



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0140331
(43) 공개일자 2017년12월20일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/46 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07K 16/468 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2017-7034034</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2016년04월22일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2017년11월24일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2016/028850</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2016/172485
국제공개일자 2016년10월27일</p> <p>(30) 우선권주장
62/152,735 2015년04월24일 미국(US)
(뒷면에 계속)</p> | <p>(71) 출원인
제넨테크, 인크.</p> <p>미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우
쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1</p> <p>(72) 발명자
카터, 폴</p> <p>미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌 프란시스코
디엔에이 웨이 1 제넨테크 인크. 내</p> <p>스피스, 크리스토프</p> <p>미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌 프란시스코
디엔에이 웨이 1 제넨테크 인크. 내</p> <p>(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
양영준, 이귀동</p> |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 139 항

(54) 발명의 명칭 다중특이적 항원-결합 단백질

(57) 요약

특히, VH/VL 도메인 및/또는 CH1/CL 도메인에서 1종 이상의 돌연변이를 포함하는 다중특이적 항원 결합 단백질, 또는 그것의 항원-결합 단편, 상기를 포함하는 약제학적 조성물, 상기를 인코딩/발현시키는 단리된 핵산, 벡터, 및 숙주세포, 상기 다중특이적 항원 결합 단백질을 제조하는 방법, 다중특이적 항원 결합 단백질을 평가하기 위한 컴퓨터 판독가능한 매체, 및 라이브러리가 제공된다.

(52) CPC특허분류

C07K 2317/522 (2013.01)

C07K 2317/56 (2013.01)

(72) 발명자

인, 인위안

미국 94555 캘리포니아주 프리몬트 페어뱅크스 커
먼 5220

조우, 지안휘

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코 디
엔에이 웨이 1 제넨테크 인크. 내

산도발, 웬디

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코 디
엔에이 웨이 1 제넨테크 인크. 내

콘, 제이콥

미국 94702 캘리포니아주 버클리 액톤 스트리트
1452

딜런, 마이클

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코 디
엔에이 웨이 1 제넨테크 인크. 내

(30) 우선권주장

62/264,291 2015년12월07일 미국(US)

62/310,555 2016년03월18일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는 다중특이적 항원 결합 단백질: a) 제1 중쇄 폴리펩타이드 (H1) 및 제1 경쇄 폴리펩타이드 (L1)를 포함하는 제1 항원에 결합하는 제1 중쇄/경쇄 쌍, 및 b) 제2 중쇄 폴리펩타이드 (H2) 및 제2 경쇄 폴리펩타이드 (L2)를 포함하는 제2 항원에 결합하는 제2 중쇄/경쇄 쌍, 여기서 각 H1 및 H2는 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 중쇄 불변 도메인 (CH1)를 포함하고, 그리고 각 L1 및 L2는 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 경쇄 불변 도메인 (CL)을 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 S183 (EU 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133 (EU 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함한다.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 S183 치환은 S183A, S183T, S183V, S183Y, S183F, S183H, S183N, S183D, S183E, S183R, 및 S183K로 구성된 군으로부터 선택되고, 그리고 상기 V133 치환은 V133E, V133S, V133L, V133W, V133K, V133R, 및 V133D로 구성된 군으로부터 선택되는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 H1의 CH1 도메인 상의 EU 위치 S183에 있는 아미노산은 양으로 하전된 잔기로 대체되고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인 상의 V133에 있는 아미노산은 음으로 하전된 잔기로 대체되는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 4

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 H1의 CH1 도메인 상의 EU 위치 S183에 있는 아미노산은 음으로 하전된 잔기로 대체되고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인 상의 V133에 있는 아미노산은 양으로 하전된 잔기로 대체되는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 5

청구항 3 또는 4에 있어서, 상기 양으로 하전된 잔기는 R 및 K로 구성된 군으로부터 선택되는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 6

청구항 3 내지 5 중 어느 한 항에 있어서, 상기 음으로 하전된 잔기는 D 및 E로 구성된 군으로부터 선택되는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CH1 도메인은 S183 (EU 넘버링)에서의 아미노산 치환으로 구성되고, 및 상기 L1의 CL 도메인은 V133 (EU 넘버링)에서의 아미노산 치환으로 구성되는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 8

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항에 있어서,

- (a) 상기 H1의 CH1 도메인은 S183D 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133K 돌연변이를 포함하고;
- (b) 상기 H1의 CH1 도메인은 S183E 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133K 돌연변이를 포함하고;
- (c) 상기 H1의 CH1 도메인은 S183A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133E 돌연변이를 포함하고;

- (y) 상기 H1의 CH1 도메인은 S183Y 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133S 돌연변이를 포함하고;
- (z) 상기 H1의 CH1 도메인은 S183Y 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133L 돌연변이를 포함하고;
- (aa) 상기 H1의 CH1 도메인은 S183Y 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1 도메인의 CL은 V133W 돌연변이를 포함하고;
- (bb) 상기 H1의 CH1 도메인은 S183Y 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1 도메인의 CL은 V133K 돌연변이를 포함하고;
- (cc) 상기 H1의 CH1 도메인은 S183Y 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133R 돌연변이를 포함하고;
- (dd) 상기 H1의 CH1 도메인은 S183Y 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133D 돌연변이를 포함하고;
- (ee) 상기 H1의 CH1 도메인은 S183F 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133E 돌연변이를 포함하고;
- (ff) 상기 H1의 CH1 도메인은 S183F 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133S 돌연변이를 포함하고;
- (gg) 상기 H1의 CH1 도메인은 S183F 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133L 돌연변이를 포함하고;
- (hh) 상기 H1의 CH1 도메인은 S183F 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133W 돌연변이를 포함하고;
- (ii) 상기 H1의 CH1 도메인은 S183F 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133K 돌연변이를 포함하고;
- (jj) 상기 H1의 CH1 도메인은 S183F 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133R 돌연변이를 포함하고;
- (kk) 상기 H1의 CH1 도메인은 S183F 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1 도메인의 CL은 V133D 돌연변이를 포함하고;
- (ll) 상기 H1의 CH1 도메인은 S183H 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133S 돌연변이를 포함하고;
- (mm) 상기 H1의 CH1 도메인은 S183H 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133L 돌연변이를 포함하고;
- (nn) 상기 H1의 CH1 도메인은 S183H 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133W 돌연변이를 포함하고;
- (oo) 상기 H1의 CH1 도메인은 S183N 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133L 돌연변이를 포함하거나; 또는
- (pp) 상기 H1의 CH1 도메인은 S183E 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133L 돌연변이를 포함한다. H1의 CH1 도메인은 S183K 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L V133E 돌연변이를 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

- (a) 상기 H1의 CH1 도메인은 S183D 돌연변이를 포함하거나 그것으로 구성되고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133K 돌연변이를 포함하거나 그것으로 구성되고;
- (b) 상기 H1의 CH1 도메인은 S183E 돌연변이를 포함하거나 그것으로 구성되고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은

V133K 돌연변이를 포함하거나 그것으로 구성되고;

(c) 상기 H1의 CH1 도메인은 S183T 돌연변이를 포함하거나 그것으로 구성되고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133K 돌연변이를 포함하거나 그것으로 구성되거나; 또는

(d) 상기 H1의 CH1 도메인은 S183V 돌연변이를 포함하거나 그것으로 구성되고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133E 돌연변이를 포함하거나 그것으로 구성되고

(e) 상기 H1의 CH1 도메인은 S183K 돌연변이를 포함하거나 그것으로 구성되고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133E 돌연변이를 포함하거나 그것으로 구성되는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 10

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 H2의 CH1 도메인 및/또는 상기 L2의 CL 도메인은 아미노산 치환을 포함하지 않는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 11

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 H2의 CH1 도메인은 S183에서의 치환을 포함하지 않고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 V133에서의 치환을 포함하지 않는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 12

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항에 있어서, 상기 H1 및/또는 H2의 VH 도메인은 위치 Q39 (카뱃 넘버링)에서의 아미노산을 포함하고, 및 상기 L1 및/또는 L2의 VL 도메인은 위치 Q38 (카뱃 넘버링)에서의 아미노산을 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 VH 도메인에 있는 Q39에서의 아미노산은 양으로 하전된 잔기로 대체되고, 그리고 상기 VL 도메인에 있는 Q38에서의 아미노산은 음으로 하전된 잔기 (카뱃 넘버링)으로 대체되는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 14

청구항 4에 있어서, 상기 VH 도메인에 있는 Q39에서의 아미노산은 양으로 하전된 잔기로 대체되고, 그리고 상기 VL 도메인에 있는 Q38에서의 아미노산은 음으로 하전된 잔기 (카뱃 넘버링)으로 대체되는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 15

청구항 12에 있어서, 상기 VH 도메인에 있는 Q39에서의 아미노산은 음으로 하전된 잔기로 대체되고, 그리고 상기 VL 도메인에 있는 Q38에서의 아미노산은 양으로 하전된 잔기 (카뱃 넘버링)으로 대체되는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 16

청구항 3에 있어서, 상기 VH 도메인에 있는 Q39에서의 아미노산은 음으로 하전된 잔기로 대체되고, 그리고 상기 VL 도메인에 있는 Q38에서의 아미노산은 양으로 하전된 잔기 (카뱃 넘버링)으로 대체되는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 17

청구항 13 내지 16 중 어느 한 항에 있어서, 상기 양으로 하전된 잔기는 R 및 K로 구성된 군으로부터 선택되는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 18

청구항 13 내지 17 중 어느 한 항에 있어서, 상기 음으로 하전된 잔기는 D 및 E로 구성된 군으로부터 선택되는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 19

청구항 1 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 H1의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 그리고 상기 L1의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 20

청구항 1 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 H1의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이를 포함하고, 상기 L1의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 H2의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고를 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 21

청구항 1 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 H1의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이를 포함하고, 상기 L1의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이를 포함하고, 상기 H2의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 22

청구항 1 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 H1의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 그리고 상기 L1의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 23

청구항 1 내지 12 및 20 중 어느 한 항에 있어서, 상기 H1의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이를 포함하고, 상기 L1의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 H2의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (모든 카바트 넘버링)을 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 24

청구항 1 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 H1의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이를 포함하고, 상기 H2의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (모든 카바트 넘버링)을 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 25

청구항 1 내지 12 및 20 내지 21 중 어느 한 항에 있어서, 상기 H1의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이를 포함하고, 상기 L1의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이를 포함하고, 상기 H2의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (모든 카바트 넘버링)을 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 26

청구항 1 내지 25 중 어느 한 항에 있어서, 상기 2종의 치환된 아미노산 사이의 상호작용은 수소 결합에 의한 것인, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 27

청구항 1 내지 26 중 어느 한 항에 있어서, 상기 2종의 치환된 아미노산 사이의 상호작용은 정전기 상호작용에 의한 것인, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 28

청구항 1 내지 9, 12 내지 13, 15, 17 내지 18, 22 내지 23, 및 25 내지 26 중 어느 한 항에 있어서, 상기 H1의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 H1의 CH1 도메인은 S183E 치환 돌연변이를 포함하고, 상기 L1의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133K 돌연변이를 포함하고, 상기 H2의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌

치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 V133E 돌연변이를 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 36

청구항 1 내지 9, 12 내지 13, 15, 17 내지 18, 22 내지 23, 및 25 내지 26 중 어느 한 항에 있어서, 상기 H1의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 H1의 CH1 도메인은 S183K 치환 돌연변이를 포함하고, 상기 L1의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133E 치환 돌연변이를 포함하고, 상기 H2의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 H2의 CH1 도메인은 S183E 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 V133K 돌연변이를 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 37

청구항 1 내지 9, 12 내지 13, 15, 17 내지 18, 22 내지 23, 및 25 내지 26 중 어느 한 항에 있어서, 상기 H1의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 H1의 CH1 도메인은 S183E 치환 돌연변이를 포함하고, 상기 L1의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인 V133K 치환 돌연변이를 포함하고, 상기 H2의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 H2의 CH1 도메인은 S183K 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 V133E 돌연변이를 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 38

청구항 1 내지 37 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 H1 및/또는 H2는 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 Fc 영역을 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 39

청구항 38에 있어서, 상기 H1 및/또는 H2의 Fc 영역은 인간 IgG1, 인간 IgG2 또는 인간 IgG4 Fc인, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 40

청구항 38에 있어서, 상기 H1 및/또는 H2의 Fc 영역은 마우스 IgG1, 마우스 IgG2 또는 마우스 IgG4 Fc인, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 41

청구항 1 내지 40 중 어느 한 항에 있어서, 상기 H1 및 H2의 CH3 도메인 각각은 계면에서 만나고, 그리고 여기서 각각의 CH3 도메인은 아미노산 치환을 포함하고, 이로써 상기 H1의 Fc 영역은 H1과 비교하여 H2의 영역과 우선적으로 쌍을 이룬, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 42

청구항 41에 있어서, 상기 CH3 도메인에서의 아미노산 치환은 더 큰 정전기 상보성을 초래하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 43

청구항 41에 있어서, 상기 CH3 도메인에서의 아미노산 치환은 더 큰 입체 상보성을 초래하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 44

청구항 41에 있어서,

상기 H1의 CH3 도메인은, 상기 CH3/CH3 계면 내에, 1종 이상의 아미노산 잔기가 더 큰 측쇄 용적을 갖는 1종 이상의 아미노산 잔기로 대체되도록 변경되고, 이로써 H2의 CH3 도메인과 상호작용하는 H1의 CH3 도메인의 표면 상에 돌출부를 생성하고 및

상기 H2의 CH3 도메인은, 상기 CH3/CH3 계면 내에서 1종 이상의 아미노산 잔기가 더 작은 측쇄 용적을 갖는 아미노산 잔기로 대체되도록 변경되고, 이로써 H1의 CH3 도메인과 상호작용하는 H2의 CH3 도메인의 표면 상에 공동을 생성하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 45

청구항 41에 있어서,

상기 H2의 CH3 도메인은, 상기 CH3/CH3 계면 내에, 1종 이상의 아미노산 잔기가 더 큰 측쇄 용적을 갖는 1종 이상의 아미노산 잔기로 대체되도록 변경되고, 이로써 H1의 CH3 도메인과 상호작용하는 H2의 CH3 도메인의 표면 상에 돌출부를 생성하고,

그리고

상기 H1의 CH3 도메인은, 상기 CH3/CH3 계면 내에, 1종 이상의 아미노산 잔기가 더 작은 측쇄 용적을 갖는 아미노산 잔기로 대체되도록 변경되고, 이로써 H2의 CH3 도메인과 상호작용하는 H1의 CH3 도메인의 표면 상에 공동을 생성하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 46

청구항 44 또는 45에 있어서, 상기 돌출부는 좁 돌연변이인, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 47

청구항 46에 있어서, 상기 좁 돌연변이는 T366W (EU 넘버링)을 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 48

청구항 44 또는 45 상기 공동은 홀 돌연변이인, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 49

청구항 48에 있어서, 상기 홀 돌연변이는 T366S, L368A, 및 Y407V (EU 넘버링) 중 적어도 1개, 적어도 2개 또는 모두 3개를 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 50

하기를 포함하는 다중특이적 항원 결합 단백질:a) 제1 중쇄 폴리펩타이드 (H1) 및 제1 경쇄 폴리펩타이드 (L1)를 포함하는 제1 중쇄/경쇄 쌍, 및 b) 제2 중쇄 폴리펩타이드 (H2) 및 제2 경쇄 폴리펩타이드 (L2)를 포함하는 제2 중쇄/경쇄 쌍, 여기서 각 H1 및 H2는 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 중쇄 불변 도메인 (CH1)를 포함하고, 그리고 각 L1 및 L2는 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 경쇄 불변 도메인 (CL)을 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 에서 아미노산 치환을 포함하고 F170 (EU 넘버링), 및 상기 L1의 CL 도메인은 S176 (EU 넘버링)에서의 아미노산 치환을 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 51

청구항 50에 있어서, 상기 H1의 CH1 도메인은 추가로, 하기로 구성된 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질:A141, S181, S183, 및 V185 (EU 넘버링).

청구항 52

청구항 50 내지 51 중 어느 한 항에 있어서, 상기 L1의 CL 도메인은 추가로, F116, S131, V133, L135, S162, S174, 및 T178 (EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 53

청구항 50 내지 52 중 어느 한 항에 있어서, CH1의 A141, F170, S181, S183, 및 V185 (EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환 및/또는 CL1의 F116, S131, V133, L135, S162, S174, S176, 및 T178 (EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환은 하전된 아미노

산 잔기로 치환되지 않는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 54

청구항 50 내지 53 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아미노산 치환은 입체 상보성을 초래하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 55

청구항 50 내지 54 중 어느 한 항에 있어서, 상기 H1의 CH1 도메인은 F170S 및 F170A로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 치환을 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 S176F의 아미노산 치환을 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 56

청구항 50 내지 54 중 어느 한 항에 있어서,

(a) 상기 H1의 CH1 도메인은 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 S176F 돌연변이를 포함하고; or

(b) 상기 H1의 CH1 도메인은 F170A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 S176F 돌연변이를 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 57

청구항 56에 있어서, 상기 H1의 CH1 도메인은 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 S176F 돌연변이를 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 58

청구항 50 내지 57 중 어느 한 항에 있어서,

(a) 상기 H1의 CH1 도메인은 A141I, F170S, S181M, S183V, 및 V185A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, V133I, L135V, S162M, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이를 포함하고;

(b) 상기 H1의 CH1 도메인은 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, S131D, L135V, S162A, S174A, S176F, 및 T178I 돌연변이를 포함하고;

(c) 상기 H1의 CH1 도메인은 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이를 포함하거나; 또는

(d) 상기 H1의 CH1 도메인은 A141I, F170A, S181M, S183V, 및 V185A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S162M, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이를 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 59

청구항 50 내지 57 중 어느 한 항에 있어서, 상기 H1의 CH1 도메인은 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이를 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 60

청구항 59에 있어서, 상기 H1의 VH 도메인은 Q39E 돌연변이 (카뱃 넘버링)을 포함하고, 상기 L1의 VL 도메인은 Q38K 돌연변이 (카뱃 넘버링)을 포함하고, 상기 H2의 VH 도메인은 Q39K 돌연변이 (카뱃 넘버링)을 포함하고, 그리고 상기 L2의 VL 도메인은 Q38E 돌연변이 (카뱃 넘버링)을 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 61

청구항 59 또는 60에 있어서, 상기 H2의 CH1 도메인은 S183E 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 V133K 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 62

청구항 59에 있어서, 상기 H1의 VH 도메인은 Q39K 돌연변이 (카뱃 넘버링)을 포함하고, 상기 L1의 VL 도메인은 Q38E 돌연변이 (카뱃 넘버링)을 포함하고, 상기 H2의 VH 도메인은 Q39E 돌연변이 (카뱃 넘버링)을 포함하고, 그리고 상기 L2의 VL 도메인은 Q38K 돌연변이 (카뱃 넘버링)을 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 63

청구항 59 또는 62에 있어서,

상기 H2의 CH1 도메인은 S183K 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 V133K 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 64

청구항 50 내지 55 중 어느 한 항에 있어서,

(a) 상기 H1의 CH1 도메인은 F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이를 포함하고;

(b) 상기 H1의 CH1 도메인은 A141I, F170S, S183A, 및 V185A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이를 포함하고;

(c) H1의 CH1 도메인은 A141I, F170S, S181M, 및 V185A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S176F, 및 T178V 돌연변이를 포함하고;

(d) H1의 CH1 도메인은 A141I, F170S, S181M, 및 S183A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S174A, 및 S176F 돌연변이를 포함하고;

(e) 상기 H1의 CH1 도메인은 F170S, S183A, 및 V185A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, S176F, 및 T178V 돌연변이를 포함하고;

(f) 상기 H1의 CH1 도메인은 F170S, S181M, 및 V185A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, 및 S176F 돌연변이를 포함하고;

(g) 상기 H1의 CH1 도메인은 F170S, S181M, 및 S183A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A 및 S176F 돌연변이를 포함하고;

(h) 상기 H1의 CH1 도메인은 A141I, F170S, 및 V185A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A 및 S176F 돌연변이를 포함하고;

(i) H1의 CH1 도메인은 A141I, F170S, 및 S183A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A 및 S176F 돌연변이를 포함하고;

(j) 상기 H1의 CH1 도메인은 A141I, F170S, 및 S181M 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이를 포함하고;

(k) H1의 CH1 도메인은 F170S 및 V185A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A 및 S176F 돌연변이를 포함하고;

(l) 상기 H1의 CH1 도메인은 A141I 및 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이를 포함하고;

(m) H1의 CH1 도메인은 A141I 및 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S176F, 및 T178V 돌연변이를 포함하고;

(n) H1의 CH1 도메인은 A141I 및 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S174A, 및 S176F 돌연변이를 포함하고;

(o) H1의 CH1 도메인은 A141I 및 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, S176F, 및 T178V 돌연변이를 포함하고;

(p) H1의 CH1 도메인은 A141I 및 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, 및

S176F 돌연변이를 포함하고;

(q) 상기 H1의 CH1 도메인은 A141I 및 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A 및 S176F 돌연변이를 포함하고;

(r) 상기 H1의 CH1 도메인은 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이를 포함하고;

(s) 상기 H1의 CH1 도메인은 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S176F, 및 T178V 돌연변이를 포함하고;

t) 상기 H1의 CH1 도메인은 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S174A, 및 S176F 돌연변이를 포함하고;

(u) 상기 H1의 CH1 도메인은 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, S176F, 및 T178V 돌연변이를 포함하고;

(v) 상기 H1의 CH1 도메인은 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, 및 S176F 돌연변이를 포함하거나; 또는

(w) 상기 H1의 CH1 도메인은 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A 및 S176F 돌연변이를 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 65

청구항 64에 있어서, 상기 H1의 CH1 도메인은 A141I, F170S, 및 S181M 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이를 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 66

청구항 64에 있어서, 상기 H1의 CH1 도메인은 A141I 및 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이를 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 67

청구항 64에 있어서, 상기 H1의 CH1 도메인은 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이를 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 68

하기를 포함하는 다중특이적 항원 결합 단백질:a) 제1 중쇄 서열 (H1) 및 제1 경쇄 서열 (L1)을 포함하는 제1 중쇄/경쇄 쌍, 및 b) 제2 중쇄 서열 (H2) 및 제2 경쇄 서열 (L2)을 포함하는 제2 중쇄/경쇄 쌍, 여기서 각 H1 및 H2는 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 중쇄 불변 도메인 (CH1)를 포함하고, 그리고 각 L1 및 L2는 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 경쇄 불변 도메인 (CL)을 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 L128 (EU 넘버링)에서의 아미노산 치환을 포함하고 및 상기 C1의 CL 도메인은 F118 및 L135 (EU 넘버링)에서의 아미노산 치환을 포함한다.

청구항 69

청구항 68에 있어서, 상기 H1의 CH1 도메인은 추가로, V185 (EU 넘버링)에서의 아미노산 치환을 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 70

청구항 68 또는 69에 있어서, 상기 H1의 CH1 도메인은 추가로, 하기로 구성된 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질:A141, F170, S181, 및 S183 (EU 넘버링).

청구항 71

청구항 68 내지 70 중 어느 한 항에 있어서, 상기 L1의 CL 도메인은 추가로, S131, V133, S162, T164, S176 및 T178 (EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 72

청구항 68 내지 71 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CH1의 L128 A141, F170, S181, S183, V185 (EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환 및/또는 CL1의 F118 S131, V133, 및 L135 S162, T164, S176 및 T178 (EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환은 하전된 아미노산 잔기로 치환되지 않는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 73

청구항 68 내지 72 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아미노산 치환은 더 큰 입체 상보성을 초래하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 74

청구항 68 내지 73 중 어느 한 항에 있어서, 상기 H1의 CH1 도메인은 A141, F170, S181, 및 S183으로 구성된 군으로부터 선택된 위치에서 아미노산 치환을 포함하고, 그리고 상기 CL 도메인은 S131, V133, S162, T164, S176 및 T178로 구성된 군으로부터 선택된 위치에서 아미노산 치환을 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 75

청구항 74에 있어서,

- (a) 상기 H1의 CH1 도메인은 L128F, A141M, F170M, S181I 및 S183A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 CL 도메인은 F118V, S131T, V133A, L135Y, S162A, T164S, S176M, 및 T178L 돌연변이를 포함하고;
- (b) 상기 H1의 CH1 도메인은 L128F, A141M, F170Y, S181I, S183A, 및 V185A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 CL 도메인은 F118V, S131T, V133A, L135F, S162A, S176A, 및 T178L 돌연변이를 포함하고;
- (c) 상기 H1의 CH1 도메인은 L128F, A141T, F170M, S181T, S183A, 및 V185L 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 CL 도메인은 F118V, S131T, V133A, L135F, S162A, T164S, S176T, 및 T178L 돌연변이를 포함하거나; 또는
- (d) 상기 H1의 CH1 도메인은 L128F, A141M, F170M, S181T, 및 S183A, 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 CL 도메인은 F118V, S131T, V133A, L135F, S162M, T164S, S176M, 및 T178L 돌연변이를 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 76

청구항 75에 있어서, 상기 H1의 CH1 도메인은 L128F, A141M, F170Y, S181I, S183A, 및 V185A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 CL 도메인은 F118V, S131T, V133A, L135F, S162A, S176A, 및 T178L 돌연변이를 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 77

청구항 1 내지 49 중 어느 한 항에 있어서, 상기 H2의 CH1 도메인은, CH1/CL 계면 내에서, 2종 이상의 아미노산 잔기가 더 큰 측쇄 용적을 갖는 동등한 수의 아미노산 잔기로 대체되도록 변경되고, 이로써 L2의 CL 도메인과 상호작용하는 H2의 CH1 도메인의 표면 상에 돌출부를 생성하고,

그리고

상기 L2의 CL 도메인은, CH1/CL 계면 내에서, 2종 이상의 아미노산 잔기가 더 작은 측쇄 용적을 갖는 동등한 수의 아미노산 잔기로 대체되도록 변경되고, 이로써 상기 H2의 CH1 도메인과 상호작용하는 L2의 CL 도메인의 표면 상에 공동을 생성하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 78

청구항 1 내지 49 중 어느 한 항에 있어서, 상기 L2의 CL 도메인은, CH1/CL 계면 내에서, 2종 이상의 아미노산 잔기가 더 큰 측쇄 용적을 갖는 아미노산 잔기로 대체되도록 변경되고, 이로써 H2의 CH1 도메인과 상호작용하는 CL 도메인의 표면 상에 돌출부를 생성하고,

그리고

상기 H2의 CH1 도메인은, CH1/CL 계면내에서, 2종 이상의 아미노산 잔기가 더 작은 측쇄 용적을 갖는 아미노산 잔기로 대체되도록 변경되고, 이로써 CL 도메인과 상호작용하는 H2의 CH1 도메인의 표면 상에 공동을 생성하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 79

청구항 59에 있어서, 상기 H2의 CH1 도메인은 S183 (EU 넘버링)에서의 아미노산 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 아미노산 치환 돌연변이 V133K (EU 넘버링)을 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 80

청구항 79에 있어서, 상기 H2의 CH1 도메인에 있는 위치 S183에서의 아미노산은 양으로 하전된 아미노산으로 대체되고, 및 상기 L2의 CL 도메인에 있는 위치 V133에서의 아미노산은 음으로 하전된 아미노산으로 대체되는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 81

청구항 79에 있어서, 상기 H2의 CH1 도메인에 있는 위치 S183에서의 아미노산은 음으로 하전된 아미노산으로 대체되고, 및 상기 L2의 CL 도메인에 있는 위치 V133에서의 아미노산은 양으로 하전된 아미노산으로 대체되는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 82

청구항 79에 있어서, 상기 H2의 CH1 도메인은 S183E 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 V133K 돌연변이를 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 83

청구항 82에 있어서, H1의 VH 도메인에서 Q39E 돌연변이, L1의 VL 도메인에서 Q38K 돌연변이, H2의 VH 도메인에서 Q39K 돌연변이 및 L2의 VL 도메인에서 Q38E 돌연변이를 추가로 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 84

청구항 79에 있어서, 상기 H2의 CH1 도메인은 S183K 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 V133E 돌연변이를 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 85

청구항 84에 있어서, H1의 VH 도메인에서 Q39K 돌연변이, L1의 VL 도메인에서 Q38E 돌연변이, H2의 VH 도메인에서 Q39E 돌연변이 및 L2의 VL 도메인에서 Q38K 돌연변이를 추가로 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 86

청구항 50 내지 59 및 64 내지 78 중 어느 한 항에 있어서, 상기 H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183에서의 아미노산을 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 EU 위치 V133에서의 아미노산을 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 87

청구항 85에 있어서, 상기 H2의 CH1 도메인 상의 EU 위치 S183에서의 아미노산과 L2의 CL 도메인 상의 EU 위치 V133에서의 아미노산 사이의 상호작용은 정전기 상호작용에 의한 것인, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 88

청구항 87에 있어서, 상기 H2의 CH1 도메인 상의 EU 위치 S183에서의 아미노산은 양으로 하전된 잔기로 대체되고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인 상의 EU 위치 V133에서의 아미노산은 음으로 하전된 잔기로 대체되는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 89

청구항 87에 있어서, 상기 H2의 CH1 도메인 상의 EU 위치 S183에서의 아미노산은 음으로 하전된 잔기로 대체되고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인 상의 EU 위치 V133에서의 아미노산은 양으로 하전된 잔기로 대체되는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 90

청구항 86 내지 89 중 어느 한 항에 있어서, 상기 H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183A, S183T, S183V, S183Y, S183F, S183H, S183N, S183D, S183E, S183R, 및 S183K로 구성된 군으로부터 선택된 위치에서 아미노산 치환을 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 EU 위치 V133E, V133S, V133L, V133W, V133K, V133R, 및 V133D로 구성된 군으로부터 선택된 위치에서 아미노산 치환을 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 91

청구항 90에 있어서,

- (a) 상기 H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183D 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 EU 위치 V133K 돌연변이를 포함하고;
- (b) 상기 H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183E 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 EU 위치 V133K 돌연변이를 포함하고;
- (c) 상기 H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 EU 위치 V133E 돌연변이를 포함하고;
- (d) 상기 H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 EU 위치 V133S 돌연변이를 포함하고;
- (e) 상기 H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 EU 위치 V133L 돌연변이를 포함하고;
- (f) 상기 H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 EU 위치 V133W 돌연변이를 포함하고;
- (g) 상기 H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 EU 위치 V133K 돌연변이를 포함하고;
- (h) 상기 H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 EU 위치 V133R 돌연변이를 포함하고;
- (i) 상기 H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 EU 위치 V133D 돌연변이를 포함하고;
- (j) 상기 H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183T 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 EU 위치 V133E 돌연변이를 포함하고;
- (k) 상기 H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183T 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 EU 위치 V133S 돌연변이를 포함하고;
- (l) 상기 H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183T 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 EU 위치 V133L 돌연변이를 포함하고;
- (m) 상기 H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183T 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 EU 위치 V133W 돌연변이를 포함하고;
- (n) 상기 H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183T 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 EU 위치 V133K 돌연변이를 포함하고;
- (o) 상기 H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183T 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 EU 위치 V133R 돌연변이를 포함하고;

(kk) 상기 H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183F 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2 도메인의 CL는 EU 위치 V133D 돌연변이를 포함하고;

(ll) 상기 H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183H 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 EU 위치 V133S 돌연변이를 포함하고;

(mm) 상기 H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183H 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 EU 위치 V133L 돌연변이를 포함하고;

(nn) 상기 H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183H 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 EU 위치 V133W 돌연변이를 포함하고;

(oo) 상기 H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183N 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 EU 위치 V133L 돌연변이를 포함하고;

(pp) 상기 H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183E 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 EU 위치 V133L 돌연변이를 포함하거나; 또는

(qq) 상기 H2의 CH1 도메인은 S183K 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 V133E 돌연변이를 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 92

청구항 91에 있어서, 상기 H2의 CH1 도메인은 하기를 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질:

(a) 상기 H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183D 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 EU 위치 V133K 돌연변이를 포함하고;

(b) 상기 H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183E 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 EU 위치 V133K 돌연변이를 포함하고;

(c) 상기 H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183T 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 EU 위치 V133K 돌연변이를 포함하고;

(d) 상기 H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183V 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 EU 위치 V133E 돌연변이를 포함하고;

(e) 상기 H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183K 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 EU 위치 V133E 돌연변이를 포함한다.

청구항 93

청구항 50 내지 59 및 64 내지 78 중 어느 한 항에 있어서, 상기 H2의 CH1 도메인 및 상기 L2의 CL 도메인은 아미노산 치환을 포함하지 않는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 94

청구항 50 내지 59 및 64 내지 93 중 어느 한 항에 있어서, 상기 H1의 VH 도메인은 카뎀 위치 Q39에서의 아미노산 치환을 포함하고, 그리고 상기 V1의 VL 도메인은 카뎀 위치 Q38에서의 아미노산 치환을 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 95

청구항 94에 있어서, 상기 H1의 VH 도메인 상의 카뎀 위치 Q39에서의 아미노산은 양으로 하전된 잔기로 대체되고, 그리고 상기 L1의 VL 도메인 상의 카뎀 위치 Q38에서의 아미노산은 음으로 하전된 잔기로 대체되는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 96

청구항 94에 있어서, 상기 H1의 VH 도메인 상의 카뎀 위치 Q39에서의 아미노산은 음으로 하전된 잔기로 대체되고, 그리고 상기 L1의 VL 도메인 상의 카뎀 위치 Q38에서의 아미노산은 양으로 하전된 잔기로 대체되는, 다중특

이적 항원 결합 단백질.

청구항 97

청구항 94 내지 96 중 어느 한 항에 있어서, 상기 양으로 하전된 잔기는 R 및 K로 구성된 군으로부터 선택되는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 98

청구항 94 내지 97 중 어느 한 항에 있어서, 상기 음으로 하전된 잔기는 D 및 E로 구성된 군으로부터 선택되는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 99

청구항 50 내지 59 및 64 내지 93 중 어느 한 항에 있어서, 상기 H1의 VH 도메인은 카뎃 위치 Q39E 치환 돌연변이를 포함하고, 상기 L1의 VL 도메인은 카뎃 위치 Q38K 치환을 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 100

청구항 50 내지 59 및 64 내지 93 중 어느 한 항에 있어서, 상기 H1의 VH 도메인은 카뎃 위치 Q39E 치환 돌연변이를 포함하고, 상기 L1의 VL 도메인은 카뎃 위치 Q38K 치환을 포함하고, 그리고 상기 H2의 VH 도메인은 카뎃 위치 Q39K 치환 돌연변이를 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 101

청구항 50 내지 59 및 64 내지 93 중 어느 한 항에 있어서, 상기 H1의 VH 도메인은 카뎃 위치 Q39E 치환 돌연변이를 포함하고, 상기 L1의 VL 도메인은 카뎃 위치 Q38K 치환을 포함하고, 상기 H2의 VH 도메인은 카뎃 위치 Q39K 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 VL 도메인은 카뎃 위치 Q38E 치환 돌연변이를 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 102

청구항 50 내지 59 및 64 내지 93 중 어느 한 항에 있어서, 상기 H1의 VH 도메인은 카뎃 위치 Q39K 치환 돌연변이를 포함하고, 상기 L1의 VL 도메인은 카뎃 위치 Q38E 치환을 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 103

청구항 50 내지 59 및 64 내지 93 중 어느 한 항에 있어서, 상기 H1의 VH 도메인은 카뎃 위치 Q39K 치환 돌연변이를 포함하고, 상기 L1의 VL 도메인은 카뎃 위치 Q38E 치환을 포함하고, 그리고 상기 H2의 VH 도메인은 카뎃 위치 Q39E 치환 돌연변이를 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 104

청구항 50 내지 59 및 64 내지 93 중 어느 한 항에 있어서, 상기 H1의 VH 도메인은 카뎃 위치 Q39K 치환 돌연변이를 포함하고, 상기 L1의 VL 도메인은 카뎃 위치 Q38E 치환을 포함하고, 상기 H2의 VH 도메인은 카뎃 위치 Q39E 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 VL 도메인은 카뎃 위치 Q38K 치환 돌연변이를 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 105

청구항 50 내지 103 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 H1는 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 Fc 영역을 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 106

청구항 50 내지 105 중 어느 한 항에 있어서, 상기 H1 및/또는 H2의 Fc 영역은 인간 IgG1, 인간 IgG2 또는 인간 IgG4 Fc인, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 107

청구항 50 내지 105 중 어느 한 항에 있어서, 상기 H1 및/또는 H2의 Fc 영역은 마우스 IgG1, 마우스 IgG2 또는 마우스 IgG4 Fc인, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 108

청구항 106 또는 107에 있어서, 상기 H1 및 H2의 CH3 도메인 각각은 계면에서 만나고, 그리고 여기서 각각의 CH3 도메인은 아미노산 치환을 포함하고, 이로써 상기 H1의 Fc 영역은 H1과 비교하여 H2의 영역과 우선적으로 쌍을 이룬, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 109

청구항 108에 있어서, 상기 CH3 도메인에서의 아미노산 치환은 더 큰 정전기 상보성을 초래하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 110

청구항 108에 있어서, 상기 CH3 도메인에서의 아미노산 치환은 더 큰 입체 상보성을 초래하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 111

청구항 108에 있어서,

상기 H1의 CH3 도메인은, 상기 CH3/CH3 계면 내에, 1종 이상의 아미노산 잔기가 더 큰 측쇄 용적을 갖는 1종 이상의 아미노산 잔기로 대체되도록 변경되고, 이로써 H2의 CH3 도메인과 상호작용하는 H1의 CH3 도메인의 표면 상에 돌출부를 생성하고 및

상기 H2의 CH3 도메인은, 상기 CH3/CH3 계면 내에서 1종 이상의 아미노산 잔기가 더 작은 측쇄 용적을 갖는 아미노산 잔기로 대체되도록 변경되고, 이로써 H1의 CH3 도메인과 상호작용하는 H2의 CH3 도메인의 표면 상에서 공동을 생성하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 112

청구항 108에 있어서,

상기 H2의 CH3 도메인은, 상기 CH3/CH3 계면 내에, 1종 이상의 아미노산 잔기가 더 큰 측쇄 용적을 갖는 1종 이상의 아미노산 잔기로 대체되도록 변경되고, 이로써 H1의 CH3 도메인과 상호작용하는 H2의 CH3 도메인의 표면 상에 돌출부를 생성하고,

그리고

상기 H1의 CH3 도메인은, 상기 CH3/CH3 계면 내에, 1종 이상의 아미노산 잔기가 더 작은 측쇄 용적을 갖는 아미노산 잔기로 대체되도록 변경되고, 이로써 H2의 CH3 도메인과 상호작용하는 H1의 CH3 도메인의 표면 상에 공동을 생성하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 113

청구항 111 또는 112에 있어서, 상기 돌출부는 좁 돌연변이인, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 114

청구항 113에 있어서, 상기 좁 돌연변이는 T366W (EU 넘버링)를 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 115

청구항 111 또는 112에 있어서, 상기 공동은 홀 돌연변이인, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 116

청구항 115에 있어서, 상기 홀 돌연변이는 T366S, L368A, 및 Y407V (EU 넘버링) 중 적어도 1개, 적어도 2개 또는 3개 모두를 포함하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 117

청구항 1 내지 116 중 어느 한 항에 있어서, H1는 L2와 비교하여 L1과 우선적으로 쌍을 이루고, 그리고 여기서 H2는 L1과 비교하여 L2와 우선적으로 쌍을 이루는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 118

청구항 1 내지 117 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원은 동일한, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 119

청구항 1 내지 118 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 중쇄/경쇄 쌍 및 상기 제2 중쇄/경쇄 쌍 각각은 동일한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합하는, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 120

청구항 1 내지 117 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원은 상이한, 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 121

청구항 1 내지 120 중 어느 한 항의 다중특이적 항원 결합 단백질 및 약제학적으로 허용가능한 캐리어를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 122

개체에서 질환을 치료하는 방법으로서, 상기 개체에게 유효량의 청구항 121의 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 123

청구항 1 내지 122 중 어느 한 항의 다중특이적 항원 결합 단백질의 적어도 1개의 폴리펩타이드 서열을 인코딩하는 단리된 핵산(들).

청구항 124

청구항 123의 핵산(들)을 포함하는 벡터.

청구항 125

청구항 123의 핵산(들) 또는 청구항 124의 벡터를 포함하는, 단리된 숙주세포.

청구항 126

청구항 125에 있어서, 상기 숙주세포는 원핵 숙주세포, 및 E. 콜리 세포, 진핵 숙주 세포, 효모 세포, 포유동물 세포, 또는 CHO 세포인, 숙주세포.

청구항 127

청구항 1 내지 120 중 어느 한 항의 다중특이적 항원 결합 단백질을 생성하는 방법으로서, 하기의 단계들을 포함하는, 방법:

- (a) 상기 H1, H2, L1, 및 L2 폴리펩타이드를 얻는 단계;
- (b) H1이 L2와 비교하여 L1과 우선적으로 쌍을 이루고, H2는 L1과 비교하여 L2와 우선적으로 쌍을 이루도록 하여 상기 다중특이적 항원 결합 단백질을 형성하는 단계.

청구항 128

청구항 1 내지 120 중 어느 한 항의 다중특이적 항원 결합 단백질을 생성하는 방법으로서, 하기의 단계들을 포

합하는, 방법:

- (a) H1, L1, H2, 및 L2를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 세트를 숙주세포에 도입하는 단계; 및
- (b) 상기 숙주세포를 배양하여 상기 다중특이적 항원 결합 단백질을 생성하는 단계.

청구항 129

청구항 128에 있어서, 상기 H1, L1, H2, 및 L2를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 세트는 예정된 비로 상기 숙주세포에 도입되는, 방법.

청구항 130

청구항 129에 있어서, 상기 숙주세포에 도입하기 위해 상기 폴리뉴클레오타이드의 최적의 비를 결정하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 131

청구항 127 내지 130 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다중특이적 항원 결합 단백질은 60% 이상의 상대 수율로 생성되는, 방법.

청구항 132

청구항 127 내지 131 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다중특이적 항원 결합 단백질은 적어도 약 70%, 적어도 약 71%, 적어도 약 71%, 적어도 약 72%, 적어도 약 73%, 적어도 약 74%, 적어도 약 75%, 적어도 약 76%, 적어도 약 77%, 적어도 약 78%, 적어도 약 79%, 적어도 약 80%, 적어도 약 81%, 적어도 약 82%, 적어도 약 83%, 적어도 약 84%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 99%, 또는 약 99% 초과와 상대 수율로 생성되는, 방법.

청구항 133

다중특이적 항원 결합 단백질을 생성하는 방법으로서, 청구항 125 내지 126 중 어느 한 항의 숙주세포를 배양하는 단계 및 상기 다중특이적 항원 결합 단백질을 생성하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 134

청구항 127 내지 133 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다중특이적 항원 결합 단백질을 회수하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 135

청구항 127 내지 134 중 어느 한 항의 방법으로 생성된 다중특이적 항원 결합 단백질.

청구항 136

청구항 1 내지 120 중 어느 한 항의 복수의 다중특이적 항원 결합 단백질을 인코딩하는 복수의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 라이브러리.

청구항 137

제1 항원 및 제2 항원에 결합하는 다중특이적 항원 결합 단백질을 선별하는 방법으로서, 하기의 단계들을 포함하는 방법:

- (a) 복수의 다중특이적 항원 결합 단백질을 청구항 123의 라이브러리로부터 얻는 단계;
- (b) 상기 복수의 다중특이적 항원 결합 단백질의 상기 제1 및 제2 항원에의 결합을 검정하는 단계; 및
- (c) 상기 제1 및 제2 항원에 결합하는 다중특이적 항원 결합 단백질을 확인하는 단계.

청구항 138

1) 제1 중쇄 서열 (H1) 및 제1 경쇄 서열 (L1)을 포함하는 제1 항원에 결합하는 제1 중쇄/경쇄 쌍, 및 2) 제2 중쇄 서열 (H2) 및 제2 경쇄 서열 (L2)을 포함하는 제2 항원에 결합하는 제2 중쇄/경쇄 쌍을 포함하는 다중특이적 항원 결합 단백질을 평가하기 위한 컴퓨터 판독가능 매체로서, 각 H1 및 H2는 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 중쇄 불변 도메인 (CH1)를 포함하고, 그리고 각 L1 및 L2는 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 경쇄 불변 도메인 (CL)을 포함하고; 하기를 포함하는 컴퓨터 판독가능 매체:

a) H1, L1, H2, 및 L2의 아미노산 치환을 나타내는 데이터를 포함하는 데이터셋으로서, 상기 H1의 CH1 도메인 내 아미노산 치환 중 적어도 1개는 EU 위치 F170 또는 L128에서의 아미노산 치환을 포함하고 및 상기 CL 도메인은 EU 위치 S176 또는 F118 및 L135에서의 아미노산 치환을 포함하는, 데이터셋; 및/또는

b) H1, L1, H2, 및 L2의 아미노산 치환을 나타내는 데이터를 포함하는 데이터셋으로서, 상기 H1의 CH1 도메인 내 아미노산 치환 중 적어도 1개는 EU 위치 S183에서의 아미노산을 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 EU 위치 V133에서의 아미노산을 포함하는, 데이터셋; 및

(b) H1는 L2와 비교하여 L1과 우선적으로 쌍을 이룰 것이고/거나 H2는 L1과 비교하여 L2와 우선적으로 쌍을 이룰 가능성을 결정하는 컴퓨터 실행가능 코드.

청구항 139

청구항 138에 있어서, 상기 H1의 CH1 도메인 내 아미노산 치환 중 적어도 1개는 EU 위치 F170 또는 L128 및 V185에서의 아미노산을 포함하는, 컴퓨터 판독가능 매체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차참조

[0002] 본원은 하기 우선권의 권리를 주장한다: 미국 가출원 번호 62/152,735 (2015년 4월 24일 출원), 62/264,291 (2015년 12월 7일 출원), 및 62/310,555 (2016년 3월 18일 출원) (이들 모두는 이로써 그 전문이 참고로 편입된다.)

[0003] 서열목록

[0004] 본원은 ASCII 포맷으로 전자적으로 제출되었던 서열목록을 포함하고 이로써 그 전문이 참고로 편입된다. 2016년 4월 22일 작성된, 상기 ASCII 카피는 P05841WO_PCTSequenceListing.txt로 명명되고 131,134 바이트 크기이다.

배경 기술

[0005] 인간 질환에 대한 치료제로서 이중특이적 항체의 개발은 대단한 임상 잠재력을 갖는다. 그러나, 항체 중쇄가 상대적으로 부정확한 방식으로 항체 경쇄에 결합하도록 진화됨에 따라, IgG 포맷으로 이중특이적 항체의 생산은 도전적이었다. 이 부정확한 짝짓기의 결과로서, 예를 들면, 2개의 항체 중쇄 및 2개의 항체 경쇄의 수반되는 발현은 자연적으로 중쇄 동형이량체화 및 중쇄/경쇄 짝짓기의 스크램블링으로 이어진다.

[0006] '놉스-인트-홀스(knobs-into-holes)'로서 공지된, 중쇄 동형이량체화의 문제를 회피하기 위한 하나의 접근법은 접촉 계면을 변형시키기 위해 CH3 도메인 속에 돌연변이의 도입에 의한 2개의 상이한 항체 중쇄의 짝짓기 강제를 목표로 한다. 하나의 중쇄상에서 최초 아미노산은 '홀'을 창출하기 위해 짧은 측쇄를 가진 아미노산으로 대체되었다. 반대로, 큰 측쇄를 가진 아미노산은 다른 CH3 도메인 속에 도입되어, '놉'을 창출하였다. 이들 2개의 중쇄 (및, 두 중쇄에 적절해야 하는, 2개의 동일한 경쇄)를 공동발현함으로써, 헤테로이량체 형성 ('놉-홀') 대 동형이량체 형성 ('홀-홀' 또는 놉-놉)의 고수율이 관측되었다 (Ridgway, J. B., Protein Eng. 9 (1996) 617-621; 및 WO 96/027011).

[0007] 중쇄/경쇄의 스크램블링 최소화는 항체 Fabs 내에서 복잡한 다중도메인 헤테로이량체 상호작용 때문에 더욱 어려워졌다. 중쇄/경쇄 스크램블링의 어드레싱을 목표로 한 이중특이적 항체 포맷은 하기를 포함한다: DVD-Ig (이중 가변 도메인(Dual Variable Domain) Ig) (Nature Biotechnology 25, 1290-1297 (2007)); 크로스오버(Cross-over) Ig (Schaefer W 등 (2011) PNAS 108(27): 11187-11192); 투인원(Two-in-One) Ig (Science 2009, 323, 1610); BiTE® 항체 (PNAS 92(15): 7021-7025; 1995) 및 Lewis 등에 기재된 전략. (2014) "Generation of bispecific IgG antibodies by structure-based desing of orthogonal Fab interface." *Nat Biotechnol* 32,

191-8; Liu 등 (2015) "A Novel Antibody Engineering Strategy for Making Monovalent Bispecific Heterodimeric IgG Antibodies by Electrostatic Steering Mechanism." *J Biol Chem.* 2015년 1월 12일 온라인 공개됨, doi:10.1074/jbc.M114.620260; Mazor 등 2015."Improving target cell specificity using a novel monovalent bispecific IgG design." *Mabs.* 2015년 1월 26일 온라인 공개됨, doi:10.1080/19420862.2015.1007816; WO 2014/081955, WO 2014/082179, 및 WO 2014/150973.

[0008] 짝짓기오류된 중쇄/경쇄 부산물을 감소시키기 위한 및 이중특이적 항체 수율을 증가시키기 위한 필요성이 계속된다.

[0009] 발명의 간략한 요약

[0010] 이하에 더 상세히 기재된 바와 같이, 그와 같은 비대칭 돌연변이를 포함하기 위해 변형된 다중특이적 항원-결합 단백질 (예컨대 이중특이적 항체)은 변형 없는 서열을 갖는 다중특이적 항원-결합 단백질과 비교하여, 특히, 다중특이적 항원-결합 단백질의 개선된 보정 중쇄/경쇄 짝짓기 및/또는 개선된 수율로 단일 세포에서 생성된다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 중쇄/경쇄 짝짓기의 보정을 용이하게 하기 위해 VH/VL 및/또는 CH1/CL 영역 중 변형(들)을 포함한다. 특정 다른 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 추가로 다중특이적 항원-결합 단백질의 2개의 아암의 헤테로이량체화를 용이하게 하기 위해 Fc 영역에서 변형(들)을 포함한다.

[0011] 하기를 포함하는 다중특이적 항원 결합 단백질, 또는 그것의 항원-결합 단편이 본 명세서에서 제공된다: a) 제1 중쇄 폴리펩타이드 (H1) 및 제1 경쇄 폴리펩타이드 (L1)를 포함하는 제1 항원에 결합하는 제1 중쇄/경쇄 쌍, 및 b) 제2 중쇄 폴리펩타이드 (H2) 및 제2 경쇄 폴리펩타이드 (L2)를 포함하는 제2 항원에 결합하는 제2 중쇄/경쇄 쌍, 여기서 각 H1 및 H2는 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 중쇄 불변 도메인(CH1)를 포함하고, 그리고 각 L1 및 L2는 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 경쇄 불변 도메인 (CL)을 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 S183 (EU 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133 (EU 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 특정 구현예에서, L1은 카파 사슬이다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 특정 구현예에서, L2는 카파 사슬이다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 특정 구현예에서, L1 및 L2 각각은 카파 사슬이다.

[0012] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, S183 치환은 S183A, S183T, S183V, S183Y, S183F, S183H, S183N, S183D, S183E, S183R, 및 S183K로 구성된 군으로부터 선택되고, 그리고 상기 V133 치환은 V133E, V133S, V133L, V133W, V133K, V133R, 및 V133D로 구성된 군으로부터 선택된다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 CH1 도메인 상의 EU 위치 S183에 있는 아미노산은 양으로 하전된 잔기로 치환되고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인 상의 V133에 있는 아미노산은 음으로 하전된 잔기로 치환된다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 CH1 도메인 상의 EU 위치 S183에 있는 아미노산은 음으로 하전된 잔기로 치환되고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인 상의 V133에 있는 아미노산은 양으로 하전된 잔기로 치환된다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 양으로 하전된 잔기는 R 및 K로 구성된 군으로부터 선택된다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 음으로 하전된 잔기는 D 및 E로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0013] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 특정 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 S183 (EU 넘버링)에서의 아미노산 치환으로 구성되고, 그리고 L1의 CL 도메인은 V133 (EU 넘버링)에서의 아미노산 치환으로 구성된다.

[0014] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 S183D 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133K 돌연변이를 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 S183E 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133K 돌연변이를 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 S183A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133E 돌연변이를 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 S183A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133S 돌연변이를 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 S183A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133L 돌연변이를 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 S183A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133W 돌연변이를 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 S183A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133K 돌연변이를 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 S183A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133R 돌연변이를 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 S183A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133D 돌연변이를 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 S183T 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133E 돌연변이를 포함하고; 상기 H1의 CH1

[illegible]

- [0015] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 S183D 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133K 돌연변이를 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 S183E 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133K 돌연변이를 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 S183T 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133K 돌연변이를 포함하거나; 또는 상기 H1의 CH1 도메인은 S183V 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133E 돌연변이를 포함한다.
- [0016] 특정 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 S183K 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133E 돌연변이를 포함한다.
- [0017] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 S183D 돌연변이로 구성되고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133K 돌연변이로 구성되고; 상기 H1의 CH1 도메인은 S183E 돌연변이로 구성되고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133K 돌연변이로 구성되고; 상기 H1의 CH1 도메인은 S183T 돌연변이로 구성되고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133K 돌연변이로 구성되거나; 또는 상기 H1의 CH1 도메인은 S183V 돌연변이로 구성되고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133E 돌연변이로 구성된다. 특정 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 S183K 돌연변이로 구성되고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133E 돌연변이로 구성된다.
- [0018] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 상기 H2의 CH1 도메인 및/또는 상기 L2의 CL 도메인은 아미노산 치환을 포함하지 않는다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 상기 H2의 CH1 도메인은 S183에서의 치환을 포함하지 않고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은

V133에서의 치환을 포함하지 않는다.

- [0019] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1 및/또는 H2의 VH 도메인은 위치 Q39 (카밧 넘버링)에서의 아미노산을 포함하고, 그리고 L1 및/또는 L2의 VL 도메인은 위치 Q38 (카밧 넘버링)에서의 아미노산을 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, VH 도메인에 있는 Q39에서의 아미노산은 양으로 하전된 잔기로 치환되고, 그리고 상기 VL 도메인에 있는 Q38에서의 아미노산은 음으로 하전된 잔기로 치환된다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, VH 도메인에 있는 Q39에서의 아미노산은 음으로 하전된 잔기로 치환되고, 그리고 상기 VL 도메인에 있는 Q38에서의 아미노산은 양으로 하전된 잔기로 치환된다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 양으로 하전된 잔기는 R 및 K로 구성된 군으로부터 선택된다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 음으로 하전된 잔기는 D 및 E로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0020] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 CH1 도메인 상의 EU 위치 S183에 있는 아미노산은 음으로 하전된 잔기로 치환되고, VH 도메인에 있는 Q39에서의 아미노산은 양으로 하전된 잔기로 치환되고, L1의 CL 도메인 상의 V133에 있는 아미노산은 양으로 하전된 잔기로 치환되고, 그리고 상기 VL 도메인에 있는 Q38에서의 아미노산은 음으로 하전된 잔기 (카밧 넘버링)으로 치환된다.
- [0021] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 CH1 도메인 상의 EU 위치 S183에 있는 아미노산은 양으로 하전된 잔기로 치환되고, VH 도메인에 있는 Q39에서의 아미노산은 음으로 하전된 잔기로 치환되고, L1의 CL 도메인 상의 V133에 있는 아미노산은 음으로 하전된 잔기로 치환되고, 그리고 상기 VL 도메인에 있는 Q38에서의 아미노산은 양으로 하전된 잔기 (카밧 넘버링)으로 치환된다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 CH1 도메인 상의 EU 위치 S183에 있는 아미노산은 양으로 하전된 잔기로 치환되고, VH 도메인에 있는 Q39에서의 아미노산은 음으로 하전된 잔기로 치환되고, L1의 CL 도메인 상의 V133에 있는 아미노산은 음으로 하전된 잔기로 치환되고, 그리고 상기 L1의 VL 도메인 중 Q38에서의 아미노산은 양으로 하전된 잔기 (카밧 넘버링)으로 치환된다. 추가 구현예에서, 상기 H2의 CH1 도메인 상의 EU 위치 S183에서의 아미노산은 음으로 하전된 잔기로 치환되고, H2의 VH 도메인 중 Q39에서의 아미노산은 양으로 하전된 잔기로 치환되고, L2의 CL 도메인 상의 V133에서의 아미노산은 양으로 하전된 잔기로 치환되고, 그리고 상기 VL 도메인에 있는 Q38에서의 아미노산은 음으로 하전된 잔기 (카밧 넘버링)으로 치환된다.
- [0022] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 그리고 상기 L1의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이를 포함하고, L1의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 H2의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이를 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이를 포함하고, L1의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이를 포함하고, H2의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이를 포함한다.
- [0023] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 그리고 상기 L1의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이를 포함하고, L1의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 H2의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (모든 카밧 넘버링)을 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이를 포함하고, H2의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (모든 카밧 넘버링)을 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이를 포함하고, L1의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이를 포함하고, H2의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (모든 카밧 넘버링)을 포함한다.
- [0024] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 2종의 치환된 아미노산 사이의 상호작용은 수소 결합에 의한 것이다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 2종의 치환된 아미노산 사이의 상호작용은 정전기 상호작용에 의한 것이다.
- [0025] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 H1의 CH1 도메인은 S183E 치환 돌연변이를 포함하고, L1의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 V133K 돌연변이를 포함하고, H2의 VH 도메인은 Q39E 치환

돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이를 포함한다.

- [illegible]

- [0036] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이를 포함하고, H1의 CH1 도메인은 S183K 치환 돌연변이를 포함하고, L1의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이를 포함하고, L1의 CL 도메인은 V133E 치환 돌연변이를 포함하고, H2의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이를 포함하고, 상기 H2의 CH1 도메인은 S183E 치환 돌연변이를 포함하고, L2의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 V133K 돌연변이를 포함한다.
- [0037] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 각각의 H1 및/또는 H2는 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 Fc 영역을 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1 및/또는 H2의 Fc 영역은 인간 IgG1, 인간 IgG2 또는 인간 IgG4 Fc이다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1 및/또는 H2의 Fc 영역은 마우스 IgG1, 마우스 IgG2 또는 마우스 IgG4 Fc이다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1 및 H2의 CH3 도메인 각각은 계면에서 만나고, 그리고 각각의 CH3 도메인은 아미노산 치환을 포함하고, 이로써 상기 H1의 Fc 영역은 H1과 비교하여 H2의 영역과 우선적으로 쌍을 이룬다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, CH3 도메인에서의 아미노산 치환은 더 큰 정전기 상보성을 초래한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, CH3 도메인에서의 아미노산 치환은 더 큰 입체 상보성을 초래한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 CH3 도메인은, 상기 CH3/CH3 계면 내에, 1종 이상의 아미노산 잔기가 더 큰 측쇄 용적을 갖는 1종 이상의 아미노산 잔기로 치환되도록 변경되고, 이로써 H2의 CH3 도메인과 상호작용하는 H1의 CH3 도메인의 표면 상에 돌출부를 생성하고, 그리고 H2의 CH3 도메인은, 상기 CH3/CH3 계면 내에서 1종 이상의 아미노산 잔기가 더 작은 측쇄 용적을 갖는 아미노산 잔기로 치환되도록 변경되고, 이로써 H1의 CH3 도메인과 상호작용하는 H2의 CH3 도메인의 표면 상에 공동을 생성한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H2의 CH3 도메인은, 상기 CH3/CH3 계면 내에, 1종 이상의 아미노산 잔기가 더 큰 측쇄 용적을 갖는 1종 이상의 아미노산 잔기로 치환되도록 변경되고, 이로써 H1의 CH3 도메인과 상호작용하는 H2의 CH3 도메인의 표면 상에 돌출부를 생성한다 및 H1의 CH3 도메인은, 상기 CH3/CH3 계면 내에, 1종 이상의 아미노산 잔기가 더 작은 측쇄 용적을 갖는 아미노산 잔기로 치환되도록 변경되고, 이로써 H2의 CH3 도메인과 상호작용하는 H1의 CH3 도메인의 표면 상에 공동을 생성한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 돌출부는 좁 돌연변이이다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 좁을 생성하는 변형은 T366W (EU 넘버링)을 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 공동은 홀 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 홀을 생성하는 변형은 T366S, L368A, 및 Y407V 중 적어도 하나이다.
- [0038] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 좁은 T366W (EU 넘버링)을 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 홀 돌연변이는 T366S, L368A, 및 Y407V 중 적어도 1개, 적어도 2개 또는 3개 모두를 포함한다.
- [0039] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 CH1 도메인은, CH1/CL 계면 내에서, 2종 이상의 아미노산 잔기가 더 큰 측쇄 용적을 갖는 동등한 수의 아미노산 잔기로 치환되도록 추가로 변경되고, 이로써 L1의 CL 도메인과 상호작용하는 H1의 CH1 도메인의 표면 상에 돌출부를 생성하고, 그리고 L1의 CL 도메인은, CH1/CL 계면 내에서, 2종 이상의 아미노산 잔기가 더 작은 측쇄 용적을 갖는 동등한 수의 아미노산 잔기로 치환되도록 추가로 변경되고, 이로써 H1의 CH1 도메인과 상호작용하는 L1의 CL 도메인의 표면 상에 공동을 생성한다.
- [0040] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, CL 도메인은, CH1/CL 계면 내에서, 2종 이상의 아미노산 잔기가 더 큰 측쇄 용적을 갖는 동등한 수의 아미노산 잔기로 치환되도록 추가로 변경되고, 이로써 H1의 CH1 도메인과 상호작용하는 CL 도메인의 표면 상에 돌출부를 생성하고, 그리고 H1의 CH1 도메인은, CH1/CL 계면 내에서, 2종 이상의 아미노산 잔기가 더 작은 측쇄 용적을 갖는 동등한 수의 아미노산 잔기로 치환되도록 추가로 변경되고, 이로써 CL 도메인과 상호작용하는 H1의 CH1 도메인의 표면 상에 공동을 생성한다.
- [0041] 하기를 포함하는 다중특이적 항원 결합 단백질, 또는 그것의 항원-결합 단편이 본 명세서에서 또한 제공된다:
a) 제1 중쇄 폴리펩타이드 (H1) 및 제1 경쇄 폴리펩타이드 (L1)를 포함하는 제1 중쇄/경쇄 쌍, 및 b) 제2 중쇄 폴리펩타이드 (H2) 및 제2 경쇄 폴리펩타이드 (L2)를 포함하는 제2 중쇄/경쇄 쌍, 각 H1 및 H2는 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 중쇄 불변 도메인 (CH1)를 포함하고, 그리고 각 L1 및 L2는 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 경쇄 불변 도메인 (CL)을 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 F170 (EU 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함하고, 그리고 L1의 CL 도메인은 S176 (EU 넘버링)에서의 아미노산 치환을 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그

것에 적용된) 특정 구현예에서, L1은 카파 사슬이다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 특정 구현예에서, L2는 카파 사슬이다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 특정 구현예에서, L1 및 L2 각각은 카파 사슬이다.

[0042] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 추가로, 하기로 구성된 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환을 포함한다: A141, S181, S183, 및 V185 (EU 넘버링). 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, L1의 CL 도메인은 추가로, F116, S131, V133, L135, S162, S174, 및 T178 (EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 아미노산 치환은 입체 상보성을 초래한다.

[0043] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, CH1의 A141, F170, S181, S183, V185 (EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환 및/또는 CL의 F116, S131, V133, L135, S162, S174, S176, 및 T178 (EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환은 하전된 아미노산 잔기로 치환되지 않는다..

[0044] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 F170S 및 F170A로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 치환을 포함하고, 그리고 L1의 CL 도메인은 S176F의 아미노산 치환을 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 S176F 돌연변이를 포함하고; 또는 H1의 CH1 도메인은 F170A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 S176F 돌연변이를 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 S176F 돌연변이를 포함한다.

[0045] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 A141I, F170S, S181M, S183V, 및 V185A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, V133I, L135V, S162M, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이를 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, S131D, L135V, S162A, S174A, S176F, 및 T178I 돌연변이를 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이를 포함하거나; 또는 상기 H1의 CH1 도메인은 A141I, F170A, S181M, S183V, 및 V185A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S162M, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이를 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이를 포함한다.

[0046] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이를 포함한다.

[0047] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이를 포함하고, L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이를 포함하고, 상기 H2의 CH1 도메인은 S183 (EU 넘버링)에서의 아미노산 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 아미노산 치환 돌연변이 V133K (EU 넘버링)을 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이를 포함하고, L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이를 포함하고, 상기 H2의 CH1 도메인은 S183 (EU 넘버링)에서의 아미노산 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 아미노산 치환 돌연변이 V133 (EU 넘버링)을 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 특정 구현예에서, 상기 H2의 CH1 도메인에 있는 위치 S183에서의 아미노산은 양으로 하전된 아미노산으로 치환되고, 그리고 L2의 CL 도메인에 있는 위치 V133에서의 아미노산은 음으로 하전된 아미노산으로 치환된다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 특정 구현예에서, 상기 H2의 CH1 도메인에 있는 위치 S183에서의 아미노산은 음으로 하전된 아미노산으로 치환되고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인에 있는 위치 V133에서의 아미노산은 양으로 하전된 아미노산으로 치환된다.

[0048] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하고, H1의 VH 도메인은 Q39E 돌연변이 (카바트 넘버링)을

및 T178V 돌연변이를 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 A141I 및 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, 및 S176F 돌연변이를 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 A141I 및 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, 및 S176F 돌연변이를 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이를 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S176F, 및 T178V 돌연변이를 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이를 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, 및 S176F 돌연변이를 포함하고; or H1의 CH1 도메인은 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, 및 S176F 돌연변이를 포함한다.

[0055] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 H1의 CH1 도메인은 A141I, F170S, S181M, 및 S183A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S174A, 및 S176F 돌연변이를 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 F170S, S181M, 및 S183A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, 및 S176F 돌연변이를 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 A141I 및 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S174A, 및 S176F 돌연변이를 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 A141I 및 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, 및 S176F 돌연변이를 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S174A, 및 S176F 돌연변이를 포함하거나; 또는 상기 H1의 CH1 도메인은 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, 및 S176F 돌연변이를 포함한다.

[0056] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 A141I, F170S, 및 S181M 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이를 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 A141I 및 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이를 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이를 포함한다.

[0057] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 A141I 및 F170S 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S174A, 및 S176F 돌연변이를 포함한다.

[0058] 하기를 포함하는, 항원 결합 단백질, 또는 그것의 항원-결합 단편이 본 명세서에서 제공된다: a) 제1 중쇄 서열 (H1) 및 제1 경쇄 서열 (L1)을 포함하는 제1 중쇄/경쇄 쌍, 및 b) 제2 중쇄 서열 (H2) 및 제2 경쇄 서열 (L2)을 포함하는 제2 중쇄/경쇄 쌍, 각 H1 및 H2는 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 중쇄 불변 도메인 (CH1)를 포함하고, 그리고 각 L1 및 L2는 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 경쇄 불변 도메인 (CL)을 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 L128 및 V185, (EU 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함하고 및 C1의 CL 도메인은 F118 및 L135 (EU 넘버링)에서의 아미노산 치환을 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 특정 구현예에서, L1은 카파 사슬이다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 특정 구현예에서, L2는 카파 사슬이다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 특정 구현예에서, L1 및 L2 각각은 카파 사슬이다.

[0059] 또한 하기를 포함하는, 항원 결합 단백질, 또는 그것의 항원-결합 단편이 본 명세서에서 제공된다: a) 제1 중쇄 서열 (H1) 및 제1 경쇄 서열 (L1)을 포함하는 제1 중쇄/경쇄 쌍, 및 b) 제2 중쇄 서열 (H2) 및 제2 경쇄 서열 (L2)을 포함하는 제2 중쇄/경쇄 쌍, 각 H1 및 H2는 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 중쇄 불변 도메인 (CH1)를 포함하고, 그리고 각 L1 및 L2는 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 경쇄 불변 도메인 (CL)을 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 L128, (EU 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함하고 및 C1의 CL 도메인은 F118 및 L135 (EU 넘버링)에서의 아미노산 치환을 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 특정 구현예에서, L1은 카파 사슬이다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 특정 구현예에서, L2는 카파 사슬이다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 특정 구현예에서, L1 및 L2 각각은 카파 사슬이다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 추가로, V185 (EU 넘버링)에서의 아미노산 치환을 포함한다.

[0060] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 추가로, 하기로 구성된 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환을 포함한다: A141, F170, S181, 및 S183 (EU

넘버링). 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, L1의 CL 도메인은 추가로, S131, V133, S162, T164, S176 및 T178 (EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 아미노산 치환은 더 큰 입체 상보성을 초래한다.

[0061] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 A141, F170, S181, 및 S183으로 구성된 군으로부터 선택된 위치에서 아미노산 치환을 포함하고, 그리고 CL 도메인은 S131, V133, S162, T164, S176 및 T178로 구성된 군으로부터 선택된 위치에서 아미노산 치환을 포함한다.

[0062] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, CH1의 L128 A141, F170, S181, S183, V185 (EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환 및/또는 CL의 F118, S131, V133, 및 L135 S162, T164, S176 및 T178 (EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환은 하전된 아미노산 잔기로 치환되지 않는다.

[0063] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 L128F, A141M, F170M, S181I 및 S183A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 CL 도메인은 F118V, S131T, V133A, L135Y, S162A, T164S, S176M, 및 T178L 돌연변이를 포함하고; H1의 CH1 도메인은 L128F, A141M, F170Y, S181I, S183A, 및 V185A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 CL 도메인은 F118V, S131T, V133A, L135F, S162A, S176A, 및 T178L 돌연변이를 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 L128F, A141T, F170M, S181T, S183A, 및 V185L 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 CL 도메인은 F118V, S131T, V133A, L135F, S162A, T164S, S176T, 및 T178L 돌연변이를 포함하거나; 또는 H1의 CH1 도메인은 L128F, A141M, F170M, S181T, 및 S183A, 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 CL 도메인은 F118V, S131T, V133A, L135F, S162M, T164S, S176M, 및 T178L 돌연변이를 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 L128F, A141M, F170Y, S181I, S183A, 및 V185A 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 CL 도메인은 F118V, S131T, V133A, L135F, S162A, S176A, 및 T178L 돌연변이를 포함한다.

[0064] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 상기 H2의 CH1 도메인은 S183E 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 V133K 돌연변이를 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 VH 도메인은 Q39E 돌연변이를 포함하고, L1의 VL 도메인은 Q38K 돌연변이를 포함하고, H2의 VH 도메인은 Q39K 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 VL 도메인은 Q38E 돌연변이를 포함한다.

[0065] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 상기 H2의 CH1 도메인은 S183K 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 V133E 돌연변이를 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 VH 도메인은 Q39K 돌연변이를 포함하고, L1의 VL 도메인은 Q38E 돌연변이를 포함하고, H2의 VH 도메인은 Q39E 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 VL 도메인은 Q38K 돌연변이를 포함한다.

[0066] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 상기 H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183에서의 아미노산을 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 EU 위치 V133에서의 아미노산을 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 상기 H2의 CH1 도메인 상의 EU 위치 S183에서의 아미노산과 L2의 CL 도메인 상의 EU 위치 V133에서의 아미노산 사이의 상호작용은 정전기 상호작용에 의한 것이다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 상기 H2의 CH1 도메인 상의 EU 위치 S183에서의 아미노산은 양으로 하전된 잔기로 치환되고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인 상의 EU 위치 V133에서의 아미노산은 음으로 하전된 잔기로 치환된다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 상기 H2의 CH1 도메인 상의 EU 위치 S183에서의 아미노산은 음으로 하전된 잔기로 치환되고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인 상의 EU 위치 V133에서의 아미노산은 양으로 하전된 잔기로 치환된다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 상기 H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183A, S183T, S183V, S183Y, S183F, S183H, S183N, S183D, S183E, S183R, 및 S183K로 구성된 군으로부터 선택된 위치에서 아미노산 치환, 및 L2의 CL 도메인은 EU 위치 V133E, V133S, V133L, V133W, V133K, V133R, 및 V133D로 구성된 군으로부터 선택된 위치에서 아미노산 치환을 포함한다.

[0067] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183D 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 EU 위치 V133K 돌연변이를 포함하고; 상기 H2의 CH1 도메인은 EU 위치 S183E 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 CL 도메인은 EU 위치 V133K 돌연변이를 포함하고; 상

[illegible]

- [0068] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 VH 도메인은 카밧 위치 Q39에서의 아미노산 치환을 포함하고, 그리고 상기 V1의 VL 도메인은 카밧 위치 Q38에서의 아미노산 치환을 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 VH 도메인 상의 카밧 위치 Q39에서의 아미노산은 양으로 하전된 잔기로 치환되고, 그리고 상기 L1의 VL 도메인 상의 카밧 위치 Q38에서의 아미노산은 음으로 하전된 잔기로 치환된다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 VH 도메인 상의 카밧 위치 Q39에서의 아미노산은 음으로 하전된 잔기로 치환되고, 그리고 상기 L1의 VL 도메인 상의 카밧 위치 Q38에서의 아미노산은 양으로 하전된 잔기로 치환된다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 양으로 하전된 잔기는 R 및 K로 구성된 군으로부터 선택된다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 음으로 하전된 잔기는 D 및 E로 구성된 군으로부터 선택된다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 VH 도메인은 카밧 위치 Q39E 치환 돌연변이를 포함하고, 상기 L1의 VL 도메인은 카밧 위치 Q38K 치환을 포함하고, 상기 H2의 VH 도메인은 카밧 위치 Q39K 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 VL 도메인은 카밧 위치 Q38E 치환 돌연변이를 포함한다.
- [0069] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 VH 도메인은 카밧 위치 Q39E 치환 돌연변이를 포함하고, 상기 L1의 VL 도메인은 카밧 위치 Q38K 치환을 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 VH 도메인은 카밧 위치 Q39E 치환 돌연변이를 포함하고, 상기 L1의 VL 도메인은 카밧 위치 Q38K 치환을 포함하고, 그리고 상기 H2의 VH 도메인은 카밧 위치 Q39K 치환 돌연변이를 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 VH 도메인은 카밧 위치 Q39E 치환 돌연변이를 포함하고, 상기 L1의 VL 도메인은 카밧 위치 Q38K 치환을 포함하고, 상기 H2의 VH 도메인은 카밧 위치 Q39K 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 VL 도메인은 카밧 위치 Q38E 치환 돌연변이를 포함한다.
- [0070] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 VH 도메인은 카밧 위치 Q39K 치환 돌연변이를 포함하고, 상기 L1의 VL 도메인은 카밧 위치 Q38E 치환을 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 VH 도메인은 카밧 위치 Q39K 치환 돌연변이를 포함하고, 상기 L1의 VL 도메인은 카밧 위치 Q38E 치환을 포함하고, 그리고 상기 H2의 VH 도메인은 카밧 위치 Q39E 치환 돌연변이를 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 VH 도메인은 카밧 위치 Q39K 치환 돌연변이를 포함하고, 상기 L1의 VL 도메인은 카밧 위치 Q38E 치환을 포함하고, 상기 H2의 VH 도메인은 카밧 위치 Q39E 치환 돌연변이를 포함하고, 그리고 상기 L2의 VL 도메인은 카밧 위치 Q38K 치환 돌연변이를 포함한다.
- [0071] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1는 L2와 비교하여 L1과 우선적으로 쌍을 이루고, 그리고 H2는 L1과 비교하여 L2와 우선적으로 쌍을 이룬다.
- [0072] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1는 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 Fc 영역을 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1 및/또는 H2의 Fc 영역은 IgG1, IgG2 또는 IgG4 Fc이다.
- [0073] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1 및/또는 H2의 Fc 영역은 마우스 IgG1, 마우스 IgG2 또는 마우스 IgG4 Fc이다.
- [0074] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1 및 H2의 CH3 도메인 각각은 계면에서 만나고, 그리고 각각의 CH3 도메인은 아미노산 치환을 포함하고, 이로써 상기 H1의 Fc 영역은 H1과 비교하여 H2의 영역과 우선적으로 쌍을 이룬다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, CH3 도메인에서의 아미노산 치환은 더 큰 정전기 상보성을 초래한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, CH3 도메인에서의 아미노산 치환은 더 큰 입체 상보성을 초래한다.
- [0075] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1의 CH3 도메인은, 상기 CH3/CH3 계면 내에, 1종 이상의 아미노산 잔기가 더 큰 측쇄 용적을 갖는 1종 이상의 아미노산 잔기로 치환되도록 변경되고, 이로써 H2의 CH3 도메인과 상호작용하는 H1의 CH3 도메인의 표면 상에 돌출부를 생성하고; 그리고 H2의 CH3 도메인은, 상기 CH3/CH3 계면 내에서 1종 이상의 아미노산 잔기가 더 작은 측쇄 용적을 갖는 아미노산 잔기로 치환되도록 변경되고, 이로써 H1의 CH3 도메인과 상호작용하는 H2의 CH3 도메인의 표면 상에서 공동을 생성한다.

- [0076] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H2의 CH3 도메인은, 상기 CH3/CH3 계면 내에, 1종 이상의 아미노산 잔기가 더 큰 측쇄 용적을 갖는 1종 이상의 아미노산 잔기로 치환되도록 변경되고, 이로써 H1의 CH3 도메인과 상호작용하는 H2의 CH3 도메인의 표면 상에 돌출부를 생성한다; 및 H1의 CH3 도메인은, 상기 CH3/CH3 계면 내에, 1종 이상의 아미노산 잔기가 더 작은 측쇄 용적을 갖는 아미노산 잔기로 치환되도록 변경되고, 이로써 H2의 CH3 도메인과 상호작용하는 H1의 CH3 도메인의 표면 상에 공동을 생성한다.
- [0077] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 돌출부는 늪이다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 늪을 생성하는 변경은 T366W이다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 공동은 홀이다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 홀을 생성하는 변경은 T366S, L368A, 및 Y407V 중 적어도 하나이다.
- [0078] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 늪은 T366W (EU 넘버링)을 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 홀 돌연변이는 T366S, L368A, 및 Y407V 중 적어도 1개, 적어도 2개 또는 3개 모두를 포함한다.
- [0079] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1는 L2와 비교하여 L1과 우선적으로 쌍을 이루고, 그리고 여기서 H2는 L1과 비교하여 L2와 우선적으로 쌍을 이룬다.
- [0080] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 제1 항원 및 제2 항원은 동일하다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 제1 중쇄/경쇄 쌍 및 상기 제2 중쇄/경쇄 쌍 각각은 동일한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 제1 항원 및 제2 항원은 상이하다.
- [0081] 상기 구현예 중 임의의 것의 다중특이적 항원 결합 단백질, 및 약제학적으로 허용가능한 캐리어를 포함하는 약제학적 조성물이 또한 본 명세서에서 제공된다. 개체에서 질환을 치료하는 방법이 본 명세서에서 또한 제공되고, 상기 방법은 상기 개체에게 유효량의 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함한다.
- [0082] 상기 구현예 중 임의의 하나의 다중특이적 항원 결합 단백질의 적어도 1개의 폴리펩타이드 서열을 인코딩하는 단리된 핵산(들)이 제공된다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 핵산(들)을 포함하는 벡터가 또한 제공된다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 핵산(들), 또는 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 벡터를 포함하는 단리된 숙주세포가 또한 제공된다.
- [0083] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 숙주세포는 원핵 숙주세포, 및 E. 콜리 세포, 진핵 숙주 세포, 효모 세포, 포유동물 세포, 또는 CHO 세포이다.
- [0084] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 다중특이적 항원 결합 단백질을 생성하는 방법이 본 명세서에서 제공되고, 상기 방법은 하기를 포함한다: (a) 상기 H1, H2, L1, 및 L2 폴리펩타이드를 얻는 단계; (b) H1이 L2와 비교하여 L1과 우선적으로 쌍을 이루고, H2는 L1과 비교하여 L2와 우선적으로 쌍을 이루도록 하여 상기 다중특이적 항원 결합 단백질을 형성하는 단계.
- [0085] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 다중특이적 항원 결합 단백질을 생성하는 방법이 또한 제공되고, 상기 방법은 하기를 포함한다: (a) H1, L1, H2, 및 L2를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 세트를 숙주세포에 도입하는 단계; 및 (b) 상기 숙주세포를 배양하여 상기 다중특이적 항원 결합 단백질을 생성하는 단계. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1, L1, H2, 및 L2를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 세트는 동일한 숙주세포에 도입된다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1, L1, H2, 및 L2를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 세트는 세포주에 도입된다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 세포주는 H1, L1, H2, 및 L2를 안정적으로 공발현시키는 안정적인 세포주이다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 세포주는 다중특이적 항원 결합 단백질을 안정적으로 발현시키는 안정적인 세포주이다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, H1, L1, H2, 및 L2를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 세트는 예정된 비로 상기 숙주세포에 도입된다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 본 방법은 추가로, 숙주세포로의 도입을 위한 폴리뉴클레오타이드의 최적의 비를 결정하는 것을 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 다중특이적 항원 결합 단백질은 60% 이상의 상대 수율로 생성된다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 특정 구현예에서, 다중특이적 항원 결합 단백질은 적어도 약 70%, 적어도 약 71%, 적어도 약 71%, 적어도 약 71%, 적어도 약 72%, 적어도

약 73%, 적어도 약 74%, 적어도 약 75%, 적어도 약 76%, 적어도 약 77%, 적어도 약 78%, 적어도 약 79%, 적어도 약 80%, 적어도 약 81%, 적어도 약 82%, 적어도 약 83%, 적어도 약 84%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 99%, 또는 약 99% 초과와 상대 수율로 생성된다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 특정 구현예에서, 다중특이적 항원 결합 단백질은 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 99%, 또는 약 99% 초과와 상대 수율로 생성된다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 특정 구현예에서, 다중특이적 항원 결합 단백질은 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 99%, 또는 약 99% 초과와 상대 수율로 생성된다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 특정 구현예에서, 다중특이적 항원 결합 단백질은 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 99%, 또는 약 99% 초과와 상대 수율로 생성된다.

[0086] 다중특이적 항원 결합 단백질을 생성하는 방법이 또한 제공되고, 상기 방법은 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 숙주세포를 배양하는 단계, 및 다중특이적 항원 결합 단백질을 생성하는 단계를 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 일부 구현예에서, 본 방법은 추가로, 다중특이적 항원 결합 단백질을 회수하는 단계를 포함한다. 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 방법에 의해 생성된 다중특이적 항원 결합 단백질이 또한 제공된다.

[0087] 복수의 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 다중특이적 항원 결합 단백질을 인코딩하는 복수의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 라이브러리가 본 명세서에서 제공된다. 제1 항원 및 제2 항원에 결합하는 다중특이적 항원 결합 단백질을 선별하는 방법이 또한 제공되고, 상기 방법은 하기를 포함한다: (a) 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 그것에 적용된) 라이브러리로부터 복수의 다중특이적 항원 결합 단백질을 얻는 단계; (b) 상기 복수의 다중특이적 항원 결합 단백질의 상기 제1 및 제2 항원과의 결합을 검정하는 단계; 및 (c) 상기 제1 및 제2 항원에 결합하는 다중특이적 항원 결합 단백질을 확인하는 단계.

[0088] 1) 제1 중쇄 서열 (H1) 및 제1 경쇄 서열 (L1)을 포함하는 제1 항원에 결합하는 제1 중쇄/경쇄 쌍, 및 2) 제2 중쇄 서열 (H2) 및 제2 경쇄 서열 (L2)을 포함하는 제2 항원에 결합하는 제2 중쇄/경쇄 쌍을 포함하는 다중특이적 항원 결합 단백질을 평가하기 위한 컴퓨터 판독가능 매체로서, 각 H1 및 H2는 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 중쇄 불변 도메인 (CH1)를 포함하고, 그리고 각 L1 및 L2는 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 경쇄 불변 도메인 (CL)을 포함하고; 하기를 포함하는 컴퓨터 판독가능 매체가 또한 제공된다: a) H1, L1, H2, 및 L2의 아미노산 치환을 나타내는 데이터를 포함하는 데이터세트로서, 상기 H1의 CH1 도메인 내 아미노산 치환 중 적어도 1개는 EU 위치 F170 또는 L128 및 V185에서의 아미노산을 포함하고, 그리고 상기 CL 도메인은 EU 위치 S176 또는 F118 및 L135에서의 아미노산 치환을 포함하고; 그리고/또는 H1, L1, H2, 및 L2의 아미노산 치환을 나타내는 데이터를 포함하는 데이터세트로서, 상기 H1의 CH1 도메인 내 아미노산 치환 중 적어도 1개는 EU 위치 S183에서의 아미노산을 포함하고, 그리고 상기 C1는 EU 위치 V133에서의 아미노산을 포함하는 데이터세트; 및 (b) H1는 L2와 비교하여 L1과 우선적으로 쌍을 이룰 것이고/거나 H2는 L1과 비교하여 L2와 우선적으로 쌍을 이룰 가능성을 결정하는 컴퓨터 실행가능 코드.

[0089] 1) 제1 중쇄 서열 (H1) 및 제1 경쇄 서열 (L1)을 포함하는 제1 항원에 결합하는 제1 중쇄/경쇄 쌍, 및 2) 제2 중쇄 서열 (H2) 및 제2 경쇄 서열 (L2)을 포함하는 제2 항원에 결합하는 제2 중쇄/경쇄 쌍을 포함하는 다중특이적 항원 결합 단백질을 평가하기 위한 컴퓨터 판독가능 매체로서, 각 H1 및 H2는 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 중쇄 불변 도메인 (CH1)를 포함하고, 그리고 각 L1 및 L2는 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 경쇄 불변 도메인 (CL)을 포함하고; 하기를 포함하는 컴퓨터 판독가능 매체가 또한 제공된다: a) H1, L1, H2, 및 L2의 아미노산 치환을 나타내는 데이터를 포함하는 데이터세트로서, 상기 H1의 CH1 도메인 내 아미노산 치환 중 적어도 1개는 EU 위치 F170 또는 L128에서의 아미노산 치환을 포함하고, 그리고 상기 CL 도메인은 EU 위치 S176 또는 F118 및 L135에서의 아미노산 치환을 포함하고; 그리고/또는 H1, L1, H2, 및 L2의 아미노산 치환을 나타내는 데이터를 포함하는 데이터세트로서, 상기 H1의 CH1 도메인 내 아미노산 치환 중 적어도 1개는 EU 위치 S183에서의 아미노산을 포함하고, 그리고 상기 C1는 EU 위치 V133에서의 아미노산을 포함하는 데이터세트; 및 (b) H1는 L2와 비교하여 L1과 우선적으로 쌍을 이룰 것이고/거나 H2는 L1과 비교하여 L2와 우선적으로 쌍을 이룰 가능성을 결정하는 컴퓨터 실행가능 코드. 특정 구현예에서, H1, L1, H2, 및 L2의 아미노산 치환을 나타내는 데이터를 포함하는 데이터세트, 상기 H1의 CH1 도메인 내 아미노산 치환 중 적어도 1개는 EU 위치 F170 또는 L128 및 V185에서의 아미노산 치환을 포함하고, 그리고 상기 CL 도메인은 EU 위치 S176 또는 F118 및 L135에서의 아미노산 치환을 포함하고; 그리고/또는 H1, L1, H2, 및 L2의 아미노산 치환을 나타내는 데이터를 포함하는 데이터세트, 상기 H1의 CH1 도메인 내 아미노산 치환 중 적어도 1개는 EU 위치 S183에서의 아미노산 치환을 포함하고, 그리고 상기 C1는 EU 위치 V133에서의 아미노산을 포함하는 데이터세트; 및 (b) H1는 L2와 비교하여 L1과 우선적으로 쌍을 이룰 것이고/거나 H2는 L1과 비교하여 L2와 우선적으로 쌍을 이룰 가능성을 결정하는 컴퓨터 실행가능 코드.

노산을 포함한다.

