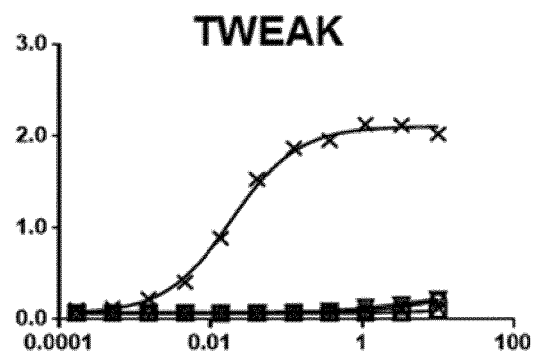
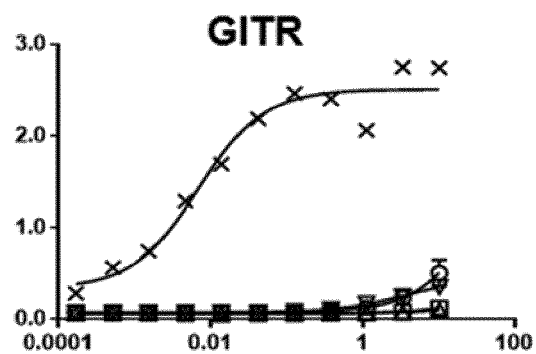
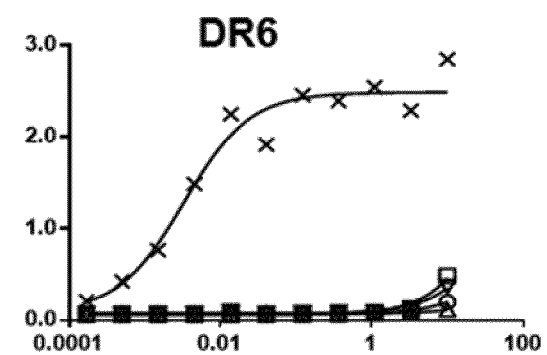
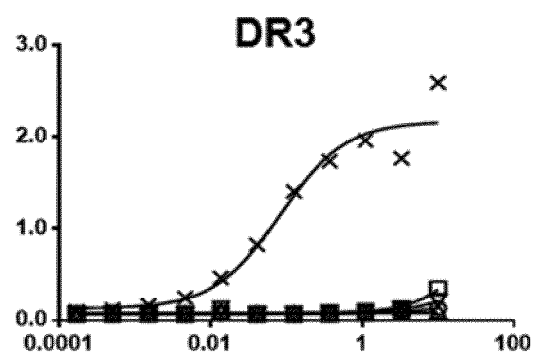
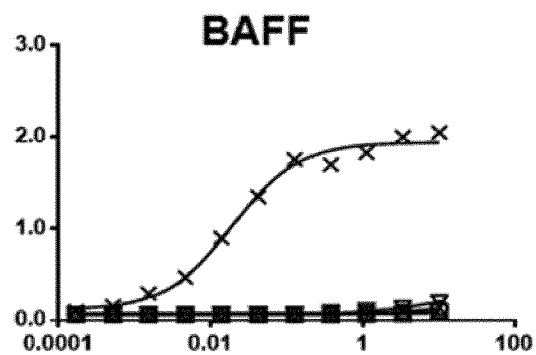


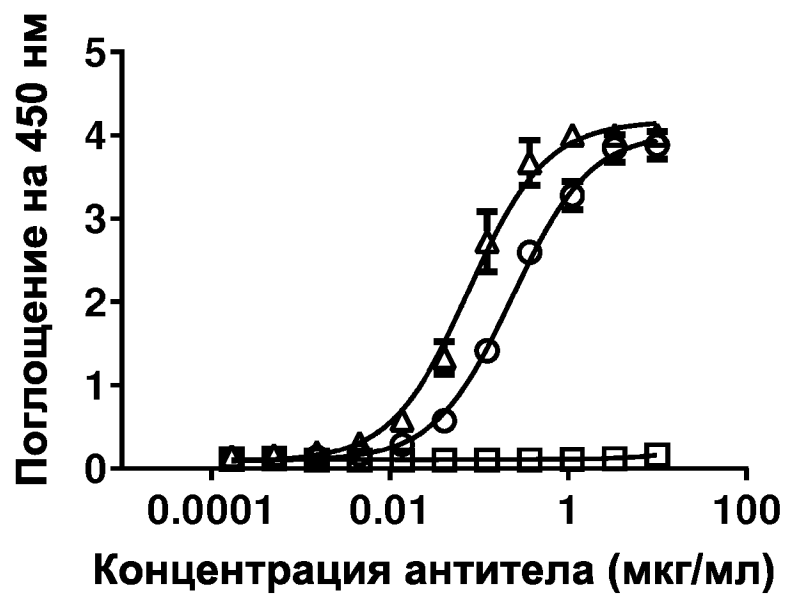
Фиг. 10



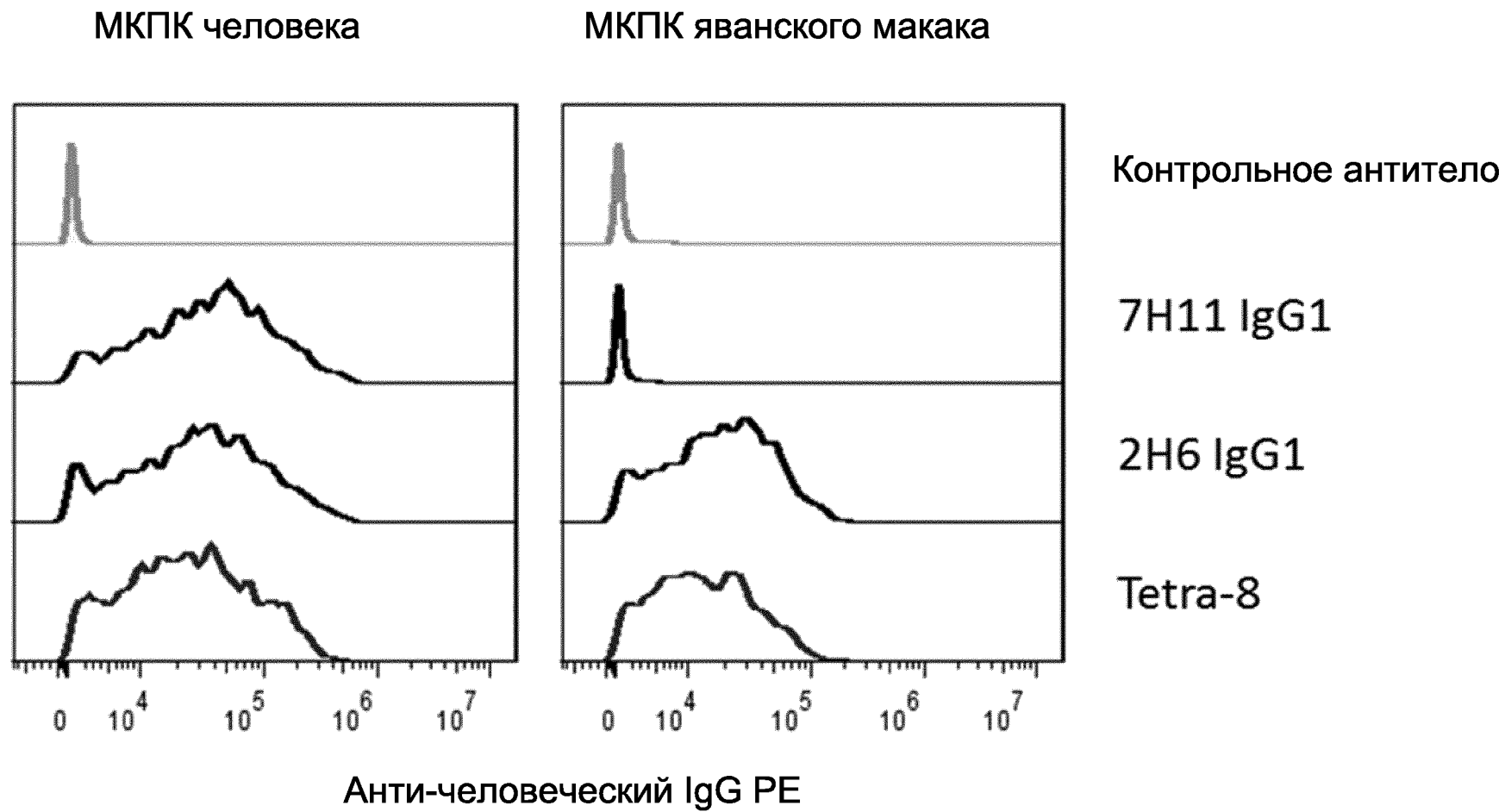
**Фиг. 11****Рецептор ОХ40 человека****Фиг. 12**

