(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0051674
(43) 공개일자 2025년04월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *C07K 16/32* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2809 (2013.01)
C07K 16/2803 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2025-7005834
(22) 출원일자(국제) 2023년07월21일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2025년02월21일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2023/108651
(87) 국제공개번호 WO 2024/017371
국제공개일자 2024년01월25일
(30) 우선권주장
202210915171.1 2022년07월22일 중국(CN)
202310261507.1 2023년03월17일 중국(CN)

(71) 출원인
이노벤트 바이오로직스 (쑤저우) 컴퍼니, 리미티드
중국 215123 장쑤 쑤저우 쑤저우 인더스트리얼 파크 동핑 스트리트 168
(72) 발명자
양 시아오
중국, 지앙수 215123, 수저우, 수저우 인더스트리얼 파크, 168 동핑 스트리트
이사프라스 하산
중국, 지앙수 215123, 수저우, 수저우 인더스트리얼 파크, 168 동핑 스트리트
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

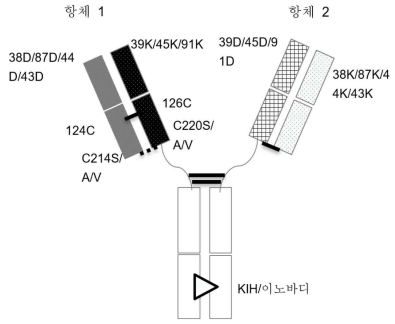
전체 청구항 수 : 총 74 항

(54) 발명의 명칭 **다중특이적 항체의 중쇄 및 경쇄의 상동성 페어링을 촉진하는 돌연변이체**

(57) 요 약

본 개시는 다중특이적 항체의 중쇄 및 경쇄의 상동성 페어링을 촉진할 수 있는 돌연변이된 아미노산 쌍을 포함하는 이중특이적 항체와 같은 다중특이적 항체에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C07K 16/2818 (2013.01)
C07K 16/2827 (2013.01)
C07K 16/2863 (2013.01)
C07K 16/2878 (2013.01)
C07K 16/2887 (2013.01)
C07K 16/32 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
(72) 발명자
가오 창수
중국, 지앙수 215123, 수저우, 수저우 인더스트리얼 파크, 168 동핑 스트리트
왕 이
중국, 지앙수 215123, 수저우, 수저우 인더스트리얼 파크, 168 동핑 스트리트

명 세 서

청구범위

청구항 1

항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 제1 항원에 특이적으로 결합하는 하나 또는 복수의 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원에 특이적으로 결합하는 하나 또는 복수의 제2 항원 결합 영역을 포함하되, 적어도 하나 또는 복수의 상기 항원 결합 영역은 중쇄 CH1 및 경쇄 CL을 포함하고, 상기 CH1-CL 계면에서 이황화 결합 재형성 돌연변이를 포함하고/하거나,

적어도 하나 또는 복수의 상기 항원 결합 영역은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 함유하되, 상기 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 계면에서의 아미노산 쌍은 상기 아미노산 쌍 상의 2개의 아미노산을 각각 반대 전하를 갖는 아미노산으로 돌연변이시키는 전하 돌연변이를 포함하며;

상기 제1 항원 및 상기 제2 항원은 동일하거나 상이할 수 있고;

바람직하게는, 하나의 항원 결합 영역만이 상기 CH1-CL 계면에서의 상기 이황화 결합 재형성 돌연변이를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 이황화 결합 재형성 돌연변이는

(i) 중쇄 CH1의 위치 126에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하고, 경쇄 CL의 위치 124에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하는 것;

(ii) 중쇄 CH1의 위치 168에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하고, 경쇄 CL의 위치 164에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하는 것;

(iii) 중쇄 CH1의 위치 170에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하고, 경쇄 CL의 위치 162 또는 164에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하는 것;

(iv) 중쇄 CH1의 위치 173에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하고, 경쇄 CL의 위치 160 또는 162에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하는 것;

(v) 중쇄 CH1의 위치 128에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하고, 경쇄 CL의 위치 118에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하는 것;

(vi) 중쇄 CH1의 위치 134에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하고, 경쇄 CL의 위치 116에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하는 것;

(vii) 중쇄 CH1의 위치 136에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하고, 경쇄 CL의 위치 114에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하는 것;

(viii) 중쇄 CH1의 위치 171에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하고, 경쇄 CL의 위치 162에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하는 것;

(ix) 중쇄 CH1의 위치 139에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하고, 경쇄 CL의 위치 116에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하는 것을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 이황화 결합 재형성 돌연변이는

(i) CH1에서의 F126C 및 CL에서의 Q124C(EU 번호);

(ii) CH1에서의 H168C 및 CL에서의 T164C(EU 번호);

(iii) CH1에서의 F170C 및 CL에서의 T164C(EU 번호);

(iv) CH1에서의 F170C 및 CL에서의 S162C(EU 번호);

(v) CH1에서의 V173C 및 CL에서의 S162C(EU 번호);

(vi) CH1에서의 V173C 및 CL에서의 Q160C(EU 번호);

(vii) CH1에서의 L128C 및 CL에서의 F118C(EU 번호);

(viii) CH1에서의 S134C 및 CL에서의 F116C(EU 번호);

(ix) CH1에서의 S136C 및 CL에서의 S114C(EU 번호);

(x) CH1에서의 P171C 및 CL에서의 S162C(EU 번호);

(xi) CH1에서의 T139C 및 CL에서의 F116C(EU 번호)를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 4

항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 제1 항원에 특이적으로 결합하는 하나 또는 복수의 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원에 특이적으로 결합하는 하나 또는 복수의 제2 항원 결합 영역을 포함하되, 적어도 하나의 상기 항원 결합 영역은 중쇄 CH1 및 경쇄 CL을 포함하며, 상기 CH1-CL 계면에서의 이황화 결합 재형성 돌연변이를 포함하되, 상기 이황화 결합 재형성 돌연변이는 CH1에서의 T139C 및 CL에서의 F116C를 포함하며, 상기 제1 항원 결합 영역 및 상기 제2 항원 결합 영역은 동일하거나 상이할 수 있는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이황화 결합 재형성 돌연변이는 또한 중쇄 불변 영역-경쇄 불변 영역 계면에서의 사슬간 Cys를 비-Cys로 치환하는 것을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 6

제5항에 있어서, 사슬간 Cys를 비-Cys로 치환하는 것은 CH1의 위치 220에서의 Cys를 비-Cys로 치환하는 것, 및 CL의 위치 214에서의 Cys를 비-Cys로 치환하는 것을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 7

제6항에 있어서, 사슬간 Cys를 비-Cys로 치환하는 것은 CH1에서의 C220S/A/V 및 CL(EU 번호)에서의 C214S/A/V를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 이황화 결합 재형성 돌연변이는

(i) CH1에서의 F126C 및 C220S 및 CL에서의 Q124C 및 C214S(EU 번호);

(ii) CH1에서의 H168C 및 C220S 및 CL에서의 T164C 및 C214S(EU 번호);

(iii) CH1에서의 F170C 및 C220S 및 CL에서의 T164C 및 C214S(EU 번호);

(iv) CH1에서의 F170C 및 C220S 및 CL에서의 S162C 및 C214S(EU 번호);

(v) CH1에서의 V173C 및 C220S 및 CL에서의 S162C 및 C214S(EU 번호);

(vi) CH1에서의 V173C 및 C220S 및 CL에서의 Q160C 및 C214S(EU 번호);

(vii) CH1에서의 L128C 및 C220S 및 CL에서의 F118C 및 C214S(EU 번호);

(viii) CH1에서의 S134C 및 C220S 및 CL에서의 F116C 및 C214S(EU 번호);

(ix) CH1에서의 S136C 및 C220S 및 CL에서의 S114C 및 C214S(EU 번호);

(x) CH1에서의 P171C 및 C220S 및 CL에서의 S162C 및 C214S(EU 번호);

CH1에서의 T139C 및 C220S 및 CL에서의 F116C 및 C214S(EU 번호)를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CH1 영역은 인간 IgG1 CH1, 예를 들어, 인간 IgG1 CH1, 인간 IgG2 CH1, 인간 IgG3 CH1, 또는 인간 IgG4 CH1이고, 예를 들어, 상기 CH1 영역은 서열번호 116에 도시된 아미노산 서열을 포함하고/하거나;

상기 CL 영역은 인간 카파 경쇄 CL 영역 또는 인간 람다 경쇄 CL 영역이고, 예를 들어, 상기 CL 영역은 서열번호 54 또는 서열번호 55의 아미노산 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서, CH1은

(i) 서열번호 129에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, F126C 및 C220S를 포함하거나; 서열번호 129에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

(ii) 서열번호 133에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, H168C 및 C220S를 포함하거나; 서열번호 133에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

(iii) 서열번호 135에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, F170C 및 C220S를 포함하거나; 서열번호 135에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

(iv) 서열번호 137에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, V173C 및 C220S를 포함하거나; 서열번호 137에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

(v) 서열번호 139에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, L128C 및 C220S를 포함하거나; 서열번호 139에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

(vi) 서열번호 141에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, S134C 및 C220S를 포함하거나; 서열번호 141에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

(vii) 서열번호 143에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, S136C 및 C220S를 포함하거나; 서열번호 143에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

(viii) 서열번호 145에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, P171C 및 C220S를 포함하거나; 서열번호 145에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

(ix) 서열번호 147에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, T139C 및 C220S를 포함하거나; 서열번호 147에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 11

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, CL은

(i) 서열번호 128에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, Q124C 및 C124S를 포함하거나; 서열번호 128에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

(ii) 서열번호 149에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, T164C 및 C124S를 포함하거나; 서열번호 149에 도시된 아미노산

서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

(iii) 서열번호 151에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, S162C 및 C124S를 포함하거나; 서열번호 151에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

(iv) 서열번호 35에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, Q160C 및 C124S를 포함하거나; 서열번호 35에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

(v) 서열번호 37에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, F118C 및 C124S를 포함하거나; 서열번호 37에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

(vii) 서열번호 98에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, F116C 및 C124S를 포함하거나; 서열번호 98에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

(viii) 서열번호 100에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, S114C 및 C124S를 포함하거나; 서열번호 100에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 계면에서 아미노산 쌍의 위치는: 상기 중쇄 가변 영역의 위치 39 및 상기 경쇄 가변 영역의 위치 38, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45 및 상기 경쇄 가변 영역의 위치 87, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45 및 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91 및 상기 경쇄 가변 영역의 위치 43, 또는 중쇄 가변 영역의 위치 91 및 경쇄 가변 영역의 위치 44(Kabat 번호)로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 제1 항원 결합 영역에서 상기 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 계면에서의 아미노산 쌍의 위치는 적어도 하나의 제2 항원 결합 영역에서의 위치와 동일한, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 영역에서 아미노산 쌍의 위치에서의 돌연변이된 아미노산은 상기 제2 항원 결합 영역에서 동일한 위치에서의 돌연변이된 아미노산과 반대 전하를 갖는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 15

제14항에 있어서,

(1) 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 39에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 38에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되며; 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 39에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 38에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되거나;

(2) 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 87에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되며; 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 87에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되거나;

(3) 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되며; 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로

치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되거나;

(4) 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 43에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되며; 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 43에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되거나;

(5) 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되며; 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 16

제15항에 있어서, 양전하를 갖는 아미노산은 K, R, 또는 H로부터 선택되고/되거나, 음전하를 갖는 아미노산은 E 또는 D로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 17

제16항에 있어서,

(vi) 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 39에서의 아미노산은 K로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 38에서의 아미노산은 D로 치환되는 반면, 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 39에서의 아미노산은 D로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 38에서의 아미노산은 K로 치환되거나;

(vii) 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 K로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 87에서의 아미노산은 D로 치환되는 반면, 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 D로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 87에서의 아미노산은 K로 치환되거나;

(viii) 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 K로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 D로 치환되는 반면, 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 D로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 K로 치환되거나;

(ix) 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 K로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 43에서의 아미노산은 D로 치환되는 반면, 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 D로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 43에서의 아미노산은 K로 치환되거나;

(x) 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 K로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 D로 치환되는 반면, 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 D로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 K로 치환되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다중특이적 항체는 전하 돌연변이 및 이황화 결합 재형성 돌연변이를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 동일한 항원에 결합하는 하나 또는 복수의 또는 모든 항원 결합 영역은 동일한 돌연변이를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 영역은 중쇄 가변 영역, 중쇄 불변 영역 CH1, 경쇄 가변 영역, 및 경쇄 불변 영역 CL을 포함하고, 상기 제2 항원 결합 영역은 중쇄 가변 영역 VH 및 경쇄 가변 영역 VL을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 21

제20항에 있어서,

1) 상기 제1 항원 결합 영역은 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 정의된 이황화 결합 재형성 돌연변이를 포함하거나;

2) 상기 제1 항원 결합 영역은 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 정의된 전하 돌연변이를 포함하거나;

3) 상기 제1 항원 결합 영역은 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 정의된 이황화 결합 재형성 돌연변이 및 전하 돌연변이를 포함하거나;

4) 상기 제1 항원 결합 영역은 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 정의된 이황화 결합 재형성 돌연변이 및 전하 돌연변이를 포함하고; 상기 제2 항원 결합 영역은 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 정의된 전하 돌연변이를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 22

제21항에 있어서,

1) 상기 제1 항원 결합 영역은 제2항 내지 제8항 중 어느 한 항에 정의된 이황화 결합 재형성 돌연변이를 포함하거나;

2) 상기 제1 항원 결합 영역은 제12항 내지 제17항 중 어느 한 항에 정의된 전하 돌연변이를 포함하거나;

3) 상기 제1 항원 결합 영역은 제2항 내지 제8항 중 어느 한 항에 정의된 이황화 결합 재형성 돌연변이를 포함하고, 제12항 내지 제17항 중 어느 한 항에 정의된 전하 돌연변이를 포함하거나;

4) 상기 제1 항원 결합 영역 및 상기 제2 항원 결합 영역은 제12항 내지 제17항 중 어느 한 항에 정의된 전하 돌연변이를 포함하고, 상기 제1 항원 결합 영역은 또한 제2항 내지 제8항 중 어느 한 항에 정의된 이황화 결합 재형성 돌연변이를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 다중특이적 항체의 제1 항원 결합 영역은 다음으로부터 선택된 돌연변이 조합을 포함하며:

	중쇄 VH 돌연변이	중쇄 CH1 돌연변이	경쇄 VL 돌연변이	경쇄 CL 돌연변이
조합 1	Q39K	F126C, C220S	Q38D	Q124C, C214S
	Q39K	H168C, C220S	Q38D	T164C, C214S
	Q39K	F170C, C220S	Q38D	T164C, C214S
	Q39K	F170C, C220S	Q38D	S162C, C214S
	Q39K	V173C, C220S	Q38D	S162C, C214S
	Q39K	V173C, C220S	Q38D	Q160C, C214S
	Q39K	L128C, C220S	Q38D	F118C, C214S
	Q39K	S134C, C220S	Q38D	F116C, C214S
	Q39K	S136C, C220S	Q38D	S114C, C214S
	Q39K	P171C, C220S	Q38D	S162C, C214S
	Q39K	T139C, C220S	Q38D	F116C, C214S
조합 2	L45K	F126C, C220S	Y87D	Q124C, C214S
	L45K	H168C, C220S	Y87D	T164C, C214S
	L45K	F170C, C220S	Y87D	T164C, C214S
	L45K	F170C, C220S	Y87D	S162C, C214S
	L45K	V173C, C220S	Y87D	S162C, C214S
	L45K	V173C, C220S	Y87D	Q160C, C214S
	L45K	L128C, C220S	Y87D	F118C, C214S
	L45K	S134C, C220S	Y87D	F116C, C214S
	L45K	S136C, C220S	Y87D	S114C, C214S
	L45K	P171C, C220S	Y87D	S162C, C214S
	L45K	T139C, C220S	Y87D	F116C, C214S
조합 3	L45K	F126C, C220S	P44D	Q124C, C214S
	L45K	H168C, C220S	P44D	T164C, C214S
	L45K	F170C, C220S	P44D	T164C, C214S
	L45K	F170C, C220S	P44D	S162C, C214S

	L45K	V173C, C220S	P44D	S162C, C214S
	L45K	V173C, C220S	P44D	Q160C, C214S
	L45K	L128C, C220S	P44D	F118C, C214S
	L45K	S134C, C220S	P44D	F116C, C214S
	L45K	S136C, C220S	P44D	S114C, C214S
	L45K	P171C, C220S	P44D	S162C, C214S
	L45K	T139C, C220S	P44D	F116C, C214S
조합 4	Y91K	F126C, C220S	A43D	Q124C, C214S
	Y91K	H168C, C220S	A43D	T164C, C214S
	Y91K	F170C, C220S	A43D	T164C, C214S
	Y91K	F170C, C220S	A43D	S162C, C214S
	Y91K	V173C, C220S	A43D	S162C, C214S
	Y91K	V173C, C220S	A43D	Q160C, C214S
	Y91K	L128C, C220S	A43D	F118C, C214S
	Y91K	S134C, C220S	A43D	F116C, C214S
	Y91K	S136C, C220S	A43D	S114C, C214S
	Y91K	P171C, C220S	A43D	S162C, C214S
	Y91K	T139C, C220S	A43D	F116C, C214S
조합 5	Y91K	F126C, C220S	P44D	Q124C, C214S
	Y91K	H168C, C220S	P44D	T164C, C214S
	Y91K	F170C, C220S	P44D	T164C, C214S
	Y91K	F170C, C220S	P44D	S162C, C214S
	Y91K	V173C, C220S	P44D	S162C, C214S
	Y91K	V173C, C220S	P44D	Q160C, C214S
	Y91K	L128C, C220S	P44D	F118C, C214S
	Y91K	S134C, C220S	P44D	F116C, C214S
	Y91K	S136C, C220S	P44D	S114C, C214S
	Y91K	P171C, C220S	P44D	S162C, C214S

	Y91K	T139C, C220S	P44D	F116C, C214S

임의로, 상기 제2 항원 결합 영역은 또한 다음으로부터 선택된 돌연변이 조합을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

	중쇄 VH 돌연변이	경쇄 VL 돌연변이
조합 1	Q39D	Q38K
조합 2	L45D	Y87K
조합 3	L45D	P44K
조합 4	Y91D	A43K
조합 5	Y91D	P44K

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 다중특이적 항체의 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원 결합 영역은 다음의 돌연변이 조합을 각각 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

	제 1 항원 결합 영역				제 2 항원 결합 영역	
	중쇄 VH 돌연변이	중쇄 CH1 돌연변이	경쇄 VL 돌연변이	경쇄 CL 돌연변이	중쇄 VH 돌연변이	경쇄 VL 돌연변이
조합 1	Q39K	F126C, C220S	Q38D	Q124C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	H168C, C220S	Q38D	T164C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	F170C, C220S	Q38D	T164C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	F170C, C220S	Q38D	S162C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	V173C, C220S	Q38D	S162C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	V173C, C220S	Q38D	Q160C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	L128C, C220S	Q38D	F118C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	S134C, C220S	Q38D	F116C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	S136C, C220S	Q38D	S114C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	P171C, C220S	Q38D	S162C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	T139C, C220S	Q38D	F116C, C214S	Q39D	Q38K
조합 2	L45K	F126C, C220S	Y87D	Q124C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	H168C, C220S	Y87D	T164C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	F170C, C220S	Y87D	T164C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	F170C, C220S	Y87D	S162C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	V173C, C220S	Y87D	S162C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	V173C, C220S	Y87D	Q160C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	L128C, C220S	Y87D	F118C, C214S	L45D	Y87K

	L45K	S134C, C220S	Y87D	F116C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	S136C, C220S	Y87D	S114C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	P171C, C220S	Y87D	S162C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	T139C, C220S	Y87D	F116C, C214S	L45D	Y87K
조합 3	L45K	F126C, C220S	P44D	Q124C, C214S	L45D	P44K
	L45K	H168C, C220S	P44D	T164C, C214S	L45D	P44K
	L45K	F170C, C220S	P44D	T164C, C214S	L45D	P44K
	L45K	F170C, C220S	P44D	S162C, C214S	L45D	P44K
	L45K	V173C, C220S	P44D	S162C, C214S	L45D	P44K
	L45K	V173C, C220S	P44D	Q160C, C214S	L45D	P44K
	L45K	L128C, C220S	P44D	F118C, C214S	L45D	P44K
	L45K	S134C, C220S	P44D	F116C, C214S	L45D	P44K
	L45K	S136C, C220S	P44D	S114C, C214S	L45D	P44K
	L45K	P171C, C220S	P44D	S162C, C214S	L45D	P44K
	L45K	T139C, C220S	P44D	F116C, C214S	L45D	P44K
조합 4	Y91K	F126C, C220S	A43D	Q124C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	H168C, C220S	A43D	T164C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	F170C, C220S	A43D	T164C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	F170C, C220S	A43D	S162C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	V173C, C220S	A43D	S162C, C214S	Y91D	A43K

	Y91K	V173C, C220S	A43D	Q160C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	L128C, C220S	A43D	F118C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	S134C, C220S	A43D	F116C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	S136C, C220S	A43D	S114C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	P171C, C220S	A43D	S162C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	T139C, C220S	A43D	F116C, C214S	Y91D	A43K
조합 5	Y91K	F126C, C220S	P44D	Q124C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	H168C, C220S	P44D	T164C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	F170C, C220S	P44D	T164C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	F170C, C220S	P44D	S162C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	V173C, C220S	P44D	S162C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	V173C, C220S	P44D	Q160C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	L128C, C220S	P44D	F118C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	S134C, C220S	P44D	F116C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	S136C, C220S	P44D	S114C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	P171C, C220S	P44D	S162C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	T139C, C220S	P44D	F116C, C214S	Y91D	P44K

청구항 25

항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 제1 항원에 특이적으로 결합하는 하나 또는 복수의 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원에 특이적으로 결합하는 하나 또는 복수의 제2 항원 결합 영역을 포함하되, 적어도 하나의 상기 항원 결합 영역은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 중쇄 가변 및 경쇄 가변 영역에서의 아미노산 쌍은 아미노산 쌍 상의 2개의 아미노산을 반대 전하를 갖는 아미노산으로 돌연변이시키는 전하 돌연변이를 각각 포함하며, 상기 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 계면에서 아미노산 쌍의 위치는: 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45 및 상기 경쇄 가변 영역의 위치 87, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45 및 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91 및 상기 경쇄 가변 영역의 위치 43, 또는 중쇄 가변 영역의 위치 91 및 경쇄 가변 영역의 위치 44(Kabat 번호)로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 적어도 하나의 제1 항원 결합 영역에서 상기 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 계면에서의 아미노산 쌍의 위치는 상기 적어도 하나의 제2 항원 결합 영역에서의 위치와 동일하며, 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원은 동일하거나 상이한, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 영역에서 아미노산 쌍의 위치에서의 돌연변이된 아미노산은 상기 제2 항원 결합 영역에서 동일한 위치에서의 돌연변이된 아미노산과 반대 전하를 갖는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 28

제27항에 있어서,

(1) 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 87에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되며; 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 87에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되거나;

(2) 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되며; 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되거나;

(3) 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 43에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되며; 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 43에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되거나;

(4) 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되며; 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 29

제28항에 있어서, 양전하를 갖는 아미노산은 K, R, 또는 H로부터 선택되고/되거나, 음전하를 갖는 아미노산은 E 또는 D로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 30

제29항에 있어서,

(v). 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 K로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 87에서의 아미노산은 D로 치환되는 반면, 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 D로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 87에서의 아미노산은 K로 치환되거나;

(vi). 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 K로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 D로 치환되는 반면, 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 D로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 K로 치환되거나;

(vii). 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 K로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 43에서의 아미노산은 D로 치환되는 반면, 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 D로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 43에서의 아미노산은 K로 치환되거나;

(viii). 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 K로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 D로 치환되는 반면, 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 D로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 K로 치환되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 영역은 동일한 돌연변이를 포함하고, 상기 제2 항원 결합 영역은 동일한 돌연변이를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 영역은 항체의 Fab 단편이고/이거나, 상기 제2 항원 결합 영역은 항체의 Fab 단편인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체의 하나 또는 복수의 또는 모든 제1 항원 결합 영역이 포함하는 경쇄 불변 영역은 카파 경쇄 불변 영역이고, 상기 하나 또는 복수의 또는 모든 제2 항원 결합 영역이 포함하는 경쇄 불변 영역은 람다 경쇄 불변 영역이거나, 상기 하나 또는 복수의 또는 모든 제1 항원 결합 영역이 포함하는 경쇄 불변 영역은 람다 경쇄 불변 영역이고, 상기 하나 또는 복수의 또는 모든 제2 항원 결합 영역이 포함하는 경쇄 불변 영역은 카파 경쇄 불변 영역인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 또한 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역을 포함하고, 상기 제1 Fc 영역 및 상기 제2 Fc 영역은 동일하거나 상이한, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 제1 Fc 영역 및 상기 제2 Fc 영역은 각각 인간 IgG Fc, 예를 들어 인간 IgG1 Fc, 인간 IgG2 Fc, 인간 IgG3 Fc, 또는 인간 IgG4 Fc이고, 예를 들어, 이는 아미노산 서열 서열번호 122 또는 123을 포함하거나 이로 구성되거나, 적어도 90%의 동일성, 예를 들어 95%, 96%, 97%, 99%, 또는 그 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 36

제34항 또는 제35항에 있어서, 상기 노브-인투-홀 기술에 기초하여, 상응하는 노브 돌연변이 및 홀 돌연변이는 상기 제1 Fc 영역 및 상기 제2 Fc 영역 내로 도입되는, 다중특이적 항체.

청구항 37

제36항에 있어서,

a) 하나의 Fc 영역의 폴리펩티드는 돌연변이 T366W를 포함하는 반면, 다른 Fc 영역의 폴리펩티드는 T366S, L368A, 및 Y407V(EU 인덱스에 기초하여 넘버링됨)를 포함하거나,

b) 하나의 Fc 영역은 아미노산 치환 S354C 및 T366W를 포함하고, 다른 Fc 영역은 아미노산 치환 Y349C, T366S, L368A, 및 Y407V(EU 인덱스에 기초하여 넘버링됨)를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 38

제36항에 있어서,

a) 하나의 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 125에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 반면, 다른 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 124에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

b) 하나의 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 125에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 반면, 다른 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 124에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나;

c) 하나의 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 125에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고 돌연변이 S354C 및 T366W를 포함하는 반면, 다른 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 124에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고 돌연변이 Y349C, T366S, L368A, 및 Y407V를 포함하거나;

d) 하나의 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 20 또는 131에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 반면, 다른 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 101 또는 130에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되

거나;

e) 하나의 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 20 또는 131에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 반면, 다른 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 101 또는 130에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나;

f) 하나의 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 20 또는 131에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고 돌연변이 T366W를 포함하는 반면, 다른 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 101 또는 130에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고 T366S, L368A, 및 Y407V를 포함하는, 다중특이적 항체.

청구항 39

제34항 또는 제35항에 있어서, 돌연변이는 상기 제1 Fc 영역 및 상기 제2 Fc 영역의 이종이량체화를 촉진하기 위한 이노바디 기술에 기초하여 상기 제1 Fc 영역 및 상기 제2 Fc 영역에 도입되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 40

제39항에 있어서, 하나의 Fc 영역의 CH3은 S364R 및 D399K 돌연변이를 포함하고, 다른 Fc 영역의 CH3 돌연변이는 Y349T, K370S, 및 K409D 돌연변이를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 41

제40항에 있어서,

a) 하나의 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 126에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 반면, 다른 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 127에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

b) 하나의 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 126에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 반면, 다른 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 127에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나;

c) 하나의 Fc 영역은 서열번호 126에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고 돌연변이 S364R 및 D399K를 포함하는 반면, 다른 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 127에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고 돌연변이 Y349T, K370S, 및 K409D를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 42

제34항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 및/또는 제2 Fc 영역은 L234A/L235A 돌연변이를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 43

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 결합된 항원은 하나 또는 복수의: CD3, BCMA, CD20, Her2, Her3, B7H3, EGFR, Hel, cMET, Ax1, GPRC5D, PD-1, PD-L1, CD47과 같은 면역 관문 분자, 4-1BB, CD40, 및 OX40과 같은 면역 활성화 분자로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 44

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 및 제2 항원은 상이하고 상기 항체는 이중특이적 항체인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 45

제44항에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 다음: CD3/BCMA, CD3/CD20, CD3/Her2, Her2/Her3, B7H3/EGFR, PD-L1/CD47, PD-L1/CD40, PD-L1/4-1BB, EGFR/Her3, Her2/Hel, Her2/PD-1, Her2/PD-L1, Her2/CD47, Her2/cMet, 또

는 CD3/GPRC5D로부터 선택된 2개의 항원에 결합하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 46

제44항 또는 제45항에 있어서, 본 개시의 이중특이적 항체는 제1 항원에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 영역을 포함하되, 상기 제1 항원 결합 영역은 제1 Fab를 포함하며, 상기 제2 항원 결합 영역은 제2 Fab를 포함하고, 상기 제1 Fab는 (링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 상기 제1 Fc 영역의 N-말단에 연결되고, 상기 제2 Fab는 (링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 상기 제2 Fc 영역의 N-말단에 연결되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 도 1에 도시된 구성을 갖는 IgG 유사 항체인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 48

제46항 또는 제47항에 있어서, 다음을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

중쇄 1: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제1 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1-제1 Fc 영역을 포함하거나 이로 구성되되, 상기 중쇄 불변 영역 CH1은 링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이 이의 C-말단에서 상기 제1 Fc 영역의 N-말단에 연결됨;

경쇄 1: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제1 Fab 경쇄 가변 영역-경쇄 불변 영역을 포함하거나 이로 구성됨;

중쇄 2: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제2 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1-제2 Fc 영역을 포함하거나 이로 구성되되, 상기 중쇄 불변 영역 CH1은 링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이 이의 C-말단에서 상기 제2 Fc 영역의 N-말단에 연결됨;

경쇄 2: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제2 Fab 경쇄 가변 영역-경쇄 불변 영역을 포함하거나 이로 구성됨.

청구항 49

제48항에 있어서,

(1) 상기 제1 항원 결합 영역은 Her2에 특이적으로 결합하며, 중쇄 1 및 경쇄 1은 다음의 서열번호에 도시된 아미노산 서열을 각각 포함하거나, 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 다음의 서열번호에 도시된 서열로 구성되거나

i) 서열번호 43 및 서열번호 45;

ii) 서열번호 48 및 서열번호 49;

iii) 서열번호 21 및 서열번호 22;

iv) 서열번호 25 및 서열번호 26;

v) 서열번호 25 및 서열번호 29;

vi) 서열번호 31 및 서열번호 32; 또는

vii) 서열번호 31 및 서열번호 29;

및/또는

(2) 상기 제2 항원 결합 영역은 Hel에 특이적으로 결합하고, 중쇄 2 및 경쇄 2는 다음의 서열번호를 각각 포함하거나, 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 다음의 서열번호에 도시된 서열로 구성되거나

i) 서열번호 41 및 서열번호 42;

ii) 서열번호 23 및 서열번호 24;

iii) 서열번호 27 및 서열번호 28;

iv) 서열번호 27 및 서열번호 30;

v) 서열번호 33 및 서열번호 34; 또는

vi) 서열번호 33 및 서열번호 30;

(2)-1 상기 제2 항원 결합 영역은 PD-1에 특이적으로 결합하고, 중쇄 2 및 경쇄 2는 다음의 서열번호를 각각 포함하거나; 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 다음의 서열번호 46 및 서열번호 47에 도시된 서열로 구성되거나;

(2)-2 상기 제2 항원 결합 영역은 CD47에 특이적으로 결합하고, 중쇄 2 및 경쇄 2는 다음의 서열번호를 각각 포함하거나; 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 다음의 서열번호 50 및 서열번호 51에 도시된 서열로 구성되거나;

(3)-2 상기 제2 항원 결합 영역은 cMet에 특이적으로 결합하고, 중쇄 2 및 경쇄 2는 다음의 서열번호를 각각 포함하거나; 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 다음의 서열번호 52 및 서열번호 53에 도시된 서열로 구성되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 50

제44항 또는 제45항에 있어서, 상기 이중특이적 항원은 제1 항원에 특이적으로 결합하는 1개의 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원에 특이적으로 결합하는 2개의 제2 항원 결합 영역을 포함하되, 상기 제1 항원 결합 영역은 제1 Fab를 포함하며, 상기 제2 항원 결합 영역은 제2 Fab를 포함하고, 1개의 제2 Fab는 (링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 상기 제1 Fc 영역의 N-말단에 연결되고, 1개의 제1 Fab는 (링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 상기 제2 Fc 영역의 N-말단에 연결되고, 다른 제2 Fab는 (링커를 통해 또는 링커 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 상기 제1 Fab 중쇄 가변 영역의 N-말단에 연결되는, 다중특이적 항체.

청구항 51

제50항에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 도 5a에 도시된 구성을 갖는 2+1N-말단 구성을 갖는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 52

제51항에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 다음을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

중쇄 1: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제2 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1-상기 제1 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1-제2 Fc 영역을 포함하거나 이로 구성되되, 상기 제1 Fab 중쇄 불변 영역 CH1은 링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이 이의 C-말단에서 상기 제2 Fc 영역의 N-말단에 연결되고, 상기 제2 Fab는 (링커를 통해 또는 링커 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 상기 제1 Fab 중쇄 가변 영역의 N-말단에 연결됨;

경쇄 1: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제1 Fab 경쇄 가변 영역-경쇄 불변 영역을 포함하거나 이로 구성됨;

중쇄 2: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제2 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1-제1 Fc 영역을 포함하거나 이로 구성되되, 상기 중쇄 불변 영역 CH1은 링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이 이의 C-말단에서 상기 제1 Fc 영역의 N-말단에 연결됨;

경쇄 2: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제2 Fab 경쇄 가변 영역-경쇄 불변 영역을 포함하거나 이로 구성되며,

상기 이중특이적 항체는 2개의 경쇄 2를 포함함.

청구항 53

제52항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 영역은 CD3에 결합하고, 상기 제2 항원 결합 영역은 GPRC5D에 결합하되, 예를 들어,

1) 중쇄 1은 서열번호 58에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 58에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

경쇄 1은 서열번호 59에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 59에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

중쇄 2는 서열번호 57에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 57에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

경쇄 2는 서열번호 56에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 56에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

2) 중쇄 1은 서열번호 62에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 62에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

경쇄 1은 서열번호 63에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 63에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

중쇄 2는 서열번호 61에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 61에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

경쇄 2는 서열번호 60에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 60에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 54

제44항 또는 제45항에 있어서, 본 개시의 이중특이적 항체는 제1 항원에 특이적으로 결합하는 1개의 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원에 특이적으로 결합하는 2개의 제2 항원 결합 영역을 포함하되, 상기 제1 항원 결합 영역은 1개의 제1 Fab를 포함하고, 상기 제2 항원 결합 영역은 1개의 제2 Fab를 포함하며, 상기 2개의 제2 Fab는 (링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 상기 제1 Fc 영역의 N-말단 및 상기 제2 Fc 영역의 N-말단에 각각 연결되고, 상기 제1 Fab 중쇄 가변 영역의 N-말단은 (링커를 통해 또는 링커 없이) 상기 제2 Fc 영역의 C-말단에 연결되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 55

제54항에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 도 5b에 도시된 구성을 갖는 2+1C-말단 구성을 갖는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 56

제55항에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 다음을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

중쇄 1: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제2 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1-제2 Fc 영역-상기 제1 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1을 포함하거나 이로 구성되되, 상기 제2 Fab는 (링커를 통해 또는 링커 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 상기 제2 Fc 영역의 N-말단에 연결되고, 상기 제1 Fab 중쇄 가변 영역의 N-말단은 (링커를 통해 또는 링커 없이) 상기 제2 Fc 영역의 C-말단에 연결됨;

경쇄 1: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제1 Fab 경쇄 가변 영역-경쇄 불변 영역을 포함하거나 이로 구성됨;

중쇄 2: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제2 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1-제1 Fc 영역을 포함하거나 이로 구성되되, 상기 중쇄 불변 영역 CH1은 링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이 이의 C-말단에서 상기 제1 Fc 영역의 N-말단에 연결됨;

경쇄 2: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제2 Fab 경쇄 가변 영역-경쇄 불변 영역을 포함하거나 이로 구성되며,

상기 이중특이적 항체는 2개의 경쇄 2를 포함함.