- [0090] 도면의 간단한 설명
- [0091] **도1 (도A 및 도1B)**는 위치 L128, G143, L145, S183, 또는 V185에서 치환 돌연변이를 보유한 중쇄 및 F118, V133, 또는 L135에서 치환을 보유한 경쇄를 함유한 항체의 1 ml 293T 배양액으로부터 단백질을 회수하여 보여준다.
- [0092] **도2**는 F118, V133, 또는 L135 치환 돌연변이를 갖는 CL로 공-발현된 경우 항체 발현을 회복하는 CH1에서 아미노산 돌연변이를 확인하기 위해 수행된 포유동물 배양 발현 검정의 결과를 제공한다.
- [0093] **도3**은 경쇄 불변 영역 (CL) 및 중쇄 CH1 도메인의 계면의 내부의 도식을 제공한다.
- [0094] **도4**는 V133X/S183X 치환 돌연변이를 갖는 경쇄/중쇄 쌍을 발현한 배양액내 항체 발현을 분석하기 위해 수행되었던 포유동물 배양 발현 검정의 결과를 제공한다.
- [0095] **도5**는 VH Q39 또는 VL Q38 또는 둘 모두에서 항원 IL-13에 아미노산 치환을 가진 다양한 돌연변이체 항체의 결합의 FACS 분석의 결과를 보여준다.
- [0096] **도6** VH/VL 짝짓기를 선호하는 Q39X-VH/Q38X-VL 돌연변이체 쌍을 확인하기 위해 수행된 추가의 FACS 분석의 결과.
- [0097] **도7**은 VH/VL 짝짓기를 선호하는 Q39X-VH/Q38X-VL 돌연변이체 쌍을 확인하기 위해 수행된 포유동물 배양 발현 검정의 결과를 보여준다.
- [0098] **도8**은, 포유동물 공-발현된 항체로부터 오비트랩(Orbitrap) 질량 분광분석법으로 측정된, 정확한 중쇄-경쇄 짝짓기를 가진 이중특이적 항체 변이체의 % 존재에 대하여 예시적인 결과를 보여준다. 시험된 돌연변이체는 X-축 상에 보여진다. 돌연변이의 각 세트에서 4개의 문자는 Q39X_{HC1}/Q38X_{LC1} 홑/Q39X_{HC2}/Q38X_{LC2} 홑, 각각에서 아미노산 치환을 지칭한다.
- [0099] **도9A**는 4D5/UCHT1 이중특이적 항체에서 중쇄/경쇄 짝짓기를 평가하기 위해 수행된 QTOF 검정의 결과를 보여준다. **도9B**는 4D5 아암(arm)이 Q38K 돌연변이를 갖는 VL 및 Q39E 돌연변이를 갖는 VH를 함유하도록 및 UCHT1 아암이 Q38E 돌연변이를 갖는 VL 및 Q39K 돌연변이 ("EKKE")를 갖는 VH를 함유하도록 변형된 4D5/UCHT1 이중특이적 항체에서 중쇄/경쇄 짝짓기를 평가하기 위해 수행된 QTOF 검정의 결과를 보여준다.
- [0100] **도10A**는 **도10B**의 확장을 보여준다. **도10B**는 UCHT1 아암이 VL-Q38E, CL-V133K, VH-Q39K, 및 CH1-S183E 돌연변이를 함유하도록 변형된, 및 4D5/UCHT1 항체의 4D5 아암이 VL-Q38K 및 VH-Q39E 돌연변이를 함유하도록 변형된 이중특이적 4D5/UCHT1 항체에서 중쇄/경쇄 짝짓기를 평가하기 위해 수행된 고해상도 질량 분광분석법의 결과를 보여준다. **도10C**는 **도10D**의 확장을 보여준다. **도10D**는 UCHT1 아암이 CL-V133K 및 CH1-S183E 돌연변이를 함유하도록 변형된 이중특이적 4D5/UCHT1 항체에서 중쇄/경쇄 짝짓기를 평가하기 위해 수행된 고해상도 질량 분광분석법의 결과를 보여준다. **도10E**는 WT 이중특이적 4D5/UCHT1 항체에서 중쇄/경쇄 짝짓기를 평가하기 위해 수행된 고해상도 질량 분광분석법의 결과를 보여준다.
- [0101] **도 11A**는 야생형 4D5 Fab 그리고 VL-Q38K, CL-V133E, VH-Q39E, 및 CH1-S183K 돌연변이를 갖도록 변형된 4D5 Fab의 중첩 결정 구조를 보여준다. **도11B**는 변형된 4D5 Fab에서 VL-Q38K 및 VH-Q39E에 의해 형성된 결합 (예를 들면, 염 다리 및 수소 결합)을 보여준다. **도11C**는 변형된 4D5 Fab에서 CL-V133E 및 CH1-S183K에 의해 형성된 결합 (예를 들면, 염 다리 및 수소 결합)을 보여준다.
- [0102] **도 12A**는 야생형 4D5 Fab 그리고 VL-Q38E, CL-V133K, VH-Q39K, 및 CH1-S183E 돌연변이를 갖도록 변형된 4D5 Fab의 중첩 결정 구조를 보여준다. **도12B**는 변형된 4D5 Fab에서 VL-Q38E 및 VH-Q39K에 의해 형성된 결합을 보여준다. **도12C**는 변형된 4D5 Fab에서 CL-V133K 및 CH1-S183E에 의해 형성된 결합을 보여준다.
- [0103] **도13A**는 하기를 도시한다: 하나의 설계 접근법 (즉, "접근법 A") 돌연변이체 CH1/CL 쌍 생성을 위한. **도13B**는 하기를 도시한다: 제2 설계 접근법 (즉, "접근법 B") (4D5/UCHT1 이중특이적 항체 (항-HER2/항-CD3)용 돌연변이체 CH1/CL 쌍 생성을 위한).
- [0104] **도14**는 단일 세포 공-발현으로부터 이중특이적 IgG 함량을 결정하기 위해 사용된 샌드위치 ELISA 실험의 개략도를 보여준다.
- [0105] **도15**는 JS20, JS78, YS18, 및 YT65 변이체에서 수행된 샌드위치 ELISAs의 결과를 보여준다.

- [0106] **도16A**는 하기의 중쇄 부분의 아미노산 서열을 제공한다: JS20 (서열식별번호:49), JS78 (서열식별번호:50), JT20 (서열식별번호:51), JT25 (서열식별번호:52), YS08 (서열식별번호:28), YS18 (서열식별번호:29), YT65 (서열식별번호:29), 및 YT34 변이체 (서열식별번호:44). **도 16A**는 또한 하기 부분의 아미노산 서열을 제공한다: 4D5 야생형 중쇄 "4D5wt-Hc" (서열식별번호:67). **도16B**는 하기의 경쇄 부분의 아미노산 서열을 제공한다: JS20 (서열식별번호:69), JS78 (서열식별번호:70), JT20 (서열식별번호:71), JT25 (서열식별번호:72), YS08 (서열식별번호:73), YS18 (서열식별번호:74), YT65 (서열식별번호:75), 및 YT34 변이체 (서열식별번호:76). **도 16B**는 또한 하기 부분의 아미노산 서열을 제공한다: 4D5 WT 경쇄 "4D5wt-Lc" (서열식별번호:68).
- [0107] **도17A**는 야생형 4D5/UCHT1 공발현된 이중특이적 항체에서 수행된 질량 분광분석법의 결과를 보여준다. **도17B**는 4D5 아암에서 YT65 CH1/CL 돌연변이 및 VH-Q39E 및 VL-Q38K 돌연변이, 그리고 UCHT1 아암에서 VL-Q38E 및 VH-Q39K 돌연변이를 포함한 4D5/UCHT1 공발현된 항체에서 수행된 질량 분광분석법의 결과를 보여준다.
- [0108] **도18A**는 야생형 4D5/UCHT1 이중특이적 항체에서 수행된 질량 분광분석법의 결과를 보여준다. **도18B**는 4D5 아암에서 YT65 CH1/CL 돌연변이 및 VH-Q39E 및 VL-Q38K 돌연변이, 그리고 UCHT1 아암에서 VL-Q38E 및 VH-Q39K 돌연변이를 포함한 4D5/UCHT1 항체에서 수행된 질량 분광분석법의 결과를 보여준다.
- [0109] **도19A**는 하기의 중쇄 부분의 아미노산 서열을 제공한다: YT65 (서열식별번호:78), YT65.1 (서열식별번호:79), YT65.2 (서열식별번호:80), YT65.3 (서열식별번호:81), YT65.4 (서열식별번호:82), YT65.5 (서열식별번호:83), YT65.6 (서열식별번호:84), YT65.7 (서열식별번호:85), YT65.8 (서열식별번호:86), YT65.9 (서열식별번호:87), YT65.10 (서열식별번호:88), YT65.11 (서열식별번호:89), YT65.12 (서열식별번호:90), 및 YT65.13 변이체 (서열식별번호:91). **도 19B**는 하기로써 4D5 wt 중쇄 서열 "4D5wt-Hc"의 부분을 개시한다: 서열식별번호:77. **도19B**는 하기의 경쇄 부분의 아미노산 서열을 제공한다: YT65 (서열식별번호:93), YT65.1 (서열식별번호:94), YT65.2 (서열식별번호:95), YT65.3 (서열식별번호:96), YT65.4 (서열식별번호:97), YT65.5 (서열식별번호:98), YT65.6 (서열식별번호:99), 및 YT65.7 변이체 (서열식별번호:100). **도 19B**는 하기로써 4D5 wt 경쇄 서열 "4D5wt-Lc"의 부분을 개시한다: 서열식별번호:92.
- [0110] **도20A**는 4D5 아암에서 YT65 CH1/CL 돌연변이 및 VH-Q39E 및 VL-Q38K 돌연변이, 및 UCHT1 아암에서 VH-Q39K 및 VL-Q38E 돌연변이를 포함한 4D5/UCHT1 항체에서 수행된 pH 중성 원상태 질량 분광분석법의 결과를 보여준다. **도 20B**는 **도 20A**에서 데이터를 획득하는데 사용된 분석의 검출 감수성을 확인하기 위해 수행된 실험의 결과를 보여준다.
- [0111] **도21**은 하기내 중쇄/경쇄 짝짓기에서 YT65, EKKE, 및 양쪽 YT65 및 EKKE의 효과를 평가하기 위해 수행된 고해상도 질량 분광분석법 실험의 정량적 결과를 보여준다: 항-IL4/IL13, 항-EGFR/MET, 항-VEGFA/ANG2 항-VEGFA/VEGFC, 및 항-HER2/CD3 (즉, 4D5/UCHT1) 이중특이적 항체.
- [0112] **도22A**는 VL-Q38K, VH-Q39E, 및 YT65 돌연변이를 갖도록 변형된 4D5 Fab의 결정 구조를 보여준다. **도22B**는 야생형 4D5 Fab의 CH1 도메인 및 YT65 돌연변이를 갖도록 변형된 4D5 Fab의 CH1 도메인의 중첩 결정 구조를 보여준다.
- [0113] **FIG 23**은 항-HER2/CD3 + EKKE + V133K/S183E_{HL}, 항-HER2/CD3 + EKKE + YT65_{HL}, 및 시험관내 T-세포 매개된 B-세포 세포독성 검정에서 비변형된 항-HER2/CD3의 생물학적 활성을 보여준다.
- [0114] **FIG 24**는 C.B-17 SCID 마우스내 항체의 5 mg/kg 정맥내 투여 이후 다양한 시점에서 (i) 항-HER2, (ii) 항-gD/CD3, (iii) 항-HER2/CD3, (iv) 항-HER2/CD3 + EKKE + YT65_{HL}, 및 (iv) 항-HER2/CD3 + EKKE + V133E/S183K_{HL} + V133K/S183E_{HL}의 평균 혈청 수준을 보여준다.
- [0115] 상세한 발명의 설명
- [0116] 본 명세서에서 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어들은 본 발명이 속하는 당해 분야의 숙련가에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. Singleton, 등, DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 2D Ed., John Wiley and Sons, New York (1994), 및 Hale & Margham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991)은 본 발명에서 사용된 많은 용어들의 일반 사전을 기술 중 하나에 제공한다. 본 명세서에서 기재된 것에 유사한 또는 동등한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에서 사용될 수 있어도, 바람직한 방법 및 물질은 기재된다. 수치 범위는 그 범위를 정의한 수를 포괄한다. 달리 나타내지 않는 한, 핵산은 좌측부터 우측까지 5'에서 3' 방향으로 기록되고; 아미노산 서열은 좌측부터 우측까지 아미노에서 카복시 배향으로, 각각 기록된다. 종사자는 특히 하기에

지향된다: Sambrook 등, 1989, 및 Ausubel FM 등, 1993 (기술의 정의 및 용어에 대한). 본 발명이, 다양할 수 있는 바와 같이, 특정한 방법론, 프로토콜, 및 기재된 시약에 제한되지 않는 것이 이해된다.

[0117] 수치 범위는 그 범위를 정의한 수를 포괄한다.

[0118] 달리 나타내지 않는 한, 핵산은 좌측부터 우측까지 5'에서 3' 방향으로 기록되고; 아미노산 서열은 좌측부터 우측까지 아미노에서 카복시 배향으로, 각각 기록된다.

[0119] 본 명세서에서 제공된 제목은 전체적으로 명세서에 참조로 갖게 될 수 있는 다양한 측면 또는 구현예의 제한은 아니다. 따라서, 바로 아래 정의된 용어들은 전체적으로 명세서에 참고로 더욱 완전히 정의된다.

[0120] **정의**

[0121] 용어 "다중특이적 항원-결합 단백질"은 본 명세서에서 2종 이상의 항원을 결합할 수 있는 결합 단백질을 가장 넓은 의미에서 지칭하는데 사용된다. 특정 측면에서 다중특이적 결합 단백질은 이중특이적 항체, 예를 들면, 인간 이중특이적 항체, 인간화된 이중특이적 항체, 키메라성 이중특이적 항체, 또는 마우스 이중특이적 항체를 지칭한다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질, 예컨대 이중특이적 항체는 2개의 상이한 항원에 결합한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질, 예컨대 이중특이적 항체는 하나의 항원상의 상이한 에피토프에 결합한다.

[0122] 용어 "항체"는 본 명세서에서 가장 넓은 의미에서 사용되고 이들이 요망된 생물학적 활성 (예를 들면, 에피토프 결합 활성)을 나타내는 한 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄, 및 이들의 임의의 단편, 돌연변이체, 변이체 또는 유도를 포함한 임의의 면역글로불린 (Ig) 분자를 지칭한다. 항체의 예는 본 명세서에서 기재된 바와 같이 단클론성 항체, 다클론성 항체, 다중특이적 항체 (예를 들면, 이중특이적 항체) 및 항체 단편을 포함한다. 항체는 마우스, 키메라성, 인간, 인간화 및/또는 친화도 성숙될 수 있다.

[0123] 참조의 프레임으로서, 본 명세서에서 사용된 바와 같이 항체는 면역글로불린 G (IgG)의 구조를 지칭할 것이다. 그러나, 당해 분야의 숙련가는 임의의 면역글로불린 부류의 항체가 본 명세서에서 기재된 본 발명 방법에서 이용될 수 있다는 것을 이해/인식할 것이다. 명백하게 하기 위해, IgG 분자는 한 쌍의 중쇄 (HCs) 및 한 쌍의 경쇄 (LCs)를 함유한다. 각 LC는 1개의 가변 도메인 (VL) 및 1개의 불변 도메인 (CL)을 갖는 반면, 각 HC는 1개의 가변 (VH) 및 3개의 불변 도메인 (CH1, CH2, 및 CH3)을 갖는다. CH1 및 CH2 도메인은 힌지 영역에 의해 연결된다. 상기 구조는 당해 분야에 공지되어 있다.

[0124] 간단히, 염기성 4-쇄 항체 단위는 2개의 경(L)쇄 및 2개의 중(H)쇄로 구성된 헤테로사량체 당단백질이다 (IgM 항체는 J쇄로 불리는 추가의 폴리펩타이드와 함께 5개의 염기성 헤테로사량체 단위로 구성되고, 따라서 10 항원 결합 부위를 함유하고, 반면에 분비된 IgA 항체는 J쇄와 함께 염기성 4-쇄 단위의 2-5를 포함한 다가 조립체를 형성하기 위해 중합할 수 있다). IgGs의 경우에서, 4-쇄 단위는 일반적으로 약 150,000 달톤이다. 각 L쇄는 H쇄에 1종의 공유 디설파이드 결합에 의해 연결되고, 반면에 2개의 H쇄는 H쇄 아이소타입에 의존하는 1종 이상의 디설파이드 결합에 의해 서로에 연결된다. 각 H쇄 및 L쇄는 또한 규칙적으로 이격된 쇠내 디설파이드 브릿지를 갖는다. 각 H쇄는 N-말단에서 가변 도메인 (V_H) 그 다음 각각의 α 및 γ 쇠에 대하여 3개의 불변 도메인 (C_H) 및 μ 및 ε 아이소타입에 대하여 4개의 C_H 도메인을 갖는다. 각 L쇄는 N-말단에서 가변 도메인 (V_L) 그 다음 그것의 다른 말단에서 불변 도메인 (C_L)을 갖는다. V_L은 V_H와 정렬되고 C_L은 중쇄 (C_{H1})의 제1 불변 도메인과 정렬된다. 특정한 아미노산 잔기는 경쇄와 중쇄 가변 도메인 사이 계면을 형성한다고 여겨진다. V_H 및 V_L의 짝짓기는 함께 단일 항원-결합 부위를 형성한다. 항체의 상이한 클래스의 구조 및 특성에 대하여, 참조, 예를 들면, Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P.Stites, Abba I.Terr and Tristram G.Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, 페이지 71 및 챕터 6.

[0125] 임의의 척추동물 종으로부터 L쇄는, 그의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기반된, 카파 및 람다로 불리는, 2개의 명확히 상이한 유형 중 하나로 배정될 수 있다. 그의 중쇄 (C_H)의 불변 도메인의 아미노산 서열에 의존하여, 면역글로불린은 상이한 클래스 또는 아이소타입으로 배정될 수 있다. 면역글로불린의 5개 클래스가 있다: α, δ, γ, ε, 및 μ, 각각으로 지정된 중쇄를 갖는, IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM. γ 및 α 클래스는 C_H 서열 및 기능에서 상대적으로 소수의 차이를 기준으로 서브클래스로 추가로 분할되고, 예를 들면, 인간은 하기 서브클래스를 발현한다: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 및 IgA2.

[0126] 용어 "VL" 도메인은 면역글로불린 경쇄의 아미노 말단 가변 도메인을 포함한다.

[0127] 용어 "VH 도메인"는 면역글로불린 중쇄의 아미노 말단 가변 도메인을 포함한다.

[0128] 용어 "CL 도메인"은, 예를 들면 약 카뱃 위치 107A-216 (EU 위치 108-214 (카파))로부터, 면역글로불린 경쇄의 불변 영역 도메인을 포함한다. 카파 C 도메인에 대한 Eu/카뱃 환산표는 아래 제공된다. CL 도메인은 VL 도메인에 인접하고 면역글로불린 경쇄의 카복시 말단을 포함한다. 인간 카파 경쇄의 CL 도메인용 예시적인 아미노산 서열은 서열식별번호:30에서 아래 보여지고, 유전자 스플라이싱의 결과로서 성숙한 CL 도메인에 존재하는 N-말단에서 R 잔기를 포함한다.

표 A

인간 IG 카파 쇠 아미노산 번역 (서열식별번호:30)	EU 넘버링	카뱃 넘버링
(R)	108	108
T	109	109
V	110	110
A	111	111
A	112	112
P	113	113
S	114	114
V	115	115
F	116	116
I	117	117
F	118	118
P	119	119
P	120	120
S	121	121
D	122	122
E	123	123
Q	124	124
L	125	125
K	126	126
-	-	-
-	-	-
-	-	-
S	127	127
G	128	128
T	129	129
A	130	130
S	131	131
V	132	132
V	133	133

[0129]

인간 IG 카파 쇠 아미노산 번역 (서열식별번호:30)	EU 넘버링	카밧 넘버링
C	134	134
L	135	135
L	136	136
N	137	137
N	138	138
F	139	139
Y	140	140
P	141	141
-	-	-
-	-	-
R	142	142
E	143	143
A	144	144
K	145	145
V	146	146
Q	147	147
W	148	148
K	149	149
V	150	150
D	151	151
N	152	152
A	153	153
L	154	154
Q	155	155
S	156	156
G	157	157
-	-	-
-	-	-
N	158	158
S	159	159

[0130]

인간 IG 카파 쇠 아미노산 번역 (서열식별번호:30)	EU 넘버링	카밧 넘버링
Q	160	160
E	161	161
S	162	162
V	163	163
T	164	164
E	165	165
Q	166	166
D	167	167
S	168	168
K	169	169
D	170	170
-	-	-
-	-	-
-	-	-
-	-	-
-	-	-
S	171	171
T	172	172
Y	173	173
S	174	174
L	175	175
S	176	176
S	177	177
T	178	178
L	179	179
T	180	180
L	181	181
S	182	182
K	183	183
A	184	184

[0131]

인간 IG 카파 쇠 아미노산 번역 (서열식별번호:30)	EU 넘버링	카밧 넘버링
D	185	185
Y	186	186
-	-	-
-	-	-
E	187	187
K	188	188
H	189	189
K	190	190
V	191	191
Y	192	192
A	193	193
C	194	194
E	195	195
V	196	196
T	197	197
H	198	198
Q	199	199
G	200	200
-	-	-
-	-	-
L	201	201
S	202	202
S	203	203
P	204	204
V	205	205
T	206	206
K	207	207
S	208	208
F	209	209
N	210	210

[0132]

인간 IG 카파 쇠 아미노산 번역 (서열식별번호:30)	EU 넘버링	카밧 넘버링
R	211	211
G	212	212
E	213	213
C	214	214
-	-	215
-	-	216

[0133]

[0134]

본 명세서에서 사용된 바와 같이, 인간 IgG의 용어 "CH1 도메인"은, 예를 들면, 카밧 넘버링 시스템에서 약 위치 114-223 (EU 위치 118-215) 확장하는 면역글로불린 중쇄의 제1 (최고 아미노 말단) 불변 영역 도메인을 포함

한다. CH1 도메인은 VH 도메인에 인접하고 면역글로불린 중쇄 분자의 힌지 영역에 대한 아미노 말단은 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역의 일부를 형성하지 않고, 하기로 이량체화할 수 있다: 면역글로불린 경쇄 불변 도메인 (즉, "CL").

[0135]

하기에 대한 EU/카밧 환산표: IgG1 중쇄 (서열식별번호:65)는 아래 제공된다. 예시적인 CH1 서열은 서열식별번호:53에서 보여지고, 힌지 서열은 서열식별번호:129에서 보여지고, CH2 서열은 서열식별번호:130에서 보여지고, 및 CH3 서열은 서열식별번호:131에서 보여진다.

표 B

CH1 (서열식별번호:53)		
	EU 넘버링	카밧 넘버링
(A)	118	114
S	119	115
T	120	116
K	121	117
G	122	118
P	123	119
S	124	120
V	125	121
F	126	122
P	127	123
L	128	124
A	129	125
P	130	126
S	131	127
S	132	128
K	133	129
S	134	130
T	135	133
S	136	134
G	137	135
G	138	136
T	139	137
A	140	138
A	141	139
L	142	140
G	143	141
C	144	142
L	145	143
V	146	144

[0136]

표 C

힌지 (서열식별번호:129)		
	EU 넘버링	카밧 넘버링
(E)	216	226
P	217	227
K	218	228
S	219	232
C	220	233
D	221	234
K	222	235
T	223	236
H	224	237
T	225	238
C	226	239
P	227	240
P	228	241
C	229	242
P	230	243

K	147	145
D	148	146
Y	149	147
F	150	148
P	151	149
E	152	150
P	153	151
V	154	152
T	155	153
V	156	154
S	157	156
W	158	157
N	159	162
S	160	163
G	161	164
A	162	165
L	163	166
T	164	167
S	165	168
G	166	169
V	167	171
H	168	172
T	169	173
F	170	174
P	171	175
A	172	176
V	173	177
L	174	178
Q	175	179
S	176	180
S	177	182
G	178	183

[0137]

L	179	184
Y	180	185
S	181	186
L	182	187
S	183	188
S	184	189
V	185	190
V	186	191
T	187	192
V	188	193
P	189	194
S	190	195
S	191	196
S	192	197
L	193	198
G	194	199
T	195	200
Q	196	203
T	197	205
Y	198	206
I	199	207
C	200	208
N	201	209
V	202	210
N	203	211
H	204	212
K	205	213
P	206	214
S	207	215
N	208	216
T	209	217
K	210	218

[0138]

V	211	219
D	212	220
K	213	221
K	214	222
V	215	223
-	-	-

표 D

CH2 (서열식별번호:130)		
	EU 넘버링	카밧 넘버링
(A)	231	244
P	232	245
E	233	246
L	234	247
L	235	248
G	236	249
G	237	250
P	238	251
S	239	252
V	240	253
F	241	254
L	242	255
F	243	256
P	244	257
P	245	258
K	246	259
P	247	260
K	248	261
D	249	262
T	250	263
L	251	264
M	252	265
I	253	266

표 E

CH3 (서열식별번호:131)		
	EU 넘버링	카밧 넘버링
(G)	341	361
Q	342	363
P	343	364
R	344	365
E	345	366
P	346	367
Q	347	368
V	348	369
Y	349	370
T	350	371
L	351	372
P	352	373
P	353	374
S	354	375
R	355	376
D	356	377
E	357	378
L	358	381
T	359	382
K	360	383
N	361	384
Q	362	385
V	363	386

[0139]

CH2 (서열식별번호:130)		
	EU 넘버링	카뱃 넘버링
S	254	267
R	255	268
T	256	269
P	257	270
E	258	271
V	259	272
T	260	273
C	261	274
V	262	275
V	263	276
V	264	277
D	265	278
V	266	279
S	267	280
H	268	281
E	269	282
D	270	283
P	271	284
E	272	285
V	273	286
K	274	287
F	275	288
N	276	289
W	277	290
Y	278	291
V	279	292
D	280	295
G	281	296
V	282	299
E	283	300

CH3 (서열식별번호:131)		
	EU 넘버링	카뱃 넘버링
S	364	387
L	365	388
T	366	389
C	367	390
L	368	391
V	369	392
K	370	393
G	371	394
F	372	395
Y	373	396
P	374	397
S	375	398
D	376	399
I	377	400
A	378	401
V	379	402
E	380	405
W	381	406
E	382	407
S	383	408
N	384	410
G	385	411
Q	386	414
P	387	415
E	388	416
N	389	417
N	390	418
Y	391	419
K	392	420
T	393	421

[0140]

CH2 (서열식별번호:130)		
	EU 넘버링	카밧 넘버링
V	284	301
H	285	302
N	286	303
A	287	304
K	288	305
T	289	306
K	290	307
P	291	308
R	292	309
E	293	310
E	294	311
Q	295	312
Y	296	313
N	297	314
S	298	317
T	299	318
Y	300	319
R	301	320
V	302	321
V	303	322
S	304	323
V	305	324
L	306	325
T	307	326
V	308	327
L	309	328
H	310	329
Q	311	330
D	312	331
W	313	332

CH3 (서열식별번호:131)		
	EU 넘버링	카밧 넘버링
T	394	422
P	395	423
P	396	424
V	397	425
L	398	426
D	399	427
S	400	428
D	401	430
G	402	433
S	403	434
F	404	435
F	405	436
L	406	437
Y	407	438
S	408	439
K	409	440
L	410	441
T	411	442
V	412	443
D	413	444
K	414	445
S	415	446
R	416	447
W	417	448
Q	418	449
Q	419	450
G	420	451
N	421	452
V	422	453
F	423	454

[0141]

CH2 (서열식별번호:130)		
	EU 넘버링	카밧 넘버링
L	314	333
N	315	334
G	316	335
K	317	336
E	318	337
Y	319	338
K	320	339
C	321	340
K	322	341
V	323	342
S	324	343
N	325	344
K	326	345
A	327	346
L	328	347
P	329	348
A	330	349
P	331	350
I	332	351
E	333	352
K	334	353
T	335	354
I	336	355
S	337	357
K	338	358
A	339	359
K	340	360
-	-	-
-	-	-

CH3 (서열식별번호:131)		
	EU 넘버링	카밧 넘버링
S	424	455
C	425	456
S	426	457
V	427	458
M	428	459
H	429	460
E	430	461
A	431	462
L	432	463
H	433	464
N	434	465
H	435	466
Y	436	467
T	437	468
Q	438	469
K	439	470
S	440	471
L	441	472
S	442	473
L	443	474
S	444	475
P	445	476
G	446	477
K	447	478

[0142]

[0143]

본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "상보성"은, 예를 들면, 중쇄/경쇄 짝짓기에 영향을 주는, 본 명세서에서 기재된 다중특이적 항원-결합 단백질의 중쇄의 CH1 및 경쇄의 CL의 계면에서 상호작용의 조합을 지칭한다"입체 상보성" 또는 "형태적 상보성"은, 예를 들면, 중쇄의 CH1 도메인 및 경쇄의 CL 도메인의 상호작용 표면에서 3차원 구조의 혼용성을 지칭한다. "정전기 상보성"은, 예를 들면, 중쇄의 CH1 도메인 및 경쇄의 CL 도메인 및/또는 중쇄의 VH 도메인 및 경쇄의 VL 도메인의 상호작용 표면에서 음으로- 및/또는 양성으로-하전된 원자의 배치의 혼용성을 지칭한다.

[0144]

인간 IgG Fc 영역의 용어 "CH2 도메인"은 보통 EU 넘버링 시스템에 따라 IgG의 약잔기 231 내지 약 340을 포함한다. CH2 도메인은 또 다른 도메인과 밀접하게 짝짓기되지 않는다는 점에서 독특하다. 오히려, 2개의 N-연결된 분지형 탄수화물 쉼은 온전한 원상태 IgG 분자의 2개의 CH2 도메인 사이에서 개재된다. 탄수화물이 도메인-도메인 짝짓기용 치환체를 제공할 수 있고 CH2 도메인 안정화를 도울 수 있다는 것이 추측되었다. Burton, Mol. Immunol. 22: 161-206 (1985).

[0145]

용어 "CH3 도메인"은 Fc 영역에서 CH2 도메인에 대한 잔기 C-말단 (즉, EU 넘버링 시스템에 따라 IgG의 약 아미노산 잔기 341 내지 약 아미노산 잔기 447)을 포함한다

- [0146] 용어 "Fc 영역"은, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 일반적으로 면역글로불린 중쇄의 C-말단 폴리펩타이드 서열을 포함한 이량체 복합체를 지칭하고, 여기서 C-말단 폴리펩타이드 서열은 온전한 항체의 파파인 소화에 의해 수득가능한 것이다. Fc 영역은 원상태 또는 변이체 Fc 서열을 포함할 수 있다. 면역글로불린 중쇄의 Fc 서열의 경계가 다양할 수 있어도, 인간 IgG 중쇄 Fc 서열은 Fc 서열의 카복실 말단에 대해 대략 위치 Cys226, 또는 대략 위치 Pro230을 포함한다. 달리 구체화되지 않는 한 본 명세서에서, Fc 영역 또는 불변 영역에서 아미노산 잔기의 넘버링은, 하기에 기재된 바와 같이, 또한 EU 지수로 불리는, EU 넘버링 시스템에 따른다: 카밧 등, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. 면역글로불린의 Fc 서열은 일반적으로는 2개의 불변 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하고, 선택적으로는 CH4 도메인을 포함한다. "Fc 폴리펩타이드"는 본 명세서에서 Fc 영역, 예를 들면, 모노머성 Fc를 구성하는 폴리펩타이드 중 하나를 의미한다. Fc 폴리펩타이드는 임의의 적합한 면역글로불린, 예컨대 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 하위유형, IgA, IgE, IgD 또는 IgM으로부터 수득될 수 있다. Fc 폴리펩타이드는 마우스, 예를 들면, 마우스 IgG2a로부터 수득될 수 있다. Fc 영역은 디설파이드에 의해 함께 유지된 양쪽 H쇄의 카복시-말단부를 포함한다. 항체의 효과기 기능은 Fc 영역에서 서열에 의해 결정되고; 상기 영역은 또한 특정 유형의 세포상에서 발견된 Fc 수용체 (FcR)에 의해 기술적으로 인식된 일부이다. 일부 구현예에서, Fc 폴리펩타이드는 (일반적으로 그의 N 말단에서) 야생형 힌지 서열의 일부 또는 모두를 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 폴리펩타이드는 작용성 또는 야생형 힌지 서열을 포함하지 않는다.
- [0147] "작용성 Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역의 "효과기 기능"을 소유한다. 예시적인 "효과기 기능"은 하기를 포함한다: C1q 결합; CDC; Fc 수용체 결합; ADCC; 식균작용; 하기의 하향 조절: 세포 표면 수용체 (예를 들면, B 세포 수용체; BCR), 등. 상기 효과기 기능은 일반적으로 결합 도메인 (예를 들면, 항체 가변 도메인)과 조합되도록 Fc 영역을 필요로 하고, 예를 들면, 본 명세서에서 정의에 개시된 바와 같이 다양한 검정을 이용하여 평가될 수 있다.
- [0148] "천연 서열 Fc 영역"은 자연에서 발견된 Fc 영역의 아미노산 서열에 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 천연 서열 인간 Fc 영역은 천연 서열 인간IgG1 Fc 영역 (비-A 및 동종이인자형); 천연 서열 인간 IgG2 Fc 영역; 천연 서열 인간 IgG3 Fc 영역; 및 천연 서열 인간 IgG4 Fc 영역 뿐만 아니라 이들의 천연 발생 변이체를 포함한다. 천연 서열 Fc 영역은 또한 천연 서열 마우스 IgG2a를 포함한다.
- [0149] "변이체 Fc 영역"은 적어도 1종의 아미노산 변형, 바람직하게는 1개 이상의 아미노산 치환(들) 덕분에 천연 서열 Fc 영역의 것과 상이한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 변이체 Fc 영역은 모 폴리펩타이드의 Fc 영역 또는 천연 서열 Fc 영역에 비교된 적어도 1종의 아미노산 치환, 예를 들면, 모 폴리펩타이드의 Fc 영역에서 또는 천연 서열 Fc 영역에서 약 1 내지 약 10 아미노산 치환, 및 바람직하게는 약 1 내지 약 5 아미노산 치환을 갖는다. 본 명세서에서 변이체 Fc 영역은 바람직하게는 천연 서열 Fc 영역과 및/또는 모 폴리펩타이드의 Fc 영역과 적어도 약 80% 상동성, 및 가장 바람직하게는 이와 적어도 약 90% 상동성, 더욱 바람직하게는 이와 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98% 또는 적어도 약 99% 상동성을 소유할 것이다.
- [0150] "Fc 구성요소"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 힌지 영역, Fc 영역의 CH2 도메인 또는 CH3 도메인을 지칭한다.
- [0151] 특정 구현예에서, Fc 영역은, 바람직하게는 야생형 인간 IgG Fc 영역으로부터 유도된, IgG Fc 영역을 포함한다. 특정 구현예에서, Fc 영역은 "야생형" 마우스 IgG, 예컨대 마우스 IgG2a로부터 유도된다. "야생형" 인간 IgG Fc 또는 "야생형" 마우스 IgG Fc는 인간 집단 또는 마우스 집단, 각각 내에서 자연적으로 발생하는 아미노산의 서열을 의미한다. 물론, Fc 서열이 개체 사이에서 약간 다양할 수 있듯이, 1종 이상의 변경이 야생형 서열에 실시될 수 있고 여전히 본 발명의 범위 내에 있다. 예를 들면, Fc 영역은 비천연 아미노산의 당화 부위 또는 봉입체에서 변경 예컨대 돌연변이를 함유할 수 있다.
- [0152] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항원에 항체의 결합에 관여되는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 원상태 항체의 중쇄 및 경쇄 (VH 및 VL, 각각)의 가변 도메인은 일반적으로 유사한 구조를 갖고, 각 도메인은 4개의 보존 프레임워크 영역 (FRs) 및 3개의 초가변성 영역 (HVRs)을 포함한다. (참고, 예를 들면, Kindt 등 *Kuby Immunology*, 61st ed., W. H. Freeman and Co., page 91 (2007).) 단일 VH 또는 VL 도메인은 항원-결합 특이성을 부여하는데 충분할 수 있다. 더욱이, 특정한 항원을 결합하는 항체는 상보적 VL 또는 VH 도메인, 각각의 라이브러리를 스크리닝하기 위해 항원을 결합하는 항체로부터 VH 또는 VL 도메인을 이용하여 단리될 수 있다. 참고, 예를 들면, Portolano 등, *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson 등, *Nature* 352:624-628 (1991).

- [0153] 어구 "항원 결합 아암", "표적 분자 결합 아암", "표적 결합 아암" 및 이들의 변동은, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 관심 표적을 구체적으로 결합하는 능력을 갖는 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 성분 부분을 지칭한다. 일반적으로 및 바람직하게는, 항원 결합 아암은 하기의 복합체이다: 면역글로불린 폴리펩타이드 서열, 예를 들면, CDR 및/또는 면역글로불린 경쇄 및 중쇄의 가변 도메인 서열.
- [0154] "표적" 또는 "표적 분자"는 다중특이적 항원-결합 단백질의 결합 아암에 의해 기술적으로 인식된 모이어티를 지칭한다. 예를 들면, 다중특이적 항원-결합 단백질이 항체인면, 표적은, 맥락에 의존하여, 단일 분자상 또는 상이한 분자상의 에피토프, 또는 병원체 또는 종양 세포일 수 있다. 유사하게, 다중특이적 항원-결합 단백질이 수용체-Fc 융합 단백질이면 표적은 수용체용 동족 결합 파트너일 것이다. 당해 분야의 숙련가는 표적이 표적 결합 아암의 결합 특이성에 의해 결정되는 것 및 상이한 표적 결합 아암이 상이한 표적을 인식할 수 있다는 것을 인정할 것이다. 표적은 바람직하게는 (스캐차드(Scatchard) 분석에 따라) $1 \mu\text{M}$ Kd 초과와 친화도로 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질에 결합한다. 표적 분자의 예는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 혈청 용해성 단백질 및/또는 그것의 수용체, 예컨대 사이토카인 및/또는 사이토카인 수용체, 부착소, 성장 인자 및/또는 그의 수용체, 호르몬, 바이러스성 입자 (예를 들면, RSV F 단백질, CMV, 스타프(Staph) A, 인플루엔자, C형 간염 바이러스), 미생물 (예를 들면, 박테리아 세포 단백질, 진균 세포), 부착소, CD 단백질 및 그의 수용체.
- [0155] 용어 "계면"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 제2 항체 도메인의 1종 이상의 아미노산과 제1 항체 도메인내 1종 이상의 아미노산의 상호작용에서 비롯한 회합 표면을 지칭한다. 예시적인 계면은, 예를 들면, 하기를 포함한다: CH1/CL, VH/VL 및 CH3/CH3. 일부 구현예에서, 계면은, 예를 들면, 수소 결합, 정전기 상호작용, 또는 아미노산 형성 계면 사이 염 다리를 포함한다.
- [0156] "온전한" 또는 "전장" 항체의 하나의 예는 항원-결합 아암 뿐만 아니라 CL 및 적어도 중쇄 불변 도메인, CH1, CH2, 및 CH3을 포함하는 것이다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인 (예를 들면, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 이의 아미노산 서열 변이체일 수 있다.
- [0157] 용어 "커플링"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 하기를 연결하는데 필요한 단계를 지칭한다: 제1 및 제2 중쇄 폴리펩타이드 (즉, H1 및 H2) 서로에 대해서, 예를 들면, 공유 결합의 형성. 상기 단계는 하기에서 시스테인 잔기의 환원, 어닐링 및/또는 산화를 포함한다: 제1 및 제2 중쇄 폴리펩타이드 (즉, H1 및 H2) (쇄간 디설파이드 결합을 형성하기 위해). 커플링은 화학 가교결합 또는 산화환원 시스템의 사용에 의해 달성될 수 있다. 참고, 예를 들면, Humphreys 등, J. Immunol. Methods (1998) 217:1-10 및 Zhu 등, Cancer Lett., (1994) 86:127-134.
- [0158] "단일특이적" 항원-결합 단백질은, 단 하나의 에피토프에 결합하는, 항원 결합 단백질, 예컨대 항체의 능력을 지칭한다. "이중특이적" 항원-결합 단백질은 2개의 상이한 에피토프를 결합하는 항원 결합 단백질의 능력을 지칭한다. "다중특이적" 항원 결합 단백질은 1 초과 에피토프에 결합하는 항원 결합 단백질의 능력을 지칭한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질, 예컨대 다중특이적 항체는 이중특이적 항원-결합 단백질 또는 이중특이적 항체를 포함한다. 본 명세서에서 제공된 이중특이적 및 다중특이적 항원-결합 단백질에 대하여, 에피토프는 동일한 항원상에 존재할 수 있거나, 각 에피토프가 상이한 항원상에 존재할 수 있다. 따라서, 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질, 예컨대 이중특이적 항체는 하나의 항원상의 상이한 에피토프에 결합한다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질은 각 에피토프에 하기의 해리 상수 (Kd)로 결합한다: 약 $\leq 1 \mu\text{M}$, 약 $\leq 100 \text{ nM}$, 약 $\leq 10 \text{ nM}$, 약 $\leq 1 \text{ nM}$, 약 $\leq 0.1 \text{ nM}$, 약 $\leq 0.01 \text{ nM}$, 또는 약 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (예를 들면, 약 10^{-8} M 이하, 예를 들면, 약 10^{-8} M 내지 약 10^{-13} M , 예를 들면, 약 10^{-9} M 내지 약 10^{-13} M).
- [0159] "항체 단편"은 온전한 항체의 부분, 바람직하게는 온전한 항체의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 하기를 포함한다: Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편; 디아바디 (Db); 탠덤 디아바디 (taDb), 선형 항체 (예를 들면, 미국특허 번호 5,641,870; Zapata 등, Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995)); 1중 아암된 항체, 단일 가변 도메인 항체, 미니바디, 단쇄 항체 분자; 및 (예를 들면, 비제한적으로, Db-Fc, taDb-Fc, taDb-CH3 및 (scFV)₄-Fc를 포함한) 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체.
- [0160] 본 명세서에서 제공된 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 부분이 특정한 종으로부터 유도된 또는 특정한 항체 부류 또는 서브클래스에 속하는 항체내 대응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라성" 항체일 수 있고, 반면에 쇠

(들)의 나머지는 또 다른 종으로부터 유도된 또는 또 다른 항체 부류 또는 서브클래스에 속하는 항체, 뿐만 아니라 상기 항체의 단편내 대응하는 서열과 동일하거나 상동성이고, 단, 이들은 요망된 생물학적 활성을 나타낸다 (미국특허 번호 4,816,567; 및 Morrison 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984)). 본 명세서에서 관심의 키메라성 항체는 하기로부터 유도된 가변 도메인 항원-결합 서열을 포함하는 영장류화된 항체를 포함한다: 비-인간 영장류 (예를 들면, 구대륙 원숭이, 유인원, 등.) 및 인간 불변 영역 서열.

[0161] 비-인간 (예를 들면, 설치류) 항체의 "인간화된" 형태는 비-인간 항체로부터 유도된 최소 서열을 함유하는 키메라성 항체이다. 대개, 인간화된 항체는 수령체의 추가변 영역으로부터 잔기가 요망된 항체 특이성, 친화도, 및 능력을 갖는 비-인간 종 (공여체 항체) 예컨대 마우스, 랫트, 토끼 또는 비-인간 영장류의 추가변 영역으로부터 잔기로 대체되는 인간 면역글로불린 (수령체 항체)이다. 일부 사례에서, 인간 면역글로불린의 프레임워크 영역 (FR) 잔기는 대응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 더욱이, 인간화된 항체는 수령체 항체에서 또는 공여체 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 성능을 개선하기 위해 실시될 수 있다. 일반적으로, 인간화된 항체는 실질적으로 적어도 하나, 및 전형적으로 2개의 가변 도메인의 모두를 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 추가변 루프는 비인간 면역글로불린의 것에 대응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FRs는 인간 면역글로불린 서열의 것이다. 인간화된 항체는 선택적으로 또한 면역글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부분, 전형적으로 인간 면역글로불린의 것을 포함할 것이다. 추가 세부사항에 대하여, *참고* Jones 등, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann 등, Nature 332:323-329 (1988); 및 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992).

[0162] "복합체" 또는 "복합된"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 펩타이드 결합이 아닌 결합 및/또는 힘 (예를 들면, 반데르발스, 소수성, 친수성 힘)을 통해 서로 상호작용하는 2종 이상의 분자의 회합을 지칭한다. 일 구현 예에서, 복합체는 헤테로다량체성이다. 용어 "단백질 복합체" 또는 "폴리펩타이드 복합체"가 본 명세서에서 사용된 바와 같이 (예를 들면, 비제한적으로, 화학 분자 예컨대 독소 또는 검출제를 포함한) 단백질 복합체에서 단백질에 접합된 비-단백질 독립체를 갖는 복합체를 포함한다는 것이 이해되어야 한다.

[0163] "관심 항원에 결합하는" 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질은 충분한 친화도로 항원, 예를 들면, 단백질에 결합하는 것으로 이로써 다중특이적 항원-결합 단백질이 단백질 또는 세포의 표적화 또는 단백질의 조직 발현에서 진단제 및/또는 치료제로서 유용하고, 다른 단백질과 상당히 교차-반응하지 않는다. 그와 같은 구현예에서, "비-표적" 단백질에 대한 항원-결합 단백질의 결합의 정도는 형광 활성화된 세포 분류 (FACS) 분석 또는 방사선면역침강 (RIA) 또는 ELISA에 의해 결정된 바와 같이 그의 특정한 표적 단백질에 대한 항체 결합의 약 10% 미만일 것이다. 표적 분자에 다중특이적 항원-결합 단백질의 결합에 관하여, 특정한 폴리펩타이드 또는 특정한 폴리펩타이드 표적상의 에피토프의 용어 "특이적 결합" 또는 "이에 특이적으로 결합하는" 또는 "이에 특이적인"은 비특이적 상호작용 과 측정가능하게 상이한 결합을 의미한다 (예를 들면, 비-특이적 상호작용은 소 혈청 알부민 또는 카세인에 결합될 수 있다). 특이적 결합은, 예를 들면, 대조 분자의 결합에 비교된 분자의 결합 결정에 의해 측정될 수 있다. 예를 들면, 특이적 결합은 표적, 예를 들면, 과잉의 비-표지된 표적에 유사한 대조 분자와 경쟁에 의해 결정될 수 있다. 이 경우에, 특이적 결합은 프로브에 표지된 표적의 결합이 과잉의 비표지된 표적에 의해 경쟁적으로 저해되는 경우 표시된다. 특정한 폴리펩타이드 또는 특정한 폴리펩타이드상의 에피토프의 용어 "특이적 결합" 또는 "이에 특이적으로 결합하는" 또는 "이에 특이적인"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 예를 들면, 적어도 약 200 nM, 대안적으로 적어도 약 150 nM, 대안적으로 적어도 약 100 nM, 대안적으로 적어도 약 60 nM, 대안적으로 적어도 약 50 nM, 대안적으로 적어도 약 40 nM, 대안적으로 적어도 약 30 nM, 대안적으로 적어도 약 20 nM, 대안적으로 적어도 약 10 nM, 대안적으로 적어도 약 8 nM, 대안적으로 적어도 약 6 nM, 대안적으로 적어도 약 4 nM, 대안적으로 적어도 약 2 nM, 대안적으로 적어도 약 1 nM, 또는 더 큰 친화도의 표적에 대한 Kd를 갖는 분자에 의해 나타나질 수 있다. 일 구현예에서, 용어 "특이적 결합"은 다중 특이적 항원-결합 단백질이 임의의 다른 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 에피토프에 실질적으로 결합 없이 특정한 폴리펩타이드 또는 특정한 폴리펩타이드상의 에피토프에 결합하는 결합을 지칭한다.

[0164] "결합 친화도"는 일반적으로 분자 (예를 들면, 항체 또는 다중특이적 항원-결합 단백질) 및 그것의 결합 파트너 (예를 들면, 항원)의 단일 결합 부위 사이 비공유 상호작용의 총계의 강도를 지칭한다. 달리 나타내지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "결합 친화도"는 결합 쌍의 구성원 (예를 들면, 항체 및 항원) 사이 1:1 상호작용을 반영하는 고유 결합 친화도를 지칭한다. 분자 X의 이의 파트너 Y에 대한 친화도는 일반적으로 해리 상수 (Kd)에 의해 나타나질 수 있다. 예를 들면, Kd는 약 200 nM 이하, 약 150 nM 이하, 약 100 nM 이하, 약 60 nM 이하, 약 50 nM 이하, 약 40 nM 이하, 약 30 nM 이하, 약 20 nM 이하, 약 10 nM 이하, 약 8 nM 이하, 약 6 nM 이하, 약 4 nM 이하, 약 2 nM 이하, 또는 약 1 nM 이하일 수 있다. 친화도는, 본 명세서에서 기재된 것을 포함

한, 당해 분야에서 공지된 통상 방법에 의해 측정될 수 있다. 저-친화도 항체는 일반적으로 항원을 서서히 결합시키고 쉽게 해리하는 경향이 있고, 반면에 고-친화도 항체는 일반적으로 항원을 더 빠르게 결합하고 더 오래 결합을 유지하는 경향이 있다. 결합 친화도의 다양한 측정 방법은 당해 기술에 공지되어 있고, 이들 중 어떤 것은 본 발명을 위해 사용될 수 있다.

[0165] 일 구현예에서, "Kd" 또는 "Kd 값"은 하기를 이용한 표면 플라즈몬 공명 검정을 이용함으로써 측정된다: BIAcore™-2000 또는 BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) (25° C에서 고정된 표적 (예를 들면, 항원) CM5 칩으로 -10 반응 단위 (RU)에). 간단히, 카복시메틸레이트화된 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, BIAcore Inc.)은 공급자의 지침에 따라 N-에틸 -N'-(3- 디메틸아미노프로필)-카보다이미드 하이드로클로라이드 (EDC) 및 N-하이드록시석신이미드 (NHS)로 활성화된다. 항원은 커플링된 단백질의 대략 10 반응 단위 (RU)를 달성하기 위해 5 µl/분의 유량에서 주사 이전 5 µg/ml (~0.2 µM)속에서 10 mM 아세트산나트륨, pH 4.8로 희석된다. 항원의 주입 다음에, 1M 에탄올아민은 블록 미반응된 그룹에 주입된다. 동력학 측정에 대해, Fab의 2-배 연속 희석 (예를 들면, 0.78 nM 내지 500 nM)은 25° C에서 대략 25 µl/min의 유량에서에서 0.05% Tween 20 (PBST)와 함께 PBS에서 주입된다. 결합 속도 (k_{on}) 및 해리 속도 (k_{off})는 회합 및 해리 센서그램의 동시 적합화에 의해 단순 1대1 랑뮤어 결합 모델 (BIAcore 평가 소프트웨어 버전 3.2)를 이용하여 계산된다. 평형 해리 상수 (Kd)은 비 k_{off}/k_{on} 로서 계산된다. 참고, 예를 들면, Chen 등, J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). 온-레이트가 상기 면 플라즈몬 공명 검정에 의해 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 를 초과하면, 이때 상기 온-레이트는 분광기, 예컨대 교반 큐벳을 구비한 정지-유동 구비된 분광측정기 (Aviv Instruments) 또는 8000-시리즈 SLM-Aminco 분광측정기 (ThermoSpectronic)에서 측정된 바와 같이 증가 농도의 항원의 존재에서 PBS, pH 7.2에서 20 nM 항-항원 항체 (Fab 형태)의, 25° C에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 대역통과)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기술을 사용하여 결정될 수 있다.

[0166] 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질, 예컨대 항체 (예를 들면, 이중특이적 항체), 단편, 또는 그의 유도체에 대하여 "생물학적으로 활성" 및 "생물학적 활성" 및 "생물학적 특징"은, 달리 지정된 것을 제외하고, 생물학적 분자에 결합하는 능력을 갖는 것을 의미한다.

[0167] 다양한 헤테로다량체 폴리펩타이드를 기재하는데 사용될 때 "단리된"은 발현된 세포 또는 세포 배양으로부터 분리된 및/또는 회수된 헤테로다량체를 의미한다. 그의 천연 환경의 오염물질 구성요소는 헤테로다량체로 진단 또는 치료 용도를 방해하는, 및 효소, 호르몬, 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있는 물질이다. 특정 구현예에서, 헤테로다량체는 (1) 로우리(Lowry) 방법에 의해 결정된 바와 같이 단백질의 95중량 % 초과, 및 가장 바람직하게는 99중량 % 초과, (2) 스피닝 컵 서열분석장치의 이용에 의한 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15 잔기를 수득하는데 충분한 정도, 또는 (3) 쿠마씨 블루 또는, 바람직하게는, 은 염색을 이용하여 환원 또는 비환원 조건 하에 SDS PAGE에 의한 균질성으로 정제될 것이다. 통상적으로, 그러나, 단리된 폴리펩타이드는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

[0168] 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질은 일반적으로 실질적인 균질성으로 정제된다. 어구 "실질적으로 균질한", "실질적으로 균질한 형태", 및 "실질적인 균질성"은 생성물이 요망되지 않는 폴리펩타이드 조합으로부터 유래된 부산물 (예를 들면, 동종다량체)이 실질적으로 없는 것을 나타내는데 사용된다.

[0169] 순도에 관하여 표현되는 경우, 실질적인 균질성은 부산물의 양이 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 4%, 3%, 2% 또는 1중량 %를 초과하지 않거나 1중량 % 미만인 것을 의미한다. 일 구현예에서, 부산물은 5% 미만이다.

[0170] "생물학적 분자"는 핵산, 단백질, 탄수화물, 지질, 및 이들의 조합을 지칭한다. 일 구현예에서, 생물학적 분자는 자연에서 존재한다.

[0171] 항체 "효과기 기능"은 항체의 Fc 영역 (천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인하는 이들 생물학적 활성을 지칭하고, 항체 아이소타입으로 다양하다. 항체 효과기 기능의 예는 하기를 포함한다: C1q 결합 및 보체 의존적 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존적 세포-매개된 세포독성 (ADCC); 식균작용; 하기의 하향 조절; 세포 표면 수용체 (예를 들면, B 세포 수용체); 및 B 세포 활성화.

[0172] "항체-의존적 세포-매개된 세포독성" 또는 "ADCC"는 하기인 세포독성의 형태를 지칭한다: 하기에서 존재한 Fc 수용체 (FcRs)에 결합된 분비된 Ig: 특정 세포독성 세포 (예를 들면, 자연 살해 (NK) 세포, 중성구, 및 대식세포)가 이들 세포독성 효과기 세포를 항원-보유 표적 세포에 구체적으로 결합하고 그 뒤에 표적 세포를 세포독성 약물로 사멸시킬 수 있다. 항체는 세포독성 세포를 "아암하고" 상기 사멸에 절대적으로 요구된다. ADCC 매개용 1차 세포, NK 세포는 Fc γRIII만을 발현하고, 반면에 단핵구는 Fc γRI, Fc γRII, 및 Fc γRIII을 발현한다. 조혈

세포에 관한 FcR 발현은 하기에 요약된다: Table 3 on page 464 of Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991). 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 시험관내 ADCC 검정, 예컨대 하기 기재된 것: 미국 특허 번호 5,500,362 또는 5,821,337이 수행될 수 있다. 상기 검정용 유용한 효과기 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 살해 (NK) 세포를 포함한다. 대안적으로, 또는 추가로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체내, 예를 들면, 동물 모델에서 예컨대 하기에 개시된 것에서 평가될 수 있다: Clynes 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998).

- [0173] "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기재한다. 바람직한 FcR은 인간 FcR이다. 또한, 바람직한 FcR은 IgG 항체 (감마 수용체)를 결합하고, 대립유전자 변이체를 포함한, Fc γ RI, Fc γ RII, 및 Fc γ RIII 서브클래스의 수용체 및 대안적으로 이들 수용체의 스플라이싱된 형태를 포함하는 것이다. Fc γ RII 수용체는, 이의 세포질 도메인에서 주로 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는, Fc γ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc γ RIIB ("저해 수용체")를 포함한다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 이의 세포질 도메인에서 면역수용체 티로신계 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 저해 수용체 Fc γ RIIB는 이의 세포질 도메인에서 면역수용체 티로신계 저해 모티프 (ITIM)를 함유한다 (참고 검토 M. Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234 (1997)). FcRs은 하기에 검토된다: Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-492 (1991); Capel 등, Immunomethods 4:25-34 (1994); 및 de Haas 등, J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995). 미래에 확인된 것을 포함한, 다른 FcRs는 본 명세서에서 용어 "FcR"에 의해 포함된다. 용어는 또한, 하기를 책임지는, 신생아 수용체, FcRn을 포함한다: 태아에 모계 IgGs의 전달 (Guyer 등, J. Immunol. 117:587 (1976) 및 Kim 등, J. Immunol. 24:249 (1994)).
- [0174] "인간 효과기 세포"는 하나 이상의 FcRs를 발현하고 효과기 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게는, 세포는 적어도 Fc γ RIII를 발현하고 ADCC 효과기 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 자연 살해 (NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포, 및 중성구를 포함하고; PBMCs 및 NK 세포가 바람직하다. 효과기 세포는 원상태 공급원, 예를 들면, 혈액으로부터 분리될 수 있다.
- [0175] "보체 의존적 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재하에 표적 세포의 용해를 지칭한다. 고전적 보체 경로의 활성화는 그들의 동족 항원에 결합되는 (적절한 서브클래스의) 항체에 보체 시스템 (C1q)의 제1 구성요소의 결합에 의해 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들면, 하기에 기재된 바와 같이, CDC 검정: Gazzano-Santoro 등, J. Immunol. Methods 202:163 (1996)은 수행될 수 있다.
- [0176] 용어 "치료적으로 유효한 양"은 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하기 위한 (다중특이적 항체를 포함한) 항체, 이의 항원-결합 항체 단편, 또는 이의 유도체의 양을 지칭한다. 종양 (예를 들면, 암성 종양)의 경우에, 치료적 유효량의 항체 또는 항체 단편 (예를 들면, 다중특이적 항체 또는 항체 단편은 암 세포의 수를 감소시킬 수 있고; 원발성 종양 크기를 감소시킬 수 있고; 주변 기관 속에 암 세포 침윤을 저해 (즉, 어느 정도까지 둔화 및 바람직하게는 중단)할 수 있고; 종양 전이를 저해 (즉, 어느 정도까지 둔화 및 바람직하게는 중단)할 수 있고; 어느 정도까지, 종양 성장을 저해할 수 있고; 및/또는 장애와 관련된 증상 중 하나 이상을 어느 정도까지 완화할 수 있다. 항체 또는 이의 항체 단편, 또는 이의 유도체가 성장을 방지할 수 있고/있거나 현존하는 암 세포를 사멸할 수 있는 정도로, 세포증식억제성 및/또는 세포독성일 수 있다. 암 요법에 대하여, 생체내 효능은, 예를 들면, 생존의 지속기간, 질환 진행까지의 시간 (TTP), 반응 속도 (RR), 반응의 지속기간, 및/또는 삶의 질의 평가에 의해 측정될 수 있다.
- [0177] "감소하다 또는 저해하다"는 바람직하게는 20% 이상, 더욱 바람직하게는 50% 이상, 및 가장 바람직하게는 75%, 85%, 90%, 95%, 또는 초과 전반적인 감소를 일으키는 능력을 의미한다. 감소하다 또는 저해하다는 치료받는 장애의 증상, 전이의 존재 또는 크기, 원발성 종양의 크기, 또는 혈관신생 장애에서 혈관의 크기 또는 수를 지칭할 수 있다.
- [0178] 용어들 "암" 및 "암성"은 조절되지 않은 세포 성장/증식에 의해 전형적으로 특성구명되는 포유동물내 생리적 조건을 지칭하거나 기재한다. 양성 및 악성 암이 상기 정의에 포함된다. 암의 예는 비제한적으로, 암종, 림프종, 모세포종, 육종, 및 백혈병을 포함한다. 상기 암의 더욱 특정한 예는 하기를 포함한다: 편평상피 세포 암, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐의 선암종, 폐의 편평상피 암종, 복막의 암, 간세포 암, 위장 암을 포함한 위의 또는 위 암, 췌장암, 교모세포종, 신경아교종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간종양, 유방암, 결장암, 직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액샘 암종, 신장암 (예를 들면, 신장 세포 암종), 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종, 항문 암종, 음경 암종, 흑색종, 및 다양한 유형의 두경부 암."초기 단계 암"은 침습성 또는 전이성이 아니거나 0, I, 또는 II 기 암으로서 분류되는 암을 의미한다. 용어 "전암성"은 전형적으로 암을 선행하거나 암으로 발생하는 성장 또는 상태를 지칭한다. "비-전이성"은 양성인 또는 원발 부위에 남아있고 림

프 또는 혈관 시스템 속에 또는 원발 부위 이외의 조직에 침투하지 않은 암을 의미한다. 일반적으로, 비전이암은 0, I, 또는 II 기 암, 및 가끔 III 기 암인 임의의 암이다.

[0179] "자가면역 질환"은 본 명세서에서 개인의 자체 조직에서 일어나고 이에 관한 질환 또는 장애 혹은 이의 공-분리 또는 징후 혹은 이로부터 생긴 병태이다. 자가면역 질환 또는 장애의 예는, 비제한적으로 하기를 포함한다: 류마티스성 관절염, 자가면역 용혈성 빈혈 (예를 들면, 면역 범혈구감소증, 발작성 야행성 혈색소뇨증), 자가면역 혈소판감소증 (예를 들면, 특발성 혈소판감소성 자반병, 면역-매개된 혈소판감소증), 갑상선염 (예를 들면, 그레이브스병, 하시모토 갑상선염, 유년성 림프구 갑상선염, 위축성 갑상선염), I형 진성 당뇨병 또는 인슐린-의존적 당뇨병, 중추 및 말초 신경계의 탈수초 질환 (예를 들면, 다발성 경화증, 특발성 탈수초 다발성신경병증 또는 길랑-바레 증후군), 만성 염증성 탈수초 다발성신경병증, 수포성 피부 질환, 홍반 다형성, 접촉 피부염, 및 자가면역 만성적 활동 간염.

[0180] 용어 "세포독성제"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 세포의 기능을 저해 또는 방해하고/하거나 세포의 파괴를 일으키는 서브스텐스를 지칭한다. 상기 용어는 하기를 포함할 의도이다: 방사성 동위원소 (예를 들면, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , Ra^{223} , P^{32} , 및 Lu의 방사성 동위원소), 화학치료제, 예를 들면, 메토트렉세이트, 아드리마이신, 빈카 알칼로이드 (빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드), 독소루비신, 펠팔란, 미토마이신 C, 클로르암부실, 다우노루비신 또는 다른 개재 물질, 효소 및 이의 단편 예컨대 핵산분해 효소, 항생제, 및 독소 예컨대, 이들의 단편 및/또는 변이체를 포함한, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 소분자 독소 또는 효소 활성 독소, 및 다양한 항종양, 항암, 및 본 명세서에서 개시된 화학치료제. 다른 세포독성제는 본 명세서에 기재되어 있다. 종양파괴제는 종양 세포의 파괴를 유발한다.

[0181] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "약제학적으로 허용가능한" 또는 "약리적으로 양립가능한"은 생물학적으로 또는 달리 비바람직하지 않은 물질을 의미하고, 예를 들면, 임의의 상당한 바람직하지 않은 생물학적 효과의 유발 또는 함유되는 조성물의 임의의 다른 구성요소와 유해한 방식으로 상호작용 없이 환자에 투여된 약제학적 조성물 속에 편입될 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 캐리어 또는 부형제는 바람직하게는 독물학 및 제조 시험의 요구된 표준을 충족시켰고/시켰거나 하기에 의해 작성된 불활성 성분 가이드상에 포함된다: 미국식품의약품안전청.

[0182] "항-암 요법"은 본 명세서에서 사용된 바와 같이 대상체내 암을 감소 또는 저해하는 치료를 지칭한다. 항-암 요법의 예는 하기를 포함한다: 세포독성 방사선요법 뿐만 아니라 치료적 유효량의 세포독성 약물, 화학치료제, 성장 저해 제제, 암 백신, 혈관신생 저해제, 프로드러그, 사이토카인, 사이토카인 길항제, 코르티코스테로이드, 면역억제제 제제, 항-구토제, 항체 또는 항체 단편, 또는 진통제의 상기 대상체에게 투여.

[0183] 용어 "프로드러그"는 본원에서 사용된 바와 같이 모 약물에 비교된 종양 세포에 더 적은 세포독성인 및 더 많은 활성 모 형태로 효소적으로 활성화 또는 전환될 수 있는 약제학적으로 활성 서브스텐스의 전구체 또는 유도체를 지칭한다. 참고, 예를 들면, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) 및 Stella 등, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt 등, (ed.), pp. 247-267, Humana Press(1985). 전구약물은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 더 많은 활성 세포독성 유리 약물로 전환될 수 있는 포스페이트-함유 전구약물, 티오포스페이트-함유 전구약물, 설페이트-함유 전구약물, 펩타이드-함유 전구약물, D-아미노산-변형된 전구약물, 당화된 전구약물, 베타-락탐 함유 전구약물, 선택적으로 치환된 페녹시아세트아미드-함유 전구약물 또는 선택적으로 치환된 페닐아세트아미드-함유 전구약물, 5-플루오로시토신 및 다른 5-플루오로우리딘 전구약물. 본 발명에서 사용을 위하여 프로드러그 속에 유도될 수 있는 세포독성 약물의 예는, 비제한적으로, 상기 기재된 그들 화학치료제를 포함한다.

[0184] "대상체"는 척추동물, 예컨대 포유동물, 예를 들면, 인간이다. 포유동물은, 비제한적으로, 농장 동물 (예컨대 소), 스포츠 동물, 애완동물 (예컨대 고양이, 개 및 말), 영장류, 마우스, 및 랫트를 포함한다.

[0185] 맥락에 의해 달리 표시된 경우를 제외하고, 용어들 "제1" 폴리펩타이드 (예컨대 중쇄 (H1) 또는 경쇄 (L1)) 및 "제2" 폴리펩타이드 (예컨대 중쇄 (H2) 또는 경쇄 (L2)), 및 이들의 변동은 단지 일반적인 식별자이고, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 특이적 또는 특정한 폴리펩타이드 또는 구성요소의 확인으로서 취급되지 않아야 한다.

[0186] 실시예에서 참조된 상업적으로 입수가능한 시약은 달리 나타내지 않는 한 제조자의 지침에 따라 사용되었다. ATCC 수탁 번호 에 의해, 하기 실시예에서, 및 명세서 내내 확인된 그들 세포의 공급원은 버지니아주, 머내서스

소재, 미국 종균 협회이다. 달리 지적되지 않는 한, 본 발명은 재조합 DNA 기술의 표준 절차, 예컨대 상기 본 명세서에서 및 하기 교과서에 기재된 것을 이용한다: Sambrook 등, *상기*; Ausubel 등, *Current Protocols in Molecular Biology* (Green Publishing Associates 및 Wiley Interscience, NY, 1989); Innis 등, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, Inc., NY, 1990); Harlow 등, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1988); Gait, *Oligonucleotide Synthesis* (IRL Press, Oxford, 1984); Freshney, *Animal Cell Culture*, 1987; Coligan 등, *Current Protocols in Immunology*, 1991.

[0187] 본 명세서에서 "약" 값 또는 파라미터에 대한 언급은 이 기술 분야에서 숙련가에 쉽게 공지된 각각의 값에 대하여 일반적 오차 범위를 지칭한다. 본 명세서에서 "약" 값 또는 파라미터에 대한 언급은 그 값 또는 파라미터 자체에 관한 측면을 포함(및 기재)한다. 예를 들면, "약 X"를 지칭하는 설명은 "X"의 설명을 포함한다.

[0188] 본 명세서에서 기재된 본 발명의 측면 및 구현예가 측면 및 구현예를 "포함한", "상기로 이루어진", 및 "본질적으로 상기로 이루어진"을 포함하는 것으로 이해된다.

[0189] 특허 출원 및 공개를 포함한, 본 명세서에서 인용된 모든 참조문헌은 이로써 그 전문이 참고로 편입된다.

[0190] **돌연변이체 또는 변형된 중쇄/경쇄 쌍을 포함한 다중특이적 항원-결합 단백질**

[0191] 본원은 중쇄/경쇄 짝짓기 선택성을 개선하는 CH1/CL 계면, 및/또는 VH/VL 계면에서 신규 돌연변이의 확인에 기반한다.

[0192] 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질은 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드의 가변 및/또는 불변 도메인 내의 특정한 잔기에서 아미노산 변형을 포함한다. 당해 분야의 숙련가가 인정할 바와 같이, 다양한 넘버링 규약은 IgG 가변 영역 서열 내의 특정한 아미노산 잔기 설계에 이용될 수 있다. 통상적으로 사용된 넘버링 규약은 하기를 포함한다: 카밧 및 EU 지수 넘버링 (참고, 카밧 등, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). 가변 도메인에 대하여 정정 또는 대안 넘버링 시스템을 포함하는 다른 규약은 하기를 포함한다: 초티아 (Chothia C, Lesk AM (1987), *J Mol Biol* 196: 901-917; Chothia, 등 (1989), *Nature* 342:877-883), IMGT (Lefranc, 등 (2003), *Dev Comp Immunol* 27: 55-77), 및 AHO (Honegger A, Pluckthun A (2001) *J Mol Biol* 309:657-670). 이들 참조문헌은 항체 서열의 가변 영역 아미노산 잔기의 위치를 정의하는 번역글로불린 가변 영역에 아미노산 서열 넘버링 반응식을 제공한다.

[0193] 본 명세서에서 달리 명확히 언급되지 않는 한, 하기에 대한 모든 언급: 번역글로불린 중쇄 가변 영역 (즉, VH) 아미노산 잔기 (즉 번호) (실시에 및 청구범위에서 나타남) 은, VL 잔기에 대한 모든 언급에서와 같이, 카밧 넘버링 시스템에 기반한다. 실시에 및 청구범위에서 나타나는 번역글로불린 중쇄 불변 영역 CH1 잔기에 대한 모든 언급 (즉, 번호) 은, CL 잔기에 대한 모든 언급에서와 같이, EU 시스템에 기반한다. 카밧 또는 EU 지수 넘버링에 따른 잔기 번호의 지식으로, 숙련가는, 임의의 통상적으로 사용된 넘버링 규약에 따라, 본 명세서에서 기재된 아미노산 서열 변형을 확인할 수 있다.

[0194] 본 명세서에서 실시에 및 청구범위가 특정한 아미노산 잔기를 확인하기 위해 카밧 또는 EU 지수를 확인하는 반면, 그 전체가 본 명세서에서 편입된, 서열목록에서 나타나는 서열 식별이 소정의 폴리펩타이드 내의 아미노산의 순차적인 넘버링을 제공하고, 따라서, 카밧 또는 EU 지수에 의해 제공된 바와 같이 대응하는 아미노산 번호에 따르지 않는 것이 이해된다. 예를 들면, 서열식별번호:53의 세린 잔기 번호 66은 EU 넘버링 시스템 하에서 CH1의 S183에 대응한다.

[0195] 본 명세서에서 제공된 항목, 구성요소, 또는 요소 (예컨대 "다중특이적 항원-결합 단백질")이 단수로 기재 또는 청구될 수 있어도, 단수로 제한이 명백하게 언급되지 않는 한 복수는 그의 범위 내에 있는 것으로 고려된다.

[0196] 이하에 더 상세히 기재된 바와 같이, 변형 없이 서열을 가진 다중특이적 항원-결합 단백질과 비교된 경우 개선된 정확한 중쇄/경쇄 짝짓기 및/또는 개선된 수율로 단일 세포에서 생산될 수 있는 변형된 다중특이적 항원-결합 단백질이 본 명세서에서 제공된다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 용이하게 하기 위해 VH/VL 및/또는 CH1/CL 영역에서 변형(들)을 포함한다: 정확한 중쇄/경쇄 짝짓기 (즉, 하기 형성을 위하여 제1 경쇄 L1과 제1 중쇄 H1 (또는 그의 단편)의 짝짓기: 제1 중쇄/경쇄 쌍 (즉, H1/L1) (결합 제1 에피토프를 결합할 수 있음) 및 하기 형성하기 위해 제2 경쇄 L2와 제2 중쇄 H2 (또는 그의 단편)의 짝짓기: 제2 중쇄/경쇄 쌍 (즉, H2/L2) (제2 (예를 들면, 상이한) 에피토프를 결합할 수 있음). 용어들 "H1" 및 "H2"은 임의의 지정이고 구현예 중 임의의 것에서의 "H1" 및 "H2"가 역전될 수 있다는 것은 당해 분야의 숙련가에게 분명할 것이다.

즉, H1의 CH1 도메인 및 L1의 CL 도메인 내에 있는 것으로 상기에서 기재된 돌연변이 중 임의의 것은, 대안적으로, 상기 H2의 CH1 도메인 및 L2의 CL 도메인 내에 있을 수 있다.

[0197] 특정 다른 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 추가로 다중특이적 항원-결합 단백질의 2개의 아암의 헤테로이량체화를 용이하게 하기 위해 Fc 영역에서 변형(들)을 포함한다.

전략 #1

[0199] 일 측면에서, 중쇄의 CH1 도메인에서 위치 S183 (EU 넘버링)의 단일 아미노산 변형 및 경쇄의 CL 도메인에서 위치 V133 (EU 넘버링)의 단일 아미노산 변형이 변형된 중쇄와 변형된 경쇄 사이 우선적인 짝짓기 및, 예를 들면, 변형된 중쇄와 비-변형된 경쇄 사이, 또는, 예를 들면, 비-변형된 중쇄와 변형된 경쇄 사이 감소하는 짝짓기를 입증한다는 것이 놀랍게도 밝혀졌다. 이들 잔기는 발현 데이터에 의해 선택되었고 중쇄 CH1 도메인 및 경쇄 CL 도메인의 구조 및 기능의 지식 및 연구에 의해 확인되었다. **참고 도 1-3, 11C 및 12C.**

[0200] 따라서, 특정 구현예에서, 하기를 포함하는 다중특이적 항원-결합 단백질이 제공된다: (a) 제1 항원에 결합할 수 있는 제1 중쇄/경쇄 쌍으로서, 제1 중쇄 폴리펩타이드 (H1) 및 제1 경쇄 폴리펩타이드 (L1)를 포함하는 제1 중쇄/경쇄 쌍, 및 (b) 제2 항원에 결합할 수 있는 제2 중쇄/경쇄 쌍으로서, 제2 중쇄 폴리펩타이드 (H2) 및 제2 경쇄 폴리펩타이드 (L2)를 포함하는 제2 중쇄/경쇄 쌍, 여기서 각 H1 및 H2는 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 중쇄 불변 도메인 (CH1)를 포함하고, 그리고 각 L1 및 L2는 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 경쇄 불변 도메인 (CL)을 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 위치 S183 (EU 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함하고, 그리고 상기 CL 도메인은 위치 V133 (EU 넘버링)에서 아미노산 치환 돌연변이를 포함한다. 특정 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 위치 S183 (EU 넘버링)에서 아미노산 치환으로 구성되고 (예컨대 본질적으로 구성되고), 상기 CL 도메인은 위치 V133 (EU 넘버링)에서 아미노산 치환 돌연변이로 구성되고 (예컨대 본질적으로 구성된다). 특정 구현예에서, 제1 항원 및 제2 항원은 동일하다. 특정 구현예에서, 제1 중쇄/경쇄 쌍 및 상기 제2 중쇄/경쇄 쌍 각각은 동일한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합한다. 특정 구현예에서, 제1 항원 및 제2 항원은 상이하다. 특정 구현예에서, 다중 특이적 항원-결합 단백질은 2개의 상이한 항원에 결합하는 이중특이적 항체이다. 특정 구현예에서, 이중특이적 항체는 길항제 또는 효능제 항체이다. 특정 구현예에서, 이중특이적 항체는 하나의 또는 둘 모두의 항원에 대한 길항제이고; 한편 다른 구현예에서, 이중특이적 항체는 하나 또는 둘 모두의 항원에 대한 효능제이다. 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질 (예컨대 이중특이적 항체)의 항원-결합 단편이 또한 고려된다.

[0201] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 CH1 도메인 상의 위치 S183 (EU 넘버링)에서의 아미노산은 양으로 하전된 아미노산 잔기로 치환되고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 CL 도메인 상의 위치 V133 (EU 넘버링)에서의 아미노산은 음으로 하전된 잔기로 치환된다. 특정 구현예에서, H1의 CH1 도메인 상의 위치 S183 (EU 넘버링)에서의 아미노산은 음으로 하전된 아미노산 잔기로 치환되고, 그리고 CL 도메인 상의 위치 V133 (EU 넘버링)에서의 아미노산은 양으로 하전된 잔기로 치환된다. 특정 구현예에서, 양으로 하전된 잔기는 R 또는 K로 구성된 군으로부터 선택된다. 특정 구현예에서, 음으로 하전된 잔기는 D 및 E로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0202] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 CH1 도메인은 S183A, S183T, S183V, S183Y, S183F, S183H, S183N, S183D, S183E, S183R, 및 S183K (EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 치환을 포함하고, 그리고 상기 CL 도메인은 V133E, V133S, V133L, V133W, V133K, V133R, 및 V133D (EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 치환을 포함한다.

[0203] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 CH1 도메인은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 치환으로 구성되고 (예컨대 본질적으로 구성되고) S183A, S183T, S183V, S183Y, S183F, S183H, S183N, S183D, S183E, S183R, 및 S183K (EU 넘버링), 및 상기 CL 도메인은 V133E, V133S, V133L, V133W, V133K, V133R, 및 V133D (EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 치환으로 구성되고 (예컨대 본질적으로 구성된다).

[0204] 용어들 "H1" 및 "H2"은 임의의 지정이고 구현예 중 임의의 것에서의 "H1" 및 "H2"가 역전될 수 있다는 것은 당해 분야의 숙련자에게 분명할 것이다. 즉, H1의 CH1 도메인 및 L1의 CL 도메인 내에 있는 것으로 상기에서 기재된 돌연변이 중 임의의 것은, 대안적으로, 상기 H2의 CH1 도메인 및 L2의 CL 도메인 내에 있을 수 있다.

[0205] 따라서, H1의 CH1 도메인 상의 위치 S183 (EU 넘버링) 및 L1의 CL 도메인 상의 위치 V133 (EU 넘버링)에서의 치환 돌연변이의 모든 가능한 쌍으로 된 조합이 고려된다. 특정 구현예에서, H1의 CH1 도메인 상의 위치 S183 (EU 넘버링) 및 L1의 CL 도메인 상의 위치 V133 (EU 넘버링)에서의 치환 돌연변이의 특정 조합이 고려된다. 그와 같은 조합은 아래의 표 1에서 제공된 것들을 비제한적으로 포함한다:

표 1

S183D/ V133K	S183A/ V133K	S183T/ V133W	S183V/ V133L	S183Y/ V133S	S183F/ V133E	S183F/ V133D
S183E/ V133K	S183A/ V133R	S183T/ V133K	S183V/ V133W	S183Y/ V133L	S183F/ V133S	S183H/ V133S
S183A/ V133E	S183A/ V133D	S183T/ V133R	S183V/ V133K	S183Y/ V133W	S183F/ V133L	S183H/ V133L
S183A/ V133S	S183T/ V133E	S183T/ V133D	S183V/ V133R	S183Y/ V133K	S183F/ V133W	S183H/ V133W
S183A/ V133L	S183T/ V133S	S183V/ V133E	S183V/ V133D	S183Y/ V133R	S183F/ V133K	S183N/ V133L
S183A/ V133W	S183T/ V133L	S183V/ V133S	S183Y/ V133E	S183Y/ V133D	S183F/ V133R	S183E/ V133L
S183T/ V133K	S183K/ V133E	S183Y/ V133K				

[0206]

[0207]

특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 S183D 또는 S183E 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는 H1의 CH1 도메인, 그리고 V133K 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 H1의 CH1 도메인 및 L1의 CL 도메인을 포함하고, 상기 CH1 도메인은 S183D 또는 S183E 돌연변이 (EU 넘버링)로 구성되고, 그리고 L1의 CL 도메인은 V133K 돌연변이 (EU 넘버링)로 구성된다.

[0208]

2개의 예시적인 IgG1 CH1 도메인 아미노산 서열 (서열식별번호:53 및 서열식별번호:109), 예시적인 IgG2 CH1 도메인 아미노산 서열 (서열식별번호:109), 예시적인 IgG2 CH1 도메인 서열 (서열식별번호:110), 예시적인 IgG3 CH1 도메인 아미노산 서열 (서열식별번호:111), 예시적인 IgG4 CH1 도메인 아미노산 서열 (서열식별번호:112), 예시적인 람다 CL 도메인 아미노산 서열 (서열식별번호:113) 및 예시적인 카파 CL 도메인 아미노산 서열 (서열식별번호:54)이 아래에서 제공된다:

[0209]

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKV (서열식별번호:53)

[0210]

tkgpsvfpla psskstsggt aalgclvkdy fpepvtvsw nsgaltsgvht fpavlqssgl yslssvvtvp sssslgtqyti cn (서열식별번호:109)

[0211]

TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CN (서열식별번호:110)

[0212]

TKGPSVFPLA PCSRSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSSLGTQTYT CN (서열식별번호:111)

[0213]

TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSSLGTQTYT CN (서열식별번호:112)

[0214]

GQPKAAPSVT LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWKADSSPVK AGVETTTTPSK QSNKYAASS YLSLTPEQWK SHKSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS (서열식별번호:113)

[0215]

TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVCLLN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC (서열식별번호:54, 유전자 스플라이싱의 결과로서 생성된, 서열식별번호:30에서 나타난 CL 도메인의 N-말단에서 R 잔기 없이,)

[0216]

하기의 아미노산 서열: 전장 4D5 IgG1 중쇄 (서열식별번호:55) 및 경쇄 (서열식별번호:56)이 아래에서 제공된다:

[0217]

4D5 HC (인간 IgG1):

[0218]

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHVVRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTILVTSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLWC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV LQSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK (서

열식별번호:55)

[0219] 4D5 LC (인간 카파):

[0220] DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS RFSGSRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTTPTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSK STYLSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC (서열식별번호:56)

[0221] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 카파 경쇄를 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: 하기에서 제시된 아미노산 서열: 서열식별번호:1 또는 하기에서 제시된 서열 중 아미노산 11-116: 서열식별번호:1. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: 하기에서 제시된 아미노산 서열: 서열식별번호:2 또는 하기에서 제시된 서열 중 아미노산 11-116: 서열식별번호:2. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: 하기에서 제시된 아미노산 서열: 서열식별번호:3 또는 하기에서 제시된 서열 중 아미노산 11-116: 서열식별번호:3. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: 하기에서 제시된 아미노산 서열: 서열식별번호:4 또는 하기에서 제시된 서열 중 아미노산 11-116: 서열식별번호:4. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: 하기에서 제시된 아미노산 서열: 서열식별번호:5 또는 하기에서 제시된 서열 중 아미노산 11-116: 서열식별번호:5. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: 하기에서 제시된 아미노산 서열: 서열식별번호:6 또는 하기에서 제시된 서열 중 아미노산 11-116: 서열식별번호:6. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: 하기에서 제시된 아미노산 서열: 서열식별번호:7 또는 하기에서 제시된 서열 중 아미노산 11-116: 서열식별번호:7.

[0222] 하기의 아미노산 서열: 서열식별번호:1-7은 아래의 표 2A에서 제공된다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 이들 서열 중 임의의 것에서 제시된 바와 같이 CL 도메인을 포함하는 제1 경쇄 폴리펩타이드 L1을 포함한다. 하기에서 제시된 CL 도메인: 서열식별번호:54는 하기의 서열식별번호의 아미노산 11-116에 해당한다: 1-7. 따라서, L1은 하기의 서열식별번호 중 임의의 것에서 제시된 바와 같이 아미노산 11-116을 포함하는 CL 도메인을 포함할 수 있다: 1-7.

표 2A

V133E 서열식별번호:1	GQGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASV E CLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
V133S 서열식별번호:2	GQGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASV S CLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
V133L 서열식별번호:3	GQGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASV L CLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
V133W 서열식별번호:4	GQGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASV W CLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
V133K 서열식별번호:5	GQGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASV K CLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
V133R 서열식별번호:6	GQGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASV R CLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
V133D 서열식별번호:7	GQGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASV D CLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC

[0223]

[0224] 카파 경쇄의 CL 도메인 중 아미노산 위치 133 (EU 넘버링)은 하기 중 아미노산 위치 35에 해당한다: 서열식별번호

호:1-7.

[0225] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 람다 경쇄를 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: 하기에서 제시된 아미노산 서열: 서열식별번호:114. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: 하기에서 제시된 아미노산 서열: 서열식별번호:115. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: 하기에서 제시된 아미노산 서열: 서열식별번호:116. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: 하기에서 제시된 아미노산 서열: 서열식별번호:117. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: 하기에서 제시된 아미노산 서열: 서열식별번호:118. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: 하기에서 제시된 아미노산 서열: 서열식별번호:119. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: 하기에서 제시된 아미노산 서열: 서열식별번호:120.

[0226] 하기의 아미노산 서열: 서열식별번호:114-120은 아래의 표 2B에서 제공된다:

표 2B

V133E 서열식별번호:114	GQPKAAPSVT LFPPSSEELQ ANKATL E CLI SDFYPGAVTV AWKADSSPVK AGVETTTTPSK QSNNKYAASS YLSLTPEQWK SHKSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS
V133S 서열식별번호:115	GQPKAAPSVT LFPPSSEELQ ANKATL S CLI SDFYPGAVTV AWKADSSPVK AGVETTTTPSK QSNNKYAASS YLSLTPEQWK SHKSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS
V133L 서열식별번호:116	GQPKAAPSVT LFPPSSEELQ ANKATL L CLI SDFYPGAVTV AWKADSSPVK AGVETTTTPSK QSNNKYAASS YLSLTPEQWK SHKSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS
V133W 서열식별번호:117	GQPKAAPSVT LFPPSSEELQ ANKATL W CLI SDFYPGAVTV AWKADSSPVK AGVETTTTPSK QSNNKYAASS YLSLTPEQWK SHKSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS
V133K 서열식별번호:118	GQPKAAPSVT LFPPSSEELQ ANKATL K CLI SDFYPGAVTV AWKADSSPVK AGVETTTTPSK QSNNKYAASS YLSLTPEQWK SHKSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS
V133R 서열식별번호:119	GQPKAAPSVT LFPPSSEELQ ANKATL R CLI SDFYPGAVTV AWKADSSPVK AGVETTTTPSK QSNNKYAASS YLSLTPEQWK SHKSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS
V133D 서열식별번호:120	GQPKAAPSVT LFPPSSEELQ ANKATL D CLI SDFYPGAVTV AWKADSSPVK AGVETTTTPSK QSNNKYAASS YLSLTPEQWK SHKSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS

[0227]

[0228] 카파 경쇄의 CL 도메인 중 아미노산 위치 133 (EU 넘버링)은 하기 중 아미노산 위치 27에 해당하는 람다 경쇄의 CL 도메인 중 아미노산 위치 133 (카밧 넘버링)에 해당한다: 서열식별번호:114-120.

[0229] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 IgG1 중쇄, IgG2 중쇄, IgG3 중쇄, 또는 IgG4 중쇄를 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호 에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 8. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호 에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 9. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호 에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 10. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호 에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 11. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호 에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 12. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호 에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 13. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호 에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 14. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호 에서 제시된 아

미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 15. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호 에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 16. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호 에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 101. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호 에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 102. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호 에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 121. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호 에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 122. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호 에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 123. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호 에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 124. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호 에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 125. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호 에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 126.

[0230] 하기의 아미노산 서열: 서열식별번호:8-16, 101-102, 및 121-126은 아래의 표 3에서 제공된다:

표 3

S183A 서열식별번호:8	TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTWSN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSL A SVVTVP SSSLGTQTYI CN
S183T 서열식별번호:9	TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTWSN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSL T SVVTVP SSSLGTQTYI CN
S183V 서열식별번호:10	TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTWSN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSL V SVVTVP SSSLGTQTYI CN
S183Y 서열식별번호:11	TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTWSN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSL Y SVVTVP SSSLGTQTYI CN
S183F 서열식별번호:12	TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTWSN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSL F SVVTVP SSSLGTQTYI CN
S183H 서열식별번호:13	TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTWSN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSL H SVVTVP SSSLGTQTYI CN
S183N 서열식별번호:14	TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTWSN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSL N SVVTVP SSSLGTQTYI CN
S183E IgG1 서열식별번호:15	TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTWSN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSL E SVVTVP SSSLGTQTYI CN
S183D 서열식별번호:16	TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTWSN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSL D SVVTVP SSSLGTQTYI CN
S183E IgG2 서열식별번호:121	TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTWSN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSL E SVVTVP SSNFGTQTYT CN
S183E IgG3 서열식별번호:122	TKGPSVFPLA PCSRSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTWSN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSL E SVVTVP SSSLGTQTYT CN
S183E IgG4 서열식별번호:123	TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTWSN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSL E SVVTVP SSSLGTKTYT CN
S183R 서열식별번호:101	TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTWSN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSL R SVVTVP SSSLGTQTYI CN
S183K IgG1	TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTWSN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL

[0231]

서열식별번호:102	YSL K SVVTVP SSSLGTQTYI CN
S183K IgG2 서열식별번호:124	TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTWSN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSL K SVVTVP SSNFGTQTYT CN
S183K IgG3 서열식별번호:125	TKGPSVFPLA PCSRSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTWSN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSL K SVVTVP SSSLGTQTYT CN
S183K IgG4 서열식별번호:126	TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTWSN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSL K SVVTVP SSSLGTKTYT CN

[0232]

[0233] IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4의 CH1 도메인 중 아미노산 위치 183은 하기 중 아미노산 위치 64에 해당한다: 서열

식별번호:8-16, 101-102, 및 121-126.