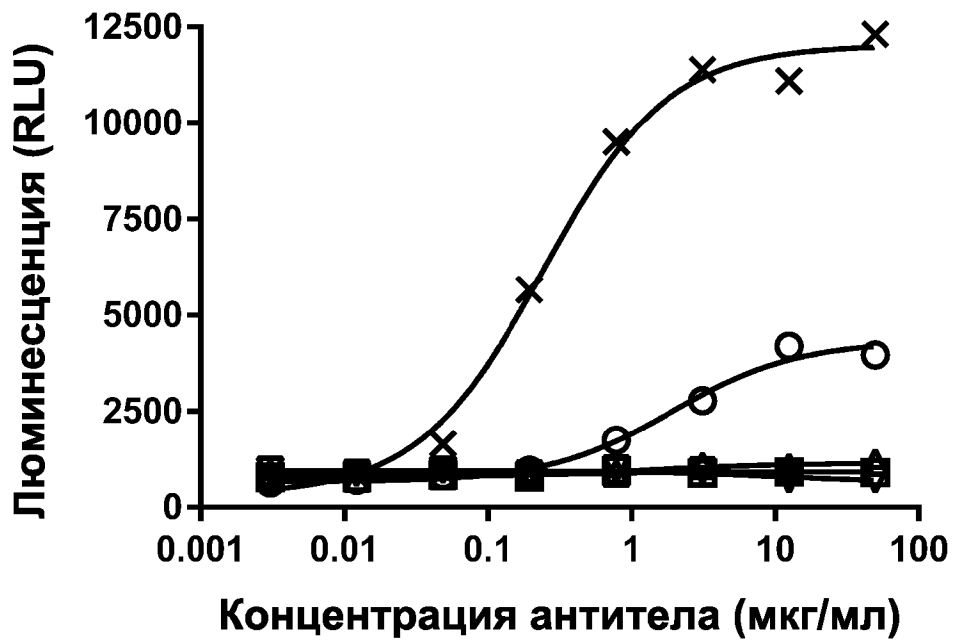
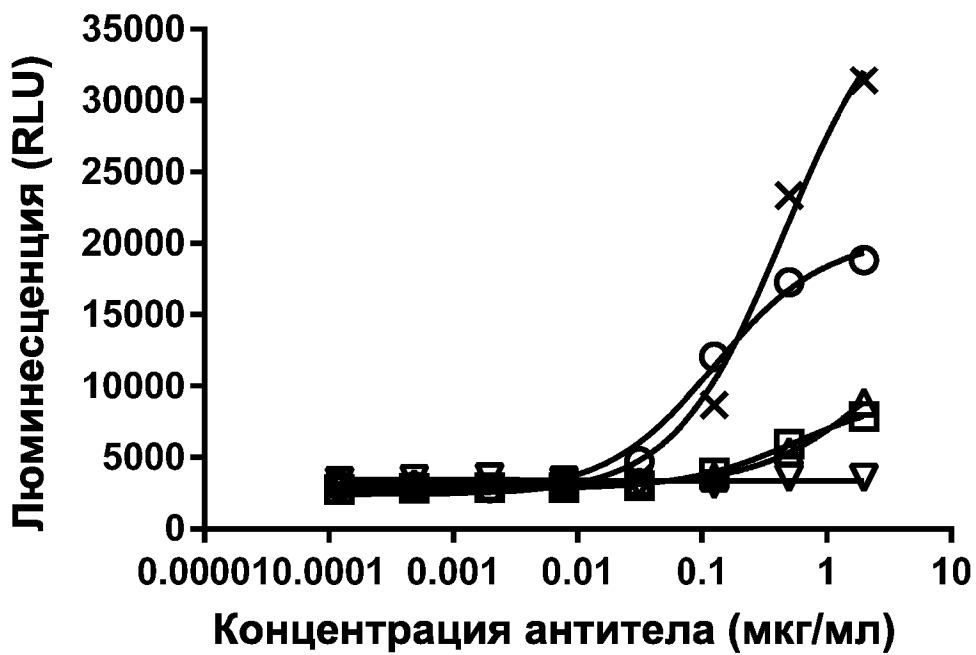
Фиг. 13



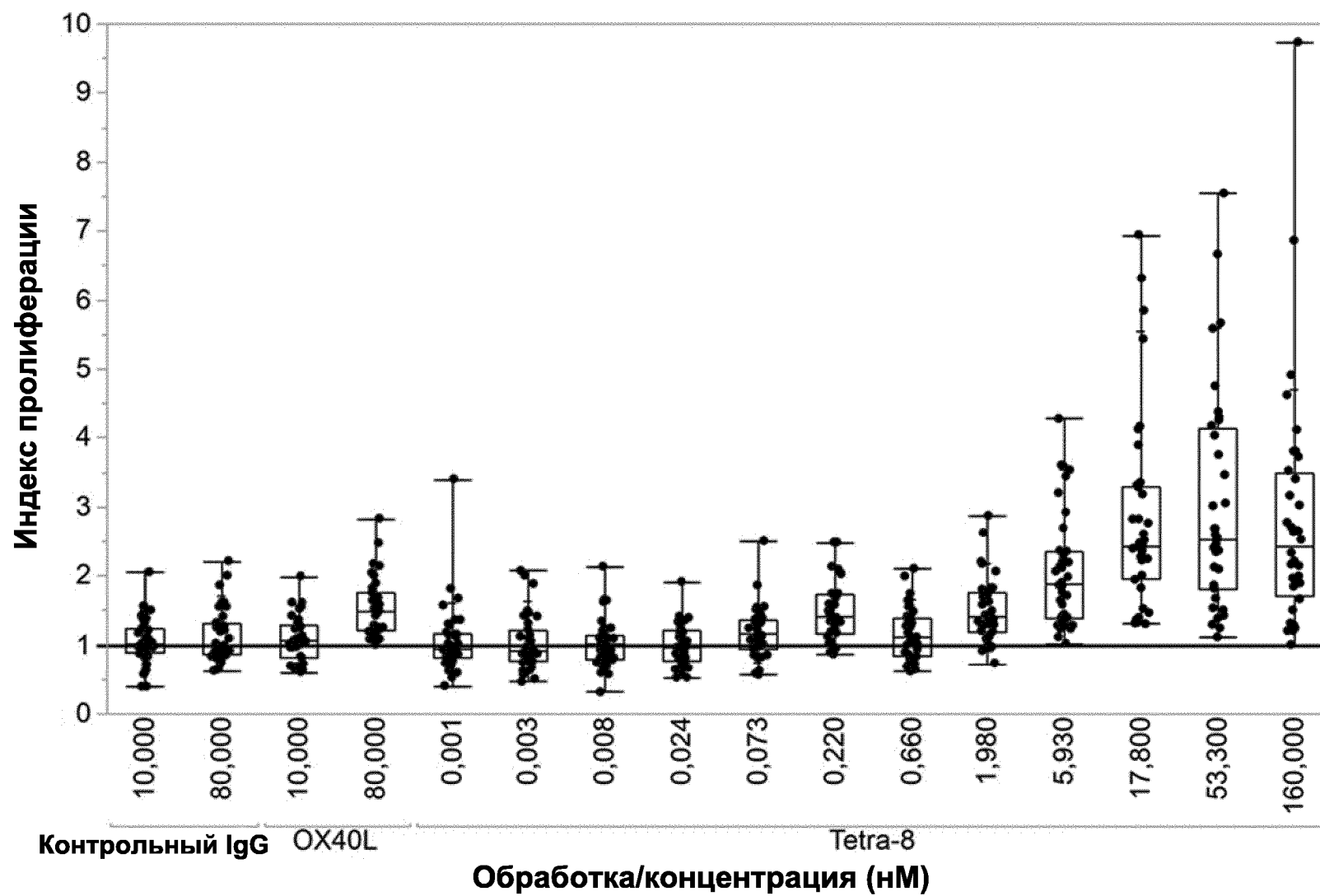
**Фиг. 14****ОХ40 яванского макака**

**Фиг. 15**



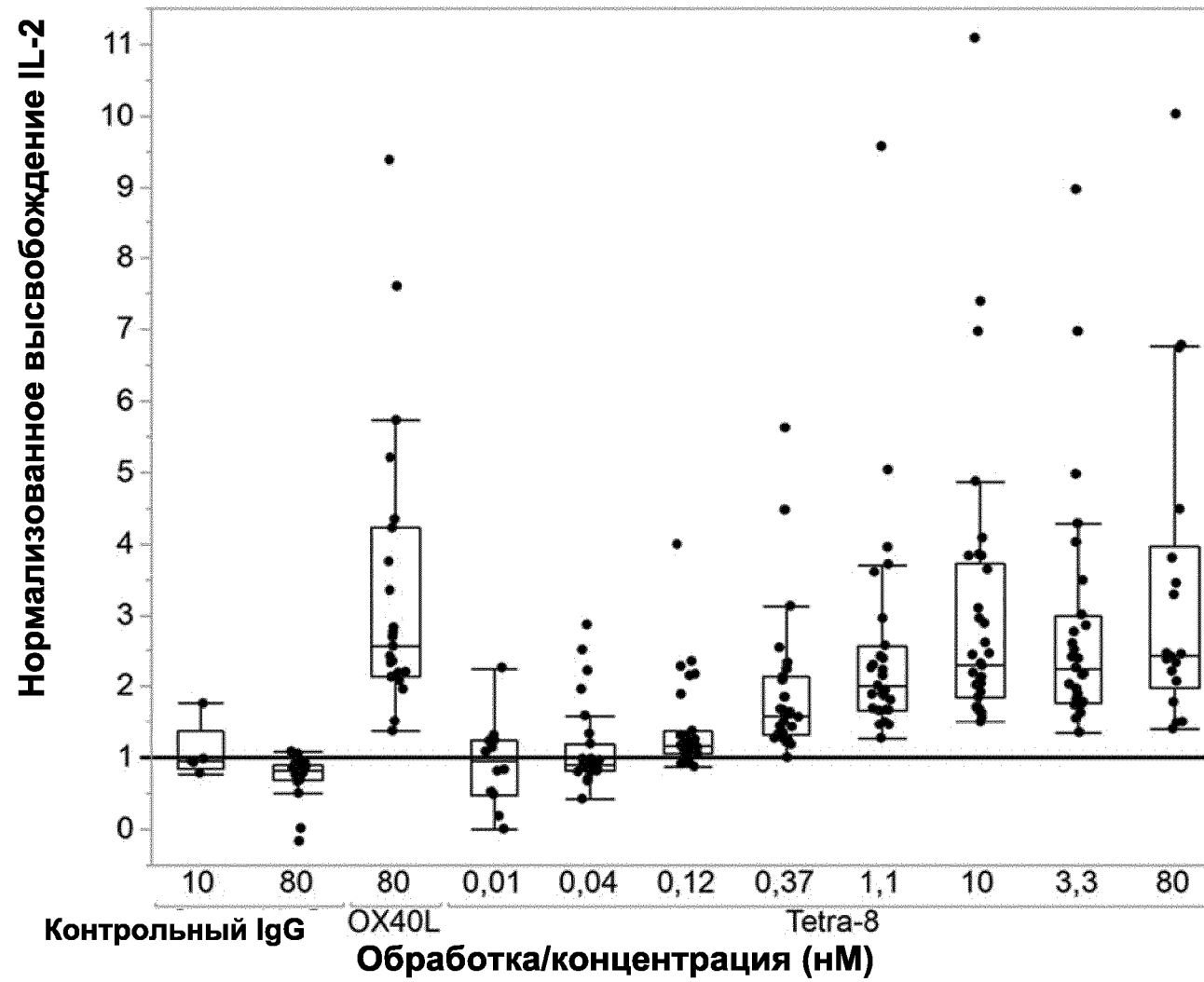
**Фиг. 16****Без анти-CD3 стимуляции****С анти-CD3 стимуляции**