청구항 57

제56항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 영역은 CD3에 결합하고, 상기 제2 항원 결합 영역은 GPRC5D에 결합하되, 예를 들어,

1) 중쇄 1은 서열번호 64에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 64에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

경쇄 1은 서열번호 59에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 59에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

중쇄 2는 서열번호 57에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 57에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

경쇄 2는 서열번호 56에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 56에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

2) 중쇄 1은 서열번호 65에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 65에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

경쇄 1은 서열번호 63에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 63에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

중쇄 2는 서열번호 61에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 61에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

경쇄 2는 서열번호 60에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 60에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 58

제44항 또는 제45항에 있어서, 본 개시의 이중특이적 항체는 제1 항원에 특이적으로 결합하는 2개의 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원에 특이적으로 결합하는 2개의 제2 항원 결합 영역을 포함하되, 상기 제1 항원 결합 영역은 제1 Fab를 포함하고, 상기 제2 항원 결합 영역은 제2 Fab를 포함하며, 상기 2개의 제2 Fab는 (링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 2개의 Fc 영역의 N-말단에 연결되고(Fc 영역은 동일하거나 상이할 수 있음), 상기 2개의 제1 Fab의 중쇄 가변 영역의 N-말단은 2개의 Fc 영역의 C-말단에 연결되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 59

제58항에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 도 5c에 도시된 구성을 갖는 2+2C-말단 구성을 갖는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 60

제59항에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 다음을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

중쇄: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제2 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1-Fc 영역-상기 제1 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1을 포함하거나 이로 구성되되, 상기 제2 Fab는 (링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 상기 Fc 영역의 N-말단에 연결되고, 상기 제1 Fab 중쇄 가변 영역의 N-말단은 링커를 통해 또는 링커 없이 상기 Fc 영역의 C-말단에 연결됨;

경쇄 1: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제1 Fab 경쇄 가변 영역-경쇄 불변 영역을 포함하거나 이로 구성됨;

경쇄 2: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제2 Fab 경쇄 가변 영역-경쇄 불변 영역을 포함하거나 이로 구성되며,

상기 이중특이적 항체는 2개의 중쇄를 포함함.

청구항 61

제60항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 영역은 CD3에 결합하고, 상기 제2 항원 결합 영역은 GPRC5D에 결합하되,

예를 들어,

1) 중쇄는 서열번호 66에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 66에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

경쇄 1은 서열번호 59에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 59에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

경쇄 2는 서열번호 56에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 56에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

2) 중쇄는 서열번호 67에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 67에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

경쇄 1은 서열번호 63에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 63에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

경쇄 2는 서열번호 60에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 60에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 62

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 및 제2 항원은 상이하고, 상기 항체는 또한 하나 또는 복수의 다른 항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 영역을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 63

제62항에 있어서, 상기 항체는 삼중특이적 항체인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 64

제63항에 있어서, 본 개시의 삼중특이적 항체는 제1 항원에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 영역을 포함하고, 제2 항원에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 영역을 포함하고, 제3 항원에 특이적으로 결합하는 제3 항원 결합 영역을 포함하되, 상기 제1 항원 결합 영역은 제1 Fab를 포함하고, 상기 제2 항원 결합 영역은 제2 Fab를 포함하며, 상기 제1 Fab는 (링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 상기 제1 Fc 영역의 N-말단에 연결되고, 상기 제2 Fab는 (링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 상기 제2 Fc 영역의 N-말단에 연결되고, 상기 제3 항원 결합 영역은 링커를 통해 또는 링커 없이 이의 VH 또는 VL의 N-말단에서 상기 제2 Fc 영역의 C-말단에 연결되는 scFv(예를 들어, VH-VL, 또는 VL-VH)를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 65

제64항에 있어서, 상기 삼중특이적 항체의 구성은 도 7a 또는 도 7b에 도시된 바와 같이 2+1C-말단 구성인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 66

제65항에 있어서, 상기 다중특이적 항체는 다음을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

중쇄 1: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제1 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1-제1 Fc 영역을 포함하거나 이로 구성되되, 상기 제1 Fab는 (링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 상기 제1 Fc 영역의 N-말단에 연결됨;

경쇄 1: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제1 Fab 경쇄 가변 영역-경쇄 불변 영역을 포함하거나 이로 구성됨;

중쇄 2: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제2 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1-제2 Fc 영역-scFv를 포함하거나 이로 구성되되, 상기 중쇄 불변 영역 CH1은 링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이 상기 중쇄 불변 영역 CH1의 C-말단에서 상기 제2 Fc 영역의 N-말단에 연결되고, scFv는 링커를 통해 또는 링커 없이 이의 VH 또는 VL(예를 들어, scFv는 VL-VH, 예를 들어, VL의 N-말단임)의 N-말단 또는 C-말단에서 상기 제2 Fc

영역의 C-말단에 연결됨;

경쇄 2: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제2 Fab 경쇄 가변 영역 - 경쇄 불변 영역을 포함하거나 이로 구성됨.

청구항 67

제66항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 영역은 GPRC5D에 특이적으로 결합하고/하거나, 상기 제2 항원 결합 영역은 CD3에 특이적으로 결합하고/하거나, 상기 제3 항원 결합 영역은 BCMA에 특이적으로 결합하되, 예를 들어,

중쇄 1은 서열번호 71에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 71에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

경쇄 1은 서열번호 72에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 72에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

중쇄 2는 서열번호 73에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 73에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

경쇄 2는 서열번호 74에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 74에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 68

제1항 내지 제67항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 핵산, 또는 이의 임의의 또는 복수의 사슬.

청구항 69

제68항에 따른 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 70

제68항에 따른 핵산 또는 제69항에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 71

제1항 내지 제67항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제조하는 방법으로서,

a) 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 다양한 사슬을 암호화하는 핵산을 숙주 세포 내로 도입하는 단계;

b) 상기 숙주 세포에서 발현하는 단계 및 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 조립하는 단계를 포함하며;

임의로, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 정제되고, 예를 들어 단백질 A에 의해 정제되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제조하는 방법.

청구항 72

제1항 내지 제67항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 면역접합체.

청구항 73

제1항 내지 제67항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 융합 단백질.

청구항 74

제1항 내지 제67항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 T 세포 수용체.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 개시는 다중특이적 항체의 중쇄 및 경쇄의 상동성 페어링을 촉진할 수 있는 돌연변이된 아미노산 쌍을 포함하는 이중특이적 항체와 같은 다중특이적 항체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 항체 분자는 현재 생물학적 요법 시장에서 지배적인 위치를 차지한다. 이중특이적 항체(bsAb)는 동일한 항원의 2개의 상이한 항원 또는 2개의 상이한 에피토프에 동시에 결합하는 단일 분자이며; 이들은 자연 발생 면역글로불린 G(IgG) 단일특이적 항체(mAb)와 상이하다. 추가적인 표적화 능력으로 인해, bsAb는 종종 복잡한 질환(암 및 면역 장애와 같은) 및 다양한 세포 표면 수용체 또는 리간드에 관한 질환의 치료에 있어서 향상된 임상적 이점을 제공한다. mAb를 bsAb로 조작하여, 60개 이상의 형태의 bsAb를 생성하려는 많은 노력이 이루어졌다. 많은 bsAb는 항체 단편, 예컨대 단쇄 가변 단편(scFv), 항원 결합 단편(Fab), 및 중쇄(VH) 및 경쇄(VL) 가변 도메인을 연결함으로써 조작될 수 있다. 그러나, 종래의 IgG 구조와 상이한 이러한 새로운 형태는 일반적으로 낮은 용해도, 응집 감수성, 대규모 생산의 어려움, 열안정성 불량, 약동학 불량, 및 잠재적 면역원성과 같은 더 불량한 생리화학적 특성을 갖는다. 수량, 품질, 및 안정성 측면에서의 이중특이적 항체의 상당한 생산 장애는 보다 광범위한 임상 적용 및 수용을 방해하고 있다.

[0003] 이종이량체 Fc 기술은 이중특이적 항체의 생산을 돕기 위해 개발되었다. 예를 들어, Carter 등은 항체 중쇄의 일부 아미노산을 변형시키는 데 "Kih"(노브-인투-홀(Knobs-into-holes)) 모델을 사용하였고, 이중특이적 항체를 비교적 성공적으로 달성하였다(문헌[Ridgway, Presta 등 1996; Carter 2001]). 이들은 Fc의 제1 중쇄의 CH3 영역 상의 측쇄를 갖는 작은 아미노산을 측쇄를 갖는 큰 아미노산으로 돌연변이시켜 "노브(Knob)"(예컨대 T366Y)를 생성하고, 제2 중쇄의 CH3 상의 특정 아미노산을 측쇄를 갖는 작은 아미노산으로 돌연변이시켜 "홀(Hole)"(Y407T 등)을 생성하였고, 즉 이종이량체(WO9627011)의 형성을 달성하기 위해 공간 형태 상보성을 사용하였다. 그 후, 이종이량체(WO1998050431)의 비율을 무작위 돌연변이-파지 디스플레이와 같은 방법을 통해 증가시켰다. 동시에, 이황화 결합을 CH3 도메인에 도입하여 이종이량체의 '비율'을 증가시켰지만, 동종이량체 형성을 방해하는 능력은 여전히 불충분하였다. 따라서, 전체 이종이량체의 비율은 약 70~80%였다.

[0004] 대안적으로, 가닥-교환 조작 도메인(SEED) 이질성은 IgG 및 IgA CH3 도메인(AG SEED CH3 및 GA SEED CH3)에서 상호 교환 가능한 아미노산 서열을 사용하여 상보적 구조를 형성하는 또 다른 공간 돌연변이 기반 설계 전략을 나타낸다. IgG 및 IgA CH3 유도체는 상보적 서열을 생성한다. 따라서, 2개의 상보적 중쇄를 조립하여 이종이량체를 생산할 수 있고, 이에 따라 상보성의 결여로 인해 동종이량체를 생산할 가능성을 제거할 수 있다(문헌[Muda, M 등, Therapeutic assessment of SEED: A new engineered antibody platform designed to generate mono- and bispecific antibodies. Protein Eng. Des. Sel. (PEDS), 2011, 24, 447 - 454]).

[0005] 이전에 제안된 공간 돌연변이에 더하여, 정전기 상호작용은 또한 H에서의 이종이량체 형성을 촉진하는 데 널리 사용되었다. 이 방법은 하나의 중쇄의 CH3 도메인 내의 개별 아미노산을 양전하를 갖는 Lys로 돌연변이시키고, 다른 중쇄의 CH3 내의 개별 아미노산을 음전하를 갖는 Asp 또는 Glu로 치환한다. 그런 다음, 하전된 아미노산은 정전기 인력에 의해 이종이량체를 쉽게 형성한다. Gunasekaran 등은 먼저 하전된 아미노산을 도입하여 Fc-이종이량체 이중특이적 항체를 형성하였다(문헌[Gunasekaran,K. 등, Enhancing antibody Fc heterodimer formation through electrostatic steering effects: applications to bispecific molecules and monovalent IgG. J. Biol. Chem., 2010, 285, 19637 - 19646.]).

[0006] CN104011221B는 가변 영역 및 불변 영역에서 이황화 결합 재형성 돌연변이를 포함하는 변형된 폴리펩티드 사슬을 갖는 이중특이적 항체를 제공한다. 그러나, 이러한 돌연변이는 여전히 단일 세포주에 의해 발현된 이중특이적 항체의 90%를 초과하는 완전한 정확한 페어링을 달성하기에 불충분하다. 본 특허에서 이황화 결합 재형성을 위해 선택된 아미노산 쌍은 적절하게 최적화되지 않았으며, 이의 일부는 이황화 결합을 형성할 수 없는 분자이다.

[0007] CN109475627A는 항체 혼합물을 제조하는 방법을 제공하지만, 이는 2가지 유형의 단일특이적 항체의 혼합물의 제조에 관한 것이며, 전하 돌연변이는 주로 불변 영역 내로 도입되었으며, 이는 최적의 페어링 효과를 달성하기 위해 많은 양의 돌연변이가 도입될 것을 필요로 한다.

[0008] 따라서, 이 분야에는 새로운 이중특이적 항체 플랫폼이 여전히 필요하며, 여기서 플랫폼은 친화도 및 발현 수준을 유지하면서 생성된 이중특이적 항체 상에서의 발현 동안 최소한의 불일치를 보장하기 위해 몇 개의 돌연변이만을 도입할 것을 필요로 한다. 동시에, 더 적은 돌연변이를 갖는 생성된 이중특이적 항체로 인해, 이는 더 낮은 면역원성을 가지며, 이중특이적 항체 플랫폼 상의 항체의 발현 및 재조합은 세포주에서 수행될 수 있다.

발명의 내용

[0009] 본 개시는 이황화 결합 재형성 돌연변이를 CH1/CL 영역에 도입하면서 이중특이적 항체의 가변 영역에 전하 돌연변이를 도입함으로써 다중특이적 항체를 수득하는 새로운 다중특이적 항체(예컨대 새로운 이중특이적 항체) 플랫폼을 제공한다.

[0010] (1) 소수의 불일치, 정확하게 페어링된 분자의 더 높은 비율;

[0011] (2) 면역원성 위험은 자연 IgG와 유사하고;

[0012] (3) 돌연변이의 도입 전에 항체와 유사하거나 동일한 친화도를 갖고;

[0013] (4) 돌연변이 또는 단일특이적 항체의 도입 전에 항체와 비교적 높은 발현 수준, 예를 들어 유사하거나 더 높은 발현 수준을 갖고;

[0014] (5) 상이한 세포주에서 발현 및 시험관 내 재조합을 피하면서, 세포주에서 발현될 수 있다.

[0015] 동시에, 본 개시의 다중특이적 항체 플랫폼에 도입된 돌연변이 및 아미노산의 위치는 비교적 보존적이다. 따라서, 이는 다양한 다중특이적 항체(이중특이적 항체)에 적용 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 예시적인 이중특이적 항체 구조(1가 1+1 구성) 및 이를 포함할 수 있는 돌연변이를 도시한다.

도 2는 LC-MS 분석에 의해 결정된 바와 같이, 표 7에 도시된 돌연변이 조합의 정확하게 조립된 분자의 비율을 도시하며, 여기서 A: 항체 1 중쇄; a: 항체 1 경쇄; B: 항체 2 중쇄; b: 항체 2 경쇄; AaBb: 정확하게 페어링된 bsAb이다.

도 2a: 표 7의 조합 1의 LS-MS 결과;

도 2b: 표 7의 조합 2의 LC-MS 결과;

도 2c: 표 7의 조합 3의 LC-MS 결과.

도 3은 LC-MS 분석에 의해 결정된 바와 같이, 표 8에 도시된 바와 같이 상이한 항체에 이황화 결합 재형성 및 전하 돌연변이를 도입한 후 정확하게 조립된 분자의 비율을 도시하며, 여기서 A: 항체 1 중쇄; a: 항체 1 경쇄; B: 항체 2 중쇄; b: 항체 2 경쇄; AaBb: 정확하게 페어링된 bsAb이다.

도 3a: 표 8의 Her2/PD-1 조합의 LC-MS 결과.

도 3b: 표 8의 Her2/CD47 조합의 LC-MS 결과.

도 3c: 표 8의 Her2/cMET 조합의 LC-MS 결과.

도 4는 LC-MS 분석에 의해 결정된 바와 같이, 표 9에 도시된 바와 같이 상이한 전하 돌연변이 및 동일한 이황화 결합 재형성 돌연변이를 상이한 항체에 도입한 후 정확하게 조립된 분자의 비율을 도시하며, 여기서 A: 항체 1 중쇄; a: 항체 1 경쇄; B: 항체 2 중쇄; b: 항체 2 경쇄; AaBb: 정확하게 페어링된 bsAb이다.

도 4a: 표 9의 조합 1의 LC-MS 결과.

도 4b: 표 9의 조합 2의 LC-MS 결과.

도 4c: 표 9의 조합 3의 LC-MS 결과.

도 4d: 표 9의 조합 4의 LC-MS 결과.

도 4e: 표 9의 조합 5의 LC-MS 결과.

도 5는 3가지 유형의 이중특이적 항체의 구성을 도시하며, 여기서 도 5a는 2+1N-말단 구성을 갖는 이중특이적 항체를 도시하고; 도 5b는 2+1C-말단 구성을 갖는 이중특이적 항체를 도시하고; 도 5c는 2+2C-말단 구성을 갖는 이중특이적 항체를 도시한다.

도 6은 LC-MS 분석에 의해 결정된 바와 같이, 표 11에 도시된 본 개시에 의해 구성된 다가 구성 분자를 적용하는 정확하게 조립된 분자의 비율을 도시하며, 여기서 HC1: 항체 1 중쇄; LC1: 항체 1 경쇄; HC2: 항체 2 중쇄;

LC2: 항체 2 경쇄; 무손상: 정확하게 페어링된 다가 bsAb이다.

도 6a: 표 11의 GPRC5D/CD3-1의 LC-MS 결과.

도 6b: 표 11의 GPRC5D/CD3-2의 LC-MS 결과.

도 6c: 표 11의 GPRC5D/CD3-3의 LC-MS 결과.

도 6d: 표 11의 GPRC5D/CD3-4의 LC-MS 결과.

도 6e: 표 11의 GPRC5D/CD3-5의 LC-MS 결과.

도 6f: 표 11의 GPRC5D/CD3-6의 LC-MS 결과.

도 7a 및 도 7b는 BCMA/GPRC5D/CD3 삼중특이적 항체에 도입된 전하 및 이황화 결합 재형성 돌연변이의 예를 도시한다.

도 8은 예시적인 항체에 의해 매개된 H929 세포에 대한 PBMC의 사멸 효과를 도시하며, 도 8a는 예시적인 항체에 의해 매개된 PBMC에 의한 BCMA-양성 H929 세포의 사멸 효과를 도시하며, 도 8b는 예시적인 항체에 의해 매개된 PBMC에 의한 GPRC5D-양성 H929 세포의 사멸 효과를 도시한다.

도 9a 내지 도 9c는 상이한 돌연변이 mAb의 정제 후 비환원 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 결과를 도시하며; 도 9d 내지 도 9m은 이황화 결합 항체의 형성 후 변성 비환원 모세관 전기영동(nrCE-SDS) 결과를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] **정의**

[0018] 본 개시는 본원에 기술된 특정 방법론, 용액, 및 시약에 한정되지 않는 것으로 이해되어야 하며, 이는 이들이 변경될 수 있기 때문이다. 본원에서 사용되는 용어는 단지 특정 구현예를 설명하는 것으로 이해되어야 하고 본 개시의 범위를 제한하려는 것이 아니며, 이들은 첨부된 청구범위에 의해서만 제한된다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 개시의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.

[0019] 다음의 정의는 사양을 설명하는 데 사용된다. 적절한 한, 단수 형태로 사용되는 용어는 복수 형태를 더 포함할 수 있고, 그 반대일 수 있다. 본원에서 사용되는 용어는 특정 구현예를 설명하기 위한 것이며, 제한하려는 의도가 아님을 이해해야 한다.

[0020] 용어 "대략"은 특정 수치보다 작은 하한 5% 및 특정 수치보다 큰 상한 5%의 범위 내의 수치 값을 포괄하기 위해 수치 평균과 조합하여 사용된다.

[0021] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "및/또는"은 옵션 중 임의의 옵션 또는 둘 이상의 옵션 또는 모든 옵션을 의미한다.

[0022] "제1" 및 "제2"가 본원에서 언급될 경우, 이들은 2개의 도메인 또는 사슬을 구별하기 위한 것이며, 어떤 방식으로도 2개의 도메인의 위치를 나타내지 않는다.

[0023] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "포함하는(comprise)" 및 "포함하는(include)"은 모든 요소, 정수 또는 단계를 포함하지만, 임의의 다른 요소, 정수 또는 단계를 배제하지 않는 것을 의미한다. 용어 "포함하는" 및 "포함하는"이 본원에서 사용되는 경우, 달리 명시되지 않는 한, 이들은 또한 요소, 정수, 또는 단계의 조합을 포함한다. 예를 들어, 특정한 특정 서열의 항체 가변 영역을 "포함하는" 경우, 이는 또한 특정 서열에 의해 형성된 항체의 가변 영역을 포괄한다.

[0024] 본원에서 사용되는 바와 같이, 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 내의 모든 아미노산 위치는 문헌[Kabat 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Version 5. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에 의해 기술되어 있고 본원에 "Kabat 번호"로 지칭된 Kabat 넘버링 체계에 따라 넘버링된다.

[0025] 본원에서 사용되는 바와 같이, 언급된 항체 가변 영역 외부의 도메인(예를 들어, 불변 영역, 예를 들어, Fc 영역)에서의 아미노산 위치는 문헌[Edelman, G.M. 등, Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969)]에 기술되어 있고 본원에서 "EU 번호"로 지칭된 EU 넘버링 체계에 따라 넘버링된다. 위치 번호 및/또는 아미노산 잔기가 특정

항체 이소형에 할당되는 경우, 이는 임의의 다른 항체 이소형의 상응하는 위치 및/또는 아미노산 잔기에 적용 가능하고, 이는 당업자에게 공지되어 있다.

[0026] 면역글로불린의 경쇄 및 중쇄의 뉴클레오티드 서열에 대한 일반 정보는 문헌[Kabat, E.A. 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Version 5, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에 제공되어 있다.

[0027] 용어 "아미노산 치환" 또는 "아미노산 돌연변이"는 소정의 부모 아미노산 서열 내의 적어도 하나의 아미노산 잔기를 상이한 "치환기" 아미노산 잔기로 치환하는 것을 지칭한다. 이러한 치환기 잔기 또는 복수의 잔기는 "자연 발생 아미노산 잔기"(즉, 유전자 코드에 의해 코딩됨)일 수 있고, 알라닌(Ala); 아르기닌(Arg); 아스파라긴(Asn); 아스파르트산(Asp); 시스테인(Cys); 글루타민(Gln); 글루탐산(Glu); 글리신(Gly); 히스티딘(His); 이소류신(Ile); 류신(Leu); 리신(Lys); 메티오닌(Met); 페닐알라닌(Phe); 프롤린(Pro); 세린(Ser); 트레오닌(Thr); 트립토판(Trp); 티로신(Tyr); 및 발린(Val)으로부터 선택될 수 있다. 본원의 아미노산 치환의 정의는 또한 하나 또는 복수의 비-자연 발생 아미노산 잔기와의 치환을 포함한다. "비-자연 발생 아미노산 잔기"는 전술한 자연 발생 아미노산 잔기 이외에, 폴리펩티드 사슬 내의 인접한 아미노산 잔기에 공유 결합할 수 있는 잔기를 지칭한다. 비-자연 발생 아미노산 잔기의 예는 노르류신, 오르니틴, 노르발린, 호모세린, Aib, 및 다른 아미노산 잔기 유사체를 포함한다.

[0028] 용어 "CH1 영역"은 항체 중쇄 폴리펩티드에서 EU 위치 118로부터 EU 위치 220(EU 넘버링 체계)으로 연장되는 부분을 지칭한다. 일 구현예에서, CH1 도메인은 아미노산 서열 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC(서열번호 116)를 포함한다. 일 구현예에서, 내부 이황화 결합은 CH1에서 Cys를 비-Cys로 돌연변이시킴으로써 제거되거나 새로운 이황화 결합은 비-Cys를 Cys로 돌연변이시킴으로써 재형성된다.

[0029] 용어 "CH2 영역"은 항체 중쇄 폴리펩티드에서 EU 위치 231로부터 EU 위치 340(EU 넘버링 체계)으로 연장되는 부분을 지칭한다. 일 구현예에서, CH2 도메인은 아미노산 서열 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK(서열번호 117)를 포함한다.

[0030] 용어 "CH3 영역"은 항체 중쇄 폴리펩티드에서 EU 위치 341로부터 EU 위치 447로 연장되는 부분을 지칭한다. 일 구현예에서, CH3 도메인은 아미노산 서열

[0031] GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(서열번호 118)를 포함한다.

[0032] 용어 "힌지 영역"은 항체의 중쇄 폴리펩티드 부분을 지칭하며, 이 부분은 야생형 항체의 중쇄 내의 CH1 영역 및 CH2 영역, 예를 들어 IgG1 힌지 영역, 예를 들어 EU 넘버링에 따른 D221의 서열을 P230에 연결한다. 다른 IgG 아형의 힌지 영역은 IgG1 아형 서열의 힌지 영역에서 Cys 잔기를 정렬시킴으로써 식별될 수 있다.

[0033] 힌지 영역은 일반적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 2개의 폴리펩티드에 의해 형성된 이량체 분자이다. 일 구현예에서, 힌지 영역은 아미노산 서열 DKTHTCPXCP(서열번호 119)를 가지며, 여기서 X는 S 또는 P이다. 일 구현예에서, 힌지 영역은 아미노산 서열 HTCPXCP(서열번호 120)를 포함하고, X는 S 또는 P이다. 일 구현예에서, 힌지 영역은 아미노산 서열 CPXCP(서열번호 121)를 포함하고, 여기서 X는 S 또는 P이다. 일 구현예에서, 힌지 영역 내의 이황화 결합은 힌지 영역 내의 Cys를 비-Cys로 돌연변이시킴으로써 제거된다.

[0034] 본 개시에서의 다중특이적 항체는 링커를 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "링커"는 다중특이적 항체의 상이한 부분을 직접 연결할 수 있는 임의의 분자를 지칭한다. 다중특이적 항체의 상이한 부분 사이에 공유 연결을 확립하는 링커의 예는 펩티드 링커 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 또는 폴리옥시에틸렌 또는 폴리에틸렌 글리콜의 공중합체, 또는 폴리프로필렌 글리콜을 포함하지만 이에 한정되지 않는 비단백질 중합체를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 개시에 따른 용어 "펩티드 링커"는 아미노산 서열을 지칭하며, 여기서 서열은 다중특이적 항체의 다양한 부분의 아미노산 서열을 함께 연결한다. 바람직하게는, 펩티드 링커는 원하는 활성을 방해하는 것을 방지하기 위해 서로에 대해 이들의 형태를 유지하는 방식으로 2개의 엔티티(entity)를 연결하기에 적절한 길이를 갖는다. 펩티드 링커는 주로 다음의 아미노산 잔기를 포함하거나 포함하지 않을 수 있다: Gly, Ser, Ala 또는 Thr. 유용한 링커는, 예를 들어, (GS)n, (GSGGS) n, (GGGGS) n, (GGGS)n, 및 (GGGGS)nG를 포함하는 Gly-Ser 중합체를 포함하며, 여기서 n은 적어도 1(및 바람직하게는, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10)의 정수이다. 유용한 링커는 또한 Gly-Ala 중합체, Ala-Ser 중합체, 및 다른 가요성 링커를 포함한다.

[0035] 용어 "Fc 도메인" 또는 "Fc 영역"은 면역글로불린 H에 함유된 불변 영역의 적어도 일부의 C-말단 영역을 정의하기 위해 본원에서 사용된다. 이 용어는 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함한다. 천연 면역글로불린 "Fc 도메인"은 2개 또는 3개의 불변 도메인, 즉 CH2 도메인, CH3 도메인, 및 임의로 CH4 도메인을 포함한다. 예를 들어, 천연 항체에서, 면역글로불린 Fc 도메인은 IgG, IgA, 및 IgD 항체로부터 유래된 2개의 중쇄의 제2 및 제3 불변 도메인(CH2 도메인 및 CH3 도메인)을 포함하거나; IgM 및 IgE 항체로부터 유래된 2개의 중쇄의 제2, 제3, 및 제4 불변 도메인(CH2 도메인, CH3 도메인, 및 CH4 도메인)을 포함한다. 본원에서 달리 명시되지 않는 한, Fc 영역 또는 중쇄 불변 영역의 아미노산 잔기 번호는 문헌[Kabat 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Version 5, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991]의 EU 넘버링 체계(EU 인덱스라고도 지칭함)에 따라 넘버링된다. 그러나, Fc 영역에서 C-말단 Lys(Lys447)는 존재할 수도 있고 존재하지 않을 수도 있다. 2개의 Fc 영역은 이량체 Fc를 구성하기 위해 이량체화를 거칠 수 있고, 2개의 상이한 Fc [영역]은 이종이량체화를 거쳐 이종이량체 Fc를 형성할 수 있다. 본원에서 용어 "Fc 영역", "Fc 부분" 및 "이량체 Fc(예를 들어, 이종이량체 Fc)"는 면역글로불린의 중쇄 가변 영역 VH 및 경쇄 가변 영역 VL뿐만 아니라 중쇄 불변 영역 CH1 및 경쇄 불변 영역 CL을 포함하지 않지만, 일부 경우에 중쇄 불변 영역의 N-말단 힌지 영역을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 Asp221, Cys226, 또는 Asp231로부터 H의 C-말단까지 연장된다.

[0036] 일 구현예에서, 인간 IgG1 Fc 영역 폴리펩티드(힌지 영역을 포함함)는 다음의 아미노산 서열을 포함한다:

[0037] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(서열번호 122).

[0038] 인간 IgG4 Fc 영역 폴리펩티드(힌지 영역을 포함함)는 다음의 아미노산 서열을 포함한다:

[0039] PPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK(서열번호 123).

[0040] 본원에 보고된 방법에서 생산된 항체는 Fc 영역을 포함하고, 일 구현예에서, Fc 영역은 인간-유래 Fc 영역으로부터 유래된다. 일 구현예에서, Fc 영역은 인간 불변 영역의 모든 부분을 포함한다. 항체 Fc 영역은 보체 활성화, C1q 결합, C3 활성화 및 Fc 수용체 결합에 직접 관여한다. 일 구현예에서, Fc 영역은 인간 Fc 영역이다. 일 구현예에서, Fc 영역은 인간 IgG4 아형이다. 일 구현예에서, Fc 영역은 인간 IgG1 아형이다.

[0041] 본원의 "이종이량체 Fc 스캐폴드"는 이량체화 후에 형성된 2개의 상이한 Fc 영역 또는 2개의 상이한 Fc 영역을 포함하는 스캐폴드를 지칭한다. 이는 N-말단 또는 이의 C-말단에서 항원 결합 도메인에 연결될 수 있고(예를 들어, 표적 분자, 항체의 항원 결합 단편, 또는 표적 분자에 결합할 수 있는 리간드 또는 수용체의 가용성 부분에 결합할 수 있는 항체의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역에 연결될 수 있고), 다중특이적 항체, 예를 들어 이중특이적 항체를 작제하는 데 사용된다.

[0042] 아미노산 돌연변이는 (원래 아미노산, 아미노산 위치, 돌연변이된 아미노산)을 사용하여 발현된다. 예를 들어, 돌연변이 부위가 V 영역에 위치할 경우, "A43D"는 Kabat 위치 43에 위치된 Ala 아미노산을 Asp(D)로 치환하는 것을 지칭하고; 돌연변이 부위가 C 영역에 위치할 경우, "Q124C"는 EU 위치 124에 위치된 Gln을 Cys(C)로 치환하는 것을 지칭한다. 돌연변이 조합을 언급할 경우, 조합 내의 돌연변이는 더하기 기호(+)를 사용하여 연결된다. "A43D+Q124C"는 조합이 돌연변이 A43D 및 Q124C를 동시에 포함한다는 것을 나타낸다. 특정 위치에서 복수의 돌연변이 가능성이 있는 경우, 이는 본원의 심볼 "/"에 의해 표현된다. 예를 들어, "K370T/S 돌연변이"는 위치 370에서의 잔기 K가 T 또는 S 잔기로 치환될 수 있음을 나타낸다.

[0043] 아미노산 위치가 본 개시에서 언급되는 경우, 달리 명시되지 않는 한, 이는 IgG1 중쇄 또는 카파 경쇄 번호에 따른 아미노산 위치를 지칭하며, 즉, IgG1 중쇄 또는 카파 경쇄 번호에 기초한 아미노산 위치 및 다른 중쇄 또는 경쇄에 상응하는 아미노산 위치의 아미노산 위치를 포괄한다. 예를 들어, C220이 언급될 때, 이는 EU 넘버링 하에 위치 220에서 IgG1 중쇄의 아미노산, 및 다른 중쇄에서 상응하는 아미노산을 포괄한다. 예를 들어, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 중 위치 131에서의 아미노산.

[0044] 돌연변이를 설명할 경우, 특정 위치에서의 원래 아미노산은 기술된 아미노산일 수 있거나 상응하는 위치에서의 다른 아미노산일 수 있음을 주목해야 한다. 예를 들어, 돌연변이를 설명할 경우, 이는 가변 영역의 위치 43에서의 Ala가 Asp로 돌연변이되고, Ala가 위치 43에 해당하지 않는 경우, 원래 아미노산이 가변 영역의 위치 43에

상응하는 한, 위치 43에서의 상응하는 아미노산이 Asp로 돌연변이되는 상황을 포함할 수 있음을 주목해야 한다. 용어 "숙주 세포", "숙주 세포주", 및 "숙주 세포 배양 산물"은 상호 교환적으로 사용되며, 이러한 세포의 자손을 포함하여 외래 핵산 내로 도입된 세포를 지칭한다. 숙주 세포는 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"를 포함하며, 이는 계대 수에 관계없이, 일차 형질전환된 세포 및 그 안에 유래된 자손을 포함한다. 자손은 핵산 함량의 관점에서 부모 세포와 동일하지 않을 수 있고, 심지어 돌연변이를 함유할 수 있다. 이러한 돌연변이된 자손은 본원에 포함되며, 초기 형질전환된 세포에서 스크리닝되거나 선택된 유사한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는다.

[0045] 본원에서 사용되는 용어 "벡터"는 이에 연결된 다른 핵산을 증식시킬 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 이 용어는 자가-복제 핵산 구조를 갖는 벡터 및 그 안에 도입된 숙주 세포의 게놈에 결합된 벡터를 포함한다. 일부 벡터는 작동 가능하게 연결된 핵산의 발현을 안내할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "발현 벡터"로서 지칭된다.

[0046] 용어 "결합 분자"는 표적, 예를 들어 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 융합 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 분자를 지칭한다.