[0234]

하기의 모든 가능한 쌍으로 된 조합: 서열식별번호:1-7 또는 하기의 아미노산 11-116: 서열식별번호:1-7 및 114-120, 서열식별번호:8-15, 101-102, 및 121-126가 고려된다. 특정 구현예에서, 하기의 특정 조합: 서열식별번호:1-7 또는 하기의 아미노산 11-116: 서열식별번호:1-7 및 114-120, 서열식별번호:8-15 및 101 및 102가 고려된다. 그와 같은 조합은 아래의 표 4에서 제공된 것들을 비제한적으로 포함한다 (HC는 달리 나타내지 않는 한 IgG1 HC이다):

표 4

서열식별번호:16/ 서열식별번호:5* S183D/V133K 카파	서열식별번호:8/ 서열식별번호:5* S183A/V133K 카파	서열식별번호:9/ 서열식별번호:4* S183T/V133W 카파	서열식별번호:10/ 서열식별번호:3* S183V/V133L 카파
서열식별번호:15/ 서열식별번호:5* S183E/V133K IgG1/카파	서열식별번호:8/ 서열식별번호:6* S183A/V133R 카파	서열식별번호:9/ 서열식별번호:5* S183T/V133K 카파	서열식별번호:10/ 서열식별번호:4* S183V/V133W 카파
서열식별번호:8/ 서열식별번호:1* S183A/V133E 카파	서열식별번호:8/ 서열식별번호:7* S183A/V133D 카파	서열식별번호:9/ 서열식별번호:6* S183T/V133R 카파	서열식별번호:10/ 서열식별번호:5* S183V/V133K 카파
서열식별번호:8/ 서열식별번호:2* S183A/V133S 카파	서열식별번호:9/ 서열식별번호:1* S183T/V133E 카파	서열식별번호:9/ 서열식별번호:7* S183T/V133D 카파	서열식별번호:10/ 서열식별번호:6* S183V/V133R 카파
서열식별번호:8/ 서열식별번호:3* S183A/V133L 카파	서열식별번호:9/ 서열식별번호:2* S183T/V133S 카파	서열식별번호:10/ 서열식별번호:1* S183V/V133E 카파	서열식별번호:10/ 서열식별번호:7* S183V/V133D 카파
서열식별번호:8/ 서열식별번호:4* S183A/V133W 카파	서열식별번호:9/ 서열식별번호:3* S183T/V133L 카파	서열식별번호:10/ 서열식별번호:2* S183V/V133S 카파	서열식별번호:11/ 서열식별번호:1* S183Y/V133E 카파
서열식별번호:11/ 서열식별번호:2* S183Y/V133S 카파	서열식별번호:12/ 서열식별번호:1* S183F/V133E 카파	서열식별번호:12/ 서열식별번호:7* S183F/V133D 카파	서열식별번호:11/ 서열식별번호:3* S183Y/V133L 카파
서열식별번호:12/ 서열식별번호:2* S183F/V133S 카파	서열식별번호:13/ 서열식별번호:2* S183H/V133S 카파	서열식별번호:11/ 서열식별번호:4* S183Y/V133W 카파	서열식별번호:12/ 서열식별번호:3* S183F/V133L 카파
서열식별번호:13/ 서열식별번호:3* S183H/V133L 카파	서열식별번호:11/ 서열식별번호:5* S183Y/V133K 카파	서열식별번호:12/ 서열식별번호:4* S183F/V133W 카파	서열식별번호:13/ 서열식별번호:4* S183H/V133W 카파
서열식별번호:11/ 서열식별번호:6* S183Y/V133R 카파	서열식별번호:12/ 서열식별번호:5* S183F/V133K 카파	서열식별번호:14/ 서열식별번호:3* S183N/V133L 카파	서열식별번호:11/ 서열식별번호:7* S183Y/V133D 카파
서열식별번호:12/ 서열식별번호:6* S183F/V133R 카파	서열식별번호:15/ 서열식별번호:3* S183E/V133L 카파	서열식별번호:102/ 서열식별번호:1* S183K/V133E 카파	서열식별번호:9/ 서열식별번호:5* S183T/V133K 카파
서열식별번호:8/	서열식별번호:9/	서열식별번호:10/	서열식별번호:11/

[0235]

서열식별번호:114 S183A/V133E 람다	서열식별번호:114 S183T/V133E 람다	서열식별번호:114 S183V/V133E 람다	서열식별번호:114 S183Y/V133E 람다
서열식별번호:12/ 서열식별번호:114 S183F/V133E 람다	서열식별번호:102/ 서열식별번호:114 S183K/V133E IgG1/람다	서열식별번호:16/ 서열식별번호:118 S183D/V133K 람다	서열식별번호:8/ 서열식별번호:118 S183A/V133K 람다
서열식별번호:15/ 서열식별번호:118 S183E /V133K IgG1/람다	서열식별번호:9/ 서열식별번호:118 S183T/V133K 람다	서열식별번호:10/ 서열식별번호:118 S183V/V133K 람다	서열식별번호:11/ 서열식별번호:118 S183Y/V133K 람다
서열식별번호:12/ 서열식별번호:118 S183F/V133K 람다	서열식별번호:9/ 서열식별번호:118 S183T/V133K 람다	서열식별번호:121/ 서열식별번호:5 S183E/V133K IgG2/카파	서열식별번호:122/ 서열식별번호:5 S183E/V133K IgG3/카파
서열식별번호:123/ 서열식별번호:5 S183E/V133K IgG4/카파	서열식별번호:121/ 서열식별번호:118 S183E /V133K IgG2/람다	서열식별번호:122/ 서열식별번호:118 S183E /V133K IgG3/람다	서열식별번호:123/ 서열식별번호:118 S183E /V133K IgG4/람다
서열식별번호:124/ 서열식별번호:1 S183K/V133E IgG2/카파	서열식별번호:125/ 서열식별번호:1 S183K/V133E IgG3/카파	서열식별번호:126/ 서열식별번호:1 S183K/V133E IgG4/카파	서열식별번호:124/ 서열식별번호:114 S183K/V133E IgG2/람다
서열식별번호:125/ 서열식별번호:114 S183K/V133E IgG3/람다	서열식별번호:126/ 서열식별번호:114 S183K/V133E IgG4/람다		

* 또는 대응하는 서열의 아미노산 11-116

[0236]

[0237]

표 4에서의 각 쌍 중 제1 서열목록번호는 CH1 도메인 서열을 지칭하고, 표 4에서의 각 쌍 중 제2 서열목록번호는 CL 도메인 서열을 지칭한다.

[0238]

용어들 "H1" 및 "H2"은 임의의 지정이고 구현예 중 임의의 것에서의 "H1" 및 "H2"가 역전될 수 있다는 것은 당해 분야의 숙련자에게 분명할 것이다. 즉, H1의 CH1 도메인 및 L1의 CL 도메인 내에 있는 것으로 상기에서 기재된 돌연변이 중 임의의 것은, 대안적으로, 상기 H2의 CH1 도메인 및 L2의 CL 도메인 내에 있을 수 있다.

[0239]

특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 CH1/CL 돌연변이를 포함하고, 돌연변이 없는 다중특이적 항원-결합 단백질 또는 돌연변이 없는 각 친계 단일특이적 항원-결합 단백질과 비교할만하거나 더 우수한 교정 단백질 폴딩 및/또는 발현 수준을 입증한다.

[0240]

특정 구현예에서, 상기 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 CH1 도메인 및 L2의 CL 도메인은 아미노산 치환을 포함하지 않는다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 CH1은 S183 (EU 넘버링)에서의 치환을 포함하지 않고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 CL은 V133 (EU 넘버링)에서의 치환을 포함하지 않는다.

[0241]

특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1이 유도되는 친계 H1은 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1이 유도되는 친계 L1에 대한 상당한 선호를 나타내지 않는다. 특정 구현예에서, 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1이 유도되는 친계 H1은 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1이 유도되는 친계 L1에 대한 선호를 나타낸다.

[0242]

용어들 "H1" 및 "H2"은 임의의 지정이고 구현예 중 임의의 것에서의 "H1" 및 "H2"가 역전될 수 있다는 것은 당해 분야의 숙련자에게 분명할 것이다. 즉, H1의 CH1 도메인 및 L1의 CL 도메인 내에 있는 것으로 상기에서 기재된 돌연변이 중 임의의 것은, 대안적으로, 상기 H2의 CH1 도메인 및 L2의 CL 도메인 내에 있을 수 있다.

[0243]

전략 #2

[0244]

컴퓨터-유도된 및 인간-유도된 설계에 의해 도움을 받은 제2 전략을 사용하여, 출원인은 중쇄의 CH1 도메인 및 경쇄의 CL 도메인의 상호작용 표면을 재설계하여 서로 입체적으로 양립가능한 (예컨대 형태적으로 양립가능한) CH1/CL 돌연변이체 쌍을 생성한다. 각 CH1/CL 돌연변이체 쌍 중 변형된 CH1 도메인은 야생형 CL과 덜 입체적으

로 양립가능하고 (예컨대 형태적으로 양립가능하고), 야생형 CL에 대한 감소된 짝짓기를 입증한다. 상응하여, 각 CH1/CL 돌연변이체 쌍 중 변형된 CL 도메인은 야생형 CH1과 덜 입체적으로 양립가능하고 (예컨대 형태적으로 양립가능하고), 야생형 CH1에 대한 감소된 짝짓기를 입증한다. CH1 및 CL 도메인의 계면에서의 변형을 포함하는 Fabs의 Tm이 CH1/CL 도메인 중 대응하는 돌연변이가 없는 Fabs의 Tm과 동일하거나 실질적으로 동일했다는 것을 놀랍게도 발견했다.

[0245] 아래에 기재된 설계 전략을 사용하여 확인된 돌연변이는 상기에서 논의된 S183/V133 돌연변이에 독립적으로 또는 그것에 추가하여 사용될 수 있다 (즉, 전략 #1).

[0246] 제1 접근법 (즉, "접근법 A")에서, 1개 이상의 아미노산 치환 돌연변이는 경쇄의 CL 도메인에 도입되어 CH1 도메인과 상호작용하는 CL 도메인의 표면 상의 "늪" (또는 돌출부)를 만들었다. 상응하여, 1개 이상의 아미노산 치환 돌연변이는 중쇄의 CH1 도메인에 도입되어 CL 도메인과 상호작용하는 CH1 도메인의 표면의 "홀" (또는 공동)을 만들었다. 참고, 예를 들면, 도 11A. 특정 구현예에서, 변형된 CH1/CL 서열을 포함하는 다중특이적 항원-결합 단백질은 CH1 및 CL 도메인 중 아미노산 치환 돌연변이과의 중쇄 및 경쇄의 우선적인 짝짓기를 초래한다. 특정 구현예에서, 변형된 CH1/CL 서열을 포함하는 다중특이적 항원-결합 단백질은 대응하는 CH1/CL 돌연변이가 없는 다중특이적 항원-결합 단백질과 비교하여 증가된 단백질 발현 수준을 입증한다. 특정 구현예에서, 치환된 아미노산(들)은 하전된 잔기(들)로 치환되지 않는다.

[0247] 제2 접근법 (즉, "접근법 B")에서, 2개 이상의 아미노산 치환 돌연변이는 경쇄의 CL 도메인에 도입되어 CH1 도메인과 상호작용하는 CL 도메인의 표면 상의 "늪" (또는 돌출부) 및 "홀" (또는 공동)을 만들었다. 상응하여, 2종 이상의 돌연변이는 중쇄의 CH1 도메인에 도입되어 CL 도메인과 상호작용하는 CH1 도메인의 표면 상의 "홀" 및 "늪"를 만들었다. 참고, 예를 들면, 도 11B. 특정 구현예에서, 변형된 CH1/CL 서열을 포함하는 다중특이적 항원-결합 단백질은 CH1 및 CL 도메인 중 아미노산 치환 돌연변이와의 중쇄 및 경쇄의 우선적인 짝짓기를 나타낸다. 특정 구현예에서, 변형된 CH1/CL 서열을 포함하는 다중특이적 항원-결합 단백질은 대응하는 CH1/CL 돌연변이가 없는 다중특이적 항원-결합 단백질과 비교하여 증가된 단백질 발현을 나타낸다. 특정 구현예에서, 치환된 아미노산(들)은 하전된 잔기(들)로 치환되지 않는다.

[0248] 변형된 H1의 CH1 도메인 및 변형된 L1의 CL 도메인을 포함하는 다중특이적 항원-결합 단백질은 중쇄/경쇄 짝짓기에 관해 개선된 안정성 및 개선된 특이성을 입증한다. 하기를 포함하는 다중특이적 항원-결합 단백질이 본 명세서에서 제공된다: a) 제1 항원에 결합할 수 있는 제1 중쇄/경쇄 쌍으로서, 제1 중쇄 폴리펩타이드 (H1) 및 제1 경쇄 폴리펩타이드 (L1)를 포함하는 제1 중쇄/경쇄 쌍, 및 b) 제2 항원에 결합할 수 있는 제2 중쇄/경쇄 쌍으로서, 제2 중쇄 폴리펩타이드 (H2) 및 제2 경쇄 폴리펩타이드 (L2)를 포함하는 제2 중쇄/경쇄 쌍, 여기서 각 H1 및 H2는 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 중쇄 불변 도메인 (CH1)를 포함하고, 그리고 각 L1 및 L2는 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 경쇄 불변 도메인 (CL)을 포함하고; 상기 H1의 CH1 도메인은 위치 F170 (EU 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함하고, 그리고 상기 CL 도메인은 위치 S176 (EU 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함한다. 특정 구현예에서, 제1 항원 및 제2 항원은 동일하다. 특정 구현예에서, 제1 중쇄/경쇄 쌍 및 상기 제2 중쇄/경쇄 쌍 각각은 동일한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합한다. 특정 구현예에서, 제1 항원 및 제2 항원은 상이하다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 CH1 도메인은 추가로, 하기로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환을 포함한다: A141, S181, S183, 및 V185 (모든 EU 넘버링). 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 CL 도메인은 추가로, F116, S131, V133, L135, S162, S174, 및 T178 (모든 EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 CL 도메인은 추가로, F116, V133, L135, S162, S174, 및 T178 (모든 EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 CL 도메인은 추가로, F116, S131, L135, S162, S174, 및 T178 (모든 EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 CL 도메인은 추가로, F116, L135, S174, 및 T178 (모든 EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 CL 도메인은 추가로, F116, L135, S162, S174, 및 T178 (모든 EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 특정 구현예에서, 아미노산 치환은 입체 상보성을 초래한다. 특정 구현예에서, 아미노산 치환은 형태적 상보성을 초래한다. 특정 구현예에서, 치환된 아미노산(들)은 하전된 잔기(들)로 치환되지 않는다.

[0249] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 CH1 도메인은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하고 (예컨대 그것으로 구성되거나 본질적으로 구성된다): A141 및 F170 (모든 EU 넘버링). 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 CL 도메인은 F116, L135, S176, 및 T178 (모든

V185 (모든 EU 넘버링). 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 CL 도메인은 F116, L135, S176, 및 T178 (모든 EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 특정 구현예에서, 아미노산 치환은 입체 상보성을 초래한다. 특정 구현예에서, 아미노산 치환은 형태적 상보성을 초래한다.

[0259] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 CH1 도메인은 A141, F170, S181, 및 S183 (모든 EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하고 (예컨대 그것으로 구성되거나 본질적으로 구성된다). 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 CL 도메인은 F116, L135, S174, 및 S176 (모든 EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 특정 구현예에서, 아미노산 치환은 입체 상보성을 초래한다. 특정 구현예에서, 아미노산 치환은 형태적 상보성을 초래한다.

[0260] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 CH1 도메인은 상기 아미노산 치환 F170 (EU 넘버링)을 포함하고 (예컨대 그것으로 구성되거나 본질적으로 구성된다). 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 CL 도메인은 F116, L135, S176, 및 T178 (모든 EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 특정 구현예에서, 아미노산 치환은 입체 상보성을 초래한다. 특정 구현예에서, 아미노산 치환은 형태적 상보성을 초래한다.

[0261] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 CH1 도메인은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하고 (예컨대 그것으로 구성되거나 본질적으로 구성된다): A141 F170, 및 V185 (EU 넘버링). 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 CL 도메인은 F116 및 S176 돌연변이 (모든 EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 특정 구현예에서, 아미노산 치환은 형태적 상보성을 초래한다.

[0262] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 CH1 도메인은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하고 (예컨대 그것으로 구성되거나 본질적으로 구성된다): A141, F170, 및 S183 (EU 넘버링). 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 CL 도메인은 F116 및 S176 돌연변이 (모든 EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 특정 구현예에서, 아미노산 치환은 형태적 상보성을 초래한다.

[0263] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 CH1 도메인은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하고 (예컨대 그것으로 구성되거나 본질적으로 구성된다): F170 및 V185 (EU 넘버링). 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 CL 도메인은 F116 및 S176 돌연변이 (모든 EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 특정 구현예에서, 아미노산 치환은 형태적 상보성을 초래한다.

[0264] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 CH1 도메인 및 L1의 CL 도메인은, CH1/CL 계면 내에서, CH1 도메인의 1종 이상의 아미노산 잔기가 더 큰 측쇄 용적을 갖는 아미노산 잔기, 일부 또는 모두의 동등한 수로 치환되도록 변경되고, 이로써 CH1 도메인의 표면 상에 돌출부를 생성하고, 그리고 상기 CL 도메인의 1종 이상의 아미노산 잔기는, 더 작은 측쇄 용적을 갖는 아미노산 잔기, 일부 또는 모두의 동등한 수로 치환되고, 이로써 CL 도메인의 표면 상에 공동을 생성한다. 특정 구현예에서, CH1 및 CL 도메인에 대한 변형은 CH1/CL 계면에서 입체 상보성을 제공한다. 특정 구현예에서, CH1 및 CL 도메인에 대한 변형은 CH1/CL 계면에서 형태적 상보성을 제공한다.

[0265] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 CH1 도메인 및 L1의 CL 도메인은, CH1/CL 계면 내에서, 상기 CL 도메인의 1종 이상의 아미노산 잔기가 더 큰 측쇄 용적을 갖는 아미노산 잔기인 수로 치환되도록 변경되고, 일부 또는 모두의 동등한 수, 이로써 CL 도메인의 표면 상에 돌출부를 생성하고, 그리고 CH1 도메인의 1종 이상의 아미노산 잔기는 더 작은 측쇄 용적을 갖는 아미노산 잔기, 일부 또는 모두의 동등한 수로 치환되고, 이로써 CH1 도메인의 표면 상에 공동을 생성하고. 특정 구현예에서, CL 도메인의 1종 이상의 치환된 아미노산 잔기는 S176을 포함한다. 특정 구현예에서, CH1 도메인의 1종 이상의 치환된 아미노산 잔기는 F170을 포함한다. 특정 구현예에서, CH1 및 CL 도메인에 대한 변형은 계면에서 입체 상보성을 제공한다. 특정 구현예에서, CH1 및 CL 도메인에 대한 변형은 계면에서 형태적 상보성을 제공한다.

[0266] 특정 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 F170S 및 F170A (EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 치환을 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 S176F (EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 치환을 포함한다.

- [0267] 특정 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 F170S 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하고, 그리고 L1의 CL 도메인은 S176F 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함한다. 특정 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 F170A 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하고, 그리고 L1의 CL 도메인은 S176F 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함한다.
- [0268] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 A141I, F170S, S181M, S183V, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) H1의 CH1 도메인, 및 F116A, V133I, L135V, S162M, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) L1의 CL 도메인을 포함한다.
- [0269] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) H1의 CH1 도메인 및 F116A, S131D, L135V, S162A, S174A, S176F, 및 T178I 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) L1의 CL 도메인을 포함한다.
- [0270] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) H1의 CH1 도메인 및 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) L1의 CL 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링)로 구성되는 (예컨대 본질적으로 구성되는) H1의 CH1 도메인 및 하기로 구성되는 (예컨대 본질적으로 구성되는) L1의 CL 도메인: F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함한다.
- [0271] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 A141I, F170A, S181M, S183V, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) H1의 CH1 도메인 및 F116A, L135V, S162M, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) L1의 CL 도메인을 포함한다.
- [0272] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) H1의 CH1 도메인 및 L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) L1의 CL 도메인을 포함한다.
- [0273] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 A141I, F170S, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) H1의 CH1 도메인 및 F116A, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) L1의 CL 도메인을 포함한다.
- [0274] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 A141I, F170S, S181M, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) H1의 CH1 도메인 및 F116A, L135V, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) L1의 CL 도메인을 포함한다.
- [0275] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 A141I, F170S, S181M, 및 S183A 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) H1의 CH1 도메인 및 F116A, L135V, S174A, 및 S176F 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) L1의 CL 도메인을 포함한다.
- [0276] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 F170S, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) H1의 CH1 도메인 및 F116A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) L1의 CL 도메인을 포함한다.
- [0277] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 F170S, S181M, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) H1의 CH1 도메인 및 F116A, L135V, 및 S176F 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) L1의 CL 도메인을 포함한다.

버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) L1의 CL 도메인을 포함한다.

- [0288] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 A141I 및 F170S 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) H1의 CH1 도메인 및 F116A 및 S176F 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) L1의 CL 도메인을 포함한다.
- [0289] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 F170S 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) H1의 CH1 도메인, 및 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) L1의 CL 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)를 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함한다.
- [0290] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 F170S 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) H1의 CH1 도메인, 및 F116A, L135V, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) L1의 CL 도메인을 포함한다.
- [0291] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 F170S 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) H1의 CH1 도메인 및 F116A, L135V, S174A, 및 S176F 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) L1의 CL 도메인을 포함한다.
- [0292] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 F170S 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) H1의 CH1 도메인 및 F116A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) L1의 CL 도메인을 포함한다.
- [0293] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 F170S 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) H1의 CH1 도메인 및 F116A, L135V, 및 S176F 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) L1의 CL 도메인을 포함한다.
- [0294] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 F170S 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) H1의 CH1 도메인 및 F116A 및 S176F 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) L1의 CL 도메인을 포함한다.
- [0295] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이하, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하, 또는 5개 이하의 아미노산 돌연변이를 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: A141I, F170S, S181M, S183V, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링).
- [0296] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이하, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하, 또는 5개 이하의 아미노산 돌연변이를 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링).
- [0297] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이하, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하, 또는 5개 이하의 아미노산 돌연변이로 구성된 H1의 CH1 도메인을 포함한다: A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링).
- [0298] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이하, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하, 또는 5개 이하의 아미노산 돌연변이를 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: A141I, F170A, S181M, S183V, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링).
- [0299] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이하, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하, 5개 이하, 6개 이하, 또는 7개 이하의 아미노산 돌연변이를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: F116A, V133I, L135V, S162M, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링).

- [0300] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이하, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하, 5개 이하, 6개 이하, 또는 7개 이하의 아미노산 돌연변이를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: F116A, S131D, L135V, S162A, S174A, S176F, 및 T178I 돌연변이 (EU 넘버링).
- [0301] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이하, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하, 또는 5개 이하의 아미노산 돌연변이를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링).
- [0302] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이하, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하, 또는 5개 이하의 아미노산 돌연변이로 구성된 L1의 CL 도메인을 포함한다: F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링).
- [0303] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이하, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하, 5개 이하, 또는 6개 이하의 아미노산 돌연변이를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: F116A, L135V, S162M, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링).
- [0304] 상기에서 기재된 CH1 도메인 및 L1 도메인의 모든 가능한 쌍으로 된 조합이 고려된다.
- [0305] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 카파 경쇄를 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기 중 임의의 것에서 제시된 바와 같이 CL 도메인을 포함하는 제1 경쇄 폴리펩타이드 L1을 포함한다: 서열식별번호:17-27. 하기에서 제시된 CL 도메인: 서열식별번호:54는 하기의 서열식별번호 의 아미노산 11-116에 해당한다: 17-27. 따라서, L1은 하기의 서열식별번호 중 임의의 것에서 제시된 바와 같이 아미노산 11-116을 포함하는 CL 도메인을 포함할 수 있다: 17-27. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: 하기에서 제시된 아미노산 서열: 서열식별번호:17 또는 하기에서 제시된 서열 중 아미노산 11-116: 서열식별번호:17. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: 하기에서 제시된 아미노산 서열: 서열식별번호:18 또는 하기에서 제시된 서열 중 아미노산 11-116: 서열식별번호:18. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: 하기에서 제시된 아미노산 서열: 서열식별번호:19 또는 하기에서 제시된 서열 중 아미노산 11-116: 서열식별번호:19. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: 하기에서 제시된 아미노산 서열: 서열식별번호:20 또는 하기에서 제시된 서열 중 아미노산 11-116: 서열식별번호:20. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: 하기에서 제시된 아미노산 서열: 서열식별번호:21 또는 하기에서 제시된 서열 중 아미노산 11-116: 서열식별번호:21. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: 하기에서 제시된 아미노산 서열: 서열식별번호:22 또는 하기에서 제시된 서열 중 아미노산 11-116: 서열식별번호:22. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: 하기에서 제시된 아미노산 서열: 서열식별번호:23 또는 하기에서 제시된 서열 중 아미노산 11-116: 서열식별번호:23. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: 하기에서 제시된 아미노산 서열: 서열식별번호:24 또는 하기에서 제시된 서열 중 아미노산 11-116: 서열식별번호:24. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: 하기에서 제시된 아미노산 서열: 서열식별번호:25 또는 하기에서 제시된 서열 중 아미노산 11-116: 서열식별번호:25. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: 하기에서 제시된 아미노산 서열: 서열식별번호:26 또는 하기에서 제시된 서열 중 아미노산 11-116: 서열식별번호:26. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: 하기에서 제시된 아미노산 서열: 서열식별번호:27 또는 하기에서 제시된 서열 중 아미노산 11-116: 서열식별번호:27.
- [0306] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 람다 경쇄를 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: 하기에서 제시된 아미노산 서열: 서열식별번호:127.
- [0307] 하기의 아미노산 서열: 서열식별번호:17-27 및 127은 아래의 표 5에서 제공된다 (LC는 달리 나타내지 않는 한 카파 LC이다):

표 5

YS08 LC 서열식별번호:17	GQGTKVEIKR TVAAPSV A IF PPSDEQLKSG TASV I CVLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQE M VTEQDS KDSTY A L F S V LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
YS18 LC 서열식별번호:18	GQGTKVEIKR TVAAPSV A IF PPSDEQLKSG TAD V V C VLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQE A VTEQDS KDSTY A L F S I LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
YT65 LC 카파 서열식별번호:19	GQGTKVEIKR TVAAPSV A IF PPSDEQLKSG TASV V CVLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTY A L F S V LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
YT65.1 LC 서열식별번호:20	GQGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASV V CVLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTY A L F S V LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
YT65.2 LC 서열식별번호:21	GQGTKVEIKR TVAAPSV A IF PPSDEQLKSG TASV V CLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTY A L F S V LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
YT65.3 LC 서열식별번호:22	GQGTKVEIKR TVAAPSV A IF PPSDEQLKSG TASV V CVLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSL F S V LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
YT65.4 LC 서열식별번호:23	GQGTKVEIKR TVAAPSV A IF PPSDEQLKSG TASV V CVLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTY A L F ST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
YT65.5 LC 서열식별번호:24	GQGTKVEIKR TVAAPSV A IF PPSDEQLKSG TASV V CLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSL F S V LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
YT65.6 LC 서열식별번호:25	GQGTKVEIKR TVAAPSV A IF PPSDEQLKSG TASV V CVLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSL F ST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
YT65.7 LC 서열식별번호:26	GQGTKVEIKR TVAAPSV A IF PPSDEQLKSG TASV V CLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSL F ST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
YT34 LC 서열식별번호:27	GQGTKVEIKR TVAAPSV A IF PPSDEQLKSG TASV V CVLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQE M VTEQDS KDSTY A L F S V LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
YT65 람다 서열식별번호:127	GQPKAAPSV A LFPPSSEELQ ANKATLV C VI SDFYFGAVTV AWKADSSSPVK AGVETTTPSK QSNK Y A A F S V LSLTPEQW SHKSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS

[0308]

[0309]

CL (EU 넘버링) 중 아미노산 위치 116, 118, 131, 133, 135, 162, 164, 174, 176, 및 178은 아래의 서열식별번호에서 아미노산 위치 18, 20, 33, 35, 37, 64, 66, 76, 78, 및 80에 해당한다: 17-27, 각각. 카파 사슬의 CL 도메인 중 아미노산 위치 116, 118, 131, 133, 135, 162, 164, 174, 176, 및 178 (EU 넘버링)은 람다 경쇄의 CL 도메인 중 아미노산 위치 116, 118, 131, 133, 135, 162, 164, 174, 176, 및 178 (카바트 넘버링)에 해당한다. 람다 경쇄의 CL 도메인 중 아미노산 위치 116, 118, 131, 133, 135, 162, 164, 174, 176, 및 178 (카바트 넘버링)은 하기 중 아미노산 위치 10, 12, 25, 27, 29, 56, 59, 67, 69, 및 71에 해당한다: 서열식별번호:127, 각각.

[0310]

특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 중쇄를 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 28. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 29. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 31. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 32. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 33. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 34. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 35. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 36. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 37. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 38. 특

정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호 에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 39. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호 에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 40. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호 에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 41. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호 에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 42. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호 에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 43. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호 에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 44. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호 에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 103. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호 에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 104. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호 에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 105.

[0311] 하기의 아미노산 서열: 서열식별번호:28-44은 아래의 표 6에서 제공된다 (HC은 달리 나타내지 않는 한 IgG1 아이소타입이다):

표 6

YS08 HC 서열식별번호:28	TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AILGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT SPAVLQSSGL YMLVSAVTVP SSSLGTQTYI CN
YS18 HC/ YT65 HC IgG1 서열식별번호:29	TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AILGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT SPAVLQSSGL YMLASA VTVP SSSLGTQTYI CN
YS18 HC/ YT65 HC IgG2 서열식별번호:103	TKGPSVFPLA PCRSSTSEST AILGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT SPAVLQSSGL YMLASA VTVP SSNFGTQTYT CN
YS18 HC/ YT65 HC IgG3 서열식별번호:104	TKGPSVFPLA PCRSSTSGGT AILGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT SPAVLQSSGL YMLASA VTVP SSSLGTQTYT CN
YS18 HC/ YT65 HC IgG4 서열식별번호:105	TKGPSVFPLA PCRSSTSEST AILGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT SPAVLQSSGL YMLASA VTVP SSSLGTQTYT CN
YT65.1 HC 서열식별번호:31	TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT SPAVLQSSGL YMLASA VTVP SSSLGTQTYI CN
YT65.2 HC 서열식별번호:32	TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AILGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT SPAVLQSSGL YSLASA VTVP SSSLGTQTYI CN
YT65.3 HC 서열식별번호:33	TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AILGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT SPAVLQSSGL YMLSSA VTVP SSSLGTQTYI CN
YT65.4 HC 서열식별번호:34	TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AILGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT SPAVLQSSGL YMLASVVTVP SSSLGTQTYI CN
YT65.5 HC 서열식별번호:35	TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT SPAVLQSSGL YSLASA VTVP SSSLGTQTYI CN
YT65.6 HC 서열식별번호:36	TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT SPAVLQSSGL YMLSSA VTVP SSSLGTQTYI CN
YT65.7 HC 서열식별번호:37	TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT SPAVLQSSGL YMLASA VTVP SSSLGTQTYI CN

[0312]

YT65.8 HC 서열식별번호:38	TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT A <u>I</u> LGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT <u>S</u> PAVLQSSGL YSLSS <u>A</u> VTVP SSSLGTQTYI CN
YT65.9 HC 서열식별번호:39	TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT A <u>I</u> LGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT <u>S</u> PAVLQSSGL YSL <u>A</u> SVVTVF SSSLGTQTYI CN
YT65.10 HC 서열식별번호:40	TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT A <u>I</u> LGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT <u>S</u> PAVLQSSGL Y <u>M</u> LSSVTVF SSSLGTQTYI CN
YT65.11 HC 서열식별번호:41	TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT <u>S</u> PAVLQSSGL YSLSS <u>A</u> VTVP SSSLGTQTYI CN
YT65.12 HC 서열식별번호:42	TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT A <u>I</u> LGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT <u>S</u> PAVLQSSGL YSLSSVTVF SSSLGTQTYI CN
YT65.13 HC 서열식별번호:43	TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT <u>S</u> PAVLQSSGL YSLSSVTVF SSSLGTQTYI CN
YT34 HC 서열식별번호:44	TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT A <u>I</u> LGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT <u>A</u> PAVLQSSGL Y <u>M</u> L <u>V</u> S <u>A</u> VTVP SSSLGTQTYI CN

[0313]

[0314]

CH1 중 아미노산 위치 141, 170, 181, 183, 및 185 (EU 넘버링)은 하기의 서열식별번호 의 아미노산 위치 22, 51, 62, 64, 및 66에 해당한다: 28-44 및 103-105, 각각.

[0315]

하기의 모든 가능한 쌍으로 된 조합: 서열식별번호:17-27 또는 하기의 아미노산 11-116: 서열식별번호:17-27 및 127 및 서열식별번호:28-44 및 103-105(상기에 기재됨)이 고려된다. 특정 구현예에서, 하기의 특정 조합: 서열식별번호:17-27 또는 하기의 아미노산 11-116: 서열식별번호:17-27 및 127 및 서열식별번호:28-44 및 103-105가 고려된다. 그와 같은 조합은 아래의 표 7에서 제공된 것들을 비제한적으로 포함한다:

표 7

서열식별번호: 28/ 서열식별번호: 17* YS08HC/YS08LC	서열식별번호: 40 /서열식별번호: 19* YT65.10HC/YT65LC	서열식별번호: 36/서열식 별번호: 25* YT65.6HC/YT65.6LC
서열식별번호: 29/ 서열식별번호: 18* YS18HC/YS18LC	서열식별번호: 42/ 서열식별번호: 19* YT65.12HC/YT65LC	서열식별번호: 32/ 서열식별번호: 21* YT65.2HC/YT65.2LC
서열식별번호: 29/ 서열식별번호: 19* YT65HC/YT65LC IgG1/카파	서열식별번호: 43/ 서열식별번호: 19* YT65.13HC/YT65LC	서열식별번호: 43/ 서열식별번호: 22* YT65.13HC/YT65.3LC
서열식별번호: 34/ 서열식별번호: 23* YT65.4HC/YT65.4LC	서열식별번호: 44/ 서열식별번호: 27* YT34HC/YT34LC	서열식별번호: 37/ 서열식별번호: 26* YT65.7HC/YT65.7LC
서열식별번호: 35/ 서열식별번호: 24* YT65.5HC/YT65.5LC	서열식별번호: 31/ 서열식별번호: 20* YT65.1HC/YT65.1 LC	서열식별번호: 33/ 서열식별번호: 22* YT65.3HC/YT65.3LC
서열식별번호: 42/ 서열식별번호: 22 YT65.12HC/YT65.3LC	서열식별번호: 38/ 서열식별번호: 26 YT65.8HC/YT65.7LC	서열식별번호: 39/ 서열식별번호: 26 YT65.9HC/YT65.7LC
서열식별번호: 41/ 서열식별번호: 26 YT65.11HC /YT65.7LC	서열식별번호: 103/ 서열식별번호: 19 YT65HC/YT65LC IgG2/카파	서열식별번호: 104/ 서열식별번호: 19 YT65HC IgG3/YT65LC IgG3/카파
서열식별번호: 105/ 서열식별번호: 19 YT65HC/YT65LC IgG4/카파	서열식별번호: 29/ 서열식별번호: 127 YT65HC/YT65LC IgG1/람다	서열식별번호: 103/ 서열식별번호: 127 YT65HC/YT65LC IgG2/카파
서열식별번호: 104/ 서열식별번호: 127 YT65HC IgG3/YT65LC IgG3/카파	서열식별번호: 105/ 서열식별번호: 127 YT65HC/YT65LC IgG4/람다	

* 또는 대응하는 서열의 아미노산 11-116

[0316]

[0317]

표 7 중 각 쌍에서의 제1 서열목록번호 는 CH1 도메인 서열을 지칭하고, 그리고 표 7 중 각 쌍에서의 제2 서열 목록번호 는 CL 도메인 서열을 지칭한다.

[0318]

관련된 측면에서, 하기를 포함하는 다중특이적 항원 결합 단백질이 제공된다: a) 제1 항원에 결합할 수 있는 제 1 중쇄/경쇄 쌍, 제1 중쇄 서열 (H1) 및 제1 경쇄 서열 (L1)을 포함하는 제1 중쇄/경쇄 쌍, 및 b) 제2 중쇄 서열 (H2) 및 제2 경쇄 서열 (L2)을 포함하는 제2 중쇄/경쇄 쌍, 여기서 각 H1 및 H2는 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 중쇄 불변 도메인 (CH1)를 포함하고, 그리고 각 L1 및 L2는 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 경쇄 불변 도메인 (CL)을 포함하고; 상기 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 CH1 도메인 및 L1의 CL 도메인은, CH1/CL 계면 내에서, CH1 도메인의 1종 이상의 아미노산 잔기가 아미노산 잔기, 더 큰 측쇄 용적을 갖는 일부 및 더 작은 측쇄 용적을 갖는 일부의 동등한 수로 치환되도록 변경되고, 이로써 CH1 도메인의 표면 상에 공동 및 돌출부를 생성하고, 그리고 상기 CL 도메인의 1종 이상의 아미노산 잔기가 아미노산 잔기, 더 작은 측쇄 용적을 갖는 일부 및 더 큰 측쇄 용적을 갖는 일부의 동등한 수로 치환되도록 변경되고, 이로써 CL 도메인의 표면 상에 공동 및 돌출부를 생성한다. 특정 구현예에서, CH1 및 CL 도메인에 대한 변형은 계면에서 입체 상보성 (예컨대 형태적 상보성)을 제공한다.

[0319]

특정 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 위치 L128에서 아미노산 치환을 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은

위치 F118 및 L135 (EU 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함한다. 특정 구현예에서, 제1 항원 및 제2 항원은 동일하다. 특정 구현예에서, 제1 중쇄/경쇄 쌍 및 상기 제2 중쇄/경쇄 쌍 각각은 동일한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합한다. 특정 구현예에서, 제1 항원 및 제2 항원은 상이하다. 특정 구현예에서, H1의 CH1 도메인은 위치 L128 및 V185 (EU 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함하고, 그리고 상기 L1의 CL 도메인은 위치 F118 및 L135 (EU 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함한다. 특정 구현예에서, 제1 항원 및 제2 항원은 동일하다. 특정 구현예에서, 제1 중쇄/경쇄 쌍 및 상기 제2 중쇄/경쇄 쌍 각각은 동일한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합한다. 특정 구현예에서, 제1 항원 및 제2 항원은 상이하다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 CH1 도메인은 추가로, 하기로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환을 포함한다: A141, F170, S181, 및 S183 (모든 EU 넘버링). 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 CL 도메인은 추가로, S131, V133, S162, S176 및 T178 (모든 EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 특정 구현예에서, 아미노산 치환은 야생형 서열과 비교할만하거나 더 큰 입체 상보성 (예컨대 형태적 상보성)을 초래한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 CL 도메인은 추가로, S131, V133, S162, T164, S176 및 T178 (모든 EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환을 포함한다.

[0320] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 F128, A141, F170, S181, 및 S183 (EU 넘버링)로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) H1의 CH1 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 V118, S131, V133, S135, S162, T164, S176 및 T178 (EU 넘버링)로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) L1의 CL 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, 아미노산 치환은 야생형 서열과 비교할만하거나 더 큰 입체 상보성 (예컨대 형태적 상보성)을 초래한다.

[0321] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 F128, A141, F170, S181, S183, 및 V185 (EU 넘버링)으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) H1의 CH1 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 V118, S131, V133, S135, S162, T164, S176 및 T178 (EU 넘버링)로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) L1의 CL 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, 아미노산 치환은 야생형 서열과 비교할만하거나 더 큰 입체 상보성 (예컨대 형태적 상보성)을 초래한다.

[0322] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 F128, A141, F170, S181, S183, 및 V185 (EU 넘버링)으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) H1의 CH1 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 V118, S131, V133, S135, S162, S176 및 T178 (EU 넘버링)로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) L1의 CL 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, 아미노산 치환은 야생형 서열과 비교할만하거나 더 큰 입체 상보성 (예컨대 형태적 상보성)을 초래한다.

[0323] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 L128F, A141M, F170M, S181I 및 S183A 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) H1의 CH1 도메인 및 F118V, S131T, V133A, L135Y, S162A, T164S, S176M, 및 T178L 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) L1의 CL 도메인을 포함한다.

[0324] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 L128F, A141M, F170Y, S181I, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) H1의 CH1 도메인 및 F118V, S131T, V133A, L135F, S162A, S176A, 및 T178L 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) L1의 CL 도메인을 포함한다.

[0325] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 L128F, A141T, F170M, S181T, S183A, 및 V185L 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) H1의 CH1 도메인 및 F118V, S131T, V133A, L135F, S162A, T164S, S176T, 및 T178L 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) L1의 CL 도메인을 포함한다.

[0326] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 L128F, A141M, F170M, S181T, 및 S183A 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) H1의 CH1 도메인, 및 하기를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) L1의 CL 도메인: F118V, S131T, V133A, L135F, S162M, T164S, S176M, 및 T178L 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함한다.

- [0327] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이하, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하, 또는 5개 이하의 아미노산 돌연변이를 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: L128F, A141M, F170M, S181I 및 S183A 돌연변이 (EU 넘버링).
- [0328] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이하, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하, 5개 이하, 또는 6개 이하의 아미노산 돌연변이를 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: L128F, A141M, F170Y, S181I, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링).
- [0329] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이하, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하, 5개 이하, 또는 6개 이하의 아미노산 돌연변이를 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: L128F, A141T, F170M, S181T, S183A, 및 V185L 돌연변이 (EU 넘버링).
- [0330] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이하, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하, 또는 5개 이하의 아미노산 돌연변이를 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: L128F, A141M, F170M, S181T, 및 S183A 돌연변이 (EU 넘버링).
- [0331] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이하, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하, 5개 이하, 6개 이하, 7개 이하, 또는 8개 이하의 아미노산 돌연변이를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: F118V, S131T, V133A, L135Y, S162A, T164S, S176M, 및 T178L 돌연변이 (EU 넘버링).
- [0332] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이하, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하, 5개 이하, 6개 이하, 또는 7개 이하의 아미노산 돌연변이를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: F118V, S131T, V133A, L135F, S162A, S176A, 및 T178L 돌연변이 (EU 넘버링).
- [0333] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이하, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하, 5개 이하, 6개 이하, 7개 이하, 또는 8개 이하의 아미노산 돌연변이를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: F118V, S131T, V133A, L135F, S162A, T164S, S176T, 및 T178L 돌연변이 (EU 넘버링).
- [0334] 특정 구현예에서 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이하, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하, 5개 이하, 6개 이하, 7개 이하, 또는 8개 이하의 아미노산 돌연변이를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: F118V, S131T, V133A, L135F, S162M, T164S, S176M, 및 T178L 돌연변이 (EU 넘버링).
- [0335] CH1 및 L1 도메인(상기에 기재됨)의 모든 가능한 쌍으로 된 조합이 고려된다.
- [0336] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 카파 경쇄를 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기 중 임의의 것에서 제시된 바와 같이 CL 도메인을 포함하는 제1 경쇄 폴리펩타이드 L1을 포함한다: 서열식별번호:45-48. 하기에 제시된 CL 도메인: 서열식별번호:54는 하기의 서열식별번호의 아미노산 11-116에 해당한다: 45-48. 따라서, L1은 하기의 서열식별번호 중 임의의 것에서 제시된 바와 같이 아미노산 11-116을 포함하는 CL 도메인을 포함할 수 있다: 45-48. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: 하기에 제시된 아미노산 서열: 서열식별번호:45 또는 하기에 제시된 서열 중 아미노산 11-116: 서열식별번호:45. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: 하기에 제시된 아미노산 서열: 서열식별번호:46 또는 하기에 제시된 서열 중 아미노산 11-116: 서열식별번호:46. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: 하기에 제시된 아미노산 서열: 서열식별번호:47 또는 하기에 제시된 서열 중 아미노산 11-116: 서열식별번호:47. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: 하기에 제시된 아미노산 서열: 서열식별번호:48 또는 하기에 제시된 서열 중 아미노산 11-116: 서열식별번호:48.
- [0337] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원 결합 단백질은 람다 경쇄를 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 L1의 CL 도메인을 포함한다: 128.
- [0338] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 중쇄를 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 49. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 50. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 51. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포

함한다: 52. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호 에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 106. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호 에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 107. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호 에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다: 108. 하기의 아미노산 서열: 서열식별번호:45-52 및 106-108은 아래의 표 8에서 제공된다 (LC는 달리 나타내지 않는 한 카파 LC이고 HC는 달리 나타내지 않는 한 IgG1 아이소타입이다).

표 8

JS20 LC 서열식별번호:45	GQGTKVEIKR TVAAPSVFIV PPSDEQLKSG TATVAC ~~Y~~ LNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQEAV ~~S~~ EQDS KDSTYSL ~~M~~ SL LTLISKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
JS78 LC 카파 서열식별번호:46	GQGTKVEIKR TVAAPSVFIV PPSDEQLKSG TATVAC ~~F~~ LNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQEAVTEQDS KDSTYSL ~~A~~ SL LTLISKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
JS78 LC 람다 서열식별번호:128	GQPKAAPSVT LVPPSSEELQ ANKATLACFI SDFYPGAIVT AWKADSSPVK AGVETATPSK QSNKYYAAAS LLSLTPEQWK SHKSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS
JT20 LC 서열식별번호:47	GQGTKVEIKR TVAAPSVFIV PPSDEQLKSG TATVAC ~~F~~ LNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQEAV ~~S~~ EQDS KDSTYSL ~~T~~ SL LTLISKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
JT25 LC 서열식별번호:48	GQGTKVEIKR TVAAPSVFIV PPSDEQLKSG TATVAC ~~F~~ LNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQEAV ~~M~~ SEQDS KDSTYSL ~~M~~ SL LTLISKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
JS20 HC 서열식별번호:49	TKGPSVFEP PSSKSTSGGT AMLGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT MPAVLQSSGL YILASVVTVP SSSLGTQTYI CN
JS78 HC IgG1 서열식별번호:50	TKGPSVFEP PSSKSTSGGT AMLGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT YPAVLQSSGL YILASAVTVP SSSLGTQTYI CN
JS78 HC IgG2 서열식별번호:106	TKGPSVFEPFA PCSRSTSEST AMLGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT YPAVLQSSGL YILASAVTVP SSSLGTQTYI CN
JS78 HC IgG3 서열식별번호:107	TKGPSVFEPFA PCSRSTSGGT AMLGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT YPAVLQSSGL YILASAVTVP SSSLGTQTYI CN
JS78 HC IgG4 서열식별번호:108	TKGPSVFEPFA PCSRSTSEST AMLGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YILASAVTVP SSSLGTQTYI CN
JT20 HC 서열식별번호:51	TKGPSVFEP PSSKSTSGGT ATLGLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT MPAVLQSSGL YTLASLVTV SSSLGTQTYI CN
JT25 HC 서열식별번호:52	TKGPSVFEP PSSKSTSGGT AMLGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT MPAVLQSSGL YTLASVVTVP SSSLGTQTYI CN

[0339]

[0340]

CL (EU 넘버링) 중 아미노산 위치 116, 118, 131, 133, 135, 162, 164, 174, 176, 및 178은 아래의 서열식별번호 에서 아미노산 위치 18, 20, 33, 35, 37, 64, 66, 76, 78, 및 80에 해당한다: 45-48, 각각. 카파 사슬의 CL 도메인 중 아미노산 위치 116, 118, 131, 133, 135, 162, 164, 174, 176, 및 178 (EU 넘버링)은 람다 경쇄의 CL 도메인 중 아미노산 위치 116, 118, 131, 133, 135, 162, 164, 174, 176, 및 178 (카바트 넘버링)에 해당한다. 람다 경쇄의 CL 도메인 중 아미노산 위치 116, 118, 131, 133, 135, 162, 164, 174, 176, 및 178 (카바트 넘버링)은 하기의 서열식별번호 에서 아미노산 위치 10, 12, 25, 27, 29, 56, 59, 67, 69, 및 71에 해당한다: 128, 각각.

[0341]

CH1 중 아미노산 위치 128, 141, 170, 181, 183, 및 185 (EU 넘버링)은 하기의 서열식별번호 의 아미노산 위치

9, 22, 51, 62, 64, 및 66에 해당한다: 49-52 및 106-108, 각각.

[0342] 하기의 모든 가능한 쌍으로 된 조합: 서열식별번호:45-48 또는 하기의 아미노산 11-116: 서열식별번호:45-48 및 서열식별번호:49-52가 고려된다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기의 서열식별번호 임의의 것에서 제시된 바와 같이 CL 도메인을 포함하는 제1 경쇄 폴리펩타이드 L1을 포함한다: 45-48. 하기에서 제시된 CL 도메인: 서열식별번호:54는 하기의 서열식별번호의 아미노산 11-116에 해당한다: 45-48. 따라서, L1은 하기의 서열식별번호 중 임의의 것에서 제시된 바와 같이 아미노산 11-116을 포함하는 CL 도메인을 포함할 수 있다: 45-48. 특정 구현예에서, 하기의 특정 조합: 서열식별번호:45-48 또는 하기의 아미노산 11-116: 서열식별번호:45-48 및 128 및 서열식별번호:49-52 및 106-108가 고려된다. 그와 같은 조합은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 서열식별번호:49/서열식별번호:45 또는 하기의 아미노산 11-116: 서열식별번호:45; 서열식별번호:50/서열식별번호:46 또는 하기의 아미노산 11-116: 서열식별번호:46; 서열식별번호:106/서열식별번호:46 또는 하기의 아미노산 11-116: 서열식별번호:46; 서열식별번호:107/서열식별번호:46 또는 하기의 아미노산 11-116: 서열식별번호:46; 서열식별번호:108/서열식별번호:46 또는 하기의 아미노산 11-116: 서열식별번호:46; 서열식별번호:51/서열식별번호:47 또는 하기의 아미노산 11-116: 서열식별번호:47; 서열식별번호:50/서열식별번호:128; 서열식별번호:106/서열식별번호:128; 서열식별번호:107/서열식별번호:128; 서열식별번호:108/서열식별번호:128; 및 서열식별번호:52/서열식별번호:48 또는 하기의 아미노산 11-116: 서열식별번호:48.

[0343] 용어들 "H1" 및 "H2"은 임의의 지정이고 구현예 중 임의의 것에서의 "H1" 및 "H2"가 역전될 수 있다는 것은 당해 분야의 숙련자에게 분명할 것이다. 즉, H1의 CH1 도메인 및 L1의 CL 도메인 내에 있는 것으로 상기에서 기재된 돌연변이 중 임의의 것은, 대안적으로, 상기 H2의 CH1 도메인 및 L2의 CL 도메인 내에 있을 수 있다.

[0344] 전술한 바와같이, 전략 #2에 의해 확인된 CH1/CL 계면에 있는 돌연변이는 전략 #1에 의해 확인된 CH1/CL 계면에 있는 돌연변이와는 독립적으로 또는 그것에 추가하여 사용될 수 있다.

[0345] 따라서, 예를 들면, 하기를 포함하는 다중특이적 항원-결합 단백질이 본 명세서에서 제공된다: A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 치환 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는 H1의 CH1 도메인, F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 치환 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는 L1의 CL 도메인, S183E 치환 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하는 H2의 CH1 도메인, 및 V133K 치환 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는 L2의 CL 도메인. 추가로, 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)를 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 치환 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는 H1의 CH1 도메인, F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 치환 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는 L1의 CL 도메인, S183E 치환 돌연변이 (EU 넘버링)로 구성된 H2의 CH1 도메인, 및 V133K 치환 돌연변이 (EU 넘버링)로 구성된 L2의 CL 도메인을 포함한다. 추가로, 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)를 포함한다. 추가로, 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)를 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함한다. 추가로, 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함한다.

포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함한다: 하기의 서열식별번호 의 아미노산 서열을 포함하거나 (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성된) H1의 CH1 도메인:29, 하기의 서열식별번호 를 포함하거나 (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성된) L1의 CL 도메인:19 또는 하기에서 제시된 서열 중 아미노산 11-116: 서열식별번호:19, 하기의 서열식별번호 의 아미노산 서열을 포함하거나 (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성된) H2의 CH1 도메인:15, 및 하기의 서열식별번호 을 포함하거나 (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성된) L2의 CL 도메인:5 또는 하기에서 제시된 서열 중 아미노산 11-116: 서열식별번호:5.

[0346] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 치환 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는 H1의 CH1 도메인, F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 치환 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는 L1의 CL 도메인, S183K 치환 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하는 H2의 CH1 도메인, 및 V133E 치환 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하는 L2의 CL 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 치환 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는 H1의 CH1 도메인, F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 치환 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는 L1의 CL 도메인, S183K 치환 돌연변이 (EU 넘버링)로 구성된 H2의 CH1 도메인, 및 V133E 치환 돌연변이 (EU 넘버링)로 구성된 L2의 CL 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 치환 돌연변이 (EU 넘버링)로 구성된 H1의 CH1 도메인, F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 치환 돌연변이 (EU 넘버링)로 구성된 L1의 CL 도메인, S183K 치환 돌연변이 (EU 넘버링)로 구성된 H2의 CH1 도메인, 및 V133E 치환 돌연변이 (EU 넘버링)로 구성된 L2의 CL 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)를 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)를 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함한다.

[0347] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 치환 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는 H1의 CH1 도메인, F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 치환 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는 L1의 CL 도메인, L128F, A141M, F170M, S181I, 및 S183A 치환 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는 H2의 CH1 도메인, 및 F118V, S131T, V133A, L135Y, S162A, T164S, S176M, 및 S178L 치환 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는 L2의 CL 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)를 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함한다.

[0348] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 치환 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는 H1의 CH1 도메인, F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 치환 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는 L1의 CL 도메인, L128F, A141M, F170Y, S181I, S183A, 및 V185A 치환 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는 H2의 CH1 도메인, 및 F118V, S131T, V133A, L135F, S162A, S176A, 및 T178L 치환 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하는 L2의 CL 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함한다.

(카바트 넘버링)를 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함한다.

[0361] 용어들 "H1" 및 "H2"은 임의의 지정이고 구현예 중 임의의 것에서의 "H1" 및 "H2"가 역전될 수 있다는 것은 당해 분야의 숙련자에게 분명할 것이다. 즉, CH1 도메인 및/또는 H1의 VH 도메인 및 CL 도메인 및/또는 상기 L1의 VL 도메인 내에 있는 바와 같이 상기에 기재된 돌연변이 중 임의의 것은, 대안적으로, CH1 도메인 및/또는 H2의 VH 도메인 및 CL 도메인 및/또는 L2의 VL 도메인 내에 있을 수 있다.

[0362] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 L128F, A141M, F170Y, S181I, S183A, 및 V185A 치환 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하는 H1의 CH1 도메인, F118V, S131T, V133A, L135F, S162A, S176A, 및 T178L 치환 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는 L1의 CL 도메인, A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 치환 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는 H2의 CH1 도메인, 및 F116A, S131D, L135V, S162A, S174A, S176F, 및 T178I 치환 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하는 L2의 CL 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)를 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함한다.

[0363] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 L128F, A141M, F170Y, S181I, S183A, 및 V185A 치환 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하는 H1의 CH1 도메인, F118V, S131T, V133A, L135F, S162A, S176A, 및 T178L 치환 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는 L1의 CL 도메인, A141I, F170A, S181M, S183V, 및 V185A 치환 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는 H2의 CH1 도메인, 및 F116A, L135V, S162M, S174A, S176F, 및 T178V 치환 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하는 L2의 CL 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)를 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함한다.

[0364] 용어들 "H1" 및 "H2"은 임의의 지정이고 구현예 중 임의의 것에서의 "H1" 및 "H2"가 역전될 수 있다는 것은 당해 분야의 숙련자에게 분명할 것이다. 즉, CH1 도메인 및/또는 H1의 VH 도메인 및 CL 도메인 및/또는 상기 L1의 VL 도메인 내에 있는 바와 같이 상기에 기재된 돌연변이 중 임의의 것은, 대안적으로, CH1 도메인 및/또는 H2의 VH 도메인 및 CL 도메인 및/또는 L2의 VL 도메인 내에 있을 수 있다.

[0365] 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질은 1개 이하의 아미노산 치환 돌연변이, 2개 이하의 아미노산 치환 돌연변이, 3개 이하의 아미노산 치환 돌연변이, 5개 이하의 아미노산 치환 돌연변이, 또는 6개 이하의 아미노산 치환, 7개 이하의 아미노산 치환, 8개 이하의 아미노산 치환, 9개 이하의 아미노산 치환, 10개 이하의 아미노산 치환, 11개 이하의 아미노산 치환, 또는 12개 이하의 아미노산 치환을 포함하는 H1의 CH1 도메인을 포함한다.

[0366] 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질은 1개 이하의 아미노산 치환 돌연변이, 2개 이하의 아미노산 치환 돌연변이, 3개 이하의 아미노산 치환 돌연변이, 5개 이하의 아미노산 치환 돌연변이, 또는 6개 이하의 아미노산 치환, 7개 이하의 아미노산 치환, 8개 이하의 아미노산 치환, 또는 9개 이하의 아미노산 치환, 10개 이하의 아미노산 치환, 11개 이하의 아미노산 치환, 또는 12개 이하의 아미노산 치환을 포함하

는 L1의 CL 도메인을 포함한다.

- [0367] 특정 구현예에서 H1의 CH1 도메인은 인간 생식계열 또는 동종이인자형 중쇄 CH1 도메인에 대해 적어도 약 70%, 적어도 약 71%, 적어도 약 72%, 적어도 약 73%, 적어도 약 74%, 적어도 약 75%, 적어도 약 76%, 적어도 약 77%, 적어도 약 78%, 적어도 약 79%, 적어도 약 80%, 적어도 약 81%, 적어도 약 82%, 적어도 약 83%, 적어도 약 84%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일성을 갖는다. 참고 Jefferis 등 (2009) Mabs 1:332-338. 하기의 아미노산 서열이 아래에 제공된다: 인간 IgG1 CH1 도메인 (즉, 서열식별번호:57) 및 인간 IgG4 S228P CH1 도메인 (즉, 서열식별번호:58). ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVSVLT VLHQDWLNGK EYCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGPPEPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSGSFFLY SKLTVDKSRW QGQNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK (서열식별번호 57)
- [0368] ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKISKAK GQPREPQVYT LPQSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLGK (서열식별번호 58)
- [0369] 일부 구현예에서, LC1은 카파 경쇄이다. 일부 구현예에서, LC1의 CL 도메인은 인간 생식계열 또는 동종이인자형 카파 사슬 CL 도메인에 대해 적어도 약 70%, 적어도 약 71%, 적어도 약 72%, 적어도 약 73%, 적어도 약 74%, 적어도 약 75%, 적어도 약 76%, 적어도 약 77%, 적어도 약 78%, 적어도 약 79%, 적어도 약 80%, 적어도 약 81%, 적어도 약 82%, 적어도 약 83%, 적어도 약 84%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일성을 갖는다. 하기의 아미노산 서열이 아래에 제공된다: 인간 카파 경쇄 불변 도메인 (즉, 서열식별번호:59).
- [0370] RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC (서열식별번호 59) 일부 구현예에서, LC1은 람다 경쇄이다. 일부 구현예에서, LC1의 CL 도메인은 인간 생식계열 또는 동종이인자형 람다 CL 도메인에 대해 적어도 약 70%, 적어도 약 71%, 적어도 약 72%, 적어도 약 73%, 적어도 약 74%, 적어도 약 75%, 적어도 약 76%, 적어도 약 77%, 적어도 약 78%, 적어도 약 79%, 적어도 약 80%, 적어도 약 81%, 적어도 약 82%, 적어도 약 83%, 적어도 약 84%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일성을 갖는다. 하기의 아미노산 서열이 아래에 제공된다: 인간 람다 경쇄 불변 도메인 (즉, 서열식별번호:113).
- [0371] GQPKAAPSVT LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWKADSSPVK AGVETTPPSK QSNKYAASS YLSLTPEQWK SHKSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS (서열식별번호:113)
- [0372] 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1이 유도되는 친계 H1은 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1이 유도되는 친계 L1에 대한 상당한 선호를 나타내지 않는다. 특정 구현예에서, 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1이 유도되는 친계 H1은 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1이 유도되는 친계 L1에 대한 선호를 나타낸다.
- [0373] 용어들 "H1" 및 "H2"은 임의의 지정이고 구현예 중 임의의 것에서의 "H1" 및 "H2"가 역전될 수 있다는 것은 당해 분야의 숙련자에게 분명할 것이다. 즉, CH1 도메인 및/또는 H1의 VH 도메인 및 CL 도메인 및/또는 상기 L1의 VL 도메인 내에 있는 바와 같이 상기에 기재된 돌연변이 중 임의의 것은, 대안적으로, CH1 도메인 및/또는 H2의 VH 도메인 및 CL 도메인 및/또는 L2의 VL 도메인 내에 있을 수 있다.
- [0374] **VH 및 VL 도메인에 대한 변형**
- [0375] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질, 또는 그것의 항원-결합 단편은 VH 및 VL 도메인(들) 중 아미노산 변형, 즉, 독립적으로 본 명세서에서 기재된 CH1 및 CL 도메인 중 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질은 추가로, VH 및 VL 도메인(들) 중 아미노산 변형을, 즉, 전략

#1에 의해 확인된 CH1/CL 계면에 있는 돌연변이 및/또는 전략 #1에 의해 확인된 CH1/CL 계면에 있는 돌연변이와 함께 포함한다.

[0376] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 위치 Q39 (카밧 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 위치 Q38 (카밧 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함한다. 특정 구현예에서, H1의 VH 도메인 중 위치 Q39 (카밧 넘버링)에서의 아미노산은 양으로 하전된 잔기로 치환되고, 그리고 상기 L1의 VL 도메인 중 위치 Q38 (카밧 넘버링)에서의 아미노산은 음으로 하전된 잔기로 치환된다. 특정 구현예에서, H1의 VH 도메인 중 위치 Q39 (카밧 넘버링)에서의 아미노산은 음으로 하전된 잔기로 치환되고, 그리고 상기 L1의 VL 도메인 중 위치 Q38 (카밧 넘버링)에서의 아미노산은 양으로 하전된 잔기로 치환된다. 특정 구현예에서, 양으로 하전된 잔기는 R, H, 및 K로 구성된 군으로부터 선택된다. 특정 구현예에서, 음으로 하전된 잔기는 D 및 E로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0377] 추가로 또는 대안적으로, 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 위치 Q39 (카밧 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 위치 Q38 (카밧 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함한다. 특정 구현예에서, H2의 VH 도메인 중 위치 Q39 (카밧 넘버링)에서의 아미노산은 양으로 하전된 잔기로 치환되고, 그리고 상기 L2의 VL 도메인 중 위치 Q38 (카밧 넘버링)에서의 아미노산은 음으로 하전된 잔기로 치환된다. 특정 구현예에서, H2의 VH 도메인 중 위치 Q39 (카밧 넘버링)에서의 아미노산은 음으로 하전된 잔기로 치환되고, 그리고 상기 L2의 VL 도메인 중 위치 Q38 (카밧 넘버링)에서의 아미노산은 양으로 하전된 잔기로 치환된다. 특정 구현예에서, 양으로 하전된 잔기는 R, H, 및 K로 구성된 군으로부터 선택된다. 특정 구현예에서, 음으로 하전된 잔기는 D 및 E로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0378] 특정 구현예에서, H1의 VH 도메인 상의 위치 Q39 (카밧 넘버링) 및 L1의 VL 도메인 상의 위치 Q38 (카밧 넘버링) 및/또는 H2의 VH 도메인 상의 위치 Q39 (카밧 넘버링) 및 L2의 VL 도메인 상의 위치 Q38 (카밧 넘버링)에서의 치환 돌연변이의 특정 조합이 고려된다. 그와 같은 조합은, 비제한적으로, 아래의 표 9A 및 9B에서 나뉠 것을 포함한다:

표 9A

Q39D/Q38K	Q39R/Q38D
Q39E/Q38K	Q39K/Q38D
Q39D/Q38R	Q39R/Q38E
Q39E/Q38R	Q39K/Q38E
Q39D/Q38H	Q39H/Q38D
Q39E/Q38H	Q39H/Q38E

[0379]

[0380] 표 9A의 각 쌍 중 제1 돌연변이는 VH 도메인 서열에서의 변형을 지칭하고, 표 9A의 각 쌍 중 제2 돌연변이는 VL 도메인 서열에서의 변형을 지칭한다.

표 9B

EKKE	KEEK	EKKD	KDEK
ERKE	KEER	ERKD	KDER
DKKE	KEDK	DKKD	KDDK
DRKE	KEDR	DRKD	KDDR
EKRE	REEK	EKRD	RDEK
ERRE	REER	ERRD	RDER
DKRE	REDK	DKRD	RDDK
DRRE	REDR	DRRD	RDDR

[0381]

- [0382] 표 9B에서의 4개의 문자 돌연변이는 Q39X_{VH1}/Q38X_{VL1} /Q39X_{VH2}/Q38X_{VL2}에서 아미노산 치환을 지칭하고, 상기 "VH1"은 H1의 VH 도메인을 지칭하고, "VL"은 L1의 VL 도메인을 지칭하고, "VH2"은 H2의 VH 도메인을 지칭하고, 그리고 "VL2"은 L2의 VL 도메인을 지칭한다. 용어들 "H1"/"L1" 및 "H2"/"L2"은 임의의 지칭이고, 그리고 상기 구현예 중 임의의 것에서의 "H1" 및 "L1"이 "H2" 및 "L2," 각각으로 역전될 수 있다는 것은 당해분야의 숙련자에게 분명할 것이다. 즉, H1의 VH 도메인 및 L1의 VL 도메인 내에 있는 것으로 기재된 상기의 돌연변이 중 임의의 것은, 대안적으로, H2의 VH 도메인 및 L2의 VL 도메인 내에 있을 수 있다.
- [0383] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 위치 Q39E (카밧 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 위치 Q38K (카밧 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 위치 Q39K (카밧 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 위치 Q38E (카밧 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 위치 Q39K (카밧 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 위치 Q38E (카밧 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 위치 Q39E (카밧 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 위치 Q38K (카밧 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 위치 Q39E (카밧 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 위치 Q38K (카밧 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 위치 Q39K (카밧 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 위치 Q38E (카밧 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 위치 Q39K (카밧 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 위치 Q38E (카밧 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 위치 Q39E (카밧 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 위치 Q38K (카밧 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함한다.
- [0384] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 상기 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38R 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함한다.
- [0385] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39D 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 상기 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함한다.
- [0386] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39D 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 상기 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38R 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함한다.
- [0387] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 상기 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39R 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함한다.
- [0388] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 상기 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38R 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39R 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함한다.
- [0389] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39D 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 상기 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39R 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함한다.

- [illegible]

- [0413] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39R 치환 돌연변이 (카뎃 넘버링)을 포함하고, 상기 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38D 치환 돌연변이 (카뎃 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39D 치환 돌연변이 (카뎃 넘버링)을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38R 치환 돌연변이 (카뎃 넘버링)을 포함한다.
- [0414] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39H 치환 돌연변이 (카뎃 넘버링)을 포함하고, 상기 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38D 치환 돌연변이 (카뎃 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39D 치환 돌연변이 (카뎃 넘버링)을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38H 치환 돌연변이 (카뎃 넘버링)을 포함한다.
- [0415] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39H 치환 돌연변이 (카뎃 넘버링)을 포함하고, 상기 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카뎃 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카뎃 넘버링)을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38H 치환 돌연변이 (카뎃 넘버링)을 포함한다.
- [0416] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39D 치환 돌연변이 (카뎃 넘버링)을 포함하고, 상기 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38H 치환 돌연변이 (카뎃 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39H 치환 돌연변이 (카뎃 넘버링)을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38D 치환 돌연변이 (카뎃 넘버링)을 포함한다.
- [0417] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카뎃 넘버링)을 포함하고, 상기 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38H 치환 돌연변이 (카뎃 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39H 치환 돌연변이 (카뎃 넘버링)을 포함하고, 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카뎃 넘버링)을 포함한다.
- [0418] 용어들 "H1"/"L1" 및 "H2"/"L2"은 임의의 지정이고, 그리고 상기 구현예 중 임의의 것에서의 "H1" 및 "L1"이 "H2" 및 "L2," 각각으로 역전될 수 있다는 것은 당해분야의 숙련자에게 분명할 것이다. 즉, H1의 VH 도메인 및 L1의 VL 도메인 내에 있는 것으로 기재된 상기의 돌연변이 중 임의의 것은, 대안적으로, H2의 VH 도메인 및 L2의 VL 도메인 내에 있을 수 있다.
- [0419] 본 명세서의 다른 곳에 언급된 바와 같이, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질은, 일부 구현예에서, VH 및 VL 도메인(들) 중 아미노산 변형, 즉, 예컨대 상기에 기재된 아미노산 변형을, 전략 #1에 의해 확인된 CH1/CL 계면에 있는 돌연변이 및/또는 전략 #2에 의해 확인된 CH1/CL 계면에 있는 돌연변이와 함께 포함한다.
- [0420] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카뎃 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (카뎃 넘버링)을 포함하고, 상기 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 CH1 도메인은 S183E 치환 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하고 (예컨대 그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되고), 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 CL 도메인은 V133K 치환 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하고 (예컨대 그것으로 구성되거나 본질적으로 구성된다).
- [0421] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이 (카뎃 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카뎃 넘버링)을 포함하고, 상기 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 CH1 도메인은 S183E 치환 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하고 (예컨대 그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되고), 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 CL 도메인은 V133K 치환 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하고 (예컨대 그것으로 구성되거나 본질적으로 구성된다).
- [0422] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카뎃 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (카뎃 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 CH1 도메인은 S183E 치환 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하고 (예컨대 그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되고), 그리고 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 CL 도메인은 V133K 치환 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하고 (예컨대 그것으로 구성되거나 본질적으로 구성된다).
- [0423] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이 (카뎃 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카뎃 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 CH1 도메인은 S183E 치환 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하고 (예컨대 그것으로 구

- [illegible]

(EU 넘버링)를 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 상기 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 CH1 도메인은 S183K 치환 돌연변이 (EU 넘버링)으로 구성되고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 그리고 상기 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 CL 도메인은 V133E 치환 돌연변이 (EU 넘버링)로 구성된다.

[0487] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 CH1 도메인은 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링)으로 구성되고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링)으로 구성되고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 상기 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 CH1 도메인은 S183K 치환 돌연변이 (EU 넘버링)으로 구성되고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 그리고 상기 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 CL 도메인은 V133E 치환 돌연변이 (EU 넘버링)로 구성된다.

[0488] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 CH1 도메인은 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 상기 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 CH1 도메인은 S183K 치환 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 그리고 상기 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 CL 도메인은 V133E 치환 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함한다.

[0489] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 CH1 도메인은 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 상기 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 CH1 도메인은 S183K 치환 돌연변이 (EU 넘버링)으로 구성되고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 그리고 상기 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 CL 도메인은 V133E 치환 돌연변이 (EU 넘버링)로 구성된다.

[0490] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 VH 도메인은 Q39K 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 VL 도메인은 Q38E 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 CH1 도메인은 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링)으로 구성되고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 CL 도메인은 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링)으로 구성되고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 VH 도메인은 Q39E 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 상기 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2의 CH1 도메인은 S183K 치환 돌연변이 (EU 넘버링)으로 구성되고, 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 VL 도메인은 Q38K 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, 그리고 상기 다중특이적 항원-결합 단백질의 L2의 CL 도메인은 V133E 치환 돌연변이 (EU 넘버링)로 구성된다.

[0491] 전략 #2에 의해 확인된 CH1/CL 계면에 있는 돌연변이, 전략 #1에 의해 확인된 CH1/CL 계면에 있는 돌연변이, 및 VH 및 VL 도메인 중 돌연변이, 즉, 비제한적으로 상기에 기재된 것들의 추가 조합이 또한 고려된다.

[0492] 용어들 "H1" 및 "H2"은 임의의 지정이고 구현예 중 임의의 것에서의 "H1" 및 "H2"가 역전될 수 있다는 것은 당해 분야의 숙련자에게 분명할 것이다. 즉, CH1 도메인 및/또는 H1의 VH 도메인 및 CL 도메인 및/또는 상기 L1의 VL 도메인 내에 있는 바와 같이 상기에 기재된 돌연변이 중 임의의 것은, 대안적으로, CH1 도메인 및/또는 H2의 VH 도메인 및 CL 도메인 및/또는 L2의 VL 도메인 내에 있을 수 있다.

[0493] **Fc 돌연변이**

[0494] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 각각의 H1 및 H2는 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 Fc 영역을 포함한다. 특정 구현예에서, H1 및/또는 H2의 Fc 영역은 IgG1, IgG2 또는 IgG4 Fc이다. 특정 구현예에서, H1 및

H2의 CH3 도메인 각각은 계면에서 만나고, 그리고 각각의 CH3 도메인은 아미노산 치환을 포함하고, 이로써 상기 H1의 Fc 영역은 H1과 비교하여 H2의 영역과 우선적으로 쌍을 이룬다. 특정 구현예에서, CH3 도메인에서의 아미노산 치환은 더 큰 정전기 상보성을 초래한다 CH3 도메인 중 치환 없는 야생형보다. 단백질/단백질 계면에서 정전기 상보성을 측정하는 방법은 당해 기술에 공지되어 있고, 그리고 하기에서 기재되어 있다: 예를 들면, McCoy 등 (1997) *J Mol Biol* 268, 570-584; Lee 등, (2001) *Protein Sci.* 10, 362-377; 및 Chau 등 (1994) *J Comp Mol Des* 8, 51325. 특정 구현예에서, CH3 도메인 중 아미노산 치환은 CH3 도메인 중 치환 없는 야생형보다 더 큰 입체 상보성을 초래한다. 단백질/단백질 계면에서 정전기 상보성을 측정하는 방법은 당해 기술에 공지되어 있고, 그리고 하기에서 기재되어 있다: 예를 들면, Lawrence 등 (1993) *J Mol Biol* 234, 946-950; Walls 등 (1992) *J Mol Biol* 228, 277-297; 및 Schueler-Furman 등 (2005) *Proteins* 60, 187-194.

[0495]

특정 구현예에서, H1 및 H2의 CH3 도메인 (예를 들면, 본 명세서에서 기재된 구현예 중 임의의 것의 H1 및 H2)은, 상기 CH3/CH3 계면 내에, H1의 CH3 도메인 중 1종 이상의 아미노산 잔기가 더 큰 측쇄 용적을 갖는 1종 이상의 아미노산 잔기로 치환되도록 변경되고, 이로써 H1의 CH3 도메인의 표면 상에 돌출부 (또는 늪)를 생성하고, H1의 CH3 도메인과 상호작용하는 H2의 CH3 도메인 중 1개, 바람직하게는 2개 또는 3개 이상의 아미노산 잔기가 작은 측쇄 용적을 갖는 아미노산 잔기로 치환되도록 변형되고, 이로써 H1의 CH3 도메인과 상호작용하는 H2의 CH3 도메인의 표면 상에 공동 (또는 홀)을 생성하고. 특정 구현예에서, H1 및 H2의 CH3 도메인 (예를 들면, 본 명세서에서 기재된 구현예 중 임의의 것의 H1 및 H2)은, 계면 1 또는 2 내에 H2의 CH3 도메인 중 아미노산 잔기가 더 큰 측쇄 용적을 갖는 동등한 수의 아미노산 잔기로 치환되도록 변경되고, 이로써 H1의 CH3 도메인의 표면 내의 공동 (또는 홀)에서 배치가능한 H2의 CH3 도메인의 계면 내에 돌출부 (또는 늪)를 생성하고, H1의 CH3 도메인은, H2의 CH3 도메인의 계면에 부합하는 H2의 CH3 도메인의 표면 내에 2 또는 3종의 아미노산 잔기가 더 작은 측쇄 용적을 갖는 동등한 수의 아미노산 잔기로 치환되도록 변형되고, 이로써 H2의 CH3 도메인의 계면 내의 돌출부가 배치가능한 H1의 CH3 도메인의 계면 내에 공동을 생성한다. 특정 구현예에서, 더 큰 측쇄 용적을 갖는 도입 잔기는 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y), 아르기닌 (R) 또는 트립토판 (W)이다. 특정 구현예에서, 돌출부 또는 늪 돌연변이는 위치 366에서의 트레오닌의 트립토판에 의한 치환을 포함하고, 아미노산 넘버링은 하기의 EU 넘버링 체계에 따른다: 카바트 등 (pp. 688-696 in *Sequences of proteins of immunological interest*, 5th ed., Vol.1 (1991; NIH, Bethesda, MD)). 특정 구현예에서, 더 작은 측쇄 용적을 갖는 도입 잔기는 세린 (S), 알라닌 (A), 발린 (V), 또는 트레오닌 (T)이다. 특정 구현예에서, 최초 잔기는 트레오닌이다. 특정 구현예에서, 최초 잔기는 류신이다. 특정 구현예에서, 최초 잔기는 티로신이다. 특정 구현예에서, 도입 잔기는 시스테인 (C)이 아니다. 일 구현예에서, 도입 잔기는 알라닌 (A)이다. 공동은 CH3 도메인의 1종 이상의 최초 잔기를 치환함으로써 생성될 수 있다. 예를 들면, 일 구현예에서, 공동을 포함하는 CH3 도메인은 트레오닌, 류신 및 티로신으로 구성된 군으로부터 선택된 2종 이상의 최초 아미노산의 치환을 포함한다. 특정 구현예에서, 공동을 포함하는 CH3 도메인은 알라닌, 세린, 트레오닌 및 발린으로 구성된 군으로부터 선택된 2종 이상의 도입 잔기를 포함한다. 특정 구현예에서, 늪 돌연변이에 대한 변형은 T366W이고, 홀 돌연변이에 대한 변형은 T366S, L368A, 및 Y407V 중 적어도 1종, 또는 적어도 2종이다. 특정 구현예에서, 늪 돌연변이에 대한 변형은 T366W이고, 홀 돌연변이에 대한 변형은 T366S, L368A, 및 Y407V이다. 참고, 예를 들면, US 5,731,168, US 5,807,706, US 7,183,076(이들 각각은 그 전문이 참고로 본 명세서에 편입되어 있음).

[0496]

전달성

[0497]

상기의 H1의 CH1 도메인 및 L1의 CL 도메인에 대한 특정 아미노산 변형이 EU 넘버링 시스템에 대해 기재되었지만, 이들 아미노산 변형이 다른 면역글로불린 중쇄 및 경쇄로 전달가능하고, 하기의 관점에서 1개의 면역글로불린 중쇄와 2개의 면역글로불린 경쇄 중 하나와의 우선적인 짝짓기의 유사한 패턴을 초래하는 것으로 고려된다.

[0498]

면역글로불린 중쇄와 경쇄 사이의 계면에서 CH1/CL 계면 잔기는 상대적으로 잘 보존된다 (Padlan 등, 1986, *Mol. Immunol.* 23(9): 951-960). 진화론적 구속의 결과인 이러한 서열 보존은 기능적 활성 항체 결합 도메인이 경쇄 및 중쇄의 조합 짝짓기 동안에 형성될 가능성을 증가시킨다. 이러한 서열 보존의 결과로서, 결과적으로 우선적인 짝짓기를 유도하는 상기 언급된 서열 변형이 항체를 통해 높은 서열 보전을 나타내는 바와 같은 다른 중쇄 및 경쇄 쌍으로 전달될 수 있다.

[0499]

특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 아미노산 변형은 인간 또는 인간화된 IgG1/을 기반으로 한 항체의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄로 전달가능하다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 아미노산 변형은 인간 또는 인간화된 IgG2/을 기반으로 한 항체의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄로 전달가능하다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 아미노산 변형은 인간 또는 인간화된 IgG3/을 기반으로 한 항체의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄로 전달가능하다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 아미노산 변형은 인간 또는 인간화된 IgG4/을 기반으로 한

항체의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄로 전달가능하다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 아미노산 변형은 인간 또는 인간화된 IgA1/을 기반으로 한 항체의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄로 전달가능하다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 아미노산 변형은 인간 또는 인간화된 IgA2/을 기반으로 한 항체의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄로 전달가능하다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 아미노산 변형은 인간 또는 인간화된 IgD/을 기반으로 한 항체의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄로 전달가능하다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 아미노산 변형은 인간 또는 인간화된 IgE/을 기반으로 한 항체의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄로 전달가능하다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 아미노산 변형은 인간 또는 인간화된 IgG/을 기반으로 한 항체의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄로 전달가능하다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 아미노산 변형은 인간 또는 인간화된 IgM/을 기반으로 한 항체의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄로 전달가능하다.

[0500] 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 아미노산 변형은 인간 또는 인간화된 IgG1/을 기반으로 한 항체의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄로 전달가능하다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 아미노산 변형은 인간 또는 인간화된 IgG2/을 기반으로 한 항체의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄로 전달가능하다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 아미노산 변형은 인간 또는 인간화된 IgG3/을 기반으로 한 항체의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄로 전달가능하다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 아미노산 변형은 인간 또는 인간화된 IgG4/을 기반으로 한 항체의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄로 전달가능하다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 아미노산 변형은 인간 또는 인간화된 IgA1/을 기반으로 한 항체의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄로 전달가능하다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 아미노산 변형은 인간 또는 인간화된 IgA2/을 기반으로 한 항체의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄로 전달가능하다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 아미노산 변형은 인간 또는 인간화된 IgD/을 기반으로 한 항체의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄로 전달가능하다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 아미노산 변형은 인간 또는 인간화된 IgE/을 기반으로 한 항체의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄로 전달가능하다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 아미노산 변형은 인간 또는 인간화된 IgG/을 기반으로 한 항체의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄로 전달가능하다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 아미노산 변형은 인간 또는 인간화된 IgM/을 기반으로 한 항체의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄로 전달가능하다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 아미노산 변형은 생식계열에 가까운 프레임워크를 갖는 항체의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄로 전달가능하다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 아미노산 변형은 표준 CL 및 CH1 도메인을 갖는 항체의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄에 전달가능하다.

[0501] 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 아미노산 변형은 마우스 항체의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄에 도입된다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 아미노산 변형은 마우스 IgG2a/를 기반으로 하는 항체의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄에 도입된다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 아미노산 변형은 마우스 IgG2a/를 기반으로 하는 항체의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄에 도입된다.

[0502] 마우스 IgG2a 불변 영역의 아미노산 서열은 하기에서 제시된다: 서열식별번호:60 아래:

[0503] AKTTAPSVYP LAPVCGDTTG SSVTLGCLVK GYFPEPVTLT WNSGSLSSGV HTFPAVLQSD LYTLSSSVTV TSSTWPSQSI TCNVAHPASS TKVDKKIEPR GPTIKPCPPC KCPAPNLLGG PSVFIFPPKI KDVLMSLSP ITCVVVDVS EDDPDVQISW FVNNVEVHTA QTQTHREDYN STLRVVSALP IQHQDWMSGK EFKCKVNNKD LPAPIERTIS KPKGSRAPQ VYVLPPEEE MTKKQVTLTC MVTDFMPEDI YVEWTNNGKT ELNKNTEPV LDSDGSYFMY SKLRVEKKNW VERNYSYSCSV VHEGLHNHHT TKSFSRTPGK (서열식별번호:60)

[0504] 마우스 카파 경쇄의 아미노산 서열은 하기에서 제시된다: 서열식별번호:61 아래:

[0505] RADAAPTISI FPPSSEQLTS GGASVVCFLN NFYPKDINVK WKIDGSRQN GVLNSWTDQD SKDSTYSMSS TLTLTKDEYE RHNSYTCEAT HKTSTSPIVK SFNRNEC (서열식별번호:61)

[0506] 마우스 람다 1 경쇄의 아미노산 서열은 하기에서 제시된다: 서열식별번호:62 아래:

[0507] GQPKSSPSVT LFPPSSEELK TNKATLVCTI TDFYPGVVTV DWKVDGTPVT QGMETTQPSK QSNKYMSS YLTLTARAWA RHSSYSQCVT HEGHTVEKSL SRADCS (서열식별번호:62)

[0508] 마우스 람다 2 경쇄의 아미노산 서열은 하기에서 제시된다: 서열식별번호:63 아래:

[0509] GQPKSTPTLT VFPPSSEELK ENKATLVCLI SNFSPSGVT AWKANGTPIT QGVDTSNPTK EGNKFMASS LHLTSDQWRS HNSFTCQVTH EGDTEKSL PAEL (서열식별번호:63)

[0510] 마우스 람다 3 경쇄의 아미노산 서열은 하기에서 제시된다: 서열식별번호:64 아래:

[0511] GQPKSTPTLT MFPPSPEELQ ENKATLVCLI SNFSPSGVT AWKANGTPIT QGVDTSNPTK EDNKYMSS LHLTSDQWRS HNSFTCQVTH

EGDTVEKSLS PAECL (서열식별번호:64)

- [0512] 특정 구현예에서, (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것으로) 변형가능한 아미노산 변형은 치환 돌연변이의 하기 조합을 포함한다: H1의 VH 도메인 상의 위치 Q39 (카바트 넘버링); L1의 VL 도메인 상의 위치 Q38; H2의 VH 도메인 상의 위치 Q39 (카바트 넘버링); 상기 H2의 CH1 도메인 상의 위치 S183 (EU 넘버링); L2의 VL 도메인 상의 위치 Q38 (카바트 넘버링); 및 L2의 CL 도메인 상의 위치 V133 (EU 넘버링).
- [0513] 특정 구현예에서, (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것으로) 변형가능한 아미노산 변형은 치환 돌연변이의 하기 조합을 포함한다: H1의 VH 도메인 상의 위치 Q39 (카바트 넘버링); H1의 CH1 도메인 상의 위치 S183 (EU 넘버링); L1의 VL 도메인 상의 위치 Q38; L1의 CL 도메인 상의 위치 V133 (EU 넘버링); H2의 VH 도메인 상의 위치 Q39 (카바트 넘버링); 상기 H2의 CH1 도메인 상의 위치 S183 (EU 넘버링); L2의 VL 도메인 상의 위치 Q38 (카바트 넘버링); 및 L2의 CL 도메인 상의 위치 V133 (EU 넘버링).
- [0514] 특정 구현예에서, (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것에 대해) 변형가능한 아미노산 변형은 치환 돌연변이의 하기 조합을 포함하고 (예컨대 그것으로 구성되거나 그것으로 본질적으로 구성된다): H1의 VH 도메인 상의 위치 Q39E (카바트 넘버링); L1의 VL 도메인 상의 위치 Q38K; H2의 VH 도메인 상의 위치 Q39K (카바트 넘버링); 상기 H2의 CH1 도메인 상의 위치 S183K (EU 넘버링); L1의 VL 도메인 상의 위치 Q38E (카바트 넘버링); 및 L2의 CL 도메인 상의 V133E (EU 넘버링).
- [0515] 특정 구현예에서, (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것에 대해) 변형가능한 아미노산 변형은 치환 돌연변이의 하기 조합을 포함하고 (예컨대 그것으로 구성되거나 그것으로 본질적으로 구성된다): H1의 VH 도메인 상의 위치 Q39K (카바트 넘버링); L1의 VL 도메인 상의 위치 Q38E; H2의 VH 도메인 상의 위치 Q39E (카바트 넘버링); 상기 H2의 CH1 도메인 상의 위치 S183K (EU 넘버링); L1의 VL 도메인 상의 위치 Q38K (카바트 넘버링); 및 L2의 CL 도메인 상의 V133E (EU 넘버링).
- [0516] 특정 구현예에서, (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것에 대해) 변형가능한 아미노산 변형은 치환 돌연변이의 하기 조합을 포함하고 (예컨대 그것으로 구성되거나 그것으로 본질적으로 구성된다): H1의 VH 도메인 상의 위치 Q39E (카바트 넘버링); L1의 VL 도메인 상의 위치 Q38K; H2의 VH 도메인 상의 위치 Q39K (카바트 넘버링); 상기 H2의 CH1 도메인 상의 위치 S183E (EU 넘버링); L1의 VL 도메인 상의 위치 Q38E (카바트 넘버링); 및 L2의 CL 도메인 상의 V133K (EU 넘버링).
- [0517] 특정 구현예에서, (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것에 대해) 변형가능한 아미노산 변형은 치환 돌연변이의 하기 조합을 포함하고 (예컨대 그것으로 구성되거나 그것으로 본질적으로 구성된다): H1의 VH 도메인 상의 위치 Q39K (카바트 넘버링); L1의 VL 도메인 상의 위치 Q38E; H2의 VH 도메인 상의 위치 Q39E (카바트 넘버링); 상기 H2의 CH1 도메인 상의 위치 S183E (EU 넘버링); L1의 VL 도메인 상의 위치 Q38K (카바트 넘버링); 및 L2의 CL 도메인 상의 V133K (EU 넘버링).
- [0518] 특정 구현예에서, 상이한 IgG 분자 (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것)에 도입된 아미노산 변형은 H1의 VH 도메인 중 Q39E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; L1의 VL 도메인 중 Q38K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; H1의 CH1 도메인 중 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링); L1의 CL 도메인 중 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링); H2의 VH 도메인 중 Q39K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; 그리고 L2의 VL 도메인 중 Q38E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함한다.
- [0519] 특정 구현예에서, 상이한 IgG 분자 (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것)에 도입된 아미노산 변형은 H1의 VH 도메인 중 Q39E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; L1의 VL 도메인 중 Q38K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; H1의 CH1 도메인 중 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링)으로 구성되고; L1의 CL 도메인 중 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링)으로 구성되고; H2의 VH 도메인 중 Q39K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; 그리고 L2의 VL 도메인 중 Q38E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함한다.
- [0520] 특정 구현예에서, 상이한 IgG 분자 (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것)에 도입된 아미노산 변형은 하기를 포함한다: H1의 VH 도메인 중 Q39K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링); L1의 VL 도메인 중 Q38E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링); H1의 CH1 도메인 중 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링); L1의 CL 도메인 중 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링); H2의 VH 도메인 중 Q39E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링); 및 L2의 VL 도메인 중 Q38K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함한다.