Фиг. 17

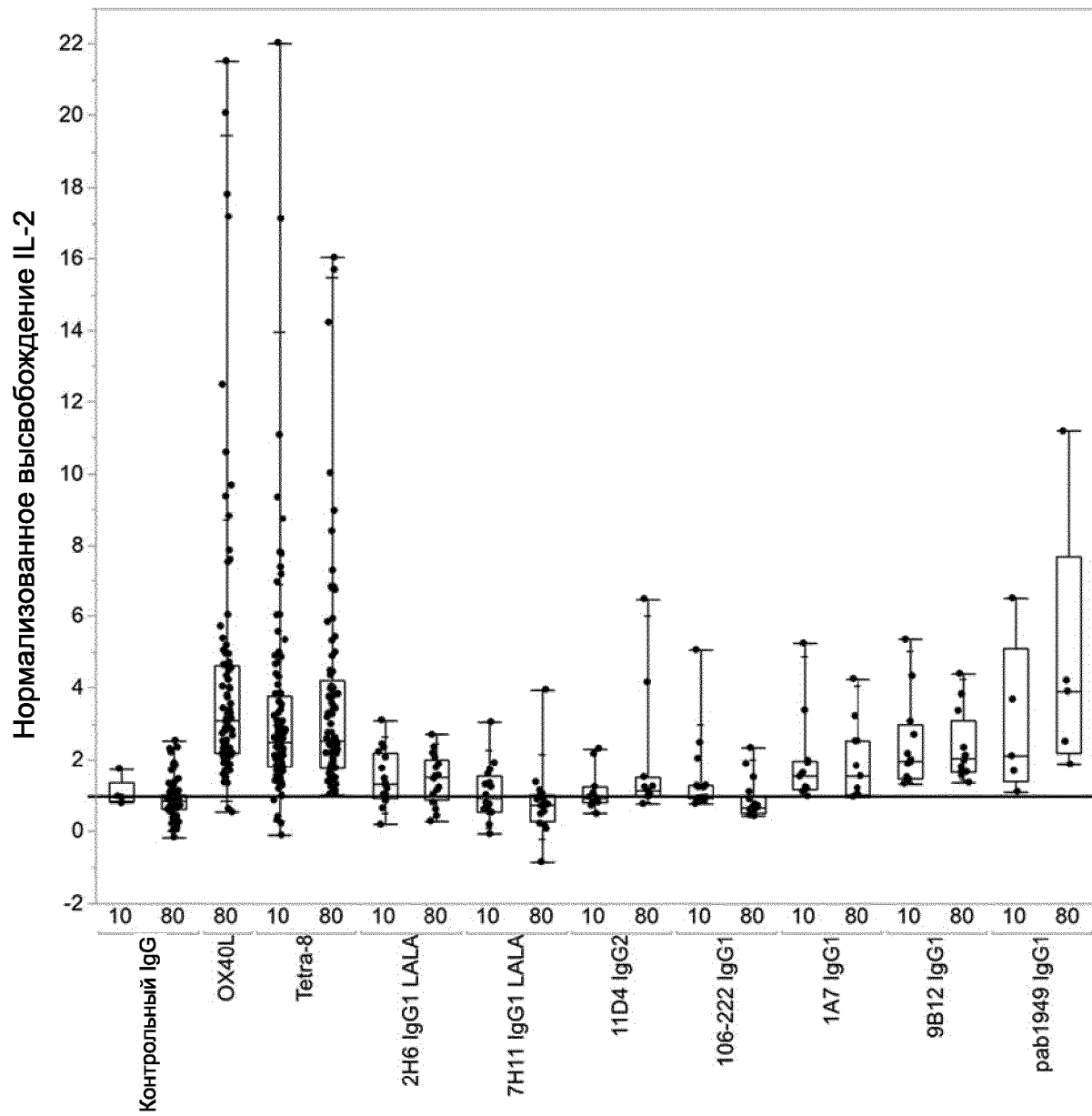




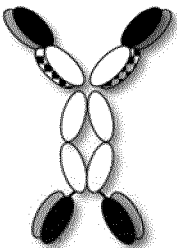
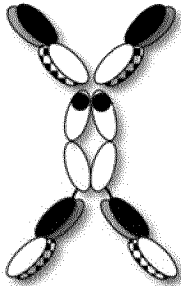
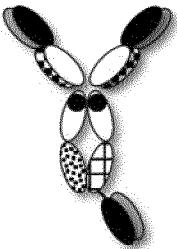
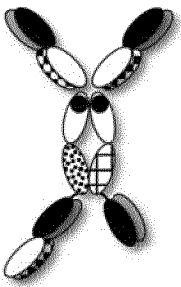
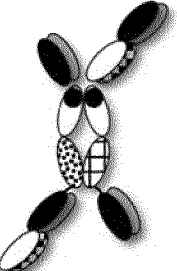
Фиг. 18



Фиг. 19

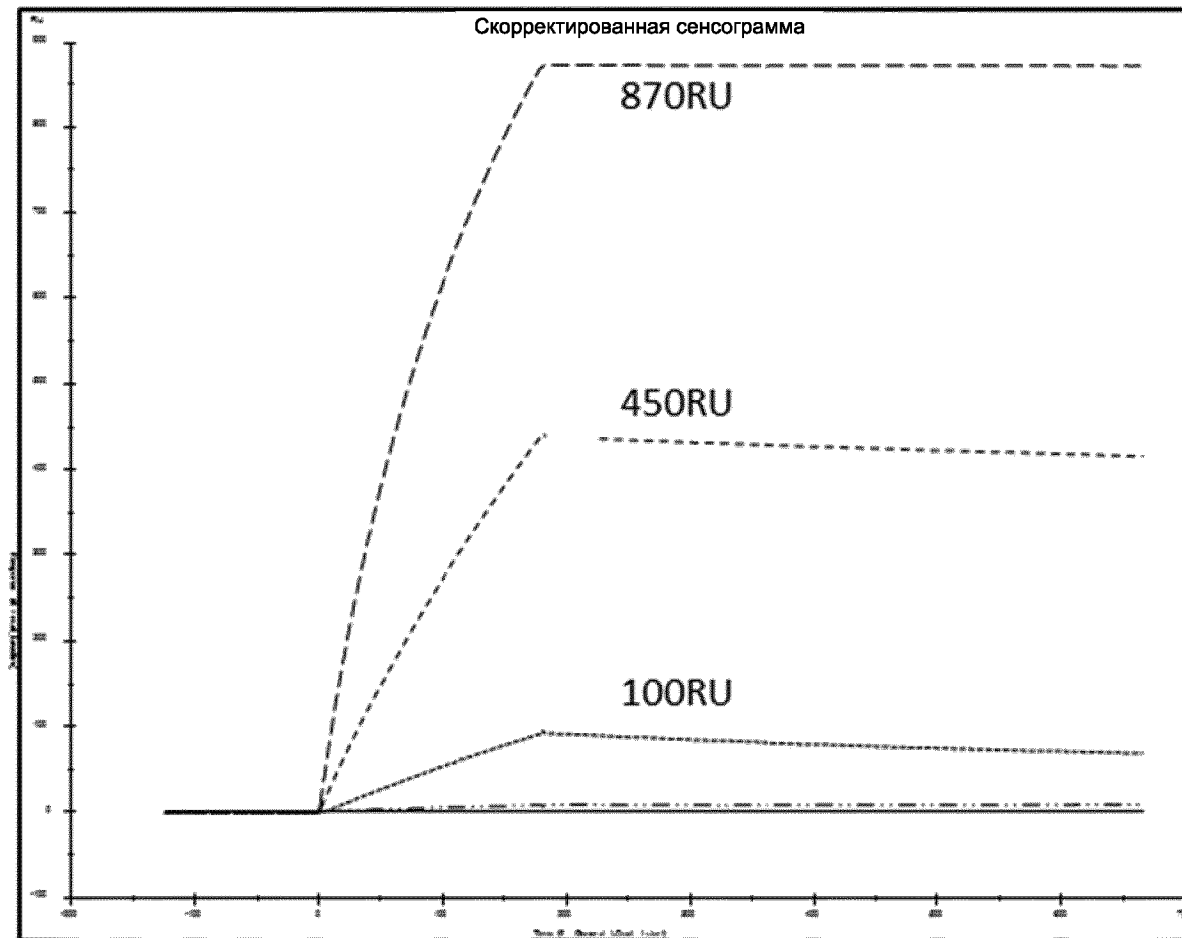


**Фиг. 20**

| Формат                                                                              | Номенклатура | Формат                                                                              | Номенклатура         |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
|    | Tetra-13     |   | Tetra-17<br>Tetra-18 |
|   | Tri-8        |  | Tetra-19<br>Tetra-20 |
|  | Tetra-21     |                                                                                     |                      |

# Фиг. 21А

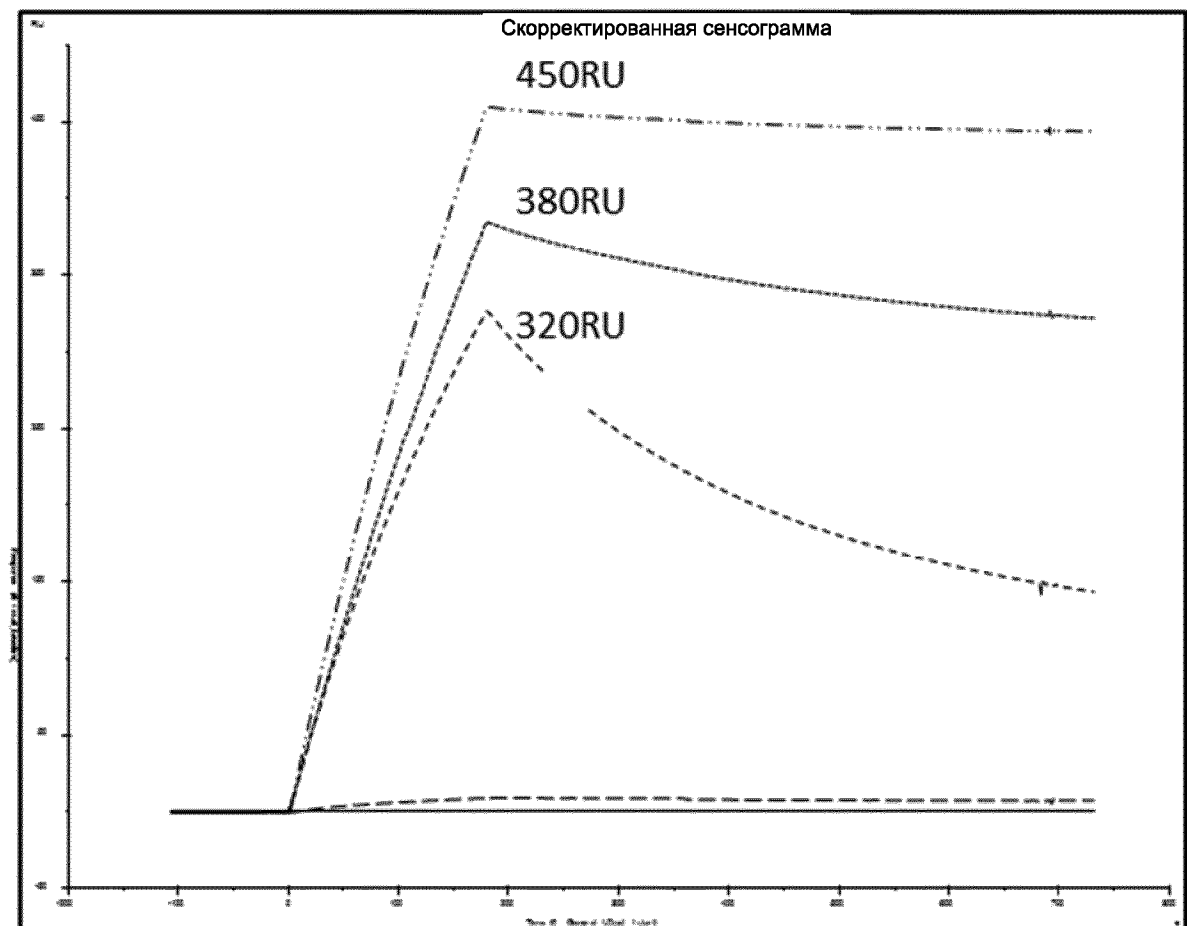
chiOX40R-Fc HHRH на чипе (Fc2-1)