[0047] 용어 "표적"은 결합 분자에 의해 결합될 대상을 지칭한다. 표적은 항원일 수 있고, 또한 리간드 또는 수용체일 수 있다. 용어 "항원"은 면역 반응을 유도하는 분자를 지칭한다. 이러한 면역 반응은 항체 생성 또는 특이적 면역 세포 활성화, 또는 둘 다와 관련될 수 있다. 당업자는 기본적으로 모든 단백질 또는 펩티드를 포함하는 임의의 거대분자가 항원으로서 사용될 수 있음을 이해해야 한다. 또한, 항원은 재조합 또는 게놈 DNA로부터 유래될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "에피토프"는 항체 분자와 특이적으로 상호작용하는 항원의 부분을 지칭한다. 일부 구현예에서, 항원은 종양-연관 항원(즉, 종양 발생 및 진행과 관련된 항원) 또는 T 세포 결합자이다. 본 개시의 결합 분자가 항체로부터 유래된 표적 결합 영역에 관한 경우, "표적" 및 "항원"은 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

[0048] 본원에서 사용되는 용어 "표적 결합 영역"은 결합 분자, 예를 들어 특정 표적 또는 항원에 결합된 다중특이적 결합 분자 또는 이중특이적 결합 분자의 일부를 지칭한다. 표적 결합 영역은, 예를 들어 항체, 면역글로불린, 또는 항체 단편일 수 있다. 이러한 표적 결합 영역은 결합 분자의 나머지 부분에 독립적인 삼차 구조를 가질 수도 있고 갖지 않을 수도 있으며, 이의 표적에 결합하거나 결합하지 않는 독립적인 엔티티로서 사용될 수도 있다. 표적 결합 영역은 또한 수용체 또는 리간드, 또는 리간드에 결합할 수 있는 수용체의 도메인일 수 있다. 다중특이적 항체 또는 이중특이적 항체의 "표적 결합 영역"은 "항원 결합 영역"으로도 지칭될 수 있다.

[0049] 본원에서 사용되는 용어 "항원 결합 영역"은 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 예를 들어 특정 표적 또는 항원에 결합된 다중특이적 항체 또는 이중특이적 항체의 임의의 부분을 지칭한다. 항원 결합 영역은, 예를 들어 항체, 면역글로불린, 또는 항체 단편일 수 있다. 이러한 항원 결합 영역은 다중특이적 항체 또는 이중특이적 항체의 나머지 부분에 독립적인 삼차 구조를 가질 수도 있고 갖지 않을 수도 있으며, 항원/에피토프에 결합하거나 결합하지 않는 독립적인 엔티티로서 사용될 수도 있다. 본 개시의 결합 분자가 항체로부터 유래된 표적 결합 영역에 관한 경우, "표적 결합 영역" 및 "항원 결합 영역"은 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

[0050] 용어 "다중특이적 결합 분자"는 적어도 이중특이적인 다중특이적 결합 분자, 예를 들어 이중특이적 결합 분자를 지칭하며, 즉, 분자는 적어도 제1 표적 결합 영역 및 제2 표적 결합 영역을 포함하고, 여기서 제1 표적 결합 영역은 표적 또는 항원의 유형에 결합하고, 제2 표적 결합 영역은 다른 항원 또는 표적에 결합한다. 본 개시에 따른 다중특이적 결합 분자는 또한 복수의 표적 결합 영역/결합 부위를 포함하는 다중특이적 분자, 예컨대 삼중특이적 결합 분자를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 개시의 다중특이적 결합 분자는 다중특이적 항체이다. 일부 구현예에서, 본 개시의 이중 특이적 결합 분자는 이중특이적 항체이다. 일부 구현예에서, 본 개시의 다중특이적 결합 분자는 융합 단백질이며, 이는 예를 들어 항체로부터의 표적 결합 영역 및 수용체 또는 리간드로부터의 표적 결합 영역을 포함할 수 있다.

[0051] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "단일특이적"은 하나 또는 복수의 표적 결합 부위를 갖는 폴리펩티드/단백질 분자를 지칭하며, 부위 중 각각의 부위는 동일한 표적의 동일한 부위 또는 구조, 또는 동일한 항원의 동일한 에피토프에 결합한다.

[0052] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "다중특이적" 결합 분자, 예를 들어 항원은 적어도 2개의 표적 결합 부위가 있는 것을 지칭하며, 적어도 2개의 표적 결합 부위 중 각각의 표적 결합 부위는 동일한 표적 또는 상이한 표적의 상이한 부위/구조에 결합한다. 다중특이적 결합 분자는 적어도 2개의 상이한 표적 또는 부위/구조에 대한 결합 특이성을 갖는 결합 분자이다. 일 구현예에서, 이러한 이중특이적 결합 분자가 본원에 제공되며, 이는 제1

표적 및 제2 표적에 대한 결합 특이성을 갖는다.

[0053] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "다중특이적" 항체는 적어도 2개의 항원 결합 부위를 갖는 항체를 지칭하며, 적어도 2개의 항원 결합 부위 중 각각의 항원 결합 부위는 동일한 항원의 상이한 에피토프 또는 상이한 항원의 상이한 에피토프에 결합한다. 다중특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 항원/에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 항체이다. 일 구현예에서, 이러한 이중특이적 항체는 본원에서 제공되며, 제1 항원 및 제2 항원에 대한 결합 특이성을 갖는다.

[0054] "제1 항원 결합 영역"이 다중특이적 항체 또는 이중특이적 항체의 관점에서 언급되는 경우, 이는 제1 항원과 결합하기 위한 결합 영역을 지칭하며, 항체에 함유된 항원 결합 영역의 수를 제한하려는 의도는 아니다. 예를 들어, 다중특이적 항체 또는 이중특이적 항체는 1개 이상의 제1 항원 결합 영역을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이중특이적 항체는 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원 결합 영역을 포함하지만, 1개 이상의 제1 항원 결합 영역 및 1개 이상의 제2 항원 결합 영역을 포함할 수 있다.

[0055] "제1 표적 결합 영역"이 결합 분자의 관점에서 언급되는 경우, 이는 제1 표적과 결합하기 위한 결합 영역을 지칭하며, 결합 분자에 함유된 표적 결합 영역의 수를 제한하려는 의도는 아니다. 예를 들어, 다중특이적 결합 분자 또는 이중특이적 항체는 1개 이상의 제1 표적 결합 영역을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이중특이적 항체는 제1 표적 결합 영역 및 제2 표적 결합 영역을 포함하지만, 1개 이상의 제1 표적 결합 영역 및 1개 이상의 제2 표적 결합 영역을 포함할 수 있다.

[0056] "제1 항원 결합 영역"이 항체의 관점에서 언급되는 경우, 이는 제1 항원과 결합하기 위한 결합 영역을 지칭하며, 항체에 함유된 항원 결합 영역의 수를 제한하려는 의도는 아니다. 예를 들어, 다중특이적 항체 또는 이중특이적 항체는 1개 이상의 제1 항원 결합 영역을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이중특이적 항체는 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원 결합 영역을 포함하지만, 1개 이상의 제1 항원 결합 영역 및 1개 이상의 제2 항원 결합 영역을 포함할 수 있다.

[0057] "표적 또는 항원 결합 영역이 항체로부터 유래됨"이 언급되는 경우, 이는 항체의 특이적 항원 결합 도메인으로부터 유래되거나 이로부터 유래된 표적/항원 결합 영역을 구성하는 결합 도메인을 지칭한다. 예를 들어, 항원 결합 영역의 특이적 Fab는 항체의 상응하는 단편, 예컨대 Fab로부터 유래되거나 이로부터 유래되거나, 항원 결합 영역의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역은 항체의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역으로부터 유래되거나, 항원 결합 영역의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개의 CDR은 항체의 CDR이다.

[0058] 용어 "유래된"은 항원 결합 영역 내의 단편이 유래되는 항체 단편과 기본적으로 동일하지만, 하나 또는 복수의 부위에서 돌연변이, 예를 들어 치환, 결실 또는 첨가를 갖는 단편을 지칭한다. 일 특정 구현예에서, 돌연변이는 항체의 CDR에 있지 않다.

[0059] 용어 "전장 항체" 또는 "전장 항체"는 본원에서 상호 교환적으로 사용될 수 있고, 천연 면역글로불린 분자 구조를 갖는 항체 분자를 지칭한다. 전장 종래의 4쇄 IgG 항체는 이황화 결합에 의해 서로 연결된 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)를 포함한다. 중쇄만을 갖고 경쇄가 결여된 전장 중쇄 항체는 이황화 결합에 의해 서로 연결된 2개의 중쇄를 포함한다. 전장 종래의 4쇄 IgG 항체의 중쇄는 일반적으로 중쇄 가변 영역(본원에서 VH로 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역을 구성하며, 여기서 중쇄 불변 영역은 적어도 3개의 도메인, 즉 CH1, CH2, 및 CH3을 포함한다. 전장 항체의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서 VL로 약칭됨) 및 CL로 구성되며, 여기서 CL은 도메인 CL로 구성된다. 각각의 중쇄 가변 영역 VH 및 각각의 경쇄 가변 영역 VL은 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성되고, N-말단에서 C-말단까지 다음의 순서로 배열된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 용어 "항체 단편"은 완전한 항체의 일부를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 항체 단편은 항원 결합 단편이다.

[0060] 항체의 "항원 결합 단편" 용어는 전장 항체의 일부를 포함하는 전장 항체와 상이한 분자이지만, 전장 항체 또는 전장 항체에 경쟁적으로 결합하는 항원(즉, 항원 결합 단편이 유래되는 전장 항체)에 결합할 수 있는 항원이다. 완전한 항체의 항원 결합 단편은 재조합 DNA 기술을 통해 또는 효소 또는 화학적 절단을 통해 제조될 수 있다. 항원 결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')2, Fv, 단일 가닥 Fv, 디아바디, 단일 도메인 항체(sdAb), 및 나노바디를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, Fab 단편은 전장 항체의 파파인(papain) 분해로부터 수득될 수 있다. 또한, F(ab')2는 힌지 영역에서 이황화 결합 아래의 전체 항체의 펩신 분해로부터 생성된다. F(ab')2는 Fab'의 이량체이고 2가 항체 단편이다. F(ab')2는 F(ab')2 이량체를 Fab' 단량체로 변환하여, 힌지 영역에서 이황화 결합을 파괴함으로써 중성 조건 하에서 환원될 수 있다. Fab' 단량체는 기본적으로 힌지 영역을 갖는 Fab 단편이다. Fv 단편은 항체의 외-분지(one-armed) VL 및 VH 도메인으로 구성된다. Fv 단편의 2개의 도메인, 즉

VL 및 VH는 독립적으로 유전적으로 코딩될 수 있지만, 재조합될 수도 있고, 이들 2개의 도메인은 합성 연결 펩티드를 사용하여 단일 단백질 사슬로 연결될 수 있고, 단일 단백질 사슬 내의 VL 영역 및 VH 영역은 페어링되어 단쇄 Fv(scFv)를 형성한다.

[0061] "Fab 단편" 또는 "Fab"는 본원에서 상호 교환적으로 사용될 수 있고, 2개의 폴리펩티드 사슬로 이루어진 면역글로불린 단편을 지칭하는 데 사용되며, 면역글로불린 중쇄 가변 도메인 VH, 중쇄 불변 도메인 CH1, 경쇄 가변 도메인 VL, 및 경쇄 불변 도메인 CL을 포함하며, 여기서 1개의 폴리펩티드 사슬은 VH 및 N-말단에서 C-말단까지 CH1 및 CL로부터 선택된 하나의 불변 영역을 포함하고, 다른 폴리펩티드 사슬은 VL 및 N-말단에서 C-말단까지 CL 및 CH1로부터 선택된 다른 불변 영역을 포함하며, 여기서 VH 도메인 및 VL 도메인은 페어링되어 항원 결합 부위를 형성한다. 본원의 중쇄 불변 영역 CH1을 포함하는 Fab 폴리펩티드 사슬은 "Fab 중쇄"로도 지칭되며; 이에 상응하여, 경쇄 불변 영역 CL을 포함하는 Fab 폴리펩티드 사슬은 "Fab 경쇄"로도 지칭된다.

[0062] "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"은 서열이 매우 가변적이고 구조적으로 정의된 루프("초가변 루프")를 형성하고/하거나 항원-접촉 잔기("항원 접촉 지점")를 함유하는 항체의 가변 도메인 내의 영역이다. CDR은 주로 항원/에피토프와의 결합을 담당한다. CDR의 중쇄 및 경쇄는 일반적으로 CDR1, CDR2, 및 CDR3으로 지칭되고, N-말단으로부터 번호가 매겨진다. 항체 중쇄 가변 도메인에 위치한 CDR은 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3으로 지칭되는 반면, 항체 경쇄 가변 도메인에 위치한 CDR은 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3으로 지칭된다. 주어진 경쇄 가변 영역 또는 중쇄 가변 영역 아미노산 서열에서, 각각의 CDR의 정확한 아미노산 서열 경계는, 예를 들어 3차원 구조 및 CDR 루프 토폴로지에 기초한 Chothia에 의해 정의된 CDR(문헌[Chothia 등 (1989) Nature 342: 877-883], 문헌[Al-Lazikani 등, Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins", Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997)]), Kabat(문헌[Kabat 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Version 4, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)]), AbM(배스 대학), Contact(런던 대학), 항체 서열 변동성에 기초한 국제 유전면역학 데이터베이스(IMGT:international ImMunoGeneTics database)(imgt.cines.fr/ on the World Wide Web), 및 다수의 결정 구조를 사용하는 친화도 전파 클러스터링에 기초한 North를 포함하는 다양한 공지된 항체 CDR 할당 체계의 임의의 것 또는 조합을 사용하여 결정될 수 있다. 달리 명시되지 않는 한, 본 개시에서의 용어 "CDR" 또는 "CDR 서열"은 상기 방법 중 어느 하나에 의해 식별된 CDR 서열을 포괄한다. CDR은 또한 동일한 Kabat 수 위치(예컨대, 본 개시의 임의의 예시적인 CDR)를 갖는 기준 CDR 서열에 기초하여 식별될 수 있다.

[0063] 서열 간의 서열 동일성은 다음과 같이 계산된다.

[0064] 2개의 아미노산 서열 또는 2개의 핵산 서열의 동일성 백분율을 결정하기 위해, 서열은 최적의 비교를 위해 정렬된다(예를 들어, 최적의 비교를 위해 제1 및 제2 아미노산 서열 중 하나 또는 둘 모두에 빈 공간이 도입될 수 있거나, 비교 목적으로 비-상동성 서열이 폐기될 수 있음). 바람직한 구현예에서, 비교 목적으로, 비교된 기준 서열의 길이는 기준 서열 길이의 적어도 30%, 바람직하게는 적어도 40%, 보다 바람직하게는 적어도 50%, 60%, 및 보다 더 바람직하게는 적어도 70%, 80%, 90%, 또는 100%이다. 그 후, 상응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오티드 위치에서의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드를 비교한다. 제1 서열에서의 위치가 제2 서열에서의 상응하는 위치에서 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드에 의해 점유될 경우, 이 위치에서의 분자는 동일하다.

[0065] **발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0066] **I. 결합 분자**

[0067] 본 개시는 제1 표적 결합 영역 및 제2 표적 결합 영역, 및 임의적으로 하나 또는 복수의 다른 표적 결합 영역을 포함하는 결합 분자의 유형에 관한 것으로서, 여기서 표적 결합 영역 중 하나 또는 둘 이상은 불일치를 방지하고/하거나 이종이량체화를 촉진하는 데 유리한 하나 또는 복수의 돌연변이를 포함한다. 일부 구현예에서, 결합 분자는 이종이량체 정제를 촉진하기 위한 하나 또는 복수의 돌연변이를 또한 포함한다. 일부 구현예에서, 본 개시의 결합 분자가 포함하는 돌연변이는 이황화 결합 재형성 돌연변이, 전하 돌연변이, 및/또는 불일치를 방지하고/하거나 이종이량체화를 촉진하는 데 유리한 하나 또는 복수의 다른 돌연변이로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 제1 표적 결합 영역 및 제2 표적 결합 영역은 동일한 표적 또는 표적 상의 부위/구조에 결합한다. 일부 구현예에서, 제1 표적 결합 영역 및 제2 표적 결합 영역은 표적 상의 상이한 표적 또는 부위/구조에 결합한다.

[0068] 일부 구현예에서, 본 개시의 결합 분자는 융합 단백질이며, 이는 예를 들어 항체로부터의 표적 결합 영역 및 수용체 또는 리간드로부터의 표적 결합 영역을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 리간드 또는 수용체의 예시적인 예는 과립-연관 사이토카인 또는 이의 수용체, 예컨대 종양 괴사 인자(TNF), 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 또는

형질전환 성장 인자(TGF, 예를 들어 TGF-β) 또는 이의 수용체뿐만 아니라 이의 단편을 포함한다.

[0069] 일부 구현예에서, 결합 분자는 항체이다. 일부 구현예에서, 본 개시는 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원 결합 영역, 및 임의로 하나 또는 복수의 다른 항원 결합 영역을 포함하는 돌연변이, 예를 들어 단일특이적 항체 또는 다중특이적 항체, 예를 들어 이중특이적 항체를 포함하는 항체에 관한 것으로서, 여기서 항원 결합 영역 중 하나 또는 둘 이상은 불일치를 방지하고/하거나 이종이량체화를 촉진하는 데 유리한 하나 또는 복수의 돌연변이를 포함한다. 일부 구현예에서, 항체는 이종이량체 정제를 촉진하기 위한 하나 또는 복수의 돌연변이를 또한 포함한다. 일부 구현예에서, 본 개시의 결합 분자가 포함하는 돌연변이는 이황화 결합 재형성 돌연변이, 전하 돌연변이, 및/또는 불일치를 방지하고/하거나 이종이량체화를 촉진하는 데 유리한 하나 또는 복수의 다른 돌연변이로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원 결합 영역은 동일한 항원 또는 에피토프에 결합한다. 일부 구현예에서, 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원 결합 영역은 상이한 항원 또는 에피토프에 결합한다.

[0070] 일부 구현예에서, 표적 결합 영역 또는 항원 결합 영역은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 표적 결합 영역 또는 항원 결합 영역은 경쇄 불변 영역 CL을 포함한다. 일부 구현예에서, 표적 결합 영역 또는 항원 결합 영역은 중쇄 불변 영역 CH1을 포함한다.

[0071] 일부 구현예에서, CH1 영역은 인간 IgG CH1, 예를 들어 인간 IgG1 CH1, 인간 IgG2 CH1, 인간 IgG3 CH1, 또는 인간 IgG4 CH1이다. 일 구현예에서, CH1 영역은 아미노산 서열 서열번호 116을 포함하거나, 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성, 예를 들어, 95%, 96%, 97%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖거나 이로 구성된다.

[0072] 일부 구현예에서, CL 영역은 인간 카파 경쇄 CL 영역 또는 인간 람다 경쇄 CL 영역이다. 일부 구현예에서, CL 영역은 아미노산 서열 서열번호 54 또는 서열번호 55를 포함하거나, 이와 적어도 90%의 동일성, 예를 들어, 95%, 96%, 97%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖거나 이로 구성된다.

[0073] 본 개시에서, 항원 결합 영역의 제한은 표적 결합 영역에 유사하게 적용 가능하다.

[0074] **I-1 이황화 결합 재형성 돌연변이**

[0075] 이황화 결합 재형성 돌연변이는 상동성 경쇄 및 중쇄 페어링을 강제하는 효과적인 전략이며, 이에 의해 결합 분자 또는 다중특이적 항체의 상이한 표적 결합 영역의 경쇄 및 중쇄 사이의 미스매치를 방지한다. 경쇄 및 중쇄 또는 하나 또는 복수의 표적 결합 영역을 연결하는 이황화 결합은 재형성되고, 이황화 결합의 위치는 불일치된 경쇄 및 중쇄가 이황화 결합을 효과적으로 형성할 수 없도록 변경된다.

[0076] 따라서, 일 구현예에서, 본 개시의 결합 분자에서, 예를 들어 항체, 적어도 하나의 표적 결합 영역 또는 항원 결합 영역은 CH1-CL을 포함하고, CH1-CL 계면에서의 이황화 결합은 재형성되고, 예를 들어 이황화 결합 재형성 돌연변이는 CH1-CL 계면 상에 존재한다. 일 구현예에서, 본 개시의 결합 분자에서, 예를 들어 항체, 2개 이상의 표적 결합 영역은 CH1-CL1 계면에서 이황화 결합 재형성 돌연변이를 포함한다.

[0077] 본원의 "이황화 결합 재형성 돌연변이"는 계면에서 아미노산 쌍의 위치에서의 돌연변이를 지칭하며, 여기서 아미노산 쌍의 위치에서의 비-Cys는 Cys로 치환된다. 예를 들어, 아미노산 쌍의 위치에서 2개의 비-Cys는 Cys로 치환되어, 사슬간 이황화 결합을 형성할 수 있다.

[0078] 일부 구현예에서, 본 개시의 이황화 결합 재형성 돌연변이는 항원 결합 영역(예를 들어, Fab를 포함하는 항원 결합 영역)의 CH1-CL 계면에서 아미노산 쌍의 위치에서의 돌연변이이며, 여기서 아미노산 쌍의 위치에서의 비-Cys는 Cys로 치환된다. 일부 구현예에서, 아미노산 쌍의 위치에서 2개의 비-Cys는 Cys로 치환되어, 사슬간 이황화 결합을 형성할 수 있다.

[0079] 일부 구현예에서, 돌연변이는 비-Cys 아미노산 쌍의 아미노산을 지칭하며, 여기서 CH1-CL 계면에서 α 탄소 원자 사이의 거리는 8 Å 미만, 보다 바람직하게는 6 Å 미만이며, Cys로 돌연변이된다. 일부 구현예에서, 아미노산 쌍 내의 아미노산 측쇄는 서로를 향한다. 일부 구현예에서, CH1-CL 계면에서 α 탄소 원자 사이의 거리가 8 Å 미만, 보다 바람직하게는 6 Å 미만인, 비-Cys 아미노산 쌍 내의 아미노산은 Cys로 돌연변이되고, 비-Cys 아미노산 쌍 내의 아미노산 측쇄는 서로를 향한다.

[0080] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4)에서의 중쇄 CH1내의 비-Cys 아미노산은 위치 126, 128, 134, 136, 139, 168, 170, 171, 또는 173(EU 번호)에서 Cys 아미노산으로 치환된다. 일부 구현예에서, 항원 결합 영역에서의 경쇄 CL 내의 비-Cys 아미노산은 위치 114, 116, 118, 124, 160, 162, 또는

164(EU 번호)에서 Cys 아미노산으로 치환된다.

[0081] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4)의 CH1-CL[인터페이스]에서 중쇄 CH1 내의 비-Cys 아미노산은 위치 126(EU 번호)에서 Cys 아미노산으로 치환되고, 경쇄 CL 내의 비-Cys 아미노산은 위치 124(EU 번호)에서 Cys 아미노산으로 치환된다.

[0082] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4)의 CH1-CL[인터페이스]에서 중쇄 CH1 내의 비-Cys 아미노산은 위치 168(EU 번호)에서 Cys 아미노산으로 치환되고, 경쇄 CL 내의 비-Cys 아미노산은 위치 164(EU 번호)에서 Cys 아미노산으로 치환된다.

[0083] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4)의 CH1-CL[인터페이스]에서 중쇄 CH1 내의 비-Cys 아미노산은 위치 170(EU 번호)에서 Cys 아미노산으로 치환되고, 경쇄 CL 내의 비-Cys 아미노산은 위치 162 또는 164(EU 번호)에서 Cys 아미노산으로 치환된다.

[0084] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4)의 CH1-CL[인터페이스]에서 중쇄 CH1 내의 비-Cys 아미노산은 위치 173(EU 번호)에서 Cys 아미노산으로 치환되고, 경쇄 CL 내의 비-Cys 아미노산은 위치 160 또는 162(EU 번호)에서 Cys 아미노산으로 치환된다.

[0085] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4)의 CH1-CL[인터페이스]에서 중쇄 CH1 내의 비-Cys 아미노산은 위치 128(EU 번호)에서 Cys 아미노산으로 치환되고, 경쇄 CL 내의 비-Cys 아미노산은 위치 118(EU 번호)에서 Cys 아미노산으로 치환된다.

[0086] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4)의 CH1-CL[인터페이스]에서 중쇄 CH1 내의 비-Cys 아미노산은 위치 134(EU 번호)에서 Cys 아미노산으로 치환되고, 경쇄 CL 내의 비-Cys 아미노산은 위치 116(EU 번호)에서 Cys 아미노산으로 치환된다.

[0087] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4)의 CH1-CL[인터페이스]에서 중쇄 CH1 내의 비-Cys 아미노산은 위치 136(EU 번호)에서 Cys 아미노산으로 치환되고, 경쇄 CL 내의 비-Cys 아미노산은 위치 114(EU 번호)에서 Cys 아미노산으로 치환된다.

[0088] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4)의 CH1-CL[인터페이스]에서 중쇄 CH1 내의 비-Cys 아미노산은 위치 171(EU 번호)에서 Cys 아미노산으로 치환되고, 경쇄 CL 내의 비-Cys 아미노산은 위치 162(EU 번호)에서 Cys 아미노산으로 치환된다.

[0089] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4)의 CH1-CL[인터페이스]에서 중쇄 CH1 내의 비-Cys 아미노산은 위치 139(EU 번호)에서 Cys 아미노산으로 치환되고, 경쇄 CL 내의 비-Cys 아미노산은 위치 116(EU 번호)에서 Cys 아미노산으로 치환된다.

[0090] 일부 양태에서, 비-Cys 아미노산은 자연 발생 및/또는 비-고전적 아미노산을 포함한다. 자연 발생 비-Cys 아미노산은 Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Ser, Thr, Met, His, Lys, Arg, Glu, Asp, Gln, Asp, Phe, Tyr, 및 Trp를 포함한다. 비-고전적 아미노산은 때때로 세포 발현 시스템(예를 들어, 원핵 세포 및/또는 진핵 세포 발현 시스템)을 통해 혼입될 수 있다. 비-고전적 아미노산의 예는 오르니틴, 디아미노부티르산, 노르류신, 피릴알라닌, 티에닐알라닌, 나프틸알라닌, 및 페닐글리신을 포함한다.

[0091] 일부 구현예에서, 이황화 결합 재형성 돌연변이는 항원 결합 영역의 CH1에서 F126C를 포함하고 CL에서 Q124C(EU 번호)를 포함한다.

[0092] 일부 구현예에서, 이황화 결합 재형성 돌연변이는 항원 결합 영역의 CH1에서 H168C를 포함하고 CL에서 T164C(EU 번호)를 포함한다.

[0093] 일부 구현예에서, 이황화 결합 재형성 돌연변이는 항원 결합 영역의 CH1에서 HF170C를 포함하고 CL에서 T164C(EU 번호)를 포함한다.

[0094] 일부 구현예에서, 이황화 결합 재형성 돌연변이는 항원 결합 영역의 CH1에서 HF170C를 포함하고 CL에서 S162C(EU 번호)를 포함한다.

[0095] 일부 구현예에서, 이황화 결합 재형성 돌연변이는 항원 결합 영역의 CH1에서 V173C를 포함하고 CL에서 S162C(EU 번호)를 포함한다.

[0096] 일부 구현예에서, 이황화 결합 재형성 돌연변이는 항원 결합 영역의 CH1에서 V173C를 포함하고 CL에서 Q160C(EU

번호)를 포함한다.

[0097] 일부 구현예에서, 이황화 결합 재형성 돌연변이는 항원 결합 영역의 CH1에서 L128C를 포함하고 CL에서 F118C(EU 번호)를 포함한다.

[0098] 일부 구현예에서, 이황화 결합 재형성 돌연변이는 항원 결합 영역의 CH1에서 S134C를 포함하고 CL에서 F116C(EU 번호)를 포함한다.

[0099] 일부 구현예에서, 이황화 결합 재형성 돌연변이는 항원 결합 영역의 CH1에서 S136C를 포함하고 CL에서 S114C(EU 번호)를 포함한다.

[0100] 일부 구현예에서, 이황화 결합 재형성 돌연변이는 항원 결합 영역의 CH1에서 P171C를 포함하고 CL에서 S162C(EU 번호)를 포함한다.

[0101] 일부 구현예에서, 이황화 결합 재형성 돌연변이는 항원 결합 영역의 CH1에서 T139C를 포함하고 CL에서 F116C(EU 번호)를 포함한다.

[0102] 따라서, 본 개시의 일 구현예에서, 본 개시는 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원 결합 영역, 및 임의적으로 다른 항원 결합 영역을 포함하는 결합 분자의 유형, 예를 들어 다중특이적 항체에 관한 것으로서, 여기서 제1 항원 결합 영역은 제1 CH1 및 제1 CL을 포함하며,

[0103] (i) 제1 CH1은 F126C 돌연변이를 포함하고, 제1 CL은 Q124C 돌연변이(EU 번호)를 포함하거나;

[0104] (ii) 제1 CH1은 H168C 돌연변이를 포함하고, 제1 CL은 T164C 돌연변이(EU 번호)를 포함하거나;

[0105] (iii) 제1 CH1은 F170C 돌연변이를 포함하고, 제1 CL은 T164C 돌연변이(EU 번호)를 포함하거나;

[0106] (iv) 제1 CH1은 F170C 돌연변이를 포함하고, 제1 CL은 S162C 돌연변이(EU 번호)를 포함하거나;

[0107] (v) 제1 CH1은 V173C 돌연변이를 포함하고, 제1 CL은 S162C 돌연변이(EU 번호)를 포함하거나;

[0108] (vi) 제1 CH1은 V173C 돌연변이를 포함하고, 제1 CL은 Q160C 돌연변이(EU 번호)를 포함하거나;

[0109] (vii) 제1 CH1은 L128C 돌연변이를 포함하고, 제1 CL은 F118C 돌연변이(EU 번호)를 포함하거나;

[0110] (viii) 제1 CH1은 S134C 돌연변이를 포함하고, 제1 CL은 F116C 돌연변이(EU 번호)를 포함하거나;

[0111] (ix) 제1 CH1은 S136C 돌연변이를 포함하고, 제1 CL은 S114C 돌연변이(EU 번호)를 포함하거나;

[0112] (x) 제1 CH1은 P171C 돌연변이를 포함하고, 제1 CL은 S162C 돌연변이(EU 번호)를 포함하거나;

[0113] (xi) 제1 CH1은 T139C 돌연변이를 포함하고, 제1 CL은 F116C 돌연변이(EU 번호)를 포함한다.

[0114] 일부 구현예에서, CH1은 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4, 바람직하게는 IgG1 또는 IgG4로부터 유래한다. 일부 구현예에서, CL은 카파 경쇄 또는 ë 경쇄로부터 유래한다.

[0115] 일부 구현예에서, 이황화 결합 재형성 돌연변이는 또한 천연 Cys를 비-Cys로 치환하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 1개 또는 2개 또는 복수의 항원 결합 영역의 중쇄 불변 영역-경쇄 불변 영역 계면에서의 사슬간 Cys는 비-Cys로 치환된다. 일부 구현예에서, 항원 결합 영역에서 CH1의 Cys 아미노산은 위치 220(EU 번호)에서 비-Cys 아미노산으로 치환된다. 일부 구현예에서, 항원 결합 영역의 IgG 중쇄 CH1 내의 Cys 아미노산은 위치 220(EU 번호)에서 비-Cys 아미노산으로 치환되거나, 항원 결합 영역의 IgG2, IgG3, 또는 IgG4 중쇄 CH1 내의 Cys는 위치 131(EU 번호)에서 비-Cys 아미노산으로 치환된다. 일부 구현예에서, 항원 결합 영역에서의 경쇄 CL 내의 Cys 아미노산은 위치 214(EU 번호)에서 비-Cys 아미노산으로 치환된다. 일부 구현예에서, 항원 결합 영역에서의 IgG1 중쇄 CH1 내의 Cys 아미노산은 위치 220(EU 번호)에서 비-Cys 아미노산으로 치환되고, 경쇄 CL 내의 Cys 아미노산은 위치 214에서 비-Cys 아미노산으로 치환되거나, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 중쇄 CH1 영역에서의 Cys 아미노산은 위치 131(EU 번호)에서 비-Cys 아미노산으로 치환되고, 경쇄 CL 내의 Cys 아미노산은 위치 214(EU 번호)에서 비-Cys 아미노산으로 치환된다. Cys에서 비-Cys로의 예시적인 돌연변이는, 예를 들어 CN104011221B에 기술되어 있다. 일부 구현예에서, Cys는 Ser, Ala, 또는 Val, 예를 들어 Ser로 치환된다.

[0116] 일부 구현예에서, 이황화 결합 재형성 돌연변이는 항원 결합 영역의 CH1에 C220S/A/V(IgG1 아형, 또는 IgG2, IgG3, 또는 IgG4의 C131S 상응하는 위치에서 C131S/A/V를 포함함)를 포함하고, CL에 C214S/A/V(EU 번호)를 포함한다.

[0117] 따라서, 본 개시의 일 구현예에서, 본 개시는 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원 결합 영역을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것으로서, 여기서 제1 항원 결합 영역은 CH1 및 CL을 포함하며,

[0118] (i) 제1 CH1은 F126C 돌연변이를 포함하고, 제1 CL은 Q124C 돌연변이(EU 번호)를 포함하거나;

[0119] (ii) 제1 CH1은 H168C 돌연변이를 포함하고, 제1 CL은 T164C 돌연변이(EU 번호)를 포함하거나;

[0120] (iii) 제1 CH1은 F170C 돌연변이를 포함하고, 제1 CL은 T164C 돌연변이(EU 번호)를 포함하거나;

[0121] (iv) 제1 CH1은 F170C 돌연변이를 포함하고, 제1 CL은 S162C 돌연변이(EU 번호)를 포함하거나;

[0122] (v) 제1 CH1은 V173C 돌연변이를 포함하고, 제1 CL은 S162C 돌연변이(EU 번호)를 포함하거나;

[0123] (vi) 제1 CH1은 V173C 돌연변이를 포함하고, 제1 CL은 Q160C 돌연변이(EU 번호)를 포함하거나;

[0124] (vii) 제1 CH1은 L128C 돌연변이를 포함하고, 제1 CL은 F118C 돌연변이(EU 번호)를 포함하거나;

[0125] (viii) 제1 CH1은 S134C 돌연변이를 포함하고, 제1 CL은 F116C 돌연변이(EU 번호)를 포함하거나;

[0126] (ix) 제1 CH1은 S136C 돌연변이를 포함하고, 제1 CL은 S114C 돌연변이(EU 번호)를 포함하거나;

[0127] (x) 제1 CH1은 P171C 돌연변이를 포함하고, 제1 CL은 S162C 돌연변이(EU 번호)를 포함하거나;

[0128] (xi) 제1 CH1은 T139C 돌연변이를 포함하고, 제1 CL은 F116C 돌연변이(EU 번호)를 포함하거나;

[0129] CH1은 또한 C220S/A/V 돌연변이(또는 상응하는 C131S/A/V)를 포함하고, CL은 또한 C214S/A/V 돌연변이(EU 번호)를 포함하거나;

[0130] 바람직하게는, CH1은 또한 C220S(EU 번호)를 포함하고, CL은 또한 C214S(EU 번호)를 포함한다.

[0131] 일부 구현예에서, 제1 항원 결합 영역은 CH1 및 CL을 포함하고, CH1은 T139C 및 C220S 돌연변이(또는 상응하는 C131S)를 포함하고, CL은 F116C 및 C214S 돌연변이(EU 번호)를 포함한다.

[0132] 일부 구현예에서, 제1 항원 결합 영역은 CH1 및 CL을 포함하고, CH1은 F126C 및 C220S 돌연변이(또는 상응하는 C131S)를 포함하고, CL은 Q124C 및 C214S 돌연변이(EU 번호)를 포함한다.