- [0521] 특정 구현예에서, 상이한 IgG 분자 (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것)에 도입된 아미노산 변형은 H1의 VH 도메인 중 Q39K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; L1의 VL 도메인 중 Q38E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; H1의 CH1 도메인 중 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링)으로 구성되고; L1의 CL 도메인 중 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링)으로 구성되고; H2의 VH 도메인 중 Q39E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; 그리고 L2의 VL 도메인 중 Q38K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함한다.
- [0522] 특정 구현예에서, 상이한 IgG 분자 (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것)에 도입된 아미노산 변형은 하기를 포함한다: H1의 CH1 도메인 중 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링); L1의 CL 도메인 중 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하고, H2의 CH1 도메인 중 S183E 치환 돌연변이 (EU 넘버링); 및 L2의 CL 도메인 중 V133K 치환 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함한다.
- [0523] 특정 구현예에서, 상이한 IgG 분자 (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것)에 도입된 아미노산 변형은 H1의 CH1 도메인 중 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하고; L1의 CL 도메인 중 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하고, H2의 CH1 도메인 중 S183E 치환 돌연변이 (EU 넘버링)으로 구성되고; 및 L2의 CL 도메인 중 V133K 치환 돌연변이 (EU 넘버링)로 구성된다.
- [0524] 특정 구현예에서, 상이한 IgG 분자 (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것)에 도입된 아미노산 변형은 H1의 CH1 도메인 중 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링)으로 구성되고; L1의 CL 도메인 중 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하고, H2의 CH1 도메인 중 S183E 치환 돌연변이 (EU 넘버링); 및 L2의 CL 도메인 중 V133K 치환 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함한다.
- [0525] 특정 구현예에서, 상이한 IgG 분자 (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것)에 도입된 아미노산 변형은 하기를 포함한다: H1의 VH 도메인 중 Q39E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; L1의 VL 도메인 중 Q38K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; H1의 CH1 중 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링); H1의 CL 도메인 중 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링); H2의 VH 도메인 중 Q39K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; H2의 CH1 중 S183E 치환 돌연변이 (EU 넘버링); L2의 VL 도메인 중 Q38E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; 그리고 L2의 CL 도메인 중 V133K 치환 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함한다.
- [0526] 특정 구현예에서, 상이한 IgG 분자 (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것)에 도입된 아미노산 변형은 H1의 VH 도메인 중 Q39E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; L1의 VL 도메인 중 Q38K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; H1의 CH1 중 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하고; H1의 CL 도메인 중 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하고; H2의 VH 도메인 중 Q39K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; H2의 CH1 중 S183E 치환 돌연변이 (EU 넘버링)로 구성되고; L2의 VL 도메인 중 Q38E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; 그리고 L2의 CL 도메인 중 V133K 치환 돌연변이 (EU 넘버링)로 구성된다.
- [0527] 특정 구현예에서, 상이한 IgG 분자 (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것)에 도입된 아미노산 변형은 H1의 VH 도메인 중 Q39E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; L1의 VL 도메인 중 Q38K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; H1의 CH1 중 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링)으로 구성되고; H1의 CL 도메인 중 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링)으로 구성되고; H2의 VH 도메인 중 Q39K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; H2의 CH1 중 S183E 치환 돌연변이 (EU 넘버링)로 구성되고; L2의 VL 도메인 중 Q38E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; 그리고 L2의 CL 도메인 중 V133K 치환 돌연변이 (EU 넘버링)로 구성된다.
- [0528] 특정 구현예에서, 상이한 IgG 분자 (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것)에 도입된 아미노산 변형은 H1의 VH 도메인 중 Q39K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링); L1의 VL 도메인 중 Q38E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링); H1의 CH1 도메인 중 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링); L1의 CL 도메인 중 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링); H2의 VH 도메인 중 Q39E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링); H2의 CH1 도메인 중 S183E 치환 돌연변이 (EU 넘버링); L2의 VL 도메인 중 Q38K 치환 돌연변이

(카바트 넘버링); 및 L2의 CL 중 V133K 치환 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함한다.

- [0529] 특정 구현예에서, 상이한 IgG 분자 (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것)에 도입된 아미노산 변형은 H1의 VH 도메인 중 Q39K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; L1의 VL 도메인 중 Q38E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; H1의 CH1 도메인 중 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하고; L1의 CL 도메인 중 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하고; H2의 VH 도메인 중 Q39E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; L2의 CL 중 V133K 치환 돌연변이 (EU 넘버링)로 구성되고; L2의 VL 도메인 중 Q38K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; 그리고 L2의 CL 중 V133K 치환 돌연변이 (EU 넘버링)로 구성된다.
- [0530] 특정 구현예에서, 상이한 IgG 분자 (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것)에 도입된 아미노산 변형은 H1의 VH 도메인 중 Q39K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; L1의 VL 도메인 중 Q38E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; H1의 CH1 도메인 중 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링)으로 구성되고; L1의 CL 도메인 중 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링)으로 구성되고; H2의 VH 도메인 중 Q39E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; L2의 CL 중 V133K 치환 돌연변이 (EU 넘버링)로 구성되고; L2의 VL 도메인 중 Q38K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; 그리고 L2의 CL 중 V133K 치환 돌연변이 (EU 넘버링)로 구성된다.
- [0531] 특정 구현예에서, 상이한 IgG 분자 (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것)에 도입된 아미노산 변형은 H1의 CH1 도메인 중 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링); L1의 CL 도메인 중 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하고, H2의 CH1 도메인 중 S183K 치환 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하고, 그리고 L2의 CL 도메인 중 V133E 치환 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함한다.
- [0532] 특정 구현예에서, 상이한 IgG 분자 (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것)에 도입된 아미노산 변형은 H1의 CH1 도메인 중 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하고; L1의 CL 도메인 중 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하고, H2의 CH1 도메인 중 S183K 치환 돌연변이 (EU 넘버링)으로 구성되고, 그리고 L2의 CL 도메인 중 V133E 치환 돌연변이 (EU 넘버링)로 구성된다.
- [0533] 특정 구현예에서, 상이한 IgG 분자 (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것)에 도입된 아미노산 변형은 H1의 CH1 도메인 중 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링)으로 구성되고; L1의 CL 도메인 중 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링), H2의 CH1 도메인 중 S183K 치환 돌연변이 (EU 넘버링)으로 구성되고, 그리고 L2의 CL 도메인 중 V133E 치환 돌연변이 (EU 넘버링)으로 구성된다.
- [0534] 특정 구현예에서, 상이한 IgG 분자 (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것)에 도입된 아미노산 변형은 H1의 VH 도메인 중 Q39E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링); L1의 VL 도메인 중 Q38K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링); H1의 CH1 도메인 중 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링); L1의 CL 도메인 중 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링), H2의 VH 도메인 중 Q39K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링), H2의 CH1 도메인 중 S183K 치환 돌연변이 (EU 넘버링), L2의 VL 도메인 중 Q38E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링), 및 L2의 CL 도메인 중 V133E 치환 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함한다.
- [0535] 특정 구현예에서, 상이한 IgG 분자 (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것)에 도입된 아미노산 변형은 H1의 VH 도메인 중 Q39E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; L1의 VL 도메인 중 Q38K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; H1의 CH1 도메인 중 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하고; L1의 CL 도메인 중 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하고; H2의 VH 도메인 중 Q39K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; H2의 CH1 도메인 중 S183K 치환 돌연변이 (EU 넘버링)으로 구성되고; L2의 VL 도메인 중 Q38E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; 그리고 L2의 CL 도메인 중 V133E 치환 돌연변이 (EU 넘버링)로 구성된다.
- [0536] 특정 구현예에서, 상이한 IgG 분자 (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것)에 도입된 아미노산 변형은 H1의 VH 도메인 중 Q39E 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; L1의 VL 도메인 중 Q38K 치환 돌연변이 (카바트 넘버링)을 포함하고; H1의 CH1 도메인 중 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링)으로 구성되고; L1의 CL 도메인 중 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링)으로

로 구성되고; H2의 VH 도메인 중 Q39K 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고; H2의 CH1 도메인 중 S183K 치환 돌연변이 (EU 넘버링)으로 구성되고; L2의 VL 도메인 중 Q38E 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고; 그리고 L2의 CL 도메인 중 V133E 치환 돌연변이 (EU 넘버링)로 구성된다.

[0537] 특정 구현예에서, 상이한 IgG 분자 (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것)에 도입된 아미노산 변형은 H1의 VH 도메인 중 Q39K 치환 돌연변이 (카밧 넘버링); L1의 VL 도메인 중 Q38E 치환 돌연변이 (카밧 넘버링); H1의 CH1 도메인 중 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링); L1의 CL 도메인 중 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링); H2의 VH 도메인 중 Q39E 치환 돌연변이 (카밧 넘버링), H2의 CH1 도메인 중 S183K 치환 돌연변이 (EU 넘버링); L2의 VL 도메인 중 Q38K 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고; 그리고 L2의 CL 도메인 중 V133E 치환 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함한다.

[0538] 특정 구현예에서, 상이한 IgG 분자 (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것)에 도입된 아미노산 변형은 H1의 VH 도메인 중 Q39K 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고; L1의 VL 도메인 중 Q38E 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고; H1의 CH1 도메인 중 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하고; L1의 CL 도메인 중 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링)을 포함하고; H2의 VH 도메인 중 Q39E 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, H2의 CH1 도메인 중 S183K 치환 돌연변이 (EU 넘버링)으로 구성되고; L2의 VL 도메인 중 Q38K 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고; 그리고 L2의 CL 도메인 중 V133E 치환 돌연변이 (EU 넘버링)로 구성된다.

[0539] 특정 구현예에서, 상이한 IgG 분자 (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것)에 도입된 아미노산 변형은 H1의 VH 도메인 중 Q39K 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고; L1의 VL 도메인 중 Q38E 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고; H1의 CH1 도메인 중 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링)으로 구성되고; L1의 CL 도메인 중 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링)으로 구성되고; H2의 VH 도메인 중 Q39E 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고, H2의 CH1 도메인 중 S183K 치환 돌연변이 (EU 넘버링)으로 구성되고; L2의 VL 도메인 중 Q38K 치환 돌연변이 (카밧 넘버링)을 포함하고; 그리고 L2의 CL 도메인 중 V133E 치환 돌연변이 (EU 넘버링)로 구성된다.

[0540] 특정 구현예에서, 상이한 IgG 분자 (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것)에 도입된 아미노산 변형은 치환 돌연변이의 하기 조합을 포함하고 (예컨대 그것으로 구성되거나 그것으로 본질적으로 구성된다): H1의 CH1 도메인 상의 L128F, A141M, F170M, S181I 및 S183A 돌연변이 (EU 넘버링) 및 L1의 CL 도메인 상의 F118V, S131T, V133A, L135Y, S162A, T164S, S176M, 및 T178L 돌연변이 (EU 넘버링).

[0541] 특정 구현예에서, 상이한 IgG 분자 (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것)에 도입된 아미노산 변형은 치환 돌연변이의 하기 조합을 포함하고 (예컨대 그것으로 구성되거나 그것으로 본질적으로 구성된다): H1의 CH1 도메인 상의 L128F, A141M, F170Y, S181I, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링) 및 L1의 CL 도메인 상의 F118V, S131T, V133A, L135F, S162A, S176A, 및 T178L 돌연변이 (EU 넘버링).

[0542] 특정 구현예에서, 상이한 IgG 분자 (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것)에 도입된 아미노산 변형은 치환 돌연변이의 하기 조합을 포함하고 (예컨대 그것으로 구성되거나 그것으로 본질적으로 구성된다): H1의 CH1 도메인 상의 L128F, A141T, F170M, S181T, S183A, 및 V185L 돌연변이 (EU 넘버링) 및 L1의 CL 도메인 상의 F118V, S131T, V133A, L135F, S162A, T164S, S176T, 및 T178L 돌연변이 (EU 넘버링).

[0543] 특정 구현예에서, 상이한 IgG 분자 (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것)에 도입된 아미노산 변형은 치환 돌연변이의 하기 조합을 포함하고 (예컨대 그것으로 구성되거나 그것으로 본질적으로 구성된다): H1의 CH1 도메인 상의 L128F, A141M, F170M, S181T, 및 S183A 돌연변이 (EU 넘버링) 및 L1의 CL 도메인 상의 F118V, S131T, V133A, L135F, S162M, T164S, S176M, 및 T178L 돌연변이 (EU 넘버링).

[0544] 특정 구현예에서, 상이한 IgG 분자 (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것)에 도입된 아미노산 변형은 치환 돌연변이의 하기 조합을 포함하고 (예컨대 그것으로 구성되거나 그것으로 본질적으로 구성된다): H1의 CH1 도메인 상의 A141I, F170S, S181M, S183V, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링) 및 L1의 CL 도메인 상의 F116A, V133I, L135V, S162M, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링).

[0545] 특정 구현예에서, 상이한 IgG 분자 (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것)에 도입된 아미노산 변형은 치환 돌연변이의 하기 조합을 포함하고 (예컨대 그것으로 구성되거나 그것으로 본질적으로 구성된다): H1의 CH1 도메인 상의 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링) 및 L1의 CL 도메인 상의 F116A, S131D, L135V, S162A, S174A, S176F, 및 T178I 돌연변이 (EU 넘버링).

- [0546] 특정 구현예에서, 상이한 IgG 분자 (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것)에 도입된 아미노산 변형은 치환 돌연변이의 하기 조합을 포함한다: H1의 CH1 도메인 상의 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링) 및 L1의 CL 도메인 상의 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링).
- [0547] 특정 구현예에서, 상이한 IgG 분자 (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것)에 도입된 아미노산 변형은 치환 돌연변이의 하기 조합으로 구성된다: H1의 CH1 도메인 상의 A141I, F170S, S181M, S183A, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링) 및 L1의 CL 도메인 상의 F116A, L135V, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링).
- [0548] 특정 구현예에서, 상이한 IgG 분자 (예컨대 상기에 기재된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 임의의 것)에 도입된 아미노산 변형은 치환 돌연변이의 하기 조합을 포함하고 (예컨대 그것으로 구성되거나 그것으로 본질적으로 구성된다): H1의 CH1 도메인 상의 A141I, F170A, S181M, S183V, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링) 및 L1의 CL 도메인 상의 F116A, L135V, S162M, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링).
- [0549] 전략 #2에 의해 확인된 CH1/CL 계면에 있는 돌연변이, 전략 #1에 의해 확인된 CH1/CL 계면에 있는 돌연변이, 및 VH 및 VL 도메인 중 돌연변이, 즉, 비제한적으로 상기에 기재된 것들의 추가 조합이 또한 고려된다. 그와 같은 조합은, 비제한적으로 아래에 기재된 것들을 포함한다:
- [0550] 용어들 "H1" 및 "H2"은 임의의 지정이고 구현예 중 임의의 것에서의 "H1" 및 "H2"가 역전될 수 있다는 것은 당해 분야의 숙련가에게 분명할 것이다. 즉, CH1 도메인 및/또는 H1의 VH 도메인 및 CL 도메인 및/또는 상기 L1의 VL 도메인 내에 있는 바와 같이 상기에 기재된 돌연변이 중 임의의 것은, 대안적으로, CH1 도메인 및/또는 H2의 VH 도메인 및 CL 도메인 및/또는 L2의 VL 도메인 내에 있을 수 있다.
- [0551] **특성**
- [0552] **우선적인 짝짓기/우선적인 어셈블리**
- [0553] "우선적인 짝짓기"가, 1종 이상의 추가의, 상이한 폴리펩타이드가 짝짓기가 제1과 제2 폴리펩타이드 사이에 일어나는 것과 동시에 존재할 때 제1 폴리펩타이드 (예컨대 H1)와 제2 폴리펩타이드 (예컨대 L1)와의 짝짓기 패턴을 기재한다. 우선적인 짝짓기는, 예를 들면, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1과 L1 사이에 일어난다, H1-L1 중쇄-경쇄 짝짓기의 양이 H1이 적어도 L1, 및 L2와 공-발현될 때 H1-L2 짝짓기의 양보다 더 크다면. 마찬가지로, 우선적인 짝짓기는 하기 사이에서 일어난다: 예를 들면, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2 및 L2, H2-L2 중쇄-경쇄 짝짓기의 양이, H2가 적어도 L1, 및 L2로 공-발현될 때 H2-L1 짝짓기의 양보다 더 컸다면. 특정 구현예에서, 우선적인 짝짓기는 VH/VL 도메인 및/또는 CH1/CL 도메인의 아미노산 변형으로부터 수득된다.
- [0554] 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1은 L1 와 우선적으로 쌍을 이룬다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 H2는 L2 와 우선적으로 쌍을 이룬다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1은 L1 와 우선적으로 쌍을 이룬다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1이 H2와 공발현될 때, 요망된 짝짓기를 포함하는 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1, 및 L2 (예를 들면, H1-L1 및 H2-L2)은 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 71%, 적어도 약 71%, 적어도 약 72%, 적어도 약 73%, 적어도 약 74%, 적어도 약 75%, 적어도 약 76%, 적어도 약 77%, 적어도 약 78%, 적어도 약 79%, 적어도 약 80%, 적어도 약 81%, 적어도 약 82%, 적어도 약 83%, 적어도 약 84%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 99% 초과(이들 값 사이의 임의의 범위 포함)의 상대 수율로 생성된다. 요망된 짝짓기를 포함하는 다중특이적 항원-결합 단백질 (예를 들면, H1-L1 및 H2-L2)의 상대 수율은 실시예에서 기재된 바와 같이, 예를 들면, 질량 분광분석법을 사용하여 결정될 수 있다.
- [0555] 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 발현된 폴리펩타이드는 잘못 짝지어진 중쇄 및 경쇄의 생성을 감소시키기 위해 개선된 특이성과 조합된다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 H1의 CH1 도메인은 생산 동안에 L1의 CL 도메인과 조립된다.

[0556] **우선적인 짝짓기/우선적인 어셈블리를 평가하는 방법**

[0557] H1의 CH1 도메인과 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 CL 도메인과의 우선적인 짝짓기 및/또는 우선적인 어셈블리 can be 당해 분야의 숙련가에게 잘 알려진 다양한 방법 중 임의의 하나를 사용하여 결정될 수 있다. 예를 들면, 다중특이적 항원-결합 단백질 중 H1의 CH1 도메인과 L1의 CL 도메인과의 우선적인 짝짓기의 정도는 경쟁 경쟁 검정 (LCCA)를 통해 결정될 수 있다. 국제 특허 출원 PCT/US2013/063306(2013년 10월 3일 출원)은, LCCA의 다양한 구현예를 기재하고 있고 모든 목적을 위해 그 전문이 본 명세서에 참고로 편입되어 있다. 상기 방법은 공-발현된 단백질의 혼합물 내에서 중쇄와 특정 경쇄와의 정량 분석을 허용하고 하나의 특정한 면역글로불린 중쇄가, 중쇄 및 경쇄가 공-발현될 때 2개의 면역글로불린 경쇄 중 하나가 선택적으로 회합되는 지를 결정하기 위해 사용될 수 있다. 본 방법은 간단히 아래와 같이 기재된다: 적어도 1개의 중쇄 및 2개의 상이한 경쇄는 중쇄가 제한적인 짝짓기 반응물인 비로 세포에서 공발현되고; 선택적으로 분비된 단백질을 세포로부터 분리하고; 중쇄에 결합된 면역글로불린 경쇄 폴리펩타이드를 분비된 단백질의 나머지에서 분리하여 분리된 중쇄 쌍으로 된 분획을 생성하고; 분리된 중쇄 분획에서 각 상이한 경쇄의 양을 탐지하고; 그리고 분리된 중쇄 분획에서 각 상이한 경쇄의 상대적인 양을 분석하여 경쇄 중 하나와 선택적으로 쌍을 이루는 적어도 1개의 중쇄의 능력을 결정한다.

[0558] 특정 구현예에서, H1의 CH1 도메인과 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 CL 도메인과의 우선적인 짝짓기는 질량 분광분석법 (예컨대 액체 크로마토그래피-질량 분광분석법 (LC-MS) 원상태 질량 분광분석법, 산성 질량 분광분석법, 등.)을 통해 결정된다. 질량 분광분석법은 각 상이한 중을 확인하기 위해 그것의 분자량의 차이를 사용하여 각 경쇄를 포함하는 상대 이중이량체 집단을 정량화하기 위해 사용된다.

[0559] 특정 구현예에서, H1의 CH1 도메인과 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 CL 도메인과의 우선적인 짝짓기는 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 중쇄/경쇄 쌍의 열 안정성을 검정함으로써 결정된다. 다중특이적 항원-결합 단백질 중 중쇄/경쇄 쌍의 열 안정성은 can be 당해 분야에서 공지된 방법에 따라 결정될 수 있다. 다중특이적 항원-결합 단백질 중 중쇄/경쇄 쌍의 용융 온도는 그것의 열 안정성을 나타낸다. 중쇄/경쇄 쌍의 용융점은 시차주사열량계와 같은 기술을 사용하여 특정될 수 있다: (Chen 등 (2003) Pharm Res 20:1952-60; Ghirlando 등 (1999) Immunol Lett 68:47-52). 대안적으로, 중쇄/경쇄 쌍의 열 안정성은 원형 2색성을 사용하여 측정될 수 있다 (Murray 등 (2002) J. Chromatogr Sci 40:343-9).

[0560] 특정 구현예에서, H1의 CH1 도메인과 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 CL 도메인과의 우선적인 짝짓기는 그것의 각각의 표적에 대한 중쇄/경쇄 쌍의 결합 친화도를 통해 결정된다. 상호작용의 온-레이트 및 해리속도상수는 당해 기술에서 잘 알려진 방법에 따라 경쟁적 결합 검정에 의해 결정될 수 있다. 특정 구현예에서, 경쟁적 결합 검정은 하기를 포함하는 방사선면역검정이다: 표지된 표적 (예를 들면, ^3H 또는 ^{125}I)과, 증가된 양의 비표지된 표적의 존재에서 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질과의 인큐베이션, 및 표지된 표적에 결합된 다중특이적 항원-결합 단백질의 검출. 특정 구현예에서, 표적에 대한 다중특이적 항원-결합 단백질의 친화도 및 결합 오프-레이트는 Scatchard 분석에 의한 포화 데이터로부터 결정될 수 있다.

[0561] 특정 구현예에서, H1의 CH1 도메인과 다중특이적 항원-결합 단백질의 L1의 CL 도메인과의 우선적인 짝짓기는 동력학 파라미터, 예컨대 K_D , k_{off} , k_{on} , R_{max} 를 측정하여 결정된다. 특정 구현예에서, 동력학 파라미터는 당해 기술에서 공지된 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 기반 검정을 통해 결정된다 (예를 들면, BIAcore 동력학 분석). SPR-기반 기술에 대한 검토에 대해, 참고 Mullet 등, 2000, Methods 22:77-91; Dong 등, 2002, Review in Mol. Biotech., 82:303-23; Fivash 등, 1998, Current Opinion in Biotechnology 9:97-101; Rich 등, 2000, Current Opinion In Biotechnology 11:54-61. 추가로, 하기에서 기재된 단백질-단백질 상호작용을 측정하기 위한 SPR 기기 및 SPR 기반 방법 중 임의의 것: U.S. 특허 번호 6,373,577; 6,289,286; 5,322,798; 5,341,215; 6,268,125가 고려된다.

[0562] 특정 구현예에서, 형광-활성화된 세포 분류 (FACS)은 당해 기술에서 잘 알려진 방법에 따라 그것의 표적(들)에 대한 다중특이적 항원-결합 단백질의 친화도를 측정하기 위해 사용된다. H1의 CH1 도메인과 L1의 CL 도메인과의 우선적인 짝짓기를검정하는 다른 방법은 하기에서 기재되어 있다: 예를 들면, WO 2014/081955, WO 2014/082179, 및 WO 2014/150973(이것은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본 명세서에 편입되어 있음).

[0563] **안정성**

[0564] 특정 구현예에서, H1의 CH1 도메인 상에 존재하는 1개 이상의 아미노산 치환(들) 및 L1의 CL 상에 존재하는 1개 이상의 아미노산 치환 돌연변이(들)는 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 안정성을 감소시키

지 않는다. 특정 구현예에서, H1의 CH1 도메인 상에 존재하는 1개 이상의 아미노산 치환(들), L1의 CL 상에 존재하는 1개 이상의 아미노산 치환 돌연변이(들), H1의 VH 상의 위치 Q39 (카뱃 넘버링)에서의 아미노산 치환 돌연변이, 및 L1의 VL의 위치 Q38 (카뱃 넘버링)에서의 아미노산 치환 돌연변이는 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 안정성을 감소시키지 않는다. 특정 구현예에서, H1의 CH1 도메인 상에 존재하는 1개 이상의 아미노산 치환(들), L1의 CL 상에 존재하는 1개 이상의 아미노산 치환 돌연변이(들), H1의 VH 상의 위치 Q39 (카뱃 넘버링)에서의 아미노산 치환 돌연변이, L1의 VL의 위치 Q38 (카뱃 넘버링)에서의 아미노산 치환 돌연변이, H2의 VH 상의 위치 Q39 (카뱃 넘버링)에서의 아미노산 치환 돌연변이, 및 L2의 VL의 위치 Q38 (카뱃 넘버링)에서의 아미노산 치환 돌연변이는, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 안정성을 감소시키지 않는다.

[0565] 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 안정성은 아미노산 치환 돌연변이 없는 다중특이적 항원-결합 단백질의 안정성의 적어도 약 80%, 적어도 약 81%, 적어도 약 82%, 적어도 약 83%, 적어도 약 84%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 99% 초과이다.

[0566] 다중특이적 항원-결합 단백질의 안정성은 당해 분야의 숙련가에게 공지된 단백질 안정성을 평가하기 위한 다양한 기술 중 임의의 하나를 사용하여 결정될 수 있다. 예를 들면, 원형 2색성 (CD)은 원편광의 흡수를 측정하는 분광 기술이다. 구조 예컨대 알파 나선 및 베타 시트는 키랄성이기 때문에, 원편광의 흡수는 단백질 앙상블의 접힘성의 정도의 마커로서 작용한다. 이러한 기술은 온도의 함수로서 흡수의 변화를 측정함으로써 단백질의 평형 언폴딩을 측정하기 위해 사용되었다. 원상태 및 변성 상태의 농도가 1인 전이 중간점에서의 온도는 단백질의 용융 온도 (T_m)으로 공지된다. CD에 관한 추가 세부사항은 예를 들면 하기에서 기재되어 있다: Kelly 등 (2000) *Curr Prot and Peptide Sci* 1, 349-384; Correa 등 (2009) *African J Biochem Res* 3, 164-173; 및 Greenfield (2006) *Nat Protoc*.1, 2527-2535.

[0567] 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 다중특이적 항원-결합 단백질 (예를 들면, 본 명세서에서 기재된 CH1/CL 변형 및/또는 VH/VL 변형 포함)은 CH1/CL 및/또는 VH/VL 도메인에서 아미노산 치환 돌연변이를 포함하지 않는 야생형 다중특이적 항원 결합 단백질의 T_m보다 약 10 °C 이하, 약 9.5 °C 이하, 약 9 °C 이하, 약 8.5 °C 이하, 약 8 °C 이하, 약 7.5 °C 이하, 약 7.0 °C 이하, 약 6.5 °C 이하, 약 6.0 °C 이하, 약 5.5 °C 이하, 약 5.0 °C 이하, 약 4.5 °C 이하, 약 4 °C 이하, 약 3.5 °C 이하, 약 3 °C 이하, 약 2.5 °C 이하, 약 2 °C 이하, 약 1.5 °C 이하, 약 1 °C 이하, 약 0.5 °C, 또는 약 0.5 °C 더 낮은 용융 온도를 갖는다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 다중특이적 항원-결합 단백질의 Fab (예를 들면, 본 명세서에서 기재된 CH1/CL 변형 및/또는 VH/VL 변형 포함)은 CH1/CL 및/또는 VH/VL 도메인에서 아미노산 치환 돌연변이를 포함하지 않는 다중특이적 항원 결합 단백질의 야생형 모 항체의 Fab의 T_m보다 약 10 °C 이하, 약 9.5 °C 이하, 약 9 °C 이하, 약 8.5 °C 이하, 약 8 °C 이하, 약 7.5 °C 이하, 약 7.0 °C 이하, 약 6.5 °C 이하, 약 6.0 °C 이하, 약 5.5 °C 이하, 약 5.0 °C 이하, 약 4.5 °C 이하, 약 4 °C 이하, 약 3.5 °C 이하, 약 3 °C 이하, 약 2.5 °C 이하, 약 2 °C 이하, 약 1.5 °C 이하, 약 1 °C 이하, 약 0.5 °C 이하, 또는 약 0.5 °C 더 낮은 용융 온도를 갖는다.

[0568] 대안적으로, 다중특이적 항원-결합 단백질의 안정성은, 예를 들면, 단백질에서 비-공유 결합 형성을 조절하는 열역학적 파라미터를 측정하는 시차주사열량계 (DSC)를 사용하여 결정될 수 있다. DSC에 관한 세부사항은 예를 들면 하기에서 기재되어 있다: Ionescu 등 (2008) *J Pharm Sci* 97, 1414-1426. 다중특이적 항원-결합 단백질의 안정성은 또한, 예를 들면, 표적 단백질의 열 안정성 및 예를 들면, 리간드 또는 제2 단백질에 대한 단백질의 결합시의 단백질 용융 온도의 변화를 측정하는 시차 주사 형광측정법 (DSF 또는 열 이동 검정)을 사용하여 결정될 수 있다. DSF에 관한 세부사항은, 예를 들면, 하기에서 기재되어 있다: Niesen, 등 (2007) *Nat Protoc* 2, 2212-2221.

[0569] 결합 친화도

[0570] 특정 구현예에서, H1의 CH1 도메인 상에 존재하는 1개 이상의 아미노산 치환(들) 및 L1의 CL 상에 존재하는 1개 이상의 아미노산 치환 돌연변이(들)은 항원에 대한 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 결합 친화도를 감소시키지 않는다. 특정 구현예에서, H1의 CH1 도메인 상에 존재하는 1개 이상의 아미노산 치환(들), L1의 CL 상에 존재하는 1개 이상의 아미노산 치환 돌연변이(들), H1의 VH 상의 위치 Q39 (카뱃 넘버링)에서의 아미노산 치환 돌연변이, 및 L1의 VL의 위치 Q38 (카뱃 넘버링)에서의 아미노산 치환 돌연변이는 항원에 대한 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 결합 친화도를 감소시키지 않는다. 특정

구현예에서, H1의 CH1 도메인 상에 존재하는 1개 이상의 아미노산 치환(들), L1의 CL 상에 존재하는 1개 이상의 아미노산 치환 돌연변이(들), H1의 VH 상의 위치 Q39 (카바트 넘버링)에서의 아미노산 치환 돌연변이, L1의 VL의 위치 Q38 (카바트 넘버링)에서의 아미노산 치환 돌연변이, H2의 VH 상의 위치 Q39 (카바트 넘버링)에서의 아미노산 치환 돌연변이, 및 L2의 VL의 위치 Q38 (카바트 넘버링)에서의 아미노산 치환 돌연변이는, 항원에 대한 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 결합 친화도를 감소시키지 않는다.

[0571] **결합 친화도를 측정하는 방법**

[0572] 본 명세서의 다른 곳에 언급된 바와 같이, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원 결합 단백질의 항원 결합은 K_d , k_{on} , 및/또는 k_{off} 을 포함하는 다양한 결합 동력학 파라미터 중 임의의 하나를 측정하여 평가될 수 있다. K_d 는 100 반응 단위 (RU)에서 고정된 표적 (예를 들면, 항원) CM5 칩으로 25° C에서 BIAcore™-T100 또는 BIAcore™-T200 (GE Healthcare, Piscataway, NJ)을 사용하는 표면 플라즈몬 공명 검정을 사용하여 측정될 수 있다. 간단히, 카복시메틸레이트화된 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, BIAcore Inc.)은 공급자의 지침에 따라 N-에틸 -N'-(3- 디메틸아미노프로필)-카보디이미드 하이드로클로라이드 (EDC) 및 N-하이드록시석신이미드 (NHS)로 활성화된다. 항원은 10 mM 아세트산나트륨(pH 4.8)로 희석되고, 5 µg/ml (~0.2 µM)에 주입된 후, 5 µl/분의 유량으로 주입하여 커플링된 단백질의 대략 100개의 반응 단위 (RU)를 달성한다. 항원의 주입 다음에, 1M 에탄올아민은 블록 미반응된 그룹에 주입된다. 동력학 측정에 대해, Fab의 2-배 연속 희석 (예를 들면, 0.78 nM 내지 500 nM)은 25° C에서 대략 25 µl/min의 유량에서에서 0.05% Tween 20 (PBST)와 함께 PBS에서 주입된다. 결합 속도 (k_{on}) 및 해리 속도 (k_{off})은 결합 및 해리 센서그램을 동시에 적합화하여 간단한 윈 -투-온 랑뮤어 결합 모델 (BIAcore Evaluation Software)을 사용하여 계산된다. 평형 해리 상수 (K_d)은 비 k_{off}/k_{on} 로서 계산된다. 참고, 예를 들면, Chen 등, J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). 온-레이트가 상기 면 플라즈몬 공명 검정에 의해 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 를 초과하면, 이때 상기 온-레이트는 분광기, 예컨대 교반 큐벳을 구비한 정지-유동 구비된 분광측정기 (Aviv Instruments) 또는 8000-시리즈 SLM-Aminco 분광측정기 (ThermoSpectronic)에서 측정된 바와 같이 증가 농도의 항원의 존재에서 PBS, pH 7.2에서 20 nM 항-항원 항체 (Fab 형태)의, 25° C에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 대역통과)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기술을 사용하여 결정될 수 있다.

[0573] 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원 결합 단백질의 K_d 는 CH1/CL 계면에서 돌연변이를 포함하지 않는 야생형 결합 단백질의 K_d 의 적어도 약 10% 이상, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 또는 약 50% 초과이다.

[0574] **면역원성**

[0575] 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질은 인간에서 비-면역원성 또는 실질적으로 비-면역원성이다. 특정 구현예에서, CH1 영역의 변형 (예컨대 1개 이상의 아미노산 치환)은 인간에서 비-면역원성 또는 실질적으로 비-면역원성이다. 특정 구현예에서, CL 영역의 변형 (예컨대 1개 이상의 아미노산 치환)은 인간에서 비-면역원성 또는 실질적으로 비-면역원성이다. 특정 구현예에서, CH1 영역의 변형 (예컨대 1개 이상의 아미노산 치환)은 인간 T-세포 에피토프를 초래하지 않는다. 특정 구현예에서, CL 영역의 변형 (예컨대 1개 이상의 아미노산 치환)은 인간 T-세포 에피토프를 초래하지 않는다. 본 명세서에서 제공된 면역원성 다중특이적 항원-결합 단백질은 당해 분야의 숙련가에게 잘 알려진 방법을 사용하여 평가될 수 있다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 면역원성 다중특이적 항원-결합 단백질은 ELISA를 통해 평가된다 (참고, 예를 들면, Yin 등 (2015) *Cell Immunol.* 295,118-126). 또한 하기를 참조한다.; 예를 들면, Hartmann 등 (2001) *Clin Cancer Res.* 7, 1873-1881.

[0576] **약동학적 특성**

[0577] 특정 구현예에서, H1의 CH1 도메인 상에 존재하는 1개 이상의 아미노산 치환(들) 및 L1의 CL 상에 존재하는 1개 이상의 아미노산 치환 돌연변이(들)은 그와 같은 아미노산 치환을 포함하지 않는 다중특이적 항원-결합 단백질과 비교하여 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 약동학적 특성에 상당히 영향을 주지 않는다. 특정 구현예에서, H1의 CH1 도메인 상에 존재하는 1개 이상의 아미노산 치환(들), L1의 CL 상에 존재하는 1개 이상의 아미노산 치환 돌연변이(들), H1의 VH 상의 위치 Q39 (카바트 넘버링)에서의 아미노산 치환 돌연변이, 및 L1의 VL의 위치 Q38 (카바트 넘버링)에서의 아미노산 치환 돌연변이는 그와 같은 아미노산 치환을 포함하지 않는 다중특이적 항원-결합 단백질과 비교하여 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 약동학적 특성에 상당히 영향을 주지 않는다. 특정 구현예에서, H1의 CH1 도메인 상에 존재하는 1개 이상의 아미노산 치환

(들), L1의 CL 상에 존재하는 1개 이상의 아미노산 치환 돌연변이(들), H1의 VH 상의 위치 Q39 (카바트 넘버링)에서의 아미노산 치환 돌연변이, L1의 VL의 위치 Q38 (카바트 넘버링)에서의 아미노산 치환 돌연변이, H2의 VH 상의 위치 Q39 (카바트 넘버링)에서의 아미노산 치환 돌연변이, 및 L2의 VL의 위치 Q38 (카바트 넘버링)에서의 아미노산 치환 돌연변이는 그와 같은 아미노산 치환을 포함하지 않는 다중특이적 항원-결합 단백질과 비교하여 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 약동학적 특성에 상당히 영향을 주지 않는다. 그와 같은 약력학적 특성은 하기를 포함한다: 예를 들면, C_{max}, AUC, CL (즉, 약물 청소능), t_{1/2}, V₁, 및 V_{ss}. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 C_{max}은 H1의 CH1, H1의 VH, L1의 CL, L1의 VL, H2의 CH1, H2의 VH, L2의 CL, 및/또는 L2의 VL에서 아미노산 치환을 포함하지 않는 다중특이적 항원-결합 단백질의 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 또는 160% (이들 값 사이의 임의의 범위 포함) 중 약 임의의 하나이다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 AUC는 H1의 CH1, H1의 VH, L1의 CL, L1의 VL, H2의 CH1, H2의 VH, L2의 CL, 및/또는 L2의 VL에서 아미노산 치환을 포함하지 않는 다중특이적 항원-결합 단백질의 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 또는 160% (이들 값 사이의 임의의 범위 포함) 중 약 임의의 하나이다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 CL (즉, 약물 청소능)은 H1의 CH1, H1의 VH, L1의 CL, L1의 VL, H2의 CH1, H2의 VH, L2의 CL, 및/또는 L2의 VL에서 아미노산 치환을 포함하지 않는 다중특이적 항원-결합 단백질의 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 또는 160% (이들 값 사이의 임의의 범위 포함) 중 약 임의의 하나이다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 t_{1/2}은 H1의 CH1, H1의 VH, L1의 CL, L1의 VL, H2의 CH1, H2의 VH, L2의 CL, 및/또는 L2의 VL에서 아미노산 치환을 포함하지 않는 다중특이적 항원-결합 단백질의 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 또는 160% (이들 값 사이의 임의의 범위 포함) 중 약 임의의 하나이다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 V₁은 H1의 CH1, H1의 VH, L1의 CL, L1의 VL, H2의 CH1, H2의 VH, L2의 CL, 및/또는 L2의 VL에서 아미노산 치환을 포함하지 않는 다중특이적 항원-결합 단백질의 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 또는 160% (이들 값 사이의 임의의 범위 포함) 중 약 임의의 하나이다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 V_{ss}은 H1의 CH1, H1의 VH, L1의 CL, L1의 VL, H2의 CH1, H2의 VH, L2의 CL, 및/또는 L2의 VL에서 아미노산 치환을 포함하지 않는 다중특이적 항원-결합 단백질의 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 또는 160% (이들 값 사이의 임의의 범위 포함) 중 약 임의의 하나이다.

[0578] **다중특이적 항체 포맷**

[0579] 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질은 당해 기술에서 공지된 다양한 이중특이적 또는 다중특이적 항체 포맷 중 임의의 하나와 함께 사용될 수 있다. 수많은 포맷은 다중 결합 특이성을 갖는 분자에 의해 부여된 치료 기회를 다루기 위해 당해 기술에서 개발되었다. 몇 개의 접근법은 특이적 항체 경쇄 또는 단편이 특이적 항체 중쇄 또는 단편과 쌍을 이루는 이중특이적 항체를 제조하기 위해 기재되었다.

[0580] 예를 들면, 국제 특허 출원 번호 PCT/EP2011/056388 (WO 2011/131746)는 이중이량체 단백질을 생성하는 시험관 내 방법을 기재하고, 이 방법에서, 비대칭 돌연변이는 환원 조건 하 인큐베이션 시에 2종의 단일특이적 IgG4 또는 IgG4-유사 항체 사이의 지향성 "Fab-arm" 또는 "하프-분자" 교환을 유도하기 위해 2종의 단일특이적 개시 단백질의 CH3 영역에 도입된다.

[0581] Schaefer 등 (Roche Diagnostics GmbH)은, 인공 링커의 사용 없이 2종의 존재하는 항체로부터 유도된 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를, 인간 2가 이중특이적 IgG 항체로 집합시키는 방법을 기재한다 (PNAS (2011) 108(27): 11187-11192 및 US 2009/0232811). 상기 방법은 이중특이적 항체의 이분의 일의 항원-결합 단편 (Fab) 내의 1개 이상의 중쇄 및 경쇄 도메인을 교환하는 것을 수반한다 (CrossMab). 중쇄의 이중이량체화를 가능하게 하는 낚-인투-홀 기술을 기반으로, 경쇄 및 그것의 동족 중쇄의 보정 회합은 이중특이적 항체의 이분의 일의 항원 결합 단편 (Fab) 내의 중쇄 및 경쇄 도메인의 교환에 의해 달성된다. 이러한 "교차"는 항원-결합 친화도를 유지하지만, 2개의 아암을 매우 상이하게 만들어 경쇄 짝짓기 오류가 더 이상 생기지 않게 한다. 참고 WO2009/080251, WO2009/080252, WO2009/080253, 및 WO2009/080254(이들 각각은 그 전문이 참고로 본 명세서에 편입되어 있음).

[0582] 낚-인투-홀은 항체의 CH3 도메인에 대한 이중이량체화 기술이다. 이전에, 낚-인투-홀 기술은 단일 공통 경쇄 (LC)를 갖는 인간 전장 이중특이적 항체의 생산에 적용되었다 (Merchant 등 "An efficient route to human bispecific IgG." Nat Biotechnol. 1998; 16:677-81; Jackman 등 "Development of a two-part strategy to identify a therapeutic human bispecific antibody that inhibits IgE receptor signaling." J Biol Chem.

2010; 285:20850-9.) 참고. 또한 W01996027011(이들은 모든 목적을 위해 그 전문이 본 명세서에 참고로 편입되어 있음).

- [0583] Strop 등 (Rinat-Pfizer Inc.)는, 관심의 2종의 항체를 개별적으로 발현 및 정제시키고, 및 그 다음 산화환원 조건 하에서 함께 혼합시켜 안정적인 이중특이적 항체를 생산하는 방법을 기재한다 (J. Mol. Biol. (2012) 420:204-19).
- [0584] 동종이량체보다 이종이량체 형성하는 것에 대해 강한 선호도를 갖는 다른 이종이량체화 도메인이 본 다중특이적 항원-결합 단백질에 편입될 수 있다. 예시적인 예는 비제한적으로, 예를 들면, 하기를 포함한다: W02007147901 (Kjaergaard 등 - Novo Nordisk: 이온성 상호작용 기재함); W0 2009089004 (Kannan 등 - Amgen: 정전기 조합 효과 기재함); W0 2010/034605 (Christensen 등 - Genentech; 이중나선 기재함). 참고 또한, 예를 들면, Pack, P. & Plueckthun, A., Biochemistry 31, 1579-1584 (1992) (류신 지퍼 또는 팩 등을 기재함), Bio/Technology 11, 1271-1277 (1993) (헬릭스-턴-헬릭스 모티프를 기재함). 어구 "헤테로다량체화 도메인" 및 "이종이량체화 도메인"은 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 1종 이상의 이종이량체화 도메인을 포함한다.
- [0585] Zhu 등 (Genentech)은 불변 도메인이 전혀 없는 변이체 도메인 항체 단편로 구성된 디아바디 작제물의 VL/VH 계면에서 돌연변이 조작하고 이종이량체 디아바디를 생성했다 (Protein Science (1997) 6:781-788). 유사하게, Igawa 등 (Chugai)은 또한, 선택적 발현을 촉진하고 디아바디의 형태적 이성질체화를 억제하기 위해 단일-사슬 디아바디의 VL/VH 계면에서 돌연변이를 조작했다 (Protein Engineering, Design & Selection (2010) 23:667-677).
- [0586] US 특허 공개 번호 2009/0182127 (Novo Nordisk, Inc.)은 Fc 계면에서, 그리고 다른 쌍의 중쇄와 상호작용하기 위해 하나의 쌍의 경쇄의 능력을 감소시키는 경쇄-중쇄 쌍의 CH1:CL 계면에서 아미노산 잔기를 변형시켜 이중특이적 항체의 생성을 기재한다.
- [0587] 이중특이적 T 세포 연관체 (BiTE) 분자에 대해 사용된 또 다른 포맷 (참고, 예를 들면, Wolf 등 (2005) Drug Discovery Today 10:1237-1244)은 단일 사슬 가변 단편 (scFv) 모듈을 기반으로 한다. scFv는, 일반적으로 적절하게 폴딩될 수 있는 가용성 링커를 통해 융합된 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 영역으로 구성되고, 이로써 상기 영역은 동족 항원에 결합할 수 있다. BiTE는 단일 사슬 상에서 일렬로 상이한 특이성의 2개의 scFv's를 연결한다. 이러한 배치구성은 동일한 중쇄 가변 영역의 2종의 카피로 분자를 생산하는 것을 불가능하게 한다. 또한, 링커 배치구성은 각각의 경쇄 및 중쇄의 보정 짝짓기를 보장하도록 설계된다.
- [0588] 다양한 이중특이적 및 다중특이적 항체 포맷의 검토는 아래에서 제공된다: Klein 등, (2012) *mAbs* 4:6, 653-663 및 Spiess 등 (2015) "Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies." *Mol. Immunol.* 2015년 1월 27일 온라인 공개; doi:10.1016/j.molimm.2015.01.003.
- [0589] 본 명세서에서 기재된 다중특이적 항원-결합 단백질은 상기 기재된 포맷 중 임의의 하나로 편입될 수 있다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 CH1/CL 및 VH/VL 돌연변이는 보정 중쇄/경쇄 짝짓기를 추가로 보장하기 위해 CrossMab 기술과 조합될 수 있다.
- [0590] **폴리뉴클레오타이드, 벡터, 및 숙주세포**
- [0591] **폴리뉴클레오타이드**
- [0592] 본 명세서에서 기재된 경쇄 및/또는 경쇄 불변 및/또는 가변 도메인을 인코딩하는 핵산이 본 명세서에서 제공된다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 단리된 핵산은 본 명세서에서 기재된 다중특이적 항원-결합 단백질의 적어도 1개의 폴리펩타이드 서열을 인코딩한다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 단리된 핵산은 본 명세서에서 기재된 다중특이적 항원-결합 단백질의 적어도 2개의 폴리펩타이드 서열을 인코딩한다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 단리된 핵산은 본 명세서에서 기재된 다중특이적 항원-결합 단백질의 적어도 3개의 폴리펩타이드 서열을 인코딩한다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 단리된 핵산은 본 명세서에서 기재된 다중특이적 항원-결합 단백질의 적어도 4개의 폴리펩타이드 서열을 인코딩한다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 단리된 핵산은 본 명세서에서 기재된 다중특이적 항원-결합 단백질의 적어도 4개 초과 폴리펩타이드 서열을 인코딩한다.
- [0593] 본 명세서에서 제공된 핵산 분자는 단일가닥 및 이중-가닥 형태 둘 모두에서의 DNA 및 RNA, 뿐만 아니라 대응하는 상보적 서열을 포함한다. DNA는, 예를 들면, cDNA, 게놈 DNA, 화학적으로 합성된 DNA, PCR에 의해 증폭된

DNA, 및 이들의 조합을 포함한다. 본 명세서에서 제공된 핵산 분자는 전장 유전자 또는 cDNA 분자 뿐만 아니라 그것의 단편의 조합을 포함한다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 핵산은 인간 공급원으로부터 유도된다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 핵산은 마우스 공급원으로부터 유도된다.

[0594] 본 명세서의 다른 곳에 언급된 바와 같이, "단리된" 핵산은, 천연 발생 공급원으로부터 단리된 핵산의 경우에 핵산이 단리되었던 유기체의 게놈에 존재하는 인접한 유전적 서열로부터 분리되었던 핵산이다. 템플레이트로부터 효소적으로 또는 화학적으로 합성된 핵산, 예컨대 PCR 생성물, cDNA 분자, 또는 올리고뉴클레오타이드의 경우에, 그와 같은 과정으로 생긴 핵산은 단리된 핵산인 것으로 이해된다. 단리된 핵산 분자는 별개의 단편의 형태의 또는 더 큰 핵산 작제물의 성분으로서 핵산 분자를 지칭한다.

[0595] 특정 구현예에서, 핵산은 실질적으로 내인성 물질을 오염시키지 않는다. 핵산 분자는 바람직하게는, 표준 생화학적 방법에 의해 실질적으로 순수한 형태로 및 그것의 성분 뉴클레오타이드 서열의 확인, 조작, 및 회수를 가능하게 하는 양 또는 농도로 적어도 1회 단리된 DNA 또는 RNA로부터 유도되었다 (예컨대 하기에서 개괄된 것: Sambrook 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)). 그와 같은 서열은 바람직하게는 진핵생물 유전자에 전형적으로 존재하는 내부 비-번역된 서열, 또는 인트랜스(intrans)에 의해 중단되지 않는 열린 해독틀의 형태로 제공되고/거나 작제된다. 비번역된 DNA의 서열은 열린 해독틀로부터 5' 또는 3'에 존재할 수 있고, 상기 해독틀은 코딩 영역의 조작 또는 발현을 방해하지 않는다.

[0596] 핵산 변이체는 카세트 또는 PCR 돌연변이유발 또는 당해 기술에서 잘 알려진 다른 기술을 사용하여 폴리펩타이드를 인코딩하는 DNA에서 뉴클레오타이드의 부위 특이적 돌연변이유발에 의해 통상적으로 제조되어, 본 명세서에서 설명된 바와 같이 변이체를 인코딩하는 DNA를 생성하고, 그 후에 세포 배양에서 재조합 DNA를 발현시킨다. 그러나, 최대 약 100-150 잔기를 갖는 변이체 CDR를 포함하는 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 확립된 기술을 사용하는 시험관내 합성에 의해 제조될 수 있다. 변이체는 전형적으로, 변형된 특징을 변이체가 또한 선택될 수 있지만 천연 발생 유사체와 동일한 정성적 생물학적 활성, 예를 들면, 항원에 대한 결합을 나타낸다.

[0597] 당해 기술의 숙련가에 의해 인정되는 바와 같이, 유전자 암호의 축퇴로 인해, 아주 큰 수의 핵산이 만들어질 수 있고, 이들 모두는 중쇄 및 경쇄의 CDR 또는 본 명세서에서 기재된 다량체 항원-결합 단백질의 다른 성분을 인코딩한다. 따라서, 확인된 특정한 아미노산 서열을 갖기 때문에, 당해 분야의 숙련가는 인코딩된 다량체 항원-결합 단백질의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 방식으로 1종 이상의 코돈의 서열을 간단히 변경시켜서 임의의 수의 상이한 핵산을 가질 수 있다.

[0598] **벡터**

[0599] 본 명세서에서 기재된 적어도 1종의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 플라스미드, 발현 벡터, 전사 또는 발현 카세트의 형태의 발현 시스템 및 작제물이 제공된다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 플라스미드, 발현 벡터, 전사 또는 발현 카세트는 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 적어도 1종의 폴리펩타이드 (예를 들면, 제1 중쇄, 제1 경쇄, 제2 중쇄, 또는 제2 경쇄)를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 플라스미드, 발현 벡터, 전사 또는 발현 카세트는 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 적어도 2종의 폴리펩타이드 (예를 들면, 제1 중쇄 및 제1 경쇄, 또는 제2 중쇄 및 제2 경쇄)를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 플라스미드, 발현 벡터, 전사 또는 발현 카세트는 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 적어도 4종의 폴리펩타이드 (예를 들면, 제1 중쇄, 제1 경쇄, 제2 중쇄, 및 제2 경쇄)를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0600] 전형적으로, 숙주세포에서 사용된 발현 벡터는 플라스미드 유지를 위해 그리고 외인성 뉴클레오타이드 서열의 클로닝 및 발현을 위해 서열을 함유할 것이다. 그와 같은 서열은, 집합적으로 "촉접 서열"로 칭하고, 특정 구현예에서 전형적으로 하기 뉴클레오타이드 서열 중 하나 이상을 포함할 것이다: 프로모터, 1종 이상의 인핸서 서열, 복제 원점, 전사 종결 서열, 공여체 및 수용체 스플라이스 부위를 함유하는 완전한 인트론 서열, 폴리펩타이드 분비를 위해 선도 서열을 인코딩하는 서열, 리보솜 결합 부위, 폴리아데닐화 서열, 발현될 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산을 삽입하기 위한 폴리링커 영역, 및 선별 마커 요소. 각각의 이들 서열은 아래에서 논의된다.

[0601] 선택적으로, 벡터는 "태그"-인코딩 서열, 즉, 폴리펩타이드 코딩 서열의 5' 또는 3' 말단에 전형적으로 위치한 올리고뉴클레오타이드 분자를 함유할 수 있고; 올리고뉴클레오타이드 서열은 polyHis (예컨대 hexaHis (서열식 별번호:66)), 또는 또 다른 "태그" 예컨대 상업적으로 입수가능한 항체가 존재하는 FLAG, HA (헤마글루티닌 인

플루엔자 바이러스), 또는 myc을 인코딩한다. 이러한 태그는 전형적으로 폴리펩타이드의 발현시 폴리펩타이드에 융합되고, 숙주세포로부터 폴리펩타이드의 친화도 정제 또는 검출의 수단으로써 쓰일 수 있다. 친화도 정제는, 예를 들면, 친화도 매트릭스로서 태그에 대한 항체를 사용하여 칼럼 크로마토그래피에 의해 달성될 수 있다. 선택적으로, 태그는 그 뒤에 절단을 위해 특정 펩타이드를 사용하는 것과 같은 다양한 수단에 의해 정제된 폴리펩타이드로부터 제거될 수 있다.

[0602] 측접 서열은 상동성 (즉, 숙주세포와 동일한 종 및/또는 균주), 이종성 (즉, 숙주세포 종 또는 균주 이외의 종 으로부터), 혼성 (즉, 1 초과의 공급원으로부터 측접 서열의 조합), 합성 또는 원상태일 수 있다. 이와 같이, 측접 서열의 공급원은 임의의 원핵 또는 진핵 유기체, 임의의 척추동물 또는 무척추동물 유기체, 또는 임의의 식물일 수 있고, 단, 측접 서열은 숙주 세포 기구에서 기능성이 있고, 그것에 의해 활성화될 수 있다.

[0603] 본 명세서에서 제공된 벡터에서 유용한 측접 서열은 몇 개의 방법 당해 기술에서 잘 알려져 있는 몇 개의 방법 중 임의의 것에 의해 수득될 수 있다. 전형적으로, 본 명세서에서 유용한 측접 서열은 맵핑 및/또는 제한 엔도 뉴클레아제 소화에 의해 이전에 확인되었고 따라서 적절한 제한 엔도뉴클레아제를 사용하여 적절한 조직 공급원 으로부터 단리될 수 있다. 일부 경우에, 측접 서열의 전체 뉴클레오타이드 서열은 공지될 수 있다. 여기서, 측 접 서열은 핵산 합성 또는 클로닝을 위해 본 명세서에서 기재된 방법을 사용하여 합성될 수 있다.

[0604] 측접 서열의 전부 또는 일부만이 공지되었는지, 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)을 사용하고/하거나 게놈 라이브러 리을, 적합한 프로브 예컨대 동일 또는 또 다른 종으로부터의 올리고뉴클레오타이드 및/또는 측접 서열 단편으 로 선별하여 수득될 수 있다. 측접 서열이 공지되지 않은 경우, 측접 서열을 함유하는 DNA의 단편은, 예를 들면, 코딩 서열 또는 심지어 또 다른 유전자 또는 유전자를 함유할 수 있는 더 큰 조각의 DNA로부터 단리될 수 있다. 단리는 적절한 DNA 단편을 생산하기 위해 제한 엔도뉴클레아제 소화, 그 다음 단리 아가로스 겔 정제, Qiagen® 칼럼 크로마토그래피 (Chatsworth, CA), 또는 숙련자에게 공지된 다른 방법을 사용하는 단리에 의해 달성되리 수 있다. 목적 이러한 목적을 달성하기 위한 적합한 효소의 선택은 당해 분야의 숙련자에게 쉽게 명백 할 것이다.

[0605] 복제 원점은 전형적으로 상업적으로 구매된 원핵 발현 벡터들의 일부이고, 상기 원점은 숙주세포에서 벡터의 증 폭에 도움이 된다. 선택된 벡터가 복제 원점 부위를 함유하지 않으면, 상기 벡터는 공지된 서열을 기반으로 화 학적으로 합성될 수 있고, 벡터로 결합될 수 있다. 예를 들면, 플라스미드 pBR322로부터의 복제 원점 (New England Biolabs, Beverly, MA)은 대부분의 그람-음성 박테리아, 및 다양한 바이러스 기원 (예를 들면, SV40, 폴리오마, 아데노바이러스, 소포성 구내염 바이러스 (VSV)에 적합하거나, 파필로마바이러스 예컨대 HPV 또는 BPV)은 포유동물 세포에서 벡터의 클로닝에 유용하다. 일반적으로, 복제 성분의 기원은 포유동물 발현 벡터에 대해 필요하지 않다 (예를 들면, SV40 기원은, 바이러스 초기 프로모터를 함유하기 때문에 종종 사용된다).

[0606] 전사 종결 서열은 전형적으로 폴리펩타이드 코딩 영역의 3'에서 말단에 위치하고 전사를 종결하기 위해 쓰인다. 보통, 원핵 세포 중 전사 종결 서열은 G-C 풍부 단편 그 다음 폴리-T 서열이다. 서열은 라이브러리로부터 쉽게 클로닝되거나 심지어 벡터의 일부로서 상업적으로 구매할 수 있지만, 핵산 합성의 방법 예컨대 본 명세서에서 기재된 것을 사용하여 포함 쉽게 합성될 수 있다.

[0607] 선택가능한 마커 유전자는 선택적 배양 배지에서 성장된 숙주세포의 생존 및 성장에 필요한 단백질을 인코딩한 다. 전형적인 선택 마커 유전자는 하기인 단백질을 인코딩한다: (a) 원핵 숙주세포에 대해 항생제 또는 다른 독 소, 예를 들면, 암피실린, 테트라사이클린, 또는 카나마이신에 대한 내성을 부여하고; (b) 세포의 영양요구성 결핍을 보충하거나; 또는 (c) 복잡하거나 한정된 배지로부터 이용불가능한 중요한 영양소를 공급한다. 특정 선 별 마커는 카나마이신 저항 유전자, 암피실린 저항 유전자, 및 테트라사이클린 저항 유전자이다. 유익하게는, 네오마이신 저항 유전자는 또한, 원핵 및 진핵 숙주 세포 모두에서 선택하기 위해 사용될 수 있다.

[0608] 다른 선택가능한 유전자는 발현될 유전자를 증폭시키기 위해 사용될 수 있다. 증폭은, 성장 또는 세포 생존에 중요한 단백질의 생산에 필요한 요전자가 재조합 세포의 연속적인 생성의 염색체 내에 일렬로 반복되는 과정이 다. 포유동물 세포의 적합한 선별 마커의 예는 디하이드로폴레이트 환원효소 (DHFR) 및 프로모터 없는 티미딘 키나제 유전자를 포함한다. 포유동물 세포 형질전환체는, 유일한지 형질전환체가 벡터에 존재하는 선택가능한 유전자 덕택에 생존하도록 독특하게 적응된 선택 압력 하에 놓인다. 선별 압력은 배지 중 선택 체계의 농도가 연속하여 증가되는 조건하에서 전환된 세포를 배양함으로써 가해지고, 이로써 또 다른 유전자, 예컨대 항체 경 쇄 또는 중쇄와 같은 또 다른 유전자를 인코딩하는 선택가능한 유전자 및 DNA 둘 모두가 증폭된다. 그 결과, 증 가된 양의 폴리펩타이드는 증폭된 DNA로부터 합성된다.

- [0609] 리보솜-결합 부위는 보통 mRNA의 번역 개시에 필요하고 샤인-달가르노 서열 (원핵생물) 또는 코작 서열 (진핵생물)를 특징으로 한다. 요소는 전형적으로 프로모터에 대해 3'에 그리고 발현될 폴리펩타이드의 코딩 서열에 대해 5'에 위치한다. 특정 구현예에서, 1종 이상의 코딩 영역은 내부 리보솜 결합 부위 (IRES)에 작동가능하게 연결될 수 있고, 이로써 단일 RNA 전사체로부터 2개의 열린 해독틀의 번역을 허용한다.
- [0610] 당화가 진핵 숙주 세포 발현 시스템에서 요망되는 것과 같은 일부 경우에, 당화 또는 수율을 개선하기 위해 다양한 프리- 또는 프로서열을 조작할 수 있다. 예를 들면, 당업자는 특정한 신호 펩타이드의 펩티다아제 절단 부위를 변경시키거나, 당화에 또한 영향을 줄 수 있는 프로서열을 첨가할 수 있다. 최종 단백질 생성물은 (성숙한 단백질의 제1 아미노산에 관한) -1 위치에서 1종 이상의 추가의 아미노산이 발현되어, 전적으로 제거되지 않을 수 있다. 예를 들면, 최종 단백질 생성물은 아미노-말단에 부착된 펩티다아제 절단 부위에서 발견된 1 또는 2개의 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 대안적으로, 일부 효소 절단 부위의 사용은, 효소가 성숙한 폴리펩타이드 내의 그와 같은 영역에서 절단되면 약간 절단된 형태의 요망된 폴리펩타이드를 초래한다.
- [0611] 본 명세서에서 제공된 클로닝 벡터 및 발현은 전형적으로, 숙주 유기체에 의해 기술적으로 인식되고 폴리펩타이드를 인코딩하는 분자에 작동가능하게 연결된 프로모터를 함유할 것이다. 프로모터는 비전사된 서열 위치한 업스트림 (즉, 5'), 구조적 유전자의 전사를 조절하는 구조 유전자 (일반적으로 약 100 내지 1000 bp 내)의 시작 코돈에 대해, 프로모터는 종래에 2개의 클래스 중 하나로 그룹화된다: 유도성 프로모터 및 항시성 프로모터.유도성 프로모터는 배양 조건, 예컨대 영양소의 존재 또는 부재 또는 온도의 변화에서 일부 변화에 대한 반응에서 그것의 조절 하에서 DNA로부터 증가된 수준의 전사를 개시한다. 항시성 프로모터는, 다른 한편으로, 작동가능하게 연결된, 즉, 유전자 발현을 거의 또는 전혀 제어하지 않으면서 유전자를 균일하게 전사한다. 다양한 잠재적인 숙주세포에 의해 기술적으로 인식된 다수의 프로모터는 잘 알려져 있다. 적합한 프로모터는 예를 들면, 제한 효소 소화에 의해 공급원 DNA로부터 프로모터를 제거하고 요망된 프로모터 서열을 벡터에 삽입함시킴으로써 중쇄 또는 경쇄를 인코딩하는 DNA에 작동가능하게 연결된다.
- [0612] 효모 호스트와 함께 사용되는 적합한 프로모터는 또한 당해 기술에서 잘 알려져 있다. 효모 인헨서는 유익하게는 효모 프로모터와 함께 사용된다. 포유동물 숙주세포와 함께 사용되는 적합한 프로모터는 잘 알려져 있고, 비제한적으로, 하기의 계놈으로부터 수득된 것들을 포함한다: 바이러스 예컨대 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스, 아데노바이러스 (예컨대 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 사이토메갈로 바이러스, 레트로바이러스, 간염-B 바이러스 및 가장 바람직하게는 유인원 바이러스 40 (SV40). 다른 적합한 포유동물 프로모터는 이중성 포유동물 프로모터, 예를 들면, 열-충격 프로모터 및 액틴 프로모터를 포함한다.
- [0613] 관심을 끌 수 있는 추가의 프로모터는, 비제한적으로 하기를 포함한다: SV40 초기 프로모터 (Benoist 및 Chambon, 1981, Nature 290:304-310); CMV 프로모터 (Thomsen 등, 1984, Proc. Natl. Acad. U.S.A. 81: 659-663); 루 육종 바이러스의 3' 긴 말단 반복체 내에 함유된 프로모터 (Yamamoto 등, 1980, Cell 22:787-797); 헤르페스 티미딘 키나제 프로모터 (Wagner 등, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1444-1445); 메탈로티오네인 유전자로부터의 프로모터 및 조절 서열 (Prinster 등, 1982, Nature 296:39-42); 및 원핵 프로모터 예컨대 베타-락타마제 프로모터 (Villa-Kamaroff 등, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731); 또는 tac 프로모터 (DeBoer 등, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25). 조직 특이성을 나타내고 트랜스제닉 동물에서 이용되었던 하기 동물 전사 조절 영역이 또한 관심 대상이다: 췌장 썬파리 세포에서 활성인 엘라스타제 I 유전자 조절 영역 (Swift 등, 1984, Cell 38:639-646; Omitz 등, 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515); 췌장 베타 세포에서 활성인 인슐린 유전자 조절 영역 (Hanahan, 1985, Nature 315:115-122); 림프양 세포에서 활성인 면역글로불린 유전자 조절 영역 (Grosschedl 등, 1984, Cell 38:647-658; Adames 등, 1985, Nature 318:533-538; Alexander 등, 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444); 고환, 유방, 림프양 및 비만 세포에서 활성인 마우스 유선 종양 바이러스 대조군 영역 (Leder 등, 1986, Cell 45:485-495); 간에서 활성인 알부민 유전자 조절 영역 (Pinkert 등, 1987, Genes and Devel. 1:268-276); 간에서 활성인 알파-페타-단백질 유전자 조절 영역 (Krumlauf 등, 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648; Hammer 등, 1987, Science 253:53-58); 간에서 활성인 알파 1-항트립신 유전자 조절 영역 (Kelsey 등, 1987, Genes and Devel.1:161-171); 골수 세포에서 활성인 베타-글로빈 유전자 조절 영역 (Mogam 등, 1985, Nature 315:338-340; Kollias 등, 1986, Cell 46:89-94); 뇌의 회소돌기교세포 세포에서 활성인 수초 염기성 단백질 유전자 조절 영역 (Readhead 등, 1987, Cell 48:703-712); 골격 근육에서 활성인 미오신 경쇄-2 유전자 조절 영역 (Sani, 1985, Nature 314:283-286); 및 시상하부에서 활성인 생식선자극성 방출 호르몬 유전자 조절 영역 (Mason 등, 1986, Science 234:1372-1378).
- [0614] 인헨서 서열은 고등 진핵생물에 의해 본 명세서에서 제공된 경쇄 또는 중쇄를 인코딩하는 DNA의 전사를 증가시

키기 위해 벡터에 삽입될 수 있다. 인헨서는 전사를 증가시키기 위해 프로모터 상에서 작용하는 보통 약 10-300 bp 길이의 DNA의 시스-작용 요소이다. 인헨서는 상대적으로 배향 및 위치 독립적이며, 전사 단위에 대한 5' 및 3' 둘 모두의 위치에서 발견되었다. 포유동물 유전자로부터 이용가능한 몇 개의 인헨서 서열은 공지되어 있다 (예를 들면, 글로빈, 엘라스타제, 알부민, 알파페토-단백질 및 인슐린). 전형적으로, 그러나, 바이러스로부터의 인헨서가 사용된다. 당해 기술에서 공지된 SV40 인헨서, 사이토메갈로바이러스 초기 프로모터 인헨서, 폴리오마 인헨서, 및 아데노바이러스 인헨서는 진행 프로모터의 활성을 위한 예시적인 향상 요소이다. 인헨서는 코딩 서열에 대해 5' 또는 3'의 벡터에서 배치될 수 있지만, 프로모터로부터의 부위 5'에서 전형적으로 위치한다. 적절한 원상태 또는 이중성 신호 서열 (선도 서열 또는 신호 펩타이드)을 인코딩하는 서열은 다중특이적 항원-결합 단백질의 세포외 분비를 촉진하기 위해 발현 벡터에 편입될 수 있다. 신호 펩타이드 또는 리더의 선택은, 다중 특이적 항원-결합 단백질이 생성되고 이중성 신호 서열이 원상태 신호 서열을 대체할 수 있는 숙주세포의 유형에 좌우된다. 포유동물 숙주세포에서 작용성이 있는 신호 펩타이드의 예는 하기를 포함한다: 하기에서 기재된 인터류킨-7 (IL-7)의 신호 서열: US 특허 번호 4,965,195; 하기에서 기재된 인터류킨-2 수용체의 신호 서열: Cosman 등, 1984, Nature 312:768; 하기에서 기재된 인터류킨-4 수용체 신호 펩타이드: EP 특허 번호 0367 566; 하기에서 기재된 유형 I 인터류킨-I 수용체 신호 펩타이드: U.S. 특허 번호 4,968,607; 하기에서 기재된 유형 II 인터류킨-I 수용체 신호 펩타이드: EP 특허 번호 0 460 846.

[0615] 벡터는, 벡터가 숙주세포 계통에 통합될 때의 발현을 용이하게 하는 1종 이상의 요소를 함유할 수 있다. 그 예는 하기를 포함한다: EASE 요소 (Aldrich 등, 2003 Biotechnol Prog. 19:1433-38) 및 매트릭스 부착 영역 (MAR). MAR은 염색질의 구조적 조직화를 매개하고 통합된 벡터를 "위치" 효과로부터 격리할 수 있다. 따라서, MAR은, 벡터가 안정적인 감염체를 만들기 위해 사용될 때, 특히 유용하다. 수많은 천연 및 합성 MAR-함유 핵산은 당해 기술, 예를 들면, 하기에 공지되어 있다: 미국특허 번호 6,239,328; 7,326,567; 6,177,612; 6,388,066; 6,245,974; 7,259,010; 6,037,525; 7,422,874; 7,129,062.

[0616] 본 명세서에서 제공된 발현 벡터는 개시 벡터 예컨대 상업적으로 입수가능한 벡터로부터 작제될 수 있다. 그와 같은 벡터는 또는 모든 요망된 측점 서열을 함유할 수 없다. 본 명세서에서 기재된 측점 서열 중 하나 이상이 벡터에 이미 존재하지 않는 경우, 개별적으로 수득되고 벡터로 결합될 수 있다. 각각의 측점 서열을 얻기 위해 사용된 방법은 당해 분야의 숙련가에게 잘 알려져 있다.

[0617] 벡터가 작제되었고 경쇄, 중쇄, 또는 경쇄 및 중쇄 서열을 인코딩하는 핵산 분자는 벡터의 적절한 부위로 삽입된 후에, 완료된 벡터는 증폭 및/또는 폴리펩타이드 발현을 위해 적합한 숙주세포에 삽입될 수 있다. 발현 벡터의 선택된 숙주세포로의 전환은 형질감염, 감염, 인산칼슘 공동침전, 전기천공, 미세주입, 리포펙션, DEAE-덱스트란 매개된 형질감염, 또는 다른 공지된 기술을 포함하는 공지된 방법에 의해 달성될 수 있다. 선택된 방법은 부분적으로 사용될 숙주세포의 유형의 기능일 것이다. 이들 방법 및 다른 적합한 방법은 숙련가에게 잘 알려져 있고, 예를 들면, 하기에서 제시된다: Sambrook 등, 2001, 상기. 특정 구현예에서, 제1 중쇄, 제1 경쇄, 제2 중쇄 및 제1 경쇄를 발현시킬 수 있는 1종 이상의 벡터는 숙주세포에 도입된다.

[0618] 숙주세포

[0619] 또한, 상기에 기재된 발현 시스템 또는 작제물을 포함하는 숙주세포가 제공된다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 단일 숙주세포로부터 발현된다. 숙주세포는, 적절한 조건 하에서 배양될 때, 배양 배지 (숙주세포가 배지로 상기 단백질을 분비하면)로부터 또는 그것을 생산하는 숙주세포 (분비되지 않으면)로부터 직접적으로 수집될 수 있는 다중특이적 항원-결합 단백질을 합성한다. 적절한 숙주세포의 선택은 다양한 인자, 예컨대 요망된 발현 수준, 활성 (예컨대 당화 또는 인산화)에 대해 바람직하거나 필요한 폴리펩타이드 변형 및 생물학적 활성 분자로의 폴딩의 용이성에 좌우될 것이다. 숙주세포는 진행 또는 원핵일 수 있다.

[0620] 발현용 호스트로서 이용가능한 포유동물 세포주는 당해 기술에서 잘 알려져 있고, 비제한적으로, 미국 종균 협회 (ATCC)로부터 이용가능한 불멸화된 세포주를 포함하고 당해 기술에서 공지된 발현 시스템에서 사용된 임의의 세포주는 본 명세서에서 제공된 재조합 폴리펩타이드를 만들기 위해 사용될 수 있다. 일반적으로, 숙주세포는 요망된 다중특이적 항원-결합 단백질을 인코딩하는 DNA를 포함하는 재조합 발현 벡터로 전환된다. 이용될 수 있는 숙주세포 중에는 원핵생물, 효모 또는 고등 진핵 세포가 있다. 원핵생물은 그람 음성 또는 그람 양성 유기체, 예를 들면 E. 콜리 또는 바실러스를 포함한다. 고등 진핵 세포는 곤충 세포 및 포유동물 기원의 확립된 세포주를 포함한다. 적합한 포유동물 숙주 세포주의 예는 하기를 포함한다: 원숭이 신장 세포의 COS-7 계통 (ATCC CRL 1651) (Gluzman 등, 1981, Cell 23:175), L 세포, 293 세포, C127 세포, 3T3 세포 (ATCC CCL 163), 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포, 또는 그것의 유도체 예컨대 무혈청 배지에서 성장된 Veggie CHO 및 관련된

세포주 (Rasmussen 등, 1998, Cytotechnology 28:31), HeLa 세포, BHK (ATCC CRL10) 세포주, 및 하기에 의해 기재된 바와 같이 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포주 CVI로부터 유도된 CVI/EBNA 세포주 (ATCC CCL 70): McMahan 등, 1991, EMBO J. 10:2821, 인간 배아 신장 세포 예컨대 293, 293 EBNA 또는 MSR 293, 인간 표피 A431 세포, 인간 Colo205 세포, 다른 전환된 영장류 세포주, 정상 2배체 세포, 1차 조직의 시험관내 배양으로부터 부토 유도된 세포주, 1차 외식편, HL-60, U937, HaK 또는 저켓 세포. 선택적으로, 포유동물 세포주 예컨대 HepG2/3B, KB, NIH 3T3 또는 S49는, 예를 들면, 다양한 신호 변환 또는 리포터 검정에서 폴리펩타이드를 사용하는 것이 바람직할 때 폴리펩타이드의 발현을 위해 사용될 수 있다. 대안적으로, 하등 진핵생물 예컨대 효모 또는 원핵생물 예컨대 박테리아에서 폴리펩타이드를 생성할 수 있다. 적합한 효모는 *사카로마이세스 세레비지애*, *쉬조사카로마이세스 폼베*, *클루이베로마이세스* 균주, *칸디다* 균주, *피치아* 균주, 또는 이중성 폴리펩타이드를 발현시킬 수 있는 임의의 효모 균주를 포함한다. 적합한 균주는 *에스케리치아 콜라이*, *바실러스 서브틸리스*, *살모넬라 타이피뮤리움*, 또는 이중성 폴리펩타이드를 발현시킬 수 있는 임의의 균주를 포함한다.

[0621] 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 다중특이적 항원-결합 단백질을 발현시키는 세포주가 제공된다. 특정 구현예에서, 세포주는 원핵 세포주이다. 특정 구현예에서, 세포주는 E. 콜리 세포주이다. 특정 구현예에서, HC1, LC1, HC2, 및 LC2는 동일한 원핵 세포에서 공발현된다. 특정 구현예에서, HC1, LC1, HC2, 및 LC2는 동일한 E. 콜리 세포에서 공발현된다. 특정 구현예에서, HC1, LC1, HC2, 및 LC2는 동일한 진핵 세포에서 공발현된다. 특정 구현예에서, 세포주는 진핵 세포주이다. 특정 구현예에서, 세포주는 안정적인 세포주이다. 특정 구현예에서, 안정적인 세포주는 포유동물 세포주이다. 특정 구현예에서, 안정적인 세포주는 CHO 세포주이다. 특정 구현예에서, 안정적인 세포주에 의해 발현된 다중특이적 항원-결합 단백질의 적어도 약 85%, 약 86%, 약 87%, 약 88%, 약 89%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 99% 초과는 정확하게 조립된다 (즉, 여기서 LC1은 HC1와 쌍을 이루고, 여기서 LC2는 HC2와 쌍을 이룬다). 안정적인 세포주는 당해 분야에서 공지된 방법에 의해 생성될 수 있다. 특정 구현예에서, 안정적인 세포주는 HC1, LC1, HC2, 및 LC2를 발현시키는 폴리뉴클레오타이드(들)의 숙주세포 계능으로의 무작위 또는 표적화된 통합에 의해 생성된다.

[0622] 다중특이적 항원-결합 단백질이 효모 또는 박테리아에서 만들어지면, 기능성 생성물을 얻기 위해 예를 들면 적절한 부위의 인산화 또는 당화에 의해 본 명세서에서 생산된 생성물을 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 그와 같은 공유 결합은 공지된 화학 또는 효소 방법을 사용하여 달성될 수 있다. 폴리펩타이드는 또한 1종 이상의 곤충 발현 벡터 본 명세서에 제공된 단리된 핵산을 적합한 조절 서열에서 작동가능하게 연결시키고, 곤충 발현 시스템을 이용하여 생산될 수 있다. 배콜로바이러스/곤충 세포 발현 시스템에 대한 물질 및 방법은 하기로부터 키트 형태로 상업적으로 입수가능하다: 예를 들면, Invitrogen, San Diego, Calif., U.S.A. (MaxBac 키트), 및 그와 같은 방법은 하기에서 기재된 바와 같이 당해 기술에서 잘 알려져 있다: Summers 및 Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No.1555 (1987), 및 Luckow 및 Summers, Bio/Technology 6:47 (1988). 무세포 번역 시스템은 본 명세서에서 개시된 핵산 작제물로부터 유도된 RNA를 사용하여 폴리펩타이드, 예컨대 항체 또는 단백을 생산하도록 또한 이용될 수 있다. 박테리아, 진균, 효모, 및 포유동물 세포성 호스트와 함께 사용하기 위한 적절한 클로닝 및 발현 벡터는 하기에 의해 기재된다: Pouwels 등 (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985). 바람직하게는 적어도 1종의 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결된, 본 명세서에 제공된 단리된 핵산을 포함하는 숙주세포는 "재조합 숙주세포"이다.

[0623] 특정 구현예에서, 세포주는, 세포주가 고 발현 수준을 가지며 요망된 결합 특성을 갖는 다중특이적 항원-결합 단백질을 구성적으로 생산하는지의 결정을 통해 선택될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 그것의 자체의 항체를 만들지는 못하지만 이중성 다중특이적 항원-결합 단백질을 제조하고 분지하는 수용력을 갖는 B 세포 계통의 세포주가 선택될 수 있다.

[0624] **다중특이적 항원-결합 단백질의 생산 및 정제**

[0625] **숙주세포 배양**

[0626] 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 다중특이적 항원-결합 단백질을 생성하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 (a) H1, H2, L1, 및 L2를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 숙주세포에 도입하는 단계; 및 (b) 상기 숙주세포를 배양하여 다중특이적 항원-결합 단백질을 생성하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, L1 및 L2를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 예정된 비(예를 들면, 몰비 또는 중량 비)로 상기 숙주세포에 도입된다. 특정 구현예에서, L1 및 L2를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는, L1:L2의 비 (예를 들면, 몰비 또는 중량 비)가 약 1:1, 약 1:1.5, 약 1:2, 약 1:2.5, 약 1:3, 약 1:3.5, 약 1:4, 약 1:4.5, 약 1:5, 약 1:5.5, 약 1.5:1, 약 2:1, 약

2.5:1, 약 3:1, 약 3.5:1, 약 4:1, 약 4.5:1, 약 5:1, 또는 약 5.5:1(이들 값 사이의 임의의 범위 포함)이 되도록 숙주세포에 도입된다. 특정 구현예에서, 비는 몰비이다. 특정 구현예에서 비는 중량 비이다. 특정 구현예에서, H1 및 H1를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 예정된 비(예를 들면, 몰비 또는 중량 비)로 상기 숙주세포에 도입된다. 특정 구현예에서, H1 및 H2를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는, H1:H2의 비 (예를 들면, 몰비 또는 중량 비)가 약 1:1, 약 1:1.5, 약 1:2, 약 1:2.5, 약 1:3, 약 1:3.5, 약 1:4, 약 1:4.5, 약 1:5, 약 1:5.5, 약 1.5:1, 약 2:1, 약 2.5:1, 약 3:1, 약 3.5:1, 약 4:1, 약 4.5:1, 약 5:1, 또는 약 5.5:1(이들 값 사이의 임의의 범위 포함)이도록 숙주세포에 도입된다. 특정 구현예에서, 비는 몰비이다. 특정 구현예에서 비는 중량 비이다. 특정 구현예에서, H1, H2, L1 및 L2를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 예정된 비(예를 들면, 몰비 또는 중량 비)로 상기 숙주세포에 도입된다. 특정 구현예에서, H1, H2, L1, 및 L2를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는, H1 + H2 : L1 + L2의 비 (예를 들면, 몰비 또는 중량 비)가 약 5:1, 약 5:2, 약 5:3, 약 5:4, 약 1:1, 약 4:5, 약 3:5, 약 2:5, 또는 약 1:5(이들 값 사이의 임의의 범위 포함)이도록 숙주세포에 도입된다. 특정 구현예에서, LC1, LC2, HC1, 및 HC2를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는, 하기이도록 숙주세포에 도입된다: LC1:LC2:HC1:HC2의 비 (예를 들면, 몰비 또는 중량 비)가 약 1:1:1:1, 약 2.8:1:1:1, 약 1.4:1:1:1, 약 1:1.4:1:1, 약 1:2.8:1:1, 약 1:1:2.8:1, 약 1:1:1.4:1, 약 1:1:1:2.8, 또는 약 1:1:1:1.4(이들 값 사이의 임의의 범위 포함). 특정 구현예에서, 비는 몰비이다. 특정 구현예에서 비는 중량 비이다.

[0627] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질을 생성하는 방법은 추가로, 세포로의 도입을 위해 폴리뉴클레오타이드의 최적의 비를 결정하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 질량 분광분석법은 다중특이적 항원-결합 단백질 수율 (예컨대 이중특이적 항체 수율)을 결정하기 위해 사용되고, 최적의 사슬 비는 다중특이적 항원-결합 단백질 수율 (예컨대 이중특이적 항체 수율)을 최대화하도록 조정된다. 특정 구현예에서, 이중 항원 ELISA은 다중특이적 항원-결합 단백질 수율 (예컨대 이중특이적 항체 수율)을 결정하기 위해 사용되고, 최적의 사슬 비는 수율을 최대화하도록 조정된다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질을 생성하는 방법은 추가로, 다중특이적 항원-결합 단백질을 세포 배양으로부터 수확 또는 회수하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질을 생성하는 방법은 추가로, 수확되거나 회수된 다중특이적 항원-결합 단백질을 정제하는 것을 포함한다.

[0628] 본 명세서에서 제공된 요망된 다중특이적 항원-결합 단백질 (예컨대 이중특이적 항체)을 생산하기 위해 사용된 숙주세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 상업적으로 입수가 가능한 배지 예컨대 Ham's F10 (Sigma), 최소 필수 배지 ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), 및 둘베코 변형 이글 배지 ((DMEM), 시그마)은 숙주세포를 배양하는데 적합하다. 또한, 하기에서 기재된 배지 중 임의의 것: Ham 등, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes 등, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), U.S. 특허 번호 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 또는 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 U.S. 특허 Re.30,985는 숙주세포를 위해 배양 배지로서 사용될 수 있다. 이들 배지 중 임의의 것은 필요에 따라 하기로 보강될 수 있다: 호르몬 및/또는 다른 성장 인자 (예컨대 인슐린, 트랜스페린, 또는 표피 성장 인자), 염 (예컨대 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘, 및 포스페이트), 완충액 (예컨대 HEPES), 뉴클레오타이드 (예컨대 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예컨대 GENTAMYCINTM 약물), 미량 원소 (마이크로몰 범위로 최종 농도에 보통 존재하는 무기 화합물로 정의됨), 및 글루코오스 또는 동등 에너지 공급원. 임의의 다른 필요한 보충물은 또한, 당해 분야의 숙련자에게 공지된 적절한 농도로 포함될 수 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH, 및 기타 동종의 것은 발현을 위해 선택된 숙주세포와 함께 이전에 사용된 것이고, 당업자에게 명백할 것이다.

[0629] **다중특이적 항원-결합 단백질의 수확 또는 회수 및 정제**

[0630] 관련된 측면에서, 본 명세서에서 기재된 다중특이적 항원-결합 단백질을 생성하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 다중특이적 항원-결합 단백질의 발현을 허용하는 조건 하에서 상기에 기재된 숙주세포를 배양하는 단계 및 상기 다중특이적 항원-결합 단백질을 회수하는 (예컨대 수확하는) 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 본 방법은 추가로, 예를 들면, 추가 검정 및 사용을 위해 실질적으로 균질한 제제를 얻기 위해 회수된 다중특이적 항원-결합 단백질 (예컨대 이중특이적 항체)를 정제하는 단계를 포함한다.

[0631] 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질은 세포내에서 생산될 수 있거나, 또는 배지로 직접적으로 분비될 수 있다. 다중특이적 항원-결합 단백질이 제1 단계로서 세포내에서 생산되면, 미립자 잔해, 숙주세포 또는 용해된 단편은 예를 들면, 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거된다. 다중특이적 항원-결합 단백질이 배지로 분비되는 경우, 그와 같은 발현 시스템으로부터의 상층액은 일반적으로 상업적으로 입수가 가능한 단백질 농축 필터, 예를 들면, Amicon 또는 Millipore Pellicon 한외여과 장치를 사용하여 먼저 농축된다. 프로테아제 저해제 예컨대 PMSF는 단백질분해를 억제하기 위해 전술한 단계 중 임의의 것에 포함될 수 있고 항생제는 우발적인 오

염물질의 성장을 방지하기 위해 포함될 수 있다.

- [0632] 표준 단백질 정제 당해 분야에서 공지된 방법은 세포로부터 다중특이적 항원-결합 단백질의 실질적으로 균질한 제제를 얻기 위해 이용될 수 있다. 하기 절차는 적합한 정제 절차를 예시한다: 면역친화성 또는 이온교환 칼럼 상의 분별화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 또는 양이온교환 수지 상의 크로마토그래피 예컨대 DEAE, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 암모늄 설페이트 침전, 및 예를 들면, Sephadex G-75를 사용하는 겔 여과.
- [0633] 추가로 또는 대안적으로, 제조된 다중특이적 항원-결합 단백질은 예를 들면, 수산화인회석 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 및 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제될 수 있고, 친화성 크로마토그래피가 바람직한 정제 기술이다.
- [0634] 특정 측면에서, 상기에 기재된 바와 같은 세포 배양 배지로부터 유도된 제제는 관심 다중특이적 항원-결합 단백질의 단백질 A에의 특이적 결합을 허용하도록 단백질 A 고정된 고상 상에 적용된다. 그 다음 고상은 세정되어 고상에 비특이적으로 결합된 오염물질을 제거한다. 다중특이적 항원-결합 단백질 (예컨대 이중특이적 항체)은 용출에 의한 고상으로부터 무질서유발제 또는 중성 세제를 함유하는 용액으로 회수된다. 예시적인 무질서유발제 및 중성 세제는, 비제한적으로, 구아니딘-HCl, 우레아, 리튬 퍼플로레이트, 아르기닌, 히스티딘, SDS (나트륨 도데실 설페이트), Tween, 트리톤, 및 NP-40를 포함하고, 이들 모두는 상업적으로 입수가능하다.
- [0635] 친화도 리간드로서 단백질 A의 적합성은 다중특이적 항원-결합 단백질에 존재하는 임의의 면역글로불린 Fc 도메인의 중 및 아이소타입에 좌우된다. 단백질 A는 인간 $\gamma 1$, $\gamma 2$, 또는 $\gamma 4$ 중쇄를 기반으로 하는 항체를 정제하기 위해 사용될 수 있다 (Lindmark 등, *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13 (1983)). 단백질 G은 모든 마우스 아이소타입 및 인간에 대해 권고된다: $\gamma 3$ (Guss 등, *EMBO J.* 5: 15671575 (1986)). 친화도 리간드가 부착된 매트릭스는 가장 흔한 아가로스이지만 다른 매트릭스가 이용가능하다. 기계적으로 안정적인 매트릭스 예컨대 조절된 기공 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가로스보다 달성될 수 있는 것보다 더 빠른 유량 및 더 짧은 처리 시간을 허용한다. 다중특이적 항원-결합 단백질이 $C_{\mu 3}$ 도메인을 포함하는 경우, Bakerbond ABX™ 수지 (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ)은 정제에 유용하다. 단백질 정제에 대한 다른 기술 예컨대 이온교환 칼럼 상의 분별화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상의 크로마토그래피, 헤파린 SEPHAROSE™ 상의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온교환수지에 대한 크로마토그래피 (예컨대 폴리아스파르트산 칼럼), 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 및 암모늄 설페이트 침전은 회수될 다중특이적 항원-결합 단백질에 따라 또한 이용가능하다.
- [0636] 임의의 예비 정제 단계(들) 다음에, 관심 다중특이적 항원-결합 단백질 및 오염물질을 포함하는 혼합물에 대해 약 2.5-4.5의 pH에서 용출 완충액을 사용하는 낮은 pH 소수성 상호작용 크로마토그래피가 수행될 수 있고, 바람직하게는 낮은 염 농도 (예를 들면, 약 0-0.25M 염)에서 수행된다. 다중특이적 항원-결합 단백질의 생산은 (진술한 특정한 방법 중 임의의 것에 대해) 폴리펩타이드의 혼합물을 포함하는 용액을 투석하는 단계를 대안적으로 또는 추가로 포함할 수 있다.
- [0637] **다중특이적 항원-결합 단백질의 라이브러리**
- [0638] 본 명세서에서 기재된 복수의 다중특이적 항원-결합 단백질을 포함하는 라이브러리가 본 명세서에서 제공된다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 폴리뉴클레오타이드 라이브러리 (예컨대 본 명세서에서 기재된 폴리뉴클레오타이드 중 복수의 임의의 것)이다. 특정 구현예에서, 라이브러리는 폴리펩타이드 라이브러리 (예컨대 본 명세서에서 기재된 폴리펩타이드 중 복수의 임의의 것)이다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 폴리펩타이드 라이브러리는 폴리펩타이드 디스플레이 라이브러리이다. 그와 같은 폴리펩타이드 디스플레이 라이브러리는 치료제, 예방적, 수의과, 진단, 시약, 또는 물질 적용을 비제한적으로 포함하는 다양한 유용성에 대한 요망된 특성과 함께 결합 단백질을 선택하고/거나 진화시키기 위해 선별될 수 있다.
- [0639] 특정 구현예에서, 적어도 2, 3, 4, 5, 10, 30, 100, 250, 500, 750, 1000, 2500, 5000, 7500, 10000, 25000, 50000, 75000, 100000, 250000, 500000, 750000, 1000000, 2500000, 5000000, 7500000, 10000000, 또는 10000000 초과 개의 상이한 다중특이적 항원-결합 단백질을 포함하는 라이브러리가 제공되고, 이들 각각은 H1의 CH1 도메인 상의 위치 S183 (EU 넘버링)에서의 아미노산 치환 돌연변이 및 L1의 CL 도메인 상의 위치 V133 (EU 넘버링)에서의 아미노산 치환 돌연변이를 포함한다. 추가로 또는 대안적으로, 라이브러리 중 다중특이적 항원-결합 단백질은 A141I, F170S, S181M, S183V, 및 V185A 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) H1의 CH1 도메인, 및 F116A, V133I, L135V, S162M, S174A, S176F, 및 T178V 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) L1의 CL 도메인을 포함한다. 추가로 또는 대안적으로, 라이브러리 중 다중특이적 항원-결합 단백질은 A141I, F170S,

- 122 -

링)를 포함하는, (그것으로 구성되거나 본질적으로 구성되는 것을 포함하는) L1의 CL 도메인을 포함한다.