- Fc-2H6 Fab/2H6 Fab
- ..... Fc-2H6 Fab/7H11 scFv
- Fc-7H11 Fab/2H6 scFv
- Fc-7H11 Fab/7H11 Fab
- Буфер

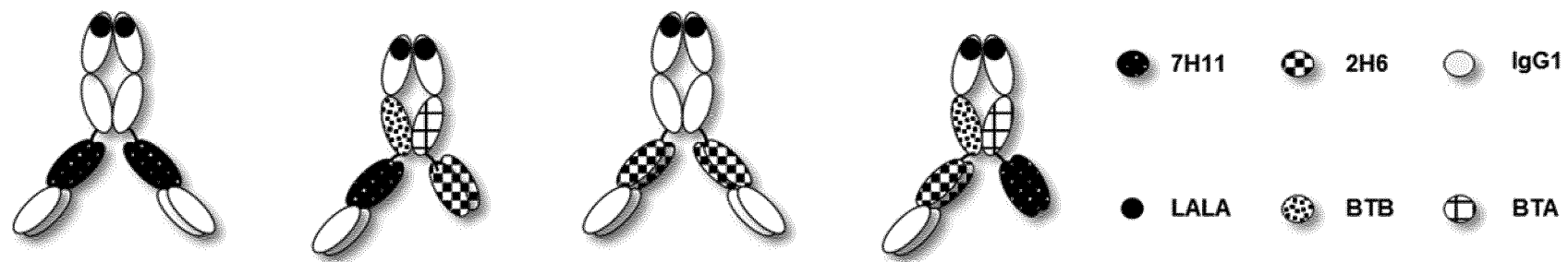
## Фиг. 21В

chiOX40R-Fc RRHH на чипе (Fc4-3)



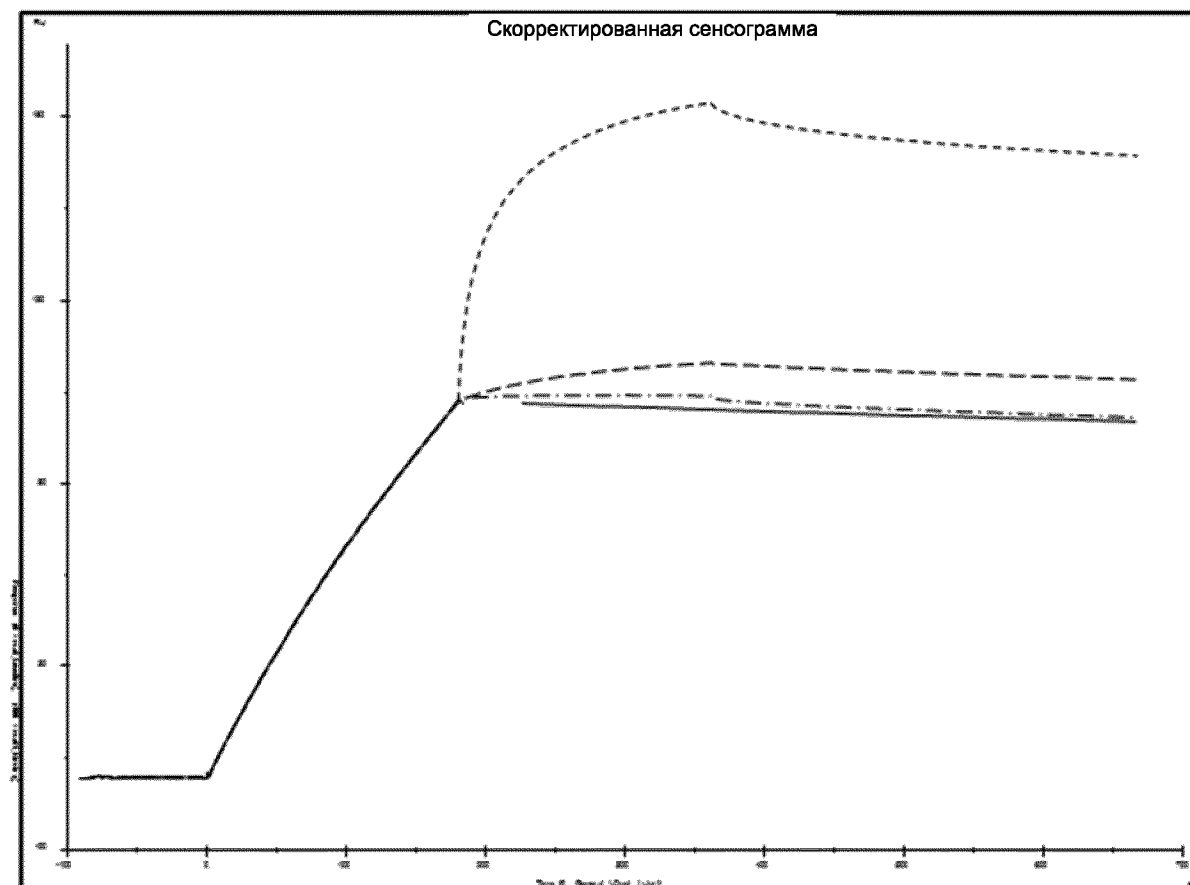
- Fc-2H6 Fab/2H6 Fab
- .-.-.- Fc-2H6 Fab/7H11 scFv
- ..... Fc-7H11 Fab/2H6 scFv
- Fc-7H11 Fab/7H11 Fab
- Буфер

Фиг. 21С



# Фиг. 22А

OX40R-Fc HHRH на чипе (Fc2-1)



— Буфер

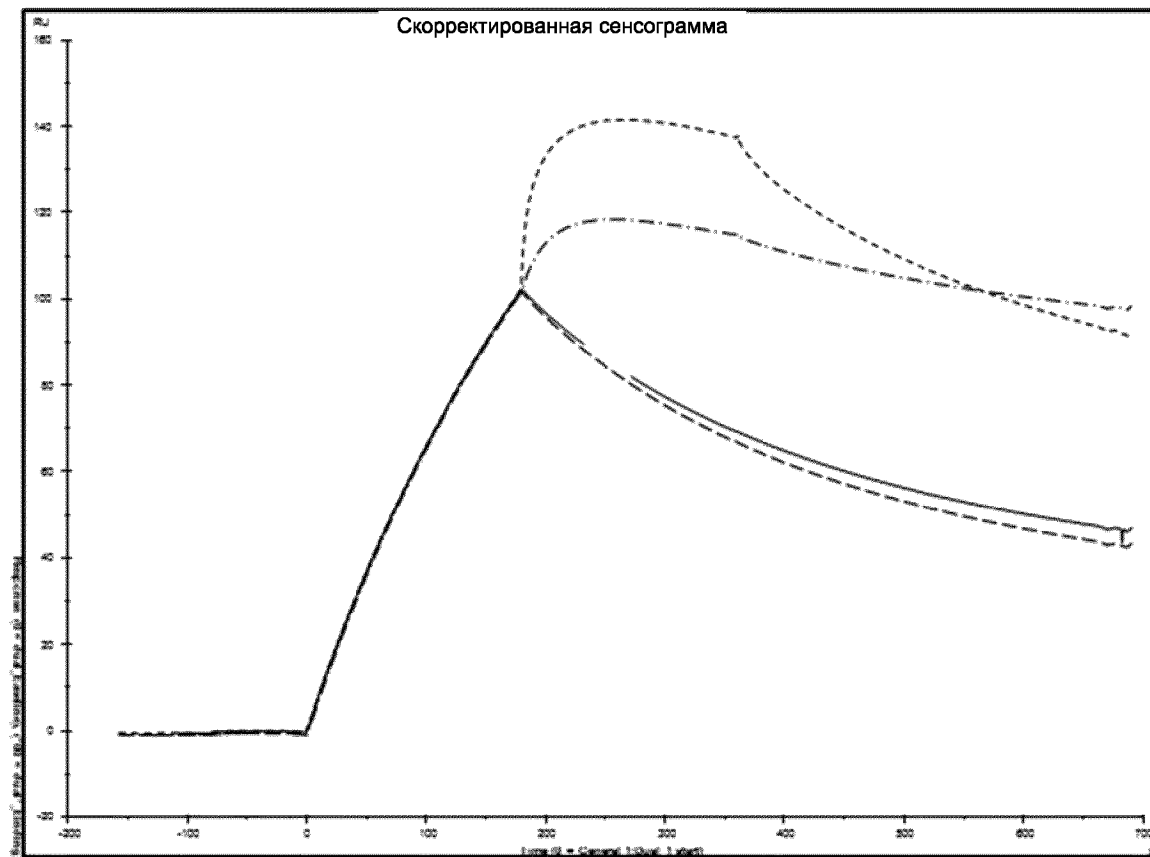
---- HHHH

-.-.- HHRH

.... RRHH

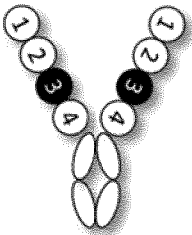
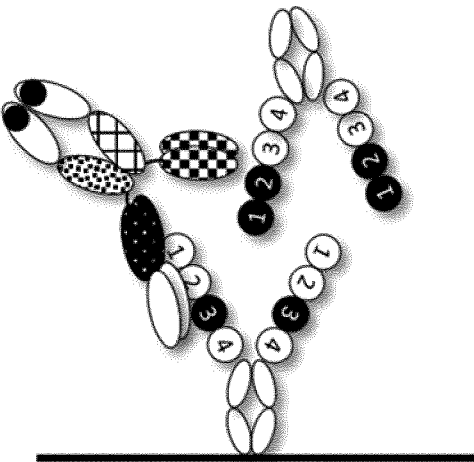
# Фиг. 22В

OX40R-Fc RRHH на чипе (Fc4-3)