[0133] 일부 구현예에서, 제1 항원 결합 영역은 CH1 및 CL을 포함하고, CH1은 H168C 및 C220S 돌연변이(또는 상응하는 C131S)를 포함하고, CL은 T164C 및 C214S 돌연변이(EU 번호)를 포함한다.

[0134] 일부 구현예에서, 제1 항원 결합 영역은 CH1 및 CL을 포함하며, CH1은 F170C 및 C220S 돌연변이(또는 상응하는 C131S)를 포함하고, CL은 T164C 및 C214S 돌연변이(EU 번호)를 포함한다.

[0135] 일부 구현예에서, 제1 항원 결합 영역은 CH1 및 CL을 포함하며, CH1은 F170C 및 C220S 돌연변이(또는 상응하는 C131S)를 포함하고, CL은 S162C 및 C214S 돌연변이(EU 번호)를 포함한다.

[0136] 일부 구현예에서, 제1 항원 결합 영역은 CH1 및 CL을 포함하고, CH1은 V173C 및 C220S 돌연변이(또는 상응하는 C131S)를 포함하고, CL은 S162C 및 C214S 돌연변이(EU 번호)를 포함한다.

[0137] 일부 구현예에서, 제1 항원 결합 영역은 CH1 및 CL을 포함하고, CH1은 V173C 및 C220S 돌연변이(또는 상응하는 C131S)를 포함하고, CL은 Q160C 및 C214S 돌연변이(EU 번호)를 포함한다.

[0138] 일부 구현예에서, 제1 항원 결합 영역은 CH1 및 CL을 포함하며, CH1은 L128C 및 C220S 돌연변이(또는 상응하는 C131S)를 포함하고, CL은 F118C 및 C214S 돌연변이(EU 번호)를 포함한다.

[0139] 일부 구현예에서, 제1 항원 결합 영역은 CH1 및 CL을 포함하며, CH1은 S134C 및 C220S 돌연변이(또는 상응하는 C131S)를 포함하고, CL은 F116C 및 C214S 돌연변이(EU 번호)를 포함한다.

[0140] 일부 구현예에서, 제1 항원 결합 영역은 CH1 및 CL을 포함하고, CH1은 S136C 및 C220S 돌연변이(또는 상응하는 C131S)를 포함하고, CL은 S114C 및 C214S 돌연변이(EU 번호)를 포함한다.

[0141] 일부 구현예에서, 제1 항원 결합 영역은 CH1 및 CL을 포함하고, CH1은 P171C 및 C220S 돌연변이(또는 상응하는 C131S)를 포함하고, CL은 S162C 및 C214S 돌연변이(EU 번호)를 포함한다.

[0142] 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 1에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, F126C를 포함한다. 일부 구현예에서, CH1은 서

열번호 1에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 129에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, F126C 및 C220S를 포함한다. 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 129에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0143] 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 132에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, H168C를 포함한다. 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 132에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 133에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, H168C 및 C220S를 포함한다. 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 133에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0144] 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 134에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, F170C를 포함한다. 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 134에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 135에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, F170C 및 C220S를 포함한다. 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 135에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0145] 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 136에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, V173C를 포함한다. 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 136에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 137에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, V173C 및 C220S를 포함한다. 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 137에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0146] 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 138에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, L128C를 포함한다. 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 138에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 139에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, L128C 및 C220S를 포함한다. 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 139에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0147] 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 140에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, S134C를 포함한다. 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 140에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 141에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, S134C 및 C220S를 포함한다. 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 141에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0148] 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 142에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, S136C를 포함한다. 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 142에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 143에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, S136C 및 C220S를 포함한다. 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 143에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0149] 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 144에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, P171C를 포함한다. 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 144에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 145에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, P171C 및 C220S를 포함한다. 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 145에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0150] 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 146에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,

97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, T139C를 포함한다. 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 146에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 147에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, T139C 및 C220S를 포함한다. 일부 구현예에서, CH1은 서열번호 147에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0151] 일부 구현예에서, CL은 서열번호 2에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, Q124C를 포함한다. 일부 구현예에서, CL은 서열번호 2에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, CL은 서열번호 128에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, Q124C 및 C124S를 포함한다. 일부 구현예에서, CL은 서열번호 128에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0152] 일부 구현예에서, CL은 서열번호 148에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, T164C를 포함한다. 일부 구현예에서, CL은 서열번호 148에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, CL은 서열번호 149에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, T164C 및 C124S를 포함한다. 일부 구현예에서, CL은 서열번호 149에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0153] 일부 구현예에서, CL은 서열번호 150에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, S162C를 포함한다. 일부 구현예에서, CL은 서열번호 150에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, CL은 서열번호 151에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, S162C 및 C124S를 포함한다. 일부 구현예에서, CL은 서열번호 151에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0154] 일부 구현예에서, CL은 서열번호 152에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, Q160C를 포함한다. 일부 구현예에서, CL은 서열번호 152에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, CL은 서열번호 35에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, Q160C 및 C124S를 포함한다. 일부 구현예에서, CL은 서열번호 35에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0155] 일부 구현예에서, CL은 서열번호 36에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, F118C를 포함한다. 일부 구현예에서, CL은 서열번호 36에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, CL은 서열번호 37에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, F118C 및 C124S를 포함한다. 일부 구현예에서, CL은 서열번호 37에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0156] 일부 구현예에서, CL은 서열번호 38에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, F116C를 포함한다. 일부 구현예에서, CL은 서열번호 38에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, CL은 서열번호 98에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, F116C 및 C124S를 포함한다. 일부 구현예에서, CL은 서열번호 98에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0157] 일부 구현예에서, CL은 서열번호 99에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, S114C를 포함한다. 일부 구현예에서, CL은 서열번호 99에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, CL은 서열번호 100에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, S114C 및 C124S를 포함한다. 일부 구현예에서, CL은 서열번호 100에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0158] **I-2 전하 돌연변이**

[0159] 전하 돌연변이는 상동성 경쇄 및 중쇄 페어링을 강제하여, 2개의 표적 결합 영역의 경쇄 및 중쇄 사이의 불일치를 방지하는 효과적인 전략이며, 여기서 아미노산 쌍은 중쇄 및 경쇄의 접촉 표면 상에서 발견되고 반대 전하를 갖는 아미노산으로 돌연변이되어, 반대 전하 유인의 원리에 기초하여 상동성 페어링을 촉진한다.

[0160] 일 구현예에서, 본 개시의 결합 분자, 예를 들어 항체(예를 들어, 다중특이적 항체, 예를 들어, 이중특이적 항체)는 전하 돌연변이를 포함한다. 일부 구현예에서, 전하 돌연변이는 적어도 하나의 항원 결합 영역의 중쇄 및 경쇄의 접촉 표면 상의 아미노산 쌍의 돌연변이이며, 여기서 아미노산 쌍 내의 2개의 아미노산은 반대 전하로 돌연변이된다. 일부 구현예에서, 아미노산 쌍은 하나 또는 복수의 다음 특징을 갖는다:

[0161] a. 아미노산 쌍은 항원 결합 영역의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 계면에 위치한 보존적 아미노산 쌍이고/이거나;

[0162] b. 아미노산 쌍의 α 탄소 원자 사이의 거리는 12 Å 미만이고/이거나;

[0163] c. 아미노산 쌍의 측쇄는 서로 대면한다.

[0164] 일부 구현예에서, 전하 돌연변이는 다음의 위치; 중쇄 가변 영역의 위치 39 및 경쇄 가변 영역의 위치 38, 중쇄 가변 영역의 위치 45 및 경쇄 가변 영역의 위치 87, 중쇄 가변 영역의 위치 45 및 경쇄 가변 영역의 위치 44, 중쇄 가변 영역의 위치 91 및 경쇄 가변 영역의 위치 43, 또는 중쇄 가변 영역의 위치 91 및 경쇄 가변 영역의 위치 44(Kabat 번호)로부터 선택된 아미노산 쌍 상의 2개의 아미노산을 반대 전하를 갖는 아미노산으로 돌연변이시키는 것을 포함한다.

[0165] 일부 구현예에서, 전하 돌연변이는 다음 위치; 중쇄 가변 영역의 Q39 및 경쇄 가변 영역의 Q38, 중쇄 가변 영역의 L45 및 경쇄 가변 영역의 Y87, 중쇄 가변 영역의 L45 및 경쇄 가변 영역의 P44, 중쇄 가변 영역의 Y91 및 경쇄 가변 영역의 A43, 또는 중쇄 가변 영역의 Y91 및 경쇄 가변 영역의 P44(Kabat 번호)로부터 선택된 아미노산 쌍 상의 2개의 아미노산을 반대 전하를 갖는 아미노산으로 돌연변이시키는 것을 포함한다.

[0166] 일부 구현예에서, 상이한 항원에 결합하기 위한 항원 결합 영역에서 각각 하나 또는 복수의 아미노산 쌍의 위치는 전하 돌연변이를 포함한다. 일부 구현예에서, 상이한 항원에 결합하기 위해 항원 결합 영역에서 전하 돌연변이를 포함하는 아미노산 위치는 동일하거나 상이할 수 있다. 전하 돌연변이를 포함하는 아미노산 위치가 동일한 경우, 상이한 항원과의 결합을 위한 항원 결합 영역에서 아미노산 쌍의 돌연변이된 아미노산은 상이하다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원 결합 영역의 하나 또는 복수의 아미노산 쌍의 동일한 위치는 전하 돌연변이를 포함하지만, 하나의 항원 결합 영역에서 아미노산 쌍 상의 전하 돌연변이는 다른 항원 결합 영역에서 아미노산 쌍 상의 전하 돌연변이와 상이하다. 예를 들어, 동일한 위치에서, 제1 항원 결합 영역에서 돌연변이된 아미노산에 의해 운반되는 전하는 제2 항원 결합 영역에서 돌연변이된 아미노산에 의해 운반되는 전하의 반대이다. 예를 들어, 제1 항원 결합 영역에서, 위치 X1에서의 중쇄 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 돌연변이되는 반면, 위치 X2에서의 경쇄 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 돌연변이된다. 동시에 제2 항원 결합 영역에서, 위치 X1에서의 중쇄 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 돌연변이되는 반면, 위치 X2에서의 경쇄 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 돌연변이되며, 여기서 제1 항원 결합 영역에서 양전하를 갖는 아미노산은 제2 항원 결합 영역에서 양전하를 갖는 아미노산과 동일하거나 상이할 수 있고, 예를 들어, 이들은 동일하고; 제1 항원 결합 영역에서 음전하를 갖는 아미노산은 제2 항원 결합 영역에서 음전하를 갖는 아미노산과 동일하거나 상이할 수 있고, 예를 들어, 이들은 동일하다.

[0167] 일부 구현예에서, 아미노산 쌍의 중쇄 가변 영역 내의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 경쇄 가변 영역 내의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환된다. 일부 구현예에서, 아미노산 쌍의 중쇄 가변 영역 내의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 경쇄 가변 영역 내의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환된다.

[0168] 일부 구현예에서, 제1 항원 결합 영역에서, 중쇄 가변 영역의 위치 39에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 경쇄 가변 영역의 위치 38에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되고/되거나; 제2 항원 결합 영역에서, 중쇄 가변 영역의 위치 39에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 경쇄 가변 영역의 위치 38에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환된다.

[0169] 일부 구현예에서, 제1 항원 결합 영역에서, 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 경쇄 가변 영역의 위치 87에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되고/되거나;

제2 항원 결합 영역에서, 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 경쇄 가변 영역의 위치 87에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환된다.

[0170] 일부 구현예에서, 제1 항원 결합 영역에서, 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되고/되거나; 제2 항원 결합 영역에서, 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환된다.

[0171] 일부 구현예에서, 제1 항원 결합 영역에서, 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 경쇄 가변 영역의 위치 43에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되고/되거나; 제2 항원 결합 영역에서, 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 경쇄 가변 영역의 위치 43에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환된다.

[0172] 일부 구현예에서, 제1 항원 결합 영역에서, 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되고/되거나; 제2 항원 결합 영역에서, 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환된다.

[0173] 일부 구현예에서, 양전하를 갖는 아미노산은 K, R, 및 H로부터 선택되고/되거나, 음전하를 갖는 아미노산은 E 또는 D로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 양전하를 갖는 아미노산은 K 및 R로부터 선택되고/되거나, 음전하를 갖는 아미노산은 E 또는 D로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 양전하를 갖는 아미노산은 K이고/이거나, 음전하를 갖는 아미노산은 D이다.

[0174] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역에서, 중쇄 가변 영역의 위치 39에서의 아미노산은 K로 치환되고, 경쇄 가변 영역의 위치 38에서의 아미노산은 D로 치환된다. 일부 구현예에서, 항원 결합 영역에서, 중쇄 가변 영역의 위치 39에서의 아미노산은 D로 치환되고, 경쇄 가변 영역의 위치 38에서의 아미노산은 K로 치환된다.

[0175] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역에서, 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 K로 치환되고, 경쇄 가변 영역의 위치 87에서의 아미노산은 D로 치환된다. 일부 구현예에서, 항원 결합 영역에서, 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 D로 치환되고, 경쇄 가변 영역의 위치 87에서의 아미노산은 K로 치환된다.

[0176] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역에서, 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 K로 치환되고, 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 D로 치환된다. 일부 구현예에서, 항원 결합 영역에서, 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 D로 치환되고, 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 K로 치환된다.

[0177] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역에서, 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 K로 치환되고, 경쇄 가변 영역의 위치 43에서의 아미노산은 D로 치환된다. 일부 구현예에서, 항원 결합 영역에서, 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 D로 치환되고, 경쇄 가변 영역의 위치 43에서의 아미노산은 K로 치환된다.

[0178] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역에서, 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 K로 치환되고, 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 D로 치환된다. 일부 구현예에서, 항원 결합 영역에서, 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 D로 치환되고, 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 K로 치환된다.

[0179] 일부 구현예에서, 본 개시의 결합 분자, 예를 들어 항체, 예컨대 다중특이적 항체, 예를 들어 이중특이적 항체는 다음으로부터 선택된 치환을 포함하는 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원 결합 영역을 포함한다:

[0180] (i). 제1 항원 결합 영역에서, 중쇄 가변 영역의 위치 39에서의 아미노산은 K로 치환되고, 경쇄 가변 영역의 위치 38에서의 아미노산은 D로 치환되는 반면, 제2 항원 결합 영역에서, 중쇄 가변 영역의 위치 39에서의 아미노산은 D로 치환되고, 경쇄 가변 영역의 위치 38에서의 아미노산은 K로 치환되거나;

[0181] (ii). 제1 항원 결합 영역에서, 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 K로 치환되고, 경쇄 가변 영역의 위치 87에서의 아미노산은 D로 치환되는 반면, 제2 항원 결합 영역에서, 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 D로 치환되고, 경쇄 가변 영역의 위치 87에서의 아미노산은 K로 치환되거나;

[0182] (iii). 제1 항원 결합 영역에서, 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 K로 치환되고, 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 D로 치환되는 반면, 제2 항원 결합 영역에서, 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 D로 치환되고, 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 K로 치환되거나;

[0183] (iv). 제1 항원 결합 영역에서, 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 K로 치환되고, 경쇄 가변 영역의

위치 43에서의 아미노산은 D로 치환되는 반면, 제2 항원 결합 영역에서, 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 D로 치환되고, 경쇄 가변 영역의 위치 43에서의 아미노산은 K로 치환되거나;

[0184] (v). 제1 항원 결합 영역에서, 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 K로 치환되고, 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 D로 치환되는 반면, 제2 항원 결합 영역에서, 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 D로 치환되고, 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 K로 치환된다.

[0185] **I-3 조합 돌연변이**

[0186] 일부 구현예에서, 본 개시의 결합 분자, 예를 들어 항체, 예를 들어 다중특이적 항체, 예를 들어 이중특이적 항체는 이황화 결합 재형성 돌연변이 및 전하 돌연변이를 포함하는 제1 표적 결합 영역(항원 결합 영역) 및 제2 표적 결합 영역(항원 결합 영역)을 포함한다.

[0187] 일부 구현예에서, 본 개시는 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원 결합 영역을 포함하는 항체 유형, 예를 들어 다중특이적 항체, 예를 들어 이중특이적 항체에 관한 것으로서, 여기서 제1 항원 결합 영역은 중쇄 가변 영역, 중쇄 불변 영역 CH1, 경쇄 가변 영역, 및 경쇄 불변 영역 CL을 포함하고, 제2 항원 결합 영역은 중쇄 가변 영역 VH 및 경쇄 가변 영역 VL을 포함한다.

[0188] 일부 구현예에서, 제1 항원 결합 영역은 CH1-CL 계면에서 이황화 결합 재형성 돌연변이를 포함하고, VH 및 VL에서 전하 돌연변이를 포함한다.일부 구현예에서, 제1 항원 결합 영역은 CH1-CL 계면에서 이황화 결합 재형성 돌연변이를 포함하고, VH 및 VL에서 전하 돌연변이를 포함하며; 제2 항원 결합 영역은 VH 및 VL에서 전하 돌연변이를 포함한다.

[0189] 일부 구현예에서, 제1 항원 결합 영역은 다음으로부터 선택된 돌연변이 조합을 포함한다:

[0190]

	중쇄 VH 돌연변이	중쇄 CH1 돌연변이	경쇄 VL 돌연변이	경쇄 CL 돌연변이
조합 1	Q39K	F126C, C220S	Q38D	Q124C, C214S
	Q39K	H168C, C220S	Q38D	T164C, C214S
	Q39K	F170C, C220S	Q38D	T164C, C214S
	Q39K	F170C, C220S	Q38D	S162C, C214S
	Q39K	V173C, C220S	Q38D	S162C, C214S
	Q39K	V173C, C220S	Q38D	Q160C, C214S
	Q39K	L128C, C220S	Q38D	F118C, C214S
	Q39K	S134C, C220S	Q38D	F116C, C214S
	Q39K	S136C, C220S	Q38D	S114C, C214S
	Q39K	P171C, C220S	Q38D	S162C, C214S
	Q39K	T139C, C220S	Q38D	F116C, C214S
조합 2	L45K	F126C, C220S	Y87D	Q124C, C214S
	L45K	H168C, C220S	Y87D	T164C, C214S
	L45K	F170C, C220S	Y87D	T164C, C214S
	L45K	F170C, C220S	Y87D	S162C, C214S
	L45K	V173C, C220S	Y87D	S162C, C214S
	L45K	V173C, C220S	Y87D	Q160C, C214S
	L45K	L128C, C220S	Y87D	F118C, C214S
	L45K	S134C, C220S	Y87D	F116C, C214S
	L45K	S136C, C220S	Y87D	S114C, C214S
	L45K	P171C, C220S	Y87D	S162C, C214S
	L45K	T139C, C220S	Y87D	F116C, C214S
조합 3	L45K	F126C, C220S	P44D	Q124C, C214S
	L45K	H168C, C220S	P44D	T164C, C214S
	L45K	F170C, C220S	P44D	T164C, C214S
	L45K	F170C, C220S	P44D	S162C, C214S

	L45K	V173C, C220S	P44D	S162C, C214S
	L45K	V173C, C220S	P44D	Q160C, C214S
	L45K	L128C, C220S	P44D	F118C, C214S
	L45K	S134C, C220S	P44D	F116C, C214S
	L45K	S136C, C220S	P44D	S114C, C214S
	L45K	P171C, C220S	P44D	S162C, C214S
	L45K	T139C, C220S	P44D	F116C, C214S
조합 4	Y91K	F126C, C220S	A43D	Q124C, C214S
	Y91K	H168C, C220S	A43D	T164C, C214S
	Y91K	F170C, C220S	A43D	T164C, C214S
	Y91K	F170C, C220S	A43D	S162C, C214S
	Y91K	V173C, C220S	A43D	S162C, C214S
	Y91K	V173C, C220S	A43D	Q160C, C214S
	Y91K	L128C, C220S	A43D	F118C, C214S
	Y91K	S134C, C220S	A43D	F116C, C214S
	Y91K	S136C, C220S	A43D	S114C, C214S
	Y91K	P171C, C220S	A43D	S162C, C214S
	Y91K	T139C, C220S	A43D	F116C, C214S
조합 5	Y91K	F126C, C220S	P44D	Q124C, C214S
	Y91K	H168C, C220S	P44D	T164C, C214S
	Y91K	F170C, C220S	P44D	T164C, C214S
	Y91K	F170C, C220S	P44D	S162C, C214S
	Y91K	V173C, C220S	P44D	S162C, C214S
	Y91K	V173C, C220S	P44D	Q160C, C214S
	Y91K	L128C, C220S	P44D	F118C, C214S
	Y91K	S134C, C220S	P44D	F116C, C214S
	Y91K	S136C, C220S	P44D	S114C, C214S
	Y91K	P171C, C220S	P44D	S162C, C214S

[0191]

	Y91K	T139C, C220S	P44D	F116C, C214S

[0192]

[0193] 일부 구현예에서, 제2 항원 결합 영역은 다음으로부터 선택된 돌연변이 조합을 포함한다:

	중쇄 VH 돌연변이	경쇄 VL 돌연변이
조합 1	Q39D	Q38K
조합 2	L45D	Y87K
조합 3	L45D	P44K
조합 4	Y91D	A43K
조합 5	Y91D	P44K

[0194]

[0195] 일부 구현예에서, 본 개시는 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원 결합 영역을 포함하는 항체의 유형, 예를 들어, 다중특이적 항체, 예를 들어, 이중특이적 항체에 관한 것으로서, 여기서 제1 항원 결합 영역은 중쇄 가변 영역 VH, 중쇄 불변 영역 CH1, 경쇄 가변 영역 VL, 및 경쇄 불변 영역 CL을 포함하고, 제2 항원 결합 영역은 중쇄 가변 영역 VH 및 경쇄 가변 영역 VL을 포함하며, 여기서 항체는 다음의 돌연변이 조합을 포함한다:

	제 1 항원 결합 영역				제 2 항원 결합 영역	
	중쇄 VH 돌연변이	중쇄 CH1 돌연변이	경쇄 VL 돌연변이	경쇄 CL 돌연변이	중쇄 VH 돌연변이	경쇄 VL 돌연변이
조합 1	Q39K	F126C, C220S	Q38D	Q124C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	H168C, C220S	Q38D	T164C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	F170C, C220S	Q38D	T164C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	F170C, C220S	Q38D	S162C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	V173C, C220S	Q38D	S162C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	V173C, C220S	Q38D	Q160C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	L128C, C220S	Q38D	F118C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	S134C, C220S	Q38D	F116C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	S136C, C220S	Q38D	S114C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	P171C, C220S	Q38D	S162C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	T139C, C220S	Q38D	F116C, C214S	Q39D	Q38K
조합 2	L45K	F126C, C220S	Y87D	Q124C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	H168C, C220S	Y87D	T164C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	F170C, C220S	Y87D	T164C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	F170C, C220S	Y87D	S162C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	V173C, C220S	Y87D	S162C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	V173C, C220S	Y87D	Q160C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	L128C, C220S	Y87D	F118C, C214S	L45D	Y87K

[0196]

	L45K	S134C, C220S	Y87D	F116C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	S136C, C220S	Y87D	S114C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	P171C, C220S	Y87D	S162C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	T139C, C220S	Y87D	F116C, C214S	L45D	Y87K
조합 3	L45K	F126C, C220S	P44D	Q124C, C214S	L45D	P44K
	L45K	H168C, C220S	P44D	T164C, C214S	L45D	P44K
	L45K	F170C, C220S	P44D	T164C, C214S	L45D	P44K
	L45K	F170C, C220S	P44D	S162C, C214S	L45D	P44K
	L45K	V173C, C220S	P44D	S162C, C214S	L45D	P44K
	L45K	V173C, C220S	P44D	Q160C, C214S	L45D	P44K
	L45K	L128C, C220S	P44D	F118C, C214S	L45D	P44K
	L45K	S134C, C220S	P44D	F116C, C214S	L45D	P44K
	L45K	S136C, C220S	P44D	S114C, C214S	L45D	P44K
	L45K	P171C, C220S	P44D	S162C, C214S	L45D	P44K
	L45K	T139C, C220S	P44D	F116C, C214S	L45D	P44K
조합 4	Y91K	F126C, C220S	A43D	Q124C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	H168C, C220S	A43D	T164C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	F170C, C220S	A43D	T164C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	F170C, C220S	A43D	S162C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	V173C, C220S	A43D	S162C, C214S	Y91D	A43K

[0197]

	Y91K	V173C, C220S	A43D	Q160C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	L128C, C220S	A43D	F118C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	S134C, C220S	A43D	F116C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	S136C, C220S	A43D	S114C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	P171C, C220S	A43D	S162C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	T139C, C220S	A43D	F116C, C214S	Y91D	A43K
조합 5	Y91K	F126C, C220S	P44D	Q124C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	H168C, C220S	P44D	T164C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	F170C, C220S	P44D	T164C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	F170C, C220S	P44D	S162C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	V173C, C220S	P44D	S162C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	V173C, C220S	P44D	Q160C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	L128C, C220S	P44D	F118C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	S134C, C220S	P44D	F116C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	S136C, C220S	P44D	S114C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	P171C, C220S	P44D	S162C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	T139C, C220S	P44D	F116C, C214S	Y91D	P44K

[0198]

[0199] 일부 구현예에서, 항체, 예를 들어, 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체)에서, 동일한 항원에 결합하는 하나 또는 복수의 또는 모든 항원 결합 영역은 동일한 돌연변이를 포함한다.

[0200] 일부 구현예에서, 항체, 예를 들어 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체)에서, 동일한 항원에 결합하는 하나 또는 복수의 또는 모든 항원 결합 영역은 상이한 돌연변이를 포함한다.

[0201] **I-4 경쇄 불변 영역 치환**

[0202] 일부 구현예에서, 본 개시의 결합 분자, 예를 들어 항체, 예컨대 다중특이적 항체는 제1 표적 결합 영역(항원 결합 영역) 및 제2 표적 결합 영역(항원 결합 영역)을 포함하며, 여기서 하나 또는 복수의 또는 모든 제1 표적 결합 영역(항원 결합 영역)이 포함하는 경쇄 불변 영역은 카파 경쇄 불변 영역이고, 하나 또는 복수의 또는 모든 제2 표적 결합 영역이 포함하는 경쇄 불변 영역은 람다 경쇄 불변 영역이거나, 하나 또는 복수의 또는 모든 제1 표적 결합 영역(항원 결합 영역)이 포함하는 경쇄 불변 영역은 람다 경쇄 불변 영역이고, 복수의 또는 모든 제2 표적 결합 영역(항원 결합 영역) 중 하나가 포함하는 경쇄 불변 영역은 카파 경쇄 불변 영역이다.

[0203] **I-5 Fc 영역 돌연변이**

[0204] 일부 구현예에서, 본 개시의 결합 분자의 하나 또는 복수의 표적 결합 영역(항원 결합 영역), 예를 들어, 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체)와 같은 항체는 Fc 영역을 포함하며, 여기서 Fc 영역을 포함하는 것은 동일하거나 상이할 수 있다.

[0205] 일부 구현예에서, 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역은 상이하고 이종이량체화되어 이종이량체 Fc 스캐폴드를 형성할

수 있다.

[0206] 본원의 Fc 영역은 불변 영역의 면역글로불린 중쇄의 적어도 일부를 포함하고 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함할 수 있는 C-말단 영역을 지칭한다. 천연 서열 Fc 영역은 다양한 자연 발생 면역글로불린 Fc 서열, 예를 들어, 다양한 IgG 아형 및 이의 동종형의 Fc 영역을 포괄한다(문헌[Gestur Vidarsson 등, IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions, 20 October 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00520]). 일부 구현예에서, 본 개시의 Fc 영역은 항체 CH2 및 CH3을 포함한다. 일부 구현예에서, 항체 Fc 영역은 또한 N-말단에서 IgG 힌지 영역 또는 IgG 힌지 영역의 일부, 예를 들어 IgG1 힌지 영역 또는 IgG1 힌지 영역의 일부, 예를 들어 EU 넘버링에 따른 D221 내지 P230의 서열을 운반할 수 있다. 힌지 영역은 돌연변이를 함유할 수 있다.

[0207] 본원에서 달리 명시되지 않는 한, Fc 영역 내의 아미노산 잔기 수는 EU 지수로도 알려진 EU 넘버링 체계, 예컨대 문헌[Kabat, E.A. 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Version 5, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91 - 3,242]에 언급된 것들에 기초한다.

[0208] 일부 구현예에서, Fc 영역은 인간 IgG Fc, 예를 들어 인간 IgG1 Fc, 인간 IgG2 Fc, 인간 IgG3 Fc, 또는 인간 IgG4 Fc이다. 일 구현예에서, Fc 영역은 아미노산 서열 서열번호 122 또는 123을 포함하거나 이로 구성되거나, 이와 적어도 90% 동일성, 예를 들어 95%, 96%, 97%, 99% 또는 그 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는다.

[0209] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 본 개시의 다중특이적 항체의 이종이량체로서의 형성을 촉진하기 위해, 본 개시의 다중특이적 항체가 포함하는 Fc 영역은 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역의 이종이량체화에 유리한 돌연변이를 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 돌연변이는 2개의 Fc 영역의 CH3 영역 내로 도입된다.

[0210] Fc 영역 이종이량체화를 촉진하는 당업계에 공지된 방법. 예를 들어, 제1 Fc 영역의 CH3 영역 및 제2 Fc 영역의 CH3 영역은 상보적 방식으로 조작되어, 각각의 CH3 영역(또는 이를 포함하는 중쇄)은 더 이상 그 자체와 동종이량체화될 수 없지만, 상보적으로 조작된 다른 CH3 영역과 이종이량체화되도록 강제된다(제1 및 제2 Fc 영역의 CH3 영역이 이종이량체화되고 동종이량체가 2개의 제1 CH3 영역 또는 2개의 제2 CH3 영역 사이에 형성되지 않도록 함).

[0211] 바람직하게는, 노브-인투-홀 기술에 기초하여, 상응하는 노브 돌연변이 및 홀 돌연변이는 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역 내로 도입된다. 예를 들어, 이 기술에 대해서는 문헌[US 5, 731, 168; US 7, 695, 936; Ridgway 등, Prot Eng 9, 617-621 (1996) and Carter, J Immunol Meth 248, 7 - 15(2001)]를 참조한다.

[0212] 특정 구현예에서, 하나의 Fc 영역의 CH3 영역에서, 위치 366에서의 Thr 잔기는 Trp 잔기(T366W)(노브 돌연변이)로 치환되는 반면; 다른 Fc 영역의 CH3 영역에서, 위치 407에서의 Tyr 잔기는 Val 잔기(Y407V)(홀 돌연변이)로 치환되고, 임의로 위치 366에서의 Thr 잔기는 Ser 잔기(T366S)로 치환되고, 위치 407에서의 Tyr 잔기는 Val 잔기(Y407V)로 치환된다(EU 인덱스에 기초하여 넘버링됨).

[0213] 다른 구현예에서, 하나의 Fc 영역의 CH3 영역에서, 위치 366에서의 Thr 잔기는 Trp 잔기(T366W)로 치환되고, 위치 354에서의 Ser 잔기는 Cys 잔기(S354C)로 치환되거나, 위치 356에서의 Glu 잔기는 Cys 잔기(E356C)로 치환되는 반면(특히, 위치 354에서의 Ser 잔기는 Cys 잔기로 치환됨); 또 다른 Fc 영역의 CH3 영역에서, 위치 407에서의 Tyr 잔기는 Val 잔기(Y407V)(홀 돌연변이)로 치환되고, 임의적으로 위치 366에서의 Thr 잔기는 Ser 잔기(T366S)로 치환되고, 위치 368에서의 Leu 잔기는 Ala 잔기(L368A)(EU 인덱스에 기초하여 넘버링됨)로 치환되고, 임의적으로 위치 349에서의 Tyr 잔기는 Cys 잔기(Y349C)(EU 인덱스에 기초하여 넘버링됨)로 치환된다.

[0214] 특정 구현예에서, 하나의 Fc 영역은 아미노산 치환 T366W를 포함하고, 다른 Fc 영역은 아미노산 치환 T366S, L368A, 및 Y407V(EU 인덱스에 기초하여 넘버링됨)를 포함한다.

[0215] 특정 구현예에서, 하나의 Fc 영역은 아미노산 치환 S354C 및 T366W를 포함하고, 다른 Fc 영역은 아미노산 치환 Y349C, T366S, L368A, 및 Y407V(EU 인덱스에 기초하여 넘버링됨)를 포함한다.

[0216] 상응하는 돌연변이는 이노바디(Innobody) 기술에 기초하여 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역에 도입될 수 있다. 예를 들어, 이 기술에 대한 PCT/CN2021/143141을 지칭한다.

[0217] 특정 구현예에서, 제1 CH3 영역은 S364R/K 돌연변이(바람직하게는 S364R), 및 임의적으로 하나 또는 복수의 다른 돌연변이를 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 CH3 영역은 K370S/T/A/V 돌연변이(바람직하게는 K370S), 및 임

의적으로 하나 또는 복수의 다른 돌연변이를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 CH3 영역은 S364R/K 돌연변이를 포함하고, 제2 CH3 영역은 K370S/T/A/V 돌연변이를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 CH3 영역은 S364R 돌연변이를 포함하고, 제2 CH3 영역은 K370S 돌연변이를 포함한다.

[0218] 일부 구현예에서, 제1 CH3 영역은 S364R/K(바람직하게는 S364R) 및 D399K/R(바람직하게는 D399K) 돌연변이를 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 CH3 영역은 K370S/T/A/V 돌연변이(바람직하게는 K370S), 및 K409D/E(바람직하게는 K409D) 돌연변이를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 CH3 영역은 S364R/K+D399K/R을 포함하고, 제2 CH3 영역은 K370S/T/A/V+Y349T/S/A/V를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 CH3 영역은 S364R+D399K를 포함하고, 제2 CH3 영역은 K370S+Y349T를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 CH3 영역은 또한 E375N/Q(바람직하게는 E375N), 및/또는 T350V/A(바람직하게는 T350V)를 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 CH3 영역은 또한 K409D/E(바람직하게는 K409D), Q347D/E(바람직하게는 Q347D) 및/또는 T350V/A(바람직하게는 T350V)를 포함한다.

[0219] 일부 구현예에서, 제1 CH3 영역은 S364R+D399K를 포함하고, 제2 CH3 영역은 K370S+Y349T+K409D를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 CH3 영역은 또한 E357N을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 CH3 영역은 또한 Q347D를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 CH3 영역은 또한 E357N을 포함하고, 제2 CH3 영역은 또한 Q347D를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 CH3 영역 및 제2 CH3 영역은 또한 T350V를 각각 포함하거나, 둘 모두는 T350V를 포함한다.

[0220] 따라서, 일부 구현예에서, 제1 CH3 영역은 S364R+D399K를 포함하고, 제2 CH3 영역은 K370S+Y349T+K409D+Q347D를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 CH3 영역은 S364R+D399K+E357N을 포함하고, 제2 CH3 영역은 K370S+Y349T+K409D+Q347D를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 CH3 영역은 S364R+D399K+E357N+T350V를 포함하고, 제2 CH3 영역은 K370S+Y349T+K409D+Q347D+T350V를 포함한다.