- [0642] 추가로 또는 대안적으로, 라이브러리 중 다중특이적 항원-결합 단백질은 H1의 VH 도메인 상의 위치 Q39 (카바트 넘버링)에 있는 아미노산 치환 돌연변이 및 L1의 VL 도메인 상의 위치 Q38 (카바트 넘버링)에 있는 아미노산 치환 돌연변이를 포함한다. 추가로 또는 대안적으로, 라이브러리 중 다중특이적 항원-결합 단백질은 H2의 VH 도메인 상의 위치 Q39 (카바트 넘버링)에 있는 아미노산 치환 돌연변이 및 L2의 VL 도메인 상의 위치 Q38 (카바트 넘버링)에 있는 아미노산 치환 돌연변이를 포함한다.
- [0643] 특정 구현예에서, 적어도 2, 3, 4, 5, 10, 30, 100, 250, 500, 750, 1000, 2500, 5000, 7500, 10000, 25000, 50000, 75000, 100000, 250000, 500000, 750000, 1000000, 2500000, 5000000, 7500000, 10000000, 또는 10000000 초과 개의, 그것의 상보성 결정 영역 (CDRS)에서 독특한 서열을 갖는 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질을 포함하는 라이브러리가 제공된다 (이들 값 사이의 임의의 범위 포함). 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질 라이브러리는 하기의 서열 다양성을 갖는다: 약 2, 약 5, 약 10, 약 50, 약 100, 약 250, 약 500, 약 750, 약 10^3 , 약 10^4 , 약 10^5 , 약 10^6 , 약 10^7 , 약 10^8 , 약 10^9 , 약 10^{10} , 약 10^{11} , 약 10^{12} , 약 10^{13} , 약 10^{14} , 또는 약 10^{14} 초과 (예컨대 약 10^{15} 또는 약 10^{16}) (이들 값 사이의 임의의 범위 포함).
- [0644] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질 라이브러리는 유전공학을 통해 생성된다. 돌연변이유발 및 후속의 라이브러리 작제에 대한 다양한 방법은 (선별 또는 선택에 대한 적절한 방법과 함께) 이전에 기재되었다. 그와 같은 돌연변이유발 방법은, 비제한적으로, 예를 들면, 오투유발 PCR, 루프 서플링, 또는 올리고뉴클레오타이드-지향된 돌연변이유발, 랜덤 뉴클레오타이드 삽입 또는 재조합 전의 다른 방법을 포함한다. 이들 방법에 관한 추가 세부사항은 하기에 기재되어 있다: 예를 들면, Abou-Nadler 등 (2010) *Bioengineered Bugs* 1, 337-340; Firth 등 (2005) *Bioinformatics* 21, 3314-3315; Cirino 등 (2003) *Methods Mol Biol* 231, 3-9; Pirakitikulr (2010) *Protein Sci* 19, 2336-2346; Steffens 등 (2007) *J. Biomol Tech* 18, 147-149; 및 다른 것. 따라서, 특정 구현예에서, 유전적 공학 기술을 통해 생성된 다중특이적 항원-결합 단백질 라이브러리가 제공된다.
- [0645] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질 라이브러리는 시험관내 번역을 통해 생성된다. 간단히, 시험관내 번역은 단백질-코딩 서열(들)을 프로모터 함유 벡터로 클로닝시키고, 클로닝된 서열(들)을 RNA 폴리머라제로 전사시켜 mRNA를 생성하고, 그리고 무세포 추출물을 사용하여 이러한 mRNA 시험관내, 예를 들면의 번역으로 단백질을 합성하는 것을 수반한다. 요망된 돌연변이체 단백질은 클로닝된 단백질-코딩 서열을 변경시켜서 간단히 생성될 수 있다. 많은 mRNAs는 밀 배아 추출물 또는 토끼 망상적혈구 용해물에서 효율적으로 번역될 수 있다. 시험관내 번역에 관한 추가 세부사항은 예를 들면 하기에 기재되어 있다: Hope 등 (1985) *Cell* 43, 177-188; Hope 등 (1986) *Cell* 46, 885-894; Hope 등 (1987) *EMBO J.* 6, 2781-2784; Hope 등 (1988) *Nature* 333, 635-640; 및 Melton 등 (1984) *Nucl.Acids Res.* 12, 7057-7070.
- [0646] 따라서, 본 명세서에서 기재된 폴리펩타이드 디스플레이 라이브러리를 인코딩하는 복수의 핵산 분자가 제공된다. 복수의 핵산 분자에 작동가능하게 연결된 발현 벡터가 또한 본 명세서에서 제공된다.
- [0647] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질 라이브러리는 화학 합성을 통해 생성된다. 고상 및 액상 펩타이드 합성 방법은 당해 기술에서 잘 알려져 있고, 기재된 하기에 상세히 기재된다: 예를 들면, *Methods of Molecular Biology*, 35, Peptide Synthesis Protocols, (M. W. Pennington 및 B.M. Dunn Eds), Springer, 1994; Welsch 등 (2010) *Curr Opin Chem Biol* 14, 1-15; *Methods of Enzymology*, 289, Solid Phase Peptide Synthesis, (G.B.Fields Ed.), Academic Press, 1997; *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, (P.Lloyd-Williams, F. Albericio, 및 E. Giralt Eds), CRC Press, 1997; *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach*, (W. C. Chan, P. D. White Eds), Oxford University Press, 2000; *Solid Phase Synthesis, A Practical Guide*, (S.F. Kates, F Albericio Eds), Marcel Dekker, 2000; P.Seneci, *Solid-Phase Synthesis and Combinatorial Technologies*, John Wiley & Sons, 2000; *Synthesis of Peptides and Peptidomimetics* (M. Goodman, Editor-in-chief, A.Felix, L. Moroder, C.Tmiolo Eds), Thieme, 2002; N.L.Benoiton, *Chemistry of Peptide Synthesis*, CRC Press, 2005; *Methods in Molecular Biology*, 298, Peptide Synthesis and Applications, (J. Howl Ed) Humana Press, 2005; 및 *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry, Volume 3, Building Blocks, Catalysts and Coupling Chemistry*, (A.B.Hughs, Ed.) Wiley-VCH, 2011. 따라서, 특정 구현예에서, 화학 합성 기술을 통해 생성된 다중특이적 항원-결합 단백질 라이브러리가 제공된다.
- [0648] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질 라이브러리는 디스플레이 라이브러리를 포함한다. 특정 구현예

에서, 디스플레이 라이브러리는 파아지 디스플레이 라이브러리, 파아지미드(mid) 디스플레이 라이브러리, 바이러스 디스플레이 라이브러리, 박테리아 디스플레이 라이브러리, 효모 디스플레이 라이브러리, gt11 라이브러리, 시스 디스플레이 라이브러리, 및 시험관내 구획화 라이브러리, 또는 리보솜 디스플레이 라이브러리이다. 그와 같은 디스플레이 라이브러리를 제조 및 선별하는 방법은 당해 분야의 숙련자에게 잘 알려져 있고 하기에 기재되어 있다: 예를 들면, Molek 등 (2011) *Molecules* 16, 857-887; Boder 등, (1997) *Nat Biotechnol* 15, 553-557; Scott 등 (1990) *Science* 249, 386-390; Brisette 등 (2007) *Methods Mol Biol* 383, 203-213; Kenrick 등 (2010) *Protein Eng Des Sel* 23, 9-17; Freudl 등 (1986) *J Mol Biol* 188,491-494; Getz 등 (2012) *Methods Enzymol* 503, 75-97; Smith 등 (2014) *Curr Drug Discov Technol* 11, 48-55; Hanes, 등 (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94,4937-4942; Lipovsek 등, (2004) *J Imm Methods* 290, 51-67; Ullman 등 (2011) *Brief.Funct.Genomics*, 10, 125-134; Odegrip 등 (2004) *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 2806-2810; 및 Miller 등 (2006) *Nat Methods* 3, 561-570.

[0649] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질 라이브러리는 예를 들면 하기에 기재된 기술에 의해 생성된 RNA-단백질 융합 라이브러리를 포함한다: Szostak 등, US 6258558, US 6261804, US 5643768, 및 US 5658754. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질 라이브러리는 예를 들면, US 6416950에서 기재된 바와 같이 DNA-단백질 라이브러리를 포함한다.

[0650] **다중특이적 항원-결합 단백질 라이브러리의 지향된 발생**

[0651] 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원 결합 단백질은 예를 들면, 2종 이상의 관심 표적 리간드에 대한 개선된 결합 친화도를 갖는 다가 항원 결합 단백질을 확인하게 위해 선별될 수 있다. 따라서, 적어도 2종의 관심 표적 리간드 (예를 들면, 본 명세서의 다른 곳에 기재된 2종 이상의 관심 표적 리간드) 에 특이적으로 결합하는 다중특이적 항원-결합 단백질을 얻는 방법이 본 명세서에 기재된다.

[0652] 특정 구현예에서, 상기 방법은 하기를 포함한다: a) 제1 표적 리간드를 다중특이적 항원-결합 단백질의 라이브러리 (예컨대 본 명세서에서 기재된 라이브러리)와, 다중특이적 항원-결합 단백질:제1 표적 리간드 착물을 형성하도록 하는 조건 하에서 접촉시키는 단계, (b) 다중특이적 항원-결합 단백질:제1 표적 리간드 착물의 형성을 검출하는 단계, 및 (c) 상기 복합체를 제1 표적 리간드에 특이적으로 결합하는 다중특이적 항원-결합 단백질로부터 얻는 단계.

[0653] 추가로 또는 대안적으로, 특정 구현예에서, 상기 방법은 하기를 포함한다: a) 제2 표적 리간드를 다중특이적 항원-결합 단백질의 라이브러리 (예컨대 본 명세서에서 기재된 라이브러리)와, 다중특이적 항원-결합 단백질:제2 표적 리간드 착물을 형성하도록 하는 조건 하에서 접촉시키는 단계, (b) 다중특이적 항원-결합 단백질:제2 표적 리간드 착물의 형성을 검출하는 단계, 및 (c) 상기 복합체를 제2 표적 리간드에 특이적으로 결합하는 다중특이적 항원-결합 단백질로부터 얻는 단계.

[0654] 특정 구현예에서, 하기를 포함하는 복합체가 제공된다: 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질 및 제1 표적 리간드 (즉, 다중특이적 항원-결합 단백질:표적 리간드 착물). 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질 및 제2 표적 리간드를 포함하는 복합체가 제공된다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질, 제1 표적 리간드, 및 제2 표적 리간드를 포함하는 복합체가 제공된다. 특정 구현예에서, 2종 이상의 표적 리간드에 결합할 수 있는 다중특이적 항원-결합 단백질이 제공된다. 특정 구현예에서, 본 방법은 추가로, (d) 2종 이상의 표적 리간드에 특이적으로 결합하는 다중특이적 항원-결합 단백질의 핵산 서열을 결정하는 단계를 포함한다.

[0655] 특정 구현예에서, 2종 이상의 표적 리간드에 특이적으로 결합하는 다중특이적 항원-결합 단백질은 친화도 성숙을 겪는다. 이 방법에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 제1 표적 및/또는 제2 표적에 대한 증가된 친화도를 선택하는 계획을 겪는다 (참고 Wu 등 (1998) *Proc Natl Acad Sci USA*.95, 6037-42). 특정 구현예에서, 제1 표적 리간드에 특이적으로 결합하는 다중특이적 항원-결합 단백질은 라이브러리 스크린으로부터 확인 후 추가로 무작위화된다. 예를 들면, 특정 구현예에서, 제1 표적 리간드에 특이적으로 결합하는 다중특이적 항원-결합 단백질을 얻는 방법은 추가로, (e) 다중특이적 항원-결합 단백질로부터 수득된 다중특이적 항원-결합 단백질의 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, 및/또는 CDR-L3을 무작위화하는 것을 포함한다: 제1 표적 리간드 착물은 추가의 다중특이적 항원-결합 단백질을 생성하기 위해 이전에 이전에 확인되었다, (f) 제1 표적 리간드를 상기 추가의 무작위화된 다중특이적 항원-결합 단백질과 접촉시키는 단계, (g) 하기의 형성을 검출하는 단계: 추가의 무작위화된 다중특이적 항원-결합 단백질:제1 표적 리간드 착물, 및 (h) 상기 복합체로부터, 제1 표적 리간드 에 특이적으로 결합하는 추가의 무작위화된 다중특이적 항원-결합 단백질을 얻는 단계. 추가로 또는 대안

적으로, 특정 구현예에서, 단계 (e)-(h)은 제2 표적 리간드와 반복된다.

- [0656] 특정 구현예에서, 본 방법은 추가로, (i) 제1 (및/또는 제2) 표적 리간드 에 특이적으로 결합하는 다중특이적 항원-결합 단백질의 핵산 서열을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0657] 특정 구현예에서, 추가의 무작위화된 다중특이적 항원-결합 단백질은 제1 라이브러리에서 이전에 무작위화되지 않은 적어도 1종 또는 적어도 2종의 무작위화된 CDR을 포함한다. 무작위화, 선별 및 선택의 여러 라운드는, 제1 및/또는 제2 표적 리간드에 대해 충분한 친화도를 갖는 n 다중특이적 항원-결합 단백질(들) 이 수득될 때까지 수행될 수 있다. 따라서, 특정 구현예에서, 단계 (e)-(h) 또는 단계 (e)-(i)은 제1 표적 리간드에 특이적으로 결합하는 다중특이적 항원-결합 단백질을 확인하기 위해 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 10 배 초과로 반복된다. 추가로 또는 대안적으로, 특정 구현예에서, 단계 (e)-(h) 또는 단계 (e)-(i)은 제2 표적 리간드에 특이적으로 결합하는 다중특이적 항원-결합 단백질을 확인하기 위해 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 10 배 초과로 반복된다.
- [0658] 특정 구현예에서, 무작위화, 선별 및 선택의 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 10 초과 라운드를 겪는 다중특이적 항원-결합 단백질은 무작위화, 선별, 및 선택의 1 라운드를 겪은 다중특이적 항원-결합 단백질의 친화도 만큼 적어도 높은 친화도로 표적 리간드에 결합한다. 특정 구현예에서, 무작위화, 선별 및 선택의 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 10 초과 라운드를 겪은 다중특이적 항원-결합 단백질은 무작위화, 선별, 및 선택의 1 라운드를 겪은 다중특이적 항원-결합 단백질보다 더 높은 친화도로 제1 표적 리간드에 결합한다. 추가로 또는 대안적으로, 특정 구현예에서, 무작위화, 선별 및 선택의 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 10 초과 라운드를 겪은 다중특이적 항원-결합 단백질은 무작위화, 선별, 및 선택의 1 라운드를 겪은 다중특이적 항원-결합 단백질의 친화도보다 더 높은 친화도로 제2 표적 리간드에 결합한다.
- [0659] 상기에 기재된 방법이 3개의 관심 표적 리간드, 4개의 관심 표적 리간드, 5개의 관심 표적 리간드, 또는 5개 초과 관심 표적 리간드에 특이적으로 결합하는 다중특이적 항원-결합 단백질을 확인하게 위해 반복될 수 있다는 것은 당해 분야의 숙련가에 쉽게 명백할 것이다.
- [0660] 본 명세서에서 기재된 다중특이적 항원-결합 단백질의 라이브러리는 표적 리간드에 특이적으로 결합하는 신규한 또는 개선된 결합 단백질을 진화시키기 위해 당해 기술에서 공지된 임의의 기술에 의해 선별될 수 있다. 특정 구현예에서, 표적 리간드는 고정 지지체 (예컨대 칼럼 수지 또는 미세적정 플레이트 웰) 상에 고정되고, 표적 리간드는 후보자 다중특이적 항원-결합 단백질의 라이브러리 (예컨대 본 명세서에서 기재된 임의의 라이브러리)와 접촉된다. 선택 기술은, 예를 들면, 하기일 수 있다: 파아지 디스플레이 (Smith (1985) *Science* 228, 1315-1317), mRNA display (Wilson 등 (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98:3750-3755) 박테리아 디스플레이 (Georgiou, 등 (1997) *Nat Biotechnol* 15:29-34.), 효모 디스플레이 (Boder 및 Wittrup (1997) *Nat. Biotechnol.* 15:553-557) 또는 리보솜 디스플레이 (Hanes 및 Pluckthun (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4937-4942 및 WO2008/068637).
- [0661] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질의 라이브러리는 파아지 디스플레이 라이브러리이다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 다중특이적 항원-결합 단백질을 디스플레이하는 파아지 입자가 제공된다. 특정 구현예에서, 표적 리간드에 결합할 수 있는, 본 명세서에서 기재된 다중특이적 항원-결합 단백질을 디스플레이하는 파아지 입자가 제공된다.
- [0662] 파아지 디스플레이는, 복수의 다중특이적 항원-결합 단백질 변이체가 박테리오파아지 입자의 표면 상에 코트 단백질에 대한 융합 단백질로서 표시된 기술이다 (Smith, G.P.(1985) *Science*, 228:1315-7; Scott, J. K. 및 Smith, G.P.(1990) *Science* 249:386; Sergeeva, A., 등 (2006) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58:1622-54). 파아지 디스플레이의 유용성은, 선택적으로 무작위화된 단백질 변이체 (또는 무작위로 클로닝된 cDNAs)의 큰 라이브러리가 고친화도로 표적 분자에 결합하는 서열에 대해 빠르게 및 효율적으로 분류될 수 있다는 사실에 있다.
- [0663] 펩타이드의 디스플레이 (Cwirla, S.E. 등 (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6378) 또는 단백질 (Lowman, H.B. 등 (1991) *g0>Biochemistry*, 30:10832; Clackson, T. 등 (1991) *Nature*, 352:624; Marks, J. D. 등 (1991), *J. Mol. Biol.*, 222:581; Kang, A.S. 등 (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8363) 라이브러리 (파아지 상)는 특이적 결합 특성을 갖는 것에 대해 수백만 폴리펩타이드 또는 올리고펩타이드를 선별하기 위해 사용되었다 (Smith, G.P.(1991) *Current Opin. Biotechnol.*, 2:668; Wu 등 (1998) *Proc Natl Acad Sci USA*. May 95, 6037-42). 다가 파아지 디스플레이 방법은 섬유상 파아지의 유전자 III 또는 유전자 VIII에의 융합을 통해 작은 랜덤 펩타이드 및 작은 단백질을 나타내기 위해 사용되었다. (Wells 및 Lowman, *Curr. Opin. Struct. Biol.*,

3:355-362 (1992), 및 본 명세서에서 인용된 참조문헌.)1가 파아지 디스플레이에서, 단백질 또는 펩타이드 라이브러리는 유전자 III 또는 그것의 부분에 융합되고, 야생형 유전자 III 단백질의 존재에서 저수준으로 발현되고, 이로써 파아지 입자는 하나의 복제물을 나타내거나 융합 단백질을 나타내지 않는다. 결합능 효과는 다가 파아지에 대해 감소되고, 이로써 분류는 고유 리간드 친화도를 기준으로 하고, DNA 조작을 간소화하는 파아지미드 벡터가 사용된다. (Lowman 및 웰들, *방법: Enzymology*, 3:205-0216 (1991)에서 방법의 동반자.)

[0664] 다중특이적 항원-결합 단백질의 파아지 라이브러리의 분류는 다수의 변이체의 작제 및 변식, 표적 리간드를 사용하는 친화도 정제의 절차, 및 결합 강화의 결과를 평가하는 수단을 수반한다 (참고 예를 들면, US 5223409, US 5403484, US 5571689, 및 US 5663143).

[0665] 대부분의 파아지 디스플레이 방법은 섬유상 파아지 (예컨대 M13 파아지)를 사용한다. 람도이드 파아지 디스플레이 시스템 (참고 WO1995/34683, US 5627024), T4 파아지 디스플레이 시스템 (Ren 등 (1998) *Gene* 215:439; Zhu 등 (1998) *Cancer Research*, 58:3209-3214; Jiang 등, (1997) *Infection & Immunity*, 65:4770-4777; Ren 등 (1997) *Gene*, 195:303-311; Ren (1996) *Protein Sci.*, 5:1833; Efimov 등 (1995) *Virus Genes*, 10:173) and T7 phage display systems (Smith and Scott (1993) *Methods in Enzymology*, 217:228-257; US.5766905)가 또한 공지되어 있다.

[0666] 기본 파아지 디스플레이 개념의 많은 다른 개선 및 변동이 이제 개발되었다. 이들 개선은 선택된 표적 분자에 결합하기 위한 펩타이드 라이브러리를 선별하고 요망된 특성의 이들 단백질을 선별하는 잠재성을 갖는 기능성 단백질을 나타하는 디스플레이 시스템의 능력을 향상시킨다. 파아지 디스플레이 반응에 대한 조합 방응 장치가 개발되었고 (WO 1998/14277), 그리고 파아지 디스플레이 라이브러리는 이분자 상호작용 (WO 1998/20169; WO 1998/20159) 및 구축된 나선 펩타이드의 특성 (WO 1998/20036)을 분석 및 조절하기 위해 사용되었다. WO 1997/35196은, 친화도 리간드를 단리시키는 방법을 기재하고 있고, 이 방법에서, 파아지 디스플레이 라이브러리는, 리간드가 표적 분자에 결합할 하나의 용액 및 친화도 리간드가 표적 분자에 결합하지 않을 제2 용액과 접촉되어, 결합 리간드를 선택적으로 단리시킨다. WO 1997/46251은 친화도 정제된 항체로 랜덤 파아지 디스플레이 라이브러리를 바이로페닝하고 그 다음 결합 파아지를 단리시키고, 그 다음 마이크로플레이트 웰들을 사용하는 과정을 마이크로스페닝하여 고친화도 결합 파아지를 단리시키는 방법을 기재하고 있다. 그와 같은 방법은 본 명세서에서 개시된 다중특이적 항원-결합 단백질에 적용될 수 있다. 친화도 태그로서 *스타필로코쿠스 아우레우스* 단백질 A의 사용이 또한 보고되었다 (Li 등 (1998) *Mol Biotech.*9:187). WO 1997/47314는 파아지 디스플레이 라이브러리일 수 있는 조합 라이브러리를 사용하여 효소 특이성을 구별하기 위해 기질 삭감 라이브러리의 사용을 기재하고 있다. 특이적 결합 단백질을 선택하는 추가의 방법은 하기에서 기재되어 있다: US 5498538, US 5432018, 및 WO 1998/15833. 펩타이드 라이브러리를 생성하고 이들 라이브러리를 선별하는 방법은 또한 하기에 개시되어 있다: US 5723286, US 5432018, US 5580717, US 5427908, US 5498530, US 5770434, US 5734018, US 5698426, US 5763192, 및 US 5723323.

[0667] **항원/표적 분자**

[0668] 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 의해 표적화될 수 있는 분자의 예는, 비제한적으로, 용해성 혈청 단백질 및 그것의 수용체 및 다른 막 결합된 단백질 (예를 들면, 부착소). 또 다른 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질은 1종, 2종 이상의 사이토카인, 사이토카인-관련된 단백질, 및 사이토카인 수용체에 결합할 수 있고, 이것은 8MPI, 8MP2, 8MP38 (GDF10), 8MP4, 8MP6, 8MP8, CSFI (M-CSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (G-CSF), EPO, FGF1 (α FGF), FGF2 (FGF), FGF3 (int-2), FGF4 (HST), FGF5, FGF6 (HST-2), FGF7 (KGF), FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF12B, FGF14, FGF16, FGF17, FGF19, FGF20, FGF21, FGF23, IGF1, IGF2, IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFNA7, IFN81, IFNG, IFNWI, FEL1, FEL1 (EPSELON), FEL1 (ZETA), IL 1A, IL 1B, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL 11, IL 12A, IL 12B, IL 13, IL 14, IL 15, IL 16, IL 17, IL 17B, IL 18, IL 19, IL20, IL22, IL23, IL24, IL25, IL26, IL27, IL28A, IL28B, IL29, IL30, PDGFA, PDGFB, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFBb3, LTA (TNF-), LTB, TNF (TNF- α), TNFSF4 (OX40 리간드), TNFSF5 (CD40 리간드), TNFSF6 (FasL), TNFSF7 (CD27 리간드), TNFSF8 (CD30 리간드), TNFSF9 (4-1 BB 리간드), TNFSF10 (TRAIL), TNFSF11 (TRANCE), TNFSF12 (APO3L), TNFSF13 (April), TNFSF13B, TNFSF14 (HVEM-L), TNFSF15 (VEGI), TNFSF18, HGF (VEGFD), VEGF, VEGFB, VEGFC, IL1R1, IL1R2, IL1RL1, IL1RL2, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3RA, IL4R, IL5RA, IL6R, IL7R, IL8RA, IL8RB, IL9R, IL10RA, IL10RB, IL 11RA, IL12RB1, IL12RB2, IL13RA1, IL13RA2, IL15RA, IL17R, IL18R1, IL20RA, IL21R, IL22R, IL1HY1, IL1RAP, IL1RAPL1, IL1RAPL2, IL1RN, IL6ST, IL18BP, IL18RAP, IL22RA2, AIF1, HGF, LEP (렙틴), PTN, 및 THPO로 구성된 군으로부

터 선택된다.

[0669]

또 다른 구현예에서, 표적 분자는 케모카인, 케모카인 수용체, 또는 케모카인-관련된 단백질이고, 이것은 CCL1 (1-309), CCL2 (MCP-1/MCAF), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (mcp-2), CCL11 (예오타신), CCL13 (MCP-4), CCL15 (MIP-1), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19 (MDP-3b), CCL20 (MIP-3 α), CCL21 (SLC/엑소두스-2), CCL22 (MDC/STC-1), CCL23 (MPIF-1), CCL24 (MPIF-2 / 예오타신-2), CCL25 (TECK), CCL26 (예오타신-3), CCL27 (CTACK / ILC), CCL28, CXCL1 (GRO1), CXCL2 (GRO2), CXCL3 (GRO3), CXCL5 (ENA-78), CXCL6 (GCP-2), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), CXCL11 (1-TAC), CXCL12 (SDF1), CXCL13, CXCL14, CXCL16, PF4 (CXCL4), PPBP (CXCL7), CX3CL1 (SCYDI), SCYE1, XCL1 (림포타틴), XCL2 (SCM-1), BLRI (MDR15), CCBP2 (D6/JAB61), CCR1 (CKR1/HM145), CCR2 (mcp-IRB-IRA), CCR3 (CKR3/CMKBR3), CCR4, CCR5 (CMKBR5/ChemR13), CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6), CCR7 (CKR7/EBI1), CCR8 (CMKBR8/TER1/CKR-L1), CCR9 (GPR-9-6), CCRL1 (VSHK1), CCRL2 (L-CCR), XCR1 (GPR5/CCXCR1), CMKLR1, CMKOR1 (RDC1), CX3CR1 (V28), CXCR4, GPR2 (CCR10), GPR31, GPR81 (FKSG80), CXCR3 (GPR9/CKR-L2), CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo), HM74, IL8RA (IL8R α), IL8RB (IL8R), LTB4R (GPR16), TCP10, CKLFSF2, CKLFSF3, CKLFSF4, CKLFSF5, CKLFSF6, CKLFSF7, CKLFSF8, BDNF, C5R1, CSF3, GRCC10 (C10), EPO, FY (DARC), GDF5, HDF1, HDF1 α , DL8, PRL, RGS3, RGS13, SDF2, SLIT2, TLR2, TLR4, TREM1, TREM2, 및 VHL로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0670]

또 다른 구현예에서 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상의 표적에 결합할 수 있다: ABCF1; ACVR1; ACVR1B; ACVR2; ACVR2B; ACVRL1; ADORA2A; 아그레칸; AGR2; AICDA; AIF1; AIG1; AKAP1; AKAP2; AMH; AMHR2; ANGPTL; ANGPT2; ANGPTL3; ANGPTL4; ANPEP; APC; APOC1; AR; AZGP1 (아연-a-당단백질); B7.1; B7.2; BAD; BAFF (BLys); BAG1; BAI1; BCL2; BCL6; BDNF; BLNK; BLRI (MDR15); BMP1; BMP2; BMP3B (GDF10); BMP4; BMP6; BMP8; BMPR1A; BMPR1B; BMPR2; BPAG1 (플렉틴); BRCA1; C19orf10 (IL27w); C3; C4A; C5; C5R1; CANT1; CASP1; CASP4; CAV1; CCBP2 (D6/JAB61); CCL1 (1-309); CCL11 (예오타신); CCL13 (MCP-4); CCL15 (MIP1); CCL16 (HCC-4); CCL17 (TARC); CCL18 (PARC); CCL19 (MIP-3); CCL2 (MCP-1); MCAF; CCL20 (MIP-3 α); CCL21 (MTP-2); SLC; 엑소두스-2; CCL22 (MDC/STC-1); CCL23 (MPIF-1); CCL24 (MPIF-2/예오타신-2); CCL25 (TECK); CCL26 (예오타신-3); CCL27 (CTACK/ILC); CCL28; CCL3 (MTP-1 α); CCL4 (MDP-1); CCL5(RANTES); CCL7 (MCP-3); CCL8 (mcp-2); CCNA1; CCNA2; CCND1; CCNE1; CCNE2; CCR1 (CKR1 / HM145); CCR2 (mcp-IR/RA); CCR3 (CKR/CMKBR3); CCR4; CCR5 (CMKBR5/ChemR13); CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6); CCR7 (CKR7/EBI1); CCR8 (CMKBR8/TER1/CKR-L1); CCR9 (GPR-9-6); CCRL1 (VSHK1); CCRL2 (L-CCR); CD164; CD19; CD1C; CD20; CD200; CD22; CD24; CD28; CD3; CD37; CD38; CD3E; CD3G; CD3Z; CD4; CD40; CD40L; CD44; CD45RB; CD52; CD69; CD72; CD74; CD79A; CD79B; CDS; CD80; CD81; CD83; CD86; CDH1 (E-카드헤린); CDH10; CDH12; CDH13; CDH18; CDH19; CDH20; CDH5; CDH7; CDH8; CDH9; CDK2; CDK3; CDK4; CDK5; CDK6; CDK7; CDK9; CDKN1A (p21/WAF1/Cip1); CDKN1B (p27/Kip1); CDKN1C; CDKN2A (P16INK4a); CDKN2B; CDKN2C; CDKN3; CEBPB; CER1; CHGA; CHGB; 키티나제; CHST10; CKLFSF2; CKLFSF3; CKLFSF4; CKLFSF5; CKLFSF6; CKLFSF7; CKLFSF8; CLDN3; CLDN7 (클라우딘-7); CLN3; CLU (클러스테린); CMKLR1; CMKOR1 (RDC1); CNR1; COL18A1; COL1A1; COL4A3; COL6A1; CR2; CRP; CSF1 (M-CSF); CSF2 (GM-CSF); CSF3 (G-CSF); CTLA4; CTNNB1 (b-카테닌); CTSB (카텝신 B); CX3CL1 (SCYDI); CX3CR1 (V28); CXCL1 (GRO1); CXCL10 (IP-10); CXCL11 (1-TAC/IP-9); CXCL12 (SDF1); CXCL13; CXCL14; CXCL16; CXCL2 (GRO2); CXCL3 (GRO3); CXCL5 (ENA-78/LIX); CXCL6 (GCP-2); CXCL9 (MIG); CXCR3 (GPR9/CKR-L2); CXCR4; CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo); CYB5; CYC1; CYSLTR1; DAB2IP; DES; DKFZp451J0118; DNCL1; DPP4; E2F1; ECGF1; EDG1; EFNA1; EFNA3; EFNB2; EGF; EGFR; ELAC2; ENG; ENO1; ENO2; ENO3; EPHB4; EPO; ERBB2 (Her-2); EREG; ERK8; ESR1; ESR2; F3 (TF); FADD; FasL; FASN; FCER1A; FCER2; FCGR3A; FGF; FGF1 (α FGF); FGF10; FGF11; FGF12; FGF12B; FGF13; FGF14; FGF16; FGF17; FGF18; FGF19; FGF2 (bFGF); FGF20; FGF21; FGF22; FGF23; FGF3 (int-2); FGF4 (HST); FGF5; FGF6 (HST-2); FGF7 (KGF); FGF8; FGF9; FGFR3; FIGF (VEGFD); FEL1 (엡실론); FIL1 (ZETA); FLJ12584; FLJ25530; FLRT1 (파이크로렉틴); FLT1; FOS; FOSL1 (FRA-1); FY (DARC); GABRP (GABAa); GAGEB1; GAGEC1; GALNAC4S-6ST; GATA3; GDF5; GF11; GGT1; GM-CSF; GNAS1; GNRHI; GPR2 (CCR10); GPR31; GPR44; GPR81 (FKSG80); GRCC10 (C10); GRP; GSN (겔솔린); GSTP1; HAVCR2; HDAC4; HDAC5; HDAC7A; HDAC9; HGF; HIF1A; HOP1; 히스타민 및 히스타민 수용체; HLA-A; HLA-DRA; HM74; HMOXI; HUMCYT2A; 얼음BERG; ICOSL; ID2; IFN-a; IFNA1; IFNA2; IFNA4; IFNA5; IFNA6; IFNA7; IFNB1; IFN감마; DFNW1; IGBP1; IGF1; IGF1R; IGF2; IGFBP2; IGFBP3; IGFBP6; IL-1; IL10; IL10RA; IL10RB; IL11; IL11RA; IL-12; IL12A; IL12B; IL12RB1; IL12RB2; IL13; IL13RA1; IL13RA2; IL14; IL15; IL15RA; IL16; IL17; IL17B; IL17C; IL17R; IL18; IL18BP; IL18R1; IL18RAP; IL19; IL1A; IL1B;

IL1F10; IL1F5; IL1F6; IL1F7; IL1F8; IL1F9; IL1HY1; IL1R1; IL1R2; IL1RAP; IL1RAPL1; IL1RAPL2; IL1RL1; IL1RL2; IL1RN; IL2; IL20; IL20RA; IL21 R; IL22; IL22R; IL22RA2; IL23; IL24; IL25; IL26; IL27; IL28A; IL28B; IL29; IL2RA; IL2RB; IL2RG; IL3; IL30; IL3RA; IL4; IL4R; IL5; IL5RA; IL6; IL6R; IL6ST (당단백질 130); EL7; EL7R; EL8; IL8RA; DL8RB; IL8RB; DL9; DL9R; DLK; INHA; INHBA; INSL3; INSL4; IRAK1; ERAK2; ITGA1; ITGA2; ITGA3; ITGA6 (a6 인테그린); ITGAV; ITGB3; ITGB4 (b4 인테그린); JAG1; JAK1; JAK3; JUN; K6HF; KAI1; KDR; KITLG; KLF5 (GC 박스 BP); KLF6; KLK10; KLK12; KLK13; KLK14; KLK15; KLK3; KLK4; KLK5; KLK6; KLK9; KRT1; KRT19 (케라틴 19); KRT2A; KHTHB6 (모발-특이적 유형 H 케라틴); LAMAS; LEP (렙틴); Lingo-p75; Lingo-Troy; LPS; LTA (TNF-b); LTB; LTB4R (GPR16); LTB4R2; LTBR; MACMARCKS; MAG 또는 OMgp; MAP2K7 (c-Jun); MDK; MIB1; 미드카인; MEF; MIP-2; MKI67; (Ki-67); MMP2; MMP9; MS4A1; MSMB; MT3 (메탈로티오넥틴-111); MTSS1; MUC1 (뮤신); MYC; MYO88; NCK2; 뉴로칸; NFKB1; NFKB2; NGFB (NGF); NGFR; Ngr-Lingo; Ngr- Nogo66 (Nogo); Ngr-p75; Ngr-Troy; NME1 (NM23A); NOX5; NPPB; NROB1; NROB2; NR1D1; NR1D2; NR1H2; NR1H3; NR1H4; NR112; NR113; NR2C1; NR2C2; NR2E1; NR2E3; NR2F1; NR2F2; NR2F6; NR3C1; NR3C2; NR4A1; NR4A2; NR4A3; NR5A1; NR5A2; NR6A1; NRP1; NRP2; NT5E; NTN4; ODZI; OPRD1; P2RX7; PAP; PART1; PATE; PAWR; PCA3; PCNA; POGFA; POGFB; PECAM1; PF4 (CXCL4); PGF; PGR; 포스파칸; PIAS2; PIK3CG; PLAU (uPA); PLG; PLXDC1; PPBP (CXCL7); PPID; PRI; PRKCQ; PRKDI; PRL; PROC; PROK2; PSAP; PSCA; PTAFR; PTEN; PTGS2 (COX-2); PTN; RAC2 (p21 Rac2); RARB; RGS1; RGS13; RGS3; RNF110 (ZNF144); ROBO2; S100A2; SCGB1D2 (리포필린 B); SCGB2A1 (맘마글로빈2); SCGB2A2 (맘마글로빈 1); SCYE1 (내피 단핵구-활성화 사이토카인); SDF2; 세르핀A1; 세르핀A3; SERP1NB5 (마스핀); 세르핀1(PAI-1); SERPDMF1; SHBG; SLA2; SLC2A2; SLC33A1; SLC43A1; SLIT2; SPPI; SPRR1B (Spr1); ST6GAL1; STAB1; STAT6; STEAP; STEAP2; TB4R2; TBX21; TCP10; TOGFI; TEK; TGFA; TGFBI; TGFBI1; TGFBI2; TGFBI3; TGFBI4; TGFBI5; TGFBI6; TGFBI7; TGFBI8; TGFBI9; TGFBI10; TGFBI11; TGFBI12; TGFBI13; TGFBI14; TGFBI15; TGFBI16; TGFBI17; TGFBI18; TGFBI19; TGFBI20; TGFBI21; TGFBI22; TGFBI23; TGFBI24; TGFBI25; TGFBI26; TGFBI27; TGFBI28; TGFBI29; TGFBI30; TGFBI31; TGFBI32; TGFBI33; TGFBI34; TGFBI35; TGFBI36; TGFBI37; TGFBI38; TGFBI39; TGFBI40; TGFBI41; TGFBI42; TGFBI43; TGFBI44; TGFBI45; TGFBI46; TGFBI47; TGFBI48; TGFBI49; TGFBI50; TGFBI51; TGFBI52; TGFBI53; TGFBI54; TGFBI55; TGFBI56; TGFBI57; TGFBI58; TGFBI59; TGFBI60; TGFBI61; TGFBI62; TGFBI63; TGFBI64; TGFBI65; TGFBI66; TGFBI67; TGFBI68; TGFBI69; TGFBI70; TGFBI71; TGFBI72; TGFBI73; TGFBI74; TGFBI75; TGFBI76; TGFBI77; TGFBI78; TGFBI79; TGFBI80; TGFBI81; TGFBI82; TGFBI83; TGFBI84; TGFBI85; TGFBI86; TGFBI87; TGFBI88; TGFBI89; TGFBI90; TGFBI91; TGFBI92; TGFBI93; TGFBI94; TGFBI95; TGFBI96; TGFBI97; TGFBI98; TGFBI99; TGFBI100; TGFBI101; TGFBI102; TGFBI103; TGFBI104; TGFBI105; TGFBI106; TGFBI107; TGFBI108; TGFBI109; TGFBI110; TGFBI111; TGFBI112; TGFBI113; TGFBI114; TGFBI115; TGFBI116; TGFBI117; TGFBI118; TGFBI119; TGFBI120; TGFBI121; TGFBI122; TGFBI123; TGFBI124; TGFBI125; TGFBI126; TGFBI127; TGFBI128; TGFBI129; TGFBI130; TGFBI131; TGFBI132; TGFBI133; TGFBI134; TGFBI135; TGFBI136; TGFBI137; TGFBI138; TGFBI139; TGFBI140; TGFBI141; TGFBI142; TGFBI143; TGFBI144; TGFBI145; TGFBI146; TGFBI147; TGFBI148; TGFBI149; TGFBI150; TGFBI151; TGFBI152; TGFBI153; TGFBI154; TGFBI155; TGFBI156; TGFBI157; TGFBI158; TGFBI159; TGFBI160; TGFBI161; TGFBI162; TGFBI163; TGFBI164; TGFBI165; TGFBI166; TGFBI167; TGFBI168; TGFBI169; TGFBI170; TGFBI171; TGFBI172; TGFBI173; TGFBI174; TGFBI175; TGFBI176; TGFBI177; TGFBI178; TGFBI179; TGFBI180; TGFBI181; TGFBI182; TGFBI183; TGFBI184; TGFBI185; TGFBI186; TGFBI187; TGFBI188; TGFBI189; TGFBI190; TGFBI191; TGFBI192; TGFBI193; TGFBI194; TGFBI195; TGFBI196; TGFBI197; TGFBI198; TGFBI199; TGFBI200; TGFBI201; TGFBI202; TGFBI203; TGFBI204; TGFBI205; TGFBI206; TGFBI207; TGFBI208; TGFBI209; TGFBI210; TGFBI211; TGFBI212; TGFBI213; TGFBI214; TGFBI215; TGFBI216; TGFBI217; TGFBI218; TGFBI219; TGFBI220; TGFBI221; TGFBI222; TGFBI223; TGFBI224; TGFBI225; TGFBI226; TGFBI227; TGFBI228; TGFBI229; TGFBI230; TGFBI231; TGFBI232; TGFBI233; TGFBI234; TGFBI235; TGFBI236; TGFBI237; TGFBI238; TGFBI239; TGFBI240; TGFBI241; TGFBI242; TGFBI243; TGFBI244; TGFBI245; TGFBI246; TGFBI247; TGFBI248; TGFBI249; TGFBI250; TGFBI251; TGFBI252; TGFBI253; TGFBI254; TGFBI255; TGFBI256; TGFBI257; TGFBI258; TGFBI259; TGFBI260; TGFBI261; TGFBI262; TGFBI263; TGFBI264; TGFBI265; TGFBI266; TGFBI267; TGFBI268; TGFBI269; TGFBI270; TGFBI271; TGFBI272; TGFBI273; TGFBI274; TGFBI275; TGFBI276; TGFBI277; TGFBI278; TGFBI279; TGFBI280; TGFBI281; TGFBI282; TGFBI283; TGFBI284; TGFBI285; TGFBI286; TGFBI287; TGFBI288; TGFBI289; TGFBI290; TGFBI291; TGFBI292; TGFBI293; TGFBI294; TGFBI295; TGFBI296; TGFBI297; TGFBI298; TGFBI299; TGFBI300; TGFBI301; TGFBI302; TGFBI303; TGFBI304; TGFBI305; TGFBI306; TGFBI307; TGFBI308; TGFBI309; TGFBI310; TGFBI311; TGFBI312; TGFBI313; TGFBI314; TGFBI315; TGFBI316; TGFBI317; TGFBI318; TGFBI319; TGFBI320; TGFBI321; TGFBI322; TGFBI323; TGFBI324; TGFBI325; TGFBI326; TGFBI327; TGFBI328; TGFBI329; TGFBI330; TGFBI331; TGFBI332; TGFBI333; TGFBI334; TGFBI335; TGFBI336; TGFBI337; TGFBI338; TGFBI339; TGFBI340; TGFBI341; TGFBI342; TGFBI343; TGFBI344; TGFBI345; TGFBI346; TGFBI347; TGFBI348; TGFBI349; TGFBI350; TGFBI351; TGFBI352; TGFBI353; TGFBI354; TGFBI355; TGFBI356; TGFBI357; TGFBI358; TGFBI359; TGFBI360; TGFBI361; TGFBI362; TGFBI363; TGFBI364; TGFBI365; TGFBI366; TGFBI367; TGFBI368; TGFBI369; TGFBI370; TGFBI371; TGFBI372; TGFBI373; TGFBI374; TGFBI375; TGFBI376; TGFBI377; TGFBI378; TGFBI379; TGFBI380; TGFBI381; TGFBI382; TGFBI383; TGFBI384; TGFBI385; TGFBI386; TGFBI387; TGFBI388; TGFBI389; TGFBI390; TGFBI391; TGFBI392; TGFBI393; TGFBI394; TGFBI395; TGFBI396; TGFBI397; TGFBI398; TGFBI399; TGFBI400; TGFBI401; TGFBI402; TGFBI403; TGFBI404; TGFBI405; TGFBI406; TGFBI407; TGFBI408; TGFBI409; TGFBI410; TGFBI411; TGFBI412; TGFBI413; TGFBI414; TGFBI415; TGFBI416; TGFBI417; TGFBI418; TGFBI419; TGFBI420; TGFBI421; TGFBI422; TGFBI423; TGFBI424; TGFBI425; TGFBI426; TGFBI427; TGFBI428; TGFBI429; TGFBI430; TGFBI431; TGFBI432; TGFBI433; TGFBI434; TGFBI435; TGFBI436; TGFBI437; TGFBI438; TGFBI439; TGFBI440; TGFBI441; TGFBI442; TGFBI443; TGFBI444; TGFBI445; TGFBI446; TGFBI447; TGFBI448; TGFBI449; TGFBI450; TGFBI451; TGFBI452; TGFBI453; TGFBI454; TGFBI455; TGFBI456; TGFBI457; TGFBI458; TGFBI459; TGFBI460; TGFBI461; TGFBI462; TGFBI463; TGFBI464; TGFBI465; TGFBI466; TGFBI467; TGFBI468; TGFBI469; TGFBI470; TGFBI471; TGFBI472; TGFBI473; TGFBI474; TGFBI475; TGFBI476; TGFBI477; TGFBI478; TGFBI479; TGFBI480; TGFBI481; TGFBI482; TGFBI483; TGFBI484; TGFBI485; TGFBI486; TGFBI487; TGFBI488; TGFBI489; TGFBI490; TGFBI491; TGFBI492; TGFBI493; TGFBI494; TGFBI495; TGFBI496; TGFBI497; TGFBI498; TGFBI499; TGFBI500; TGFBI501; TGFBI502; TGFBI503; TGFBI504; TGFBI505; TGFBI506; TGFBI507; TGFBI508; TGFBI509; TGFBI510; TGFBI511; TGFBI512; TGFBI513; TGFBI514; TGFBI515; TGFBI516; TGFBI517; TGFBI518; TGFBI519; TGFBI520; TGFBI521; TGFBI522; TGFBI523; TGFBI524; TGFBI525; TGFBI526; TGFBI527; TGFBI528; TGFBI529; TGFBI530; TGFBI531; TGFBI532; TGFBI533; TGFBI534; TGFBI535; TGFBI536; TGFBI537; TGFBI538; TGFBI539; TGFBI540; TGFBI541; TGFBI542; TGFBI543; TGFBI544; TGFBI545; TGFBI546; TGFBI547; TGFBI548; TGFBI549; TGFBI550; TGFBI551; TGFBI552; TGFBI553; TGFBI554; TGFBI555; TGFBI556; TGFBI557; TGFBI558; TGFBI559; TGFBI560; TGFBI561; TGFBI562; TGFBI563; TGFBI564; TGFBI565; TGFBI566; TGFBI567; TGFBI568; TGFBI569; TGFBI570; TGFBI571; TGFBI572; TGFBI573; TGFBI574; TGFBI575; TGFBI576; TGFBI577; TGFBI578; TGFBI579; TGFBI580; TGFBI581; TGFBI582; TGFBI583; TGFBI584; TGFBI585; TGFBI586; TGFBI587; TGFBI588; TGFBI589; TGFBI590; TGFBI591; TGFBI592; TGFBI593; TGFBI594; TGFBI595; TGFBI596; TGFBI597; TGFBI598; TGFBI599; TGFBI600; TGFBI601; TGFBI602; TGFBI603; TGFBI604; TGFBI605; TGFBI606; TGFBI607; TGFBI608; TGFBI609; TGFBI610; TGFBI611; TGFBI612; TGFBI613; TGFBI614; TGFBI615; TGFBI616; TGFBI617; TGFBI618; TGFBI619; TGFBI620; TGFBI621; TGFBI622; TGFBI623; TGFBI624; TGFBI625; TGFBI626; TGFBI627; TGFBI628; TGFBI629; TGFBI630; TGFBI631; TGFBI632; TGFBI633; TGFBI634; TGFBI635; TGFBI636; TGFBI637; TGFBI638; TGFBI639; TGFBI640; TGFBI641; TGFBI642; TGFBI643; TGFBI644; TGFBI645; TGFBI646; TGFBI647; TGFBI648; TGFBI649; TGFBI650; TGFBI651; TGFBI652; TGFBI653; TGFBI654; TGFBI655; TGFBI656; TGFBI657; TGFBI658; TGFBI659; TGFBI660; TGFBI661; TGFBI662; TGFBI663; TGFBI664; TGFBI665; TGFBI666; TGFBI667; TGFBI668; TGFBI669; TGFBI670; TGFBI671; TGFBI672; TGFBI673; TGFBI674; TGFBI675; TGFBI676; TGFBI677; TGFBI678; TGFBI679; TGFBI680; TGFBI681; TGFBI682; TGFBI683; TGFBI684; TGFBI685; TGFBI686; TGFBI687; TGFBI688; TGFBI689; TGFBI690; TGFBI691; TGFBI692; TGFBI693; TGFBI694; TGFBI695; TGFBI696; TGFBI697; TGFBI698; TGFBI699; TGFBI700; TGFBI701; TGFBI702; TGFBI703; TGFBI704; TGFBI705; TGFBI706; TGFBI707; TGFBI708; TGFBI709; TGFBI710; TGFBI711; TGFBI712; TGFBI713; TGFBI714; TGFBI715; TGFBI716; TGFBI717; TGFBI718; TGFBI719; TGFBI720; TGFBI721; TGFBI722; TGFBI723; TGFBI724; TGFBI725; TGFBI726; TGFBI727; TGFBI728; TGFBI729; TGFBI730; TGFBI731; TGFBI732; TGFBI733; TGFBI734; TGFBI735; TGFBI736; TGFBI737; TGFBI738; TGFBI739; TGFBI740; TGFBI741; TGFBI742; TGFBI743; TGFBI744; TGFBI745; TGFBI746; TGFBI747; TGFBI748; TGFBI749; TGFBI750; TGFBI751; TGFBI752; TGFBI753; TGFBI754; TGFBI755; TGFBI756; TGFBI757; TGFBI758; TGFBI759; TGFBI760; TGFBI761; TGFBI762; TGFBI763; TGFBI764; TGFBI765; TGFBI766; TGFBI767; TGFBI768; TGFBI769; TGFBI770; TGFBI771; TGFBI772; TGFBI773; TGFBI774; TGFBI775; TGFBI776; TGFBI777; TGFBI778; TGFBI779; TGFBI780; TGFBI781; TGFBI782; TGFBI783; TGFBI784; TGFBI785; TGFBI786; TGFBI787; TGFBI788; TGFBI789; TGFBI790; TGFBI791; TGFBI792; TGFBI793; TGFBI794; TGFBI795; TGFBI796; TGFBI797; TGFBI798; TGFBI799; TGFBI800; TGFBI801; TGFBI802; TGFBI803; TGFBI804; TGFBI805; TGFBI806; TGFBI807; TGFBI808; TGFBI809; TGFBI810; TGFBI811; TGFBI812; TGFBI813; TGFBI814; TGFBI815; TGFBI816; TGFBI817; TGFBI818; TGFBI819; TGFBI820; TGFBI821; TGFBI822; TGFBI823; TGFBI824; TGFBI825; TGFBI826; TGFBI827; TGFBI828; TGFBI829; TGFBI830; TGFBI831; TGFBI832; TGFBI833; TGFBI834; TGFBI835; TGFBI836; TGFBI837; TGFBI838; TGFBI839; TGFBI840; TGFBI841; TGFBI842; TGFBI843; TGFBI844; TGFBI845; TGFBI846; TGFBI847; TGFBI848; TGFBI849; TGFBI850; TGFBI851; TGFBI852; TGFBI853; TGFBI854; TGFBI855; TGFBI856; TGFBI857; TGFBI858; TGFBI859; TGFBI860; TGFBI861; TGFBI862; TGFBI863; TGFBI864; TGFBI865; TGFBI866; TGFBI867; TGFBI868; TGFBI869; TGFBI870; TGFBI871; TGFBI872; TGFBI873; TGFBI874; TGFBI875; TGFBI876; TGFBI877; TGFBI878; TGFBI879; TGFBI880; TGFBI881; TGFBI882; TGFBI883; TGFBI884; TGFBI885; TGFBI886; TGFBI887; TGFBI888; TGFBI889; TGFBI890; TGFBI891; TGFBI892; TGFBI893; TGFBI894; TGFBI895; TGFBI896; TGFBI897; TGFBI898; TGFBI899; TGFBI900; TGFBI901; TGFBI902; TGFBI903; TGFBI904; TGFBI905; TGFBI906; TGFBI907; TGFBI908; TGFBI909; TGFBI910; TGFBI911; TGFBI912; TGFBI913; TGFBI914; TGFBI915; TGFBI916; TGFBI917; TGFBI918; TGFBI919; TGFBI920; TGFBI921; TGFBI922; TGFBI923; TGFBI924; TGFBI925; TGFBI926; TGFBI927; TGFBI928; TGFBI929; TGFBI930; TGFBI931; TGFBI932; TGFBI933; TGFBI934; TGFBI935; TGFBI936; TGFBI937; TGFBI938; TGFBI939; TGFBI940; TGFBI941; TGFBI942; TGFBI943; TGFBI944; TGFBI945; TGFBI946; TGFBI947; TGFBI948; TGFBI949; TGFBI950; TGFBI951; TGFBI952; TGFBI953; TGFBI954; TGFBI955; TGFBI956; TGFBI957; TGFBI958; TGFBI959; TGFBI960; TGFBI961; TGFBI962; TGFBI963; TGFBI964; TGFBI965; TGFBI966; TGFBI967; TGFBI968; TGFBI969; TGFBI970; TGFBI971; TGFBI972; TGFBI973; TGFBI974; TGFBI975; TGFBI976; TGFBI977; TGFBI978; TGFBI979; TGFBI980; TGFBI981; TGFBI982; TGFBI983; TGFBI984; TGFBI985; TGFBI986; TGFBI987; TGFBI988; TGFBI989; TGFBI990; TGFBI991; TGFBI992; TGFBI993; TGFBI994; TGFBI995; TGFBI996; TGFBI997; TGFBI998; TGFBI999; TGFBI1000; TGFBI1001; TGFBI1002; TGFBI1003; TGFBI1004; TGFBI1005; TGFBI1006; TGFBI1007; TGFBI1008; TGFBI1009; TGFBI1010; TGFBI1011; TGFBI1012; TGFBI1013; TGFBI1014; TGFBI1015; TGFBI1016; TGFBI1017; TGFBI1018; TGFBI1019; TGFBI1020; TGFBI1021; TGFBI1022; TGFBI1023; TGFBI1024; TGFBI1025; TGFBI1026; TGFBI1027; TGFBI1028; TGFBI1029; TGFBI1030; TGFBI1031; TGFBI1032; TGFBI1033; TGFBI1034; TGFBI1035; TGFBI1036; TGFBI1037; TGFBI1038; TGFBI1039; TGFBI1040; TGFBI1041; TGFBI1042; TGFBI1043; TGFBI1044; TGFBI1045; TGFBI1046; TGFBI1047; TGFBI1048; TGFBI1049; TGFBI1050; TGFBI1051; TGFBI1052; TGFBI1053; TGFBI1054; TGFBI1055; TGFBI1056; TGFBI1057; TGFBI1058; TGFBI1059; TGFBI1060; TGFBI1061; TGFBI1062; TGFBI1063; TGFBI1064; TGFBI1065; TGFBI1066; TGFBI1067; TGFBI1068; TGFBI1069; TGFBI1070; TGFBI1071; TGFBI1072; TGFBI1073; TGFBI1074; TGFBI1075; TGFBI1076; TGFBI1077; TGFBI1078; TGFBI1079; TGFBI1080; TGFBI1081; TGFBI1082; TGFBI1083; TGFBI1084; TGFBI1085; TGFBI1086; TGFBI1087; TGFBI1088; TGFBI1089; TGFBI1090; TGFBI1091; TGFBI1092; TGFBI1093; TGFBI1094; TGFBI1095; TGFBI1096; TGFBI1097; TGFBI1098; TGFBI1099; TGFBI1100; TGFBI1101; TGFBI1102; TGFBI1103; TGFBI1104; TGFBI1105; TGFBI1106; TGFBI1107; TGFBI1108; TGFBI1109; TGFBI1110; TGFBI1111; TGFBI1112; TGFBI1113; TGFBI1114; TGFBI1115; TGFBI1116; TGFBI1117; TGFBI1118; TGFBI1119; TGFBI1120; TGFBI1121; TGFBI1122; TGFBI1123; TGFBI1124; TGFBI1125; TGFBI1126; TGFBI1127; TGFBI1128; TGFBI1129; TGFBI1130; TGFBI1131; TGFBI1132; TGFBI1133; TGFBI1134; TGFBI1135; TGFBI1136; TGFBI1137; TGFBI1138; TGFBI1139; TGFBI1140; TGFBI1141; TGFBI1142; TGFBI1143; TGFBI1144; TGFBI1145; TGFBI1146; TGFBI1147; TGFBI1148; TGFBI1149; TGFBI1150; TGFBI1151; TGFBI1152; TGFBI1153; TGFBI1154; TGFBI1155; TGFBI1156; TGFBI1157; TGFBI1158; TGFBI1159; TGFBI1160; TGFBI1161; TGFBI1162; TGFBI1163; TGFBI1164; TGFBI1165; TGFBI1166; TGFBI1167; TGFBI1168; TGFBI1169; TGFBI1170; TGFBI1171; TGFBI1172; TGFBI1173; TGFBI1174; TGFBI1175; TGFBI1176; TGFBI1177; TGFBI1178; TGFBI1179; TGFBI1180; TGFBI1181; TGFBI1182; TGFBI1183; TGFBI1184; TGFBI1185; TGFBI1186; TGFBI1187; TGFBI1188; TGFBI1189; TGFBI1190; TGFBI1191; TGFBI1192; TGFBI1193; TGFBI1194; TGFBI1195; TGFBI1196; TGFBI1197; TGFBI1198; TGFBI1199; TGFBI1200; TGFBI1201; TGFBI1202; TGFBI1203; TGFBI1204; TGFBI1205; TGFBI1206; TGFBI1207; TGFBI1208; TGFBI1209; TGFBI1210; TGFBI1211; TGFBI1212; TGFBI1213; TGFBI1214; TGFBI1215; TGFBI1216; TGFBI1217; TGFBI1218; TGFBI1219; TGFBI1220; TGFBI1221; TGFBI1222; TGFBI1223; TGFBI1224; TGFBI1225; TGFBI1226; TGFBI1227; TGFBI1228; TGFBI1229; TGFBI1230; TGFBI1231; TGFBI1232; TGFBI1233; TGFBI1234; TGFBI1235; TGFBI1236; TGFBI1237; TGFBI1238; TGFBI1239; TGFBI1240; TGFBI1241; TGFBI1242; TGFBI1243; TGFBI1244; TGFBI1245; TGFBI1246; TGFBI1247; TGFBI1248; TGFBI1249; TGFBI1250; TGFBI1251; TGFBI1252; TGFBI1253; TGFBI1254; TGFBI1255; TGFBI1256; TGFBI1257; TGFBI1258; TGFBI1259; TGFBI1260; TGFBI1261; TGFBI1262; TGFBI1263; TGFBI1264; TGFBI1265; TGFBI1266; TGFBI1267; TGFBI1268; TGFBI1269; TGFBI1270; TGFBI1271; TGFBI1272; TGFBI1273; TGFBI1274; TGFBI1275; TGFBI1276; TGFBI1277; TGFBI1278; TGFBI1279; TGFBI1280; TGFBI1281; TGFBI1282; TGFBI1283; TGFBI1284; TGFBI1285; TGFBI1286; TGFBI1287; TGFBI1288; TGFBI1289; TGFBI1290; TGFBI1291; TGFBI1292; TGFBI1293; TGFBI1294; TGFBI1295; TGFBI1296; TGFBI1297; TGFBI1298; TGFBI1299; TGFBI1300; TGFBI1301; TGFBI1302; TGFBI1303; TGFBI1304; TGFBI1305; TGFBI1306; TGFBI1307; TGFBI1308; TGFBI1309; TGFBI1310; TGFBI1311; TGFBI1312; TGFBI1313; TGFBI1314; TGFBI1315; TGFBI1316; TGFBI1317; TGFBI1318; TGFBI1319; TGFBI1320; TGFBI1321; TGFBI1322; TGFBI1323; TGFBI1324; TGFBI1325; TGFBI1326; TGFBI1327; TGFBI1328; TGFBI1329; TGFBI1330; TGFBI1331; TGFBI1332; TGFBI1333; TGFBI1334; TGFBI1335; TGFBI1336; TGFBI1337; TGFBI1338; TGFBI1339; TGFBI1340; TGFBI1341; TGFBI1342; TGFBI1343; TGFBI1344; TGFBI1345; TGFBI1346; TGFBI1347; TGFBI1348; TGFBI1349; TGFBI1350; TGFBI1351; TGFBI1352; TGFBI1353; TGFBI1354; TGFBI1355; TGFBI1356; TGFBI1357; TGFBI1358; TGFBI1359; TGFBI1360; TGFBI1361; TGFBI1362; TGFBI1363; TGFBI1364; TGFBI1365; TGFBI1366; TGFBI1367; TGFBI1368; TGFBI1369; TGFBI1370; TGFBI1371; TGFBI1372; TGFBI1373; TGFBI1374; TGFBI1375; TGFBI1376; TGFBI1377; TGFBI1378; TGFBI1379; TGFBI1380; TGFBI1381; TGFBI1382; TGFBI1383; TGFBI1384; TGFBI1385; TGFBI1386; TGFBI1387; TGFBI1388; TGFBI1389; TGFBI1390; TGFBI1391; TGFBI1392; TGFBI1393; TGFBI1394; TGFBI1395; TGFBI1396; TGFBI1397; TGFBI1398; TGFBI1399; TGFBI1400; TGFBI1401; TGFBI1402; TGFBI1403; TGFBI1404; TGFBI1405; TGFBI1406; TGFBI1407; TGFBI1408; TGFBI1409; TGFBI1410; TGFBI1411; TGFBI1412; TGFBI1413; TGFBI1414; TGFBI1415; TGFBI1416; TGFBI1417; TGFBI1418; TGFBI1419; TGFBI1420; TGFBI1421; TGFBI1422; TGFBI1423; TGFBI1424; TGFBI1425; TGFBI1426; TGFBI1427; TGFBI1428; TGFBI1429; TGFBI1430; TGFBI1431; TGFBI1432; TGFBI1433; TGFBI1434; TGFBI1435; TGFBI1436; TGFBI1437; TGFBI1438; TGFBI1439; TGFBI1440; TGFBI1441; TGFBI1442; TGFBI1443; TGFBI1444; TGFBI1445; TGFBI1446; TGFBI1447; TGFBI1448; TGFBI1449; TGFBI1450; TGFBI1451; TGFBI1452; TGFBI1453; TGFBI1454; TGFBI1455; TGFBI1456; TGFBI1457; TGFBI1458; TGFBI1459; TGFBI1460; TGFBI1461; TGFBI1462; TGFBI1463; TGFBI1464; TGFBI1465; TGFBI1466; TGFBI1467; TGFBI1468; TGFBI1469; TGFBI1470; TGFBI1471; TGFBI1472; TGFBI1473; TGFBI1474; TGFBI1475; TGFBI1476; TGFBI1477; TGFBI1478; TGFBI1479; TGFBI1480; TGFBI1481; TGFBI1482; TGFBI1483; TGFBI1484; TGFBI1485; TGFBI1486; TGFBI1487; TGFBI1488; TGFBI1489; TGFBI1490; TGFBI1491; TGFBI1492; TGFBI1493; TGFBI1494; TGFBI1495; TGFBI1496; TGFBI1497; TGFBI1498; TGFBI1499; TGFBI1500; TGFBI1501; TGFBI1502; TGFBI1503; TGFBI1504; TGFBI1505; TGFBI1506; TGFBI1507; TGFBI1508; TGFBI1509; TGFBI1510; TGFBI1511; TGFBI1512; TGFBI1513; TGFBI1514; TGFBI1515; TGFBI1516; TGFBI1517; TGFBI1518; TGFBI1519; TGFBI1520; TGFBI1521; TGFBI1522; TGFBI1523; TGFBI1524; TGFBI1525; TGFBI1526; TGFBI1527; TGFBI1528; TGFBI1529; TGFBI1530; TGFBI1531; TGFBI1532;

16, TNF 알파 및 IL-17, TNF 알파 및 IL-18, TNF 알파 및 IL-19, TNF 알파 및 IL-20, TNF 알파 및 IL-23, TNF 알파 및 IFN 알파, TNF 알파 및 CD4, TNF 알파 및 VEGF, TNF 알파 및 MIF, TNF 알파 및 ICAM-1, TNF 알파 및 PGE4, TNF 알파 및 PEG2, TNF 알파 및 RANK 리간드, TNF 알파 및 Te38, TNF 알파 및 BAFF, TNF 알파 및 CD22, TNF 알파 및 CTLA-4, TNF 알파 및 GP130, TNF 및 IL-12p40, VEGF 및 HER2, VEGF-A 및 HER2, VEGF-A 및 PDGF, HER1 및 HER2, VEGFA 및 ANG2, VEGF-A 및 VEGF-C, VEGF-C 및 VEGF-D, HER2 및 DR5, VEGF 및 IL-8, VEGF 및 MET, VEGFR 및 MET 수용체, EGFR 및 MET, VEGFR 및 EGFR, HER2 및 CD64, HER2 및 CD3, HER2 및 CD16, HER2 및 HER3; EGFR (HER1) 및 HER2, EGFR 및 HER3, EGFR 및 HER4, IL-14 및 IL-13, IL-13 및 CD40L, IL4 및 CD40L, TNFR1 및 IL-1 R, TNFR1 및 IL-6R 및 TNFR1 및 IL-18R, EpCAM 및 CD3, MAPG 및 CD28, EGFR 및 CD64, CSPGs 및 RGM A; CTLA-4 및 BTN02; IGF1 및 IGF2; IGF1/2 및 Erb2B; MAG 및 RGM A; NgR 및 RGM A; NogoA 및 RGM A; OMgp 및 RGM A; POL-1 및 CTLA-4; 및 RGM A 및 RGM B.

[0674] 다른 분자에 선택적으로 접합된 용해성 항원 또는 그것의 단편은 항체를 생성하는 면역원으로서 사용될 수 있다. 막관통 분자, 예컨대 수용체에 대해, 이들의 단편 (예를 들면, 수용체의 세포외 도메인)은 면역원로서 사용될 수 있다. 대안적으로, 막관통 분자를 발현시키는 세포는 면역원로서 사용될 수 있다. 그와 같은 세포는 천연 공급원 (예를 들면, 암 세포주)으로부터 유도될 수 있거나 막관통 분자를 발현시키기 위해 재조합 기술에 의해 전환된 세포일 수 있다. 항체를 제조하는데 유용한 다른 항원 및 그것의 형태는 당해 기술의 숙련자에게 분명할 것이다.

[0675] **활성 검정**

[0676] 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질은 당해 기술에서 공지된 다양한 검정에 의해 그것의 물리적/화학 특성 및 생물학적 기능에 대해 특성규명될 수 있다.

[0677] 정제된 다중특이적 항원-결합 단백질은 N-말단 서열분석, 아미노산 분석, 비-변성 크기 배제 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC), 질량 분광분석법, 이온 교환 크로마토그래피 및 파와인 소화를 비제한적으로 포함하는 일련의 검정에 의해 추가로 특성규명될 수 있다.

[0678] 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질은 그것의 생물학적 활성에 대해 분석된다. 일부 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 그것의 항원-결합 활성에 대해 시험된다. 당해 기술에 공지되어 있고, 본 명세서에서 사용될 수 있는 항원-결합 검정은 기술 예컨대 웨스턴 블랏, 방사선면역검정, ELISA (효소 연결된 면역흡수제 검정), "샌드위치" 면역검정, 면역침강 검정, 형광 면역검정, 및 단백질 A 면역검정을 사용하는 임의의 직접적인 또는 경쟁적 결합 검정을 비제한적으로 포함한다. 예시적인 항원-결합 검정은 아래의 예에서 제공된다.

[0679] 일 구현예에서 일부를 보유하지만, 모든 효과기 기능을 보유하고 있지 않은 변경된 다중특이적 항원-결합 단백질이 본 명세서에서 제공되는데, 이것은, 다중특이적 항원-결합 단백질 생체내의 반감기가 중용한 많은 적용에서 바람직한 후보가 되지만, 특정 효과기 기능 (예컨대 보체 및 ADCC)은 불필요하거나 유해하다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질은 감소된 Fc γ R 결합 활성을 나타낸다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질은 K322A, L234A 및 L235A (EU 넘버링)로 구성된 군으로부터 선택된 Fc 영역에서 적어도 1, 적어도 2, 또는 3종의 돌연변이를 포함한다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질은 Fc 영역에서의 N297A 치환 돌연변이를 포함하는 비당화된 다중특이적 항원-결합 단백질이다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 포함하는 비당화된 다중특이적 항원-결합 단백질이다: 예를 들면, Fc 영역에서의 N297G 치환 돌연변이. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질은 H1 및 H2의 C-말단 라이신 (K447)에서의 결실을 포함한다. 특정 구현예에서, 생산된 다중특이적 항원-결합 단백질의 Fc 활성은, 단지 요망된 특성이 유지됨을 확인하기 위해 측정된다. 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 검정은 CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고살을 확인하도록 수행될 수 있다. 예를 들면, Fc 수용체 (FcR) 결합 검정은, 다중특이적 항원-결합 단백질은 Fc γ R 결합이 없지만 (따라서 ADCC 활성이 없을 것 같지만), FcRn 결합 능력을 유지한다는 것을 보장하도록 수행될 수 있다. ADCC, NK 세포를 매개하는 1차 세포는, Fc γ RIII 단독을 발현시키고, 반면에 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현시킨다. 조혈 세포에 대한 FcR 발현은 하기의 페이지 464의 표 3에 요약되어 있다: Ravetch 및 Kinet, *Annu.Rev.Immunol* 9:457-92 (1991). 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 검정의 예는 하기에서 기재되어 있다: US 특허 번호 5,500,362 또는 5,821,337.그와 같은 검정을 위한 유용한 효과기 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 살해 (NK) 세포를 포함한다. 대안적으로, 또는 추가로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체내, 예를 들면, 하기 예에서 개시된 동물 모델에서 평가될 수 있다: Clynes 등 *PNAS (USA)* 95:652-

656 (1998). C1q 결합 검정은 또한, 다중특이적 항원-결합 단백질이 C1q에 결합할 수 없고 따라서 CDC 활성이 없다는 것을 확인하기 위해 수행될 수 있다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들면 하기에 기재된 CDC 검정: Gazzano-Santoro 등, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)이 수행될 수 있다. FcRn 결합 및 생체내 청소능/반감기 결정은 또한 당해 분야에서 공지된 방법을 사용하여 수행될 수 있다.

[0680] **접합된 단백질**

[0681] 본 명세서에서 기재된 다중특이적 항원-결합 단백질 (예를 들면, 본 명세서에서 기재된 방법에 따라 제조된 다중특이적 항원-결합 단백질) 중 임의의 것을 포함하는 접합된 단백질 예컨대 접합된 다중특이적 항원-결합 단백질 또는 면역접합체 (예를 들면, "항체-약물 콘주게이트" 또는 "ADC")가 본 명세서에서 또한 제공되고, 여기서 경쇄 또는 중쇄의 불변 영역 중의 하나는 화학 분자 예컨대 염료 또는 세포독성 약물 예컨대 화학치료제, 약물, 성장 저해 제제, 독소 (예를 들면, 박테리아, 진균, 식물, 또는 동물 기원, 또는 그것의 단편의 효소 활성 독소), 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사선접합체)에 접합된다. 특히, 본원에서 기재된 바와 같이, 헤테로다량체화 도메인의 사용은 2개의 상이한 중쇄 (HC1 및 HC2) 뿐만 아니라 2개의 상이한 경쇄 (LC1 및 LC2)를 함유하는 항체의 작제를 가능하게 한다. 본 명세서에서 기재된 방법을 사용하여 작제된 면역접합체는 중쇄 (HC1 또는 HC2)의 단 하나 또는 경쇄 (LC1 또는 LC2)의 단 하나의 불변 영역에 접합된 세포 독성 약물을 함유할 수 있다. 또한, 면역접합체가 단 하나의 중쇄 또는 경쇄에 부착된 세포독성 약물을 가질 수 있기 때문에, 대상체에게 투여 중인 세포독성 약물의 양은 중쇄 및/또는 경쇄에 부착된 세포독성 약물을 갖는 다중특이적 항원-결합 단백질의 투여에 대해 감소된다. 대상체에게 투여 중인 세포독성 약물의 양의 감소는 세포독성 약물과 관련된 유해한 부작용을 제한한다.

[0682] 암의 치료에서 종양 세포를 사멸 또는 억제하기 위한 세포독성 또는 세포증식억제제, 즉, 약물의 국부 전달용 다중특이적 항원-결합 단백질-약물 콘주게이트의 사용 (Syrigos 및 Epenetos, *Anticancer Research* 19:605-614 (1999); Niculescu-Duvaz 및 Springer, *Adv.Drg.Del.Rev.*26:151-172 (1997); U.S. 특허 번호 4,975,278)는 약물 모이머티의 종양에의 표적화된 전달, 및 그것 내의 세포내 축적을 허용하고, 여기서 이들 비접합된 약물 제제의 전신 투여는 정상 세포 뿐만 아니라 제거되는 종양 세포에 대한 독성의 허용될 수 없는 수준을 초래할 수 있다 (Baldwin 등 *Lancet* (Mar.15, 1986): 603-605 (1986); Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies '84:Biological And Clinical Applications*, A.P인치라 등 (eds.), pp. 475-506). 최소 독성으로 최대 효능이 추구된다. 다클론성 항체 및 단클론성 항체 둘 모두는 이들 전략에서 유용한 것으로 보고되었다 (Rowland 등., *Cancer Immunol.Immunother.*21:183-187 (1986)). 이들 방법에서 사용된 약물은 다우노마이신, 독소루비신, 메토타렉세이트, 및 빈데신을 포함한다 (Rowland 등 (1986) *상기*). 항체-독소 콘주게이트에서 사용된 독소는 박테리아 독소 예컨대 디프테리아 독소, 식물 독소 예컨대 리신, 소분자 독소 예컨대 젤다나마이신을 포함한다 (Mandler 등 *Jour. of Nat.Cancer Inst.*92(19): 1573-1581 (2000); Mandler 등 *Bioorganic & Med.Chem.Letters* 10:1025-1028 (2000); Mandler 등 *Bioconjugate Chem.*13:786-791 (2002)), 메이탄시노이드 (EP 1391213; Liu 등 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623 (1996)), 및 칼리키아마이신 (Lode 등 *Cancer Res.*58:2928 (1998); Hinman 등 *Cancer Res.*53:3336-3342 (1993)). 독소는 튜블린 결합, DNA 결합, 또는 토포이소머라제 저해를 포함하는 기전에 의해 그것의 세포독성 및 세포증식억제 효과에 영향을 줄 수 있다. 일부 세포독성 약물은, 큰 항체 또는 단백질 수용체 리간드에 접합될 때 불활성 또는 더 적은 활성인 경향이 있다.

[0683] 면역접합체의 생성에 유용한 화학치료제는 본 명세서에 기재되어 있다: (예를 들면, *상기*). 사용될 수 있는 효소 활성 독소 및 그것의 단편은 하기를 포함한다: 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 사슬 (슈도모나스 에어루기노사로부터), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모택신 A 사슬, 알파-사르신, 알류라이테스 포르디 단백질, 디안틴 단백질, 파이프라카 아메리카나 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 차란티아 저해제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 저해제, 젤로닌, 마이토겐린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신, 및 트리코테센. *참고, 예를 들면*, WO 93/21232(1993년 10월 28일 공개). 다양한 방사선 핵종은 방사선접합된 항체의 생산을 위해 이용가능하다. 그 예는 ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y, 및 ¹⁸⁶Re를 포함한다. 다중특이적 항원-결합 단백질 및 세포독성 약물의 콘주게이트는 made using 다양한 이중작용성 단백질-커플링제 예컨대 N-석신이미딜-3-(2-피리디디티올) 프로피오네이트 (SPDP), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이중작용성 유도체 (예컨대 디메틸 아디프이미데이트 HC1), 활성 에스테르 (예컨대 디석신이미딜 우베레이트), 알데하이드 (예컨대 글루타르알데하이드), 비스-아지도 화합물 (예컨대 비스 (파지도벤조일) 핵산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대 비스-(프디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠). 예를 들면, 리신 면역독소는

하기에서 기재된 바와 같이 제조될 수 있다: Vitetta 등 Science 238:1098 (1987). 탄소-14-표지된 1-이소티오시아나토벤질- 3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 방사선택중의 항체에의 콘주게이션의 예시적인 킬레이트제이다. **참고, 예를 들면, WO 94/11026.**

[0684] 독소 활성을 갖는 다중특이적 항원-결합 단백질 및 1종 이상의 소분자 독소, 예컨대 칼리키아마이신, 메이탄시노이드, 돌라스타틴, 아우로스타틴, 트리코테센, 및 CC1065, 및 이들 독소의 유도체의 콘주게이트가 또한 본 명세서에서 고려된다.

[0685] **메이탄신 및 메이탄시노이드**

[0686] 일부 구현예에서, 면역접합체는 1종 이상의 메이탄시노이드 분자에 접합된, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질 (전장 또는 단편)을 포함한다. 메이탄시노이드는 튜블린 중합을 억제함으로써 작용하는 유사 분열 저해제이다. 메이탄신은 동아프리카 관목 *메이테너스 세라타로부터* 먼저 단리되었다(U.S. 특허 번호 3,896,111). 그 뒤에, 특정 미생물이 또한 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄시놀 및 C-3 메이탄시놀 에스테르를 생성하는 것으로 밝혀졌다 (U.S. 특허 번호 4,151,042). 합성 메이탄시놀 및 이것의 유도체 및 유사체는, 예를 들면, 하기에서 개시되어 있다: U.S. 특허 번호 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; 및 4,371,533.

[0687] 메이탄시노이드 약물 모이어티가 항체 약물 콘주게이트 중 매력적인 약물 모이어티인 것은 하기이기 때문이다: (i) 발효 생성물의 유도체화에 의해 제조하기가 상대적으로 접근가능하고, (ii) 항체에 대한 비(non)디설파이드 링커를 통한 콘주게이션에 적합한 작용기에 의한 유도체화가 쉽고, (iii) 혈장에서 안정적이고, 그리고 (iv) 다양한 종양 세포주에 대해 효과적이다.

[0688] 메이탄시노이드를 함유하는 면역접합체, 이를 제조하는 방법, 및 그것의 치료 용도는, 예를 들면, 하기에서 개시된다: U.S. 특허 번호 5,208,020, 5,416,064 및 유럽 특허 EP 0 425 235 81(그것의 개시내용은 참고로 본 명세서에 명확히 편입되어 있음). Liu 등 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)는 인간 결장직장암에 대해 지향된 단클론성 항체 C242에 연결된 DM1로 지정된 메이탄시노이드를 포함하는 면역접합체를 기재했다. 콘주게이트는 배양된 결장암 세포에 대해 고도 세포독성인 것으로 밝혀졌고, *생체내* 종양 성장 검정에서 항종양 활성을 나타내었다. Chari 등 Cancer Research 52:127-131 (1992)은, 메이탄시노이드가 인간 결장암 세포주 상의 항원에 결합하는 것 과 항체 A7, 또는 HER-2/neu 종양유전자에 결합하는 또 다른 것 과 단클론성 항체 TA.1에 디설파이드 링커를 통해 접합된 면역접합체를 기재한다. TA.1-메이탄시노이드 콘주게이트의 세포독성은 세포 당 3×10^5 HER-2 표면 항원을 발현시키는 인간 유방암 세포주 SK-BR-3에 대해 시험관내 시험되었다. 약물 콘주게이트는 유리 메이탄시노이드 약물과 유사한 세포독성의 정도를 달성했는데, 이것은 항체 분자 당 메이탄시노이드 분자의 수를 증가시킴으로써 증가될 수 있다. A7-메이탄시노이드 콘주게이트 마우스에서 낮은 전신 세포독성을 나타내었다.

[0689] 다중특이적 항원-결합 단백질-메이탄시노이드 콘주게이트는 다중특이적 항원-결합 단백질 또는 메이탄시노이드 분자의 생물학적 활성을 상당히 줄이지 않으면서 다중특이적 항원-결합 단백질을 메이탄시노이드 분자에 화학적으로 연결시켜서 제조된다. **참고, 예를 들면, 미국특허 번호 5,208,020** (그것의 개시내용은 참고로 본 명세서에 명확히 편입되어 있음). 항체 분자에 대해 접합된 3-4개의 메이탄시노이드 분자의 평균은 항체의 기능 또는 용해도에 부정적으로 영향을 주지 않으면서 표적 세포의 세포독성을 향상시키는 효능을 나타내었지만, 심지어 독소/항체의 하나의 분자조차도 기존의 항체의 사용보다 세포독성을 향상시킬 것으로 예상된다. 메이탄시노이드는 당해 기술에서 잘 알려져 있고, 공지된 기술에 의해 합성될 수 있거나 천연 공급원으로부터 단리된다. 적합한 메이탄시노이드는 예를 들면, 하기에 개시된다: U.S. 특허 번호 5,208,020 및 위에서 언급한 다른 특허 및 비특허 공보. 바람직한 메이탄시노이드는 방향족 고리에서 또는 메이탄시놀 분자, 예컨대 다양한 메이탄시놀 에스테르의 다른 위치에서 변형된 메이탄시놀 및 메이탄시놀 유사체이다.

[0690] 하기에서 개시된 예의 것을 포함하는 다중특이적 항원-결합 단백질 메이탄시노이드 콘주게이트를 제조하기 위해 당해기술에서 공지된 많은 연결기가 있다: U.S. 특허 번호 5,208,020 또는 EP 특허 0 425 235 B1, Chari 등 Cancer Research 52:127-131 (1992), 및 U.S. 특허 출원 공개 번호 2005/0169933(그것의 개시내용은 참고로 본 명세서에 명확히 편입되어 있음). 링커 성분 SMCC을 포함하는 항체-메이탄시노이드 콘주게이트는 하기에서 개시된 바와 같이 제조될 수 있다: U.S. 특허 출원 공개 번호 2005/0169933. 연결 기는 상기-확인된 특허에서 개시된 바와 같이 디설파이드 그룹, 티오에테르 그룹, 산 불안정적인 그룹, 광불안정적인 그룹, 펩티다아제 불안정적인 그룹, 또는 에스테라제 불안정적인 그룹을 포함하고, 디설파이드 및 티오에테르 그룹이 바람직하다. 추가의 연

결 기는 본 명세서에서 기재되고 예시된다.

- [0691] 다중특이적 항원-결합 단백질 및 메이탄시노이드의 콘주게이트는 하기를 사용하여 만들어질 수 있다: 다양한 이중작용성 단백질 커플링제 예컨대 N-석신이미딜-3-(2-피리딜티오) 프로피오네이트 (SPDP), 석신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 사이클로헥산-1-카복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이중작용성 유도체 (예컨대 디메틸 아디프이미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예컨대 디석신이미딜 우베레이트), 알데하이드 (예컨대 글루타르알데하이드), 비스-아지도 화합물 (예컨대 비스 (p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대 비스-(p-디아조늄벤조일)에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠). 특히 바람직한 커플링제는 하기를 포함한다: N-석신이미딜-3-(2-피리딜티오) 프로피오네이트 (SPDP) (Carlsson 등 Biochem.J. 173:723-737 (1978)) 및 N-석신이미딜-4-(2-피리딜티오)펜타노에이트 (SPP) (이것을 디설파이드 연결을 제공하기 위한 것).
- [0692] 링커는 연결의 유형에 따라 다양한 위치에서 메이탄시노이드 분자에 부착될 수 있다. 예를 들면, 에스테르 연결은 종래의 커플링 기술을 사용하여 하이드록실 그룹과의 반응에 의해 형성될 수 있다. 반응은 하이드록실 그룹을 갖는 C-3 위치, 하이드록시메틸로 변형된 C-14 위치, 하이드록실 그룹으로 변형된 C-15 위치, 및 하이드록실 그룹을 갖는 C-20 위치에서 일어날 수 있다. 바람직한 구현예에서, 연결은 메이탄시놀 또는 메이탄시놀 유사체의 C-3 위치에서 형성된다.
- [0693] **아우리스타틴 및 돌라스타틴**
- [0694] 일부 구현예에서, 면역접합체는 돌라스타틴 또는 돌라스타틴 펩타이드 유사체 및 유도체, 아우리스타틴에 접합된 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질을 포함한다 (U.S. 특허 번호 5,635,483 및 5,780,588). 돌라스타틴 및 아우리스타틴은 미세소관 동력학, GTP 가수분해, 및 핵 및 세포성 분할 (Woyke 등 Antimicrob.Agents and Chemother.45(12): 3580-3584 (2001))을 방해하고 하기를 갖는 것으로 보여졌다: 항암 (U.S. 특허 번호 5,663,149) 및 항진균 활성 (Pettit 등 Antimicrob.Agents Chemother.42:2961-2965 (1998)). 돌라스타틴 또는 아우리스타틴 약물 모이어티는 펩타이드 약물 모이어티의 N- (아미노) 말단 또는 C- (카복실) 말단을 통해 다중특이적 항원-결합 단백질에 부착될 수 있다 (WO 02/088172).
- [0695] 예시적인 아우리스타틴 구현예는 하기에서 개시된 N-말단 연결된 모노메틸아우리스타틴 약물 모이어티 DE 및 DF를 포함한다: "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands," U.S. 출원 공개 번호 2005/0238649(그것의 개시내용은 그 전문이 참고로 명확히 편입되어 있음).
- [0696] 전형적으로, 펩타이드-기반 약물 모이어티는 2종 이상의 아미노산 및/또는 펩타이드 단편 사이의 펩타이드 결합을 형성함으로써 제조될 수 있다. 그와 같은 펩타이드 결합은, 예를 들면, 액상 합성 방법에 따라 제조될 수 있다 (참고 E. Schroder 및 K. Lubke, "The Peptides," volume 1, pp. 76-136, 1965, Academic Press) (이는 펩타이드 화학의 분야에서 잘 알려져 있음). 아우리스타틴/돌라스타틴 약물 모이어티는 하기의 방법에 따라 제조될 수 있다: 미국특허 번호 5,635,483 및 5,780,588; Pettit 등 J. Nat.Prod.44:482-485 (1981); Pettit 등 Anti-Cancer Drug Design 13:47-66 (1998); Poncet, Curr. Pharm. Des. 5:139-162 (1999); 및 Pettit, Fortschr. Chem. Org. Naturst. 70:1-79 (1997). 참고 또한 Doronina, Nat.Biotechnol.21 (7): 778-784 (2003); 및 "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands," U.S. 출원 공개 번호 2005/0238649(그 전문이 본 명세서에 참고로 편입됨) (예를 들면, 모노메틸발린 화합물 예컨대 링커에 접합된 MMAE 및 MMAF를 제조하는 링커 및 방법을 개시함).
- [0697] **칼리키아마이신**
- [0698] 다른 구현예에서, 면역접합체는 1종 이상의 칼리키아마이신 분자에 접합된 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질을 포함한다. 항생제의 칼리키아마이신 계열은 이중-가닥 DNA 절단체를 서브피코몰 농도로 생성할 수 있다. 칼리키아마이신 계열의 콘주게이트의 제조에 대해, 참고 U.S. 특허 번호 5,712,374; 5,714,586; 5,739, 116; 5,767,285; 5,770,701; 5,770,710; 5,773,001; 및 5,877,296 (모든는 American Cyanamid Company 임). 사용될 수 있는 칼리키아마이신의 구조적 유사체는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-아세틸- γ_1^I , PSAG 및 Θ_1^I (Hinman 등 Cancer Research 53:3336- 3342 (1993), Lode 등 Cancer Research 58:2925-2928 (1998) 및 상기 언급된 U.S. 특허(American Cyanamid)). 다중특이적 항원-결합 단백질이 접합될 수 있는 또 다른 항종양 약물은 항염산제인 QFA이다. 칼리키아마이신 및 QFA 둘 모두는 세포내 작용 부위를 가지며 원형질막을 쉽게 가로지르지 못한다. 따라서, 항체 매개된 내재화를 통한 이들 제제의 세포성 흡수는 그것

의 세포독성 효과를 크게 향상시킨다.