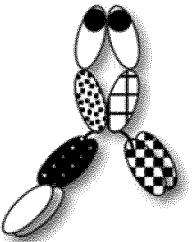


Фиг. 22С



hOX40-Fc

1 крыса 1 человек

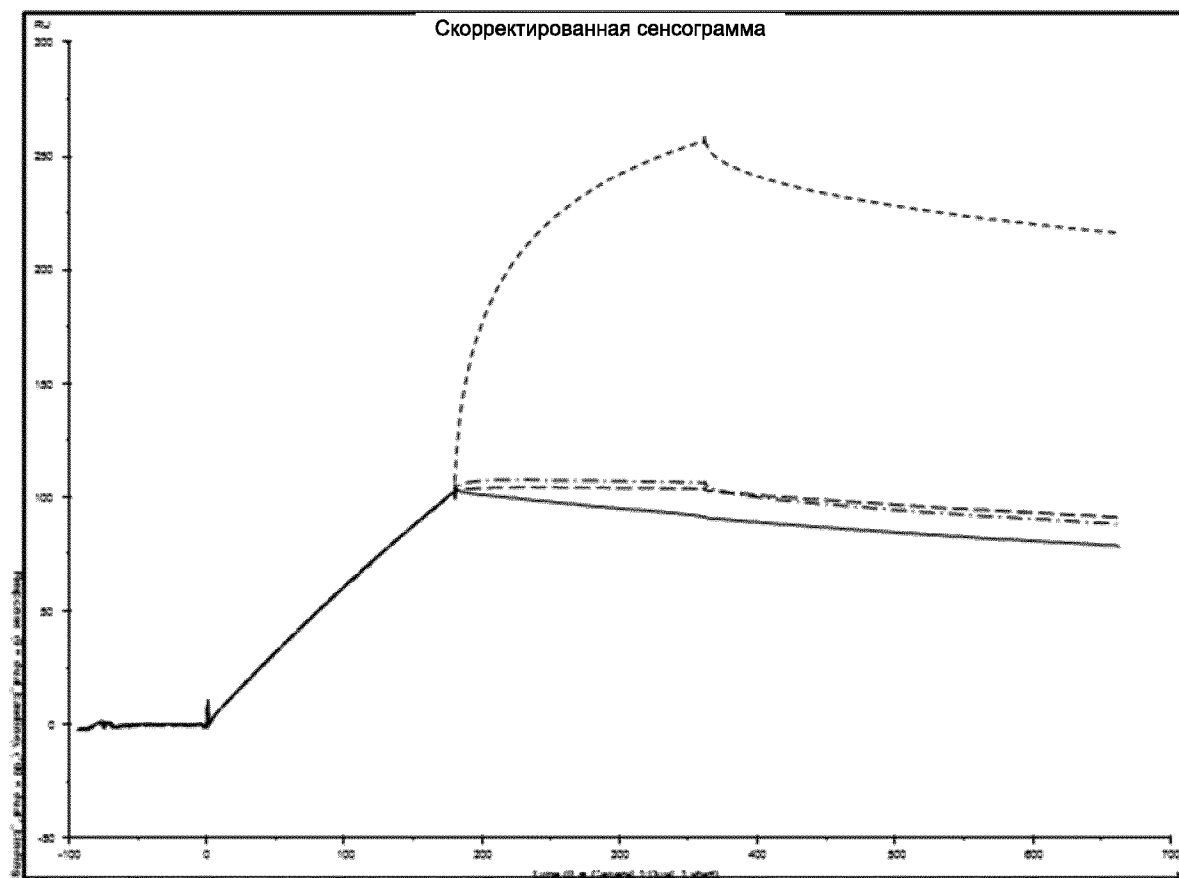


Fc-7H11 Fab/2H6 scFv

7H11 2H6 IgG1  
LALA BTB BTA

# Фиг. 23А

OX40R-FC HHRH на чипе (Fc2-1)



— Буфер

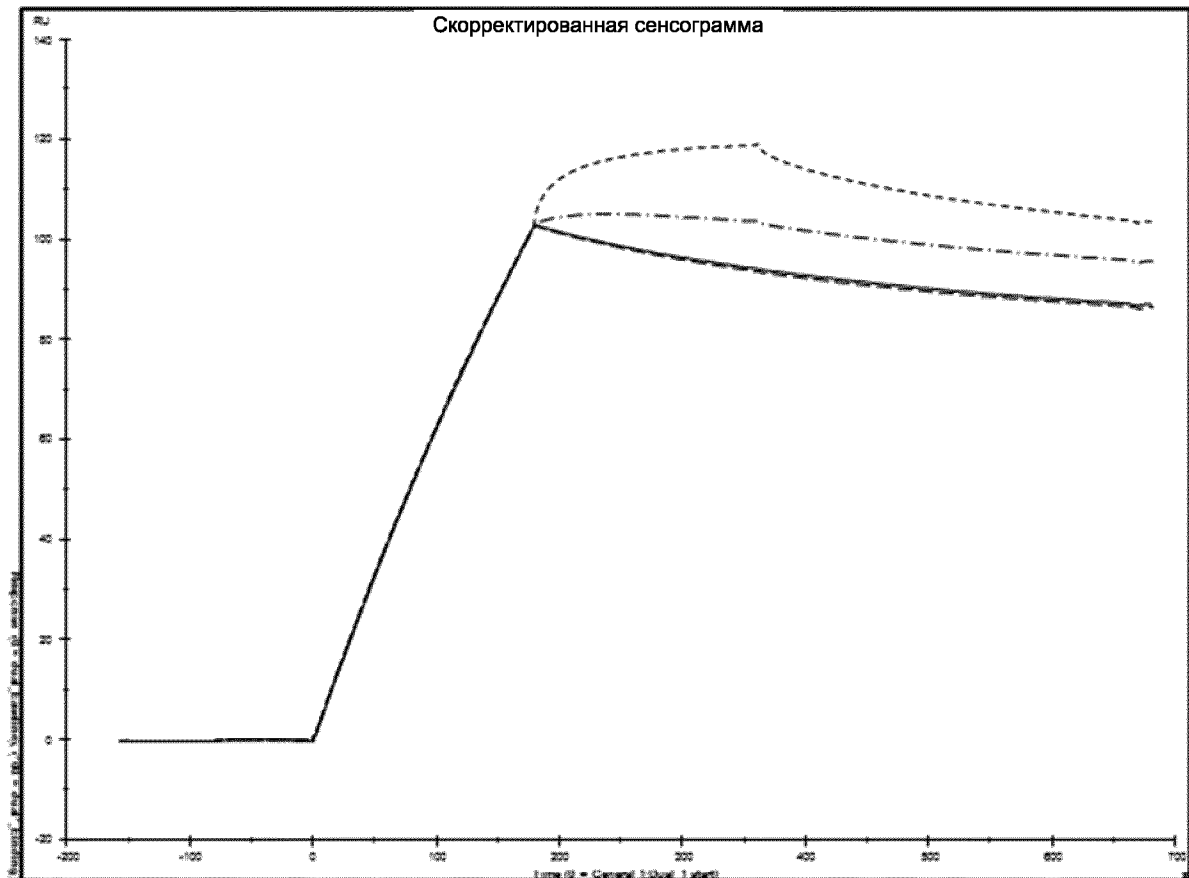
..... HHHH

----- HHRH

- . - . - . RRHH

## Фиг. 23В

OX40R-FC RRHH на чипе (Fc4-3)