[0221] 일부 구현예에서, 제1 CH3 영역은 K409E/D(바람직하게는 K409E)를 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 CH3 영역은 D399K/R(바람직하게는 D399K) 또는 K370T/S/A/V(바람직하게는 K370T)를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 CH3 영역은 K409E/D(바람직하게는 K409E)를 포함하고, 제2 CH3 영역은 D399K/R(바람직하게는 D399K)을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 CH3 영역은 또한 T411R/K(바람직하게는 T411R)를 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 CH3 영역은 또한 K370T/S/A/V(바람직하게는 K370T)를 포함한다. 일부 구현예에서, [제1] CH3 영역은 K409E/D+T411R/K를 포함하고, 제2 CH3 영역은 D399K/R+K370T/S/A/V를 포함한다. 일부 구현예에서, [제1] CH3 영역은 K409E+T411R을 포함하고, 제2 CH3 영역은 D399K+K370T를 포함한다.

[0222] 일부 특정 구현예에서, 제1 및 제2 CH3 영역은 다음의 돌연변이 조합을 갖는다:

[0223]

제 1 CH3 영역	제 2 CH3 영역
S364R, D399K, E357N, T350V	K370S, Y349T, Q347D, K409D, T350V
K409E, T411R	D399K, K370T
S364R, D399K, E357N	K370S, Y349T, Q347D, K409D
S364R, D399K	K370S, Y349T, Q347D, K409D
S364R, D399K	K370S, Y349T, K409D

[0224] 일 구현예에서, 하나의 Fc 영역의 CH3은 S364R 및 D399K 돌연변이를 포함하고, 다른 Fc 영역의 CH3 돌연변이는 Y349T, K370S, 및 K409D 돌연변이를 포함한다.

[0225] 따라서, 특정 구현예에서, 본 개시의 결합 분자, 예를 들어 항체, 예컨대 다중특이적 항체는 2개의 Fc 영역의 이종이량체화를 포함하며, 여기서

[0226] a) 하나의 Fc 영역의 폴리펩티드는 돌연변이 T366W를 포함하는 반면, 다른 Fc 영역의 폴리펩티드는 T366S, L368A, 및 Y407V를 포함하거나,

[0227] b) 하나의 Fc 영역의 폴리펩티드는 돌연변이 S354C 및 T366W를 포함하는 반면, 다른 Fc 영역의 폴리펩티드는 돌연변이 Y349C, T366S, L368A, 및 Y407V를 포함하거나,

[0228] c) 하나의 Fc-영역의 폴리펩티드는 돌연변이 S364R 및 D399K를 포함하는 반면, 다른 Fc-영역의 폴리펩티드는 돌연변이 Y349T, K370S, 및 K409D를 포함한다.

[0229] 따라서, 특정 구현예에서, 본 개시의 결합 분자, 예를 들어 항체, 예컨대 다중특이적 항체는 2개의 Fc 영역의

이종이량체화를 포함하며, 여기서

[0230] a) 하나의 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 20 또는 131에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 반면, 다른 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 101 또는 130에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

[0231] b) 하나의 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 125에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 반면, 다른 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 124에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

[0232] c) 하나의 Fc 영역은 서열번호 126에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 반면, 다른 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 127에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0233] 따라서, 특정 구현예에서, 본 개시의 결합 분자, 예를 들어 항체, 예컨대 다중특이적 항체는 2개의 Fc 영역의 이종이량체화를 포함하며, 여기서

[0234] a) 하나의 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 20 또는 131에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 반면, 다른 하나의 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 101 또는 130에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나;

[0235] b) 하나의 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 125에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 반면, 다른 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 124에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나;

[0236] c) 하나의 Fc 영역은 서열번호 126에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 반면, 다른 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 127에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0237] 따라서, 특정 구현예에서, 본 개시의 결합 분자, 예를 들어 항체, 예컨대 다중특이적 항체는 2개의 Fc 영역의 이종이량체화를 포함하며, 여기서

[0238] a) 하나의 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 20 또는 131에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고 돌연변이 T366W를 포함하는 반면, 다른 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 101 또는 130에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고 T366S, L368A, 및 Y407V를 포함하거나;

[0239] b) 하나의 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 125에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고 돌연변이 S354C 및 T366W를 포함하는 반면, 다른 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 124에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고 돌연변이 Y349C, T366S, L368A, 및 Y407V를 포함하거나;

[0240] c) 하나의 Fc 영역은 서열번호 126에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고 돌연변이 S364R 및 D399K를 포함하는 반면, 다른 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 127에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고 돌연변이 Y349T, K370S, 및 K409D를 포함한다.

[0241] 일부 구현예에서, Fc 영역은 또한 이종이량체 정제에 유리한 다른 돌연변이를 포함한다.

[0242] 본 개시의 결합 분자 내의 Fc 영역, 예를 들어 항체는 원하는 특성을 얻기 위해 돌연변이될 수도 있다. Fc 영역 돌연변이는 당업계에 공지되어 있다.

[0243] 일 구현예에서, Fc 영역은 그 안의 효과기 기능 특성(예를 들어, Fc 영역에서의 보체 활성화 기능)을 [변경]하도록 변형된다. 일 구현예에서, 효과기 기능은 야생형 이소형의 Fc 영역과 비교하여 감소되거나 제거된다. 일 구현예에서, 효과기 기능은 다음으로부터 선택된 방법을 통해 감소되거나 제거된다: 자연적으로 감소되거나 제거된 효과기 기능을 갖는 Fc 이소형, 및 Fc 영역 변형을 사용함.

[0244] 하나의 바람직한 구현예에서, Fc 영역은 감소된 Fc 영역 매개 효과기 기능, 예를 들어 상기 기능을 달성하기 위한 돌연변이를 포함하는 감소되거나 제거된 ADCC 또는 ADCP 또는 CDC 효과기 기능을 갖는다.

[0245] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 본 개시의 결합 분자, 예를 들어 항체 분자, 본 개시의 결합 분자, 예를 들어 항체 분자의 예상 용도에 따르면, 하나 또는 복수의 Fc 수용체의 결합 친화도를 변화시키는 Fc 도메인의 변형을 포함할 수도 있다. 일 구현예에서, Fc 수용체는 Fc γ 수용체, 특히 인간 Fc γ 수용체이다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 Fc γ 수용체에 대한 결합을 감소시키는 돌연변이를 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 본 개시에 사용된 Fc 영역은 Fc γ 수용체에 대한 결합을 감소시키는 L234A/L235A 돌연변이를 갖는다. 다른 바람직한 구현예에서, Fc 단편은 혈청 반감기의 증가를 유발하는 돌연변이, 예를 들어 FcRn에 대한 Fc 단편의 결합을 향상시키는 돌연변이를 가질 수 있다.

[0246] **I-6. 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체**

[0247] 일부 구현예에서, 본 개시의 항체는 이중특이적 항체이다.

[0248] 용어 "이중특이적 항체"는 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원 결합 영역을 포함하는 항체를 지칭하며, 여기서 제1 항원 결합 영역은 항원 또는 에피토프의 유형에 결합하고, 제2 항원 결합 영역은 다른 항원 또는 다른 에피토프에 결합한다. 따라서, 본 개시에 따른 이중특이적 항체는 2개의 상이한 유형의 항원, 또는 하나의 유형의 항원의 2개의 상이한 에피토프에 대한 특이성을 포함한다. 이중특이적 항체 형태는 IgG-유사 항체를 포함한다(문헌 [Fan 등 (2015) Journal of Hematology & Oncology. 8: 130]). IgG-유사 항체의 가장 흔한 유형은 2개의 Fab 영역 및 2개의 Fc 영역을 포함하고, 각각의 Fab의 중쇄 및 경쇄는 독립적인 단일특이적 항체로부터 유래할 수 있다.

[0249] 본 개시의 이중특이적 항체는 당업계에 공지된 이중특이적 항체 형태 또는 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 본 개시의 맥락에서 사용되는 특정 예시적인 이중특이적 항체 형태에 대해 문헌[Labrijn 등 Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline. Nature Reviews Drug Discovery, 2019, 18(8): 1 - 24]을 참조한다. 일부 구현예에서, 본 개시의 이중특이적 항체는 다음의 포맷을 갖는다: 2+1N-말단 구성을 갖는 이중특이적 항체(도 5a), 2+1C-말단 구성을 갖는 이중특이적 항체(도 5b), 2+2C-말단 구성을 갖는 이중특이적 항체(도 5c). 일부 구현예에서, 본 개시의 이중특이적 항체는 또한 2+2N 구성 또는 탠덤(tandem) Fab 구성을 포함한다.

[0250] 일부 구현예에서, 본 개시의 이중특이적 항체는 제1 항원에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 영역을 포함하며, 여기서 제1 항원 결합 영역은 제1 Fab를 포함하고, 제2 항원 결합 영역은 제2 Fab를 포함하며, 여기서 제1 Fab는 (링커, 예를 들어 힌지 영역을 통해 또는 힌지 영역 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 제1 Fc 영역의 N-말단에 연결되고, 제2 Fab는 (링커, 예를 들어 힌지 영역을 통해 또는 힌지 영역 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 제2 Fc 영역의 N-말단에 연결된다. 특정 구현예에서, 이중특이적 항체는 도 1에 도시된 구성을 갖는 IgG-유사 항체이다. 특정 구현예에서, 제1 Fab는 전하 돌연변이 및 이황화 결합 재형성 돌연변이를 포함하고, 제2 Fab는 전하 돌연변이를 포함하고, 임의적으로, 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역은 항체 돌연변이 또는 노브-인투-홀 돌연변이를 포함한다. 바람직하게는, 제1 Fab가 포함하는 전하 돌연변이 및 제2 Fab가 포함하는 전하 돌연변이는 동일한 위치를 갖지만, 동일한 위치에서 돌연변이된 아미노산에 의해 운반되는 전하는 반대이다. 일 구현예에서, 이중특이적 항체는 다음을 포함한다:

[0251] 중쇄 1: N-말단에서 C-말단 방향으로: 제1 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1-제1 Fc 영역을 포함하거나 이로 구성되되, 여기서 중쇄 불변 영역 CH1은 링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이 이의 C-말단에서 제1 Fc 영역의 N-말단에 연결된다;

[0252] 경쇄 1: N-말단에서 C-말단 방향으로: 제1 Fab 경쇄 가변 영역-경쇄 불변 영역을 포함하거나 이로 구성된다;

[0253] 중쇄 2: N-말단에서 C-말단 방향으로: 제2 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1-제2 Fc 영역을 포함하거나 이로 구성되며, 여기서 중쇄 불변 영역 CH1은 링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이 이의 C-말단에서 제2 Fc 영역의 N-말단에 연결된다;

[0254] 경쇄 2: N-말단에서 C-말단 방향으로: 제2 Fab 경쇄 가변 영역-경쇄 불변 영역을 포함하거나 이로 구성된다.

[0255] 일부 구현예에서, 본 개시의 이중특이적 항체는 제1 항원에 특이적으로 결합하는 1개의 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원에 특이적으로 결합하는 2개의 제2 항원 결합 영역을 포함하며, 여기서 제1 항원 결합 영역은 제1 Fab를 포함하고, 제2 항원 결합 영역은 제2 Fab를 포함하며, 여기서 1개의 제2 Fab는 (링커, 예를 들어 힌지 영역을 통해 또는 힌지 영역 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 제1 Fc 영역의 N-말단에 연결되고, 1개의 제1 Fab는 (링커, 예를 들어 힌지 영역을 통해 또는 힌지 영역 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 제2 Fc 영역의 N-말단에 연결되

고, 다른 제2 Fab는 (링커를 통해 또는 링커 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 제1 Fab 중쇄 가변 영역의 N-말단에 연결된다. 특정 구현예에서, 이중특이적 항체는 2+1N-말단 구성, 및 도 5a에 도시된 구성을 갖는다. 특정 구현예에서, 1개 또는 2개의 제2 Fab는 본 개시에 따른 전하 돌연변이를 포함하고, 제1 Fab는 본 개시에 따른 전하 돌연변이 및 이황화 결합 재형성 돌연변이를 포함하고, 임의적으로, 돌연변이는 이노바디 또는 노브-인투-홀에 기초하여 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역 내로 도입된다. 바람직하게는, 2개의 제2 Fab는 동일한 전하 돌연변이를 포함한다. 바람직하게는, 제2 Fab가 포함하는 전하 돌연변이는 제1 Fab가 포함하는 전하 돌연변이와 동일한 위치를 갖지만, 동일한 위치에서 돌연변이된 아미노산에 의해 운반되는 전하는 반대이다. 일 구현예에서, 이중특이적 항체는 다음을 포함한다:

[0256] 중쇄 1: N-말단에서 C-말단 방향으로: 제2 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1-제1 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1-제2 Fc 영역을 포함하거나 이로 구성되며, 여기서 제1 Fab 중쇄 불변 영역 CH1은 링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이 이의 C-말단에서 제2 Fc 영역의 N-말단에 연결되고, 제2 Fab는 (링커를 통해 또는 링커 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 제1 Fab 중쇄 가변 영역의 N-말단에 연결된다;

[0257] 경쇄 1: N-말단에서 C-말단 방향으로: 제1 Fab 경쇄 가변 영역-경쇄 불변 영역을 포함하거나 이로 구성된다;

[0258] 중쇄 2: N-말단에서 C-말단 방향으로: 제2 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1-제1 Fc 영역을 포함하거나 이로 구성되며, 여기서 중쇄 불변 영역 CH1은 링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이 이의 C-말단에서 제1 Fc 영역의 N-말단에 연결된다;

[0259] 경쇄 2: N-말단에서 C-말단 방향으로: 제2 Fab 경쇄 가변 영역-경쇄 불변 영역을 포함하거나 이로 구성되며,

[0260] 여기서 이중특이적 항체는 2개의 경쇄 2를 포함한다.

[0261] 일부 구현예에서, 본 개시의 이중특이적 항체는 제1 항원에 특이적으로 결합하는 1개의 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원에 특이적으로 결합하는 2개의 제2 항원 결합 영역을 포함하며, 여기서 제1 항원 결합 영역은 제1 Fab를 포함하고, 제2 항원 결합 영역은 제2 Fab를 포함하며, 여기서 2개의 제2 Fab는 (링커, 예를 들어 힌지 영역을 통해 또는 힌지 영역 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 제1 Fc 영역의 N-말단 및 제2 Fc 영역의 N-말단에 각각 연결되고, 제1 Fab 중쇄 가변 영역의 N-말단은 (링커를 통해 또는 링커 없이) 제2 Fc 영역의 C-말단에 연결된다. 특정 구현예에서, 이중특이적 항체는 2+1C-말단 구성 및 도 5b에 도시된 구성을 갖는다. 특정 구현예에서, 1개 또는 2개의 제2 Fab는 본 개시에 따른 전하 돌연변이를 포함하고, 제1 Fab는 본 개시에 따른 전하 돌연변이 및 이황화 결합 재형성 돌연변이를 포함하고, 임의적으로, 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역은 이노바디 돌연변이 또는 노브-인투-홀 돌연변이를 포함한다. 바람직하게는, 2개의 제2 Fab는 동일한 전하 돌연변이를 포함한다. 바람직하게는, 제1 Fab가 포함하는 전하 돌연변이 및 제2 Fab가 포함하는 전하 돌연변이는 동일한 위치를 갖지만, 동일한 위치에서 돌연변이된 아미노산에 의해 운반되는 전하는 반대이다. 일 구현예에서, 이중특이적 항체는 다음을 포함한다:

[0262] 중쇄 1: N-말단에서 C-말단 방향으로: 제2 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1-제2 Fc 영역-제1 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1을 포함하거나 이로 구성되며, 여기서 제2 Fab는 (링커를 통해 또는 링커 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 제2 Fc 영역의 N-말단에 연결되고, 제1 Fab 중쇄 가변 영역의 N-말단은 (링커를 통해 또는 링커 없이) 제2 Fc 영역의 C-말단에 연결된다;

[0263] 경쇄 1: N-말단에서 C-말단 방향으로: 제1 Fab 경쇄 가변 영역-경쇄 불변 영역을 포함하거나 이로 구성된다;

[0264] 중쇄 2: N-말단에서 C-말단 방향으로: 제2 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1-제1 Fc 영역을 포함하거나 이로 구성되며, 여기서 중쇄 불변 영역 CH1은 링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이 이의 C-말단에서 상기 제1 Fc 영역의 N-말단에 연결된다;

[0265] 경쇄 2: N-말단에서 C-말단 방향으로: 제2 Fab 경쇄 가변 영역-경쇄 불변 영역을 포함하거나 이로 구성되며,

[0266] 여기서 이중특이적 항체는 2개의 경쇄 2를 포함한다.

[0267] 일부 구현예에서, 본 개시의 이중특이적 항체는 제1 항원에 특이적으로 결합하는 2개의 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원에 특이적으로 결합하는 2개의 제2 항원 결합 영역을 포함하며, 여기서 제1 항원 결합 영역은 제1 Fab를 포함하고, 제2 항원 결합 영역은 제2 Fab를 포함하며, 여기서 2개의 제2 Fab는 (링커, 예를 들어 힌지 영역을 통해 또는 힌지 영역 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 2개의 Fc 영역의 N-말단에 연결되고(Fc 영역은 동일하거나 상이할 수 있음), 2개의 제1 Fab의 중쇄 가변 영역의 N-말단은 2개의 Fc 영역의 C-말단에 연결된다. 특정 구현예에서, 이중특이적 항체는 2+2C-말단 구성, 및 도 5c에 도시된 구성을 갖는다. 특정 구현예에서, 1개 또는 2

개의 제2 Fab는 본 개시에 따른 전하 돌연변이를 포함하고, 1개 또는 2개의 제1 Fab는 본 개시에 따른 전하 돌연변이 및 이황화 결합 재형성 돌연변이를 포함한다. 특정 구현예에서, 2개의 제2 Fab는 본 개시의 동일한 전하 돌연변이를 포함하고/하거나 2개의 제1 Fab는 본 개시에 따른 전하 돌연변이 및 이황화 결합 재형성 돌연변이를 포함한다. 바람직하게는, 제1 Fab가 포함하는 전하 돌연변이 및 제2 Fab가 포함하는 전하 돌연변이는 동일한 위치를 갖지만, 동일한 위치에서 돌연변이된 아미노산에 의해 운반되는 전하는 반대이다. 일 구현예에서, 이중특이적 항체는 다음을 포함한다:

[0268] 중쇄: N-말단에서 C-말단 방향으로: 제2 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1-Fc 영역-제1 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1을 포함하거나 이로 구성되며, 여기서 제2 Fab는 (링커, 예를 들어 힌지 영역을 통해 또는 힌지 영역 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 상기 Fc 영역의 N-말단에 연결되고, 제1 Fab 중쇄 가변 영역의 N-말단은 링커를 통해 또는 링커 없이 상기 Fc 영역의 C-말단에 연결된다;

[0269] 경쇄 1: N-말단에서 C-말단 방향으로: 제1 Fab 경쇄 가변 영역-경쇄 불변 영역을 포함하거나 이로 구성된다;

[0270] 경쇄 2: N-말단에서 C-말단 방향으로: 제2 Fab 경쇄 가변 영역-경쇄 불변 영역을 포함하거나 이로 구성되며,

[0271] 여기서 이중특이적 항체는 2개의 중쇄를 포함한다.

[0272] 일부 구현예에서, 본 개시의 항체는 다중특이적 항체이다. 일부 구현예에서, 본 개시의 다중특이적 항체는 삼중특이적 항체이다.

[0273] 일부 구현예에서, 본 개시의 삼중특이적 항체는 제1 항원에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 영역을 포함하고, 제2 항원에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 영역을 포함하고, 제3 항원에 특이적으로 결합하는 제3 항원 결합 영역을 포함하며, 여기서 제1 항원 결합 영역은 제1 Fab를 포함하고, 제2 항원 결합 영역은 제2 Fab를 포함하며, 여기서 제1 Fab는 (링커, 예를 들어 힌지 영역을 통해 또는 힌지 영역 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 제1 Fc 영역의 N-말단에 연결되고, 제2 Fab는 (링커, 예를 들어 힌지 영역을 통해 또는 힌지 영역 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 제2 Fc 영역의 N-말단에 연결되고, 제3 항원 결합 영역은 링커를 통해 또는 링커 없이 이의 VH 또는 VL의 N-말단에서 제2 Fc 영역의 C-말단에 연결되는 scFv(예를 들어, VH-VL, 또는 VL-VH)를 포함한다. 특정 구현예에서, 삼중특이적 항체의 구성은 2+1C-말단 구성이다(도 7a 또는 도 7b). 특정 구현예에서, 제1 Fab는 전하 돌연변이 및 이황화 결합 재형성 돌연변이를 포함하고, 제2 Fab는 전하 돌연변이를 포함하고, 임의적으로, 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역은 이노바디 돌연변이 또는 노브-인투-홀 돌연변이를 포함한다. 바람직하게는, 제1 Fab가 포함하는 전하 돌연변이 및 제2 Fab가 포함하는 전하 돌연변이는 동일한 위치를 갖지만, 동일한 위치에서 돌연변이된 아미노산에 의해 운반되는 전하는 반대이다. 일 구현예에서, 다중특이적 항체는 다음을 포함한다:

[0274] 중쇄 1: N-말단에서 C-말단 방향으로: 제1 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1-제1 Fc 영역을 포함하거나 이로 구성되며, 여기서 제1 Fab는 (링커, 예를 들어 힌지 영역을 통해 또는 힌지 영역 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 제1 Fc 영역의 N-말단에 연결된다;

[0275] 경쇄 1: N-말단에서 C-말단 방향으로: 제1 Fab 경쇄 가변 영역-경쇄 불변 영역을 포함하거나 이로 구성된다;

[0276] 중쇄 2: N-말단에서 C-말단 방향으로: 제2 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1-제2 Fc 영역-scFv를 포함하거나 이로 구성되며, 여기서 중쇄 불변 영역 CH1은 링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이 중쇄 불변 영역 CH1의 C-말단에서 제2 Fc 영역의 N-말단에 연결되고, scFv는 링커를 통해 또는 링커 없이 이의 VH 또는 VL(예를 들어, scFv는 VL-VH, 예를 들어, VL의 N-말단임)의 N-말단 또는 C-말단에서 제2 Fc 영역의 C-말단에 연결된다;

[0277] 경쇄 2: N-말단에서 C-말단 방향으로: 제2 Fab 경쇄 가변 영역-경쇄 불변 영역을 포함하거나 이로 구성된다.

[0278] **I-7. 항원 및 항원 결합 영역**

[0279] 본 개시의 결합 분자, 예컨대 항체, 예를 들어 다중특이적 항체, 예를 들어 이중특이적 항체는 항체, 또는 리간드, 또는 수용체에 적용 가능한 항원과 같은 임의의 표적에 결합할 수 있다.

[0280] 일부 구현예에서, 항원은 종양-연관 항원(TA)이다. 일부 구현예에서, TA는 면역 관문 분자이다.

[0281] 일부 구현예에서, 표적 또는 항원은 FAP, CEA, p95 HER2, BCMA, EpCAM, MSLN, MCSP, HER-1, HER-2, HER-3, CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CD52Flt3, EpCAM, IGF-1R, FOLR1, Trop-2, CA-12-5, HLA-DR, MUC-1(뮤코단백질), GD2, A33-항원, PSMA, PSCA, 트랜스페린-수용체, TNC(테나신), CA-IX, CD3, B7H3, EGFR, Hel, cMET, Ax1,

GPRC5D, PD-1, PD-L1, CD47, 및 4-1BB, CD40, 및 OX40과 같은 면역 활성화 분자로부터 선택된다.

[0282] 일부 구현예에서, 표적 또는 항원은 하나 또는 복수의 다음의 표적/항원으로부터 선택된다: CD3, BCMA, CD20, Her2, Her3, B7H3, EGFR, Hel, cMET, Axl, GPRC5D, PD-1, PD-L1, CD47, 4-1BB, CD40, OX40, 및 동일한 항원의 상이한 에피토프와 같은 면역 관문 분자.

[0283] 일부 구현예에서, 본 개시의 이중특이적 항체는 하나의 항원의 2개의 상이한 에피토프에 결합하거나 2개의 항원에 결합한다.

[0284] 일부 특정 구현예에서, 본 개시의 이중특이적 항체는 다음으로부터 선택된 2개의 항원에 결합한다:

[0285] CD3/BCMA, CD3/CD20,CD3/Her2, Her2/Her3, B7H3/EGFR, PD-L1/CD47, PD-L1/CD40, PD-L1/4-1BB, EGFR/Her3, Her2/Hel, Her2/PD-1, Her2/PD-L1, Her2/CD47, Her2/cMet, 및 CD3/GPRC5D.

[0286] 일부 특정 구현예에서, 본 개시의 삼중특이적 항체는 BCMA, GPRC5D, 및 CD3에 결합한다.

[0287] 본 개시의 결합 분자의 표적 결합 영역 또는 항원 결합 영역, 예를 들어 항체는 상기 항원에 결합된 항체로부터 유래할 수 있다.

[0288] ▶ Her2에 특이적으로 결합하는 항원 결합 영역

[0289] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 Her2, 예를 들어 트라스투주맙에 특이적으로 결합하는 항체로부터 유래한다.

[0290] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 Her2, 예컨대 트라스투주맙에 특이적으로 결합하는 공지된 항체의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개의 CDR을 포함한다.

[0291] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 1개, 2개, 및 3개의 중쇄 가변 영역 CDR, 즉, 트라스투주맙과 같은 Her2에 특이적으로 결합하는 공지된 항체의 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3을 포함한다.

[0292] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 1개, 2개, 및 3개의 경쇄 가변 영역 CDR, 즉, 트라스투주맙과 같은 Her2에 특이적으로 결합하는 공지된 항체의 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함한다.

[0293] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 Her2, 예컨대 트라스투주맙에 특이적으로 결합하는 공지된 항체의 3개의 중쇄 가변 영역 CDR 및 3개의 경쇄 가변 영역 CDR을 포함한다.

[0294] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 Her2, 예컨대 트라스투주맙에 특이적으로 결합하는 공지된 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역, 및 본 개시에 따른 돌연변이를 포함한다.

[0295] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 Her2, 예컨대 트라스투주맙에 특이적으로 결합하는 공지된 항체의 Fab, 및 본 개시에 따른 돌연변이를 포함한다.

[0296] Ψ PD-1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 영역

[0297] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 PD-1, 예를 들어 WO2017025016에 개시된 PD-1 항체, 예를 들어 신틸리맙에 특이적으로 결합하는 항체로부터 유래한다.

[0298] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 PD-1, 예를 들어 WO2017025016에 개시된 PD-1 항체, 예를 들어 신틸리맙에 특이적으로 결합하는 공지된 항체의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개의 CDR을 포함한다.

[0299] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 PD-1, 예를 들어 WO2017025016에 개시된 PD-1 항체, 예를 들어 신틸리맙에 특이적으로 결합하는 공지된 항체의 1개, 2개, 및 3개의 중쇄 가변 영역 CDR, 즉 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3을 포함한다.

[0300] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 PD-1, 예를 들어 WO2017025016에 개시된 PD-1 항체, 예를 들어 신틸리맙에 특이적으로 결합하는 공지된 항체의 1개, 2개, 및 3개의 경쇄 가변 영역 CDR, 즉 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함한다.

[0301] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 PD-1, 예를 들어 WO2017025016에 개시된 PD-1 항체, 예를 들어 신틸리맙에 특이적으로 결합하는 공지된 항체의 3개의 중쇄 가변 영역 CDR 및 3개의 경쇄 가변 영역 CDR을 포함한다.

[0302] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 PD-1, 예를 들어 WO2017025016에 개시된 PD-1 항체, 예를 들어 신틸리맙에 특이적으로 결합하는 공지된 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역, 및 본 개시에 따른 돌연변이를 포함한

다.

[0303] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 PD-1, 예를 들어 WO2017025016에 개시된 PD-1 항체, 예를 들어 신틸리맙에 특이적으로 결합하는 공지된 항체의 Fab, 및 본 개시에 따른 돌연변이를 포함한다.

[0304] ▶ CD47에 특이적으로 결합하는 항원 결합 영역

[0305] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 CD47에 특이적으로 결합하는 항체, 예를 들어 CD47에 특이적으로 결합하는 WO2019042285A1에 개시된 항체CD47, 예를 들어 본원에 개시된 ADI26630으로부터 유래한다.

[0306] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 CD47에 특이적으로 결합하는 공지된 항체, 예를 들어 CD47에 특이적으로 결합하는 WO2019042285A1에 개시된 항체, 예를 들어 ADI26630의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개의 CDR을 포함한다.

[0307] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 1개, 2개, 및 3개의 중쇄 가변 영역 CDR, 즉, CD47에 특이적으로 결합하는 공지된 항체, 예를 들어, CD47에 특이적으로 결합하는 WO2019042285A1에 개시된 항체, 예를 들어, ADI26630의 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3을 포함한다.

[0308] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 1개, 2개, 및 3개의 경쇄 가변 영역 CDR, 즉, CD47에 특이적으로 결합하는 공지된 항체, 예를 들어, CD47에 특이적으로 결합하는 WO2019042285A1에 개시된 항체, 예를 들어, ADI26630의 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함한다.

[0309] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 CD47에 특이적으로 결합하는 공지된 항체, 예를 들어 CD47에 특이적으로 결합하는 WO2019042285A1에 개시된 항체, 예를 들어 ADI26630의 3개의 중쇄 가변 영역 CDR 및 3개의 경쇄 가변 영역 CDR을 포함한다.

[0310] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 CD47에 특이적으로 결합하는 공지된 항체, 예를 들어 CD47에 특이적으로 결합하는 WO2019042285A1에 개시된 항체, 예를 들어 ADI26630의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역, 및 본 개시에 따른 돌연변이를 포함한다.

[0311] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 CD47에 특이적으로 결합하는 공지된 항체, 예를 들어 CD47에 특이적으로 결합하는 WO2019042285A1에 개시된 항체CD47, 예를 들어 본원에 개시된 ADI26630, 및 본 개시에 따른 돌연변이를 포함한다.

[0312] ▶ cMet에 특이적으로 결합하는 항원 결합 영역

[0313] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 cMet, 예를 들어, 오나투주맙에 특이적으로 결합하는 항체로부터 유래한다.

[0314] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 cMet, 예를 들어 오나투주맙에 특이적으로 결합하는 공지된 항체의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개의 CDR을 포함한다.

[0315] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 cMet, 예를 들어, 오나투주맙에 특이적으로 결합하는 공지된 항체의 1개, 2개, 및 3개의 중쇄 가변 영역 CDR, 즉 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3을 포함한다.

[0316] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 cMet, 예를 들어, 오나투주맙에 특이적으로 결합하는 공지된 항체의 1개, 2개, 및 3개의 경쇄 가변 영역 CDR, 즉 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함한다.

[0317] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 cMet, 예를 들어 오나투주맙에 특이적으로 결합하는 공지된 항체의 3개의 중쇄 가변 영역 CDR 및 3개의 경쇄 가변 영역 CDR을 포함한다.

[0318] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 cMet, 예를 들어, 오나투주맙에 특이적으로 결합하는 공지된 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역, 및 본 개시에 따른 돌연변이를 포함한다.

[0319] 일부 항원 결합 영역은 cMet에 특이적으로 결합하는 공지된 항체의 Fab, 예를 들어, 오나투주맙, 및 본 개시에 따른 돌연변이를 포함한다.

[0320] ▶ GPRC5D에 특이적으로 결합하는 항원 결합 영역

[0321] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 GPRC5D에 특이적으로 결합하는 항체, 예를 들어 GPRC5D에 특이적으로 결합하는 PCT/CN2022/076832에 개시된 항체로부터 유래한다.

[0322] 일부 구현예에서, GPRC5D에 특이적으로 결합하는 항체는 중쇄 가변 영역(HCDR)으로부터의 3개의 CDR, 즉 HCDR1,

HCDR2, 및 HCDR3을 포함하며, 여기서 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3은 서열번호 87에 도시된 중쇄 가변 영역의 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3이다.

[0323] 일부 구현예에서, GPRC5D에 특이적으로 결합하는 항체는 경쇄 가변 영역(LCDR)으로부터의 3개의 CDR, 즉 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함하며, 여기서 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3은 서열번호 83에 도시된 경쇄 가변 영역의 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3이다.

[0324] 일부 구현예에서, GPRC5D에 특이적으로 결합하는 항체의 HCDR1은 서열번호 88의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나; HCDR2는 서열번호 89의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나, HCDR3은 서열번호 90의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나, LCDR1은 서열번호 84, LCDR2는 서열번호 85의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나, LCDR3은 서열번호 86의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0325] 일부 구현예에서, GPRC5D에 특이적으로 결합하는 항체는 중쇄 가변 영역(HCDR)으로부터의 3개의 CDR, 즉, HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3, 및 경쇄 가변 영역(LCDR)으로부터의 3개의 CDR, 즉, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함하거나 이로 구성되며, 여기서 HCDR1은 서열번호 88의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나; HCDR2는 서열번호 89의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나, HCDR3은 서열번호 90의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나, LCDR1은 서열번호 84의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나, LCDR2는 서열번호 85의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나, LCDR3은 서열번호 86의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0326] 일부 양태에서, GPRC5D에 특이적으로 결합하는 항체는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하며, 여기서 VH는

[0327] (i) 서열번호 87에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

[0328] (ii) 서열번호 87의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

[0329] (iii) 서열번호 87의 1개 또는 복수의(바람직하게는 10개 이하, 더 바람직하게는 5개, 4개, 3개, 2개, 및 1개 이하) 아미노산 변화(바람직하게는 아미노산 치환, 보다 바람직하게는 보존적 아미노산 치환)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, 바람직하게는, 아미노산 변화는 CDR에서 발생하지 않는다.

[0330] 일부 양태에서, GPRC5D에 특이적으로 결합하는 항체는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하며, 여기서 VL은

[0331] (i) 서열번호 83에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

[0332] (ii) 서열번호 83의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

[0333] (iii) 서열번호 83의 1개 또는 복수의(바람직하게는 10개 이하, 더 바람직하게는 5개, 4개, 3개, 2개, 및 1개 이하) 아미노산 변화(바람직하게는 아미노산 치환, 보다 바람직하게는 보존적 아미노산 치환)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, 바람직하게는, 아미노산 변화는 CDR에서 발생하지 않는다.

[0334] 일부 구현예에서, GPRC5D에 특이적으로 결합하는 항체는 VH 및 VL을 포함하며, 여기서 VH는 서열번호 87에 도시된 서열을 포함하거나 이로 구성되거나/되거나; VL은 서열번호 83에 도시된 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0335] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 GPRC5D에 특이적으로 결합하는 공지된 항체 또는 상기 항체의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개의 CDR을 포함한다.

[0336] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 GPRC5D에 특이적으로 결합하는 공지된 항체 또는 상기 항체의 1개, 2개, 및 3개의 중쇄 가변 영역 CDR, 즉 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3을 포함한다.

[0337] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 GPRC5D에 특이적으로 결합하는 공지된 항체 또는 상기 항체의 1개, 2개, 및 3개의 경쇄 가변 영역 CDR, 즉 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함한다.

[0338] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 GPRC5D에 특이적으로 결합하는 공지된 항체 또는 상기 항체의 3개의 중쇄 가변 영역 CDR 및 3개의 경쇄 가변 영역 CDR을 포함한다.

[0339] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 GPRC5D에 특이적으로 결합하는 공지된 항체 또는 상기 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역, 및 본 개시에 따른 돌연변이를 포함한다.

[0340] 일부 항원 결합 영역은 GPRC5D에 특이적으로 결합하는 공지된 항체 또는 상기 항체의 Fab, 및 본 개시에 따른 돌연변이를 포함한다.

[0341] ▶ CD3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 영역

[0342] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 CD3에 특이적으로 결합하는 항체, 예를 들어, CD3에 특이적으로 결합하는 WO2022068809에 개시된 항체CD3, 예를 들어, 그 안에 sp34.24 또는 sp34.87로부터 유래한다.