[0699] **다른 세포독성 약물**

[0700] 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질에 결합될 수 있는 다른 항종양 제제는 BCNU, 스트렙토조신, 빈크리스틴 및 5-플루오로우라실을 포함하고, 이들은 하기에서 기재된 집합적으로 LL-E33288 복합체로 공지된 제제의 계열이다: U.S. 특허 번호 5,053,394 및 5,770,710, 뿐만 아니라 에스페라마이신 (U.S. 특허 번호 5,877,296).

[0701] 사용될 수 있는 효소 활성 독소 및 그것의 단편은 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 사슬 (슈도모나스 에어루기노사로부터), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모택신 A 사슬, 알파-사르신, 알류라이테스 포르디 단백질, 디안틴 단백질, 파이톨라카 아메리카나 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 차란티아 저해제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 저해제, 젤로닌, 마이토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센 (참고, 예를 들면, WO 93/21232, 1993년 10월 28일 공개)를 포함한다.

[0702] 본 명세서에서 기재된 다중특이적 항원-결합 단백질과 핵산분해 활성을 갖는 화합물 (예를 들면, 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도뉴클레아제 예컨대 데옥시리보뉴클레아제; DNase) 사이에 형성된 면역접합체가 또한 제공된다.

[0703] 종양의 선택적 파괴를 위해, 다중특이적 항원-결합 단백질은 고도 방사선 원자를 포함할 수 있다. 다양한 방사성 동위원소는 방사선접합된 항체의 생산을 위해 이용가능하다. 그 예는 At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} 및 Lu의 방사성 동위원소를 포함한다. 콘주게이트가 검출을 위해 사용될 때, 섬광계수법 연구용 방사선 원자, 예를 들면 tc99m 또는 I123, 또는 핵자기 공명 (NMR) 화상형성 (자기 공명 영상, MRI로도 공지됨)에 스핀 표지, 예컨대 또한 요오드-123, 요오드-131, 인듐-111, 붐소-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망간 또는 철을 포함할 수 있다.

[0704] 방사선- 또는 다른 라벨은 공지된 방식으로 콘주게이트에서 편입될 수 있다. 예를 들면, 펩타이드는 생합성될 수 있거나, 예를 들면, 수소 대신에 붐소-19를 수반하는 적합한 아미노산 전구체를 사용하여 화학 아미노산 합성에 의해 합성될 수 있다. 라벨 예컨대 tc^{99m} 또는 I^{123} , Re^{186} , Re^{188} , 및 In^{111} 는 펩타이드에서 시스테인 잔기를 통해 부착될 수 있다. 이트륨-90은 라이신 잔기를 통해 부착될 수 있다. IODOGEN 방법 (Fraker 등 Biochem.Biophys.Res.Commun.80:49-57 (1978))이 사용되어 요오드-123을 편입시킬 수 있다. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989)은 다른 방법을 상세히 기재하고 있다.

[0705] 다중특이적 항원-결합 단백질 및 세포독성 약물의 콘주게이트는 하기를 사용하여 만들어질 수 있다: 다양한 이중작용성 단백질 커플링제 예컨대 N-석신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 석신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 사이클로헥산-1-카복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이중작용성 유도체 (예컨대 디메틸 아디프이미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예컨대 디석신이미딜 우베레이트), 알데하이드 (예컨대 글루타르알데하이드), 비스-아지도 화합물 (예컨대 비스 (p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대 비스-(p-디아조늄벤조일)에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 붐소 화합물 (예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠). 예를 들면, 리신 면역독소는 하기에서 기재된 바와 같이 제조될 수 있다: Vitetta 등 Science 238:1098 (1987). 탄소-14-표지된 1-이소티오시아나토벤젠-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 방사선헤중의 다중특이적 항원-결합 단백질로의 콘주게이션의 예시적인 킬레이트제이다. 참고, 예를 들면, WO 94/11026. 링커는 세포에서 세포독성 약물의 방출을 편리하게 하는 "절단가능 링커"일 수 있다. 예를 들면, 산-불안정적인 링커, 펩티다아제-감수성 링커, 광불안정적인 링커, 디메틸 링커 또는 디설파이드-함유 링커 (Chari 등 Cancer Research 52:127-131 (1992); U.S. 특허 번호 5,208,020)가 사용될 수 있다.

[0706] 그와 같은 화합물은, 비제한적으로, 하기의 가교결합제 시약으로 제조된 ADC를 포함한다: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 설폰-EMCS, 설폰-GMBS, 설폰-KMUS, 설폰-MBS, 설폰-SIAB, 설폰-SMCC, 및 설폰-SMPB, 및 SVSB (석신이미딜-(4-비닐설폰)벤조에이트), 이것은 상업적으로 입수가능하다 (예를 들면, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A.). 참고 페이지 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

[0707] **접합된 다중특이적 항원-결합 단백질의 제조**

[0708] 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질은, 선택적으로 링커를 통해 1종 이상의 모이어티 (예를 들면, 약물 모이어티), 예를 들면, 다중특이적 항원-결합 단백질 당 약 1 내지 약 20 모이어티

에 접합된다. 접합된 항체는 당해 분야의 숙련자에게 공지된 유기 화학 반응, 조건, 및 시약을 이용하는 몇 개의 경로에 의해 제조될 수 있고, 상기 경로는 하기를 포함한다: (1) 공유 결합을 통한 다중특이적 항원-결합 단백질의 친핵성 그룹과 2가 링커 시약과의 반응, 그 다음 관심 모이어티와의 반응; 및 (2) 공유 결합을 통한 모이어티의 친핵성 그룹과 2가 링커 시약과의 반응, 그 다음 다중특이적 항원-결합 단백질의 친핵성 그룹과의 반응. 접합된 항체를 제조하는 추가의 방법은 본 명세서에 기재되어 있다.

[0709] 링커 시약은 1종 이상의 링커 성분을 포함할 수 있다. 예시적인 링커 성분은 6-말레이미도카프로일 ("MC"), 말레이미도프로파노일 ("MP"), p-아미노벤질옥시카보닐 ("PAB"), N-석신이미딜 4-(2-피리딜티오) 펜타노에이트 ("SPP"), N-석신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 사이클로헥산-1-카복실레이트 ("SMCC"), 및 N-석신이미딜 (4-아이오도-아세틸) 아미노벤조에이트 ("SIAB")을 포함한다. 추가의 링커 성분은 당해 기술에 공지되어 있고, 그리고 일부는 본 명세서에 기재되어 있다. 참고 또한 "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands," U.S. 출원 공개 번호 2005/0238649(이들의 내용은 참고로 그 전문이 본 명세서에 편입되어 있음).

[0710] 일부 구현예에서, 링커는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 예시적인 아미노산 링커 성분은 디펩타이드, 트리펩타이드, 테트라펩타이드 또는 펜타펩타이드를 포함한다. 예시적인 디펩타이드는 하기를 포함한다: 발린-시트룰린 (vc 또는 val-cit), 알라닌-페닐알라닌 (af 또는 ala-phe). 예시적인 트리펩타이드는 하기를 포함한다: 글리신-발린-시트룰린 (gly-val-cit) 및 글리신-글리신-글리신 (gly-gly-gly). 아미노산 링커 성분을 포함하는 아미노산 잔기는 천연 발생의 것, 뿐만 아니라 소수 아미노산 및 비-천연 발생 아미노산 유사체, 예컨대 시트룰린을 포함한다. 아미노산 링커 성분은 특정한 효소, 예를 들면, 종양-관련된 프로테아제, 카텝신 B, C 및 D, 또는 플라스민 프로테아제에 의한 효소 절단에 대한 선택성으로 설계되고 최적화될 수 있다.

[0711] 항체 상의 친핵성 그룹은, 비제한적으로 하기를 포함한다: (i) N-말단 아민 그룹, (ii) 측쇄 아민 그룹, 예를 들면, 라이신, (iii) 측쇄 티올 그룹, 예를 들면, 시스테인, 및 (iv) 다중특이적 항원-결합 단백질이 당화되는 당 하이드록실 또는 아미노 그룹. 아민, 티올, 및 하이드록실 그룹은 친핵성이고 하기를 포함하는 링커 시약 및 링커 모이어티 상의 친전자성 그룹과의 공유 결합을 형성하기 위해 반응할 수 있다: (i) 활성 에스테르 예컨대 NHS 에스테르, HOBt 에스테르, 할로포르메이트, 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드 예컨대 할로아세트아미드; (iii) 알데하이드, 케톤, 카복실, 및 말레이미드 그룹. 특정 항체는 환원성 사슬간 디설파이드, 즉, 시스테인 브릿지를 갖는다. 항체는 환원제 예컨대 OTT (디티오프레이톨)에 의한 처리에 의해 링커 시약과의 공유 결합을 형성하기 위해 반응성이 있을 수 있다. 각 시스테인 브릿지는 따라서, 이론적으로, 2종의 반응성 티올 친핵체들을 형성할 것이다. 추가의 친핵성 그룹은 라이신과 2-이미노티올란 (트라우트 시약)과의 반응을 통해 항체에 도입될 수 있고, 이로써 아민이 티올로 전환된다. 반응성 티올 그룹은 1, 2, 3, 4 또는 그 초과 개의 시스테인 잔기를 도입하여 (예를 들면, 1종 이상의 비-원상태 시스테인 아미노산 잔기를 포함하는 돌연변이체 항체를 제조하여) 다중특이적 항원-결합 단백질 (또는 그것의 단편)에 도입될 수 있다.

[0712] 접합된 다중특이적 항원-결합 단백질 또한, 링커 시약 또는 약물 상의 친핵성 치환체 또는 다른 모이어티와 반응할 수 있는 친전자성 모이어티를 도입하기 위해 다중특이적 항원-결합 단백질의 변형에 의해 생성될 수 있다. 당화된 항체의 당류는, 예를 들면, 피아이오데이트 산화 시약으로 산화되어 링커 시약 또는 약물의 아민 그룹 또는 다른 모이어티와 반응할 수 있는 알데하이드 또는 케톤 그룹을 형성할 수 있다. 수득한 이민 슈프 염기 그룹은 안정적인 연결을 형성할 수 있거나, 예를 들면, 보로하이드라이드 시약에 의해 환원되어 안정적인 아민 연결기를 형성할 수 있다. 일 구현예에서, 당화된 다중특이적 항원-결합 단백질의 탄수화물 부분과 락타토오스 옥시다제 또는 나트륨 메타-피아이오데이트와의 반응은 약물 상의 적절한 그룹 또는 다른 모이어티와 반응할 수 있는 단백질에서 카보닐 (알데하이드 및 케톤) 그룹을 생성할 수 있다 (Hermanson, Bioconjugate Techniques). 또 다른 구현예에서, N-말단 세린 또는 트레오닌 잔기를 함유하는 단백질은 나트륨 메타-피아이오데이트와 반응되어, 제1 아미노산 대산에 알데하이드를 생산할 수 있다 (Geoghegan 및 Stroh, Bioconjugate Chem.3:138-146 (1992); U.S. 특허 번호 5,362,852). 그와 같은 알데하이드는 약물 모이어티 또는 링커 친핵체와 반응될 수 있다.

[0713] 마찬가지로, 모이어티 (예컨대 약물 모이어티) 상의 친핵성 그룹은, 비제한적으로 하기를 포함한다: 공유 결합을 형성하기 위해 링커 모이어티 및 링커 시약 (하기 포함) 상의 친전자성 그룹과 반응할 수 있는 아민, 티올, 하이드록실, 하이드라자이드, 옥심, 하이드라진, 티오세미카바존, 하이드라진 카복실레이트, 및 아릴하이드라자이드 그룹: (i) 활성 에스테르 예컨대 NHS 에스테르, HOBt 에스테르, 할로포르메이트, 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드 예컨대 할로아세트아미드; 및 (iii) 알데하이드, 케톤, 카복실, 및 말레이미드 그룹.

[0714] 대안적으로, 다중특이적 항원-결합 단백질 및 세포독성 약물을 포함하는 융합 단백질은, 예를 들면, 재조합 기

술 또는 펩타이드 합성에 의해 만들어질 수 있다. DNA의 길이는 콘주게이트의 요망된 특성을 파괴하지 않는 링 커 펩타이드를 인코딩하는 영역에 의해 서로 인접하거나 분리된 콘주게이트의 2개의 부분을 인코딩하는 각 영역을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 상기 다중특이적 항원-결합 단백질-수용체 콘주게이트가 개체에게 투여되는 종양 사전-표적화에서의 이용, 그 다음 투명체를 사용하여 순환으로부터 미결합된 콘주게이트의 제거 및 그 다음 세포독성 약물 (예를 들면, 방사선뉴클레오타이드)에 접합된 "리간드" (예를 들면, 아비딘)의 투여를 위해 "수용체" (예컨대 스트렙타비딘)에 접합될 수 있다.

[0715] **유용성**

[0716] 본 명세서에서 제공된 방법은 다중특이적 항원-결합 단백질의 생산에서 산업상 이용가능성을 발견한다. 본 명세서에서 기재된 다중특이적 항원-결합 단백질은, 예를 들면, *시험관내*, *생체외* 및 *생체내* 치료 방법에서 사용된다. 이들 분자 중 하나 이상의 사용을 기반으로 하는 다양한 방법이 본 명세서에서 제공된다. 특정 병태에서, 다중특이적 항원-결합 단백질 (예컨대 이중특이적 항체)를 이용하는 것이 필요하고/거나 바람직하다. 다양한 목적을 위해, 예를 들면 치료제, 예방제 및 진단제로서 사용될 수 있는 다중특이적 항원-결합 단백질이 본 명세서에서 제공된다. 예를 들면, 질환을 치료하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 치료가 필요한 대상체에게 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질을 투여함으로써, 질환이 치료되는 것을 포함한다. 본 명세서에서 기재된 다중특이적 항원-결합 단백질 중 임의의 것은 본 명세서에서 기재된 치료 (또는 예방적 또는 진단) 방법에서 사용될 수 있다.

[0717] 예를 들면, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 하나의 귀중한 이점은 그것의 항원에 대한 향상된 결합능이다. 항원 기준으로 결합 단위 (즉, Fab)에 대한 고유 고친화도를 갖는 것 외에, 정상 IgG 항체는 또한 표적에 대한 그것의 2가 결합의 결과로서 항원과의 회합을 증가시키기 위해 결합능 효과를 활용한다.

[0718] 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질은 2종 이상의 항원 분자 상의 에피토프에 결합한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 동일한 항원 분자 상의 2종 이상의 에피토프에 결합한다. 동일한 항원 분자 상의 2개의 별개의 에피토프에 대해 지향된 다중특이적 항원-결합 단백질은 향상된 결합능 (2가 결합이기 때문에) 향상된 결합능의 이점을 제공할 수 있을 뿐만 아니라, 또한, 모 항체와 관련없는 신규 특성을 얻을 수 있다. 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질은 예를 들면, 수용체-리간드 상호작용의 차단에 사용된다.

[0719] 본 명세서에서 기재된 다중특이적 항원-결합 단백질은 또한 하나의 분자로 2개의 표적의 신호전달 경로를 동시에 차단하는 적용에서 사용된다.

[0720] **치료 용도**

[0721] 다중특이적 항원-결합 단백질 (예컨대 본 명세서에서 기재된 항체 및 항체 단편)이 치료 적용에 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 대상체에서 질환을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 대상체에게 유효량의 본 명세서에서 기재된 다중특이적 항원-결합 단백질을 투여하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 질환의 치료용 약제의 제조에서의, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 용도가 제공된다. 특정 구현예에서, 대상체에서 질환을 치료하는데 사용되는 다중특이적 항원-결합 단백질이 제공된다.

[0722] 예를 들면, 그와 같은 다중특이적 항원-결합 단백질은 하기를 치료하기 위해 사용될 수 있다: 전-암성, 비-전이성, 전이성, 및 암성 종양 (예를 들면, 초기 단계 암)을 포함하는 종양, 알리지성 또는 염증성 장애, 또는 자가면역 질환, 또는 암 (예를 들면, 유방암, 결장직장암, 폐암, 신장 세포 암종, 신경아교종, 또는 난소암), 알리지성 또는 염증성 장애, 또는 자가면역 질환이 발달한 위한에 있는 대상체.

[0723] 용어 암는 전-암성 성장, 양성 종양, 및 악성 종양을 비제한적으로 포함하는 증식성 장애의 수집을 포용한다. 양성은, 원위 부위로 침입하거나 전이한다. 악성 종양은 주변의 다른 조직에 침입하고 손상시킬 것이다. 상기 종양은 또한, 보통 혈류를 통해 또는 림프절이 위치한 림프계를 통해 시작하여 신체의 다른 부분으로 퍼지고 (전이하는) 능력을 얻을 수 있다. 원발성 종양은 발생하는 조직의 유형에 의해 분류되고; 전이성 종양은 암 세포가 유도된 조직 유형에 의해 분류된다. 경시적으로, 악성 종양의 세포는 더 비정상적으로 되어 정상 세포처럼 보이지 않게 된다. 암 세포의 외관의 이러한 변화는 종양 등 급이라 불리며 암 세포는 잘-분화된, 중간 정도로 분화된, 저조하게-분화된, 또는 미분화된 것으로 기재된다. 잘-분화된 세포는 정상적으로 나타내고 유래된 정상 세포와 유사하다. 미분화된 세포는 비정상적이 되어 세포의 기원을 더 이상 결정할 수 없는 세포이다.

[0724] 종양은 고형 종양 또는 비-고형 또는 연조직 종양일 수 있다. 연조직 종양의 예는 하기를 포함한다: 백혈병 (예를 들면, 만성 골수성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 성인 급성 림프아구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 성숙한

B-세포 급성 림프아구성 백혈병, 만성적 림프구성 백혈병, 전림프구성 백혈병, 또는 모발 세포 백혈병), 또는 림프종 (예를 들면, 비-호지킨 림프종, 피부 T-세포 림프종, 또는 호지킨 질환). 고형 종양은 혈액, 골수, 또는 림프계 이외의 신체 조직의 임의의 암을 포함한다. 고형 종양은 상피 세포 기원의 것 및 비-상피 세포 기원의 것으로 추가로 분리될 수 있다. 상피성 세포 고형 종양의 예는 위장관, 결장, 유방, 전립선, 폐, 신장, 간, 췌장, 난소, 두경부, 구강, 위, 십이지장, 소장, 대장, 항문, 담낭, 음순, 비인두, 피부, 자궁, 남성 생식기 장기, 비뇨기, 방광, 및 피부의 종양을 포함한다. 비-상피성 기원의 고형 종양은 육종, 뇌종양, 및 골 종양을 포함한다.

[0725] 상피성 암은 일반적으로 양성 종양에서 침입전 단계 (예를 들면, 암종 인시투), 기저막에 침투하고 상피화 기질에 침입한 악성 암으로 진전된다. 다중특이적 항원-결합 단백질 복합체는 또한 이들 치료 적용에서 사용될 수 있고 HER2에 결합하는 항체는 특히 유방암, 결장직장암, 폐암, 신장 세포 암종, 신경아교종, 또는 난소암을 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0726] 본 명세서에서 제공된 조성물을 수용하는 호보자인 다른 대상체는 하기를 가지고 있거나 그것을 발달시킬 위험에 있다: 섬유육관 조직의 비정상 증식, 장미 여드름, 획득된 면역 결핍 증후군, 동맥 폐색, 아토피성 각막염, 박테리아 케양, 베체트 질환, 혈액 유래 종양, 경동맥 폐쇄성 질환, 맥락막 신생혈관형성, 만성 염증, 만성 망막 탈락, 만성 포도막염, 만성 유리체염, 콘택트 렌즈 과다착용, 각막 이식 거부, 각막 신생혈관형성, 각막 이식 신생혈관형성, 크론병, 이글스 질환, 유행병 각결막염, 진균 케양, 단순 포진 감염, 대상포진 감염, 과다점성 증후군, 카포시 육종, 백혈병, 지질 퇴행, 라임 질환, 변연부 각질용해, 무륜 케양, 나병 이외의 마이코박테리아 감염, 근시, 안구 신생혈관 질환, 시신경 유두소와, 오슬러-웨버 증후군 (오슬러-웨버-랑뒤), 골관절염, 파제트병, 평면 부염, 유천포창, 플릭텐증, 다발동맥염, 후-레이저 합병증, 원생동물 감염, 탄력섬유 가황색증, 익상편 각막염 시카, 방사상 각막절개, 망막 신생혈관형성, 미숙아 망막증, 수정체뒤 섬유증, 유육종증, 공막염, 겸상 적혈구 빈혈, 쇼그렌 증후군, 고형 종양, 스타가르트 질환, 스티븐스 존슨 질환, 상윤부 각막염, 매독, 전신 낭창, 테리엔 변연부 퇴행, 독소플라스마증, 유잉 육종의 종양, 신경교세포종의 종양, 골육종의 종양, 망막모세포종의 종양, 황문근육종의 종양, 궤양성 대장염, 정맥 폐색, 비타민 A 결핍, 베게너 유육종증, 당뇨병과 관련된 요양되지 않는 혈관신생, 기생충 질환, 비정상 상처 치유, 수술 다음의 비대, 손상 또는 트라우마 (예를 들면, 급성 폐 손상/ARDS), 모발 성장의 억제, 배란 및 황체 형성의 억제, 이식의 억제, 및 자궁에서의 배아 발달의 억제.

[0727] 본 명세서에서 기재된 방법에 따라 제조된 다중특이적 항원-결합 단백질을 사용하여 치료될 수 있는 알러지성 또는 염증성 장애 또는 자가면역 질환 또는 장애의 예는, 비제한적으로 하기를 포함한다: 관절염 (류마티스성 관절염, 예컨대 급성 관절염, 만성 류마티스성 관절염, 통풍 관절염, 급성 통풍 관절염, 만성 염증성 관절염, 퇴행성 관절염, 감염성 관절염, 라임 관절염, 증식성 관절염, 건선성 관절염, 척추 관절염, 및 유년성-개시 류마티스성 관절염, 골관절염, 만성 변형성 관절염, 관절염 변형성, 만성 원발성 다발관절염, 반응성 관절염, 및 강직 척추염), 염증성 과증식성 피부 질환, 건선 예컨대 판상 건선, 적상 건선, 농포성 건선, 및 손발톱의 건선, 피부염(접촉 피부염, 만성 접촉 피부염, 알러지성 피부염, 알러지성 접촉 피부염, 포진성 피부염, 및 아토피 피부염 포함), x-연결된 하이퍼 IgM 증후군, 두드러기 예컨대 만성 알러지성 두드러기 및 만성 특발성 두드러기(만성 자가면역 두드러기 포함), 다발성근염/피부근염, 유년성 피부근염, 독성 표피 괴사성용해, 경피증 (전신 경피증 포함), 경화증 예컨대 전신 경화증, 다발성 경화증 (MS) 예컨대 척추-시신경 MS, 1차 진행성 MS (PPMS), 및 재발 완화성 MS (RRMS), 진행성 전신 경화증, 측삭경화증, 동맥경화증, 파종성 경화증, 및 운동실조 경화증, 염증성 장 질환 (IBD) (예를 들면, 크론병, 자가면역-매개된 위장 질환, 결장염 예컨대 궤양성 대장염, 궤양 결장염, 현미경적 결장염, 교원성 결장염, 용종성 결장염, 괴사성 장염, 및 경벽 결장염, 및 자가면역 염증성 장 질환), 괴저성 농피증, 결절 홍반, 원발성 경화 담관염, 상공막염, 호흡 곤란 증후군(성인 또는 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS) 포함), 수막염, 포도막의 모두 또는 일부의 염증, 홍채염, 맥락막염, 자가면역 혈액 장애, 류마티스성 척추염, 갑작스러운 청력 상실, IgE-매개된 질환 예컨대 과민증 및 알러지성 및 아토피성 비염, 뇌염 예컨대 라스뮤센 뇌염 및 변연 및/또는 뇌간 뇌염, 포도막염, 예컨대 전측 포도막염, 급성 전측 포도막염, 육아종 포도막염, 비육아종 포도막염, 파코항원성 포도막염, 후측 포도막염, 또는 자가면역 포도막염, 신장 증후군기 있거나 없는 사구체신염 (GN) 예컨대 만성 또는 급성 사구체신염 예컨대 1차 GN, 면역 매개된 GN, 막성 GN (막성 신병증), 특발성 막성 GN 또는 특발성 막성 신병증, 막- 또는 막성 증식성 GN (MPGN)(1형 및 2형, 및 급속 진행 GN 포함), 알러지성 병태, 알러지성 반응, 습진(알러지성 또는 아토피성 습진 포함), 천식 예컨대 기관지 천식(asthma bronchiale), 기관지 천식(bronchial asthma), 및 자가면역 천식, T-세포의 침윤 및 만성 염증 반응을 수반하는 병태, 만성 폐 염증성 질환, 자가면역 심근염, 백혈구 접착 결핍, 전신 홍반성 낭창 (SLE) 또는 전신 홍반성 낭창 낭창 예컨대 피부 SLE, 아급성 피부 홍반성 낭창, 신생아 낭창 증후군 (NLE), 파

중성 홍반성 낭창, 낭창 (신염, 뇌염, 소아, 비-신장, 추가의-신장, 원반상 탈모증 포함), 유년 발병형 (1형) 진성 당뇨병(소아 인슐린-의존적 진성 당뇨병 (IDDM), 성인형 진성 당뇨병 (2형 당뇨병) 포함), 자가면역 당뇨병, 특발성 요붕증, 사이토카인 및 T-림프구에 의해 매개된 급성 및 지연된 과민증과 관련된 면역 반응, 결핵, 유육종증, 육아종증(림프종모양 육아종증, 베게너 육아종증, 무과립구증 포함), 혈관염(혈관염 (큰 혈관 혈관염 (류마티스성 다발근육통 및 거대세포 (다카야수) 동맥염 포함), 중간크기 혈관 혈관염 (가와사키병 및 결절성 다발동맥염 포함) 포함), 미세한 다발동맥염, CNS 혈관염, 괴사성, 피부, 또는 과민증 혈관염, 전신 괴사성 혈관염, 및 ANCA-관련된 혈관염, 예컨대 처그-스트라우스 혈관염 또는 증후군 (CSS)), 일시적 동맥염, 재생불량 빈혈, 자가면역 재생불량빈혈, 쿠웬스 양성 빈혈, 다이아몬드 블랙판 빈혈, 용혈성 빈혈 또는 면역 용혈성 빈혈 (자가면역 용혈성 빈혈 (AIHA), 악성 빈혈 (악성 빈혈) 포함), 에디슨병, 순수 적혈구 무형성증 또는 무형성증 (PRCA), 인자 VIII 결핍, 혈우병 A, 자가면역^W 호중구감소증, 범혈구감소증, 백혈구감소증, 질환(백혈구 누출을 수반하는 질환), CNS 염증성 장애, 다중 장기 손상 증후군 예컨대 패혈증, 트라우마 또는 출혈, 항원-항체 복합체 매개된 질환, 항-사구체 기저막 질환, 항-인지질 항체 증후군, 알리지성 신경염, 베체트 또는 베체트병, 케슬만 증후군, 굿파스투어 증후군, 레이노 증후군, 쇼그렌 증후군, 스티븐-존슨 증후군에 대해 2차적인 것들, 유천포창 예컨대 수포성 유사천포창 및 피부 유천포창, 천포창 (심상성 천포창, 천포창 폴리아세우스, 천포창 점액-막 유천포창, 및 천포창 홍반성 포함), 자가면역 다발성내분비병증, 라이터 질환 또는 증후군, 면역 복합체 신염, 항체-매개된 신염, 시신경척수염, 다발성신경병증, 만성 신경병증 예컨대 IgM 다발성신경병증 또는 IgM-매개된 신경병증, 혈소판감소증 (예를 들면 심근경색증 환자에 의해 발달됨) (혈전성 혈소판감소성 자반병 (TTP) 및 자가면역 또는 면역-매개된 혈소판감소증 예컨대 특발성 혈소판감소성 자반병 (ITP)(만성 또는 급성 ITP 포함) 포함), 고환 및 난소의 자가면역 질환(자가면역 고환염 및 난소염 포함), 1차 갑상선기능저하증, 부갑상선기능저하증, 자가면역 내분비 질환(갑상선염 예컨대 자가면역 갑상선염, 하시모토 질환, 만성 갑상선염 (하시모토 갑상선염), 또는 아급성 갑상선염, 자가면역 갑상선 질환, 특발성 갑상선기능저하증 포함), 그레이브스병, 다선상 증후군 예컨대 자가면역 다선상 증후군 (또는 다선상 내분비병증 증후군), 방종양성 증후군(신경 방종양성 증후군 예컨대 람베르트-이튼 근무력증 증후군 또는 이튼-람베르트 증후군, 강직인간 또는 강직 인간 증후군 포함), 뇌척수염 예컨대 알리지성 뇌척수염(allergic encephalomyelitis) 또는 알리지성 뇌척수염 (encephalomyelitis allergica) 및 실험적 알리지성 뇌척수염 (EAE), 중증 근무력증 예컨대 흥선종-관련된 중증 근무력증, 소뇌 퇴행, 신경근긴장증, 안간대 또는 안간대 간대성근경련 증후군 (OMS), 및 감각 신경병증, 다초점 운동 신경병증, 쉬한 증후군, 자가면역 간염, 만성 간염, 유낭창 간염, 거대세포 간염, 만성적 활동 간염 또는 자가면역 만성적 활동 간염, 림프양 간질성 폐렴, 폐쇄 세기관지염 (비-이식) 대 NSIP, 길랑-바레 증후군, 버거 질환 (IgA 신병증), 특발성 IgA 신병증, 선형 IgA 피부병, 원발성 담도성 간경변증, 폐경변, 자가면역 장 병증 증후군, 소아지방변증, 만성적 소화장애증, 복강 스프루 (글루텐 장 병증), 난치의 스프루, 특발성 스프루, 한성글로불린혈증, 근위축 측삭 경화증 (ALS; 루게릭병), 관상동맥 질환, 자가면역 귀 질환 예컨대 자가면역 내이 질환 (AIED), 자가면역 청력 상실, 안간대 간대성근경련 증후군 (OMS), 다연골염 예컨대 난치의 또는 재발한 다연골염, 폐 폐포 단백질증, 아밀로이드증, 공막염, 비-암성 림프구증가증, 원발성 림프구증가증(단클론성 B 세포 림프구증가증 (예를 들면, 양성 단클론성 감마글로불린병증 및 의미 불명 단클론성 감마글로불린 병증, MGUS을 포함함), 주변 신경병증, 방종양성 증후군, 이온통로병증 예컨대 간질, 편두통, 부정맥, 근육 장애, 난청, 시각상실, 주기적 마비, 및 CNS의 이온통로병증, 자폐증, 염증성 근병증, 국소 분절사구체경화증 (FSGS), 내분비 눈병증, 포도막망막염, 맥락망막염, 자가면역 간장 장애, 섬유근육통, 다중 내분비 부전, 슈미트 증후군, 부신염, 위 위축증, 초로기 치매, 탈수초 질환 예컨대 자가면역 탈수초 질환, 당뇨병성 신병증, 드레시어 증후군, 원형탈모증, CREST 증후군 (석회증, 레이노 증후군 현상, 식도 운동성장애, 가락피부경화증, 및 모세혈관확장증), 남성 및 여성 자가면역 불임, 혼합된 결합 조직 질환, 샤가스' 질환, 류마티스성 열, 재발성 낙태, 농부의 폐, 홍반 다형성, 심장절개후 증후군, 쿠싱 증후군, 새-사육가 폐, 알리지성 육아종 맥관염, 양성 림프구 맥관염, 알포트 증후군, 폐포염 예컨대 알리지성 폐포염 및 섬유성 폐포염, 사이질 폐 질환, 수혈 반응, 나병, 말라리아, 라이쉬마니증, 키파노소미아시스, 주혈흡충증, 회충증, 아스페르길루스증, 샘터 증후군, 카플란 증후군, 땀기열, 심내막염, 심내막심근 섬유증, 확산 사이질 폐 섬유증, 사이질 폐 섬유증, 특발성 폐 섬유증, 낭포성 섬유증, 내안구염, 지속 용기 홍반, 태아 적모구증, 호산구 근막염, 술만 증후군, 펠티 증후군, 사상충증, 모양체염 예컨대 만성 모양체염, 헤테로만성 모양체염, 홍채 모양체염, 또는 푸치스 모양체염, 헨노흐-손라인 자반병, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 감염, 에코바이러스 감염, 심근병증, 알츠하이머병, 파코바이러스 감염, 풍진 바이러스 감염, 후-예방접종 증후군, 선천성 풍진 감염, 엡슈타인-바르 바이러스 감염, 볼거리, 이반 증후군, 자가면역 생식샘 부전, 시트럼 무도병, 후-연쇄상구균 신염, 폐색성 혈전혈관염, 갑상선중독증, 척수매독, 맥락막염, 거대세포 다발근육통, 내분비 눈병증, 만성 과민증 폐렴, 각결막염 시카, 유행병 각결막염, 특발성 콩팥 증후군, 최소 변화 신병증, 양성 가족성 및 허혈-재관류 손상, 망막 자가면역, 관절 염

증, 기관지염, 만성적 폐쇄성 기도 질환, 규폐증, 아구창, 아프타입안염, 동맥경화 장애, 정자무발생증, 자가면역 용혈, 보액 질환, 한성글로불린혈증, 듀피트렌 구축, 수정체과민성 내안구염, 알러지성 장염, 나성 결절 홍반, 특발성 안면 마비, 만성 피로 증후군, 류마티스성 열병, 하만-리치 질환, 감각신경성 청력 상실, **발작성 혈색소뇨증**, 생식샘기능저하증, 국한 회장염, 백혈구감소증, 감염성 단핵증, 횡단성 척수염, 1차 특발성 점액부종, 신장증, 교감성 안염, 육아종성 고환염, 채장염, 급성 다발신경근염, 괴저성 농피증, 퀴바인 갑상선염, 후천성 비장 위축증, 항정자 항체, 비-악성 흉선종, 백반증, SCID 및 엡슈타인-바르 바이러스-관련된 질환으로 인한 불임, 획득된 면역 결핍 증후군 (AIDS), 기생충 질환 예컨대 라이쉬마니아, 독소 충격 증후군, 식중독, T-세포의 침윤을 수반하는 병태, 백혈구 접착 결핍, 사이토카인 및 T-림프구에 의해 매개된 와 관련된 면역 반응, 백혈구 누출을 수반하는 질환, 다중 장기 손상 증후군, 항원-항체 복합체 매개된 질환, 항사구체 기저막 질환, 알러지성 신경염, 자가면역 다발성내분비병증, 난소염, 1차 점액부종, 자가면역 위축성 위염, 교감성 안염, 류마티스성 질환, 혼합된 결합 조직 질환, 신장 증후군, 채도염, 다발성내분비 부전, 주변 신경병증, 자가면역 다선상 증후군 i형, 성인형 특발성 부갑상선기능저하증 (AOIH), 전두 탈모증, 팽창된 심근병증, 후천성 수포성 표피박리증 (EBA), 혈색소침착증, 심근염, 신장 증후군, 원발성 경화 담관염, 화농성 또는 비-화농성 부비강염, 급성 또는 만성 부비강염, 사골, 정면, 상악, 또는 점형 부비강염, 호산구-관련된 장애 예컨대 호산구증가, 폐 침윤 호산구증가, 호산구증가근육통 증후군, 괴혈증 증후군, 만성 호산구 폐렴, 열대 폐 호산구증가, 기관지폐렴 아스페르길루스증, 아스페르길루스증, 또는 호산구 함유 육아종, 과민증, 혈청검사음성 척추관절염, 다발성내분비 자가면역 질환, 경화 담관염, 공막, 공막외, 만성 점막피부 캔디다증, 브루튼 증후군, 유아기의 일시적 저감마글로불린혈증, 비스코트-알드리치 증후군, 혈관확장성 운동실조증, 콜라겐 질환과 관련된 자가면역 장애, 류마티스, 신경적 질환, 허혈성 재관류 장애, 혈압 반응의 감소, 혈관 기능이상, 혈관확장증, 조직 손상, 심혈관 허혈, 통각과민증, 뇌 허혈, 및 질환(혈관형성 수반), 알러지성 과민증 장애, 사구체신염, 재관류 손상, 심근 또는 다른 조직의 재관류 손상, 급성 염증 요인을 가지고 있는 피부병, 급성 화농성 수막염 또는 다른 중추신경계 염증성 장애, 안구 및 궤도 염증성 장애, 과립구 수혈-관련된 증후군, 사이토카인 유도된 독성, 급성 심각한 염증, 만성 난치성 염증, 신우염, 폐경변, 당뇨 망막병증, 당뇨병성 큰-동맥 장애, 동맥내막 과다형성, 위궤양, 판막염, 및 자궁내막증..

[0728] 치료 용도 외에, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질은 진단 방법, 예컨대 본 명세서에서 기재된 질환 및 병태의 진단 방법을 포함하는 다른 목적을 위해 사용될 수 있다.

[0729] **복용량, 제형, 및 지속기간**

[0730] 본 명세서에서 제공된 단백질은 제형화되고, 복용되고, 양호한 의료 실시와 일치된 방식으로 투여될 것이다. 이 맥락의 고려 인자는 치료 중인 특정한 장애, 치료 중인 특정한 포유동물, 개별적인 대상체의 임상 조건, 장애의 원인, 제제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 계획, 및 개업의에게 공지된 다른 인자를 포함한다. 투여될 단백질의 "치료적으로 유효한 양"은 그와 같은 고려사항들에 의해 좌우될 것이고, 특정한 장애 (예를 들면, 암, 알러지성 또는 염증성 장애, 또는 자가면역 장애)를 예방, 완화, 또는 치료하는데 필요한 최소량이다. 단백질이 필요한 것은 아니지만, 선택적으로, 장애를 예방 또는 치료하기 위해 현재 사용된 1종 이상의 제제로 제형화된다. 유효량의 그와 같은 다른 제제는 제형에 존재하는 단백질의 양, 장애 또는 치료의 유형, 및 상기에서 논의된 다른 인자에 좌우된다. 이들은 일반적으로 동일한 복용량으로 그리고 앞에서 사용된 투여 경로 또는 지금까지 이용된 복용량의 약 1 내지 99%로 사용된다. 일반적으로, 암의 완화 또는 치료는 암과 관련된 1종 이상의 증상 또는 의료 문제를 줄이는 것을 수반한다. 치료적 유효량의 약물은 하기 중 하나 또는 조합을 달성할 수 있다: (적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 이상까지) 상기 암 세포의 수를 감소시키고; 종양 크기 또는 종양 부담을 감소 또는 억제하고; 주변 기관으로의 암 세포 침윤을 억제하고 (즉, 어느 정도까지 감소시키고/거나 멈추고); 샘종의 경우에 호르몬 분비를 감소시키고; 혈관 밀도; 종양 전이를 감소시키고; 종양 성장을 감소시키거나 억제하고/거나; 및/또는 암과 관련된 증상 중 하나 이상을 어느 정도까지 완화시킨다. 일부 구현예에서, 단백질은 대상체에서 암 또는 자가면역 장애의 발생 또는 재발을 예방하기 위해 사용된다.

[0731] 일 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 조성물은 암 또는 자가면역 장애에 민감하거나 그것으로 진단된 인간 대상체의 생존의 지속 기간을 증가시키기 위해 사용된다. 생존의 지속기간은 약물의 첫 번째 투여로부터 사망에 이르는 시간으로서 정의된다. 생존의 지속기간은 또한 치료 동안의 대상체의 사망의 위험을 나타내는, 대조군 그룹에 대한 치료 그룹의 계층화된 위험 비율 (HR)에 의해 측정될 수 있다.

[0732] 특정 구현예에서, 치료는 다양한 항암 요법으로 치료된 암에 민감하거나 그것으로 진단된 인간 대상체의 그룹에서 반응 속도를 상당히 증가시킨다. 반응 속도는 치료에 반응한 치료된 대상체의 백분율로서 정의된다. 일 측면에서, 병용 치료는 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질의 사용을 포함하고, 수술, 방사선 요법,

또는 1종 이상의 화학치료제는 수술, 방사선 요법, 또는 화학요법 단독으로 치료된 그룹과 비교하여 치료된 대상체 그룹에서 반응 속도를 상당히 증가시키고, 상기 증가는 0.005 미만의 카이-정사각형 p-값을 갖는다. 암의 치료에서 치료 효능의 추가의 측정은 하기에서 기재되어 있다: U.S. 특허 출원 공개 번호 20050186208.

[0733] **약제학적 조성물 및 제형**

[0734] 본 명세서에서 개시된 다중특이적 항원-결합 단백질은 이들이 투여에 적합하도록 적합한 캐리어 또는 부형제로 제형화될 수 있다. 본 명세서에서 개시된 다중특이적 항원-결합 단백질의 적합한 제형은 하기와 요망된 정도의 순도를 갖는 본 명세서에서 개시된 다중특이적 항원-결합 단백질의 혼합에 의해 수득된다: 선택적인 약제학적으로 허용가능한 캐리어, 부형제 또는 안정제 (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A.Ed. (1980)) (동결건조된 제형 또는 수용액의 형태로). 허용가능한 캐리어, 부형제, 또는 안정제는 이용된 복용량 및 농도에서 수형체에 비독성이고, 하기를 포함한다: 완충액 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기 산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함한 항산화제; 보존제 (예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤 예컨대 메틸 또는 프로필파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 사이클로헥산올; 3-펜타놀; 및 *m*-크레졸); 저분자량 (약 10 미만 잔기) 폴리펩타이드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 폴리머 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 라이신; 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 글루코오스, 만노스, 또는 텍스트린을 포함한 다른 탄수화물; 킬레이트제 예컨대 EDTA; 당류 예컨대 수크로오스, 만니톨, 트레할로오스 또는 소르비톨; 염 형성 반대 이온 예컨대 나트륨; 금속 착물 (예를 들면 Zn-단백질 복합체); 및/또는 비-이온성 계면활성제 예컨대 TWEEN™, PLURONICS™ 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG). 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질에 적용될 수 있는, 예시적인 항체 제형은, 본 명세서에 참고로 명확히 편입된, W098/56418에 기재된다. 피하 투여에 적응된 동결건조된 제형은 W097/04801에 기재된다. 상기 동결건조된 제형은 고 단백질 농도로 적합한 희석제와 재구성될 수 있고 재구성된 제형은 본 명세서에서 치료받는 포유동물에 피하로 투여될 수 있다.

[0735] 제형은 본 명세서에서 또한 치료받는 특정한 적응증, 바람직하게는 서로 부정적으로 영향을 주지 않는 상보적 활성을 가진 것에 대하여 필요에 따라 1 초과 활성 화합물을 함유할 수 있다. 예를 들면, 항-신생물성 제제, 성장 저해 제제, 세포독성 약물, 또는 화학치료제를 추가로 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 상기 분자는 의도된 목적에 유효한 양으로 조합하여 적합하게 존재한다. 유효량의 상기 다른 제제는 제형에서 존재한 다중특이적 항원-결합 단백질의 양, 질환 또는 장애 또는 치료의 유형, 및 상기 논의된 다른 인자에 좌우된다. 이들은 본원에서 기재된 바와 같이 동일한 복용량으로 및 투여 경로로 또는 지금까지 이용된 복용량의 약 1 내지 99%로 일반적으로 사용된다. 활성 성분은 또한, 예를 들면, 코아세르베이션 기술에 의해 또는 계면 중합에 의해, 제조된 마이크로캡슐, 예를 들면, 하이드록시메틸셀룰로오스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타실레이트) 마이크로캡슐, 각각에서, 콜로이드성 약물 전달 시스템에서 (예를 들면, 리포솜, 알부민 마이크로구형체, 마이크로에멀전, 나노-입자 및 나노캡슐) 또는 매크로에멀전에서 포획될 수 있다. 상기 기술은 하기에서 개시된다: *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A.Ed. (1980). 지속-방출 제제는 제조될 수 있다. 지속 방출 제제의 적합한 예는 길항제를 함유한 고형 소수성 폴리머의 반-투과성 매트릭스를 포함하고, 여기서 매트릭스는 형상화된 물품의 형태, 예를 들면 필름, 또는 마이크로캡슐이다. 지속-방출 매트릭스의 예는 하기를 포함한다: 폴리에스테르, 하이드로겔 (예를 들면, 폴리(2-하이드록시에틸-메타크릴레이트), 또는 폴리(비닐알코올)), 폴리락타이드 (미국특허 번호 3,773,919), L-글루탐산 및 에틸-L-글루타메이트의 코폴리머, 비-분해성 에틸렌-비닐, 분해성 락트산-글라이콜산 코폴리머 예컨대 LUPRON DEPOT™ (락트산-글라이콜산 코폴리머 및 류프롤라이드 아세테이트로 구성된 주사가능 마이크로구형체), 및 폴리-D-(-)-3-하이드록시부티르산.

[0736] 리포펙틴 또는 리포솜은 본 명세서에서 개시된 다중특이적 항원-결합 단백질 또는 본 명세서에서 제공된 조성물을 세포 속에 전달하는데 사용될 수 있다.

[0737] 선택적으로, 그러나 바람직하게는, 제형은 약제학적으로 허용가능한 염, 바람직하게는 염화나트륨을, 그리고 바람직하게는 약 생리적 농도에서 함유한다. 선택적으로, 제형은 약제학적으로 허용가능한 보존제를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서 보존제 농도는 0.1 내지 2.0%, 전형적으로 v/v 범위이다. 적합한 보존제는 약제학적 기술에서 공지된 것을 포함한다. 벤질 알코올, 페놀, *m*-크레졸, 메틸파라벤, 및 프로필파라벤은 바람직한 보존제이다. 선택적으로, 제형은 약제학적으로 허용가능한 계면활성제를 0.005 내지 0.02%의 농도에서 포함할 수 있다.

[0738] 지속-방출 제제는 제조될 수 있다. 지속-방출 제제의 적합한 예는 다중특이적 항원-결합 단백질을 함유한 고형 소수성 폴리머의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 여기서 매트릭스는 형상화된 물품의 형태, 예를 들면, 필름,

또는 마이크로캡슐이다. 지속-방출 매트릭스의 예는 하기를 포함한다: 폴리에스테르, 하이드로겔 (예를 들면, 폴리(2-하이드록시에틸메타크릴레이트), 또는 폴리(비닐알코올)), 폴리락타이드 (미국특허 번호 3,773,919), L-글루탐산 및 에틸-L-글루타메이트의 코폴리머, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글라이콜산 코폴리머 예컨대 LUPRON DEPOT™ (락트산-글라이콜산 코폴리머 및 류프롤라이드 아세테이트로 구성된 주사가능 마이크로구형체), 및 폴리-D-(-)-3-하이드록시부티르산.폴리머 예컨대 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글라이콜산이 100 일 넘는 동안 분자의 방출을 가능하게 하는 반면, 특정 하이드로겔은 단기간 동안 단백질을 방출한다. 캡슐화된 다중특이적 항원-결합 단백질(들)이 장시간 바디에 남아있는 경우, 이들은 37° C에서 수분에 노출의 결과로서 변성 또는 응집할 수 있어서, 생물학적 활성의 손실 및 면역원성의 가능한 변화를 초래한다. 합리적인 전략은 관여된 기전에 의존한 안정화를 위하여 고안될 수 있다. 예를 들면, 응집 기전이 티오-디설파이드 교환을 통한 분자간 S-S 결합 형성인 것으로 발견되면, 안정화는 설프하이드릴 잔기의 변경, 산성 용액으로부터 동결건조, 수분 함량의 제어, 적절한 첨가제의 이용, 및 특정 폴리머 매트릭스 조성물의 현상에 의해 달성될 수 있다.

[0739] 본 명세서에서 기재된 단백질 (예를 들면, 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질 (예컨대 이중특이적 항체))는 인간 대상체에, 공지된 방법에 따라, 예컨대 볼러스로서 정맥내 투여 또는 일정 기간에 걸쳐 연속 주입, 근육내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 활막내, 척추강내, 경구, 국소, 또는 흡입 경로로 투여된다. 국부 투여는 광범위한 부작용 또는 독성이 단백질에 의해 기술적으로 인식된 표적 분자에 길항작용과 관련된 경우 특히 요망될 수 있다. 생체의 전략은 또한 치료 적용에 사용될 수 있다. 생체의 전략은 본 명세서에서 제공된 단백질을 인코딩한 폴리뉴클레오타이드로 상기 대상체로부터 수득된 세포의 형질감염 또는 형질도입을 포함한다. 형질감염된 또는 형질도입된 세포는 그 다음 상기 대상체에게 돌아간다. 세포는, 비제한적으로, 조혈 세포 (예를 들면, 골수 세포, 대식세포, 단핵구, 수지상 세포, T 세포, 또는 B 세포), 섬유아세포, 상피 세포, 내피 세포, 케라틴생성세포, 또는 근육 세포를 포함한 임의의 광범위한 유형일 수 있다.

[0740] 일 예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질 (예컨대 이중특이적 항체)는, 종양의 장애 또는 위치가 허용하는 경우, 국소로, 예를 들면, 직접적인 주사로 투여되고, 주사는 주기적으로 반복될 수 있다. 단백질 복합체는 또한, 국부 재발 또는 전이를 예방 또는 감소시키기 위해, 전신으로 상기 대상체에 또는 직접적으로 종양 세포에, 예를 들면, 종양 또는 종양의 수술용 절개 이후 종양층에 전달될 수 있다.

[0741] 진단 및 화상형성

[0742] 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질 (예컨대 이중특이적 항체)는 당해 분야의 숙련가에 공지된 고전적 면역조직화적 방법을 이용한 생물학적 샘플내 단백질 수준을 검정하는데 사용될 수 있다 (예를 들면, 참고 Jalkanen, 등, *J. Cell.Biol.*101:976-985 (1985); Jalkanen, 등, *J. Cell.Biol.*105:3087-3096 (1987)). 단백질 유전자 발현 검출에 유용한 다른 항체-기반된 방법은 면역검정을 포함하고, 예컨대 효소 연결된 면역흡착 검정 (ELISA) 및 방사선면역검정 (RIA)은 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질 (예컨대 이중특이적 항체)와 사용에 적응될 수 있다. 적합한 검정 표지는 당해 기술에 공지되어 있고 하기를 포함한다: 효소 표지, 예컨대, 글루코오스 옥시다제; 방사선동위원소, 예컨대 요오드 (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I), 탄소 (¹⁴C), 황 (³⁵S), 삼중수소 (³H), 인듐 (^{115m}In, ^{113m}In, ¹¹²In, ¹¹¹In), 및 테크네튬 (⁹⁹Tc, ^{99m}Tc), 티타늄 (²⁰¹Ti), 갈륨 (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), 팔라듐 (¹⁰³Pd), 몰리브데늄 (⁹⁹Mo), 크세논 (¹³³Xe), 불소 (¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, ⁹⁷Ru; 루미늄; 및 형광 표지, 예컨대 플루오레신 및 로다민, 및 바이오틴.

[0743] 당해 기술에 공지된 기술은 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질 (예컨대 이중특이적 항체)에 적용될 수 있다. 상기 기술은, 비제한적으로, 이중작용성 접합 제제의 이용을 포함한다 (참고 예를 들면, 미국특허 번호 5,756,065; 5,714,631; 5,696,239; 5,652,361; 5,505,931; 5,489,425; 5,435,990; 5,428,139; 5,342,604; 5,274,119; 4,994,560; 및 5,808,003). 또한, 예를 들면, 항체-기반된 검정을 이용하여, 생체액 예컨대 혈청에서 떨어진 항원(들)의 측정에 의해 1종 이상의 관심 항원의 과발현을 연구할 수 있다 (참고 또한, 예를 들면, 미국특허 번호 4,933,294 (1990년 6월 12일 발행됨); W091/05264 (1991년 4월 18일 공개됨); 미국특허 5,401,638 (1995년 3월 28일 발행됨); 및 Sias 등, *J. Immunol. Methods* 132:73-80 (1990)) (본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질 (예컨대 이중특이적 항체)로 사용을 위하여 적응됨). 상기 검정 외에, 다양한 생체내 및 생체의 검정은 당업자에 이용가능하다. 예를 들면, 포유동물의 바디 내의 세포를 검출가능한 표지, 예를 들면, 방사성 동위원소로 선택적으로 표지되는 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질 (예컨대 이중특이적 항체)에 노출시킬 수 있고, 1종 이상의 관심 항원(들)에 다중특이적 항원-결합 단백질 (예

컨대 이중특이적 항체)의 결합은, 예를 들면, 방사능을 위한 외부 스캐닝에 의해 또는 다중특이적 항원-결합 단백질에 이전에 노출된 포유동물로부터 채집된 샘플 (예를 들면, 생검 또는 다른 생물학적 샘플)의 분석에 의해 평가될 수 있다.

[0744] **제조 물품 및 키트**

[0745] 본 명세서에서 기재된 1종 이상의 다중특이적 항원-결합 단백질 (예컨대 이중특이적 항체), 및 장애 (예를 들면, 자가면역 질환 또는 암)의 치료 또는 진단에 유용한 물질을 함유한 제조 물품이 또한 제공된다. 특정 구현예에서, 제조 물품은 용기 및 용기상에 또는 이와 관련된 표지 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적합한 용기는, 예를 들면, 병, 바이알, 주사기, 등을 포함한다. 용기는 다양한 물질 예컨대 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 용기는 병태 치료에 유효한 조성물을 담고 멸균된 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들면 용기는 피하 주사 바늘에 의해 뚫을 수 있는 스톱퍼를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있다). 본 조성물내 적어도 1종의 활성제는 본 명세서에서 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질 (예컨대 이중특이적 항체)이다. 표지 또는 포장 삽입물은 본 조성물이 특정한 병태 치료에 사용되는 것을 나타낸다. 표지 또는 포장 삽입물은 추가로 대상 체에게 다중특이적 항원-결합 단백질 조성물 투여용 지침을 포함할 것이다. 본 명세서에서 기재된 조합 요법을 포함한 제조 물품 및 키트는 또한 고려된다.

[0746] "포장 삽입물"은 상기 치료 제품의 사용에 관한 징후, 용법, 복용량, 투여, 금기 및/또는 경고에 대한 정보가 들어있는 치료 제품의 상업적 패키지에 관례상 포함된 지침을 지칭한다. 특정 구현예에서, 포장 삽입물은 본 조성물이 유방암, 결장직장암, 폐암, 신장 세포 암종, 신경아교종, 또는 난소암 치료에 사용되는 것을 나타낸다.

[0747] 추가로, 제조 물품은 추가로 약제학적으로-허용가능한 완충액, 예컨대 정균 주사용 물 (BWF1), 포스페이트-완충된 염수, 링거액 및 텍스트로오스 용액을 포함한 제2 용기를 포함할 수 있다. 다른 완충액, 희석제, 필터, 바늘, 및 주사기를 포함한, 상업적 및 사용자 관점으로부터 고려된 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다.

[0748] 다양한 목적, 예를 들면, 세포로부터 2종 이상의 표적 항원의 정제 또는 면역침강에 유용한 키트가 또한 제공된다. 2종 이상의 표적 항원의 분리 및 정제를 위하여, 키트는 비드 (예를 들면, 세포로오스 비드)에 커플링된 다중특이적 항원-결합 단백질 (예를 들면, EGFR/HER2 항체)를 함유할 수 있다. 시험관내, 예를 들면, ELISA 또는 웨스턴 블랏내 항원의 검출 및 정량화를 위하여 다중특이적 항원-결합 단백질(들)을 함유하는 키트가 제공될 수 있다. 제조 물품과 같이, 본 키트는 용기 및 용기상에 또는 이와 관련된 표지 또는 포장 삽입물을 포함한다. 용기는 본 명세서에서 제공된 적어도 1종의 다중특이적 항원-결합 단백질 (예컨대 이중특이적 항체)를 포함한 조성물을 담는다. 예를 들면, 희석제 및 완충액 또는 대조 항체를 함유하는 추가의 용기가 포함될 수 있다. 표지 또는 포장 삽입물은 조성물 뿐만 아니라 의도된 시험관내 또는 진단 용도를 위한 지침의 설명을 제공할 수 있다.

[0749] **컴퓨터 실행**

[0750] 1) 제1 중쇄 서열 (H1) 및 제1 경쇄 서열 (L1)을 포함하는 제1 항원에 결합하는 제1 중쇄/경쇄 쌍, 및 2) 제2 중쇄 서열 (H2) 및 제2 경쇄 서열 (L2)을 포함하는 제2 항원에 결합하는 제2 중쇄/경쇄 쌍을 포함한 다중특이적 항원 결합 단백질 평가용 컴퓨터 판독가능 매체가 본 명세서에서 제공되고, 여기서 각 H1 및 H2는 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 중쇄 불변 도메인 (CH1)을 포함하고, 각 L1 및 L2는 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 경쇄 불변 도메인 (CL)을 포함한다.

[0751] 특정 구현예에서, 컴퓨터 판독가능 매체는 H1, L1, H2, 및 L2의 아미노산 치환을 나타내는 데이터를 포함한 데이터셋을 포함하고, 여기서 H1의 CH1 도메인에서 아미노산 치환 중 적어도 1개는 서열식별번호:1과 관련하여 위치 S183에서 아미노산 치환을 포함하고, 여기서 CL 도메인은 서열식별번호:2와 관련하여 위치 V133에서 아미노산 치환을 포함한다. 특정 구현예에서, 컴퓨터 판독가능 매체는 H1, L1, H2, 및 L2의 아미노산 치환을 나타내는 데이터를 포함한 데이터셋을 포함하고, 여기서 H1의 CH1 도메인에서 아미노산 치환 중 적어도 1개는 하기와 관련하여 위치 F170 또는 L128 및 V185에서 아미노산 치환을 포함하고: 서열식별번호:1, 및 여기서 CL 도메인은 서열식별번호:2와 관련하여 위치 S176 또는 F118 및 L135에서 아미노산 치환을 포함한다. 특정 구현예에서, 컴퓨터 판독가능 매체는 H1, L1, H2, 및 L2의 아미노산 치환을 나타내는 데이터를 포함한 데이터셋을 포함하고, 여기서 H1의 CH1 도메인에서 아미노산 치환 중 적어도 1개는 서열식별번호:1과 관련하여 위치 S182, F170 또는 L128, 및 V185에서 아미노산 치환을 포함하고, 여기서 CL 도메인은 서열식별번호:2와 관련하여 위치 V13, S176 또는 F118, 및 L135에서 아미노산 치환을 포함한다.

[0752] 특정 구현예에서, 다중특이적 항원 결합 단백질 평가용 컴퓨터 판독가능 매체는 H1이 L2와 비교된 경우 L1과 우

선적으로 짝짓기할 것이고/이거나 H2가 L1과 비교된 경우 L2와 우선적으로 짝짓기할 것이라는 가능성을 결정하기 위한 컴퓨터 실행가능 코드를 포함한다.

[0753] 특정 구현예에서, 컴퓨터는 칩셋에 커플링된 적어도 1종의 프로세서를 포함한다. 메모리, 저장 장치, 키보드, 그래픽 어댑터, 포인팅 장치, 및 네트워크 어댑터가 칩셋에 또한 커플링된다. 디스플레이는 그래픽 어댑터에 커플링된다. 일 구현예에서, 칩셋의 기능은 메모리 컨트롤러 허브 및 I/O 컨트롤러 허브에 의해 제공된다. 또 다른 구현예에서, 메모리는 칩셋 대신 프로세서에 직접적으로 커플링된다.

[0754] 저장 장치는 하드 드라이브, 콤팩트 디스크 읽기 전용 메모리 (CD-ROM), DVD, 또는 고상 메모리 소자 같은 데이터를 보유할 수 있는 임의의 디바이스이다. 메모리는 프로세서에 의해 사용된 지침 및 데이터를 보유한다. 포인팅 디바이스는 마우스, 트랙볼, 또는 다른 유형의 포인팅 디바이스일 수 있고, 컴퓨터 시스템에 데이터를 입력하기 위해 키보드와 결합하여 사용된다. 그래픽 어댑터는 디스플레이상의 이미지 및 다른 정보를 디스플레이한다. 네트워크 어댑터는 컴퓨터 시스템을 로컬 또는 광역 네트워크에 커플링한다.

[0755] 당해 기술에 공지된 바와 같이, 컴퓨터는 이전에 기재된 것들과 상이한 및/또는 다른 구성요소를 가질 수 있다. 또한, 컴퓨터는 특정 구성요소가 부족할 수 있다. 또한, 저장 장치는 (예컨대 저장 영역 네트워크 (SAN) 내에서 형태화된) 컴퓨터로부터 로컬 및/또는 원격일 수 있다.

[0756] 당해 기술에 공지된 바와 같이, 컴퓨터는 본 명세서에서 기재된 기능 제공을 위하여 컴퓨터 프로그램 모듈을 실행하도록 적응된다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "모듈"은 지정된 기능을 제공하는데 이용된 프로그램 로직을 지칭한다. 따라서, 모듈은 하드웨어, 펌웨어, 및/또는 소프트웨어에서 시행될 수 있다. 일 구현예에서, 프로그램 모듈은 저장 장치상에 저장되고, 메모리에 장입되고, 프로세서로 실행된다.

[0757] 전술한 서면 설명은 당해 분야의 숙련가가 본 발명의 실시를 가능하게 하는데 충분한 것으로 간주된다. 하기 실시예는 단지 설명하기 위해 제공되었고, 본 발명의 범위를 어떤 식으로든 제한할 의도가 아니다. 사실상, 본 명세서에서 보여진 및 기재된 것에 더하여 다양한 변형은 전술한 설명으로부터 당해 분야의 숙련가에 분명해질 것이고 첨부된 청구항들의 범위 내에 해당한다.

[0758] 실시예

[0759] **실시예 1: 전략 #1을 이용한 항체 중쇄/경쇄 쌍의 엔지니어링**

[0760] Fab 어셈블리는 VH/VL 및 CH1/CL 도메인 상호작용에 의해 독립적으로 유도된다. CL 탈안정화 돌연변이는 항원 결합에 관하여 보통의 효과를 가질 수 있을 뿐이고; 아직 CH1과 CL 도메인 사이 상호작용의 파괴는 포유동물 세포내 항체 폴딩 및 분비를 방해할 수 있다 (데이터 도시되지 않음). 우리는 특이적 및 정확한 HC 및 LC 짝짓기를 유도하기 위해 및 HC/LC 짝짓기 오류를 최소화하기 위해 CH1/CL 돌연변이 쌍의 패널을 생성하였다. 정확한 짝짓기를 유도하기 위한 CH1/CL 돌연변이 쌍의 능력은 아래 더욱 상세하게 기재된 바와 같이 조사되었다.

[0761] CL 도메인에서 F118, V133, 또는 L135에 돌연변이는 CH1로 어셈블리를 교란시킨다고 밝혀졌다 (데이터 도시되지 않음). 돌연변이된 CL 도메인으로 어셈블리를 복원하는 CH1 도메인에서 아미노산 위치를 확인하기 위해, 항체 불변 도메인 PDB ID 1CZ8은 PyMol을 이용하여 제조되었다. 중쇄 CH1 도메인 및 경쇄 CL 도메인의 구조 및 기능의 상세한 지식에 기반한 인간-유도된 설계를 이용하여, 단독으로 또는 병용으로, CH1 도메인의 위치 L128, G143, L145, S183, 및 V185에서 치환은 시험되었다. 위치 S183에서 하전된 아미노산 치환 돌연변이를 가진 중쇄는 반대로 하전된 CL 치환 돌연변이의 맥락에서 항체 발현을 개선하는 것으로 나타났다 (참고 도 1A 및 1B). 도 1A 및 1B는 1 ml 293T 배양액으로부터 단백질 A 회수 (A280 흡광도 단위 (A.U.))를 보여준다. 따라서, S183 돌연변이체는 추가 분석에 대하여 선택되었다.

[0762] 돌연변이체 CH1 및 돌연변이체 CL 도메인은 항체 발현을 복원하는 돌연변이 쌍을 초기에 확인하기 위해 스크리닝되었다. 초기 스크린으로서, F118, V133, 또는 L135가 하기로 치환되었던 CL을 가진 항체 경쇄: 양으로 하전된 아미노산 (즉, K 또는 R)은 생성되었고 S183이 하기로 치환되었던 CH1을 가진 중쇄: 음으로 하전된 아미노산 (즉, E 또는 D)는 표준 분자 생물학 기술을 이용하여 생성되었고 포유동물 발현 벡터 속에 클로닝되었다. S183E 또는 S183D 돌연변이를 가진 중쇄 CH1 도메인 및 F118K, F118R, V133K, V133R, V135K, 또는 L135R 치환 돌연변이를 가진 경쇄 CL 도메인을 인코딩한 플라스미드는 이전에 기재된 바와 같이 HEK293T 세포의 1 mL 일시적 형질 감염 배양액을 이용하여 동일 농도로 공-형질감염되었다 (참고, 예를 들면, Bos 등 (2014) "Development of a semi-automated high throughput transient transfection system." *Journal of Biotechnology* **180**, 10-16). 상기 절차는 CH1 및 CL 돌연변이체의 모든 쌍별 조합에 대하여 반복되었다.

- [0763] 인간 IgG1은 제조자의 프로토콜에 따른 MabSelectSure (GE Healthcare, USA)에 의해 포유동물 배양 상청액으로부터 정제되었고, 항체 발현은 정제된 MabSelectSure 용출액의 OD280 측정에 의해 계산되었다. 도 2에 나타난 바와 같이, 항체 발현은 V133K CL 돌연변이가 야생형 CH1과 짝짓기된 V133K에 비교된 경우 S183D CH1 돌연변이 또는 S183E CH1 돌연변이로 짝짓기되었을 때 개선되었다. 150 μ L 용적 MabSelectSure 정제 용출액으로부터 수득된 총 항체 수율 (μ g)은 도 2의 y-축 상에서 보여진다.
- [0764] 도 3에 제공된 X-선 결정 구조에 나타난 바와 같이, 경쇄 불변 도메인 (CL)에서 V133 및 중쇄 CH1 도메인에서 S183은 IgG의 경쇄 CL 및 중쇄 CH1 도메인의 계면의 내부에 거주한다. 구조는 IgG4에서 유사하다. CH1의 S183 (EU 넘버링, 카밧 넘버링하 S188에 등 가)은 인간 및 마우스 생식계열을 거쳐 보존되고, V133은 인간 및 마우스 카파 및 람다 경쇄에서 존재한다. 임의의 하나의 이론에 제한됨 없이, V133에서 하전된 아미노산의 치환 및 S183에서 반대 전하를 갖는 아미노산의 치환은 비변형된 CH1/CL 계면에서 존재하지 않는 둘러싸는 아미노산 잔기 (예컨대 CL 도메인에서 S176 및 S178)와 신규한, 안정한 상호작용을 창출할 수 있다.
- [0765] 추가 실험은 항체 발현의 양호한 수준을 보여준 추가의 특이적 V133X/S183X 돌연변이체 쌍을 확인하기 위해 수행되었다. CH1-CL 짝짓기를 선호하는 V133X/S183X 돌연변이체 쌍은 상기 기재된 항체 발현 검정을 이용하여 확인되었다. 간단히, 하기를 가진 항체 중쇄: CH1 S183X 치환 돌연변이 (예를 들면, S183A, S183T, S183V, S183Y, S183F, S183H, S183N, S183D, S183E, S183R, 또는 S183K) 및 하기를 가진 경쇄: V133X 치환 돌연변이 (예를 들면, V133E, V133S, V133L, V133W, V133K, V133R, 또는 V133D)는 상기에 기재된 바와 같이 생성되었다. 각각의 상기 돌연변이 CH1 및 CL 돌연변이로 중쇄 및 경쇄를 발현하는 플라스미드는 상기에 기재된 바와 같이 HEK293T 세포의 30 mL 일시적 형질감염 배양액을 이용하여 동일한 농도로 공-형질감염되었다. 상기 절차는 V133X/S183X 돌연변이체 쌍의 모든 조합에 대하여 반복되었다. 총 항체 수율 (μ g)은 상기에 기재된 바와 같이 결정되었다. 각 V133X/S183X 돌연변이체 쌍에 대한 발현 결과는 도 4에서 제공된다. 간단히, 도 4는 각 V133X/S183X 돌연변이체 쌍에 대하여 30ml 293T 배양액으로부터 정제된 단백질의 mg으로 총 수율을 보여준다. 항체 단백질 수준은 정제된 MabSelectSure 용출액의 OD280 측정으로부터 계산되었다. 항체 발현의 양호한 수준을 입증하였던, V133X/S183X 돌연변이체 쌍 예컨대 V133K/S183T, V133K/S183V, V133K/S183Y, 및 V133K/S183F는 항-Her 2/항-CD3 이중특이적 항체의 한 아암에 도입되었다. V133K/S183E 발현의 초기 결과가 높지 않았음에도, V133K/S183E는 또한 항-Her 2/항-CD3 이중특이적 항체의 맥락에서 시험되었다. 항-Her 2 (4D5) 및 항-CD3 (UCHT1) 항체는 하기 기준에 기반하여 선택되었다: a) 양쪽 중쇄 및 경쇄는 항원 결합을 위하여 요구되고; b) 구성요소 항체는 양호하게 발현되고 응집하는 경향이 없고; c) 모 항체가 비-동족 중쇄/경쇄 짝짓기 보다 동족에 대하여 상당한 선호를 보이지 않는다. "4D5"는 하기에 기재된, 인간화된 4D5v8을 지칭한다: Carter 등 (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4285-9. "UCHT1"은 하기에 기재된, 인간화된 UCHT1v9를 지칭한다: Zhu and Carter (1995) *J. Immunol.* 155, 1903-10.
- [0766] 상기 실험에서, UCHT1 중쇄는 CH3 도메인 (T366S, L368A, Y407V)에서 홀 돌연변이를 함유하고 4D5 중쇄는 CH3 도메인 (T366W)에서 늑 돌연변이를 함유한다. UCHT1 아암에서 V133K/S183E 돌연변이를 가진 4D5/UCHT1 이중특이적 항체는 발현되었고, 정제되었고, 사중극자-비과시간 (QTOF) 질량 분광분석법을 통해 분석되어 정제된 샘플에서 존재한 각각의 항체 종의 상대 존재비를 정량화하였다. 하기의 정확한 중쇄/경쇄 짝짓기의 비편향된, 예상된 양: 야생형 서열 + 스크램블링된 중쇄/경쇄 짝짓기 (즉, HC1/LC2 및 HC2/LC1)은 50%이다. 표 14C의 제1 및 제3 열에서 아래 나타난 바와 같이, 정확한 중쇄/경쇄 짝짓기는 UCHT1 아암에서 V133K/S183E를 가진 4D5/UCHT1 항체 변이체에서 개선된다.
- [0767] 4D5 아암 또는 UCHT1 아암에서 V133K/S183T, V133K/S183V, V133K/S183Y, V133K/S183E, 또는 V133K/S183F 돌연변이 쌍을 가진 4D5/UCHT1 항체는 발현되었고, 정제되었고 사중극자-비과시간 (QTOF) 질량 분광분석법을 통해 분석되어 정제된 샘플에서 존재한 각각의 항체 종의 상대 존재비를 정량화하였다.
- [0768] 4D5/UCHT1 항체의 발현, 정제, 및 분석에 앞서, 경쇄 비 최적화는 이전에 기재된 방법을 이용하여 HEK293T 세포의 30ml 일시적 형질감염 배양액으로 수행되었다 (참고, 예를 들면, Bos 등 (2014), 상기). 2개의 항체 중쇄를 인코딩한 플라스미드 DNA의 양은 전체 형질감염 내내 일정하게 남아있었고, 반면에 경쇄 DNA의 형질감염된 양은 LC1 (늑): LC2 (홀) DNA 비의 범위를 거쳐 다양하였다. 일시적으로 형질감염된 배양물의 생성물은 최적으로 균형있는 경쇄 발현을 가진 상태, 즉, 적절하게 조립된 이중특이적 항체의 최고 백분율이 생산되었던 상태를 확인하기 위해 오비트랩 질량 분광분석법으로 분석되었다.
- [0769] 수확식은, 고-해상도 질량 분광분석법으로부터 3개 피크의 정량화에 기반하여, 2x LC 스크램블링된 종 (즉, LC-2가 HC-1과 짝짓기되고 LC-1이 HC-2와 짝짓기되는 이중특이적 항체)로부터 정확하게 짝짓기되는 경쇄 (즉, LC-1

이 HC-1과 짝짓기되고 LC-2가 HC-2와 짝짓기되는 이중특이적 항체)를 가진 BsIgG의 양을 식별하기 위해 개발되었다. 높 중쇄 (HC_높) 및 홀 중쇄 (HC_홀)의 LC 짝짓기가 완전히 독립적인 사건이라는 가정. 정확하게 짝짓기된 BsIgG의 백분율, %[BsIgG]는 하기와 같이 계산될 수 있다:

$$\%[BsIgG] = \%[\text{조합된 BsIgG \& 2x LC 스크램블링된}] / 2 + \text{SQRT} \left((\%[\text{조합된 BsIgG \& 2x LC 스크램블링된}] / 2)^2 - \%[2x LC_{\text{높}}] * \%[2x LC_{\text{홀}}] \right)$$

$((\%[\text{조합된 BsIgG \& 2x LC 스크램블링된}] / 2)^2 - \%[2x LC_{\text{높}}] * \%[2x LC_{\text{홀}}])$ 이 음수이면, 0으로 강요되고; 그 다음:

$$\%[BsIgG] = \%[\text{조합된 BsIgG \& 2x 스크램블링된}] / 2$$

따라서, 2x LC 스크램블링된 종의 백분율은 하기와 같이 계산된다:

$$\%[2x LC \text{ 스크램블링된}] = \%[\text{조합된 BsIgG \& 2x LC 스크램블링된}] - \%[BsIgG]$$

상기 수학적 접근법을 실험적으로 확인하기 위해, 정제된 이중특이적 항체의 2개 샘플은 질량 분광분석법을 통해 분석되었다. 샘플 1에서 조합된 BsIgG 및 2x LC 스크램블링된 분획은 51.3%이었고, 샘플 2에서 조합된 BsIgG 및 2x LC 스크램블링된 분획은 70.6%이었다. 상기 식을 이용하여, %[BsIgG], %[2x LC_높], %[2x LC_홀] 및 %[2x LC 스크램블링된]의 번호는 결정되었고 (참고 표 10), 이로부터 각 Fab 종의 분획, %[Fab_높], %[Fab_홀], %[LC_높/HC_홀] 및 %[LC_홀/HC_높]는 또한 계산되었다 (참고 표 11). 양쪽 샘플은 라이실 엔도펩티다아제로 처리된 다음 질량 분광분석법으로 분석되었다. 소화된 Fab 종의 측정된 분획은 그 다음 계산된 것과 비교되었다. 양쪽 샘플로부터 밀접하게 매칭된 측정된 및 계산된 백분율은 정확하게 짝짓기된 BsIgG 종의 정량화를 위하여 우리의 수학적 접근법을 입증하였다.

표 10

	% BsIgG + 2x LC 스크램블링된	% 2x LC _높	% 2x LC _홀	%BsIgG	% 2x LC 스크램블링된
샘플 1	51.3	27.8	20.9	25.7	25.6
샘플 2	70.6	6.0	23.4	68.5	2.1

표 11

	% Fab	Fab _높	Fab _홀	LC _높 /HC _홀	LC _홀 /HC _높
샘플 1	계산된	26.8	23.3	26.7	23.2
	측정된	25.5	22.7	25.6	26.3
	Δ	-1.3	-0.6	-1.1	3.1
샘플 2	계산된	37.3	45.9	12.7	4.1
	측정된	38.1	47.8	11.3	2.8
	Δ	0.8	1.9	-1.4	-1.3

표 12에서 예시적인 결과에 나타난 바와 같이, 이중특이적 어셈블리의 %는 V133X/S183X 돌연변이가 없이 야생형 서열에 비교된 경우 증가되었다. 이중특이적 어셈블리의 백분율은 UCHT1 아암에서 존재한 V133/S183 돌연변이체 쌍 경우에 비교하여 4D5 아암에서 존재한 V133X/S183X 돌연변이체 쌍 경우 비교할만 하였다. 상기 결과는 적절한 이중특이적 항체 어셈블리가 V133X/S183X 돌연변이체 쌍이 도입되는 아암에 의해 상당히 영향을 받지 않는다는 것을 시사한다.

표 12

최적의 LC 비 (눅:홀)	CL/CH1 돌연변이	위치 (아암)	조합된 BsIgG 및 LC 스크램블 링된	2x 눅 LC	2x 홀 LC	BsIgG	LC 스크램블 링된
1:1	V133K/S183T	4D5	63.2%	26.8%	10.0%	58.6%	4.6%
1.5:1	V133K/S183T	UCHT1	64.0%	16.1%	19.8%	58.6%	5.4%
2:1	V133K/S183E	4D5	65.1%	20.1%	14.8%	60.2%	4.9%
1:1	V133K/S183E	UCHT1	51.8%	29.9%	18.3%	37.0%	14.8%

[0778]

[0779]

상기 기재된 실험은 상이한 이중특이적 항체를 이용하여 반복되었다. 상이한 이중특이적 항체를 이용한 결과는 또한 이중특이적 항체 어셈블리가 V133X/S183X 돌연변이체 쌍이 도입되는 아암에 의해 상당히 영향받지 않는다는 것을 시사한다. 모 항체가 이미 강한 우선적인 중쇄/경쇄 짝짓기를 나타내는 경우에서, 추가 개선은 달성 또는 검출하기 어렵다는 것이 또한 관측되었다.

[0780]

다음으로, 우리는 VH 및 VL 비-CDR 영역에서 추가의 돌연변이가 HC 및 LC 짝짓기를 추가로 개선할 수 있는 여부를 조사하였다. 수소 결합을 형성하는 프레임 워크 영역에서 VL-Q38 및 VH-Q39는 대부분의 생식계열을 거치고도로 보존된다. 하전된 잔기는 VL-Q38 또는 VH-Q39 혹은 IL13 항체의 양쪽 위치에 도입되었다. VH/VL 짝짓기를 선호하는 Q39X 돌연변이체, Q38X 돌연변이체, 또는 Q39X/Q38X 돌연변이체 쌍은 항-IL13 항체에서 박테리아 표면 디스플레이에 의해 확인되었다. 간단히, 돌연변이된 항체는 카나마이신 저항이 고쳐진 E. 콜리 트레인 33D3의 lpp 유도체에서 발현되었다 (참고, 예를 들면, Simmons 등 (2002) "Expression of full-length immunoglobulins in Escherichia coli: rapid and efficient production of aglycosylated antibodies." *Journal of Immunological Methods*, **263**, 133-147). 개별 프레임워크 변이체는 30 °C에서 밤새 배양액으로서 성장되었고, 용적으로 동등하게 조합되었고 1:100 희석액으로 사용되어 50 mL CRAP 배양액을 접종하였다. 30 °C에서 24 시간 후, 1 OD 분취액은 수확되었고 원심분리 (4 분, 6500 rcf)로 펠렛화되었다. 세포는 2% BSA 및 5mM EDTA를 가진 100 µL PBS에서 재현탁되었고 4° C에서 30 분 동안 인큐베이션되었다. 초기 인큐베이션 이후, SYTO 41 또는 9 핵산 염색 (Molecular Probes, USA)은 1:100의 최종 희석으로 첨가되었고, Alexa⁴⁸⁸ 또는 Alexa⁶⁴⁷ 표지된 항원은 1-2 µM의 최종 농도로 첨가되었다. 인큐베이션은 4° C에서 암흑 속에 1시간 동안 계속되었고, 어느 시점에 MgCl₂는 10-20 mM 최종 농도로 첨가되었다. 미결합된 단백질은 1 mL 용적의 PBS + 20 mM MgCl₂로 3회 세정으로 제거되었다. 염색된 세포는 Becton Dickinson FACS 아리아II(AriaII) 유세포측정기를 이용한 분석을 위하여 1x10⁷ 세포/mL의 최종 농도로 SOC 배지 (New England Biolabs, USA)에서 재현탁되었다. FACS 게이팅(gating) 전략은 SYTO 염료 양성이었던 세포를 포함하였다. 이중항 식별력 게이트는 이중항을 제거하는데 사용되었고 마지막으로 게이트는 단일 세포 결합 항원의 백분율을 결정하도록 설정되었다. 도 5에 나타난 바와 같이, 양쪽 VL-Q38 및 VH-Q39 치환을 가진 변이체 중에서, VL-Q38K/VH-Q39E 돌연변이체 쌍은, VL-Q38K/VH-Q39K 돌연변이체 쌍보다 더 높은, 가장 강력한 FACS 신호를 제공하였다 (참고 도 6). 또한, 항체는 Q38K VL 돌연변이가 Q39E VH 돌연변이와 짝짓기되는 경우 야생형과 동등한 또는 보다 더 양호한 수준으로 발현되었다. 참고 도 7. Q38K/Q39K가 Q38K/WT 쌍보다 더욱 저조하게 발현하였기 때문에, 이는 우리가 EKKE 돌연변이 (여기서 상기 4개의 문자는 Q39X_{HC1}/Q38X_{LC1} 눅/Q39X_{HC2}/Q38X_{LC2} 홀, 각각에서 아미노산 치환을 지칭한다)를 양쪽 아암에 도입하도록 하여 정확한 LC/HC 짝짓기에 대하여 최상의 추진력을 얻었다.

[0781]

다음으로, 4D5/UCHT1 이중특이적 항체 변이체는 양쪽 중쇄 및 양쪽 경쇄에서 Q39X/Q38X 돌연변이를 함유하도록 작제되었다. 변형된 이중특이적 항체는 발현되었고, 정제되었고 고해상도 질량 분광분석법을 통해 분석되었다. 고해상도 질량 분광분석법은 EMR Exactive 플러스 질량 분광분석기에서 오비트랩 기술의 향상된 검출 능력을 이용한다. 정량화를 위하여, PBS내 항체 생성물은 Micro 스핀 칼럼 (Spin-6, Bio-Rad) 또는 역상 오프라인 HPLC를 이용하여 0.1% 트리플루오로아세트산에 교환된 완충액이었다. 수득한 샘플 분획은 질량 분광분석기상에 직접적으로 주입되었다. 파라미터는 Tune 방식으로 최적화되어 전하내 상태 모이어티의 기준치 해상도를 가능하게 하

였다. 질량 엔빌로프는 단백질 디콘볼루션 소프트웨어 (Thermo, 스코어 컷오프 50)을 이용하여 디콘볼루션되었다. 수득한 디콘볼루션된 피크의 강도는 문서로 기록되었고 '정확한' 서열, 짝짓기 오류, 절반 항체 및 동형이량체의 % 존재를 결정하는데 사용되었다. 도 8에서 예시적인 결과는 적절한 중쇄-경쇄 짝짓기를 가진 '정확한' 이종특이적 항체 변이체의 % 존재를 보여준다. 시험된 돌연변이체는 X-축상에 보여진다. 돌연변이의 각 세트에서 4개의 문자는 Q39X_{HCl}/Q38X_{LC1}놈/Q39X_{HCl}/Q38X_{LC2} 홀, 각각에서 아미노산 치환을 지칭한다. 도 8에서 보여진 정량화된 결과는 아래 표 13에 제공된다. 이들 실험에서, 4D5 항체는 놉 돌연변이를 실행하였고 UCHT1 항체는 홀 돌연변이를 실행하였다. 이 결과는 EKKE에 더하여 Q39/Q38에서 다른 돌연변이가 정확한 중쇄/경쇄 짝짓기를 또한 개선했다는 것을 보여준다.

표 13

돌연변이	조합된 BsIgG 및 LC 스크램블링된	2x 놉 LC	2x 홀 LC	BsIgG	LC 스크램블링된
EKKE	70.2%	28.4%	1.4%	69.6%	0.6%
ERKE	66.3%	28.8%	4.9%	64.1%	2.2%
DKKE	68.0%	28.9%	3.1%	66.7%	1.3%
DRKE	64.7%	30.1%	5.2%	62.2%	2.5%
EKRE	74.8%	22.6%	2.6%	74.0%	0.8%
ERRE	72.2%	22.3%	5.5%	70.5%	1.7%
DKRE	75.2%	21.1%	3.7%	74.1%	1.1%
DRRE	74.9%	20.6%	4.6%	73.6%	1.3%
EKKD	70.2%	23.9%	5.9%	68.1%	2.1%
ERKD	70.8%	21.3%	8.0%	68.3%	2.5%
DKKD	65.5%	26.7%	7.8%	62.1%	3.4%
DRKD	72.2%	14.2%	13.5%	69.4%	2.8%
EKRD	78.6%	15.6%	5.8%	77.4%	1.2%
ERRD	73.8%	18.7%	7.5%	71.8%	2.0%
DKRD	75.0%	18.4%	6.7%	73.3%	1.7%
DRRD	68.5%	25.3%	6.1%	66.2%	2.3%
KEEK	56.9%	39.8%	3.3%	54.5%	2.4%
KEER	64.4%	31.2%	4.4%	62.2%	2.2%
KEDK	57.8%	36.4%	5.7%	54.0%	3.8%
KEDR	64.4%	29.3%	6.3%	61.4%	3.0%
REEK	60.6%	36.3%	3.1%	58.7%	1.9%
REER	67.2%	24.1%	8.6%	64.0%	3.2%
REDK	58.6%	36.8%	4.5%	55.6%	3.0%
REDR	62.4%	29.8%	7.8%	58.4%	4.0%
KDEK	60.7%	33.2%	6.1%	57.2%	3.5%
KDER	64.6%	24.5%	10.9%	60.2%	4.4%
KDDK	61.4%	30.0%	8.6%	56.9%	4.5%
KDDR	66.5%	23.9%	9.6%	62.8%	3.7%
RDEK	61.3%	33.6%	5.1%	58.4%	2.9%
RDER	62.5%	28.6%	8.8%	58.2%	4.3%
RDDK	62.8%	30.5%	6.7%	59.4%	3.4%
RDDR	64.8%	23.2%	12.0%	60.2%	4.6%

[0782]

[0783]

VL-Q38 VH-Q39 돌연변이는 4D5/UCHT1 이종특이적 항체에 도입되었다. 4D5/UCHT1 이종특이적 항체는 변형되어 이로써 4D5 아암이 Q39E 돌연변이를 갖는 VH 및 Q38K 돌연변이를 갖는 VL을 함유하였고 UCHT1 아암이 Q39K 돌연변이를 갖는 VH 및 하기를 갖는 VL을 함유하였다: Q38E 돌연변이 (즉, "EKKE"). 상기 실험에서, 4D5 항체는 CH3 도메인에서 놉 돌연변이를 함유하고 UCHT1 항체는 CH3 도메인에서 홀 돌연변이를 함유한다. 도 9에서 보여진, QTOF 분석에서, 중쇄-경쇄 짝짓기 오류는 WT 이종특이적 항체 (참고 도 9A)에 비교된 경우 변형된 항체 (참고 도 9B)에서 상당히 감소되었다. 표 15에 의해 제공된 예시적인 결과에서 아래 추가로 보여진 바와 같이, Q38/Q39 돌연변이는 단일 세포에서 생산된% 이종특이적 IgG를 개선하였다.

[0784]

VL-Q38E 및 VH-Q39K 돌연변이를 이미 함유한, 이종특이적 4D5/UCHT1 항체의 UCHT1 아암은 CL-V133K 및 CH-1-S183E 돌연변이를 포함하도록 추가로 변형되었다. 4D5/UCHT1 항체의 4D5 아암은 VL-Q38K 및 VH-Q39E 돌연변이를 함유하도록 변형되었다. 변형된 이종특이적 항체는 발현되었고, 정제되었고 고해상도 질량 분광분석법을 통해 분석되었다. 고해상도 질량 분광분석법은 EMR Exactive 플러스 질량 분광분석기에서 오비트랩 기술의 향상된 검출 능력을 이용한다. 정량화를 위하여, PBS내 항체 생성물은 Micro 스핀 칼럼 (Spin-6, Bio-Rad) 또는 역상 오프라인 HPLC를 이용하여 0.1% 트리플루오로아세트산에 교환된 완충액이었다. 수득한 샘플 분획은 질량 분광분석기상에 직접적으로 주입되었다. 파라미터는 Tune 방식으로 최적화되어 전하내 상태 모이어티의 기준치 해상도를

가능하게 하였다. 질량 엔빌로프는 단백질 디콘볼루션 소프트웨어 (Thermo, 스코어 컷오프 50)을 이용하여 디콘볼루션되었다. 수득한 디콘볼루션된 피크의 강도는 문서로 기록되었고 '정확한' 서열, 짝짓기 오류, 절반 항체 및 동형이량체의 예시적인 % 존재를 결정하는데 사용되었다. 도 10B의 확장된 버전을 보여주는, 도 10A에 나타낸 바와 같이, 정확하게 짝짓기된 중쇄/경쇄 아암을 함유한 항체 종은 샘플에서 주요 집단이었다. (참고 정량화된 결과에 대하여 아래 표 14C의 제4 열.) 동일한 실험은 EKKE 돌연변이 없이 UCHT1 아암에서 CL-V133K 및 CH-1-S183E 돌연변이를 포함하도록 변형된 이중특이적 4D5/UCHT1을 이용하여 수행되었다. 도 10D의 확장된 버전을 보여주는, 도 10C에 나타낸 바와 같이, 2 4D5 경쇄 또는 2 UCHT1 경쇄를 함유한 중 (즉, 짝짓기 오류된 이중특이적 항체)는 샘플에서 주요 집단이었다. (참고 정량화된 결과에 대하여 아래 표 14C의 제3 열.) 도 10E는 비변형된 WT 4D5/UCHT1 항체에 대하여 고해상도 질량 분광분석법 결과를 제공하고, 2 4D5 경쇄 또는 2 UCHT1 경쇄를 함유한 중 (즉, 짝짓기 오류된 이중특이적 항체)는 또한 상기 샘플에서 주요 집단이었다는 것을 보여준다. 이 결과는 이중특이적 항체의 홀 아암 상에서 V133X/S183X 돌연변이 쌍이 중쇄/경쇄 짝짓기 오류를 감소시켰고, EKKE 돌연변이의 첨가가 이중특이적 어셈블리를 추가로 개선하였음을 보여준다.