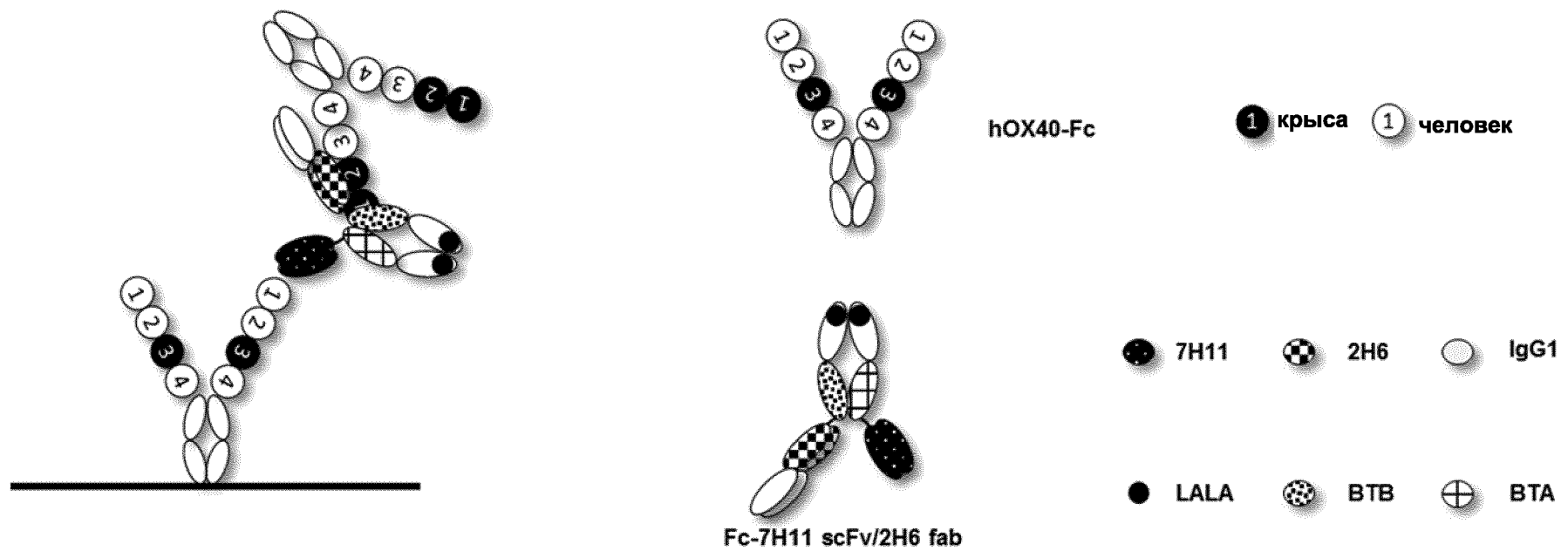
— Буфер

..... HHHH

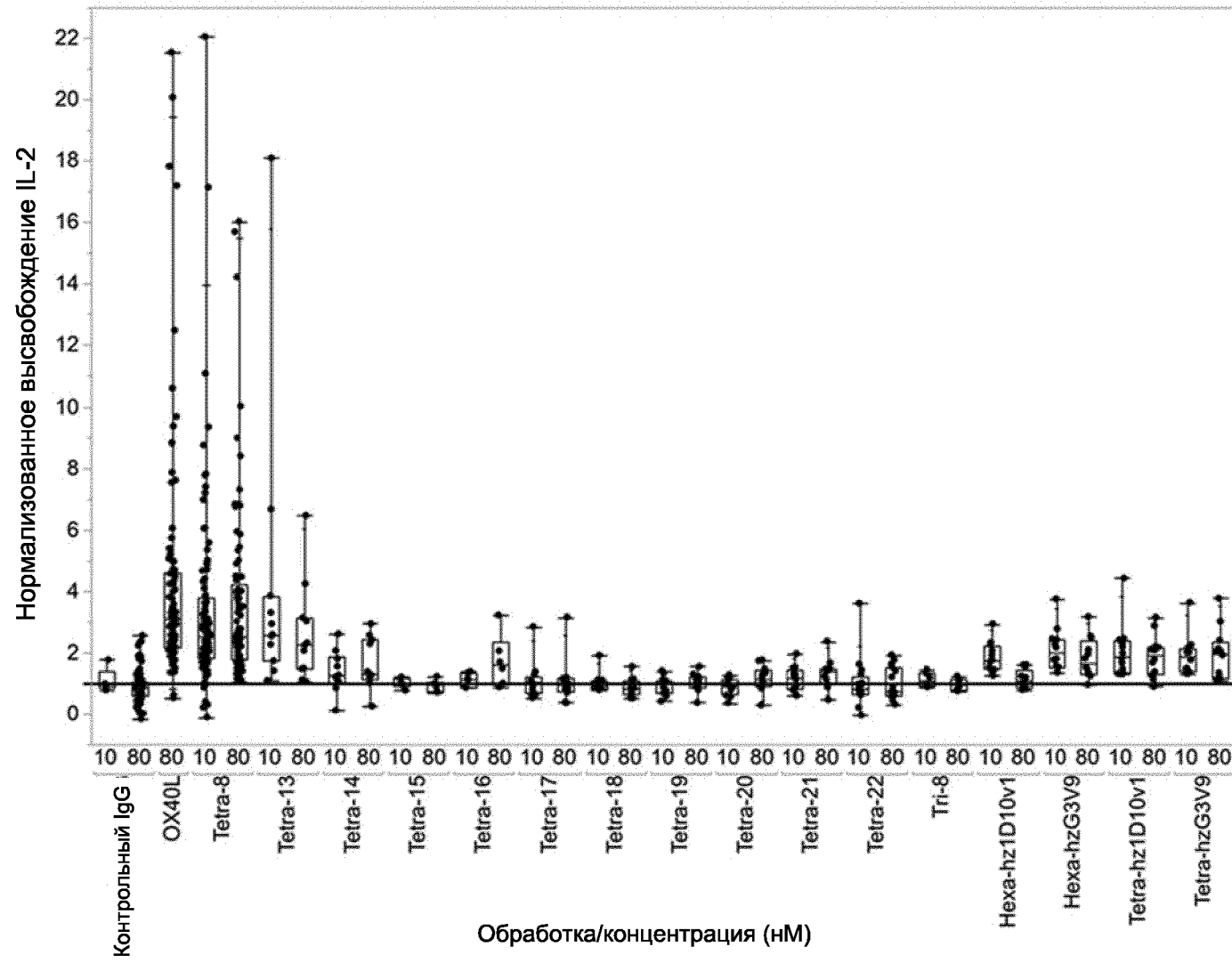
- . - . - HHRH

---- RRHH

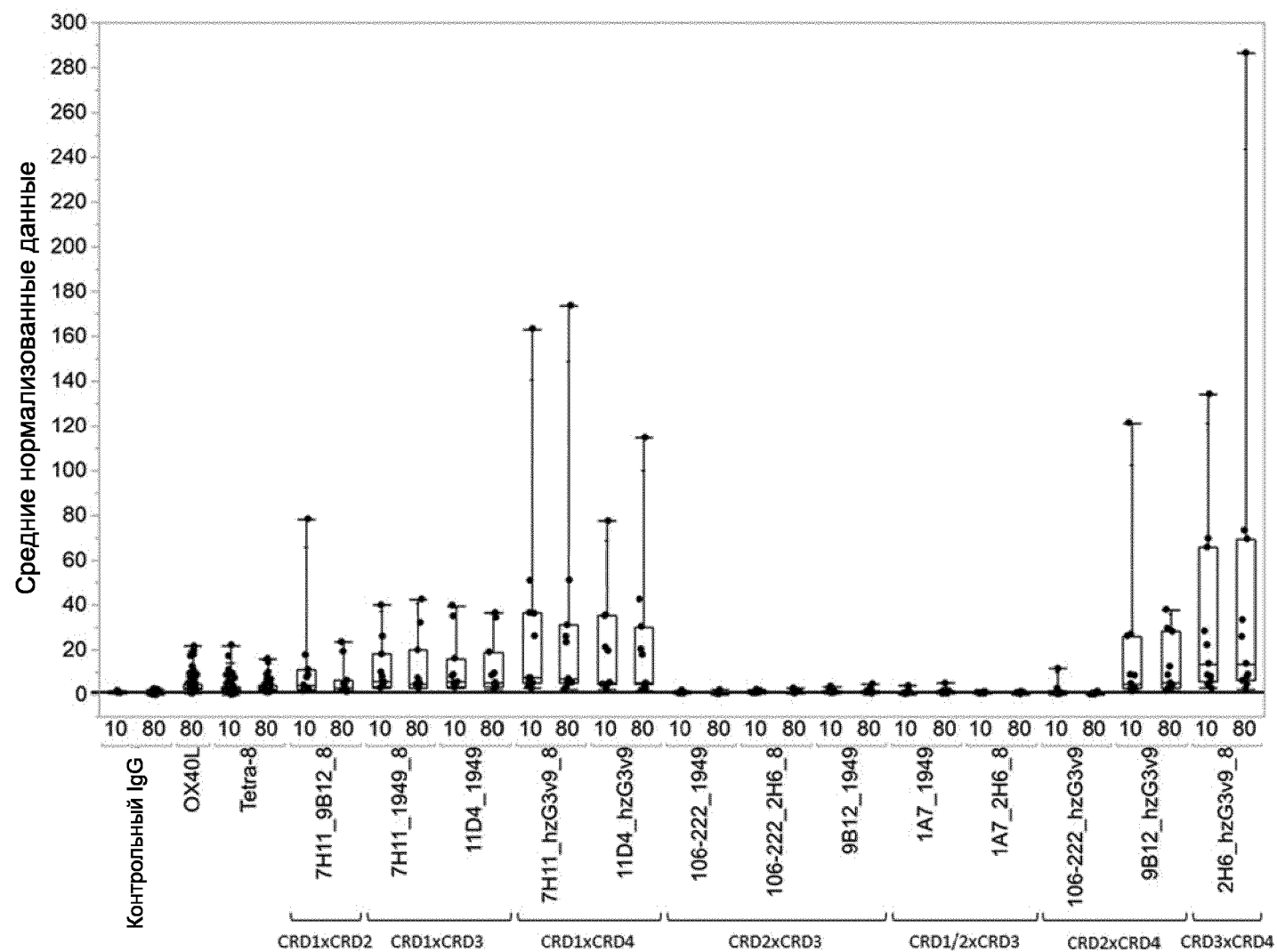
Фиг. 23С