[0343] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 CD3에 특이적으로 결합하는 공지된 항체, 예를 들어 CD3에 특이적으로 결합하는 WO2022068809에 개시된 항체, 예를 들어 sp34.24 또는 sp34.87의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개의 CDR을 포함한다.

[0344] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 CD3에 특이적으로 결합하는 공지된 항체, 예를 들어, CD3에 특이적으로 결합하는 WO2022068809에 개시된 항체, 예를 들어, sp34.24 또는 sp34.87의 1개, 2개, 및 3개의 중쇄 가변 영역 CDR, 즉 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3을 포함한다.

[0345] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 CD3에 특이적으로 결합하는 공지된 항체, 예를 들어 CD3에 특이적으로 결합하는 WO2022068809에 개시된 항체, 예를 들어 sp34.24 또는 sp34.87의 1개, 2개, 및 3개의 경쇄 가변 영역 CDR, 즉 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함한다.

[0346] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 CD3에 특이적으로 결합하는 공지된 항체, 예를 들어 CD3에 특이적으로 결합하는 WO2022068809에 개시된 항체, 예를 들어 sp34.24 또는 CD3sp34.87의 3개의 중쇄 가변 영역 CDR 및 3개의 경쇄 가변 영역 CDR을 포함한다.

[0347] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 CD3에 특이적으로 결합하는 공지된 항체, 예를 들어 CD3에 특이적으로 결합하는 WO2022068809에 개시된 항체, 예를 들어 sp34.24 또는 sp34.87의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역, 및 본 개시에 따른 돌연변이를 포함한다.

[0348] 일부 항원 결합 영역은 CD3에 특이적으로 결합하는 공지된 항체, 예를 들어 CD3에 특이적으로 결합하는 WO2022068809에 개시된 항체, 예를 들어 sp34.24 또는 sp34.87의 Fab, 및 본 개시에 따른 돌연변이를 포함한다.

[0349] ▶ BCMA에 특이적으로 결합하는 항원 결합 영역

[0350] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 BCMA에 특이적으로 결합하는 항체, 예를 들어 BCMA에 특이적으로 결합하는 PCT/CN2022/076832에 개시된 항체로부터 유래한다.

[0351] 일부 구현예에서, BCMA에 특이적으로 결합하는 항체는 중쇄 가변 영역(HCDR)으로부터의 3개의 CDR, 즉 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3을 포함하며, 여기서 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3은 서열번호 103에 도시된 중쇄 가변 영역의 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3이다.

[0352] 일부 구현예에서, BCMA에 특이적으로 결합하는 항체는 경쇄 가변 영역(LCDR)으로부터의 3개의 CDR, 즉 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함하되, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3은 서열번호 107에 도시된 경쇄 가변 영역의 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3이다.

[0353] 일부 구현예에서, BCMA에 특이적으로 결합하는 항체의 HCDR1은 서열번호 104의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나; HCDR2는 서열번호 105의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나, HCDR3은 서열번호 106의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나, LCDR1은 서열번호 108의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나, LCDR2는 서열번호 109의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나, LCDR3은 서열번호 110의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0354] 일부 구현예에서, BCMA에 특이적으로 결합하는 항체는 중쇄 가변 영역(HCDR)으로부터의 3개의 CDR, 즉, HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3, 및 경쇄 가변 영역(LCDR)으로부터의 3개의 CDR, 즉, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함하며, 여기서 HCDR1은 서열번호 104의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나; HCDR2는 서열번호 105의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나, HCDR3은 서열번호 106의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나, LCDR1은 서열번호 108의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나, LCDR2는 서열번호 109의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나, LCDR3은 서열번호 110의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0355] 일부 양태에서, BCMA에 특이적으로 결합하는 항체는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하며, 여기서 VH는

[0356] (i) 서열번호 103에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

[0357] (ii) 서열번호 103의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

[0358] (iii) 서열번호 103의 1개 또는 복수의(바람직하게는 10개 이하, 보다 바람직하게는 5개, 4개, 3개, 2개, 및 1개 이하) 아미노산 변화(바람직하게는 아미노산 치환, 보다 바람직하게는 보존적 아미노산 치환)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, 바람직하게는 아미노산 변화는 CDR에서 발생하지 않는다.

[0359] 일부 양태에서, BCMA에 특이적으로 결합하는 항체는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하며, 여기서 VL은

[0360] (i) 서열번호 107에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

[0361] (ii) 서열번호 107의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

[0362] (iii) 서열번호 107의 1개 또는 복수의(바람직하게는 10개 이하, 더 바람직하게는 5개, 4개, 3개, 2개, 및 1개 이하) 아미노산 변화(바람직하게는 아미노산 치환, 더 바람직하게는 보존적 아미노산 치환)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, 바람직하게는, 아미노산 변화는 CDR에서 발생하지 않는다.

[0363] 일부 구현예에서, BCMA에 특이적으로 결합하는 항체는 VH 및 VL을 포함하며, 여기서 VH는 서열번호 103에 도시된 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나; VL은 서열번호 107에 도시된 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0364] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 BCMA에 특이적으로 결합하는 공지된 항체 또는 상기 항체의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개의 CDR을 포함한다.

[0365] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 BCMA에 특이적으로 결합하는 공지된 항체 또는 상기 항체의 1개, 2개, 및 3개의 중쇄 가변 영역 CDR, 즉 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3을 포함한다.

[0366] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 BCMA에 특이적으로 결합하는 공지된 항체 또는 상기 항체의 1개, 2개, 및 3개의 경쇄 가변 영역 CDR, 즉 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함한다.

[0367] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 BCMA에 특이적으로 결합하는 공지된 항체 또는 상기 항체의 3개의 중쇄 가변 영역 CDR 및 3개의 경쇄 가변 영역 CDR을 포함한다.

[0368] 일부 구현예에서, 항원 결합 영역은 BCMA에 특이적으로 결합하는 공지된 항체 또는 상기 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역, 및 본 개시에 따른 돌연변이를 포함한다.

[0369] 일부 항원 결합 영역은 BCMA에 특이적으로 결합하는 공지된 항체 또는 상기 항체의 Fab, 및 본 개시에 따른 돌연변이를 포함한다.

[0370] **I.8. 결합 분자의 결합 단편**

[0371] 본 개시는 또한 본원의 결합 단편, 예를 들어 항체 단편, 특히 특이적 결합 분자에 의해 결합된 표적 분자의 단편, 예를 들어 항원 결합 단편에 관한 것이다.

[0372] 일부 구현예에서, 항원 결합 단편은 Fab이다.

[0373] 일부 구현예에서, 항원 결합 단편은 하나 또는 복수의 Fab를 포함하며, 여기서 하나 또는 복수의 Fab는 본 개시에 따른 돌연변이 또는 돌연변이 조합을 포함한다.

[0374] **I.9. 예시적인 구현예**

[0375] 1. 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 제1 항원에 특이적으로 결합하는 하나 또는 복수의 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원에 특이적으로 결합하는 하나 또는 복수의 제2 항원 결합 영역을 포함하되, 적어도 하나 또는 복수의 상기 항원 결합 영역은 중쇄 CH1 및 경쇄 CL을 포함하고, 상기 CH1-CL 계면에서 이황화 결합 재형성 돌연변이를 포함하고/하거나,

[0376] 적어도 하나 또는 복수의 상기 항원 결합 영역은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하되, 상기 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 계면에서의 아미노산 쌍은 상기 아미노산 쌍 상의 2개의 아미노산을 각각 반대 전하를 갖는 아미노산으로 돌연변이시키는 전하 돌연변이를 포함하며;

[0377] 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원은 동일하거나 상이할 수 있고;

[0378] 바람직하게는, 하나의 항원 결합 영역만이 상기 CH1-CL 계면에서의 상기 이황화 결합 재형성 돌연변이를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0379] 2. 구현예 1에 있어서, 이황화 결합 재형성 돌연변이는 다음:

[0380] (i) 중쇄 CH1의 위치 126에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하고, 경쇄 CL의 위치 124에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하는 것;

[0381] (ii) 중쇄 CH1의 위치 168에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하고, 경쇄 CL의 위치 164에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하는 것;

[0382] (iii) 중쇄 CH1의 위치 170에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하고, 경쇄 CL의 위치 162 또는 164에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하는 것;

[0383] (iv) 중쇄 CH1의 위치 173에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하고, 경쇄 CL의 위치 160 또는 162에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하는 것;

[0384] (v) 중쇄 CH1의 위치 128에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하고, 경쇄 CL의 위치 118에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하는 것;

[0385] (vi) 중쇄 CH1의 위치 134에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하고, 경쇄 CL의 위치 116에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하는 것;

[0386] (vii) 중쇄 CH1의 위치 136에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하고, 경쇄 CL의 위치 114에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하는 것;

[0387] (viii) 중쇄 CH1의 위치 171에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하고, 경쇄 CL의 위치 162에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하는 것;

[0388] (ix) 중쇄 CH1의 위치 139에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하고, 경쇄 CL의 위치 116에서의 비-Cys 아미노산을 Cys 아미노산(EU 번호)으로 치환하는 것을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0389] 3. 구현예 2에 있어서, 이황화 결합 재형성 돌연변이는 다음:

[0390] (i) CH1에서의 F126C 및 CL에서의 Q124C(EU 번호);

[0391] (ii) CH1에서의 H168C 및 CL에서의 T164C(EU 번호);

[0392] (iii) CH1에서의 F170C 및 CL에서의 T164C(EU 번호);

[0393] (iv) CH1에서의 F170C 및 CL에서의 S162C(EU 번호);

[0394] (v) CH1에서의 V173C 및 CL에서의 S162C(EU 번호);

[0395] (vi) CH1에서의 V173C 및 CL에서의 Q160C(EU 번호);

[0396] (vii) CH1에서의 L128C 및 CL에서의 F118C(EU 번호);

[0397] (viii) CH1에서의 S134C 및 CL에서의 F116C(EU 번호);

[0398] (ix) CH1에서의 S136C 및 CL에서의 S114C(EU 번호);

[0399] (x) CH1에서의 P171C 및 CL에서의 S162C(EU 번호);

[0400] (xi) CH1에서의 T139C 및 CL에서의 F116C(EU 번호)를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0401] 4. 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 제1 항원에 특이적으로 결합하는 하나 또는 복수의 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원에 특이적으로 결합하는 하나 또는 복수의 제2 항원 결합 영역을 포함하되, 적어도 하나의 상기 항원 결합 영역은 중쇄 CH1 및 경쇄 CL을 포함하며, 상기 CH1-CL 계면에서의 이황화 결합 재형성 돌연변이를 포함하되, 상기 이황화 결합 재형성 돌연변이는 CH1에서의 T139C 및 CL에서의 F116C를 포함하며, 상기 제1 항원 결합 영역 및 상기 제2 항원 결합 영역은 동일하거나 상이할 수 있는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0402] 5. 구현예 2 내지 구현예 4 중 어느 하나에 있어서, 상기 이황화 결합 재형성 돌연변이는 또한 중쇄 불변 영역-경쇄 불변 영역 계면에서 사슬간 Cys를 비-Cys로 치환하는 것을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0403] 6. 구현예 5에 있어서, 사슬간 Cys를 비-Cys로 치환하는 것은 CH1의 위치 220에서의 Cys를 비-Cys로 치환하는 것, 및 CL의 위치 214에서의 Cys를 비-Cys로 치환하는 것을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0404] 7. 구현예 6에 있어서, 사슬간 Cys를 비-Cys로 치환하는 것은 CH1에서 C220S/A/V 및 CL(EU 번호)에서 C214S/A/V를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0405] 8. 구현예 6에 있어서, 이황화 결합 재형성 돌연변이는 다음:

[0406] (i) CH1에서의 F126C 및 C220S 및 CL에서의 Q124C 및 C214S(EU 번호);

[0407] (ii) CH1에서의 H168C 및 C220S 및 CL에서의 T164C 및 C214S(EU 번호);

[0408] (iii) CH1에서의 F170C 및 C220S 및 CL에서의 T164C 및 C214S(EU 번호);

[0409] (iv) CH1에서의 F170C 및 C220S 및 CL에서의 S162C 및 C214S(EU 번호);

[0410] (v) CH1에서의 V173C 및 C220S 및 CL에서의 S162C 및 C214S(EU 번호);

[0411] (vi) CH1에서의 V173C 및 C220S 및 CL에서의 Q160C 및 C214S(EU 번호);

[0412] (vii) CH1에서의 L128C 및 C220S 및 CL에서의 F118C 및 C214S(EU 번호);

[0413] (viii) CH1에서의 S134C 및 C220S 및 CL에서의 F116C 및 C214S(EU 번호);

[0414] (ix) CH1에서의 S136C 및 C220S 및 CL에서의 S114C 및 C214S(EU 번호);

[0415] (x) CH1에서의 P171C 및 C220S 및 CL에서의 S162C 및 C214S(EU 번호);

[0416] (xi) CH1에서의 T139C 및 C220S 및 CL에서의 F116C 및 C214S(EU 번호)를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0417] 9. 구현예 1 내지 구현예 8 중 어느 하나에 있어서, CH1 영역은 인간 IgG1 CH1, 예를 들어, 인간 IgG1 CH1, 인간 IgG2 CH1, 인간 IgG3 CH1, 또는 인간 IgG4 CH1이고, 예를 들어, CH1 영역은 서열번호 116에 도시된 아미노산 서열을 포함하고/하거나;

[0418] 상기 CL 영역은 인간 카파 경쇄 CL 영역 또는 인간 람다 경쇄 CL 영역이고, 예를 들어, 상기 CL 영역은 서열번호 54 또는 서열번호 55의 아미노산 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0419] 10. 구현예 8 또는 구현예 9에 있어서, CH1은

[0420] (i) 서열번호 129에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, F126C 및 C220S를 포함하거나; 서열번호 129에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

[0421] (ii) 서열번호 133에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, H168C 및 C220S를 포함하거나; 서열번호 133에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

[0422] (iii) 서열번호 135에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, F170C 및 C220S를 포함하거나; 서열번호 135에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

[0423] (iv) 서열번호 137에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, V173C 및 C220S를 포함하거나; 서열번호 137에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

[0424] (v) 서열번호 139에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, L128C 및 C220S를 포함하거나; 서열번호 139에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

[0425] (vi) 서열번호 141에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%

의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, S134C 및 C220S를 포함하거나; 서열번호 141에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

[0426] (vii) 서열번호 143에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, S136C 및 C220S를 포함하거나; 서열번호 143에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

[0427] (viii) 서열번호 145에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, P171C 및 C220S를 포함하거나; 서열번호 145에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

[0428] (ix) 서열번호 147에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, T139C 및 C220S를 포함하거나; 서열번호 147에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0429] 11. 구현예 8 내지 구현예 10 중 어느 하나에 있어서, CL은

[0430] (i) 서열번호 128에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, Q124C 및 C124S를 포함하거나; 서열번호 128에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

[0431] (ii) 서열번호 149에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, T164C 및 C124S를 포함하거나; 서열번호 149에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

[0432] (iii) 서열번호 151에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, S162C 및 C124S를 포함하거나; 서열번호 151에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

[0433] (iv) 서열번호 35에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, Q160C 및 C124S를 포함하거나; 서열번호 35에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

[0434] (v) 서열번호 37에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, F118C 및 C124S를 포함하거나; 서열번호 37에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

[0435] (vii) 서열번호 98에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, F116C 및 C124S를 포함하거나; 서열번호 98에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

[0436] (viii) 서열번호 100에 도시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, S114C 및 C124S를 포함하거나; 서열번호 100에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0437] 12. 구현예 1 내지 구현예 11 중 어느 하나에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 계면에서 아미노산 쌍의 위치는 다음: 상기 중쇄 가변 영역의 위치 39 및 상기 경쇄 가변 영역의 위치 38, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45 및 상기 경쇄 가변 영역의 위치 87, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45 및 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91 및 상기 경쇄 가변 영역의 위치 43, 또는 중쇄 가변 영역의 위치 91 및 경쇄 가변 영역의 위치 44(Kabat 번호)로부터 선택되는, 항체 및 이의 항원 결합 단편.

[0438] 13. 구현예 1 내지 구현예 12 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의 제1 항원 결합 영역에서 상기 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 계면에서의 아미노산 쌍의 위치는 적어도 하나의 제2 항원 결합 영역에서의 위치와 동일한, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0439] 14. 구현예 13에 있어서, 상기 제1 항원 결합 영역에서 아미노산 쌍의 위치에서 돌연변이된 아미노산은 상기 제2 항원 결합 영역에서 동일한 위치에서 돌연변이된 아미노산과 반대 전하를 갖는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0440] 15. 구현예 14에 있어서,

[0441] (1) 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 39에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 38에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되며; 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 39에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 38에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되거나;

[0442] (2) 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 87에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되며; 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 87에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되거나;

[0443] (3) 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되며; 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되거나;

[0444] (4) 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 43에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되며; 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 43에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되거나;

[0445] (5) 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되며; 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0446] 16. 구현예 15에 있어서, 양전하를 갖는 아미노산은 K, R, 또는 H로부터 선택되고/되거나, 음전하를 갖는 아미노산은 E 또는 D로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0447] 17. 구현예 16에 있어서,

[0448] (i). 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 39에서의 아미노산은 K로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 38에서의 아미노산은 D로 치환되는 반면, 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 39에서의 아미노산은 D로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 38에서의 아미노산은 K로 치환되거나;

[0449] (ii). 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 K로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 87에서의 아미노산은 D로 치환되는 반면, 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 D로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 87에서의 아미노산은 K로 치환되거나;

[0450] (iii). 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 K로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 D로 치환되는 반면, 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 D로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 K로 치환되거나;

[0451] (iv). 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 K로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 43에서의 아미노산은 D로 치환되는 반면, 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 D로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 43에서의 아미노산은 K로 치환되거나;

[0452] (v). 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 K로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 D로 치환되는 반면, 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 D로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 K로 치환되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0453] 18. 구현예 1 내지 구현예 17 중 어느 하나에 있어서, 상기 다중특이적 항체는 전하 돌연변이 및 이황화 결합 재형성 돌연변이를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0454] 19. 구현예 1 내지 구현예 18 중 어느 하나에 있어서, 동일한 항원에 결합하는 하나 또는 복수의 또는 모든 항원 결합 영역은 동일한 돌연변이를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0455] 20. 구현예 1 내지 구현예 19 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 항원 결합 영역은 중쇄 가변 영역, 중쇄 불변 영역 CH1, 경쇄 가변 영역, 및 경쇄 불변 영역 CL을 포함하고, 제2 항원 결합 영역은 중쇄 가변 영역 VH 및 경쇄 가변 영역 VL을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0456] 21. 구현예 20에 있어서,

[0457] 1) 상기 제1 항원 결합 영역은 구현예 1 내지 구현예 17 중 어느 하나에 정의된 이황화 결합 재형성 돌연변이를 포함하거나;

[0458] 2) 상기 제1 항원 결합 영역은 구현예 1 내지 구현예 17 중 어느 하나에 정의된 전하 돌연변이를 포함하거나;

[0459] 3) 상기 제1 항원 결합 영역은 구현예 1 내지 구현예 17 중 어느 하나에 정의된 이황화 결합 재형성 돌연변이 및 전하 돌연변이를 포함하거나;

[0460] 4) 상기 제1 항원 결합 영역은 구현예 1 내지 구현예 17 중 어느 하나에서 정의된 이황화 결합 재형성 돌연변이 및 전하 돌연변이를 포함하고; 제2 항원 결합 영역은 구현예 1 내지 구현예 17 중 어느 하나에서 정의된 전하 돌연변이를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0461] 22. 구현예 21에 있어서,

[0462] 1) 상기 제1 항원 결합 영역은 구현예 2 내지 구현예 8 중 어느 하나에 정의된 이황화 결합 재형성 돌연변이를 포함하거나;

[0463] 2) 상기 제1 항원 결합 영역은 구현예 12 내지 구현예 17 중 어느 하나에서 정의된 전하 돌연변이를 포함하거나;

[0464] 3) 상기 제1 항원 결합 영역은 구현예 2 내지 구현예 8 중 어느 하나에서 정의된 이황화 결합 재형성 돌연변이를 포함하고, 구현예 12 내지 구현예 17 중 어느 하나에서 정의된 전하 돌연변이를 포함하거나;

[0465] 4) 상기 제1 항원 결합 영역 및 상기 제2 항원 결합 영역은 구현예 12 내지 구현예 17 중 어느 하나에서 정의된 전하 돌연변이를 포함하고, 상기 제1 항원 결합 영역은 또한 구현예 2 내지 구현예 8 중 어느 하나에서 정의된 이황화 결합 재형성 돌연변이를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0466] 23. 구현예 22에 있어서, 상기 다중특이적 항체의 제1 항원 결합 영역은 다음으로부터 선택된 돌연변이 조합을 포함하며:

[0467]

	중쇄 VH 돌연변이	중쇄 CH1 돌연변이	경쇄 VL 돌연변이	경쇄 CL 돌연변이
조합 1	Q39K	F126C, C220S	Q38D	Q124C, C214S
	Q39K	H168C, C220S	Q38D	T164C, C214S
	Q39K	F170C, C220S	Q38D	T164C, C214S
	Q39K	F170C, C220S	Q38D	S162C, C214S
	Q39K	V173C, C220S	Q38D	S162C, C214S
	Q39K	V173C, C220S	Q38D	Q160C, C214S
	Q39K	L128C, C220S	Q38D	F118C, C214S
	Q39K	S134C, C220S	Q38D	F116C, C214S
	Q39K	S136C, C220S	Q38D	S114C, C214S
	Q39K	P171C, C220S	Q38D	S162C, C214S
	Q39K	T139C, C220S	Q38D	F116C, C214S
조합 2	L45K	F126C, C220S	Y87D	Q124C, C214S
	L45K	H168C, C220S	Y87D	T164C, C214S
	L45K	F170C, C220S	Y87D	T164C, C214S
	L45K	F170C, C220S	Y87D	S162C, C214S
	L45K	V173C, C220S	Y87D	S162C, C214S
	L45K	V173C, C220S	Y87D	Q160C, C214S
	L45K	L128C, C220S	Y87D	F118C, C214S
	L45K	S134C, C220S	Y87D	F116C, C214S
	L45K	S136C, C220S	Y87D	S114C, C214S
	L45K	P171C, C220S	Y87D	S162C, C214S
	L45K	T139C, C220S	Y87D	F116C, C214S
조합 3	L45K	F126C, C220S	P44D	Q124C, C214S
	L45K	H168C, C220S	P44D	T164C, C214S
	L45K	F170C, C220S	P44D	T164C, C214S
	L45K	F170C, C220S	P44D	S162C, C214S

	L45K	V173C, C220S	P44D	S162C, C214S
	L45K	V173C, C220S	P44D	Q160C, C214S
	L45K	L128C, C220S	P44D	F118C, C214S
	L45K	S134C, C220S	P44D	F116C, C214S
	L45K	S136C, C220S	P44D	S114C, C214S
	L45K	P171C, C220S	P44D	S162C, C214S
	L45K	T139C, C220S	P44D	F116C, C214S
조합 4	Y91K	F126C, C220S	A43D	Q124C, C214S
	Y91K	H168C, C220S	A43D	T164C, C214S
	Y91K	F170C, C220S	A43D	T164C, C214S
	Y91K	F170C, C220S	A43D	S162C, C214S
	Y91K	V173C, C220S	A43D	S162C, C214S
	Y91K	V173C, C220S	A43D	Q160C, C214S
	Y91K	L128C, C220S	A43D	F118C, C214S
	Y91K	S134C, C220S	A43D	F116C, C214S
	Y91K	S136C, C220S	A43D	S114C, C214S
	Y91K	P171C, C220S	A43D	S162C, C214S
	Y91K	T139C, C220S	A43D	F116C, C214S
조합 5	Y91K	F126C, C220S	P44D	Q124C, C214S
	Y91K	H168C, C220S	P44D	T164C, C214S
	Y91K	F170C, C220S	P44D	T164C, C214S
	Y91K	F170C, C220S	P44D	S162C, C214S
	Y91K	V173C, C220S	P44D	S162C, C214S
	Y91K	V173C, C220S	P44D	Q160C, C214S
	Y91K	L128C, C220S	P44D	F118C, C214S
	Y91K	S134C, C220S	P44D	F116C, C214S
	Y91K	S136C, C220S	P44D	S114C, C214S
	Y91K	P171C, C220S	P44D	S162C, C214S

[0468]

	Y91K	T139C, C220S	P44D	F116C, C214S

[0469]

[0470] 임의로, 상기 제2 항원 결합 영역은 또한 다음으로부터 선택된 돌연변이 조합을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

	중쇄 VH 돌연변이	경쇄 VL 돌연변이
조합 1	Q39D	Q38K
조합 2	L45D	Y87K
조합 3	L45D	P44K
조합 4	Y91D	A43K
조합 5	Y91D	P44K

[0471]

[0472] 24. 구현예 23에 있어서, 상기 다중특이적 항체의 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원 결합 영역은 다음의 돌연변이 조합을 각각 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

	제 1 항원 결합 영역				제 2 항원 결합 영역	
	중쇄 VH 돌연변이	중쇄 CH1 돌연변이	경쇄 VL 돌연변이	경쇄 CL 돌연변이	중쇄 VH 돌연변이	경쇄 VL 돌연변이
조합 1	Q39K	F126C, C220S	Q38D	Q124C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	H168C, C220S	Q38D	T164C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	F170C, C220S	Q38D	T164C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	F170C, C220S	Q38D	S162C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	V173C, C220S	Q38D	S162C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	V173C, C220S	Q38D	Q160C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	L128C, C220S	Q38D	F118C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	S134C, C220S	Q38D	F116C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	S136C, C220S	Q38D	S114C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	P171C, C220S	Q38D	S162C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	T139C, C220S	Q38D	F116C, C214S	Q39D	Q38K
조합 2	L45K	F126C, C220S	Y87D	Q124C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	H168C, C220S	Y87D	T164C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	F170C, C220S	Y87D	T164C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	F170C, C220S	Y87D	S162C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	V173C, C220S	Y87D	S162C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	V173C, C220S	Y87D	Q160C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	L128C, C220S	Y87D	F118C, C214S	L45D	Y87K

[0473]

	L45K	S134C, C220S	Y87D	F116C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	S136C, C220S	Y87D	S114C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	P171C, C220S	Y87D	S162C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	T139C, C220S	Y87D	F116C, C214S	L45D	Y87K
조합 3	L45K	F126C, C220S	P44D	Q124C, C214S	L45D	P44K
	L45K	H168C, C220S	P44D	T164C, C214S	L45D	P44K
	L45K	F170C, C220S	P44D	T164C, C214S	L45D	P44K
	L45K	F170C, C220S	P44D	S162C, C214S	L45D	P44K
	L45K	V173C, C220S	P44D	S162C, C214S	L45D	P44K
	L45K	V173C, C220S	P44D	Q160C, C214S	L45D	P44K
	L45K	L128C, C220S	P44D	F118C, C214S	L45D	P44K
	L45K	S134C, C220S	P44D	F116C, C214S	L45D	P44K
	L45K	S136C, C220S	P44D	S114C, C214S	L45D	P44K
	L45K	P171C, C220S	P44D	S162C, C214S	L45D	P44K
	L45K	T139C, C220S	P44D	F116C, C214S	L45D	P44K
조합 4	Y91K	F126C, C220S	A43D	Q124C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	H168C, C220S	A43D	T164C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	F170C, C220S	A43D	T164C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	F170C, C220S	A43D	S162C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	V173C, C220S	A43D	S162C, C214S	Y91D	A43K

[0474]

	Y91K	V173C, C220S	A43D	Q160C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	L128C, C220S	A43D	F118C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	S134C, C220S	A43D	F116C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	S136C, C220S	A43D	S114C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	P171C, C220S	A43D	S162C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	T139C, C220S	A43D	F116C, C214S	Y91D	A43K
조합 5	Y91K	F126C, C220S	P44D	Q124C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	H168C, C220S	P44D	T164C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	F170C, C220S	P44D	T164C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	F170C, C220S	P44D	S162C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	V173C, C220S	P44D	S162C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	V173C, C220S	P44D	Q160C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	L128C, C220S	P44D	F118C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	S134C, C220S	P44D	F116C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	S136C, C220S	P44D	S114C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	P171C, C220S	P44D	S162C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	T139C, C220S	P44D	F116C, C214S	Y91D	P44K

[0475]

[0476] 25. 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 제1 항원에 특이적으로 결합하는 하나 또는 복수의 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원에 특이적으로 결합하는 하나 또는 복수의 제2 항원 결합 영역을 포함하되, 적어도 하나의 상기 항원 결합 영역은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 중쇄 가변 및 경쇄 가변 영역에서의 아미노산 쌍은 아미노산 쌍 상의 2개의 아미노산을 반대 전하를 갖는 아미노산으로 돌연변이시키는 전하 돌연변이를 각각 포함하며, 상기 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 계면에서 아미노산 쌍의 위치는: 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45 및 상기 경쇄 가변 영역의 위치 87, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45 및 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91 및 상기 경쇄 가변 영역의 위치 43, 또는 중쇄 가변 영역의 위치 91 및 경쇄 가변 영역의 위치 44(Kabat 번호)로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0477] 26. 구현예 25에 있어서, 적어도 하나의 제1 항원 결합 영역에서 상기 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 계면에서의 아미노산 쌍의 위치는 적어도 하나의 제2 항원 결합 영역에서의 위치와 동일하며, 상기 제1 항원 및 제2 항원은 동일하거나 상이한, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0478] 27. 구현예 26에 있어서, 상기 제1 항원 결합 영역 내의 아미노산 쌍의 위치에서 돌연변이된 아미노산은 상기 제2 항원 결합 영역 내의 동일한 위치에서 돌연변이된 아미노산과 반대 전하를 갖는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0479] 28. 구현예 27에 있어서,

[0480] (1) 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 87에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되며; 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로

치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 87에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되거나;

[0481] (2) 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되며; 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되거나;

[0482] (3) 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 43에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되며; 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 43에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되거나;

[0483] (4) 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되며; 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 음전하를 갖는 아미노산으로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 양전하를 갖는 아미노산으로 치환되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0484] 29. 구현예 28에 있어서, 양전하를 갖는 아미노산은 K, R, 또는 H로부터 선택되고/되거나 음전하를 갖는 아미노산은 E 또는 D로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0485] 30. 구현예 29에 있어서,

[0486] (i). 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 K로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 87에서의 아미노산은 D로 치환되는 반면, 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 D로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 87에서의 아미노산은 K로 치환되거나;

[0487] (ii). 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 K로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 D로 치환되는 반면, 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 45에서의 아미노산은 D로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 K로 치환되거나;

[0488] (iii). 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 K로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 43에서의 아미노산은 D로 치환되는 반면, 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 D로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 43에서의 아미노산은 K로 치환되거나;

[0489] (iv). 상기 제1 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 K로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 D로 치환되는 반면, 상기 제2 항원 결합 영역에서, 상기 중쇄 가변 영역의 위치 91에서의 아미노산은 D로 치환되고, 상기 경쇄 가변 영역의 위치 44에서의 아미노산은 K로 치환되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0490] 31. 구현예 1 내지 구현예 30 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 항원 결합 영역은 동일한 돌연변이를 포함하고, 상기 제2 항원 결합 영역은 동일한 돌연변이를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0491] 32. 구현예 1 내지 구현예 31 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 항원 결합 영역은 항체의 Fab 단편이고/이거나, 상기 제2 항원 결합 영역은 항체의 Fab 단편인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0492] 33. 구현예 1 내지 구현예 32 중 어느 하나에 있어서, 상기 항체의 하나 또는 복수의 또는 모든 제1 항원 결합 영역이 포함하는 경쇄 불변 영역은 카파 경쇄 불변 영역이고, 상기 하나 또는 복수의 또는 모든 제2 항원 결합 영역이 포함하는 경쇄 불변 영역은 람다 경쇄 불변 영역이거나, 상기 하나 또는 복수의 또는 모든 제1 항원 결합 영역이 포함하는 경쇄 불변 영역은 람다 경쇄 불변 영역이고, 상기 하나 또는 복수의 또는 모든 제2 항원 결합 영역이 포함하는 경쇄 불변 영역은 카파 경쇄 불변 영역인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0493] 34. 구현예 1 내지 구현에 33 중 어느 하나에 있어서, 상기 항체는 또한 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역을 포함하고, 상기 제1 Fc 영역 및 상기 제2 Fc 영역은 동일하거나 상이한, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0494] 35. 구현예 34에 있어서, 상기 제1 Fc 영역 및 상기 제2 Fc 영역은 각각 인간 IgG Fc, 예를 들어 인간 IgG1

Fc, 인간 IgG2 Fc, 인간 IgG3 Fc, 또는 인간 IgG4 Fc이고, 예를 들어, 이는 아미노산 서열 서열번호 122 또는 123을 포함하거나 이로 구성되거나, 적어도 90%의 동일성, 예를 들어 95%, 96%, 97%, 99%, 또는 그 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0495] 36. 구현예 34 또는 구현예 35에 있어서, 상기 노브-인투-홀 기술에 기초하여, 상응하는 노브 돌연변이 및 홀 돌연변이는 상기 제1 Fc 영역 및 상기 제2 Fc 영역 내로 도입되는, 다중특이적 항체.

[0496] 37. 구현예 36에 있어서,

[0497] a) 하나의 Fc 영역의 폴리펩티드는 돌연변이 T366W를 포함하는 반면, 다른 Fc 영역의 폴리펩티드는 T366S, L368A, 및 Y407V(EU 인덱스에 기초하여 넘버링됨)를 포함하거나,

[0498] b) 하나의 Fc 영역은 아미노산 치환 S354C 및 T366W를 포함하고, 다른 Fc 영역은 아미노산 치환 Y349C, T366S, L368A, 및 Y407V(EU 인덱스에 기초하여 넘버링됨)를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0499] 38. 구현예 36에 있어서,

[0500] a) 하나의 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 125에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 반면, 다른 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 124에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

[0501] b) 하나의 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 125에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 반면, 다른 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 124에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나;

[0502] c) 하나의 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 125에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고 돌연변이 S354C 및 T366W를 포함하는 반면, 다른 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 124에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고 돌연변이 Y349C, T366S, L368A, 및 Y407V를 포함하거나;

[0503] d) 하나의 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 20 또는 131에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 반면, 다른 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 101 또는 130에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

[0504] e) 하나의 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 20 또는 131에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 반면, 다른 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 101 또는 130에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나;

[0505] f) 하나의 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 20 또는 131에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고 돌연변이 T366W를 포함하는 반면, 다른 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 101 또는 130에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고 T366S, L368A, 및 Y407V를 포함하는, 다중특이적 항체.