[0785]

양쪽 아암에서 Q39X/Q38X 및/또는 V133X/S183X 돌연변이를 갖는 변이체를 포함한, 추가의 이중특이적 항체는, 상기 이중특이적 항체가 증가된 우선적인 중쇄/경쇄 짝짓기를 실증하였는지를 결정하기 위해, 상기에 기재된 바와 같이, 생성되었고, 발현되었고, 정제되었고, 고해상도 질량 분광분석법을 통해 분석되었다. 고해상도 질량 분광분석법 분석의 예시적인 결과는 아래 표 14A 및 14B에 제공된다:

표 14A

UCHT1 아암 (홀)		4D5 아암 (놈)		조합된 BsIgG 및 LC 스크램블링 된	2x 놈 LC	2x 홀 LC	BsIgG	LC 스크램블 링된
LC 돌연변이(들)	HC 돌연변이(들)	LC 돌연변이(들)	HC 돌연변이(들)					
Q38E V133K	Q39K S183E	Q38K V133E	Q39E	79.4%	16.6%	4.0%	78.6%	0.8%
Q38E V133E	Q39K S183K	Q38K V133K	Q39E S183E	77.0%	19.7%	3.4%	76.1%	0.9%
Q38E V133K	Q39K S183E	Q38K V133E	Q39E S183K	82.8%	16.0%	1.2%	82.6%	0.2%
Q38E V133K	Q39K S183F	Q38K	Q39E	80.1%	19.9%	0.0%	80.1%	0.0%
Q38E V133K	Q39K S183T	Q38K	Q39E	85.4%	14.6%	0.0%	85.4%	0.0%
Q38E V133K	Q39K S183Y	Q38K	Q39E	84.9%	15.1%	0.0%	84.9%	0.0%
Q38E V133K	Q39K S183F	Q38K	Q39E S183E	66.5%	31.1%	2.4%	65.4%	1.1%
Q38E V133K	Q39K S183T	Q38K	Q39E S183E	75.7%	24.3%	0.0%	75.7%	0.0%
Q38E V133K	Q39K S183Y	Q38K	Q39E S183E	71.3%	27.7%	1.0%	70.9%	0.4%

표 14B

UCHT1 아암 (홀)		4D5 아암 (놈)		조합된 BsIgG 및 LC 스크램블 링된	2x 놈 LC	2x 홀 LC	BsIgG	LC 스크램블 링된
LC 돌연변이(들)	HC 돌연변이(들)	LC 돌연변이(들)	HC 돌연변이(들)					
--	--	--	--	46.0%	32.0%	22.0%	23.0%	23.0%
Q38E	Q39K	Q38K	Q39E	77.0%	19.7%	3.4%	76.1%	0.9%
Q38K	Q39E	Q38E	Q39K	69.0%	18.5%	12.5%	65.5%	3.5%
Q38E V133K	Q39K S183E	Q38K	Q39E	94.5%	0.8%	4.7%	94.5%	0.0%
Q38K V133K	Q39E S183E	Q38E	Q39K	70.6%	12.3%	17.1%	67.5%	3.1%
Q38K	Q39E	Q38E V133K	Q39K S183E	87.0%	7.0%	6.0%	86.5%	0.5%

[0786]

[0787]

Q39X/Q38X는 놈 및/또는 홀 아암에 도입되었고/되었거나, V133X/S183X 돌연변이는 다양한 이중특이적 항체의 홀 아암에 도입되었다. 4개 문자 돌연변이는 Q39X_{HC1}/Q38X_{LC1}놈/Q39X_{HC2}/Q38X_{LC2} 홀, 각각에서 아미노산 치환을 지칭한다. 대표적인 결과는, 단독으로 또는 병용으로, (V133K/S183E를 이용하여 표 14C에서 예시된) EKKE 및 V133X/S183X 돌연변이가 상이한 항체내 이중특이적 어셈블리를 일반적으로 개선하였다는 것을 보여준다. 모 항체가 이미 강한 우선적인 중쇄/경쇄 짝짓기를 나타내는 예에서, 추가 개선은 달성 또는 검출하기 어렵다. V133X/S183X 돌연변이는 이중특이적 항체의 놈 아암에 또한 도입되었고 비교할만한 결과를 보여주었다.

표 14C

BsIgG 공동발현 쌍	변이체	조합된 BsIgG 및 LC 스크램블 링된	2x 높 LC	2x 홀 LC	BsIgG	LC 스크램블 링된
항-HER2/CD3 ^{8,9}	WT	46.0%	32.0%	22.0%	23.0%	23.0%
	EKKE	78.6%	15.9%	5.5%	77.5%	1.1%
	V133K/S183E 홀	51.8%	29.9%	18.3%	37.0%	14.8%
	EKKE + V133K/S183E 홀	94.5%	0.8%	4.7%	94.5%	0.0%
항-EGFR/cMET ^{1,2}	WT	89.8%	6.0%	4.3%	89.5%	0.3%
	EKKE	89.3%	4.9%	5.9%	89.0%	0.3%
	V133K/S183E 홀	94.0%	2.2%	3.9%	93.9%	0.1%
	EKKE + V133K/S183E 홀	94.3%	2.8%	2.9%	94.2%	0.1%
항-VEGFA/VEGFC ^{3,4}	WT	62.20%	7.70%	30.10%	ND	ND
	EKKE	62.10%	30.90%	7.00%	ND	ND
	V133K/S183E 홀	72.60%	9.80%	17.60%	ND	ND
	EKKE + V133K/S183E 홀	81.90%	15.10%	3.00%	ND	ND
항-VEGFA/VEGFC ^{3,4} (LC1:LC2 비 최적화된)	WT	62.5%	16.6%	20.9%	56.3%	6.2%
	EKKE	78.1%	8.1%	13.8%	76.6%	1.5%
	V133K/S183E 홀	68.7%	18.2%	13.1%	65.0%	3.7%
	EKKE + V133K/S183E 홀	92.1%	4.6%	3.3%	91.9%	0.2%
항-IL-13/IL-4 ^{5,6,7}	WT	81.8%	7.2%	11.0%	80.8%	1.0%
	EKKE	89.6%	7.7%	2.6%	89.4%	0.2%
	V133K/S183E 홀	88.4%	6.6%	5.0%	88.0%	0.4%
	EKKE + V133K/S183E 홀	98.4%	0.0%	1.6%	98.4%	0.0%

[0788]

항-VEGFA/ANG2 ¹⁰	WT	49.0%	17.0%	34.0%	29.2%	19.8%
	EKKE	100.00% [#]	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%
	V133K/S183E ^혼	57.9%	24.5%	17.6%	49.1%	8.8%
	EKKE + V133K/S183E ^혼	100.00% [#]	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%

[#]항-VEGFA/ANG2 샘플에서, 정확하게 조립된 이중특이적 Ab, “2x 홀 LC” Ab, 및 “2X 놓” Ab의 분자 질량은 매우 유사하다. “2x 홀 LC” 및 “2X 놓” 집단으로부터 “정확한” 집단을 식별하기 위해, 오비트랩 해상도는 증가되었고, 따라서 감수성을 약간 감소시켰다. 100% 정확한 짝짓기는 따라서 >95%에 더욱 근접할 것 같다.

1. Schaefer, 등 HER3 및 EGFR에 대한 투-인-원(two-in-one) 항체는 단일특이적 항체와 비교된 우수한 억제 활성을 갖는다. Cancer Cell. 2011; 20:472-86.
2. Merchant, 등 치료제로서 항종양 활성을 가진 MET 길항제, 오나투주맙의 I가 항체 설계 및 작용 기전. Proc Natl Acad Sci USA. 2013; 110:E2987-96.
3. Presta, 등 고형 종양 및 다른 장애의 요법을 위한 항-혈관 내피 성장 인자 단클론성 항체의 인간화. Cancer Res. 1997; 57:4593-9.
4. Gogineni, 등 VEGF-C의 저해가 원위 림프 리모델링 및 2차 전이를 조절한다. PLoS One. 2013; 8:e68755.
5. WO 2014/165771
6. WO 2005/062967
7. Ultsch M, Bevers J, Nakamura G, Vandlen R, Kelley RF, Wu LC, 등 항-IL-13 항체 레브리키주맙에 의한 신호전달 분자의 구조적 기준. J Mol Biol. 2013; 425:1330-9.
8. Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, 등 인간 암 요법에 대한 항-p185HER2 항체의 인간화. Proc Natl Acad Sci USA. 1992; 89:4285-9.
9. Zhu Z, Carter P. 효율적인 항원 결합 및 T 세포 활성화에 중요한 인간화된 항-CD3 항체에서 중쇄 잔기의 확인. J Immunol. 1995; 155:1903-10.
10. Liang WC, Wu X, Peale FV, Lee CV, Meng YG, Gutierrez J, 등 교차종 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)-블록킹 항체는 인간 종양 이종이식의 성장을 완전히 억제하고 기질 VEGF의 기여를 평가한다. J Biol Chem. 2006; 281:951-61.

[0789]

[0790]

Q39E_{HC1}/Q38K_{LC1} 놓/Q39K_{HC2}/Q38E_{LC2} 홀 및 V133K/S183E 홀 돌연변이를 포함한 항-HER2/CD3 항체는 V133E/S183K 놓 돌연변이를 함유하도록 추가로 변형되었다. 항체는, 상기 이중특이적 항체가 증가된 우선적인 중쇄/경쇄 짝짓기를 실증하였는지를 결정하기 위해, 상기에 기재된 바와 같이, 발현되었고, 정제되었고, 고해상도 질량 분광분석법을 통해 분석되었다. 고해상도 질량 분광분석법 분석의 예시적인 결과는 아래 표 14D에 제공된다:

표 14D

BsIgG 공동발현 쌍	변이체	조합된 BsIgG 및 LC 스크램블링된	2x 놓 LC	2x 홀 LC	BsIgG	LC 스크램블 링된
항-HER2/CD3 ^{8,9}	WT	46.0%	32.0%	22.0%	23.0%	23.0%
	EKKE + V133K/S183E ^혼	94.5%	0.8%	4.7%	94.5%	0.0%
	EKKE + V133K/S183E ^혼 + V133E/S183K ^놓	99.1%	0.0%	0.9%	99.1%	0.0%

[0791]

[0792]

표 14D에서 예시적인 결과는 EKKE 및 V133K/S183E 홀 돌연변이와 결합하여 V133E/S183K 놓 돌연변이가 거의 100%로 이중특이적 어셈블리를 개선하였다는 것을 보여준다.

[0793]

EKKE 및 V133K/S183E 홀 돌연변이를 갖는 항-HER2/CD3 항체의 활성은 시험관내 세포독성 검정에서 비변형된 항-HER2/CD3 항체의 것에 비교되었다. 간단히, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)는 림프구 분리 배지 (MP biomedical, Solon, OH)를 이용하여 건강한 지원자의 혈액으로부터 분리되었다. CD8⁺ 세포는 음성 선택에 의해 밀테니이 (Miltenyi) (#130-094-156)로부터 인간 CD8⁺ 분리 키트를 이용한 PBMC에서 추출되었다. 1x10⁴ PBMC 세포는 96

웰 플레이트상에 분주되었고 밤새 인큐베이션되었다. 5×10^4 CD8+ T-세포는 (a) EKKE 및 V133K/S183E 홀 돌연변이를 갖는 항-HER2/CD3 항체로, (b) EKKE 및 V133K/S183E 홀 돌연변이를 갖는 항-HER2/CD3 항체 없이, (c) 비변형된 항-HER2/CD3로, 그리고 (d) 비변형된 항-HER2/CD3 없이 첨가되었다. 혼합물은 37° C에서 48h 인큐베이션되었다. T 세포는 PBS로 2회 세정에 의해 제거되었다. PBMCs의 생존력은 CellTiter-Glo® 발광성 세포 생존력 검정 (Promega, Madison, WI)을 이용하여 측정되었다. 도 23에 나타난 바와 같이, 변형된 및 비변형된 항-HER2/CD3 항체의 활성은 비교할만 하였다.

[0794] 시차 주사 형광측정법 (DSF)은 하기의 용융 온도를 결정하기 위해 수행되었다: (a) VL-Q38K 및 VH-Q39E 돌연변이를 함유하도록 변형된 4D5 Fab; (b) VL-Q38E, CL-V133K, VH-Q39K, 및 CH-1 S183E 돌연변이를 함유하도록 변형된 UCHT1Fab; 및 (c) VL-Q38E, CL-V133K, VH-Q39K, 및 CH-1 S183T 돌연변이를 함유하도록 변형된 UCHT1 아암 (참고, 예를 들면, Niesen 등 (2007) *Nat Protoc* **2**, 2212-2221.) 단백질 안정성은 Sypro 오렌지 염료 원액 (Molecular Probes, USA)의 1:500의 최종 희석액으로 Biorad CFX96 실시간 시스템 (Biorad, USA)에서 결정되었다. PBS내 25 μ L Fab 샘플의 형광은 20-100 °C로부터 기록되었다 (0.2 °C 증분, 10 초 유지 / 단계). 아래 표 15에서 보여준 결과는 본 명세서에서 기재된 가변 및/또는 불변 영역에 도입된 돌연변이가 항체의 T_m에 크게 영향을 주지 않는다는 것을 입증한다.

표 15

LC	HC	LC 돌연변이	HC 돌연변이	T _m [°C]
4D5	4D5			80°
		Q38E	Q39K	78.6°
		Q38K	Q39E	79.8°
		V133K	S183T	76.8°
		V133K	S183E	79.0°
		Q38K V133K	Q39E S183T	75.4°
		Q38K V133K	Q39E S183E	78.0°
		Q38E V133K	Q39K S183E	77.4°
		Q38E V133K	Q39K S183T	75.2°
UCHT1v9	UCHT1v9			87.8°
		Q38E	Q39K	87.2°
		Q38K	Q39E	87.0°
		V133K	S183T	79.4°
		V133K	S183E	83.2°
		Q38K V133K	Q39E S183T	78.4°
		Q38K V133K	Q39E S183E	83.4°
		Q38E V133K	Q39K S183E	83.2°
		Q38E V133K	Q39K S183T	78.0°
4D5	4D5			80.0°
4D5	4D5	Q38K	Q39E	79.8°
UCHT1v9	4D5	V133K		78.0°
UCHT1v9	UCHT1v9			87.8°
UCHT1v9	UCHT1v9	Q38E	Q39K	87.2°
UCHT1v9	UCHT1v9	V133K	S183E	83.2°
UCHT1v9	UCHT1v9	V133K	S183T	79.4°
UCHT1v9	UCHT1v9	Q38E V133K	Q39K S183E	82.4°
UCHT1v9	UCHT1v9	Q38E V133K	Q39K S183T	78.0°
4D5	4D5	Q38K	Q39E	79.8°
UCHT1v9	UCHT1v9	Q38E V133K	Q39K S183E	82.4°

[0795]

[0796] 표 15에서 보여진 결과에 기반하여, 시험된 변이체의 열안정성은 HC의 안정성에 의해 우세하게 유도된 것처럼 보인다. 안정성이 개선된 이중특이적 짝짓기에 대한 설명일 수 있어도, 데이터는 예상외로 최상의 이중특이적 짝짓기를 나타내는 변이체가 최상의 열안정성과 항상 상관하지 않는다는 것을 보여주고, 예를 들면, 적절하게 짝짓기된 Fab는 짝짓기오류된 Fab에 비교하여 더 낮은 또는 유사한 열안정성을 보여줄 수 있다. 특이적 기전(들)에 의해 구속됨 없이, 돌연변이는, 대안적으로 또는 추가로, 적절한 쌍의 어셈블리 동력학에 영향을 줄 수 있고, 예를 들면, 적절한 쌍은 중쇄와 경쇄 사이 디설파이드 형성에 이어서 더 빨리 조립할 수 있다. 이는 쇠비 최적화가 이중특이적 형성을 추가로 개선하였다는 관찰에 의해 지지된다.

[0797] Q39E_{HC1}/Q38K_{LC1} 쌍/Q39K_{HC2}/Q38E_{LC2} 홀 및 V133K/S183E 홀 돌연변이는 인간 IgG1 아이소타입, 인간 IgG2 아이소타입, 인간 IgG4 아이소타입, 및 마우스 IgG2a 아이소타입의 이중특이적 항-4D5/UCHT1 항체에

도입되었다. 인간 IgG2 아이소타입의 항체는 *시험관내* 성공적으로 조립하는 것이 관측되지 않았다. 아래 표 16에서 예시적인 결과는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인에서 돌연변이가 상이한 아이소타입의 인간 이중특이적 항체에 서, 뿐만 아니라 마우스 이중특이적 항체에서 이중특이적 어셈블리를 일반적으로 개선하였다는 것을 보여준다.

표 16

BsIgG 공동발현 쌍	변이체	조합된 BsIgG 및 LC 스크램블링된	2x 농 LC Mab	2x 홀 LC Mab	BsIgG	LC 스크램블링된 Mab
4D5/UCHT1 huIgG1	WT	47.7%	20.0%	32.3%	23.9%	23.9%
	EKKE	67.3%	12.8%	19.9%	63.3%	4.0%
	EKKE + V133K/S183E _홀	94.5%	4.7%	0.8%	94.5%	0.0%
4D5/UCHT1 huIgG2	WT	50.0%	27.5%	22.5%	27.5%	22.5%
	EKKE	83.3%	14.3%	2.4%	82.9%	0.4%
	EKKE + V133K/S183E _홀	94.9%	2.9%	2.2%	94.8%	0.1%
4D5/UCHT1 huIgG4	WT [†]	38.6%	27.7%	33.7%	19.3%	19.3%
	EKKE	84.3%	6.4%	9.4%	83.6%	0.7%
	EKKE + V133K/S183E _홀	92.6%	2.2%	5.2%	92.5%	0.1%
4D5/UCHT1 muIgG2a	WT [‡]	44.9%	25.8%	29.2%	22.5%	22.5%
	EKKE [#]	82.2%	8.5%	9.4%	81.2%	1.0%
	EKKE + V133K/S183E _홀 [#]	89.7%	0.0%	10.3%	89.7%	0.0%

*결과는 최적화된 LC1:LC2 비를 이용하여 획득되었다

†전체 피크에 대하여 예상된 것으로부터 -110 Da의 무특성규명된 질량 차이.

‡전체 피크에 대하여 예상된 것으로부터 +160 Da의 #무특성규명된 질량 차이.

the VL-Q38K, CL-V133E, VH-Q39E, 및 CH1-S183K 돌연변이를 함유하도록 변형된 4D5 Fab의 결정 구조는 1.63 Å의 해상도로 결정되었다. 돌연변이체의 전체 구조는 야생형 4D5 Fab에 비교하는 유의차를 보여주지 않아, 모든 4 도메인에 도입된 전하 돌연변이가 구조적 완전성을 교란시키지 않는다는 것을 나타낸다. 참고 도 11A. 그러나, 돌연변이된 잔기 VL-Q38K와 VH-Q39E 사이 염 다리뿐 아니라, 양쪽 VL-Q38K 및 VH-Q39E가 2 용매 물 분자와 추가의 수소 결합을 형성한다는 것이 밝혀졌다. VL-Q38K가 수소 결합, 각각으로 VH-Y95 및 VL-K39와 상호작용하는 것이 또한 밝혀졌다. 광범위한 수소 결합 네트워크는 돌연변이된 VL과 VH 사이 짝짓기를 안정화한다. 참고 도 11B. CL-V133E 및 CH1-S183K 돌연변이를 함유한 불변 도메인에서, 돌연변이된 잔기 CL-V133E와 CH1-S183K 사이 염 다리뿐 아니라, 양쪽 CL-V133E 및 CH1-S183K는 3 용매 물 분자와 추가의 수소 결합을 형성한다. CL-V133E 및 CH1-S183K는 수소 결합 각각으로 VL-T178과 또한 상호작용한다. 예기치 못한 광범위한 수소 결합 네트워크는 돌연변이된 CL과 CH1 사이 짝짓기를 안정화하고, 이는 정확하게 짝짓기된 BsIgG의 생산을 용이하게 한다. 참고 도 11C.

VL-Q38E, CL-V133K, VH-Q39K, 및 CH1-S183E 돌연변이를 함유하도록 변형된 4D5 Fab의 결정 구조는 1.61 Å의 해상도로 결정되었다. 돌연변이체의 전체 구조는 야생형 4D5 Fab에 비교하는 유의차를 보여주지 않아, 모든 4 도메인에 도입된 전하 돌연변이가 구조적 완전성을 교란시키지 않는다는 것을 나타낸다. 참고 도 12A. VL-Q38E 및 VH-Q39K가 수소 결합을 형성하지 않는다는 것이 밝혀졌다. VL-Q38E는, 그러나, 2 용매 물 분자와 수소 결합을 형성한다. 참고 도 12B. CL-V133K 및 CH1-S183E 돌연변이를 함유한 불변 도메인에서, 돌연변이된 잔기 CL-V133K와 CH1-S183E 사이 염 다리뿐 아니라, 양쪽 CL-V133K 및 CH1-S183E는 2 용매 물 분자, 각각과 추가의 수소 결합을 형성한다. CL-V133K는 CL-T178과 수소 결합을 또한 형성하고, CH1-S183E는 VL-T76과 수소 결합을 형성한다. 예기치 못한 광범위한 수소 결합 네트워크는 돌연변이된 CL과 CH1 사이 짝짓기를 안정화하고, 이는 정

확하게 짝짓기된 BsIgG의 생산을 용이하게 한다. **참고 도 12C.**

[0801] 요약하면, 우리는 CL의 V133에서 돌연변이가 야생형 중쇄와 짝짓기된 경우 항체 어셈블리를 감소시켰다는 것을 밝혀냈다. CH1의 위치 S183에서 아미노산 치환은, 그러나, CL의 위치 V133에서 돌연변이와 짝짓기된 경우 항체 변이체의 어셈블리를 회복하였다. 따라서, V133X/S183X 돌연변이 쌍은 단일 세포에서 발현된 경우 특이적 LC 및 HC 짝짓기를 유도할 수 있다. 단독으로 또는 CH1/CL 돌연변이와 병용으로 VH의 위치 Q39 및 VL의 Q38에서 돌연변이는 추가로 이중특이적 항체의 맥락에서 LC 및 HC 짝짓기를 개선하였고, 따라서 상응하여 2개 절반 항체가 단일 세포에서 발현된 경우 정확한 이중특이적 형성을 개선하였다. 실험적으로 결정된, 최적화된 경쇄 비는 추가로 이중특이적 어셈블리를 개선하였다. 단독으로 또는 CH1/CL 돌연변이와 병용으로 VH의 위치 Q39 및 VL의 Q38에서 돌연변이는 추가로 시험된 전체 인간 및 마우스 항체 아이소타입에서 이중특이적 어셈블리를 개선하였다. 예상외로, 단독으로 또는 병용으로, 중쇄 또는 경쇄의 가변 및 불변 영역에서 돌연변이는 항체의 열안정성에 크게 영향을 주지 않는다.

[0802] **실시예 2: 전략 #2를 이용한 항체 중쇄/경쇄 쌍의 엔지니어링**

[0803] 또한, 예시적인 이중특이적 항체 4D5의 CH1-CL 계면은 하기를 이용하여 전산학적으로 재설계되었다: 분자 모델링 프로그램 ROSETTA (Leaver-Fay 등 (2011) "ROSETTA3: 거대분자의 시뮬레이션 및 설계를 위한 목적-지향된 소프트웨어 스위트." *Methods Enzymol.* 487, 545-74). ROSETTA 프로그램은 적극적인 개발 중이고 일정하게 업데이트된다. 간단히, ROSETTA 프로그램은 소정의 설계 접근법에 대하여 지정된 사용자-입력한 레퍼토리로부터 랜덤 서열을 생성한다. 2개의 설계 접근법은, 아래에 상세히 기재된 바와 같이, 수행되었다:

[0804] 하기에서: 제1 설계 접근법 (즉, 접근법 A, **참고 도 13A**), CL 도메인의 S176 아미노산 잔기는 F, Y 또는 W의 임의의 하나이도록 제한되었고; CH1 도메인의 F170 아미노산 잔기는 A, G, I, L, S, T 또는 V의 임의의 하나이도록 제한되었다. 잔기 동일성을 보존 그러나 최적화하기 위해, CL 도메인의 F118 아미노산 잔기는 F, Y 또는 W의 임의의 하나이도록 제한되었고; CH1 도메인의 F126 아미노산 잔기는 F, Y 또는 W의 임의의 하나이도록 제한되었고; CH1의 S183 아미노산 잔기는 A, G, I, L, S, T 또는 V의 임의의 하나이도록 제한되었다. CL 도메인의 F116, V133, L135, S174 아미노산 잔기 및 CH1 도메인의 L128, G143, L145, S181 아미노산 잔기는 무극성 아미노산이도록 제한되었다. 다른 잔기, 예컨대 CL 도메인의 S131, S162, T164, T178 및 CH1 도메인의 A141, V185는 시스테인을 제외한 임의의 아미노산으로서 재설계되도록 허용되었다.

[0805] 하기에서: 제2 설계 접근법 (즉, 접근법 B, **참고 도 13B**), CL 도메인의 L135 아미노산 잔기 및 CH1 도메인의 L128 아미노산 잔기는 F, Y 또는 W의 임의의 하나이도록 제한되었고; CL 도메인의 F118 아미노산 잔기 및 CH1 도메인의 L145 아미노산 잔기는 A, I, L, S, T 또는 V의 임의의 하나이도록 제한되었다. CH1 도메인의 S181 아미노산 잔기는 또한 A, I, L, S, T 또는 V의 임의의 하나이도록 제한되었다. 또한, CL 도메인의 F116 아미노산 잔기는 A, F, I, L, M, S, T, V 또는 Y의 임의의 하나이도록 제한되었고; CL 도메인의 V133 아미노산 잔기는 A, F, I, L, S, T, V, W 또는 Y의 임의의 하나이도록 제한되었고; CH1 도메인의 V185 아미노산 잔기는 무극성 아미노산이도록 제한되었다. CL 도메인의 S131, S162, T164, S176, 및 T178 아미노산 잔기 및 CH1 도메인의 A141 및 F170 아미노산 잔기는 시스테인을 제외한 임의의 아미노산으로서 재설계되도록 허용되었다.

[0806] ROSETTA는, 재설계된 CH1 및 재설계된 CL 도메인 (H'L'), 야생형 CH1 및 재설계된 CL 도메인 (HL'), 뿐만 아니라 재설계된 CH1 및 야생형 CL 도메인 (H'L)을 포함한, 모델링된 구조에 대하여 다중 결합 에너지 스코어를 계산하였다. 콘트라스트 스코어는 HL'와 H'L 사이 더욱 안정적인 쌍과 H'L' 사이 에너지 차이로서 나중에 계산된다. 모든 설계된 서열은 그 다음 비선형 결합 에너지 스코어 및 콘트라스트 스코어를 가진 서열을 폐기하기 위해 정의된 필터에 적용되었다.

[0807] 스코어12 및 탈라리스(Talaris)는 ROSETTA에 의해 채택된 2개의 스코어링 함수이다. 양쪽은 상기 기재된 설계 접근법을 분석하는데 사용되었다. 스코어12에 대하여, 접근법 A 및 접근법 B는 10 주 동안 1,000 CPU 코어로 실행되었다. 아래 **표 17**에 나타난 바와 같이, 접근법 A는 275 특유 서열을 함유한 36,831 총 출력으로 돌아왔고; 접근법 B는 184 특유 서열을 함유한 3,464 총 출력으로 돌아왔다. 탈라리스에 대하여, 양쪽 설계 접근법은 5 주 동안 1,000 CPU 코어로 실행되었다. 접근법 A는 110 특유 서열을 함유한 33,286 총 출력으로 돌아왔고; 접근법 B는 47 특유 서열을 함유한 1,253 총 출력으로 돌아왔다. **참고 아래 표 17.** 182 서열은 유전자 합성 및 평가를 위하여 선택되었다.

표 17

설계 옵션	스코어링 함수	실행 시간 (주)*	총 출력	특유 출력
접근법 A	스코어 12	10	36,831	275
	탈라리스	5	33,286	110
접근법 B	스코어 12	10	3,464	184
	탈라리스	5	1,253	47
합계			74,834	616

*1000 CPU 코어

[0808]

[0809]

그들의 에너지 스코어에 기반된 후보자 서열 선택에 더하여, 전체 616 특유 출력 서열에 대한 계통발생 트리는 생성되었다. 트리의 각 분지는 CH1/CL 짝짓기 용액의 유형을 나타내도록 고려되었다. 전산 프로그램이 콘트라스트 에너지 (짝짓기 오류에 대한 정확한 짝짓기의 선택성) 예측에 충분히 정확하지 않기 때문에, 각 계통발생 분지로부터 적어도 1종의 서열의 선택은 전체 출력의 양호한 샘플링을 우리가 얻도록 하였다. 사실상, 최종 후보자, 예컨대 YT65 및 JS78은, 이하에 더 상세히 기재된 바와 같이, 그들의 서열이 그들의 상대적으로 약한 콘트라스트 에너지에도 불구하고 계통발생 분석에 따라 다른 것으로부터 독특하기 때문에 선발되었다.

[0810]

전략 #2를 이용하여 생성된 4D5 CL/CH1 변이체의 선택 출력 서열은 합성되었다. 경쇄 변이체는 KpnI/HindIII 단편으로서 발현 벡터 pRK5 hu4D5-8 L 쇠에 클로닝되었고 (Carter 등 (1992) "Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4285-9), 그리고 중쇄 변이체는 ApaI/NdeI 단편으로서 발현 벡터 pRK5 hu4D5-8 H 쇠에 클로닝되었다. 중쇄의 Fc 영역은 포유동물 세포내 비당화된 IgG 생산용 당화 부위 (N297G)에서 돌연변이 및 C-말단 라이신 (Δ K447)에서 결실을 갖는다. 이들 2개의 돌연변이는 후 정제 효소 치료 없이 용이한 질량 분광분석법 기반 정량화를 위하여 균일한 IgG 질량을 야기하였다. 파트너 항체, UCHT1.v9를 가진 전략 #2 변이체용 BsIgG의 단일 세포 생산은 HEK293T 세포 (1 ml 배양액, 96-웰 딥 웰 플레이트)에 시험 쌍의 경쇄 또는 중쇄 유전자를 각각 갖는 4 플라스미드의 공-형질감염에 의해 수행되었다. 항체 발현은 7 일 동안 37 °C에서 격렬히 흔들면서 수행되었다. 배양 상청액은 수집되었고 300 μ l (50:50 슬러리) Mabselect Sure 수지 (GE Healthcare)로 밤새 인큐베이션되었다. 수지는 그 다음 필터 플레이트로 이동되었고 20회 수지 층 용적으로 세정되었다. 결합된 물질은 50 mM 인산 pH 3.0으로 용출되었고 20X PBS pH 11.0로 중화 (1:20)되었다. IgG 단백질은 필터 (0.22 μ m) 멸균되었다. 시험된 각 전략 #2 변이체에 대한 IgG 수율은 WT에 비교할만 하였다.

[0811]

도 14에 묘사된 바와 같이, 샌드위치 ELISA 검정은 단일 세포 공-발현으로부터 이중특이적 IgG 함량을 결정하도록 수행되었다. 첫째, 전략 #2 변이체에 대한 기준점으로서 샌드위치 ELISA에 사용된 이중특이적 IgG (BsIgG) 표준은 "놈" 아암으로서 인간화된 항-HER2 (4D5) 및 "홀" 아암으로서 항-CD3 (UCHT1.v9)로 구성되었다 (Zhu 등 (1995) "Identification of heavy chain residues in a humanized anti-CD3 antibody important for efficient antigen binding and T cell activation." *J. Immunol.* 155, 1903-10). BsIgG 표준은 개별적으로 HEK293T 세포내 각 아암의 발현 및 그 다음 시험관내 이들의 어닐링에 의해 생성되었다 (Schatz 등 (2013) "Knobs-into-holes antibody production in mammalian cell lines reveals that asymmetric afucosylation is sufficient for full antibody-dependent cellular cytotoxicity." *MAbs* 5, 872-881). 도 14에 나타낸 바와 같이, 양쪽 항원에 이중특이적 항체의 결합은 샌드위치 ELISA 신호를 생성하도록 요구된다. ELISA 신호 강도는 그 다음 혼합물에서 BsIgG 함량을 결정하기 위해 (시험관내 조립된) BsIgG 표준의 것에 대해 기준점처리되었다.

[0812]

간단히, ELISA 플레이트 (MaxiSorp, Nunc)는 PBS내 1 μ g/ml에서 HER2-ECD 항원으로 코팅되었고 4 °C에서 밤새 유지되었다. 항원 코팅된 플레이트는 그 다음 1시간 동안 PBST (1X PBS 플러스 0.05% Tween-20)내 1% BSA로 블로킹되었다. 시험 샘플은 별개의 96-웰 플레이트내에 동일한 블로킹 완충액에서 희석되었고 실온에서 1시간 동안 유지되었다. 블로킹된 샘플은 HER2 코팅된 (블로킹된) 플레이트에 이동되었고 (100 μ l/웰) 실온에서 2시간 동안 인큐베이션되었다. 플레이트는 15회 PBST로 세정되었다. 제2 항원, CD3-바이오틴은 그 다음 100 μ l/웰 (블로킹 완충액내 0.5 μ g/ml CD3-바이오틴)에서 플레이트에 첨가되었고 실온에서 2시간 동안 인큐베이션되었다. 플레이트는 15회 PBST로 세정되었다. 스트렙타비딘-HRP (Thermo Fisher, Rockford, IL)은 100 μ l/웰 (0.1 μ g/ml)에서 첨가되었고 실온에서 30 분 동안 인큐베이션되었다. 플레이트는 15회 PBST로 세정되었다. 홀스래디쉬 페록시다아제 기질, Sureblue Reserve TMB 용액 (KPL, Gaithersburg, MD)은 100 μ l/웰에

서 첨가되었다. 발색 현상은 1.0 M 인산 (H_3PO_4)의 동등 용적의 첨가에 의해 중지되었다. 플레이트는 그 다음 OD₄₅₀에서 판독되었다. 도 15에 나타난 바와 같이, 4D5 아암에서 JS20, JS78, YS18, 및 YT65 돌연변이를 갖는 변이체는, 서열 변형에 의해 영향받지 않는 야생형 서열의 정확한 중쇄/경쇄 짝짓기의 비편향된, 예상된 양을 나타내는, 25% 이중특이적 어셈블리 표준을 초과하는 증가된 우선적인 중쇄/경쇄 짝짓기를 실증하였다.

[0813]

경쇄 DNA 비 및 중쇄 DNA 비는 상기에 기재된 바와 같이 4D5.UCHT1 이중특이적 항체에 대하여 최적화되었다. 아래 표 18에 제공된 예시적인 결과에 나타난 바와 같이, 경쇄 비 및 중쇄 비의 최적화는 4D5용 이중특이적 항체 형성을 개선하였다. UCHT1 항체. LC_중:LC_경:HC_중:HC_경용 1:1.4:1:1의 DNA 비는 아래 기재된 추가 실험에서 사용되었다.

표 18

DNA 비*	백분율 2x LC _중	백분율 2x LC 짝짓기 오류	백분율 2x LC _경	백분율 2x 정확한 BslgG
2.8:1:1:1	74.3	24.3	1.4	18.5
1.4:1:1:1	52.3	40.4	7.3	25.2
1:1:1.4:1	27.1	49.4	23.5	29.8
1:2.8:1:1	9.8	41.2	49.0	28.0

*LC_중:LC_경:HC_중:HC_경

[0814]

[0815]

하기 변이체 항체는 하기 경쇄 비 최적화 및 중쇄 비 최적화에 따라 발현 및 정제되었다: 4D5.UCHT1.JS20, 4D5.UCHT1.JS78, 4D5.UCHT1.JT25, 4D5.UCHT1.YS08, 4D5.UCHT1.YS18, 및 4D5.UCHT1. 4D5.UCHT1 이중특이적에 비교된 경우 YT65, EKKE (4D5_중, Q39E/Q38K; UCHT1_중, Q39K/Q38E)의 맥락에서 전체.JS78, JT25, YS08, YS18, 및 YT65 돌연변이는 각 변이체의 4D5 아암이었다. 각 변이체에 의해 생산된 이중특이적 항체의 백분율은 질량 분광분석법을 통해 정량화되었고 아래 표 19에서 보여진다.

표 19

변이체	조합된 BslgG 및 LC 스크램블링된	2x _중 LC	2x _경 LC	BslgG	LC 스크램블 링된	돌연변이 (LC+HC)의 수
4D5/UCHT1.JS20.EKKE	85%	3%	12%	84.6%	0.4%	13
4D5/UCHT1.JS78.EKKE	84%	1%	15%	83.8%	0.2%	13
4D5/UCHT1.JT25.EKKE	91%	1%	8%	90.9%	0.1%	13
4D5/UCHT1.YS08.EKKE	77%	1%	22%	76.7%	0.3%	12
4D5/UCHT1.YS18.EKKE	94%	4%	2%	93.9%	0.1%	12
4D5/UCHT1.YT65.EKKE	90%	2%	8%	89.8%	0.2%	10
4D5/UCHT1.EKKE	81%	17%	2%	80.6%	0.4%	0

[0816]

[0817]

S20, JS78, YS18, 및 YT65 중쇄의 CH1 및 CL 도메인의 부분 서열은 도 16A에서 보여지고, S20, JS78, YS18, 및 YT65 경쇄의 CH1 및 CL 도메인의 부분 서열은 도 16B에서 보여진다.

[0818]

샌드위치 ELISA의 결과는 고해상도 질량 분광분석법을 통해 확인되었다. 고해상도 질량 분광분석법은 EMR Exactive 플러스 질량 분광분석기에서 오비트랩 기술의 향상된 검출 능력을 이용한다. 정량화를 위하여, PBS내 항체 생성물은 Micro 스핀 칼럼 (Spin-6, Bio-Rad) 또는 역상 오프라인 HPLC를 이용하여 0.1% 트리플루오로아세트산에 교환된 완충액이었다. 수득한 샘플 분획은 질량 분광분석기상에 직접적으로 주입되었다. 파라미터는 Tune 방식으로 최적화되어 전하내 상태 모이어티의 기준치 해상도를 가능하게 하였다. 질량 엔빌로프는 단백질 디콘볼루션 소프트웨어 (Thermo, 스코어 컷오프 50)을 이용하여 디콘볼루션되었다. 수득한 디콘볼루션된 피크의 강도는 문서로 기록되었고 '정확한' 서열, 짝짓기 오류, 절반 항체 및 동형이량체의 % 존재를 결정하는데 사용되었다. 참고 도 17 및 18에서 예시적인 결과. 도 17A 및 18A는 야생형 4D5/UCHT1 이중특이적 항체에서 수행된 질량 분광분석법의 결과를 보여주고, 도 17B 및 18B는 4D5 아암에서 YT65 CH1/CL 돌연변이 및 VH-Q39E/VL-Q38K

돌연변이 및 UCHT1 아암에서 VH-Q39K/ VL-Q38E 돌연변이 ("EKKE")를 포함한 4D5/UCHT1 항체에서 수행된 질량 분광분석법의 결과를 보여준다. 이들 예시적인 결과는 아래 표 20에서 정량화되었고, VH/VL 및 CH1/CL 돌연변이는, 단독으로 또는 병용으로 4D5/UCHT1v.9 이중특이적에서 정확한 중쇄/경쇄 짝짓기를 추가로 개선하였다.

표 20

변이체	조합된 BsIgG 및 LC 스크램블링된	2x 넘 LC	2x 홀 LC	BsIgG	LC 스크램블링 된
4D5/UCHT1.WT	47.7%	20.0%	32.3%	23.9%	23.9%
4D5/UCHT1.EKKE	67.3%	12.8%	19.9%	63.3%	4.0%
4D5/UCHT1.YT65	70.1%	19.4%	10.5%	67.1%	3.0%
4D5/UCHT1.YT65.EKKE	90.0%	1.7%	8.3%	89.8%	0.2%

도 16A 및 16B에 나타난 바와 같이, 각각의 YT65 중쇄 및 경쇄 서열은 5 아미노산 치환을 함유한다. YT65 중쇄 및 경쇄는 정확한 중쇄/경쇄 짝짓기 유도를 위하여 요구된 돌연변이의 최소 수를 결정하기 위해 1종 이상의 위치에서 야생형 아미노산을 회복하도록 추가로 변형되었다. "역-돌연변이된" YT65 중쇄 및 경쇄 변이체의 아미노산 서열은 도 19A 및 19B에 제공된다. 고해상도 질량 분광분석법은 상기 변이체가 증가된 우선적인 중쇄/경쇄 짝짓기를, 또한 실증하였는지를 결정하기 위해 YT65 역-돌연변이된 변이체에서 또한 수행되었다. 아래 표 21에서 제공된 예시적인 결과에 나타난 바와 같이, 시험된 전체 역-돌연변이된 변이체는 이중특이적 항체의 맥락에서 개선된 LC 및 HC 짝짓기를 실증하였고, 따라서 상응하여 2개의 절반 항체가 단일 세포에서 발현된 경우 정확한 이중특이적 형성을 개선하였다.

표 21

변이체	조합된 BsIgG 및 LC 스크램블링된	2x 넘 LC	2x 홀 LC	BsIgG	LC 스크램블링된	총 수돌연변이의(HC + LC)
4D5/UCHT1.YT65.EKKE	87%	6%	7%	86.5%	0.5%	10 (친계)
4D5/UCHT1.YT65.Hc12.L c3	73%	23%	4%	71.7%	1.3%	6
4D5/UCHT1.YT65.Hc13.L c3	73%	21%	6%	71.2%	1.8%	5
4D5/UCHT1.YT65.Hc12.L c4	65%	29%	6%	62.2%	2.8%	6
4D5/UCHT1.YT65.Hc13.L c4	66%	28%	6%	63.3%	2.7%	5
4D5/UCHT1.YT65.Hc12.L c6	66%	31%	3%	64.6%	1.4%	5
4D5/UCHT1.YT65.Hc13.L c6	66%	31%	3%	64.6%	1.4%	4
4D5/UCHT1.YT65.Hc12.L c7	68%	26%	7%	65.2%	2.8%	4
4D5/UCHT1.YT65.Hc13.L c7	67%	26%	8%	63.7%	3.3%	3
4D5/UCHT1.YT65.Hc10.L C.EKKE	87%	9%	4%	86.6%	0.4%	8
4D5/UCHT1.YT65.Hc12.L C.EKKE	86%	9%	5%	85.5%	0.5%	7
4D5/UCHT1.YT65.Hc13.L C.EKKE	81%	10%	9%	79.9%	1.1%	6

중성 pH 조건 하에 변형된 이중특이적 샘플 복합성의 정성적 시험은 원상태 질량 분광분석법에 의해 수행되었다. 원상태 MS는 항체 다량체 및 다른 형태의 응집물에 관한 정보 (즉 절반 항체-모노머 상호작용)를

제공한다. 샘플은 SEC HPLC 또는 스핀 칼럼을 이용하여 10mM 암모늄 아세테이트에 교환된 완충액이었고 직접적인 주입을 통해 EMR MS에 이온화되었다. 분석은 10의 스코어 컷오프로 단백질 디콘볼루션 소프트웨어를 이용하여 수행되었다. 도 20A에 나타난 바와 같이, 4D5 아암에서 YT65 CH1/CL 돌연변이 및 VL-Q38K 및 VH-Q39E 돌연변이 및 UCHT1 아암에서 VL-Q38E 및 VH-Q39K 돌연변이를 포함한 4D5/UCHT1 항체는 증가된 정확한 중쇄/경쇄 짝짓기를 실증하였다. UCHT1 항체는 검정용 검출의 감수성 및 한계를 결정하기 위해 및 이중특이적 항체, 2x LC 놓 항체, 및 2X LC 홀 항체 중의 정량화에 일조하기 위해 샘플 속에 스파이킹되었다. 도 20A는 2x LC 놓 항체 및 2X LC 홀 항체 중에 대하여 정량화의 한계가 2.8% 미만인 것을 보여준다.

[0823] 도 20B는 도 20A내 데이터를 취득하는데 사용된 분석의 검출 감수성을 확인한다. 도 20B에서, 하기를 함유한 샘플: 100% 정확하게 짝짓기된 HER2/UCHT1 (즉, HER2 LC/HER2 HC/UCHT1 HC/UCHT1 LC, 중간 피크)은 하기 양쪽으로 스파이킹되었다: 하기를 포함한 짝짓기오류된 HER2/UCHT1: 2개의 HER2 LCs (즉, HER2 LC/HER2 HC/UCHT1 HC/HER2 LC, 좌측 피크) 및 하기를 포함한 짝짓기오류된 HER2/UCHT1: 2개의 UCHT1 LCs (즉, UCHT1 LC/HER2 HC/UCHT1 HC/UCHT1 LC, 우측 피크) (감소하는 비에서, 도 20B의 좌측에서 보여진 바와 같이). 도 20B의 우측에서 보여진, 측정된 비는 샘플에서 각각의 종의 실제 비와 측정된 비 사이 매우 작은 차이가 있다는 것을 나타낸다.

[0824] 실시예 3: T_m 및 K_D 로 야생형 항체와 항체 변이체의 비교

[0825] 시차주사열량계 (DSC)는 하기를 함유하도록 변형되었던 4D5 Fabs의 용융 온도를 결정하기 위해 수행되었다: (a) VH에서 Q39E 및 VL에서 Q38K; (b) CH1에서 S183K 및 CL에서 V133E; (c) VH에서 Q39E, VL에서 Q38K, CH1에서 S183K, 및 CL에서 V133E; (d) VH에서 Q39K 및 VL에서 Q38E (e) CH1에서 S183E 및 CL에서 V133K; (f) VH에서 Q39K, VL에서 Q38E, CH1에서 S183E, 및 CL에서 V133K; (g) CH1 및 CL에서 YT65 돌연변이; 또는 (h) VH에서 Q39E 및 VL에서 Q38K 그리고 CH1 및 CL에서 YT65 돌연변이 (참고 Ionescu 등 (2008) *J Pharm Sci* 97, 1414-1426). DSC는 병렬적으로 돌연변이를 함유하지 않은 4D5에서 수행되었다. 아래 표 22-1에서 보여진 예시적인 결과는 본 명세서에서 기재된 가변 및/또는 불변 영역에서 도입된 돌연변이가 항체의 T_m 에 크게 영향을 주지 않는다는 것을 입증한다.

표 22-1

	돌연변이				T_m (°C)
	VH	VL	CH1	CL	
WT					81.9°C
EK 가변	Q39E	Q38K			81.5°C
KE 불변			S183K	V133E	78.5°C
EK 가변/ KE 불변	Q39E	Q38K	S183K	V133E	77.9°C
KE 가변	Q39K	Q38E			79.9°C
EK 불변			S183E	V133K	80.2°C
KE 가변/EK 불변	Q39K	Q38E	S183E	V133K	78.2°C
YT65			YT65	YT65	82.0°C
YT65/EK 가변	Q39E	Q38K	YT65	YT65	81.4°C

[0826] 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 분석은 HER2에 대하여 상기 기재된 4D5 변이체의 결합 친화도를 계산하기 위해 수행되었다. 아래 표 22-2에서 보여진 결과는 본 명세서에서 기재된 가변 및/또는 불변 영역에서 도입된 돌연변이가 항체의 K_D 에 크게 영향을 주지 않는다는 것을 입증한다.

[0827]

표 22-2

	돌연변이				K _D (nM)
	VH	VL	CH1	CL	
WT					0.63
EK 가변	Q39E	Q38K			0.67
KE 불변			S183K	V133E	0.78
EK 가변/ KE 불변	Q39E	Q38K	S183K	V133E	0.75
KE 가변	Q39K	Q38E			0.44
EK 불변			S183E	V133K	0.59
KE 가변/EK 불변	Q39K	Q38E	S183E	V133K	0.46
YT65			YT65	YT65	0.42
YT65/EK 가변	Q39E	Q38K	YT65	YT65	0.72

[0828]

[0829] 실시예 4: 다른 이중특이적 쌍에 VH/VL 및 CH1/CL 돌연변이의 적용

[0830]

다음으로, 4D5/UCHT1 이외의 이중특이적 항체에서 중쇄/경쇄 짝짓기에 관한 YT65, EKKE, 또는 YT65 및 EKKE 돌연변이의 효과는 분석되었다. 간단히, YT65 CH1/CL 돌연변이, EKKE VH/VL 돌연변이, 또는 둘 모두 YT65 및 EKKE 돌연변이는 각각의 하기 이중특이적 항체 속에 도입되었다: 항-IL4/IL13, 항-EGFR/MET, 항-VEGFA/ANG2, 및 항-VEGFA /VEGFC. YT65 CH1/CL 돌연변이는 각 이중특이적 항체의 놉 아암 속에 도입되었다. 비변형된 및 변형된 이중특이적 항체는 상기에 기재된 바와 같이 고-해상도 질량 분광법을 통해 분석되었다. 표 23 및 도 21에서 제공된 예시적인 결과에 나타난 바와 같이, EKKE 및 YT. 65 돌연변이는, 단독으로 또는 병용으로, 상이한 항체에서 이중특이적 어셈블리를 일반적으로 개선하였다. 모 항체가 이미 강한 우선적인 중쇄/경쇄 짝짓기를 나타내는 예에서, 추가 개선은 달성 또는 검출하기 어렵다.

표 23

BsIgG 공동발현 쌍	변이체	조합된 BsIgG 및 LC 스크램블링된	2x 놉 LC	2x 홀 LC	BsIgG	LC 스크램블링 된
항-IL4/IL13	WT	79% [±]	17%	4%	78.1% [±]	0.9%
	EKKE	95%	4%	1%	95.0%	0.0%
	YT65 ≡	87%	7%	6%	86.5%	0.5%
	YT65 EKKE	95%	2%	3%	94.9%	0.1%
항-EGFR/MET	WT	79%	9%	13%	77.5% [±]	1.5%
	EKKE	84%	13%	3%	83.5%	0.5%
	YT65 ≡	86%	10%	4%	85.5%	0.5%
	YT65.EK KE	87%	11%	2%	86.7%	0.3%
항-VEGFA /ANG2	WT	50%	21%	29%	29.0% [±]	21.0%
	EKKE	95%	1%	4%	95.0%	0.0%
	YT65 ≡	50%	29%	21%	29.0%	21.0%
	YT65.EK KE	87%	7%	6%	86.5%	0.5%
항-VEGFA /VEGFC	WT	59%	4%	36%	56.4% [±]	2.6%
	EKKE	79%	3%	18%	78.3%	0.7%
	YT65 ≡	52%	13%	36%	40.4%	11.6%
	YT65.EK KE	75%	1%	24%	74.7%	0.3%
항-HER2/CD3	WT	48%	20%	32%	24.0% [±]	24.0%
	EKKE	81%	17%	2%	80.6%	0.4%
	YT65 ≡	70%	19%	10%	67.2%	2.8%
	YT65.EK KE	90%	2%	8%	89.8%	0.2%

[0831]

비변형된 이중특이적 항체는 정확한 HC/LC 짝짓기를 보여준다

[0832] EKKE 및 YT65 농 돌연변이를 갖는 항-HER2/CD3 항체의 활성은, 상기에 기재된 바와 같이, *시험관내* 세포독성 검증에서 비변형된 항-HER2/CD3 항체의 것에 비교되었다. 도 23에 나타난 바와 같이, 변형된 및 비변형된 항-HER2/CD3 항체의 활성은 비교할만 하였다.

[0833] 상이한 아이소타입의 이중특이적 4D5/UCHT1 항체에서 중쇄/경쇄 짝짓기에 관한 YT65 및 EKKE 돌연변이의 효과는 분석되었다. Q39E_{HC1}/Q38K_{LC1} 농/Q39K_{HC2}/Q38E_{LC2} 홀 및 YT65 농 돌연변이는 인간 IgG1 아이소타입, 인간 IgG2 아이소타입, 인간 IgG4 아이소타입 및 컷과 IgG2a 아이소타입의 이중특이적 항-4D5/UCHT1 항체에 도입되었다. 인간 IgG2 아이소타입의 항체는 *시험관내* 성공적으로 조립하는 것이 관측되지 않았다. 아래 표 24에서 예시적인 결과는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인에서 돌연변이가 상이한 아이소타입의 인간 이중특이적 항체에서 이중특이적 어셈블리를 상당히 개선하였다는 것을 보여준다.

표 24

BsIgG 공동발현 쌍	변이체	조합된 BsIgG 및 LC 스크램블링 된	2x 농 LC	2x 홀 LC	BsIgG	LC 스크램블링 된
4D5/UCHT1 huIgG1	WT	47.7%	20.0%	32.3%	23.9%	23.9%
	YT65.EKKE	90.0%	1.7%	8.3%	89.8%	0.2%
4D5/UCHT1 huIgG2	WT	50.0%	27.5%	22.5%	27.5%	22.5%
	YT65.EKKE	87.3%	1.6%	11.1%	87.1%	0.2%
4D5/UCHT1 huIgG4	WT	38.6%	27.7%	33.7%	19.3%	19.3%
	YT65.EKKE	88.4%	9.6%	2.0%	88.2%	0.2%
4D5/UCHT1 mulgG2a	WT	44.9%	25.8%	29.2%	22.5%	22.5%
	YT65.EKKE	94.5%	2.5%	3.0%	94.4%	0.1%

[0834]

[0835] 다음으로, Q39E_{HC1}/Q38K_{LC1} 농/Q39K_{HC2}/Q38E_{LC2} 홀 및 YT65 농 돌연변이를 갖는 이중특이적 4D5/UCHT1 항체를 발현한 안정적인 세포주는 작제되었다. CHO 세포는 전기천공으로 형질감염되었고, 형질전환체는 MSX (메티오닌 선택시민)의 존재하에 선택되었다. 단리물이 몇 주후 선별되었고 정확하게 조립된 이중특이적 항체의 백분율 및 항체 역가에 대하여 스크리닝되었다. 최상부 클론은 14-일 공급-배치 배양 방법을 사용하여 평가되었다. 이중특이적 항체는 수확되었고, 정제되었고, 상기에 기재된 바와 같이 고-해상도 질량 분광법을 통해 분석되었다. 아래 표 25에 제공된 예시적인 결과에 나타난 바와 같이, 세포주로부터 발현된 이중특이적 항체의 97% 초과가 정확하게 조립되었다. Q39E_{HC1}/Q38K_{LC1} 농/Q39K_{HC2}/Q38E_{LC2} 홀 및 YT65 농 돌연변이를 갖는 4D5/UCHT1 항체를 발현한 일시적으로 형질감염된 세포주는 정확하게 조립된 이중특이적 항체를 90% 발현한다고 밝혀졌다. 상기 결과는 안정적인 세포주에 의해 발현된 정확하게 조립된 이중특이적 항체의 백분율이 일시적으로 형질감염된 세포에 비교할만하다는 것을 보여준다. Q39E_{HC1}/Q38K_{LC1} 농/Q39K_{HC2}/Q38E_{LC2} 홀 및 V133E/S183K 농/V133K/S183E 홀 돌연변이 또는 항-IL13/IL4 Q39E_{HC1}/Q38K_{LC1} 농/Q39K_{HC2}/Q38E_{LC2} V133K/S183E 홀 돌연변이를 갖는 4D5/UCHT1 이중특이적 항체를 발현하는 안정적인 세포주가 작제되었다. 예시적인 결과는 세포주로부터 발현된 이중특이적 항체의 98% 초과 또는 91%가 정확하게 조립되었다는 것을 보여준다 (표 25).

표 25

안정적인 세포주	BsIgG	2x 농 LC	2x 홀 LC	LC 스크램블링된
4D5/UCHT1.YT65.EKKE	97.5%	2.5%	0.0%	0.0%
4D5/UCHT1.EKKE + V133K/S183E _홀 +V133E/S183K _농	98.3%	0.0%	1.7%	0.0%
aIL13/aIL4.EKKE + V133K/S183E _홀	91.3%	1.3%	7.3%	0.1%

[0836]

[0837]

다음으로, 4D5/UCHT1에서 중쇄/경쇄 짝짓기에 관한 YT65, EKKE, 및 V133K/S183E 돌연변이의 조합의 효과가 분석되었다. 간단히, 농 아암 (즉, 4D5 아암)에서 EKKE 돌연변이, YT65 돌연변이, 및 홀 아암 (즉, UCHT1 아암)에서 V133K/S183E 돌연변이를 포함하는 4D5/UCHT1 이중특이적 항체는 작제되었고, 생산되었고, 정제되었고, 상기에 기재된 바와 같이 고-해상도 질량 분광법을 통해 분석되었다. 4D5/UCHT1.YT65_농.V133K/S183E_홀의 이중특이적 어셈블리.EKKE는 4D5/UCHT1의 이중특이적 어셈블리에 비교되었다. V133K/S183E_홀.EKKE. 아래 표 26에서 예시적인 결과는 V133K/S183E_홀 및 EKKE 돌연변이를 갖는 4D5/UCHT1 이중특이적 항체의 농 아암에 YT65 돌연변이의 도입이 정확한 중쇄/경쇄 짝짓기를 대략 95% 내지 100% 개선하였다는 것을 보여준다.

표 26

4D5 (농) 돌연변이	UCHT1 (홀) 돌연변이	BsIgG	2x 농 LC	2x 홀 LC	LC 스크램블링된
Q39E/Q38K	Q39K/Q38E V133K/S183E	94.75	4.7%	0.0%	0.0%
Q39E/Q38K YT65	Q39K/Q38E V133K/S183E	100%	0.0%	0.0%	0.0%

[0838]

[0839]

추가 실험은 다른 이중특이적 항체에 표 26에서 시험된 돌연변이의 이동성을 평가하기 위해 수행되었다. 아래 표 27에서 예시적인 결과는 EKKE 및 YT65_농 돌연변이를 갖는 5개의 상이한 이중특이적 항체의 홀 아암에 V133K/S183E 돌연변이의 도입이 정확한 중쇄/경쇄 짝짓기를 대략 79-95% 내지 95-100% 개선하였다는 것을 보여준다.

표 27

변이체	BsIgG (%)				
	항- HER2/CD3(4D5/UCHT1)	항- IL4/IL13	항- EGFR/cMET	항- VEGFA/ANG2	항- VEGFA/VEGFC
WT	25	71	73	30	35
EKKE+ YT65 _농	84	84	95	79	80
EKKE+ YT65 _농 + V133K/S183E _홀	100	96	100	95	98

[0840]

[0841]

추가 실험은 다른 인간 IgG 서브클래스의 항-HER2/CD3 (4D5/UCHT1) 이중특이적 항체에 표 26 및 27에서 시험된 돌연변이의 이동성을 평가하기 위해 수행되었다. 아래 표 28에서 예시적인 결과는 EKKE 및 YT65_농 돌연변이를

갖는 3개의 상이한 인간 IgG 하위유형의 홀 아암에 V133K/S183E 돌연변이의 도입이 정확한 중쇄/경쇄 짝짓기를 대략 77-85% 내지 98-100% 개선하였다는 것을 보여준다.

표 28

항-HER2/CD3	BsIgG (%)		
	인간 IgG1	인간 IgG2	인간 IgG4
WT	25	27	22
EKKE+ YT65 _홀	85	77	80
EKKE+ YT65 _홀 + V133K/S183E _홀	100	100	98

[0842]

[0843]

VL-Q38K, VH-Q39E, 및 YT65 돌연변이를 함유하는 4D5 Fab의 결정 구조는 1.72 Å의 해상도로 결정되었다. 돌연변이체의 전체 구조는 야생형 4D5 Fab에 비교된 유의차를 보여주지 않아, CH1/CL 계면에 도입된 돌연변이가 구조적 완전성을 교란시키지 않는다는 것을 나타낸다. 참고 도 22A. CL-S176F 돌연변이 및 CH1-F170S 돌연변이는, 양호하게 포장된 CL/CH1 계면을 초래하는, 양호한 형태적 상보성을 보여주었다. 이는 표 22-1에 기재된 YT65 돌연변이를 함유한 4D5 Fab의 관측된 고 열안정성과 일치된다.

[0844]

구조에 있어서, 돌연변이된 잔기 CL-S176F 및 야생형 CH1-F170이 형태적으로 양립가능하지 않기 때문에 CL-S176F 돌연변이는 야생형 HC와 돌연변이체 LC의 짝짓기를 선호하지 않는다. CH1-F170S 돌연변이가 야생형 LC와 돌연변이체 HC의 짝짓기를 선호하지 않는 것은 상기 짝짓기가 정력적으로 불안정한 소수성 코어에서 빈자리를 생성할 것이기 때문이다. 참고 도 22B. 따라서, CL-S176F와 CH1-F170S 사이 선택적 짝짓기는 정확하게 짝짓기된 BsIgG 생산의 증가된 수율에 기여한다.

[0845]

아래 표 29는 하기의 상이한 조합의 이동성을 평가하기 위해 수행된 실험의 결과를 제공한다: EK_홀, EK_홀, KE_홀, KE_홀, EKKE, KEEK, S183E/V133K_홀, S183/V133K_홀, S183K/V133_홀, S183K/V133E_홀, YT65_홀, 및 YT65_홀 대 항-HER2/CD3 IgG1, 항-IL4/IL13 IgG1, 항-EGFR/MET IgG1, 항-VEGFA/ANG2 IgG1, 항-VEGFA/VEGFC IgG1, 항-HER2/CD3 IgG2, 항-HER2/CD3 IgG4, 및 항-HER2/CD3 mIgG2a. 아래 표 29에서 예시적인 결과는 돌연변이가 정확한 중쇄/경쇄 짝짓기를 개선하였다는 것을 보여준다.

표 29

	중 HC 1		LC 1		중 HC 2		LC 2		디코볼루션된 어셈블리 %
	VH1	CH1	VL1	CL1	VH2	CH1	VL2	CL	
항- HER2/CD3 IgG1									24.6%
	Q39E		Q38K		Q39K		Q38E		55.7%
						S183E		V133K	44.2%
		S183K		V133E					24.9%
		YT65H		YT65L					59.5%
		S183K		V133E		S183E		V133K	46.4%
		YT65H		YT65L		S183E		V133K	87.0%
	Q39E		Q38K		Q39K	S183E	Q38E	V133K	81.2%
	Q39E	S183K	Q38K	V133E	Q39K		Q38E		63.0%
	Q39E	YT65H	Q38K	YT65L	Q39K		Q38E		84.4%
	Q39E	S183K	Q38K	V133E	Q39K	S183E	Q38E	V133K	91.7%
	Q39E	YT65H	Q38K	YT65L	Q39K	S183E	Q38E	V133K	100.0%
	Q39E		Q38K						37.5%
	Q39E		Q38K			S183E		V133K	65.6%
	Q39E	S183K	Q38K	V133E					38.3%
	Q39E	YT65H	Q38K	YT65L					73.7%
	Q39E	S183K	Q38K	V133E		S183E		V133K	66.2%
	Q39E	YT65H	Q38K	YT65L		S183E		V133K	85.3%
					Q39K		Q38E		53.1%
					Q39K	S183E	Q38E	V133K	78.6%
		S183K		V133E	Q39K		Q38E		55.3%
		YT65H		YT65L	Q39K		Q38E		75.5%
		S183K		V133E	Q39K	S183E	Q38E	V133K	89.8%
		YT65H		YT65L	Q39K	S183E	Q38E	V133K	98.2%
	Q39K	S183E	Q38E	V133K	Q39E	S183K	Q38K	V133E	73.0%
항- IL13/IL4 IgG1									70.8%
	Q39E		Q38K		Q39K		Q38E		76.3%
						S183E		V133K	81.6%
		S183K		V133E					73.7%

[0846]

		YT65H		YT65L					68.3%
		S183K		V133E		S183E		V133K	86.2%
		YT65H		YT65L		S183E		V133K	93.7%
	Q39E		Q38K		Q39K	S183E	Q38E	V133K	91.9%
	Q39E	S183K	Q38K	V133E	Q39K		Q38E		81.5%
	Q39E	YT65H	Q38K	YT65L	Q39K		Q38E		84.2%
	Q39E	S183K	Q38K	V133E	Q39K	S183E	Q38E	V133K	100.0%
	Q39E	YT65H	Q38K	YT65L	Q39K	S183E	Q38E	V133K	95.6%
항- EGFR/cMET IgG1									73.4%
	Q39E		Q38K		Q39K		Q38E		83.2%
						S183E		V133K	81.7%
		S183K		V133E					84.6%
		YT65H		YT65L					84.4%
		S183K		V133E		S183E		V133K	93.1%
		YT65H		YT65L		S183E		V133K	96.5%
	Q39E		Q38K		Q39K	S183E	Q38E	V133K	87.4%
	Q39E	S183K	Q38K	V133E	Q39K		Q38E		88.3%
	Q39E	YT65H	Q38K	YT65L	Q39K		Q38E		95.3%
	Q39E	S183K	Q38K	V133E	Q39K	S183E	Q38E	V133K	100.0%
	Q39E	YT65H	Q38K	YT65L	Q39K	S183E	Q38E	V133K	100.0%
항- VEGFA/ ANG2 IgG1									24.00%
	Q39E		Q38K		Q39K		Q38E		78.39%
						S183E		V133K	69.3%
		S183K		V133E					50.3%
		YT65H		YT65L					52.7%
		S183K		V133E		S183E		V133K	44.8%
		YT65H		YT65L		S183E		V133K	79.9%
	Q39E		Q38K		Q39K	S183E	Q38E	V133K	100.0%
	Q39E	S183K	Q38K	V133E	Q39K		Q38E		84.8%
	Q39E	YT65H	Q38K	YT65L	Q39K		Q38E		78.9%
	Q39E	S183K	Q38K	V133E	Q39K	S183E	Q38E	V133K	98.9%
	Q39E	YT65H	Q38K	YT65L	Q39K	S183E	Q38E	V133K	94.9%
항-									34.5%

[0847]

VEGFA/ VEGFC IgG1	Q39E		Q38K		Q39K		Q38E		58.2%
						S183E		V133K	46.7%
		S183K		V133E					58.8%
		YT65H		YT65L					38.7%
		S183K		V133E		S183E		V133K	74.4%
		YT65H		YT65L		S183E		V133K	100.0%
	Q39E		Q38K		Q39K	S183E	Q38E	V133K	73.2%
	Q39E	S183K	Q38K	V133E	Q39K		Q38E		86.2%
	Q39E	YT65H	Q38K	YT65L	Q39K		Q38E		74.0%
	Q39E	S183K	Q38K	V133E	Q39K	S183E	Q38E	V133K	100.0%
항- HER2/CD3 IgG2									24.4%
	Q39E		Q38K		Q39K		Q38E		74.2%
						S183E		V133K	48.1%
		S183K		V133E					40.7%
		YT65H		YT65L					29.3%
		S183K		V133E		S183E		V133K	59.1%
		YT65H		YT65L		S183E		V133K	85.5%
	Q39E		Q38K		Q39K	S183E	Q38E	V133K	83.7%
	Q39E	S183K	Q38K	V133E	Q39K		Q38E		76.0%
	Q39E	YT65H	Q38K	YT65L	Q39K		Q38E		76.6%
항- HER2/CD3 IgG4									22.2%
	Q39E		Q38K		Q39K		Q38E		72.0%
						S183E		V133K	49.5%
		S183K		V133E					18.5%
		YT65H		YT65L					18.1%
		S183K		V133E		S183E		V133K	47.6%
		YT65H		YT65L		S183E		V133K	75.7%
	Q39E		Q38K		Q39K	S183E	Q38E	V133K	84.9%
	Q39E	S183K	Q38K	V133E	Q39K		Q38E		73.4%
	Q39E	YT65H	Q38K	YT65L	Q39K		Q38E		79.5%

	Q39E	S183K	Q38K	V133E	Q39K	S183E	Q38E	V133K	90.6%
	Q39E	YT65H	Q38K	YT65L	Q39K	S183E	Q38E	V133K	97.6%
xHER2/ xCD3 mIgG2a	Q39E	S183K	Q38K	V133E	Q39K	S183E	Q38E	V133K	98.5%
	Q39E	YT65H	Q38K	YT65L	Q39K	S183E	Q38E	V133K	91.2%

실시예 5: 단일 세포-생산된 이중특이적 항체의 약동학 연구

추가 연구는 EKKE, YT65, 및/또는 V133X/S183X (CL/CH1) 돌연변이를 포함한 단일 세포-생산된 항-HER2/CD3
 2-인-홀 (KIH) 이중특이적 항체의 약동학 (PK) 특성 (예컨대 비-특이적 청소능)을 (a) VH/VL 및 CH1/CL에서 돌
 연변이 없이 시험관내-조립된 항-HER2/CD3 2-인-홀 (KIH) 이중특이적 항체 및 (b) C.B-17 SCID 마우스에서 트
 라스트주마 (즉, 2가 단일특이적 항-HER2)와 비교 및 평가하기 위해 설계되었다

- [0852] C.B-17 SCID 마우스 (Charles River Laboratories, Hollister, CA)는 5개 그룹 (n=9)으로 조직화되었다. 제1 그룹에서 마우스는 각각 *시험관내*-조립된 항-HER2/CD3 κ -인-홀 이중특이적 항체의 단일 5 mg/kg 정맥내 (IV) 용량으로 제공되었다. 제2 그룹에서 마우스는 각각 *시험관내*-조립된 항-gD/CD3 κ -인-홀 이중특이적 항체의 단일 5 mg/kg 정맥내 (IV) 용량으로 제공되었다. 제3 그룹에서 마우스는 각각 EKKE + YT65 κ 돌연변이를 가진 단일 세포-생산된 항-HER2/CD3 κ -인-홀 이중특이적 항체의 단일 5 mg/kg 정맥내 (IV) 용량으로 제공되었다. 제4 그룹에서 마우스는 각각 EKKE + V133E/S183K κ + V133K/S183E κ 돌연변이를 가진 단일 세포-생산된 항-HER2/CD3 κ -인-홀 이중특이적 항체의 단일 5 mg/kg 정맥내 (IV) 용량으로 제공되었다. 제5 그룹에서 마우스는 각각 라스 투주맵 (즉, 항-HER2 단일특이적 2가 항체)의 단일 5 mg/kg 정맥내 (IV) 용량으로 제공되었다. 동물은 6 내지 8 주령이었고 연구의 개시에서 대략 16.6-21.4 g으로 계량되었다. 혈액 샘플은 최대 28 일 동안 다양한 시점에서 대퇴정맥을 통해 수집되었다. 혈청내 총 항체 농도는 ELISAs에 의해 결정되었고 PK 평가를 위하여 사용되었다. PK 파라미터는 IV 볼러스 입력 모델 (모델 8) (PhoenixTM WinNonlin[®], Version 6.4; Pharsight Corporation; Mountain View, CA)와 2-구획된 모델을 이용하여 추정되었다. 명목 샘플 수집 시간 및 명목 용량 농도는 데이터 분석에서 사용되었다. 전체 PK 분석은 개별 동물 데이터의 미접촉 풀에 기반되었다.
- [0853] 혈청에서 (i) 항-HER2/CD3 κ -인-홀 이중특이적 항체, (ii) EKKE + YT65 κ 돌연변이를 갖는 항-HER2/CD3 κ -인-홀 이중특이적 항체 및 (iii) EKKE + V133E/S183K κ + V133K/S183E κ 돌연변이를 갖는 항-HER2/CD3 κ -인-홀 이중특이적 항체의 농도는 0.08 μ g/mL의 정량 하한을 가진 (도 14에서 예시된 바와 같이, HER2 세포의 도메인으로 코팅된 및 바이오티닐화된 CD3으로 검출된) 특별 ELISA를 이용하여 분석되었다. 혈청에서 (iv) 항-gD/CD3 κ -인-홀 이중특이적 항체 및 (v) 트라스투주맵의 농도는 일반 ELISA를 이용하여 결정되었다. 검정은 0.03 μ g/mL의 정량 하한을 가진 검출 시약으로서 홀스래디쉬 페록시다아제에 접합된 염소 항-인간 IgG 및 포착 시약으로서 양 항-인간 IgG를 사용하였다.
- [0854] 전체 항체는 초기의 더 빠른 분포 그 다음 더 느린 제거를 가진 IgG 항체의 전형적인 2상 성향을 보여주었다 (도 24). EKKE + YT65 κ 돌연변이를 가진 단일 세포-생산된 항-HER2/CD3 κ -인-홀 이중특이적 항체 및 EKKE + V133E/S183K κ + V133K/S183E κ 돌연변이를 가진 항-HER2/CD3 κ -인-홀 이중특이적 항체의 약동학은 종래의 *시험관내*-조립된 항-HER2/CD3 κ -인-홀 이중특이적 항체와 유사하였다 (참고 아래 표 30). EKKE + YT65 κ 돌연변이를 가진 단일 세포-생산된 항-HER2/CD3 κ -인-홀 이중특이적 항체 및 EKKE + V133E/S183K κ + V133K/S183E κ 돌연변이를 가진 항-HER2/CD3 κ -인-홀 이중특이적 항체의 약물 청소능 (CL)은 7.14 내지 8.08 mL/1일/kg 범위이었고 $t_{1/2, \beta}$ 는 9.34 내지 9.38 일 범위이었다. *시험관내*-조립된 항-HER2/CD3 κ -인-홀 이중특이적 항체는 8.23 mL/1일/kg의 CL 및 11.4 일의 $t_{1/2, \beta}$ 를 갖는다. *시험관내*-조립된 항-gD/CD3 κ -인-홀 이중특이적 항체는 *시험관내*-조립된 항-HER2/CD3 κ -인-홀 이중특이적 항체에 비교하여 약간 더 느린 CL 및 더 긴 말단 반감기를 갖는 것처럼 보였다. 상기 실험에서, 항-HER2/CD3 κ -인-홀 이중특이적 항체, EKKE + YT65 κ 를 가진 항-HER2/CD3 κ -인-홀 이중특이적 항체, 및 EKKE + V133E/S183K κ + V133K/S183E κ 를 가진 항-HER2/CD3 κ -인-홀 이중특이적 항체는 트라스투주맵에 비교하여 대략 2-배 더 빠른 청소능 및 2-배 더 짧은 반감기를 가졌다.

표 30: C.B-17 SCID 마우스에서 5 mg/kg IV 투여후 항-HER2/CD3, 항-gD/CD3, 및 헤르셉틴의
약력학적 파라미터 추정치

	C_{max} (μ g/ mL)	AUC(일* μ g/ mL)	CL(mL/1 일/ kg)	$t_{1/2, \beta}$ (일)	V_1 (mL/ kg)	V_{ss} (mL/ kg)
항-HER2/CD3+ KIH, 시험관내 조립된	83.5	608	8.23	11.4	59.8	131
항-gD/CD3+ KIH, 시험관내 조립된	98.9	804	6.22	14.3	50.5	126
항-HER2/CD3+ KIH+ EKKE+ YT65 _농	110	619	8.08	9.34	45.4	107
항-HER2/CD3+ KIH+ EKKE+ V133E/S183K _농 + V133K/S183E _농	129	700	7.14	9.39	38.9	94.5
헤르셉틴 (항-HER2)	92.2	1320	3.80	20.6	54.2	111

AUC = 혈청 농도하 면적 대 시간 곡선;

CL = 청소능;

C_{max} = 최대 농도; IV = 정맥내;

PK = 약력학적;

$t_{1/2, \beta}$ = 베타-상 반감기;

V_1 = 중심 구획의 분포의 용적;

V_{ss} = 정상 상태에서 분포의 용적.

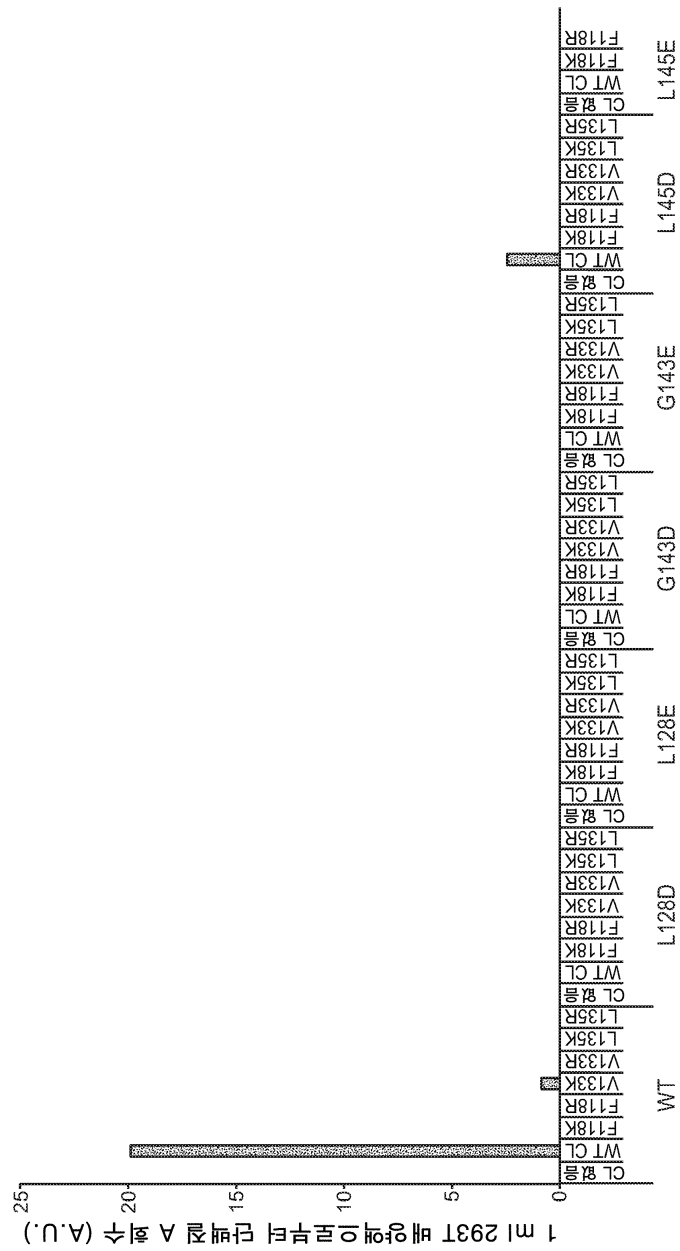
[0855]

[0856]

이전의 실시예는 단지 설명하기 위해 제공되고, 어떤 식으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것을 의도하지 않는다. 본 명세서에서 보여진 및 기재된 것에 더하여 본 발명의 다양한 변형은 전술한 설명으로부터 당해 분야의 숙련가에 분명해질 것이고 첨부된 청구항들의 범위내에 해당한다.