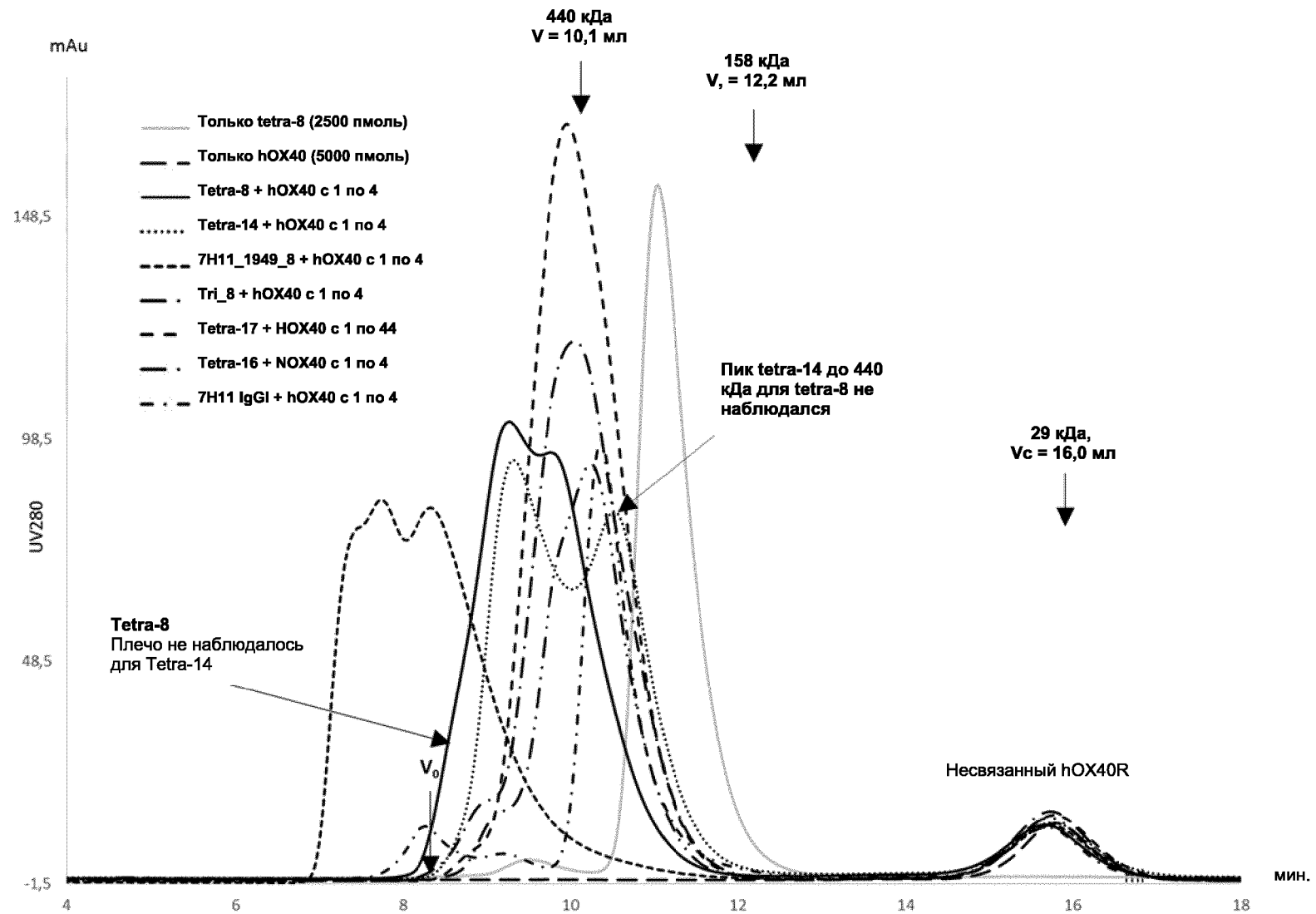
Фиг. 24



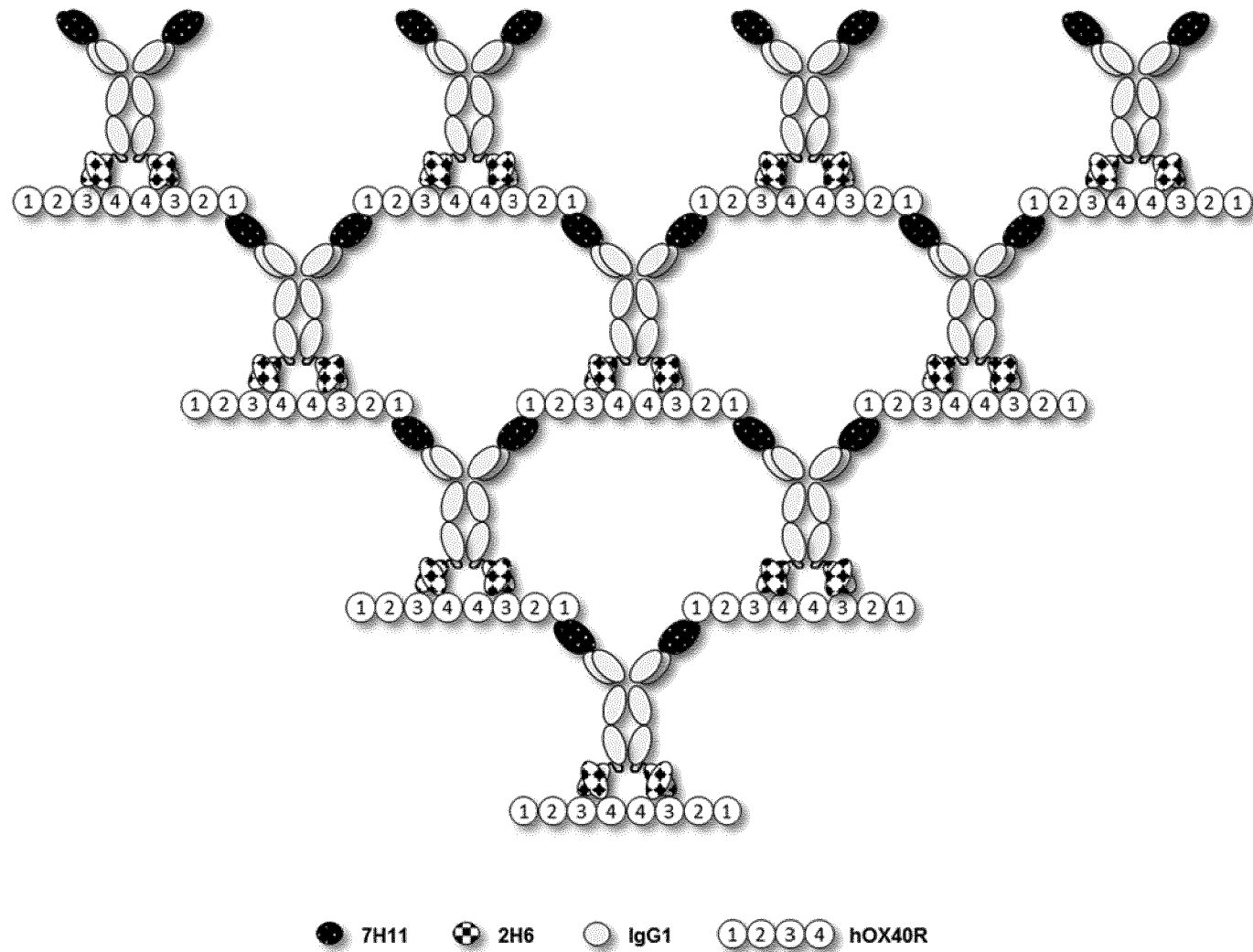
Фиг. 25



# Фиг. 26

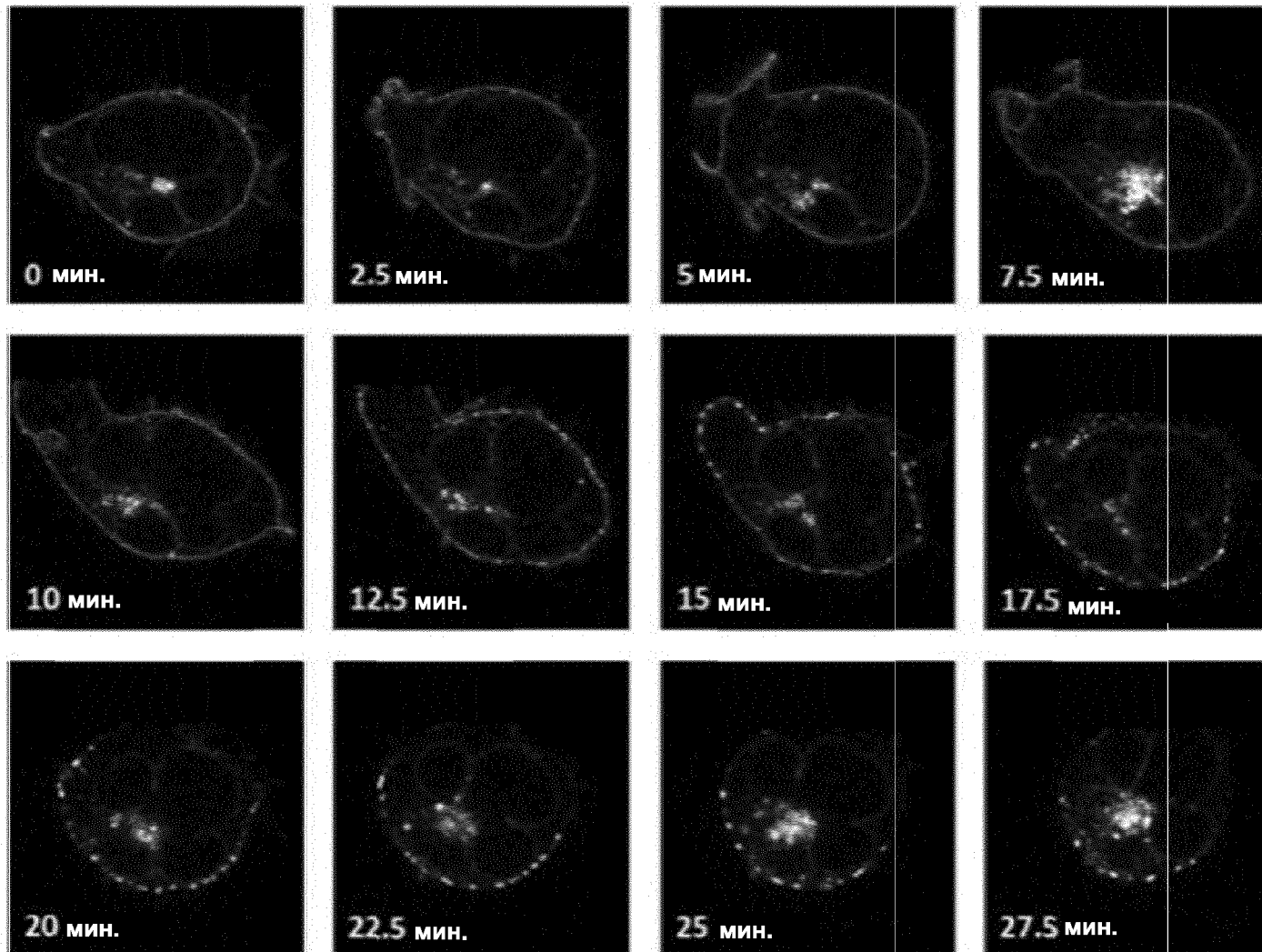


Фиг. 27

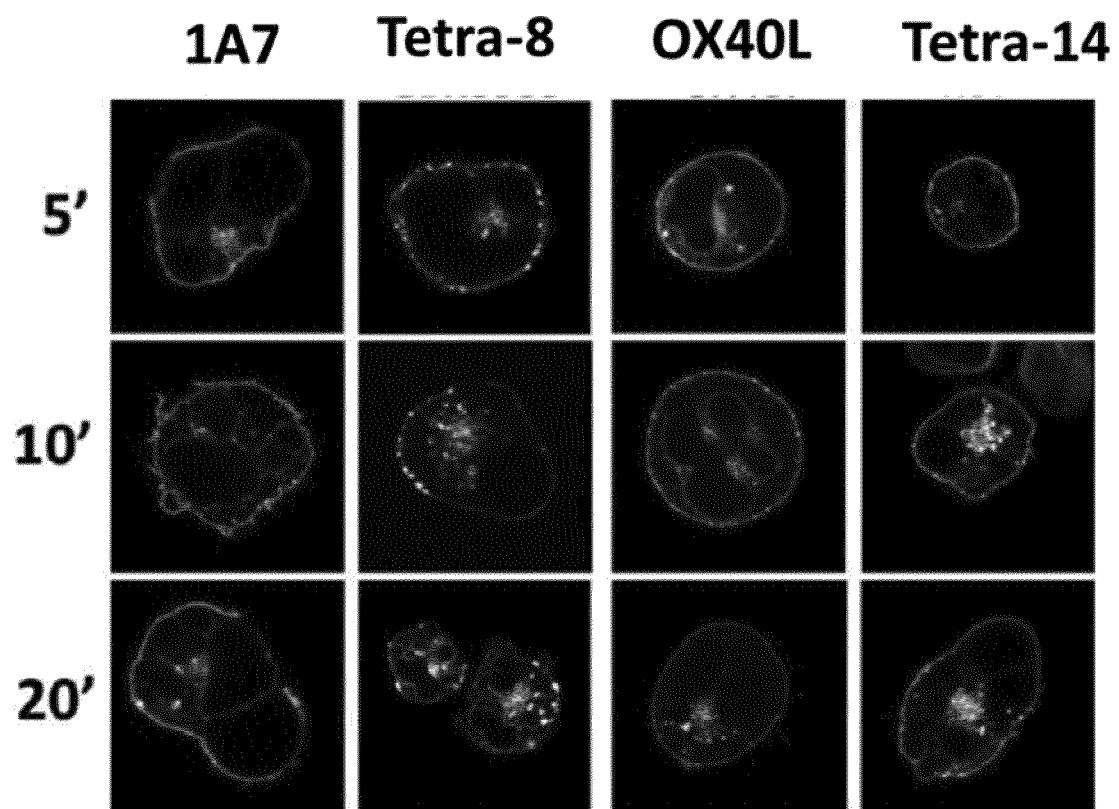