[0506] 39. 구현예 34 또는 구현예 35에 있어서, 돌연변이는 상기 제1 Fc 영역 및 상기 제2 Fc 영역의 이종이량체화를 촉진하기 위한 이노바디 기술에 기초하여 상기 제1 Fc 영역 및 상기 제2 Fc 영역에 도입되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0507] 40. 구현예 39에 있어서, 하나의 Fc 영역의 CH3은 S364R 및 D399K 돌연변이를 포함하고, 다른 Fc 영역의 CH3 돌연변이는 Y349T, K370S, 및 K409D 돌연변이를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0508] 41. 구현예 40에 있어서,

[0509] a) 하나의 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 126에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 반면, 다른 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 127에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되거나;

[0510] b) 하나의 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 126에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 반면, 다른 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 127에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나;

[0511] c) 하나의 Fc 영역은 서열번호 126에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고 돌연변이 S364R 및 D399K를 포함하는 반면, 다른 Fc 영역의 폴리펩티드는 서열번호 127에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고 돌연변이 Y349T, K370S, 및 K409D를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0512] 42. 구현예 34 내지 구현예 41 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 및/또는 제2 Fc 영역은 L234A/L235A 돌연변이를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0513] 43. 구현예 1 내지 구현예 42 중 어느 하나에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 결합된 항원은 하나 또는 복수의: CD3, BCMA, CD20, Her2, Her3, B7H3, EGFR, Hel, cMET, Axl, GPRC5D, PD-1, PD-L1, CD47과 같은 면역 관문 분자, 4-1BB, CD40, 및 OX40과 같은 면역 활성화 분자로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0514] 44. 구현예 1 내지 구현예 43 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 항원 및 제2 항원은 상이하고 상기 항체는 이중특이적 항체인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0515] 45. 구현예 44에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 다음: CD3/BCMA, CD3/CD20, CD3/Her2, Her2/Her3, B7H3/EGFR, PD-L1/CD47, PD-L1/CD40, PD-L1/4-1BB, EGFR/Her3, Her2/Hel, Her2/PD-1, Her2/PD-L1, Her2/CD47, Her2/cMet, 또는 CD3/GPRC5D로부터 선택된 2개의 항원에 결합하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0516] 46. 구현예 44 또는 구현예 45에 있어서, 본 개시의 이중특이적 항체는 제1 항원에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 영역을 포함하되, 상기 제1 항원 결합 영역은 제1 Fab를 포함하며, 상기 제2 항원 결합 영역은 제2 Fab를 포함하고, 상기 제1 Fab는 (링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 상기 제1 Fc 영역의 N-말단에 연결되고, 상기 제2 Fab는 (링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 상기 제2 Fc 영역의 N-말단에 연결되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0517] 47. 구현예 46에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 도 1에 도시된 구성을 갖는 IgG 유사 항체인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0518] 48. 구현예 46 또는 구현예 47에 있어서, 다음을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

[0519] 중쇄 1: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제1 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1-제1 Fc 영역을 포함하거나 이로 구성되되, 상기 중쇄 불변 영역 CH1은 링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이 이의 C-말단에서 상기 제1 Fc 영역의 N-말단에 연결됨;

[0520] 경쇄 1: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제1 Fab 경쇄 가변 영역-경쇄 불변 영역을 포함하거나 이로 구성됨;

[0521] 중쇄 2: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제2 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1-제2 Fc 영역을 포함하거나 이로 구성되되, 상기 중쇄 불변 영역 CH1은 링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이 이의 C-말단에서 상기 제2 Fc 영역의 N-말단에 연결됨;

[0522] 경쇄 2: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제2 Fab 경쇄 가변 영역-경쇄 불변 영역을 포함하거나 이로 구성됨.

[0523] 49. 구현예 48에 있어서,

[0524] (1) 상기 제1 항원 결합 영역은 Her2에 특이적으로 결합하며, 중쇄 1 및 경쇄 1은 다음의 서열번호에 도시된 아미노산 서열을 각각 포함하거나, 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 다음의 서열번호에 도시된 서열로 구성되거나

[0525] i) 서열번호 43 및 서열번호 45;

[0526] ii) 서열번호 48 및 서열번호 49;

[0527] iii) 서열번호 21 및 서열번호 22;

[0528] iv) 서열번호 25 및 서열번호 26;

[0529] v) 서열번호 25 및 서열번호 29;

[0530] vi) 서열번호 31 및 서열번호 32; 또는

[0531] vii) 서열번호 31 및 서열번호 29;

[0532] 및/또는

[0533] (2) 상기 제2 항원 결합 영역은 Hel에 특이적으로 결합하고, 중쇄 2 및 경쇄 2는 다음의 서열번호를 각각 포함하거나, 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 다음의 서열번호에 도시된 서열로 구성되거나

[0534] i) 서열번호 41 및 서열번호 42;

[0535] ii) 서열번호 23 및 서열번호 24;

[0536] iii) 서열번호 27 및 서열번호 28;

[0537] iv) 서열번호 27 및 서열번호 30;

[0538] v) 서열번호 33 및 서열번호 34; 또는

[0539] vi) 서열번호 33 및 서열번호 30;

[0540] (2)-1 상기 제2 항원 결합 영역은 PD-1에 특이적으로 결합하고, 중쇄 2 및 경쇄 2는 다음의 서열번호를 각각 포함하거나; 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 다음의 서열번호 46 및 서열번호 47에 도시된 서열로 구성되거나;

[0541] (2)-2 상기 제2 항원 결합 영역은 CD47에 특이적으로 결합하고, 중쇄 2 및 경쇄 2는 다음의 서열번호를 각각 포함하거나; 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 다음의 서열번호 50 및 서열번호 51에 도시된 서열로 구성되거나;

[0542] (3)-2 상기 제2 항원 결합 영역은 cMet에 특이적으로 결합하고, 중쇄 2 및 경쇄 2는 다음의 서열번호를 각각 포함하거나; 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 다음의 서열번호 52 및 서열번호 53에 도시된 서열로 구성되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0543] 50. 구현예 44 또는 구현예 45에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 제1 항원에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원에 특이적으로 결합하는 2개의 제2 항원 결합 영역을 포함하되, 상기 제1 항원 결합 영역은 제1 Fab를 포함하며, 상기 제2 항원 결합 영역은 제2 Fab를 포함하고, 1개의 제2 Fab는 (링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 상기 제1 Fc 영역의 N-말단에 연결되고, 1개의 제1 Fab는 (링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 상기 제2 Fc 영역의 N-말단에 연결되고, 다른 제2 Fab는 (링커를 통해 또는 링커 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 상기 제1 Fab 중쇄 가변 영역의 N-말단에 연결되는, 다중특이적 항체.

[0544] 51. 구현예 50에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 도 5a에 도시된 구성을 갖는 2+1N-말단 구성을 갖는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0545] 52. 구현예 51에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 다음을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

[0546] 중쇄 1: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제2 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1-상기 제1 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1-제2 Fc 영역을 포함하거나 이로 구성되되, 상기 제1 Fab 중쇄 불변 영역 CH1은 링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이 이의 C-말단에서 상기 제2 Fc 영역의 N-말단에 연결되고, 상기 제2 Fab는 (링커를 통해 또는 링커 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 상기 제1 Fab 중쇄 가변 영역의 N-말단에 연결됨;

[0547] 경쇄 1: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제1 Fab 경쇄 가변 영역-경쇄 불변 영역을 포함하거나 이로 구성됨;

[0548] 중쇄 2: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제2 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1-제1 Fc 영역을 포함하거나 이로 구성되되, 상기 중쇄 불변 영역 CH1은 링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이 이의 C-말단에서 상기 제1 Fc 영역의 N-말단에 연결됨;

[0549] 경쇄 2: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제2 Fab 경쇄 가변 영역-경쇄 불변 영역을 포함하거나 이로 구성되며,

[0550] 상기 이중특이적 항체는 2개의 경쇄 2를 포함함.

[0551] 53. 구현예 52에 있어서, 상기 제1 항원 결합 영역은 CD3에 결합하고, 상기 제2 항원 결합 영역은 GPRC5D에 결합하되, 예를 들어,

[0552] 1) 중쇄 1은 서열번호 58에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 58에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

[0553] 경쇄 1은 서열번호 59에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 59에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

[0554] 중쇄 2는 서열번호 57에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 57에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

[0555] 경쇄 2는 서열번호 56에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 56에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

[0556] 2) 중쇄 1은 서열번호 62에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 62에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

[0557] 경쇄 1은 서열번호 63에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 63에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

[0558] 중쇄 2는 서열번호 61에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 61에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

[0559] 경쇄 2는 서열번호 60에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 60에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0560] 54. 구현예 44 또는 구현예 45에 있어서, 본 개시의 이중특이적 항체는 제1 항원에 특이적으로 결합하는 1개의 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원에 특이적으로 결합하는 2개의 제2 항원 결합 영역을 포함하되, 상기 제1 항원 결합 영역은 제1 Fab를 포함하고, 상기 제2 항원 결합 영역은 제2 Fab를 포함하며, 상기 2개의 제2 Fab는 (링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 상기 제1 Fc 영역의 N-말단 및 상기 제2 Fc 영역의 N-말단에 각각 연결되고, 상기 제1 Fab 중쇄 가변 영역의 N-말단은 (링커를 통해 또는 링커 없이) 상기 제2 Fc 영역의 C-말단에 연결되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0561] 55. 구현예 54에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 도 5b에 도시된 구성을 갖는 2+1C-말단 구성을 갖는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0562] 56. 구현예 55에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 다음을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

[0563] 중쇄 1: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제2 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1-제2 Fc 영역-상기 제1 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1을 포함하거나 이로 구성되되, 상기 제2 Fab는 (링커를 통해 또는 링커 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 상기 제2 Fc 영역의 N-말단에 연결되고, 상기 제1 Fab 중쇄 가변 영역의 N-말단은 (링커를 통해 또는 링커 없이) 상기 제2 Fc 영역의 C-말단에 연결됨;

[0564] 경쇄 1: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제1 Fab 경쇄 가변 영역-경쇄 불변 영역을 포함하거나 이로 구성됨;

[0565] 중쇄 2: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제2 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1-제1 Fc 영역을 포함하거나 이로 구성되되, 상기 중쇄 불변 영역 CH1은 링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이 이의 C-말단에서 상기 제1 Fc 영역의 N-말단에 연결됨;

[0566] 경쇄 2: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제2 Fab 경쇄 가변 영역-경쇄 불변 영역을 포함하거나 이로 구성되며,

[0567] 상기 이중특이적 항체는 2개의 경쇄 2를 포함함.

[0568] 57. 구현예 56에 있어서, 상기 제1 항원 결합 영역은 CD3에 결합하고, 상기 제2 항원 결합 영역은 GPRC5D에 결합하되, 예를 들어,

[0569] 1) 중쇄 1은 서열번호 64에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 64에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

[0570] 경쇄 1은 서열번호 59에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 59에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

[0571] 중쇄 2는 서열번호 57에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 57에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

[0572] 경쇄 2는 서열번호 56에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 56에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

[0573] 2) 중쇄 1은 서열번호 65에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 65에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

[0574] 경쇄 1은 서열번호 63에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 63에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

[0575] 중쇄 2는 서열번호 61에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 61에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

[0576] 경쇄 2는 서열번호 60에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 60에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0577] 58. 구현예 44 또는 구현예 45에 있어서, 본 개시의 이중특이적 항체는 제1 항원에 특이적으로 결합하는 2개의 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원에 특이적으로 결합하는 2개의 제2 항원 결합 영역을 포함하되, 상기 제1 항원 결합 영역은 제1 Fab를 포함하고, 상기 제2 항원 결합 영역은 제2 Fab를 포함하며, 상기 2개의 제2 Fab는 (링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 2개의 Fc 영역의 N-말단에 연결되고(Fc 영역은 동일하거나 상이할 수 있음), 상기 2개의 제1 Fab의 중쇄 가변 영역의 N-말단은 2개의 Fc 영역의 C-말단에 연결되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0578] 59. 구현예 58에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 도 5c에 도시된 구성을 갖는 2+2C-말단 구성을 갖는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0579] 60. 구현예 59에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 다음을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

[0580] 중쇄: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제2 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1-Fc 영역-상기 제1 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1을 포함하거나 이로 구성되되, 상기 제2 Fab는 (링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 상기 Fc 영역의 N-말단에 연결되고, 상기 제1 Fab 중쇄 가변 영역의 N-말단은 링커를 통해 또는 링커 없이 상기 Fc 영역의 C-말단에 연결됨;

[0581] 경쇄 1: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제1 Fab 경쇄 가변 영역-경쇄 불변 영역을 포함하거나 이로 구성됨;

[0582] 경쇄 2: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제2 Fab 경쇄 가변 영역-경쇄 불변 영역을 포함하거나 이로 구성되며,

[0583] 상기 이중특이적 항체는 2개의 중쇄를 포함함.

[0584] 61. 구현예 60에 있어서, 상기 제1 항원 결합 영역은 CD3에 결합하고, 상기 제2 항원 결합 영역은 GPRC5D에 결합하되, 예를 들어,

[0585] 1) 중쇄는 서열번호 66에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 66에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

[0586] 경쇄 1은 서열번호 59에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 59에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

[0587] 경쇄 2는 서열번호 56에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 56에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

[0588] 2) 중쇄는 서열번호 67에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 67에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

[0589] 경쇄 1은 서열번호 63에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 63에 도시된 아미노산 서열과 적어도

85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

[0590] 경쇄 2는 서열번호 60에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 60에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0591] 62. 구현예 1 내지 구현예 43 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 항원 및 제2 항원은 상이하고, 상기 항체는 또한 하나 또는 복수의 다른 항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 영역을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0592] 63. 구현예 62에 있어서, 상기 항체는 삼중특이적 항체인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0593] 64. 구현예 63에 있어서, 본 개시의 삼중특이적 항체는 제1 항원에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 영역을 포함하고, 제2 항원에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 영역을 포함하고, 제3 항원에 특이적으로 결합하는 제3 항원 결합 영역을 포함하되, 상기 제1 항원 결합 영역은 제1 Fab를 포함하고, 상기 제2 항원 결합 영역은 제2 Fab를 포함하며, 상기 제1 Fab는 (링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 상기 제1 Fc 영역의 N-말단에 연결되고, 상기 제2 Fab는 (링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 상기 제2 Fc 영역의 N-말단에 연결되고, 상기 제3 항원 결합 영역은 링커를 통해 또는 링커 없이 이의 VH 또는 VL의 N-말단에서 상기 제2 Fc 영역의 C-말단에 연결되는 scFv(예를 들어, VH-VL, 또는 VL-VH)를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0594] 65. 구현예 64에 있어서, 상기 삼중특이적 항체의 구성은 도 7a 또는 도 7b에 도시된 바와 같이 2+1C-말단 구성인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0595] 66. 구현예 65에 있어서, 상기 다중특이적 항체는 다음을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

[0596] 중쇄 1: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제1 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1-제1 Fc 영역을 포함하거나 이로 구성되되, 상기 제1 Fab는 (링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이) 이의 CH1의 C-말단에서 상기 제1 Fc 영역의 N-말단에 연결됨;

[0597] 경쇄 1: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제1 Fab 경쇄 가변 영역-경쇄 불변 영역을 포함하거나 이로 구성됨;

[0598] 중쇄 2: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제2 Fab 중쇄 가변 영역-중쇄 불변 영역 CH1-제2 Fc 영역-scFv를 포함하거나 이로 구성되되, 상기 중쇄 불변 영역 CH1은 링커(예를 들어, 힌지 영역)를 통해 또는 링커 없이 상기 중쇄 불변 영역 CH1의 C-말단에서 상기 제2 Fc 영역의 N-말단에 연결되고, scFv는 링커를 통해 또는 링커 없이 이의 VH 또는 VL(예를 들어, scFv는 VL-VH, 예를 들어, VL의 N-말단임)의 N-말단 또는 C-말단에서 상기 제2 Fc 영역의 C-말단에 연결됨;

[0599] 경쇄 2: N-말단에서 C-말단 방향으로: 상기 제2 Fab 경쇄 가변 영역-경쇄 불변 영역을 포함하거나 이로 구성됨.

[0600] 67. 구현예 66에 있어서, 상기 제1 항원 결합 영역은 GPRC5D에 특이적으로 결합하고/하거나, 상기 제2 항원 결합 영역은 CD3에 특이적으로 결합하고/하거나, 상기 제3 항원 결합 영역은 BCMA에 특이적으로 결합하되, 예를 들어,

[0601] 중쇄 1은 서열번호 71에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 71에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

[0602] 경쇄 1은 서열번호 72에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 72에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

[0603] 중쇄 2는 서열번호 73에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 73에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고/되거나;

[0604] 경쇄 2는 서열번호 74에 도시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 74에 도시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0605] 68. 구현예 1 내지 구현예 67 중 어느 하나에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 핵산, 또는 이의 임의의 또는 복수의 사슬.

[0606] 69. 구현예 68에 따른 핵산을 포함하는 발현 벡터.

[0607] 70. 구현예 68에 따른 핵산 또는 구현예 69에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

[0608] 71. 구현예 1 내지 구현예 67 중 어느 하나에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제조하는 방법으로서,

[0609] a) 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 다양한 사슬을 암호화하는 핵산을 숙주 세포 내로 도입하는 단계;

[0610] b) 상기 숙주 세포에서 발현하는 단계 및 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 조립하는 단계를 포함하며;

[0611] 임의로, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 정제되고, 예를 들어 단백질 A에 의해 정제되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제조하는 방법.

[0612] 72. 구현예 1 내지 구현예 67 중 어느 하나에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 면역접합체.

[0613] 73. 구현예 1 내지 구현예 67 중 어느 하나에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 융합 단백질.

[0614] 74. 구현예 1 내지 구현예 67 중 어느 하나에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 T 세포 수용체.

[0615] **II. 결합 분자의 제조**

[0616] 본 개시는 결합 분자, 예를 들어 항체를 생산하기 위한 시험관 내 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 결합 분자는 항체 또는 융합 단백질이다. 일부 구현예에서, 항체는 다중특이적 항체, 예를 들어 이중특이적 항체이다.

[0617] 일 양태에서, 본 개시의 결합 분자, 예를 들어 항체를 제조하는 방법은:

[0618] a) 결합 분자의 다양한 사슬, 예를 들어 항체를 암호화하는 핵산을 숙주 세포 내로 도입하는 단계;

[0619] b) 숙주 세포에서 발현하고 결합 분자, 예를 들어 항체를 조립하는 단계를 포함하며;

[0620] 임의적으로, 결합 분자는 예를 들어 단백질 A에 의해 정제된다.

[0621] 또 다른 구현예에서, 화합물, 예를 들어 L-아르기닌은 결합 분자, 예를 들어 항체의 생산 동안 배양 배지에 첨가된다. 일 구현예에서, Arg는 단백질을 안정화시키는 데 사용된다.

[0622] 일부 구현예에서, 본 개시의 산물은 돌연변이 전에 결합 분자, 예를 들어 항체와 동일한 발현 수준 및 친화도를 유지한다.

[0623] 일부 구현예에서, 본 개시의 방법은 안정한 결합 분자, 예를 들어 항체, 예컨대 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체)를 고수율로 수득한다.

[0624] 일부 구현예에서, 본 개시의 방법은 결합 분자의 다양한 사슬, 예를 들어, 세포주에서 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체)와 같은 항체를 발현하고 이들을 조립할 수 있으며, 바람직하게는 2개의 세포주에서 발현 및 시험관 내 재조합을 피할 수 있다.

[0625] **III 핵산 및 숙주 세포**

[0626] 본 개시는 본 개시의 결합 분자의 임의의 사슬 또는 임의의 단량체 또는 도메인, 예를 들어 항체, 예컨대 다중특이적 항체, 예를 들어 이중특이적 항체를 암호화하는 핵산을 제공한다. 당업계에 익숙한 방법은 다양한 사슬을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 생산하는 데 사용될 수 있다. 또한 본 개시의 폴리뉴클레오티드 및 핵산은 분비 신호 펩티드를 코딩하는 분절을 포함할 수 있고, 본 개시의 항체 또는 결합 분자, 예를 들어 항체, 예컨대 다중특이적 항체, 예를 들어 이중특이적 항체를 암호화하는 항체 또는 단백질에 작동 가능하게 연결함으로써 본 개시의 결합 분자, 예를 들어 항체, 예컨대 다중특이적 항체, 예를 들어 이중특이적 항체, 및 이의 다양한 사슬의 분비 발현을 안내한다.

[0627] 본 개시는 또한 본 개시의 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다. 일 구현예에서, 벡터는 발현 벡터, 예를 들어 진핵생물 발현 벡터이다. 벡터는 바이러스, 플라스미드, 코스미드, 람다 파지, 및 효모 인공 염색체(YAC)를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 바람직한 구현예에서, 본 개시의 발현 벡터는 pCNDA 벡터, 예를 들어 pCNDA3.1 발현 벡터이다.

[0628] 본 개시는 또한 핵산 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 복제에 적합하고 본 개시의 결합 분자, 예를 들어, 다중특이적 항체와 같은 항체, 예를 들어 이중특이적 항체의 발현을 지원하는 숙주 세포는 당업계에 공지되어 있다. 이러한 세포는 특정 발현 벡터를 사용하여 형질감염되거나 형질도입될 수 있고, 대규모 발효 탱크의

접종용 벡터를 함유하는 다량의 세포를 성장시킬 수 있고, 이에 의해 임상 적용을 위한 충분한 양의 다중특이적 항체, 예를 들어 이중특이적 항체를 수득할 수 있다.

[0629] 일 구현예에서, 숙주 세포는 진핵생물이다. 다른 구현예에서, 숙주 세포는 효모 세포, 포유류 세포(예를 들어, CHO 세포 또는 293 세포, 예를 들어, Expi293 세포)로부터 선택된다. 사용 가능한 포유류 숙주 세포주의 예는 SV40-형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주(COS-7); 인간 배아 신장 계통(293 또는 293T 세포), 예컨대, 예를 들어, 문헌[Graham 등, JGenVirol36, 59 (1977)]에 기록된 것들, 아기 햄스터 신장 세포(BHK), 마우스 세르톨리 세포(TM4 세포, 예컨대, 예를 들어, 문헌[Mather, BiolReprod23, 243 - 251 (1980)]에 기록된 것들), 원숭이 신장 세포(CV1), 클로로세부스 신장 세포(VERO-76), 인간 자궁경부암 세포(HELA), 개 신장 세포(MDCK), 버팔로 랫트 간 세포(BRL3A), 인간 폐 세포(W138), 인간 간 세포(HepG2), 마우스 유방암 세포(MMT060562), TRI 세포(예컨대, 예를 들어, 문헌[Mather 등, AnnalsN.Y.AcadSci 383, 44 - 68(1982)]), MRC5 세포, 및 FS4 세포이다. 다른 유용한 포유류 숙주 세포주는 dhfr-CHO 세포를 포함하는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포(문헌[Urlaub 등, ProcNatlAcadSciUSA77, 4,216 (1980)]); 및 Y0, NS0, P3X63, 및 Sp2/0과 같은 골수종 세포주를 포함한다. 일 구현예에서, 숙주 세포는 진핵 세포, 바람직하게는 포유류 세포, 예컨대 CHO 세포, 인간 배아 신장(HEK) 세포, 또는 림프구(예를 들어, Y0, NS0, Sp20 세포)이다.

[0630] **IV. 본 개시의 결합 분자 또는 이의 단편을 포함하는 다른 분자**

[0631] 일부 구현예에서, 본 개시의 결합 분자의 제1 및/또는 제2 표적 결합 영역은 약물, 전구체, 또는 독소, 또는 약물, 전구체, 또는 독소를 함유하는 수용체기와 접합할 수 있다. 이러한 수용체기는, 예를 들어 비-천연 아미노산일 수 있다.

[0632] 따라서, 본 개시는 또한 본 개시의 결합 분자, 예를 들어 항체, 예컨대 다중특이적 항체, 예를 들어 이중특이적 항체의 면역접합체(ADC)에 관한 것이다.

[0633] 일부 구현예에서, 본 개시의 결합 분자 또는 이의 단편은 또한 T 세포 수용체(TCR)에 작제될 수 있다. 일부 구현예에서, TCR의 가변 영역은 본 개시에 따른 돌연변이 또는 돌연변이 조합, 예를 들어 이황화 결합 재형성 돌연변이 및/또는 전하 돌연변이를 포함한다.

[0634] 일부 구현예에서, 본 개시의 결합 분자 또는 이의 단편은 다른 단백질과 융합되어 융합 단백질을 구성할 수 있다. 일부 구현예에서, 다른 단백질의 예는, 예를 들어 리간드 또는 수용체, 예를 들어 과립-연관 사이토카인 또는 이의 수용체, 예컨대 종양 괴사 인자(TNF), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 형질전환 성장 인자(TGF, 예를 들어 TGF-β) 또는 이의 수용체, 및 이의 단편을 포함한다.

[0635] **V. 제품 및 용도**

[0636] 일부 구현예에서, 본 개시는 또한 결합 분자, 예를 들어 항체, 예컨대 다중특이적 항체, 예를 들어 이중특이적 항체를 포함하는 조성물(예를 들어, 약학적 조성물)에 관한 것이다.

[0637] 일 구현예에서, 조성물은 또한 약학적 부형제를 포함한다. 일 구현예에서, 조성물, 예를 들어 약학적 조성물은 본 개시의 결합 분자, 및 하나 또는 복수의 다른 유형의 치료제의 조합을 포함한다.

[0638] 본 개시의 조성물은 또한 완충액을 포함하여 당업계에 공지된 약학적 벡터 및 약학적 비히클과 같은 적절한 약학적 부형제를 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "약학적 벡터"는 임의의 또는 모든 생리학적으로 양립 가능한 용매, 분산 배지, 등장화제, 흡수 지연제 등을 포함한다. 약학적 부형제의 사용 및 용도는 문헌["Handbook of Pharmaceutical Excipients", Version 8, R.C.Rowe, P.J.Seskey and S.C. Owen, Pharmaceutical Press, London, Chicago]을 참조한다. 본 개시의 조성물은 복수의 형태일 수 있다. 이러한 형태는, 예를 들어 액체 용액(예를 들어, 주사식 용액 및 불용성 용액), 분말 또는 현탁액, 리포솜 제제, 및 좌제와 같은 액체, 반고체, 및 고체 투여 형태를 포함한다. 바람직한 형태는 예상되는 투여 방식 및 치료적 용도에 따라 달라진다. 원하는 순도를 갖는 본 개시의 결합 분자는 하나 또는 복수의 유형의 선택적인 약학적 부형제와 혼합되어 본 개시의 결합 분자를 포함하는 약물, 예를 들어 동결건조된 제형 또는 수용액을 제조할 수 있다.

[0639] 일부 구현예에서, 본 개시는 질환, 예를 들어 종양을 치료하거나, 치료적 용도를 위해, 또는 치료를 위한 약물을 제조하기 위해 결합 분자, 예를 들어 항체, 예컨대 다중특이적 항체, 예를 들어 이중특이적 항체를 사용하는 방법에 관한 것이다.

[0640] 이의 치료적 용도에 따라, 본 개시의 결합 분자, 예를 들어 항체, 예컨대 다중특이적 항체, 예를 들어 이중특이적 항체는 다른 치료제와 조합될 수 있다. 예를 들어, 결합 분자가 종양을 치료하는 데 사용되는 경우, 치료제

는, 예를 들어 종양을 치료하는 데 사용되는 다양한 치료제, 예를 들어 화학요법제, 혈관형성 억제제, 사이토카인, 세포독성제, 다른 항체, 소분자 약물, 또는 면역조절제(예를 들어, 면역 관문 억제제 또는 작용제)이다.

[0641] 일부 구현예에서, 본 개시는 또한 본 개시의 결합 분자, 및 하나 또는 복수의 다른 유형의 치료제 등을 포함하는 약학적 조합 또는 약학적 조합 제품을 제공한다.

[0642] 본 개시의 다른 목적은 본 개시의 약학적 조합을 포함하는 부품 키트를 제공하는 것이며, 바람직하게는, 키트는 약물 투여 형태이다. 이와 같이, 투여 단위는 약물의 투여 요법 또는 투여 간격에 기초하여 제공될 수 있다.

[0643] 일 구현예에서, 본 개시의 부품 키트는 동일한 패키지에서 다음을 포함한다:

[0644] - 본 개시의 결합 분자를 포함하는 약학적 조성물을 함유하는 제1 용기;

[0645] - 다른 치료제를 포함하는 약학적 조성물을 함유하는 제2 용기.

[0646] **구현예**

[0647] **구현예 1. 돌연변이 항체의 설계**

[0648] 이황화 결합 재형성

[0649] 상동성 경쇄 및 중쇄 페어링을 강제하고 2개의 항체의 경쇄 및 중쇄 사이의 불일치를 피하기 위한 효과적인 전략은 항체 중 하나의 경쇄 및 중쇄를 연결하는 이황화 결합을 재형성하고, 불일치된 경쇄 및 중쇄가 이황화 결합을 효과적으로 형성할 수 없도록 이황화 결합의 위치를 변경하는 것이다. 우리는 중쇄 및 경쇄의 접촉 표면에서 아미노산을 스크리닝하고, α 탄소 원자 사이의 거리가 8 Å 미만, 바람직하게는 6 Å 미만인 2개의 아미노산 쌍을 선택하였고, 아미노산의 측쇄는 서로를 향한다. 선택된 아미노산 쌍은 표 1(EU 번호)에 도시된 바와 같다:

표 1: 이황화 결합 재형성을 위한 위치의 선택

[0650]

중쇄 위치	실시예 CH1	경쇄 위치	실시예 CL
F126C	서열번호 1	Q124C	서열번호 2
H168C	서열번호 132	T164C	서열번호 148
F170C	서열번호 134	T164C	서열번호 148
F170C	서열번호 134	S162C	서열번호 150
V173C	서열번호 136	S162C	서열번호 150
V173C	서열번호 136	Q160C	서열번호 152
L128C	서열번호 138	F118C	서열번호 36
S134C	서열번호 140	F116C	서열번호 38
S136C	서열번호 142	S114C	서열번호 99
P171C	서열번호 144	S162C	서열번호 150
T139C	서열번호 146	F116C	서열번호 38

[0651] 전하 돌연변이

[0652] 상동성 경쇄 및 중쇄 페어링을 강제하고 2개의 항체의 경쇄 및 중쇄 사이의 불일치를 피하기 위한 또 다른 효과적인 전략은 중쇄 및 경쇄의 접촉 표면 상에서 아미노산 쌍을 발견하고, 이를 반대 전하를 갖는 아미노산으로 돌연변이시켜, 반대 전하의 원리에 기초하여 상동성 페어링을 촉진하는 것이다. 선택 기준은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 계면에서의 보존적 아미노산 쌍이며, 여기서 아미노산 쌍의 α 탄소 원자 사이의 거리는 12 Å 미만이고, 측쇄는 서로 마주본다. 선택된 아미노산 쌍은 표 2(Kabat 번호)에 도시된다.

표 2: 전하 돌연변이 조합

	항체 1 중쇄 돌연변이	실시예 VH	항체 1 경쇄 돌연변이	실시예 VL	항체 2 중쇄 돌연변이	실시예 VH	항체 2 경쇄 돌연변이	실시예 VL
조합 1	Q39K	서열번호 3	Q38D	서열번호 4	Q39D	서열번호 5	Q38K	서열번호 6
조합 2	L45K	서열번호 7	Y87D	서열번호 8	L45D	서열번호 9	Y87K	서열번호 10
조합 3	L45K	서열번호 7	P44D	서열번호 11	L45D	서열번호 9	P44K	서열번호 12
조합 4	Y91K	서열번호 13	A43D	서열번호 14	Y91D	서열번호 15	A43K	서열번호 16
조합 5	Y91K	서열번호 13	P44D	서열번호 11	Y91D	서열번호 15	P44K	서열번호 12

[0653]

[0654] 세포주에서 발현된 이중특이적 항체에 사용된 최종 돌연변이는 표 3에 도시된 바와 같이, 이황화 결합 재형성 및 전하 돌연변이의 조합이다:

표 3: V 영역에서 전하 돌연변이와 이황화 결합 재형성 돌연변이의 조합

	항체 1				항체 2	
	중쇄 VH 돌연변이	중쇄 CH1 돌연변이	경쇄 VL 돌연변이	경쇄 CL 돌연변이	중쇄 VH 돌연변이	경쇄 VL 돌연변이
조합 1	Q39K	F126C, C220S	Q38D	Q124C, C214S	Q39D	Q38K
조합 2	L45K	F126C, C220S	Y87D	Q124C, C214S	L45D	Y87K
조합 3	L45K	F126C, C220S	P44D	Q124C, C214S	L45D	P44K
조합 4	Y91K	F126C, C220S	A43D	Q124C, C214S	Y91D	A43K
조합 5	Y91K	F126C, C220S	P44D	Q124C, C214S	Y91D	P44K
조합 6	Q39K	H168C, C220S	Q38D	T164C, C214S	Q39D	Q38K
조합 7	Q39K	F170C, C220S	Q38D	T164C, C214S	Q39D	Q38K
조합 8	Q39K	F170C, C220S	Q38D	S162C, C214S	Q39D	Q38K
조합 9	Q39K	V173C, C220S	Q38D	S162C, C214S	Q39D	Q38K
조합 10	Q39K	V173C, C220S	Q38D	Q160C, C214S	Q39D	Q38K
조합 11	Q39K	S134C, C220S	Q38D	F116C, C214S	Q39D	Q38K
조합 12	Q39K	S136C, C220S	Q38D	S114C, C214S	Q39D	Q38K
조합 13	Q39K	P171C, C220S	Q38D	S162C, C214S	Q39D	Q38K
조합 14	Q39K	T139C, C220S	Q38D	F116C, C214S	Q39D	Q38K

[0655]

[0656] 항체 1이 항-Her 2 mAb이고 항체 2가 항-Hel mAb인 경우, 예시적인 이중특이적 항체의 전장 사슬의 서열, 즉 표 9의 조합 1~조합 5의 서열에 대한 서열 표의 표 3의 조합 1~조합 5를 참조한다.

[0657] 경쇄 불변 영역에서의 치환

[0658] 미량 불일치 항체의 하류 정제 및 제거의 용이성을 위해, 항체 중 하나의 경쇄 불변 영역은 C 카파에서 C 람다로의 치환을 위해 선택될 수 있어서(항체 중 하나의 경쇄 불변 영역이 람다 경쇄인 경우, 치환은 필요하지 않음), 2개의 항체 Fab 중 하나는 카파이고 다른 하나는 람다이고, 하류 정제는 선택적 친화도 배지로 카파 및 람다 경쇄 상에서 수행된다.

[0659] **구현예 2. HEK293 세포에서의 돌연변이체의 발현 및 돌연변이체의 정제**

[0660] 본 개시의 다양한 항체의 다양한 사슬을 유전자 합성을 위해 GENEWIZ에 전송하고, pCDNA3.1 템플릿 플라스미드에 작제하고, 소정량의 플라스미드를 제조하였다. 구현예에서 사용된 다양한 항체의 사슬 서열의 요약은 표 4를 참조한다.