도면

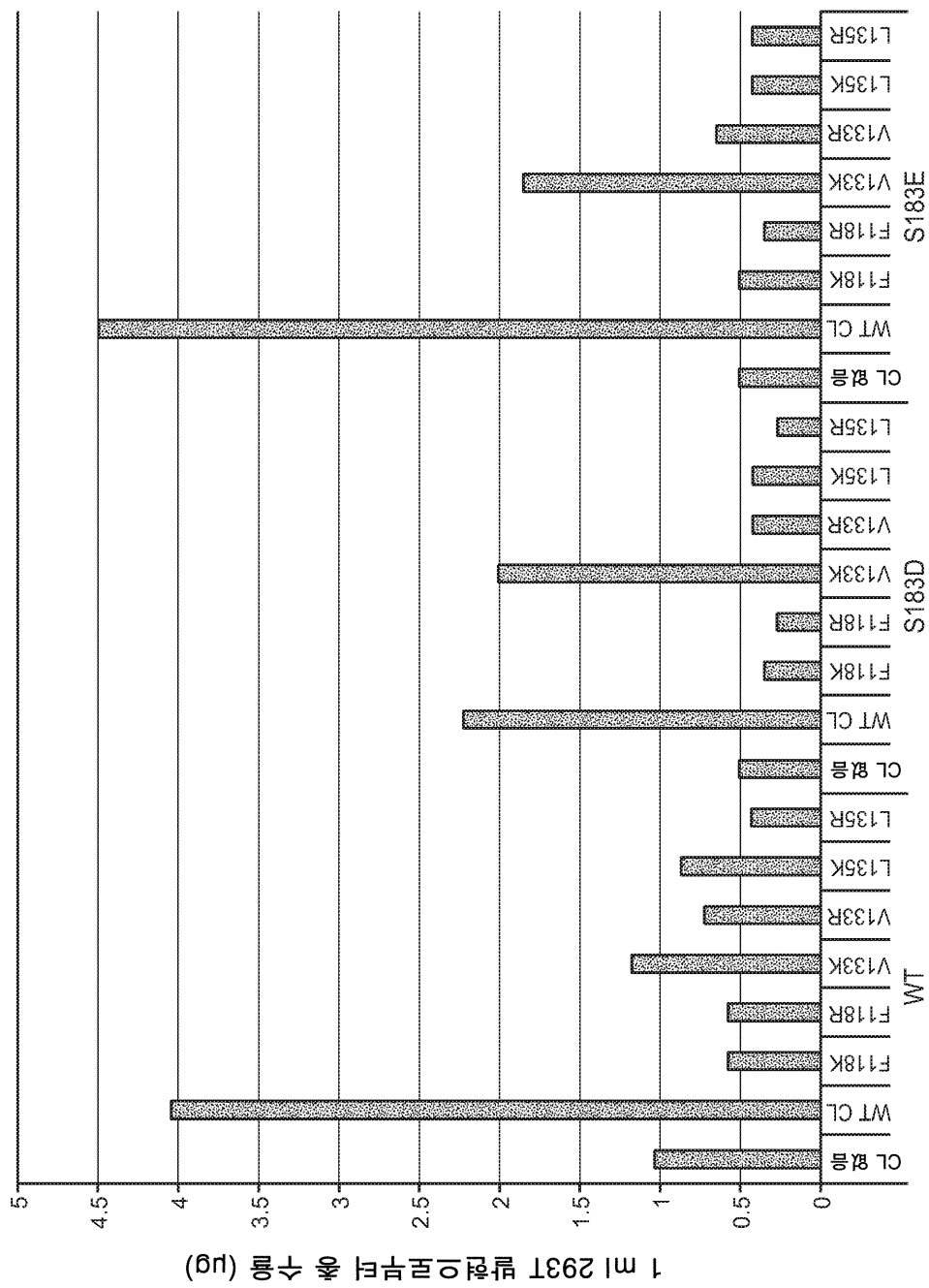
도면1a



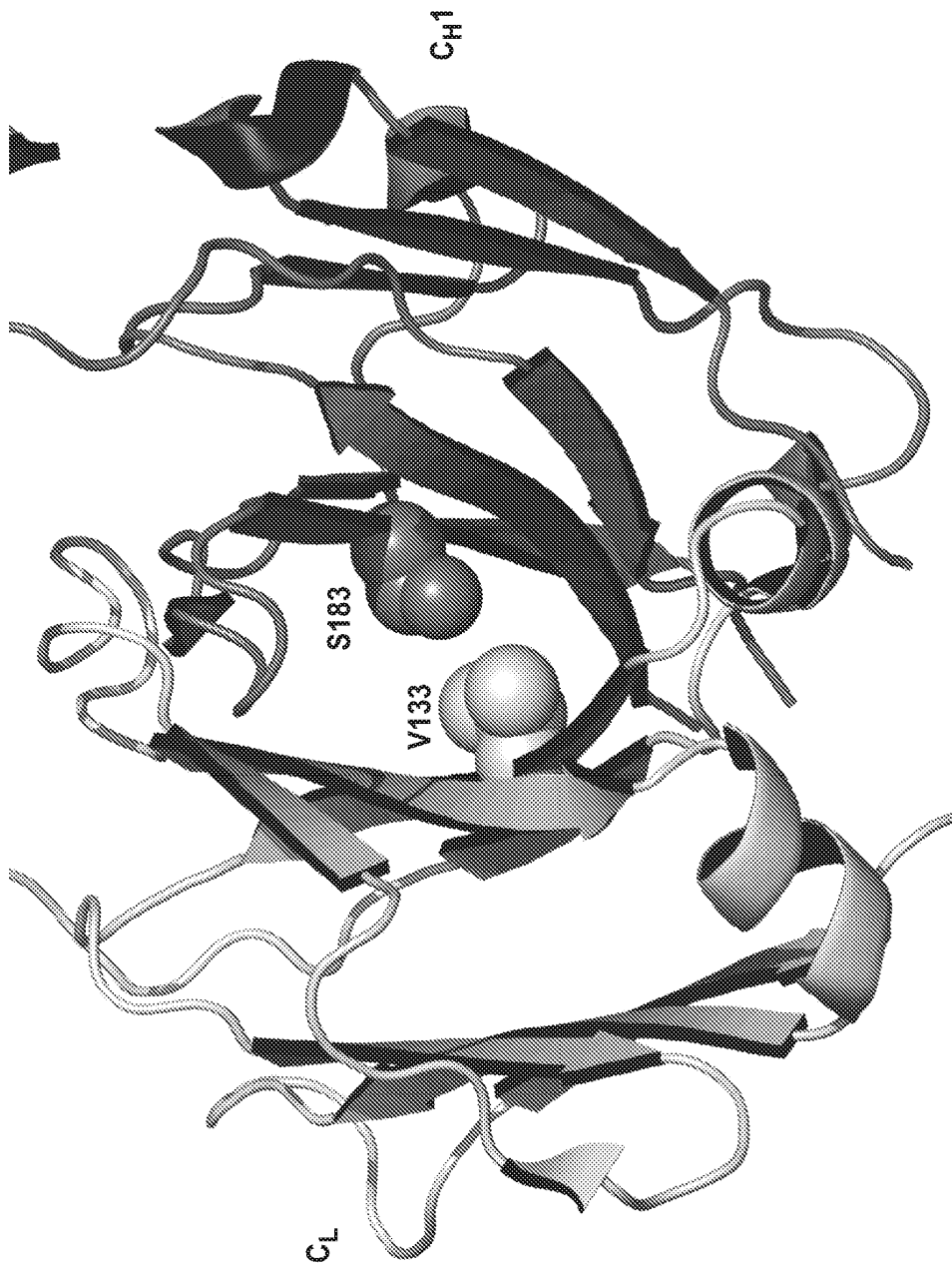
도면1b



도면2



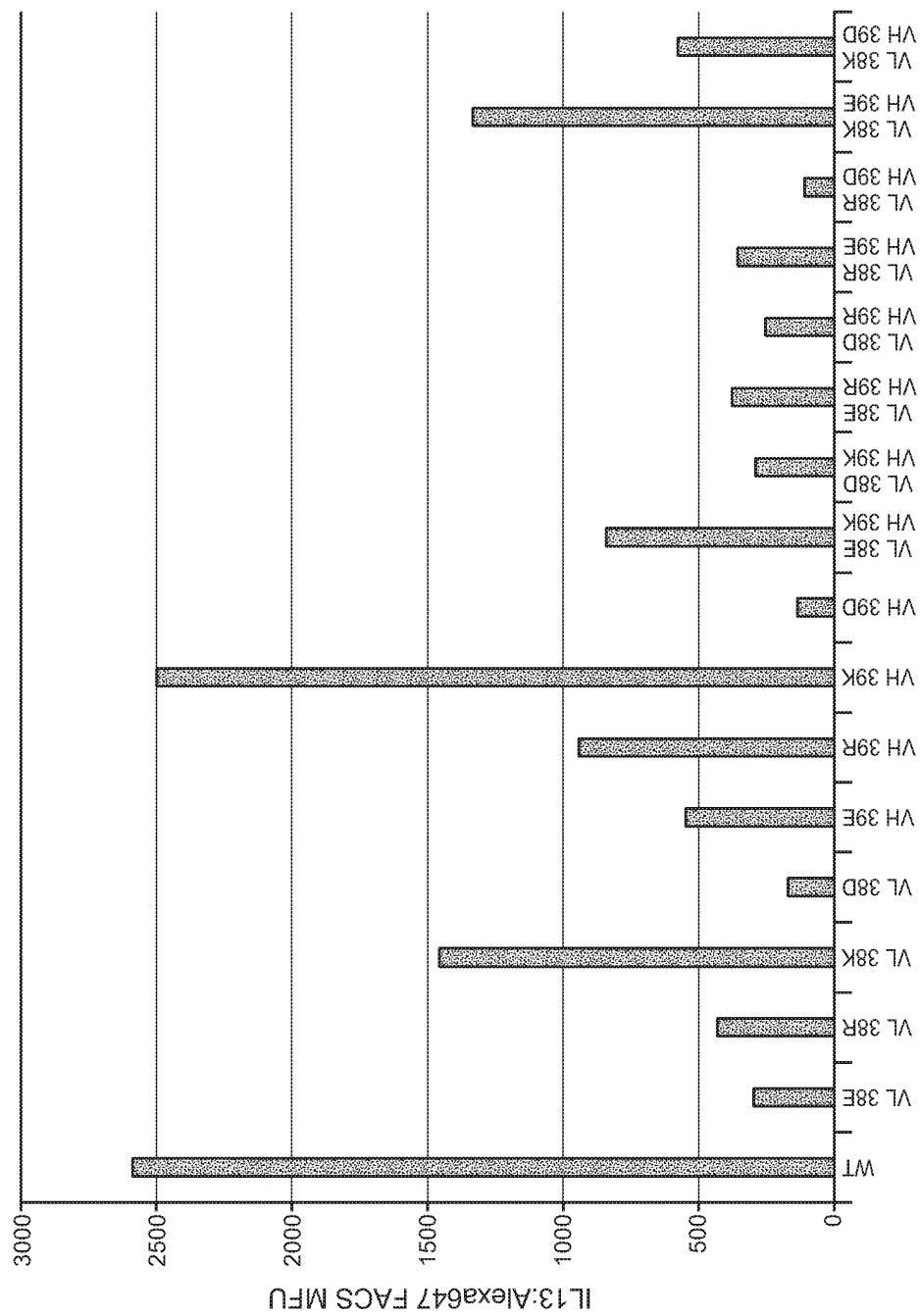
도면3



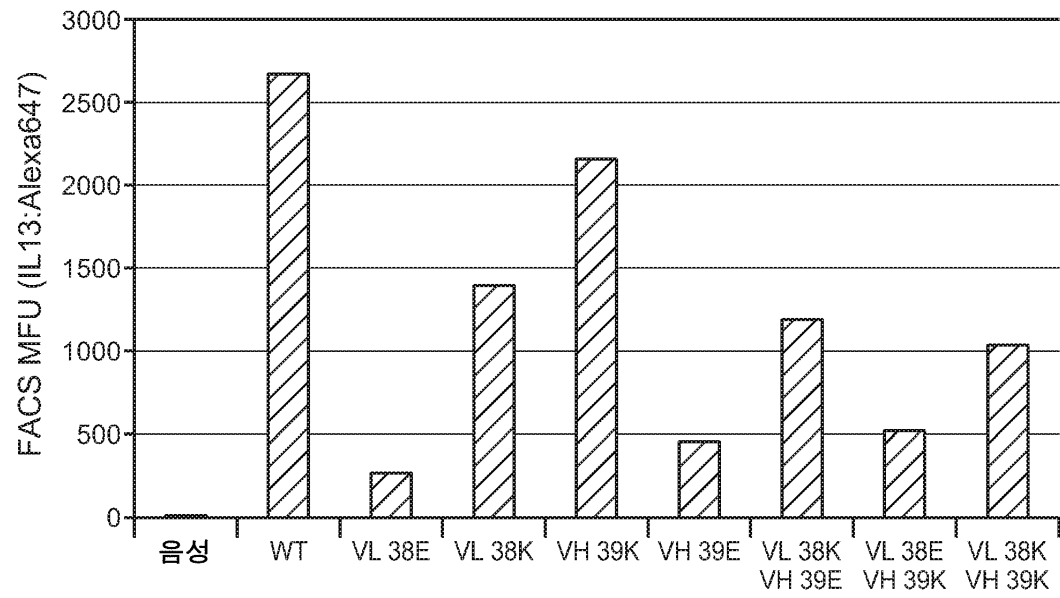
도면4

수율 (mg)/30ml 293T		종새													
		WT	S183A	S183T	S183V	S183Y	S183F	S183H	S183N	S183D	S183E	S183R	S183K		
경새	WT	2.8	2.7	2.9	2.8	3.2	3.2	1.8	1.6	0.3	2.0	0.2	0.7		
	V133E	1.7	2.3	3.6	4.5	4.4	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2		
	V133S	1.4	1.9	3.0	3.0	3.4	3.8	1.1	0.4	0.0	0.3	0.2	0.2		
	V133L	1.8	2.6	2.3	2.9	3.2	3.0	1.8	1.1	0.2	1.0	0.1	0.2		
	V133W	1.1	2.2	2.6	2.8	3.4	3.4	0.8	0.2	0.0	0.0	0.1	0.1		
	V133K	0.4	1.4	2.6	2.2	2.4	3.6	0.0	0.0	0.4	0.2	0.1	0.1		
	V133R	0.2	1.0	1.8	2.2	2.1	3.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1		
	V133D	0.3	1.1	2.0	2.0	1.7	3.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2		

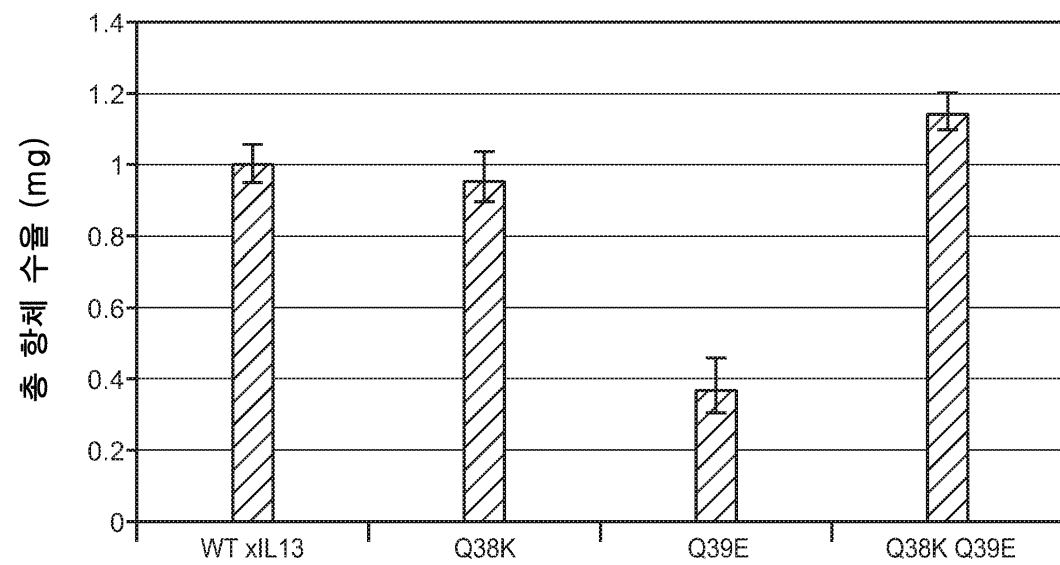
도면5



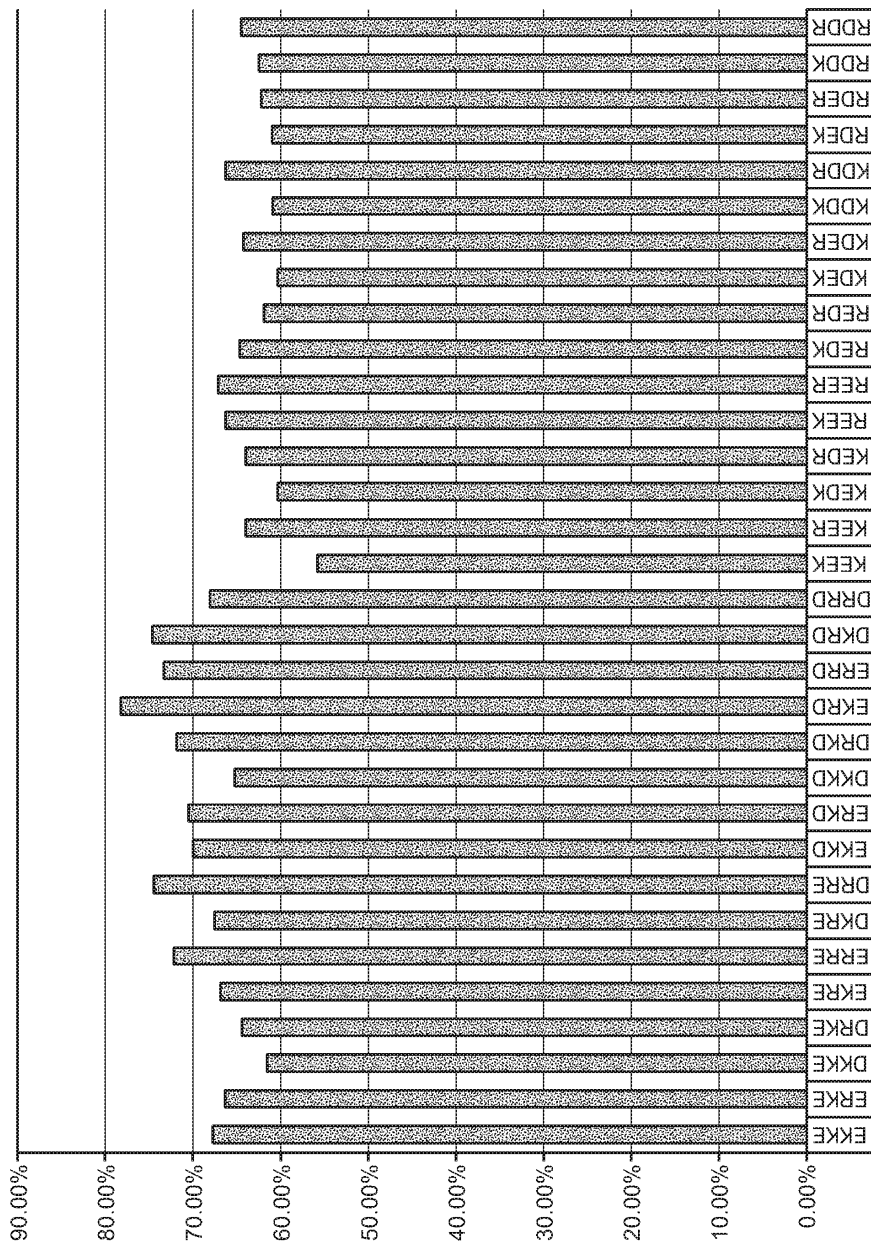
도면6



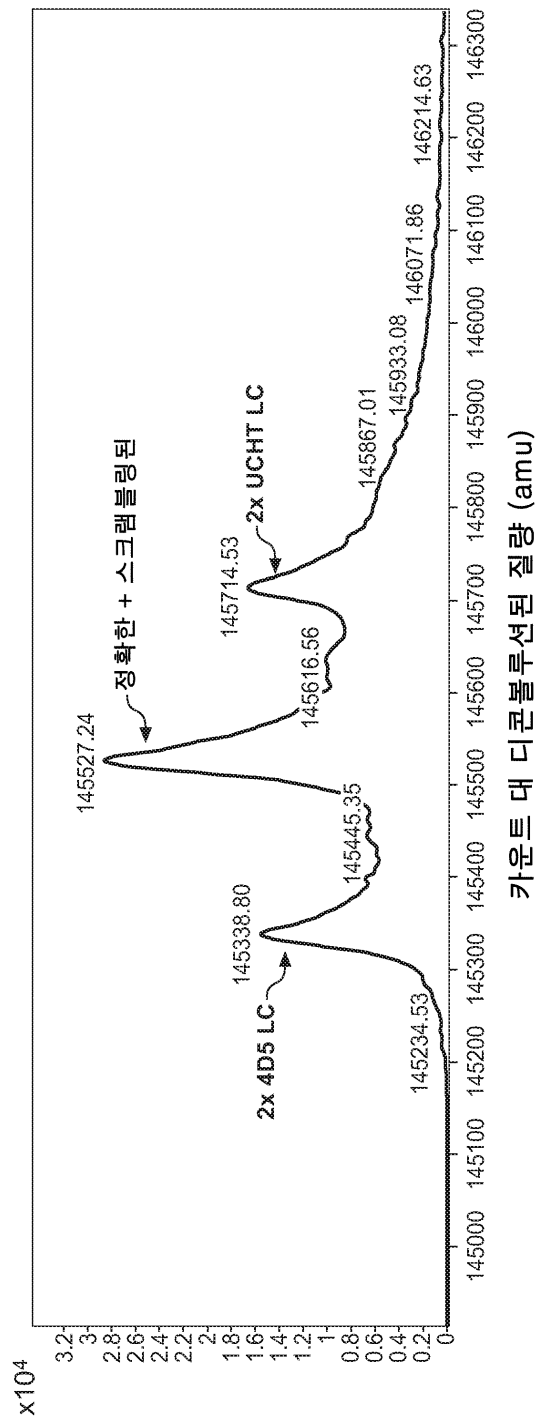
도면7



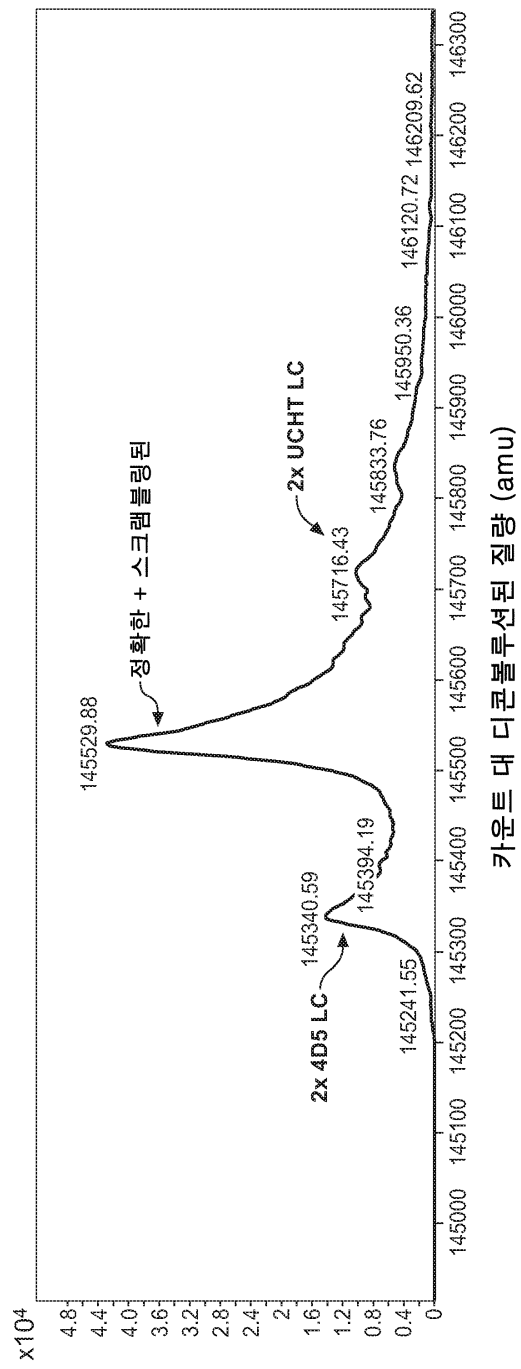
도면8



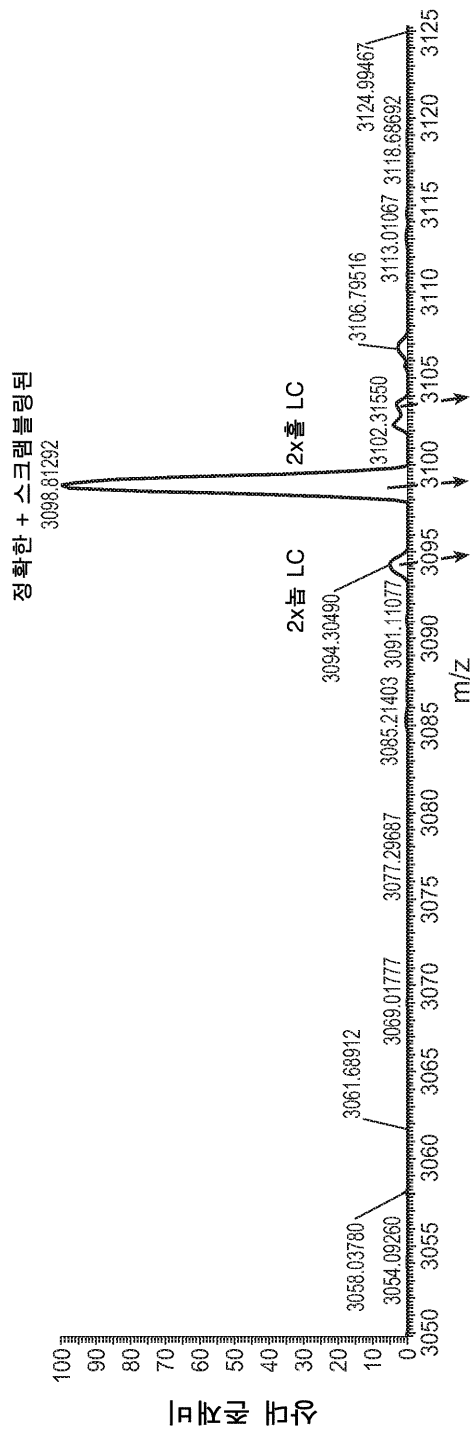
도면9a



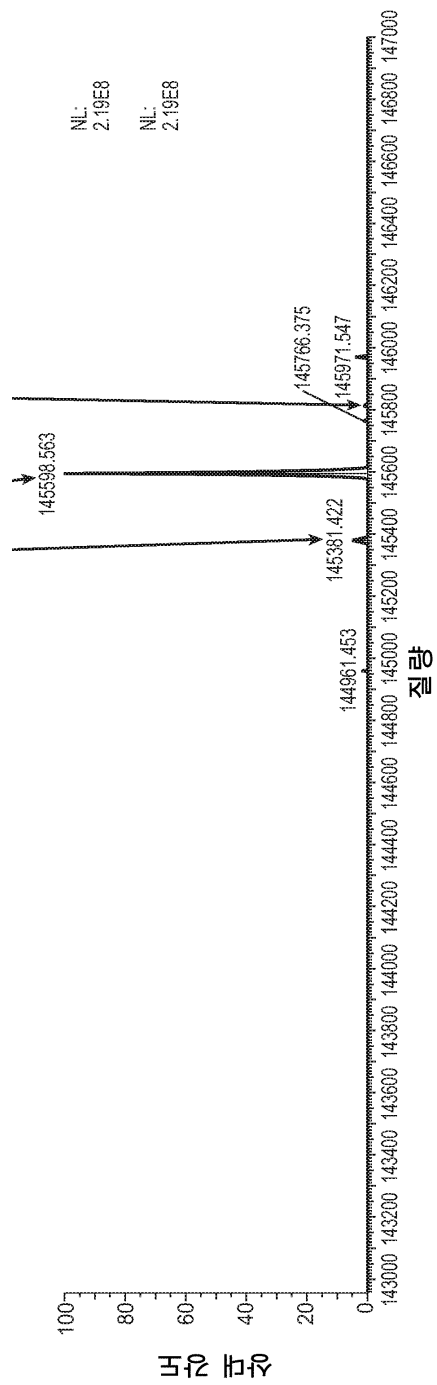
도면9b



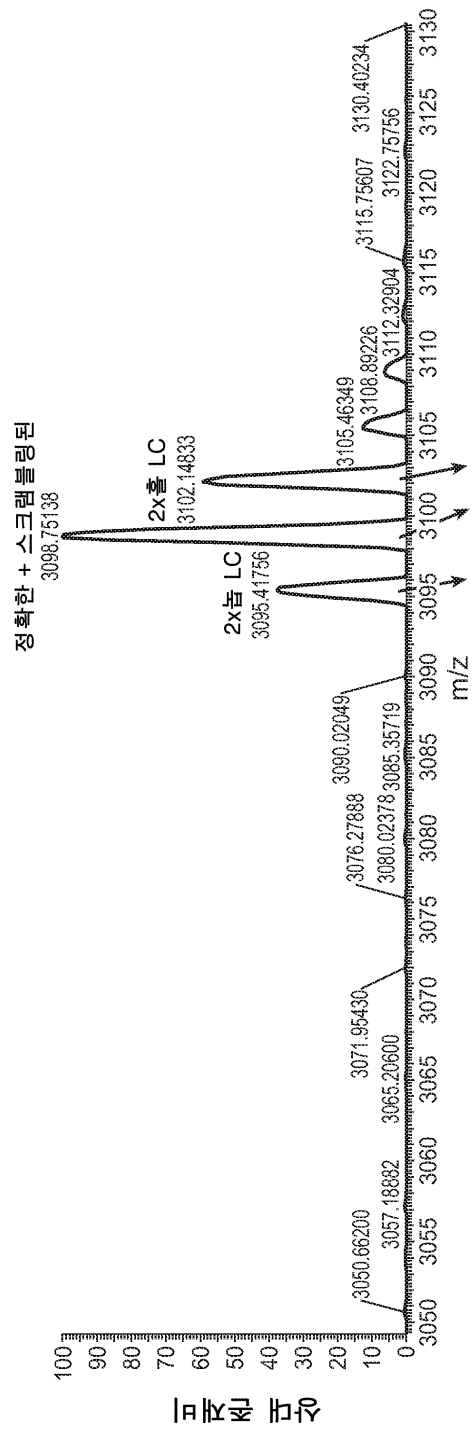
도면10a



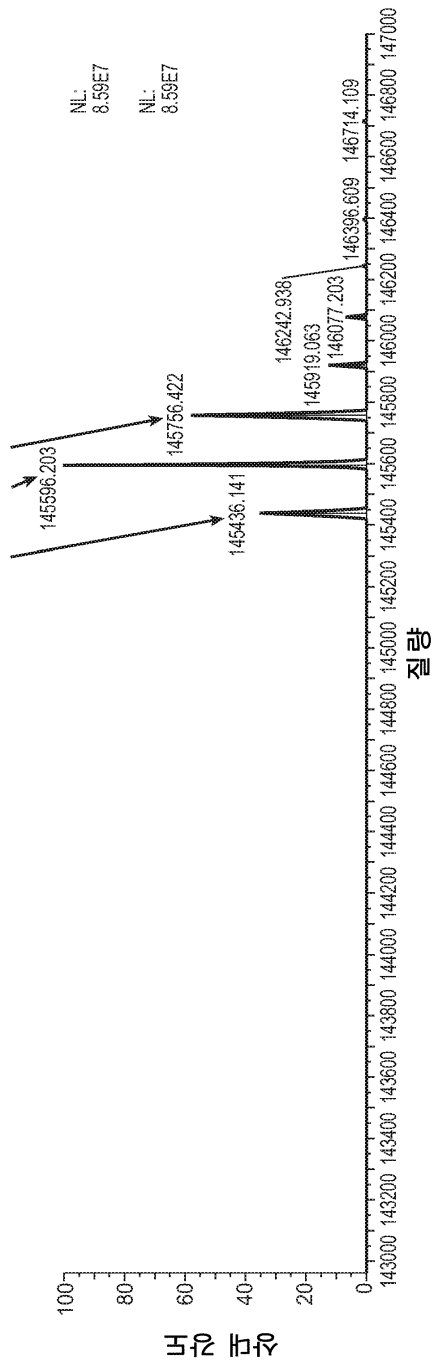
도면10b



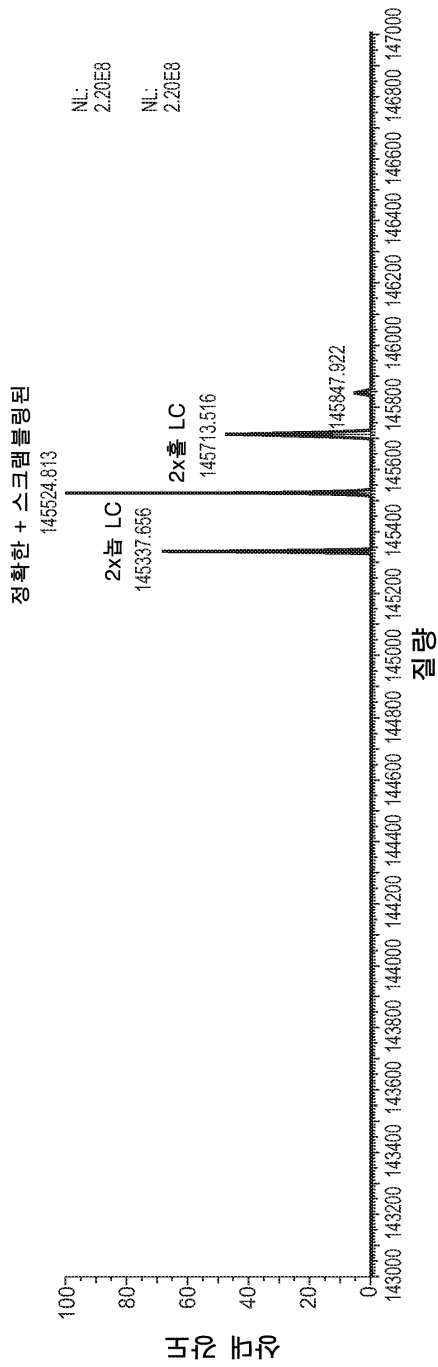
도면10c



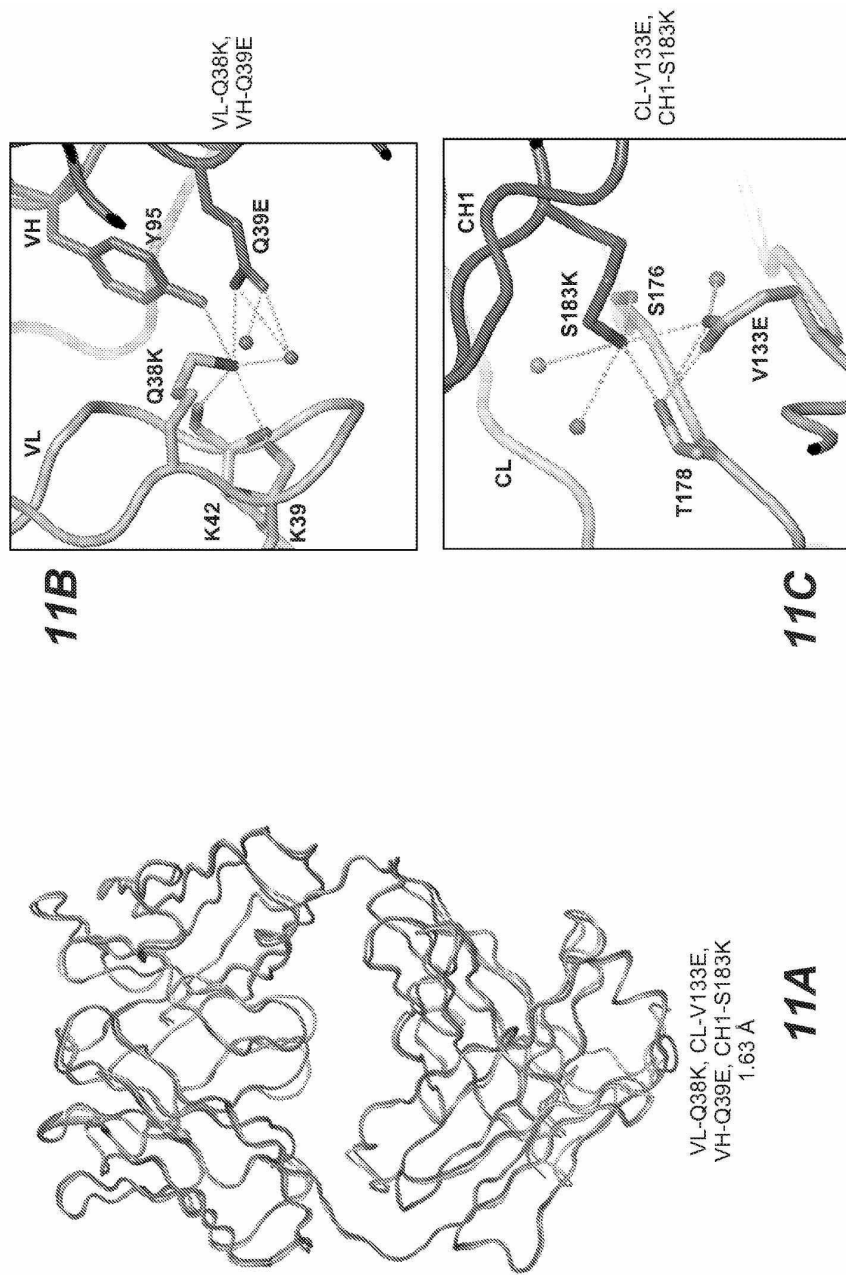
도면10d



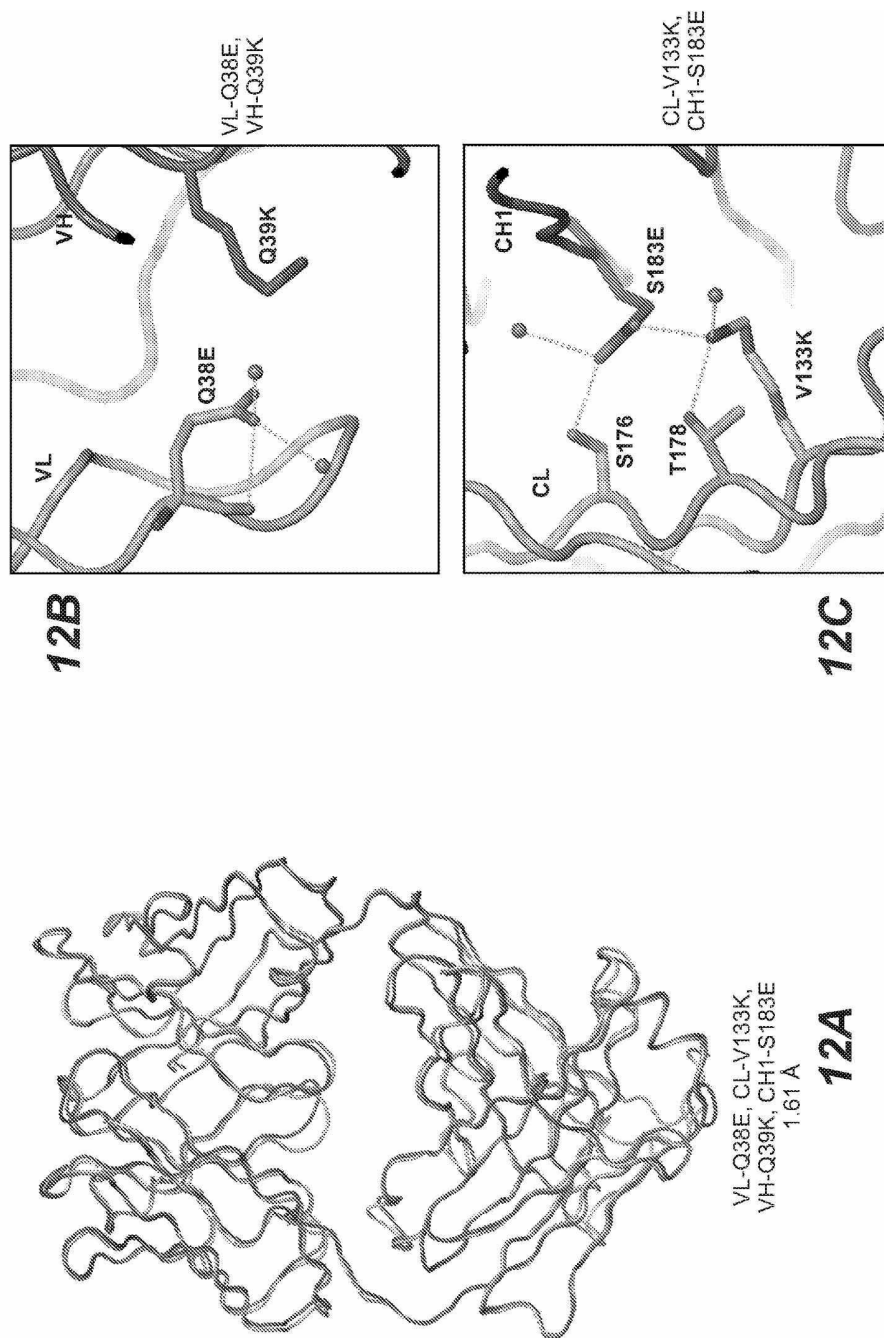
도면10e



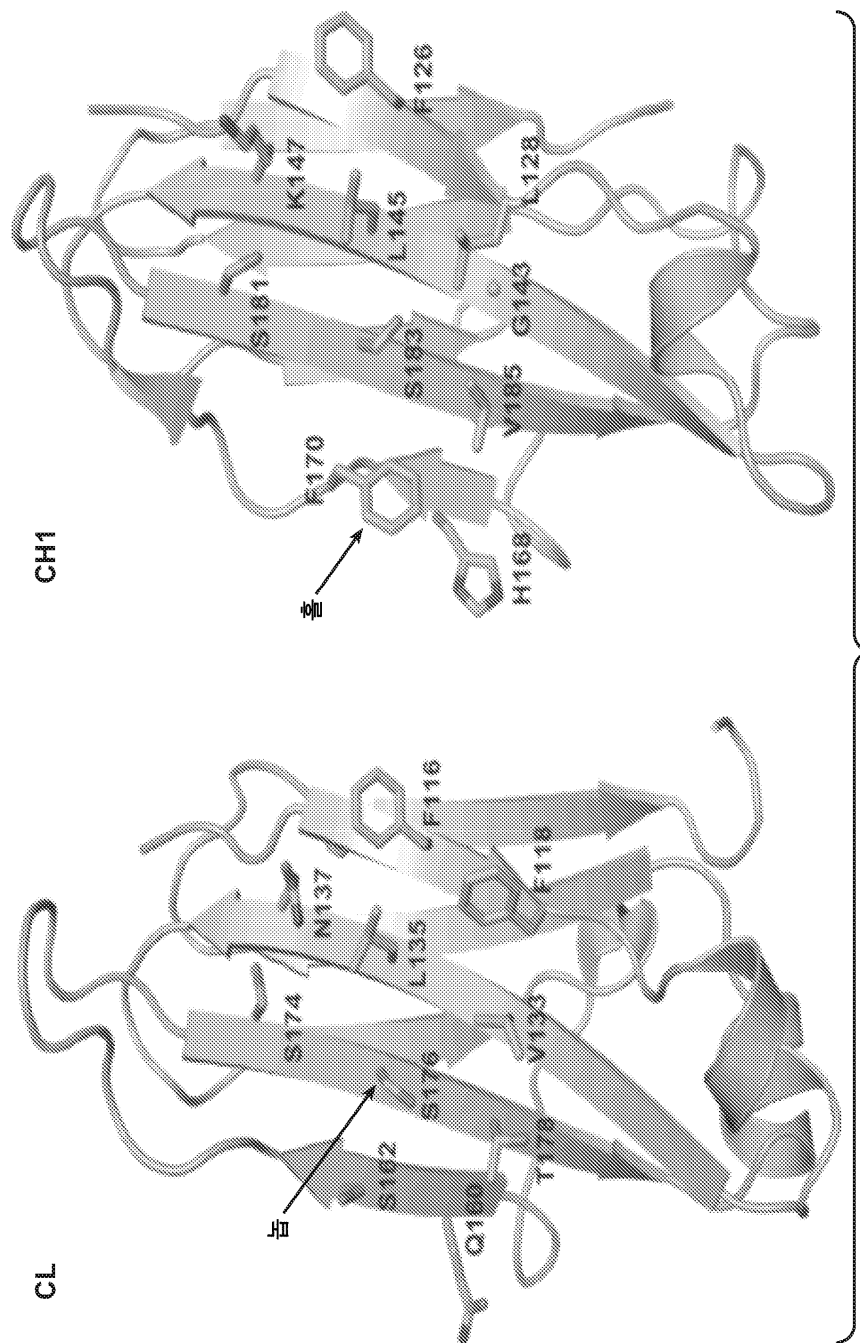
도면11



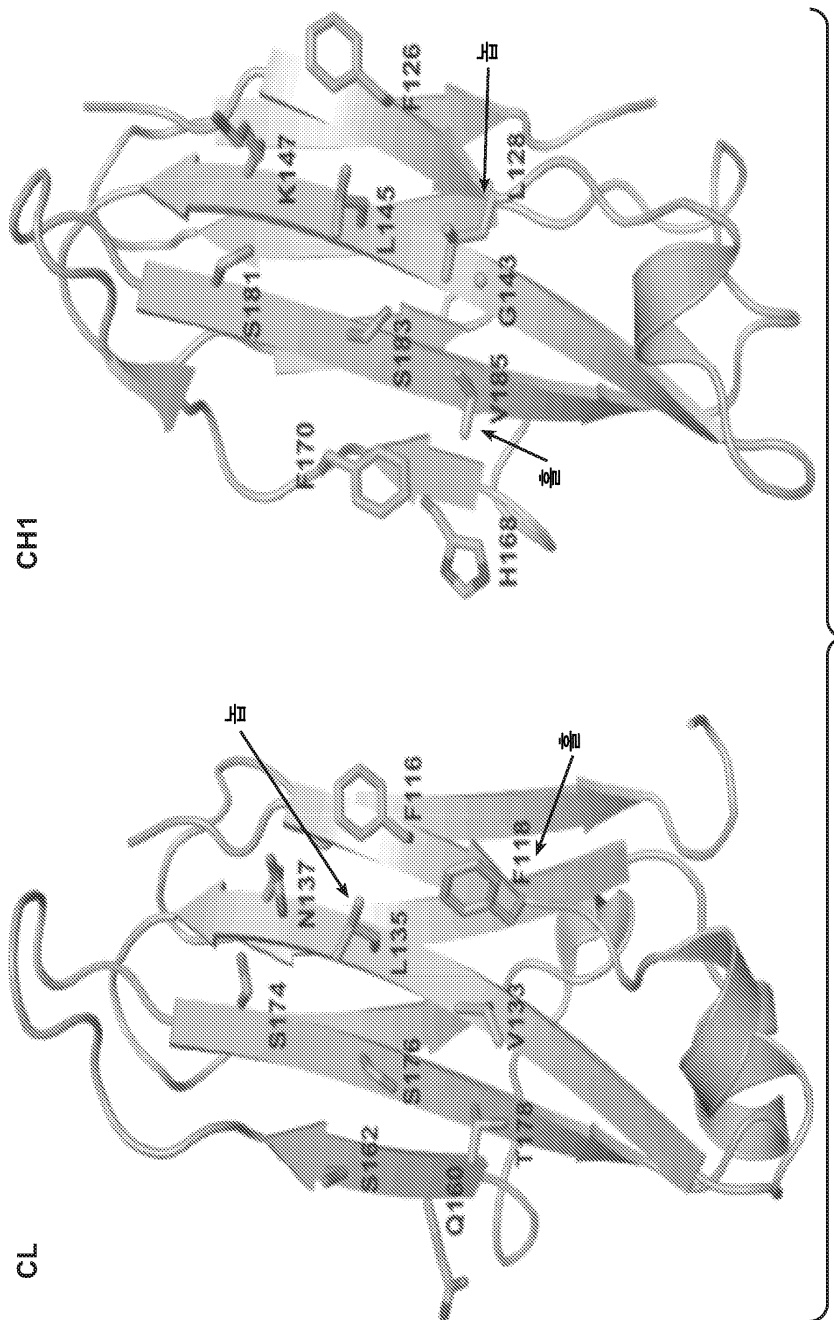
도면12



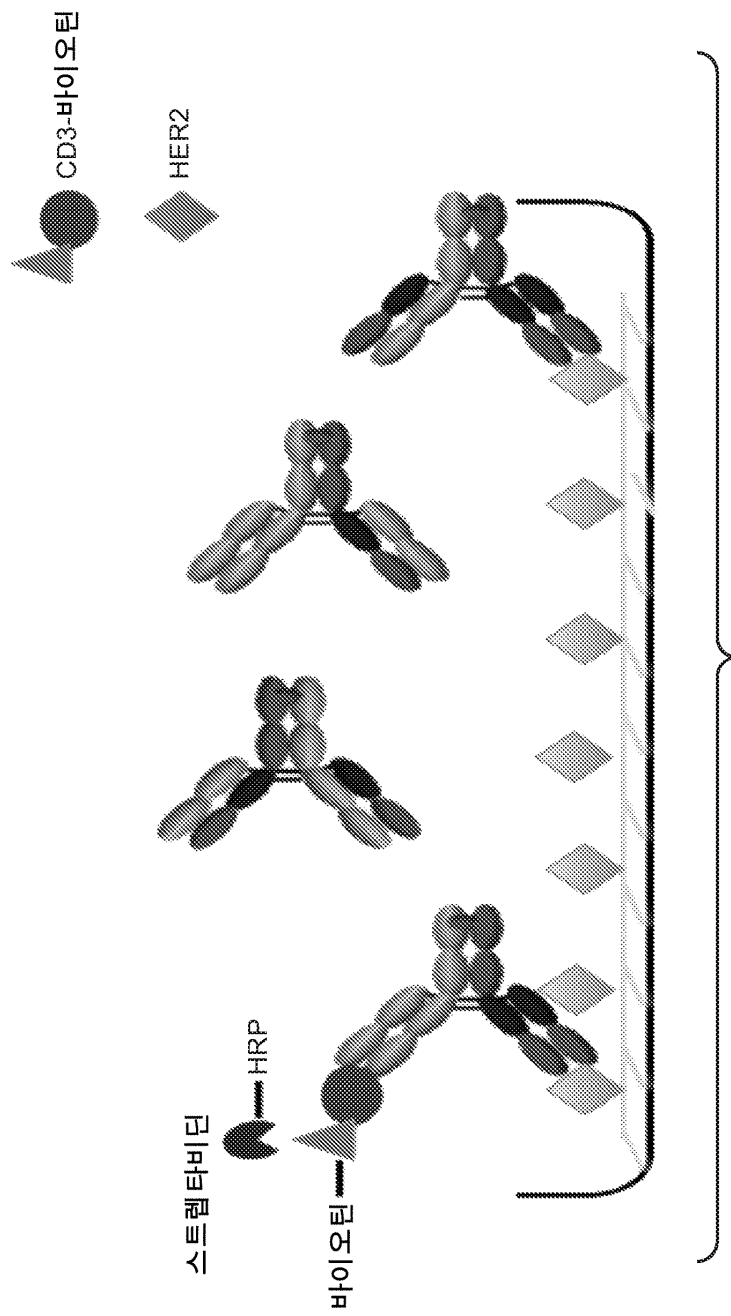
도면13a



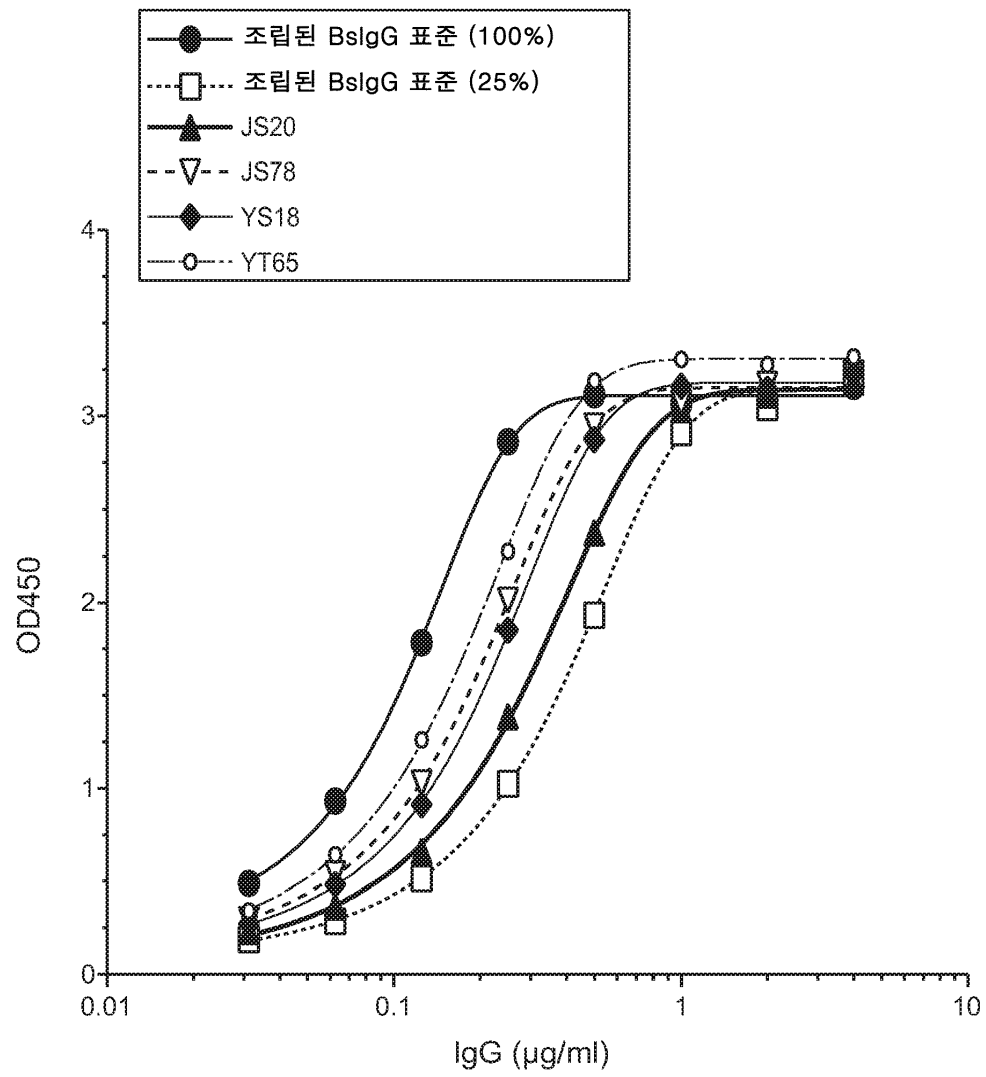
도면13b



도면14



도면15



도면16

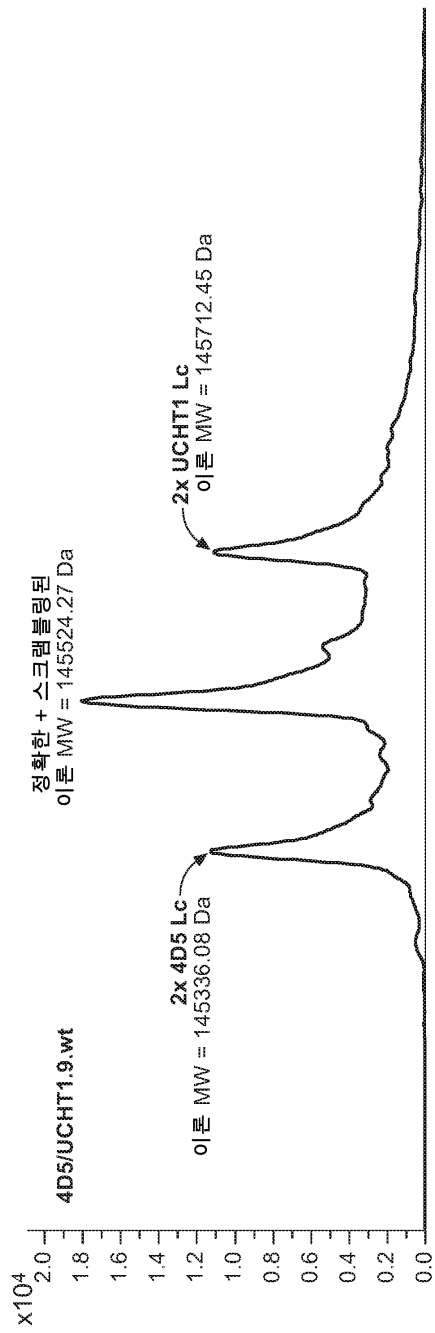
	128	141	170	183	185	
4D5wt-Hc	TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSIVSVVTPSPSSSLGHTQTYICN					
JS20	F.....	M.....	M.....	I.A.....	I.A.....	
JS78	F.....	M.....	Y.....	I.A.A.....	I.A.A.....	
JT20	F.....	T.....	M.....	T.A.L.....	T.A.L.....	
JT25	F.....	M.....	M.....	T.A.....	T.A.....	
YS8	I.....	I.....	S.....	M.V.A.....	M.V.A.....	
YS18	I.....	I.....	S.....	M.A.A.....	M.A.A.....	
YT65	I.....	I.....	S.....	M.A.A.....	M.A.A.....	
YT34	I.....	I.....	A.....	M.V.A.....	M.V.A.....	

16A

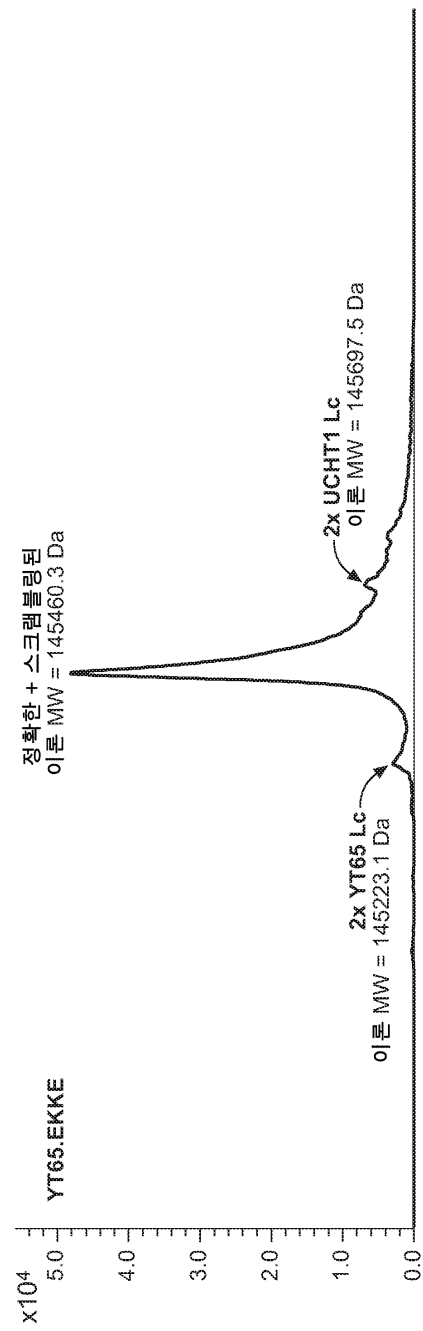
	128	138	143	153	162	172	176	178	
4D5wt-Lc	GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLL								
JS20	V.....	T.A.Y.....	T.A.Y.....	A.S.....	A.S.....	M.L.....	M.L.....	M.L.....	
JS78	V.....	T.A.F.....	T.A.F.....	A.S.....	A.S.....	A.L.....	A.L.....	A.L.....	
JT20	V.....	T.A.F.....	T.A.F.....	A.S.....	A.S.....	T.L.....	T.L.....	T.L.....	
JT25	V.....	T.A.F.....	T.A.F.....	M.S.....	M.S.....	M.L.....	M.L.....	M.L.....	
YS8	A.....	I.V.....	I.V.....	M.....	M.....	A.F.V.....	A.F.V.....	A.F.V.....	
YS18	A.....	D.V.....	D.V.....	A.....	A.....	A.F.I.....	A.F.I.....	A.F.I.....	
YT65	A.....	V.....	V.....	V.....	V.....	A.F.V.....	A.F.V.....	A.F.V.....	
YT34	A.....	V.....	V.....	M.....	M.....	A.F.V.....	A.F.V.....	A.F.V.....	

16B

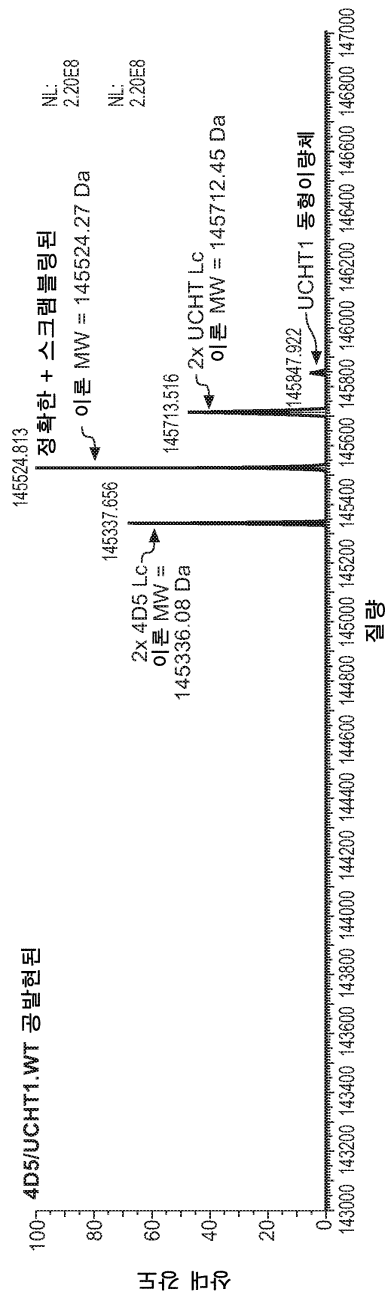
도면17a



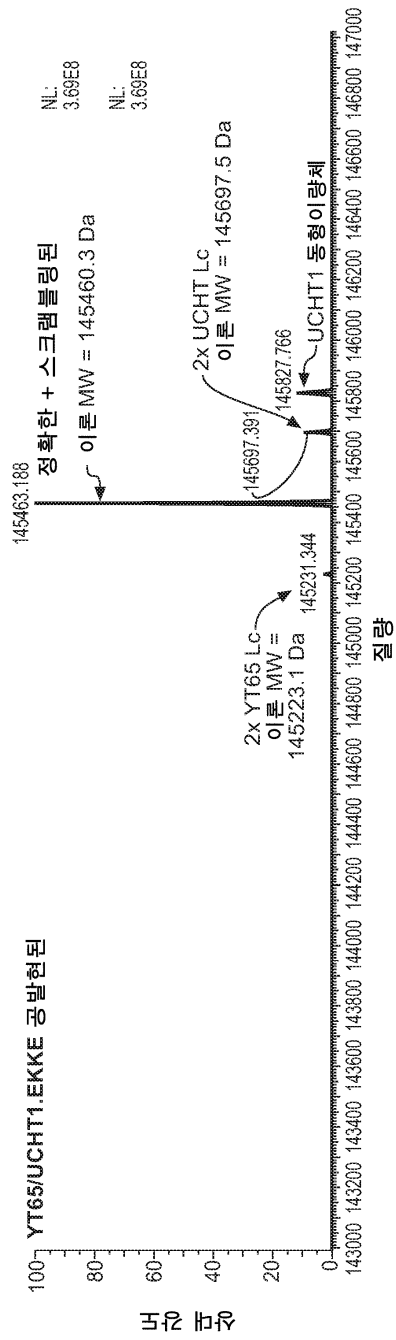
도면17b



도면18a



도면18b



도면19

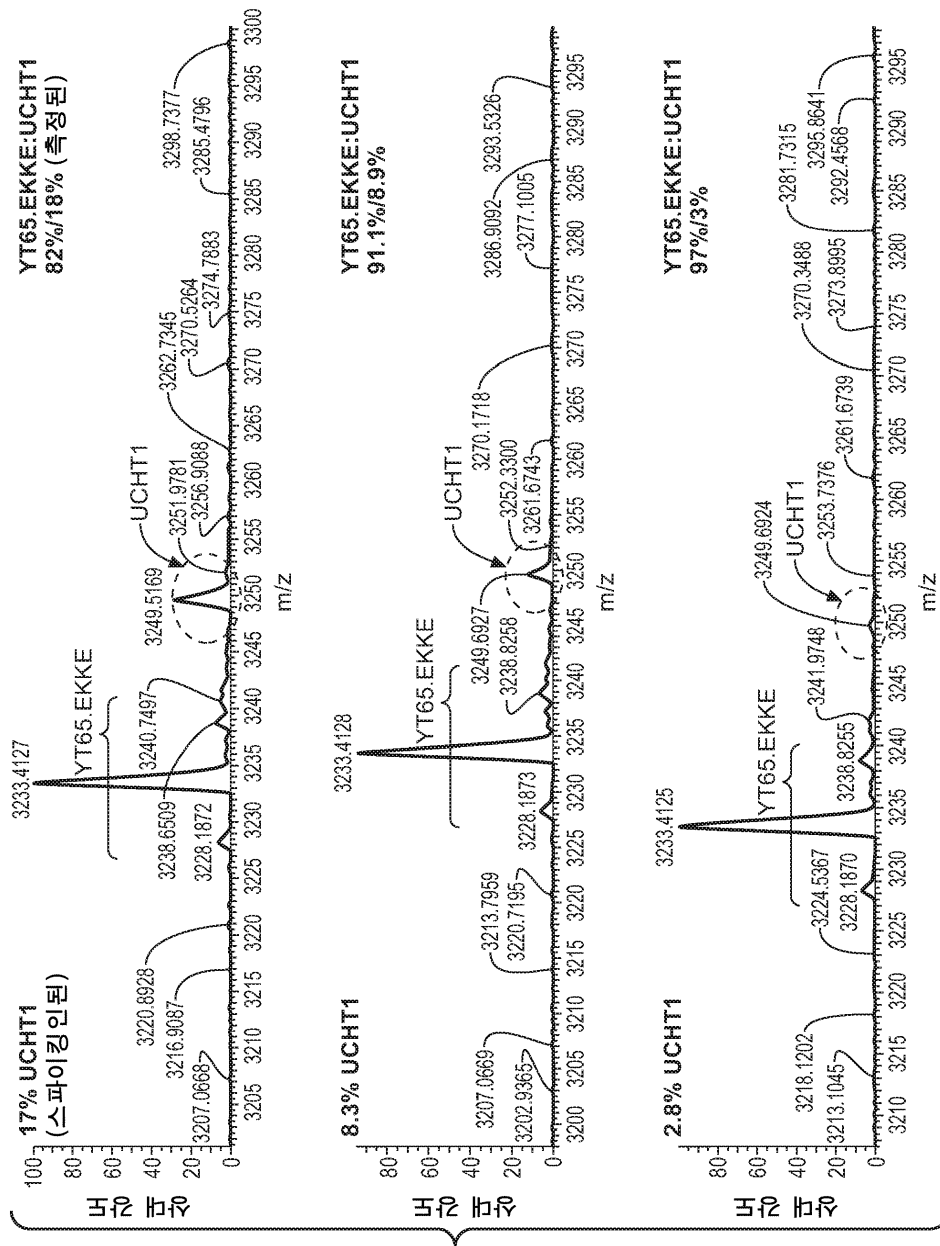
4D5wt-HC	SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSS	170	181	182	183
YT65-HC	I.....S.....M.A.A.....				
YT65-HC.1	I.....S.....M.A.A.....				
YT65-HC.2	I.....S.....A.A.....				
YT65-HC.3	I.....S.....M.A.....				
YT65-HC.4	I.....S.....M.A.....				
YT65-HC.5	I.....S.....A.A.....				
YT65-HC.6	I.....S.....M.A.....				
YT65-HC.7	I.....S.....M.A.....				
YT65-HC.8	I.....S.....A.....				
YT65-HC.9	I.....S.....A.....				
YT65-HC.10	I.....S.....M.....				
YT65-HC.11	I.....S.....A.....				
YT65-HC.12	I.....S.....S.....				
YT65-HC.13	I.....S.....S.....				

19A

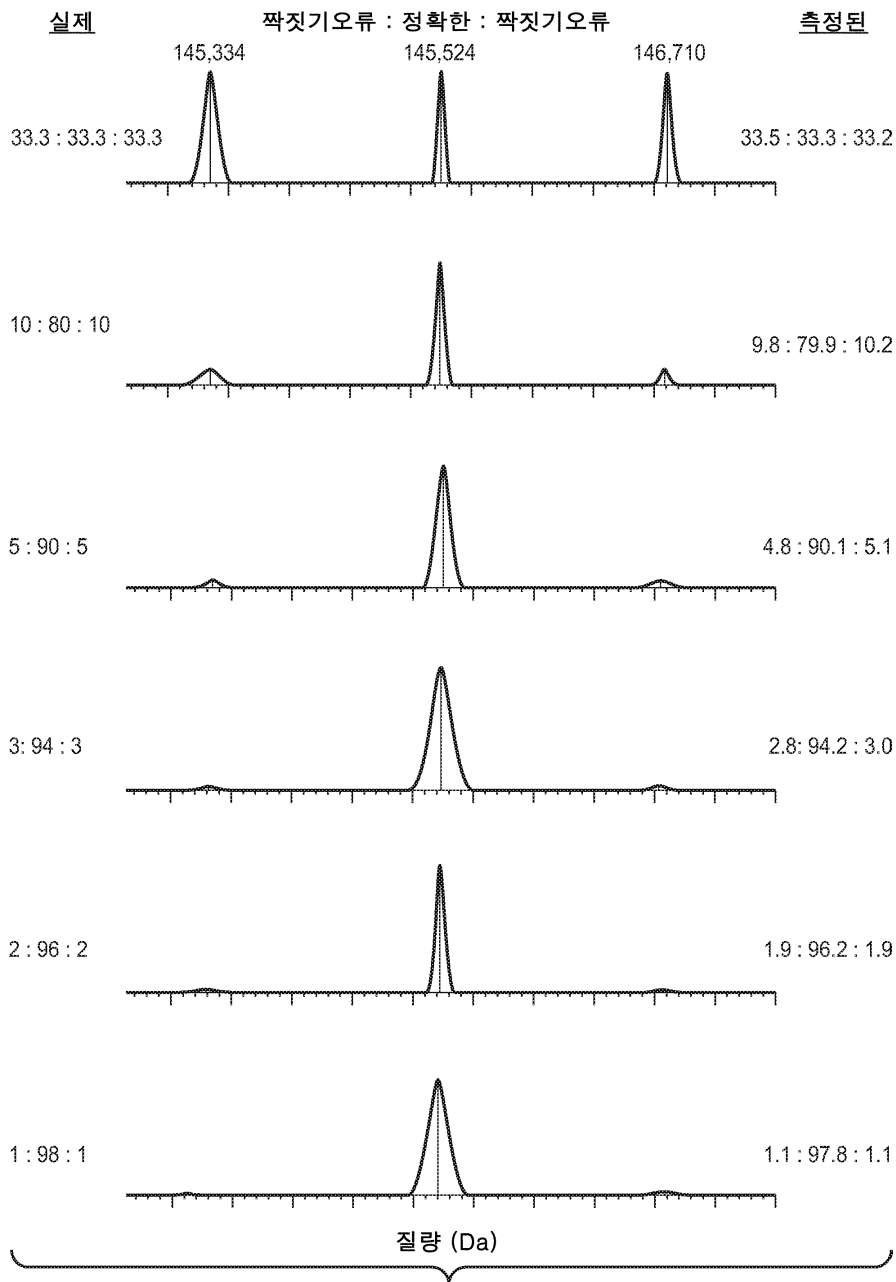
4D5wt-LC	PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSLT	162	164	174	176	178
YT65-LC	...A.....V.....A.F.V..					
YT65-LC.1	...A.....V.....A.F.V..					
YT65-LC.2	...A.....V.....A.F.V..					
YT65-LC.3	...A.....V.....F.V..					
YT65-LC.4	...A.....V.....A.F.V..					
YT65-LC.5	...A.....V.....F.V..					
YT65-LC.6	...A.....V.....F.V..					
YT65-LC.7	...A.....V.....F.V..					

19B

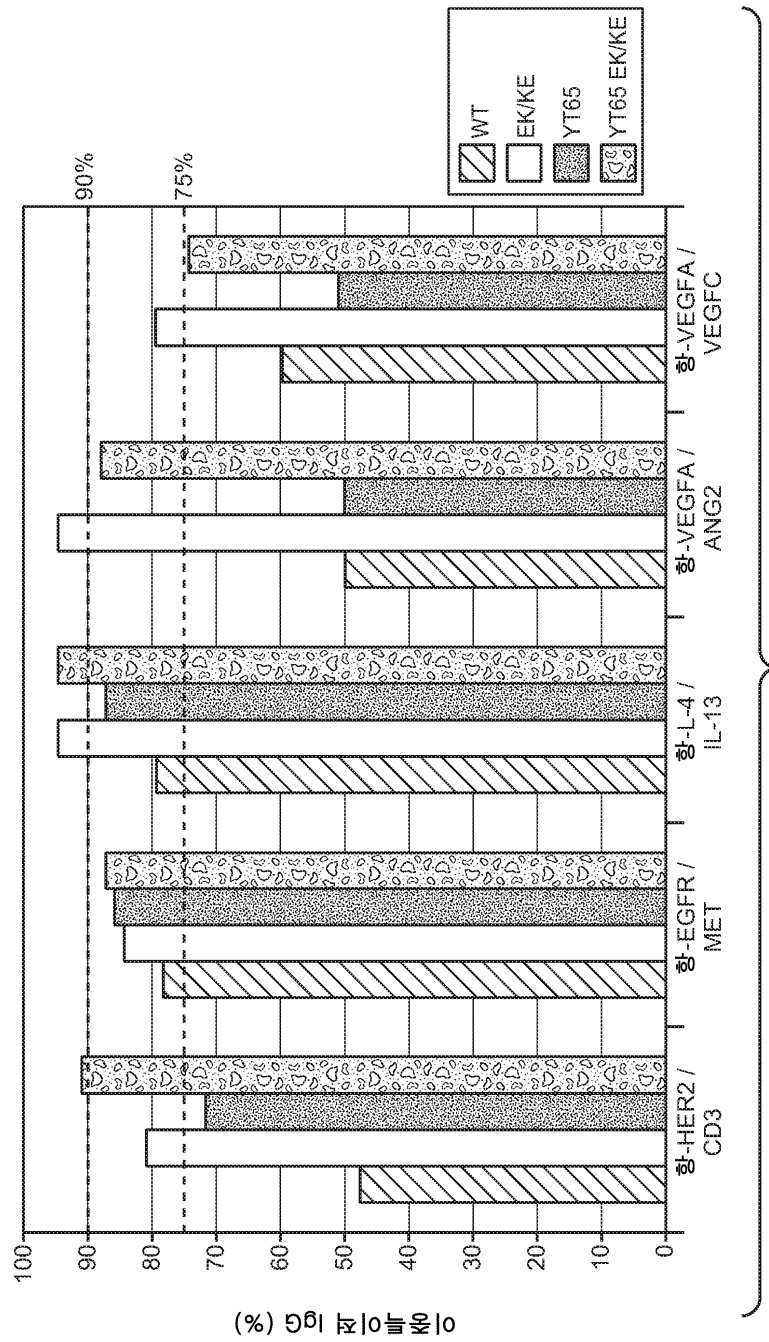
도면20a



도면20b



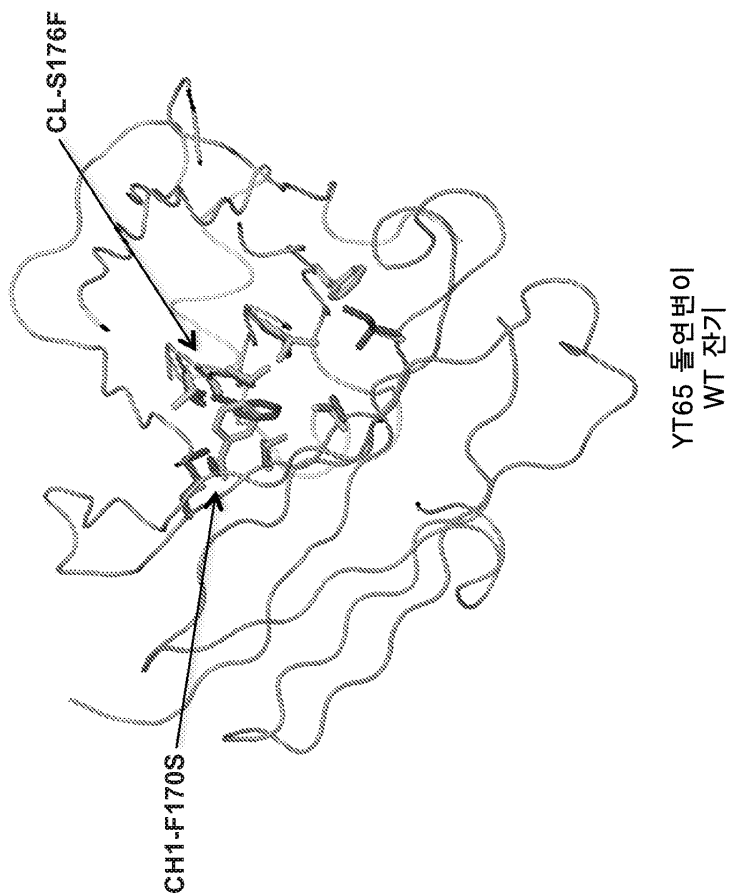
도면21



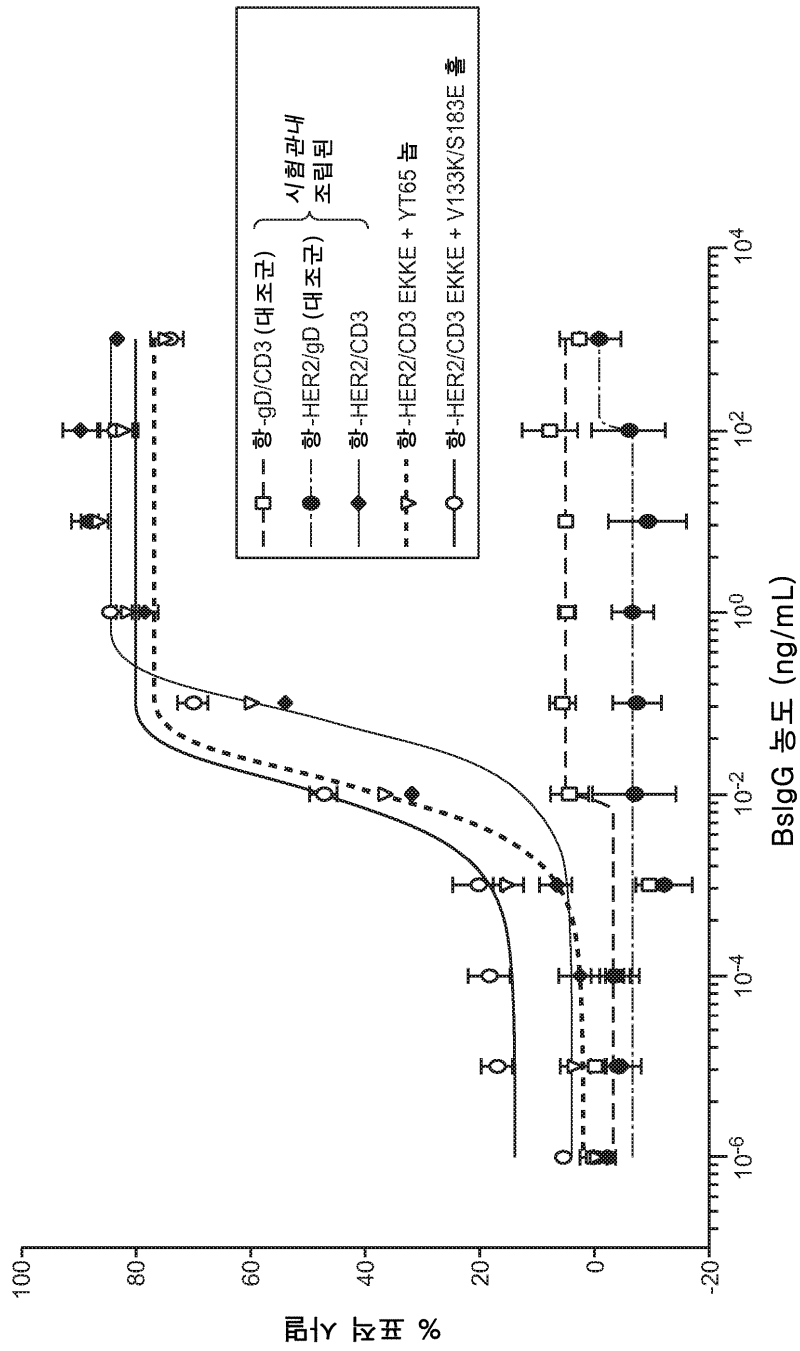
도면22a



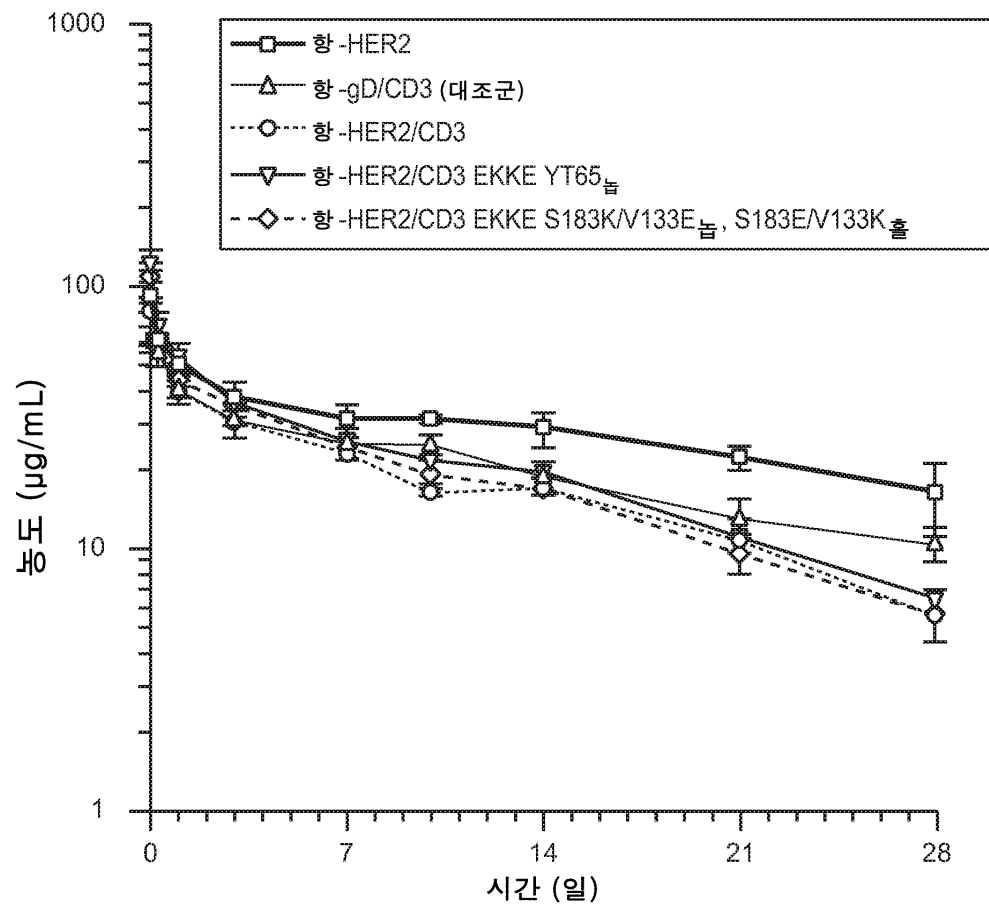
도면22b



도면23



도면24



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GENENTECH, INC. ET AL.

<120> MULTISPECIFIC ANTIGEN-BINDING PROTEINS

<130> P05841-W0

<140><141><150> 62/310,555

<151> 2016-03-18

<150> 62/264,291

<151> 2015-12-07

<150> 62/152,735

<151> 2015-04-24

<160> 131

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 1

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

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

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

<210> 2

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 2

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
20 25 30
Ser Val Ser Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
35 40 45
Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
50 55 60
Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
65 70 75 80
Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
85 90 95
Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
100 105 110
Arg Gly Glu Cys
115

<210> 3

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 3

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
1 5 10 15
Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
20 25 30
Ser Val Leu Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
35 40 45
Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
50 55 60
Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
65 70 75 80

Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
85 90 95
Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
100 105 110
Arg Gly Glu Cys
115
<210> 4

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 4

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

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

Arg Gly Glu Cys
115

<210> 5

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Arg Gly Glu Cys

115

<210> 6

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Arg Gly Glu Cys

115

<210> 7

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Val Asp Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85

90

95

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

100

105

110

Arg Gly Glu Cys

115

<210> 8

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 8

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

Cys Asn

<210> 9

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Cys Asn

<210> 10

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 10

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Cys Asn

<210> 11

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Cys Asn

<210> 12

<211> 82

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 35 40 45

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Phe
 50 55 60
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 65 70 75 80
 Cys Asn

<210> 13

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 13

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

1 5 10 15
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 20 25 30

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 35 40 45

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu His
 50 55 60

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

65 70 75 80
 Cys Asn

<210> 14

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Cys Asn

<210> 15

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 15

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Cys Asn

<210> 16

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Cys Asn

<210> 17

<211> 116

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 17

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Arg Gly Glu Cys

115

<210> 18

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 18

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Val Val Cys Val Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val

35 40 45

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

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

100 105 110
Arg Gly Glu Cys

115

<210> 19

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 19

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

Ser Val Val Cys Val Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
35 40 45

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
50 55 60

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

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
100 105 110

Arg Gly Glu Cys

115

<210> 20

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 20

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

 20 25 30
Ser Val Val Cys Val Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
 35 40 45
Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
 50 55 60
Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ala Leu Phe Ser Val
65 70 75 80
Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys

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

115

<210> 21

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 21

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
1 5 10 15

Val Ala Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
20 25 30
Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
35 40 45
Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
50 55 60
Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ala Leu Phe Ser Val
65 70 75 80

Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
85 90 95
Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
100 105 110
Arg Gly Glu Cys
115

<210> 22

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 22

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

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Arg Gly Glu Cys

115

<210> 23

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 23

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Arg Gly Glu Cys

115

<210> 24

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 24

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Arg Gly Glu Cys

115

<210> 25

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 25

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

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

Arg Gly Glu Cys
 115

<210> 26

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 26

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

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
 50 55 60

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

100 105 110

Arg Gly Glu Cys

115

<210> 27

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 27

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

Ser Val Val Cys Val Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
35 40 45

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Met
50 55 60

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

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
100 105 110

Arg Gly Glu Cys

115

<210> 28

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 28

```

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
1           5           10           15
Ser Gly Gly Thr Ala Ile Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro

           20           25           30
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
           35           40           45
His Thr Ser Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Met Leu Val
           50           55           60
Ser Ala Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
65           70           75           80
Cys Asn

```

<210> 29

<211> 82

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 29

```

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
1           5           10           15
Ser Gly Gly Thr Ala Ile Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro

           20           25           30
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val

```

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Cys Asn

<210> 30

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 31

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 31

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Cys Asn

<210> 32

<211> 82

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 32

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Cys Asn

<210> 33

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 33

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

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

65	70	75	80
Cys Asn			

<210> 34

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 34

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

1	5	10	15
Ser Gly Gly Thr Ala Ile Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro			

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Cys Asn

<210> 35

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 35

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Cys Asn

<210> 36

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 36

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Cys Asn

<210> 37

<211> 82

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 37

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
65 70 75 80
Cys Asn

<210> 38

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 38

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

1 5 10 15
Ser Gly Gly Thr Ala Ile Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
20 25 30
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
35 40 45
His Thr Ser Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
50 55 60
Ser Ala Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
65 70 75 80
Cys Asn

<210> 39

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 39

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

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

<210> 40

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 40

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 1 5 10 15
 Ser Gly Gly Thr Ala Ile Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 20 25 30
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 35 40 45
 His Thr Ser Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Met Leu Ser
 50 55 60
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 65 70 75 80
 Cys Asn

<210> 41

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 41

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
1 5 10 15
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro

 20 25 30
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 35 40 45
His Thr Ser Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 50 55 60
Ser Ala Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
65 70 75 80
Cys Asn

<210> 42

<211> 82

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 42

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

35 40 45

His Thr Ser Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 50 55 60
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 65 70 75 80
 Cys Asn

<210> 43
 <211> 82
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 43

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

1 5 10 15
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 20 25 30
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 35 40 45
 His Thr Ser Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 50 55 60
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 65 70 75 80
 Cys Asn

<210> 44
 <211> 82
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 44

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Cys Asn

<210> 45

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 45

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

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

<210> 46

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 46

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

50 55 60
 Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ala Ser Leu
 65 70 75 80
 Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
 85 90 95
 Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
 100 105 110
 Arg Gly Glu Cys
 115

<210> 47

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 47

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Arg Gly Glu Cys

115

<210> 48

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 48

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

1 5 10 15

Val Phe Ile Val Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
20 25 30

Thr Val Ala Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
35 40 45

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Met
50 55 60

Val Ser Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Met Ser Leu
65 70 75 80

Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
85 90 95

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
100 105 110

Arg Gly Glu Cys
115

<210> 49
<211> 82
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 49

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

Ser Gly Gly Thr Ala Met Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
20 25 30

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
35 40 45

His Thr Met Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ile Leu Ala
50 55 60

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
65 70 75 80

Cys Asn

<210> 50

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 50

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Cys Asn

<210> 51

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 51

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

1 5 10 15

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

20 25 30
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
35 40 45
His Thr Met Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Thr Leu Ala
50 55 60
Ser Leu Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
65 70 75 80
Cys Asn

<210> 52

<211> 82

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 52

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

His Thr Met Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Thr Leu Ala
50 55 60
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
65 70 75 80
Cys Asn

<210> 53

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 53

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

1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95
Lys Val

<210> 54

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 54

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

1 5 10 15

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105
<210> 55
<211> 450
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 55
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 Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

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

 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450
 <210> 56
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 56
 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> 57

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

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

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

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

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

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

 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

 <210> 58
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 58

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

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

290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 59

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

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

20 25 30
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 60

<211> 330

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 60

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro

115 120 125

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

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp

145 150 155 160

Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg

165 170 175

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

180 185 190

His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met

245 250 255

Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu

260 265 270

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

275 280 285

Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn

290 295 300

Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr

305 310 315 320

Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys

325 330

<210> 61

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 61

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu

65 70 75 80

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser

85 90 95

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys

100

105

<210> 62

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 62

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

1 5 10 15

Glu Glu Leu Glu Thr Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Thr Ile Thr Asp

20

25

30

Phe Tyr Pro Gly Val Val Thr Val Asp Trp Lys Val Asp Gly Thr Pro

35

40

45

Val Thr Gln Gly Met Glu Thr Thr Gln Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn

50

55

60

Lys Tyr Met Ala Ser Ser Tyr Leu Thr Leu Thr Ala Arg Ala Trp Glu

65 70 75 80

Arg His Ser Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly His Thr Val

85

90

95

Glu Lys Ser Leu Ser Arg Ala Asp Cys Ser

100

105

<210> 63

<211> 105

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 63

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

1 5 10 15

Glu Glu Leu Lys Glu Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asn

20

25

30

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

35

40

45

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

50 55 60

Phe Met Ala Ser Ser Phe Leu His Leu Thr Ser Asp Gln Trp Arg Ser

65 70 75 80

His Asn Ser Phe Thr Cys Gln Val Thr His Glu Gly Asp Thr Val Glu

85 90 95

Lys Ser Leu Ser Pro Ala Glu Cys Leu

100 105

<210> 64

<211> 105

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 64

Gly Gln Pro Lys Ser Thr Pro Thr Leu Thr Met Phe Pro Pro Ser Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

His Asn Ser Phe Thr Cys Gln Val Thr His Glu Gly Asp Thr Val Glu

85 90 95

Lys Ser Leu Ser Pro Ala Glu Cys Leu

100 105

<210> 65

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

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

245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 66

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

6xHis tag"

<400> 66

His His His His His His

1 5

<210> 67

<211> 82

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 50 55 60
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 65 70 75 80
 Cys Asn

<210> 68

<211> 81

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

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

20 25 30
 Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
 35 40 45
 Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
 50 55 60
 Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
 65 70 75 80
 Leu

<210> 69

<211> 81

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 69

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
 1 5 10 15

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

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ala
 50 55 60
 Val Ser Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Met Ser Leu
 65 70 75 80
 Leu

<210> 70

<211> 81

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 70

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

1 5 10 15
 Val Phe Ile Val Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
 20 25 30
 Thr Val Ala Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
 35 40 45
 Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ala
 50 55 60
 Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ala Ser Leu
 65 70 75 80
 Leu

<210> 71

<211> 81

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 71

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu

<210> 72

<211> 81

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 72

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Val Ser Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Met Ser Leu
65 70 75 80
Leu

<210> 73

<211> 81

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 73

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ala Leu Phe Ser Val
65 70 75 80

Leu

<210> 74

<211> 81

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 74

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Val Val Cys Val Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val

35 40 45

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

50 55 60

Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ala Leu Phe Ser Ile

65 70 75 80

Leu

<210> 75

<211> 81

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 75

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu

<210> 76

<211> 81

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 76

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu

<210> 77

<211> 62

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

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

1 5 10 15

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

<210> 78

<211> 62

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 78

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ile Leu Gly Cys Leu Val

1 5 10 15

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala

20 25 30

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

35 40 45

Leu Tyr Met Leu Ala Ser Ala Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

50 55 60

<210> 79

<211> 62

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 79

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

1 5 10 15

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala

20 25 30

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

35 40 45

Leu Tyr Met Leu Ala Ser Ala Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

50 55 60

<210> 80

<211> 62

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 80

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ile Leu Gly Cys Leu Val

1 5 10 15

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala

20 25 30

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

35 40 45

Leu Tyr Ser Leu Ala Ser Ala Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

50 55 60

<210> 81

<211> 62

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 81

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ile Leu Gly Cys Leu Val

1 5 10 15

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala

20 25 30

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

35 40 45

Leu Tyr Met Leu Ser Ser Ala Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

50 55 60

<210> 82

<211> 62

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 82

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ile Leu Gly Cys Leu Val

1 5 10 15

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala

20 25 30

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

35 40 45

Leu Tyr Met Leu Ala Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

50 55 60

<210> 83

<211> 62

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 83

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

1 5 10 15

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala

20 25 30

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

35 40 45

Leu Tyr Ser Leu Ala Ser Ala Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

50 55 60

<210> 84

<211> 62

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 84

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

1 5 10 15

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala

20 25 30

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

35 40 45

Leu Tyr Met Leu Ser Ser Ala Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

50 55 60

<210> 85

<211> 62

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 85

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

1 5 10 15

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala

20 25 30

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

35 40 45

Leu Tyr Met Leu Ala Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

50 55 60

<210> 86

<211> 62

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 86

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ile Leu Gly Cys Leu Val

1 5 10 15

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala

20 25 30

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

35 40 45

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Ala Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

50 55 60

<210> 87

<211> 62

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 87

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ile Leu Gly Cys Leu Val

1 5 10 15

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala

20 25 30

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

35 40 45

Leu Tyr Ser Leu Ala Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

50 55 60

<210> 88

<211> 62

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 88

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ile Leu Gly Cys Leu Val

1 5 10 15

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala

20 25 30

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

35 40 45

Leu Tyr Met Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

50 55 60

<210> 89

<211> 62

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 89

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

1 5 10 15

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala

20 25 30

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

35 40 45

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Ala Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

50 55 60

<210> 90

<211> 62

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 90

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ile Leu Gly Cys Leu Val

1 5 10 15

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

<210> 91

<211> 62

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 91

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

1 5 10 15

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

<210> 92

<211> 68

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Thr Leu Thr

65

<210> 93

<211> 68

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 93

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Val Leu Thr

65

<210> 94

<211> 68

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 94

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Val Leu Thr

65

<210> 95

<211> 68

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 95

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Val Leu Thr

65

<210> 96

<211> 68

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 96

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Val Leu Thr

65

<210> 97

<211> 68

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 97

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35

40

45

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

50

55

60

Ser Thr Leu Thr

65

<210> 98

<211> 68

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 98

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

Ser Val Leu Thr

65

<210> 99

<211> 68

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 99

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

50 55 60
 Ser Thr Leu Thr
 65
 <210> 100
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 100

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

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 35 40 45
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Phe
 50 55 60

Ser Thr Leu Thr
 65
 <210> 101
 <211> 82
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 101

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

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

65	70	75	80
Cys Asn			

<210> 102

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 102

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

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

65 70 75 80

Cys Asn

<210> 103

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 103

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Cys Asn

<210> 104

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 104

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

1 5 10 15

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

20 25 30
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
35 40 45
His Thr Ser Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Met Leu Ala
50 55 60
Ser Ala Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Thr
65 70 75 80
Cys Asn

<210> 105

<211> 82

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 105

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
1 5 10 15
Ser Glu Ser Thr Ala Ile Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
20 25 30
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
35 40 45
His Thr Ser Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Met Leu Ala
50 55 60
Ser Ala Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr
65 70 75 80
Cys Asn

<210> 106

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 106

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

1	5	10	15
Ser	Glu	Ser	Thr
Ala	Met	Leu	Gly
Cys	Leu	Val	Lys
Asp	Tyr	Phe	Pro
20	25	30	
Glu	Pro	Val	Thr
Val	Ser	Trp	Asn
Ser	Gly	Ala	Leu
Thr	Ser	Gly	Val
35	40	45	
His	Thr	Tyr	Pro
Ala	Val	Leu	Gln
Ser	Ser	Gly	Leu
Tyr	Ile	Leu	Ala
50	55	60	
Ser	Ala	Val	Thr
Val	Pro	Ser	Ser
Asn	Phe	Gly	Thr
Gln	Thr	Tyr	Thr
65	70	75	80
Cys	Asn		

<210> 107

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 107

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

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

His Thr Tyr Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ile Leu Ala
 50 55 60
 Ser Ala Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Thr
 65 70 75 80
 Cys Asn

<210> 108

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 108

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

Ser Ala Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr
 65 70 75 80
 Cys Asn

<210> 109

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 109

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Cys Asn

<210> 110

<211> 82

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 110

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr

65 70 75 80

Cys Asn

<210> 111

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 111

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

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

65	70	75	80
Cys Asn			

<210> 112

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 112

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

1	5	10	15
Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro			

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Cys Asn

<210> 113

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 113

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn

50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

100 105

<210> 114

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 114

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

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

<210> 115

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 115

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

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

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

<210> 116

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 116

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

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

100 105

<210> 117

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 117

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

1 5 10 15

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Trp Cys Leu Ile Ser Asp

20 25 30

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

35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn

50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

100 105

<210> 118

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 118

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

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

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

<210> 119

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 119

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

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

85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

100 105

<210> 120

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 120

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn

50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

100 105

<210> 121

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 121

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
1 5 10 15

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
35 40 45

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Glu
50 55 60

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr
65 70 75 80

Cys Asn

<210> 122

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 122

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Cys Asn

<210> 123

<211> 82

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 123

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Cys Asn

<210> 124

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 124

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
35 40 45

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr

65 70 75 80

Cys Asn

<210> 125

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 125

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
35 40 45

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Lys
50 55 60

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

65 70 75 80

Cys Asn

<210> 126

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 126

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Cys Asn

<210> 127

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 127

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn

50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Phe Ser Val Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys

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

85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

100 105

<210> 128

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 128

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

1 5 10 15

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Ala Cys Phe Ile Ser Asp

20 25 30

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

35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Ala Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn

50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ala Ser Leu Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

100 105

<210> 129

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 129

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

1 5 10 15

<210> 130

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 130

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 131

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 131

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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