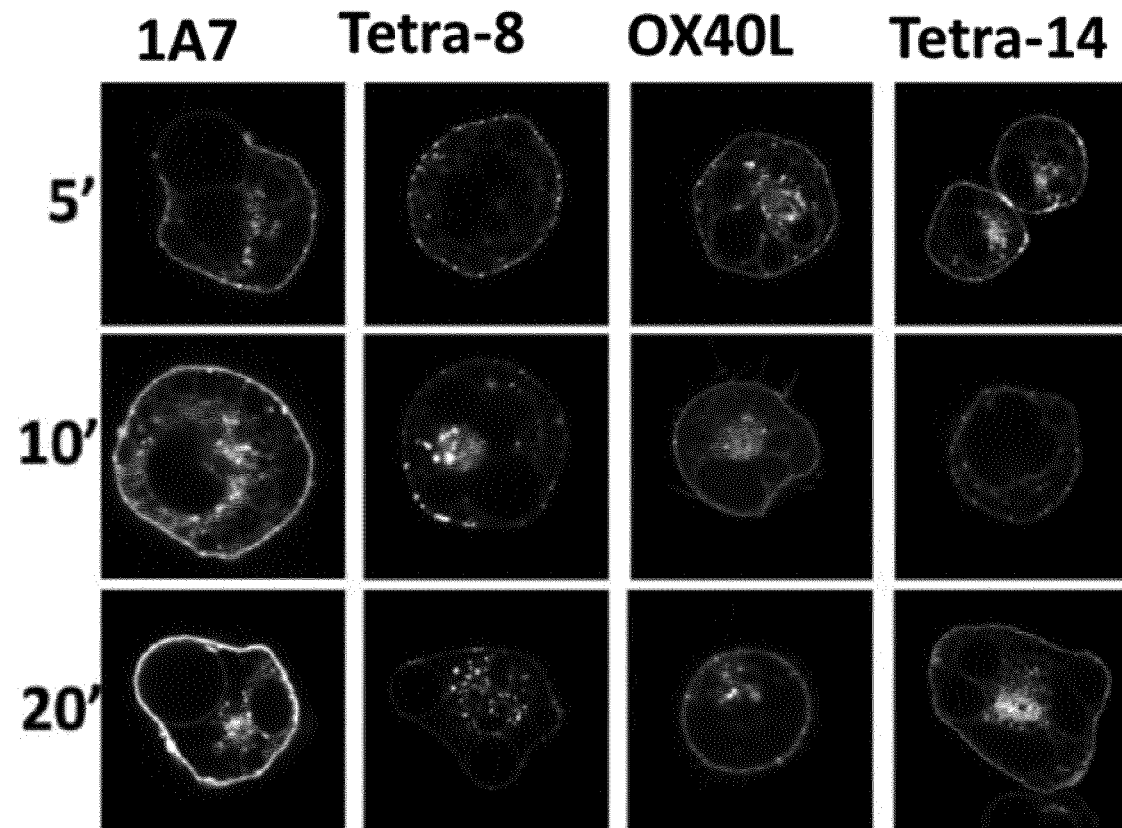
Фиг. 28



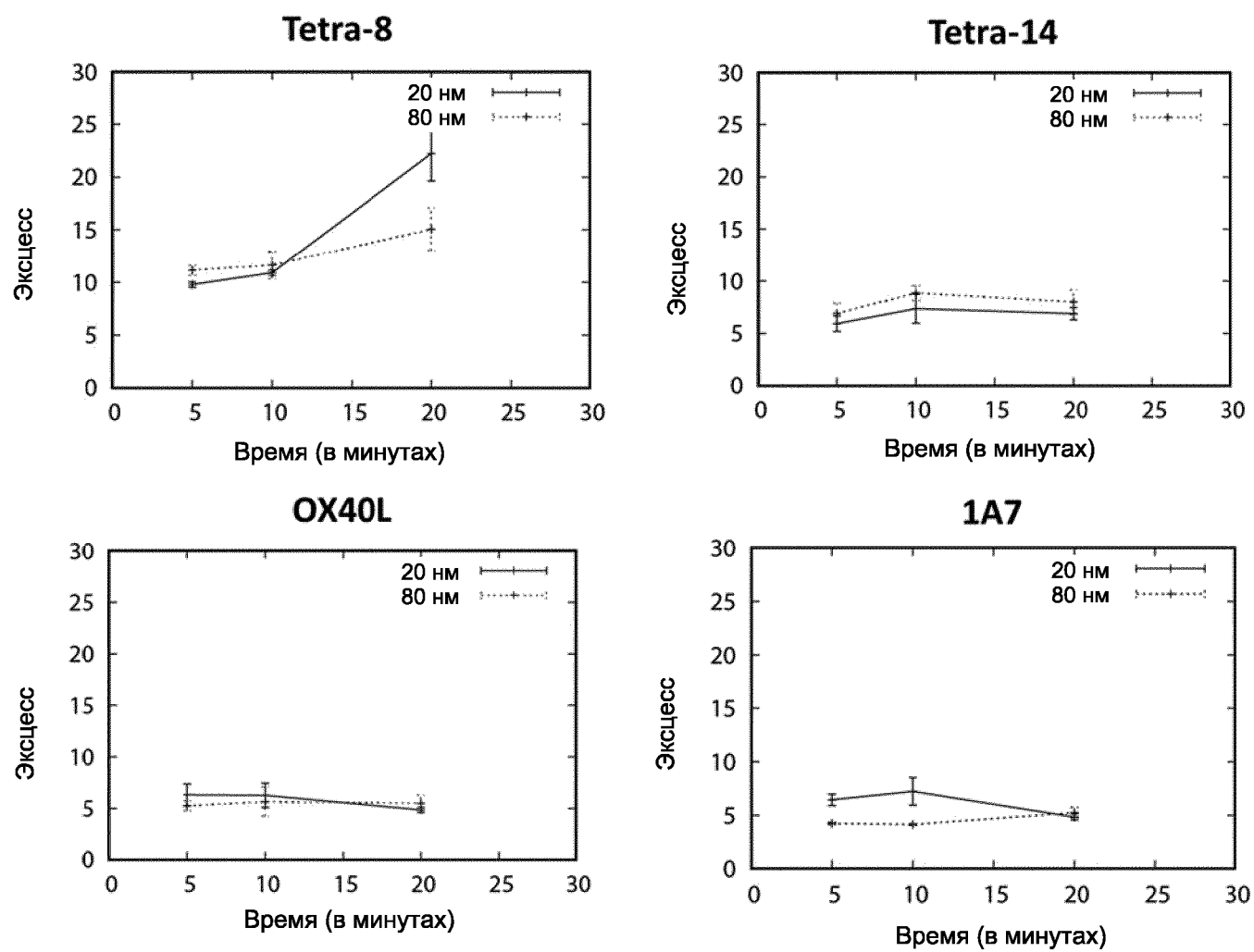
**Фиг. 29А**



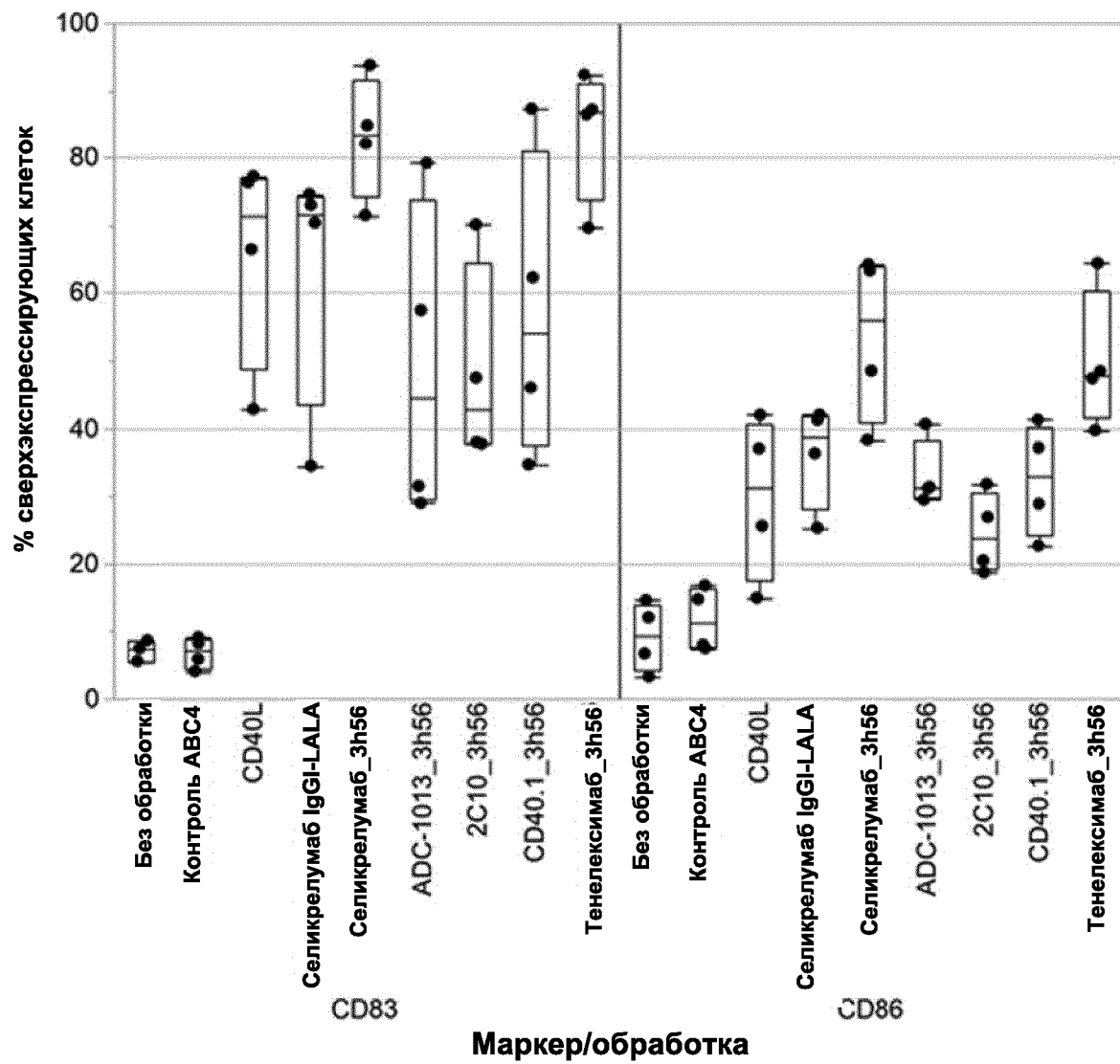
Фиг. 29В



Фиг. 30



Фиг. 31



Фиг. 32