표 4 이황화 결합 재형성을 거쳐 작제된 이중특이적 항체

항체명	Her2/Hel_WT	Her2/Hel_126C_121C	Her2/Hel_126C_124C	Her2/PD-1_WT	Her2/PD-1_126C_121C	Her2/PD-1_126C_124C
중쇄 위치 돌연변이	WT	F126C	F126C	WT	F126C	F126C
경쇄 위치 돌연변이	WT	S121C	Q124C	WT	S121C	Q124C
제 1 항체의 중쇄	서열번호 39 노브 돌연변이를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-중쇄	서열번호 43 F126C 및 노브 돌연변이를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-중쇄 이탤릭체로 표시된 것은 F126C 를 포함하는 CH1 임(서열번호 1)	서열번호 43	서열번호 39	서열번호 43	서열번호 43
제 1 항체의 중쇄 VH	서열번호 75 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-중쇄 VH, 돌연변이 없음					
제 1 항체의 경쇄	서열번호 40 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-경쇄	서열번호 44 S121C 를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-경쇄	서열번호 45 Q124C 를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-경쇄	서열번호 40	서열번호 44	서열번호 45

[0661]

제 1 항체의 경쇄 VL	서열번호 76 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-경쇄 VL, 돌연변이 없음					
제 2 항체의 중쇄	서열번호 41 홀 돌연변이를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임) 중쇄			서열번호 46 AA 돌연변이 및 홀 돌연변이를 포함하는 신털리맙(항 PD-1) H		
제 2 항체의 중쇄 VH	서열번호 77 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임) 중쇄 VH			서열번호 79 신털리맙(항-PD-1) 중쇄 VH		
제 2 항체의 경쇄	서열번호 42 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임) 경쇄			서열번호 47 카파 경쇄 불변 영역을 포함하는 신털리맙(항 PD-1) 경쇄		
제 2 항체의 경쇄 VL	서열번호 78 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-VL			서열번호 80 신털리맙(항-PD-1) 경쇄 VL		

	표 7 의 조합 1 즉, Her2 _126C_124C/Hel	표 7 의 조합 2	표 7 의 조합 3
제 1 항체의 중쇄	서열번호 43	서열번호 48 F126C 및 C220S 를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-중쇄	서열번호 21 Q39K, F126C, 및 C220S 를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-중쇄, 및 노브 돌연변이

[0662]

제 1 항체의 중쇄 VH	서열번호 75	서열번호 75 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-중쇄 VH, 돌연변이 없음	서열번호 3 Q39K 를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-VH
제 1 항체의 경쇄	서열번호 45	서열번호 49 Q124C 및 C214S 를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-경쇄	서열번호 22 Q38D, Q124C, 및 Q214S 돌연변이를 포함하는 트라스투주맙 TZB-경쇄
제 1 항체의 경쇄 VL	서열번호 76	서열번호 76 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-경쇄 VL, 돌연변이 없음	서열번호 4 Q38D 를 포함하는 트라스투주맙 TZB-VL
제 2 항체의 중쇄	서열번호 41	서열번호 41	서열번호 41
제 2 항체의 중쇄 VH	서열번호 77	서열번호 77	서열번호 77
제 2 항체의 경쇄	서열번호 42	서열번호 42	서열번호 42
제 2 항체의 경쇄 VL	서열번호 78	서열번호 78	서열번호 78

	표 8 의 Her2/PD-1	표 8 의 Her2/CD47	표 8 의 Her2/cMET	
제 1 항체의 중쇄	서열번호 21 Q39K, F126C, 및 C220S 를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-중쇄, 및 노브 돌연변이			
제 1 항체의 중쇄 VH	서열번호 3 Q39K 를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-VH			
제 1 항체의 경쇄	서열번호 22 Q38D, Q124C, 및 Q214S 돌연변이를 포함하는 트라스투주맙 TZB-경쇄			
제 1 항체의 경쇄 VL	서열번호 4 Q38D 를 포함하는 트라스투주맙 TZB-VL			
제 2 항체의 중쇄	서열번호 46	서열번호 50	서열번호 52	

[0663]

	AA 돌연변이 및 홀 돌연변이를 포함하는 신틸리맙(항-PD-1) 중쇄(IgG1 아형)	ADI26630 H	오나투주맙 H	
제 2 항체의 중쇄 VH	서열번호 79 신틸리맙(항 PD-1) 중쇄 VH, 돌연변이 없음	서열번호 81 ADI26630 중쇄 VH	서열번호 18 오나투주맙 중쇄 VH	
제 2 항체의 경쇄	서열번호 47 카파 경쇄 불변 영역을 포함하는 신틸리맙(항 PD-1) 경쇄	서열번호 51 ADI26630 경쇄	서열번호 53 오나투주맙 경쇄	
제 2 항체의 경쇄 VL	서열번호 80 신틸리맙(항-PD-1) 경쇄 VL, 돌연변이 없음	서열번호 82 ADI26630 경쇄 VL	서열번호 17 오나투주맙 경쇄 VL	

	표 9 또는 표 10의 조합 1	표 9 또는 표 10 의 조합 2	표 9 또는 표 10 의 조합 3	표 9 또는 표 10 의 조합 4	표 9 또는 표 10의 조합 5
제 1 항체의 중쇄	서열번호 21 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-중쇄 Q39K, F126C, 및 C220S, 및 노브 돌연변이를 포함함	서열번호 25 L45K, F126C, C220S 돌연변이, 및 노브 돌연변이를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-중쇄	서열번호 25	서열번호 31 Y91K_F126C_C220S 및 노브 돌연변이를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-중쇄	서열번호 31
제 1 항체의 중쇄 VH	서열번호 3 Q39K 를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-VH	서열번호 7 L45K 를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-VH	서열번호 7	서열번호 13 Y91K 를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-VH	서열번호 13
제 1 항체의 경쇄	서열번호 22 Q38D, Q124C, 및 Q214S 돌연변이를 포함하는 트라스투주맙 TZB-경쇄	서열번호 26 Y87D_Q124C_C214S 를 포함하는 트라스투주맙 TZB-경쇄	서열번호 29 P44D_Q124C_C214S 를 포함하는 트라스투주맙 TZB-경쇄	서열번호 32 A43D_Q124C_C214S 를 포함하는 트라스투주맙 TZB-경쇄	서열번호 29
제 1 항체의 경쇄 VL	서열번호 4 Q38D 를 포함하는 트라스투주맙 TZB-VL	서열번호 8 Y87D 를 포함하는 트라스투주맙 TZB-VL	서열번호 11 P44D 를 포함하는 트라스투주맙 TZB-VL	서열번호 14 A43D 를 포함하는 트라스투주맙 TZB-VL	서열번호 11
제 2 항체의 중쇄	서열번호 23 Q39D 및 홀 돌연변이를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-중쇄	서열번호 27 L45D 및 홀 돌연변이를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-중쇄	서열번호 27	서열번호 33 Y91D 및 홀 돌연변이를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-중쇄	서열번호 33

[0664]

[0665]

	난백 리소자임)-중쇄				
제 2 항체의 중쇄 VH	서열번호 5 Q39D 를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-VH	서열번호 9 L45D 를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-VH	서열번호 9	서열번호 15 Y91D 를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-VH	서열번호 15
제 2 항체의 경쇄	서열번호 24 Q38K 돌연변이를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-경쇄	서열번호 28 Y87K 돌연변이를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-경쇄	서열번호 30 P44K 돌연변이를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-경쇄	서열번호 34 A43K 돌연변이를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-경쇄	서열번호 30
제 2 항체의 경쇄 VL	서열번호 6 Q38K 를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-VL	서열번호 10 Y87K 를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-VL	서열번호 12 P44K 를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-VL	서열번호 16 A43K 를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-VL	서열번호 12

	표 11 의 GPRC5D/CD3-1	표 11 의 GPRC5D/CD3-2	표 11 의 GPRC5D/CD3-3	표 11 의 GPRC5D/CD3-4	표 11 의 GPRC5D/CD3-5	표 11 의 GPRC5D/CD3-6
경쇄 2	서열번호 56	서열번호 60	서열번호 56	서열번호 60	서열번호 56	서열번호 60
경쇄 2	서열번호 83	서열번호 93	서열번호 83	서열번호 93	서열번호 83	서열번호 93

[0666]

가변 영역						
중쇄 2	서열번호 57	서열번호 61	서열번호 57	서열번호 61	NA	NA
중쇄 2 가변 영역	서열번호 87	서열번호 94	서열번호 87	서열번호 94	NA	NA
경쇄 1	서열번호 59	서열번호 63	서열번호 59	서열번호 63	서열번호 59	서열번호 63
경쇄 1 가변 영역	서열번호 92	서열번호 97	서열번호 92	서열번호 97	서열번호 92	서열번호 97
중쇄 1	서열번호 58	서열번호 62	서열번호 64	서열번호 65	서열번호 66	서열번호 67
중쇄 1 가변 영역 1	서열번호 87	서열번호 95	서열번호 87	서열번호 95	서열번호 87	서열번호 95
중쇄 1 중쇄 가변 영역 2	서열번호 91	서열번호 96	서열번호 91	서열번호 96	서열번호 91	서열번호 96

[0667]

[0668] 세포의 일시적인 발현을 위해 0.22 μm 필터 헤드를 사용하여 플라스미드를 여과하였다. 원하는 형질감염 부피에 기초하여 Expi293 세포(Invitrogen)를 계대시키고, 형질감염 전 당일에 세포 밀도를 3 X 10^6 세포/mL로 조정하였다. 형질감염 당일에 세포 밀도를 3 X 10^6 세포/mL로 다시 조정하였다. 최종 부피가 1/10(v/v)인 Opti-MEM 배양 배지(Gibco 카탈로그 번호: 31985-070)를 항체 A 중쇄: 항체 A 경쇄: 항체 B 중쇄: 항체 B 경쇄 = 1: 1: 1: 1 또는 다른 적절한 비율의 비율로 발현 플라스미드에 첨가된 형질감염 완충액으로서 사용하고, 잘 혼합하였다. 적절한 양의 폴리에틸렌이민(PEI)(Polysciences, 23966)을 이전 단계에서 플라스미드에 첨가하고(플라스마 대 PEI의 질량비는 1:3임), 잘 혼합하고, 실온에서 10분 동안 인큐베이션하여 DNA/PEI 혼합물을 수득하였다. DNA/PEI 혼합물을 HEK293 세포에 부드럽게 붓고 잘 혼합하고, 37° C, 8% CO2 조건에서 24시간 동안 배양한 후, 추가의 VPA(Sigma, 카탈로그 번호: P4543-100G)를 2 mM 및 2%(v/v) 공급(1 g/L Phytone Peptone + 1 g/L Difco Select Phytone)의 최종 농도로 첨가하고, 6일 동안 계속 배양하였다. 배양 생성물을 수집하고, 4,000 회전/분으로 30분 동안 원심분리하고, 세포 상청액을 수집하고, 0.45 μM 막을 통해 여과하고, 단백질 A 친화도 크로마토그래피를 통해 정제하였다. 특별한 요건을 갖는 샘플을 이온 교환 크로마토그래피, KappaSelect 친화도 크로마토그래피 및 LambdaFabSelect 친화도 크로마토그래피를 통해 추가로 정제하였다.

[0669] 단백질 A 친화도 크로마토그래피 정제의 특정 작동 단계는 다음과 같다: 상청액을 미리 충진된 컬럼 Hitrap Mabselect Sure(GE, 11-0034-95)를 사용하여 정제하였다. 작동 단계는 다음과 같다: 정제 전에, 컬럼 부피의 5배의 평형 용액(20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.2)을 사용하여 평형화시키고; 수집된 상청액을 컬럼에 통과시키고, 그런 다음, 평형화 용액의 컬럼 부피의 10배를 사용하여 패킹(packing) 컬럼을 세정하여 비-특이적 결합 단백질을 제거하고; 패킹을 컬럼 부피 5배의 용리 완충액(100 mM 구연산나트륨, pH 3.5)으로 플러싱(flush)하고, 용리액을 수집하였다. 2 M Tris를 첨가하여 pH를 6.5로 중화시켰다. 정제 후 정확하게 페어링된 이중특이적 항

체의 비율을 액체 크로마토그래피-질량 분광분석(LC-MS)을 사용하여 정량적으로 측정하였다.

[0670] 이온 교환 크로마토그래피 정제의 특정 작동 단계는 다음과 같다: 한외여과 농도 튜브(MILLIPORE, 카탈로그 번호: UFC901096)를 사용하여 pH 6.0 저염 PB 완충액(10 mM 인산염, pH 6.0)로 교환하고, Capto HiRes S 10/100(GE, 카탈로그 번호 29275879)를 정제하기 전에, pH 6.0 저염 PB 완충액의 컬럼 부피의 5배를 사용하여 패킹 컬럼을 평형화시키고; 교환된 샘플을 컬럼에 통과시키고, 그런 다음, pH 6.0 저염 PB 완충액의 컬럼 부피의 10배를 사용하여 패킹 컬럼을 세정하여 비특이적 결합 단백질을 제거하였고; 용리 동안, pH 6.0 저염 PB 완충액(10 mM 인산염, pH 6.0, 1 M NaCl)은 선형으로 증가하였고(선형 구배: 30 컬럼 부피 이내, pH 6.0 고염 PB 완충액의 비율은 30%에서 100%로 증가하였음), 용리 주 피크를 수집하였다. 한외여과 농축 튜브(MILLIPORE, 카탈로그 번호: UFC901096 참조)를 사용하여 PBS(Gibco, 카탈로그 번호: 70011-044)로 교환하였다. 정제 후 정확하게 페어링된 이중특이적 항체의 비율을 액체 크로마토그래피-질량 분광분석(LC-MS)을 사용하여 정량적으로 측정하였다.

[0671] KappaSelect 친화도 크로마토그래피 정제의 특정 작동 단계는 다음과 같다: 상청액을 미리 충진된 컬럼 HiTrap KappaSelect(GE, 17-5458-11)를 사용하여 정제하였다. 작동 단계는 다음과 같다: 정제 전에, 패킹 컬럼을 평형화 용액의 컬럼 부피(PBS pH 7.4)의 5배를 사용하여 평형화시키고; 수집된 상청액을 컬럼을 통과시킨 다음, 패킹 컬럼을 평형화 용액의 컬럼 부피의 10배를 사용하여 세정하여 비특이적 결합 단백질을 제거하고; 패킹을 용리 완충액의 컬럼 부피(0.1 M 글리신 완충액, pH 2.5)의 5배로 플러싱하고, 용리액을 수집하였다. 2 M Tris를 첨가하여 pH를 6.5로 중화시켰다. 정제 후 정확하게 페어링된 이중특이적 항체의 비율을 액체 크로마토그래피-질량 분광분석(LC-MS)을 사용하여 정량적으로 측정하였다.

[0672] LambdaFabSelect 친화도 크로마토그래피 정제의 특정 작동 단계는 다음과 같다: 상청액을 미리 충진된 컬럼 Hitrap LambdaFabSelect(GE, 17-5482-11)를 사용하여 정제하였다. 작동 단계는 다음과 같다: 정제 전에, 패킹 컬럼을 평형화 용액의 컬럼 부피(PBS pH 7.4)의 5배를 사용하여 평형화시키고; 수집된 상청액을 컬럼을 통과시킨 다음, 패킹 컬럼을 평형화 용액의 컬럼 부피의 10배를 사용하여 세정하여 비특이적 결합 단백질을 제거하고; 패킹을 용리 완충액의 컬럼 부피(0.1 M 아세테이트 완충액, pH 3.5)의 5배로 플러싱하고 용리액을 수집하였다. 2 M Tris를 첨가하여 pH를 6.5로 중화시켰다. 정제 후 정확하게 페어링된 이중특이적 항체의 비율을 액체 크로마토그래피-질량 분광분석(LC-MS)을 사용하여 정량적으로 측정하였다.

[0673] **구현예 3 본 개시에서 돌연변이된 아미노산의 스크리닝**

[0674] 이황화 결합을 직접 형성할 수 있는 돌연변이 부위의 스크리닝

[0675] 모델 항체로서, 트라스투주맙을 돌연변이시켜 중쇄와 경쇄 사이의 자연 이황화 결합(H C220S, 경쇄 C214S)을 제거한 다음, 표 1에 따라 선택된 아미노산 쌍을 Cys로 돌연변이시켰다. 돌연변이된 mAb를 HEK293 시스템에서 발현시키고, 단백질 A를 사용하여 정제한 다음, 도 9a 내지 도 9c에 도시된 바와 같이 비환원 폴리아크릴아미드 겔 전기영동을 수행하였다. 이들 돌연변이된 mAb는 비환원 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에서 완전한 분자로서 유지될 수 있고, 최소 경쇄 성분만이 떨어진다는 것을 알 수 있다. 선택된 이황화 결합 돌연변이 부위는 기본적으로 정상적인 방식으로 이황화 결합을 형성하였다.

[0676] 또한, 이황화 결합을 형성한 이들 항체는 nrCE-SDS를 변성시키고(도 9d 내지 도 9m), 형성된 이황화 결합의 무결성에 대한 정량적 측정을 수행하였다. 이황화 결합 재형성된 항체는 98%가 넘는 완전한 분자를 가졌고, 이는 재형성된 이황화 결합이 정확하게 형성될 수 있음을 추가로 입증한다는 것을 알 수 있다.

[0677] **이황화 결합 재형성 돌연변이가 정확한 페어링의 비율에 미치는 효과**

[0678] 일례로서 표 1의 F126/Q124C 이황화 결합 재형성 돌연변이를 사용하여, 정확한 페어링의 비율에 대한 이황화 결합 재형성 돌연변이의 효과를 시험하고, 본 개시의 돌연변이된 항체를 적용하고, 야생형 항체 서열을 대조군으로서 사용하였다. HEK293 세포에서의 발현 후, 다른 정제 방법이 불일치 분자를 제거하는 것을 방지하기 위해 단백질 A 친화도 크로마토그래피 정제만을 사용하였다. 이중특이적 항체가 형성될 경우 항-Her2/항-PD-1 항체 쌍에 대한 정확한 항-Her2/항-Hel 항체 쌍의 비율을 LC-MS를 사용하여 시험하였다. 중쇄 사이의 이종 페어링을 노브-인투-홀을 통해 촉진시켰다.

표 5 이황화 결합 재형성을 거친 이중특이적 항체 및 정확한 페어링의 비율

항체명	정확하게 페어링된 분자의 비율
Her2/Hel_WT	30.27%
Her2/Hel_126C_121C	58.18%
Her2/Hel_126C_124C	65.10%
Her2/PD-1_WT	55.60%
Her2/PD-1_126C_121C	70.78%
Her2/PD-1_126C_124C	76.93%

[0679]

[0680] 상기 표로부터 F126C/Q124C 돌연변이가 이중특이적 항체의 정확한 페어링의 비율을 상당히 증가시킬 수 있음을 알 수 있는데, 예를 들어, 야생형 항체 쌍에 대한 정확한 Her2/PD-1 항체 쌍의 비율은 55.60%에 도달하였다. F126C/Q124C 돌연변이를 첨가한 후, 정확한 페어링의 비율은 최대 76.93%까지 증가하였다.

[0681] F126C/Q124C 돌연변이에 의해 형성된 정확하게 페어링된 분자의 비율은 가장 높았고, 야생형 항체 서열보다 상당히 높았고, 또한 CN104011221B에 개시된 돌연변이 F126C/S121C보다 어느 정도 더 높다는 것을 알 수 있다.

[0682] 또한, 돌연변이된 Cys 쌍 사이에 정확한 이황화 결합이 형성되지 않은 경우, 완전한 티올을 갖는 Cys는 종종 세포 또는 용액 중의 유리 Cys와 반응하여 이황화 결합을 형성하여 단백질 분자가 Cys에 의해 변형되게 한다. 이러한 변형은 LC-MS에 의해 검출될 수 있다.

표 6 이황화 결합 재형성을 거친 이중특이적 항체에서의 Cys 변형 시험

항체명	Cys 변형의 비율
Her2/Hel_WT	N/A
Her2/Hel_126C_121C	N/A
Her2/Hel_126C_124C	N/A
Her2/PD-1_WT	N/A
Her2/PD-1_126C_121C	10%
Her2/PD-1_126C_124C	N/A

[0683]

[0684] Her2/Hel bsAb 또는 Her2/PD-1 bsAb에서의 여부와 관계없이, 유리 Cys의 변형된 성분은 F126C/Q124C 돌연변이 후에 거의 검출되지 않으며, 이는 정확하게 형성된 이황화 결합의 매우 높은 비율을 추가로 나타낸다. 대조적으로, CN104011221B에 개시된 바와 같이 돌연변이 F126C/S121C를 도입한 Her2/PD-1 이중특이적 항체는 여전히 약 10%의 변형된 유리 Cys를 가졌는데, 이는 F126C/S121C 이황화 결합의 일부가 정확한 방식으로 완전히 형성될 수 없었음을 의미한다.

[0685] **이황화 결합 재형성 돌연변이 및 V 영역 전하 돌연변이**

[0686] 전하 돌연변이(Q39K/Q38D)를 이황화 결합 재형성 돌연변이(F126C/Q124C)에 첨가하고, HEK293 세포에서의 발현 후, 다른 정제 방법이 불일치 분자를 제거하는 것을 방지하기 위해 단백질 A 친화도 크로마토그래피 정제만을 사용하였다. 이중특이적 항체가 형성될 경우 정확한 항-Her2/항-Hel 항체 쌍의 비율을 LC-MS를 사용하여 시험하였다(도 2). 중쇄 사이의 이종 페어링을 노브-인투-홀을 통해 촉진시켰다.

표 7 이황화 결합 돌연변이 및 전하 돌연변이 후 정확하게 페어링된 이중특이적 항체의 비율

	중쇄 VH 돌연변이	중쇄 CH1 돌연변이	경쇄 VL 돌연변이	경쇄 CL 돌연변이	정확하게 페어링된 분자의 비율
조합 1	N/A	F126C	N/A	Q124C	47.4%
조합 2	N/A	F126C, C220S	N/A	Q124C, C214S	65.6%
조합 3	Q39K	F126C, C220S	Q38D	Q124C, C214S	96.3%

[0687]

[0688] 정확하게 페어링된 이중특이적 항체의 비율은 이황화 결합 재형성 후에 상당히 증가하였음을 알 수 있다. 항체의 천연 이황화 결합을 제거한 후(표 7의 조합 2, 도 2b), 정확한 페어링 비율은 이황화 결합만 첨가했을 경우보다 더 증가하였다(표 7의 조합 1, 도 2a). 또한, 전하 돌연변이를 V 영역에 첨가했을 경우(표 7의 조합 3, 도 2c), 정확한 페어링 비율은 더 증가하였다.

[0689] HEk293 세포에서의 발현 후, bsAb의 4쌍의 상이한 항체 쌍 조합을 사용하여, 단백질 A 친화도 크로마토그래피 정제만을 사용하여 다른 정제 방법이 불일치 분자를 제거하는 것을 방지하였다. 이중특이적 항체가 형성될 경우 정확한 페어링의 비율을 LC-MS를 사용하여 시험하였다(도 3). 상이한 항체에 대한 이황화 결합 재형성 및 전하 돌연변이의 범용성을 검증하였다. 동시에, 항체의 발현 수준이 관찰되었다.

표 8-1 이황화 결합 재형성 및 전하 돌연변이를 상이한 항체에 도입한 후의 항체 서열 및 정확한 페어링 비율

항체 쌍	돌연변이	정확하게 페어링된 분자의 비율	발현 수준(mg/L)
Her2/PD-1	Q39K,F126C,C220S/ Q38D,Q124C,C214S	86.1%	199.6
Her2/CD47		89.1%	234.8
Her2/cMET		94.6%	222.9

[0690]

[0691] 정확한 페어링의 비율은 4개의 상이한 항체 조합에서 약 90%로 유지되었으며, 이는 이황화 결합 재형성 및 전하 돌연변이가 상이한 항체에서 보편적임을 나타낸다. 4개의 상이한 항체 조성물의 발현 수준은 약 200 mg/L에 도달하였는데, 이는 비교적 높은 발현 수준이며 mAb와 유사하다.

[0692] **상이한 위치에서의 이황화 결합 재형성 및 전하 돌연변이가 정확한 페어링의 비율에 미치는 효과**

[0693] 세포에서 IgG의 자연 조립 및 분비 과정은 다음과 같다: 중쇄가 세포에서 발현된 후, CH1은 분자 샤페론 BiP와 결합하고 경쇄를 만나기 전에 불완전한 접힘 상태를 유지한다. 경쇄를 만난 후, 경쇄는 먼저 VL을 통해 VH에 결합한 다음, CL은 BiP를 치환하고 CH1에 결합하고, CL의 도움 하에, CH1은 완전히 접히고, 경쇄 및 중쇄 조립은 완료된다. (문헌[Matthias J. Feige, A Unfolded CH1 Domain Controls the Assembly and Secretion of IgG Antibodies, Molecular Cell. 2009년 6월 12일;34(5): 569 - 79]). 이러한 생물학적 공정으로부터 VH와 VL 사이의 상호 인식이 경쇄 및 중쇄 조립을 유도하는 제1 공정임을 알 수 있다. 이와 같이, 본 개시의 전하 돌연변이는 주로 VH 및 VL 영역에서 설계된다. 설계의 우수성을 더욱 입증하기 위해, 정확한 페어링의 비율에 대한 V 영역 및 C 영역의 전하 돌연변이의 효과를 비교하기 위해 CH1과 CL 사이의 전하를 도입하였다. 표 8-2의 임의의 돌연변이된 Her2/Hel 이중특이적 항체와 표 7의 조합 3의 항체 사이의 서열의 유일한 차이는 다른 서열이 변하지 않는 동안 열거된 돌연변이 조합의 차이이다.

표 8-2 상이한 위치에서의 이황화 결합 재형성 및 전하 돌연변이가 정확한 페어링의 비율에 미치는 효과

전하 돌연변이	이황화 결합 재형성 돌연변이	정확하게 페어링된 분자의 비율
Q39K/Q38D(V 영역)	F126/Q124	96.34%
H171K+T190K/N137D(C 영역)	F126/Q124	77.89%
K216E/E123R(C 영역)	F126/Q124	55.87%

[0694]

[0695] 동일한 이황화 결합 재형성 돌연변이로, V 영역에 위치한 Q39K/Q38D 전하 돌연변이, C 영역에 위치한 H171K+T190K/N137D 및 K216E/E123R의 조합을 [비교]하면, V 영역에 위치한 전하 돌연변이는 정확하게 페어링된 분자의 비율이 높다는 것을 알 수 있다. 이는 V 영역에서 전하를 위치시키는 설계 우수성을 입증한다.

[0696] **다른 V 영역 전하 돌연변이와 이황화 결합 재형성의 조합**

[0697] Q39K 및 Q38D 이외에, V 영역에서 발견된 다른 전하 돌연변이 및 이황화 결합 재형성 돌연변이 F126C/Q124C를 조합하여 표 3의 조합 1~조합 5를 형성하였다. HEK293 세포에서의 발현 후, 다른 정제 방법이 불일치 분자를 제거하는 것을 방지하기 위해 단백질 A 친화도 크로마토그래피 정제만을 사용하였다. 이중특이적 항체가 형성될 경우 정확한 페어링의 비율을 LC-MS를 사용하여 시험하였다(도 4). 중쇄 사이의 이종 페어링을 노브-인투-홀을 통해 촉진시켰다. 동시에, 항체의 발현 수준이 관찰되었다.

표 9-1 V 영역 돌연변이 및 이황화 결합 재형성 후 정확하게 페어링된 분자의 비율

항체 쌍	돌연변이	정확하게 페어링된 분자의 비율	발현 수준(mg/L)
Her2/Hel	조합 1	92.17%	305.6
	조합 2	98.88%	221.0
	조합 3	99.11%	183.5
	조합 4	98.47%	83.8
	조합 5	99.47%	104.6

[0698]

[0699] 조합 1 내지 조합 5의 돌연변이 방법에 의해 90% 초과의 정확한 페어링 비율을 달성하였다. mAb에 가까운 발현 수준(200~300 mg/L)은 조합 1 내지 조합 3에서 달성되었다. 조합 4 및 조합 5의 발현 수준은 약간 낮았지만, 또한 약 100 mg/L까지였다. 따라서, 본 개시의 돌연변이 조합을 포함하는 이중특이적 항체는 비교적 양호한 발현 수준을 달성할 수 있다.

[0700] V 영역 전하 돌연변이 및 다른 이황화 결합 재형성 돌연변이의 조합

[0701] F126C/Q124C 이외에, 다른 발견된 이황화 결합 재형성 돌연변이를 V 영역 전하 돌연변이 Q39K 및 Q38D와 조합하여 표 3의 조합 6~조합 14를 형성하였다. 표 3의 조합 6~조합 14 및 표 3의 조합 1~조합 5 중 어느 하나를 포함하는 임의의 돌연변이된 Her2/Hel 이중특이적 항체 사이의 서열의 유일한 차이는 열거된 돌연변이 조합의 차이인 반면, 다른 서열은 변하지 않는다.

[0702] HEK293 세포에서의 발현 후, 다른 정제 방법이 불일치 분자를 제거하는 것을 방지하기 위해 단백질 A 친화도 크로마토그래피 정제만을 사용하였다. 이중특이적 항체가 형성될 경우 정확한 페어링의 비율을 LC-MS를 사용하여 시험하였다. 중쇄 사이의 이종 페어링을 노브-인투-홀을 통해 촉진시켰다. 동시에, 항체의 발현 수준이 관찰되었다.

표 9-2 V 영역 전하 돌연변이 및 이황화 결합 재형성 돌연변이 후 정확하게 페어링된 분자의 비율

항체 쌍	돌연변이	정확하게 페어링된 분자의 비율	발현 수준(mg/L)
Her2/Hel	조합 6	83.90%	199.6
	조합 7	97.50%	229.5
	조합 8	98.90%	243.2
	조합 9	91.90%	252.9
	조합 10	80.52%	253.2
	조합 11	79.46%	264.1
	조합 12	86.86%	262.2
	조합 13	93.16%	224.0
	조합 14	83.82%	246.1

[0703]

[0704] 조합 6 내지 조합 14에서의 돌연변이 방법은 이중특이적 항체에 대해 최대 79.46% 내지 98.90%의 정확한 페어링 비율을 달성할 수 있었으며, 발현 수준은 mAb(200 내지 300 mg/L)와 유사한 수준에 도달하였다. 따라서, 본 개시의 돌연변이 조합을 포함하는 bsAb는 비교적 양호한 비율의 정확한 페어링 및 발현 수준을 달성할 수 있다.

[0705] **구현예 4. 본 개시에서의 항체의 친화도 시험 실험**

[0706] 본 개시에서 각각의 항원에 결합하는 이중특이적 항체의 평형 해리 상수(KD)를 시험하기 위해 생물층 간섭계(BLI) 기술을 사용하였다. BLI 방법 친화도 시험은 기존의 방법(문헌[Estep, P 등, High throughput solution Based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. MAbs, 2013.5 (2): Pages 270 - 8])을 사용하여 수행하였다.

[0707] 실험 시작 30분 전에, 샘플 크기에 기초하여 적절한 수의 ProA(ForteBio, 18-5010) 센서를 SD 완충액(PBS 1 X,BSA 0.1%, Tween-20 0.05%)에 침지시켰다. 100 μL의 SD 완충액 및 항원 융합 단백질을 취해 각각 96-웰 블랙 폴리스티렌 반면적(half-area) 마이크로플레이트(Greiner, 675076)에 첨가하였다. 센서 위치는 샘플 위치 및 레이아웃에 기초하여 선택되었다. 기기 설정 파라미터는 다음과 같다: 실행 단계: 베이스라인, 로딩 ~1 nm, 베이스라인, 결합 및 해리; 각 단계의 실행 시간은 샘플 결합 및 해리 속도에 의존하였고, 회전 속도는 400 rpm이었고 온도는 30도였다. ForteBio 분석 소프트웨어를 사용하여 KD 값을 분석하였다.

[0708] 항-Her2 항체를 모델로서 사용하여, 표 3에서 조합 1 - 조합 5의 돌연변이를 도입한 후, 이의 항원 Her2에 대한 친화도 데이터가 아래 표에 도시된다.

표 10. 예시적인 항체 및 Her2 의 친화도 시험

명칭	항원	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	KD(M)
WT	인간 Her2	2.68E+05	2.00E-04	7.46E-10
조합 1		2.49E+05	2.00E-04	8.05E-10
조합 2		2.68E+05	2.00E-04	7.48E-10
조합 3		2.64E+05	2.00E-04	7.58E-10
조합 4		2.62E+05	2.00E-04	7.64E-10
조합 5		2.78E+05	2.00E-04	7.20E-10

[0709]

[0710] 상기 표의 결과로부터, 다양한 돌연변이체와 야생형 항체 간에 친화도에 있어서 유의한 차이가 없었음을 알 수 있다. 따라서, 본 개시에 따른 V 영역에서 경쇄 및 중쇄의 결합 표면에 돌연변이 및 이황화 결합을 도입하는 것은 항체 친화도에 영향을 미치지 않는다.

[0711] **구현예 5. 다가 구성의 확장**

[0712] 본 개시의 이중특이적 항체는 1가 1+1 구성(도 1)으로 적용될 수 있을 뿐만 아니라, 2+1 N-말단 구성(도 5a), 2+1 C-말단 구성(도 5b), 2+2 C-말단 구성(도 5c), 및 다른 포맷과 같은 다가 구성으로 확장될 수도 있다. 중쇄 이종 페어링을 필요로 하지 않는 탠덤 Fab 구성과는 별도로, 중쇄 사이의 이종 페어링은 본 회사의 이노바디 돌연변이를 통해 촉진되었다.

[0713] 구현예 2의 방법에 따라 다가 2+1N-말단 구성, 2+1C-말단 구성, 2+2C-말단 구성을 발현하고 정제하고, 질량 분광분석을 사용하여 정확한 페어링의 비율을 시험하였다(도 6). 결과 요약은 표 11을 참조한다.

표 11 다가 구성을 갖는 정확하게 페어링된 분자의 비율

항체 번호	항체 쌍	구성	돌연변이	정확하게 페어링된 분자의 비율
GPRC5D/CD3-1	GPRC5D/CD3	2+1N-말단 구성	이황화 결합만 재형성	37.80%
GPRC5D/CD3-2	GPRC5D/CD3	2+1N-말단 구성	이황화 결합 재형성 및 전하 돌연변이	99.32%
GPRC5D/CD3-3	GPRC5D/CD3	2+1C-말단 구성	이황화 결합만 재형성	59.10%
GPRC5D/CD3-4	GPRC5D/CD3	2+1C-말단 구성	이황화 결합 재형성 및 전하 돌연변이	98.58%
GPRC5D/CD3-5	GPRC5D/CD3	2+2C-말단 구성	이황화 결합만 재형성	42.60%
GPRC5D/CD3-6	GPRC5D/CD3	2+2C-말단 구성	이황화 결합 재형성 및 전하 돌연변이	98.89%

[0714]

[0715] 본 특허에서 선언된 돌연변이가 다가 구성을 갖는 분자에 적용될 때, 여전히 매우 높은 비율의 정확한 페어링을 유지할 수 있음을 상기 표로부터 알 수 있다. 또한, 다가 구성을 갖는 분자에 적용했을 경우, 이황화 결합 재형성 돌연변이 및 전하 돌연변이는 이황화 결합 재형성 돌연변이 단독보다 훨씬 더 높은 비율의 정확한 페어링을 갖는 것으로 유사하게 관찰되었다.

[0716] **구현예 6. 세포 사멸 실험**

[0717] BCMA/GPRC5D/CD3 삼중특이적 항체(본 특허에서 선언된 야생형 및 도입된 돌연변이, 구성은 도 7 참조, 서열에 대한 서열 표 참조)는 H929 세포의 표면 상의 BCMA 및 GPRC5D 및 일차 PBMC 내의 T 세포의 표면 상의 CD3에 동시에 결합하고, T 세포를 활성화하고, BCMA 또는 GPRC5D-양성 종양 세포의 사멸을 매개한다. 본 연구는, 예시적인 항체가 PBMC 및 BCMA-양성 H929 세포 및 GPRC5D-양성 H929 세포의 공동 배양 조건 하에 젖산 탈수소효소

(LDH) 방법을 사용하여 첨가되고 24시간 후에 수집된 상청액에서 죽은 H929 세포에 의해 방출된 LDH 수준을 시험하여, 항체 매개 T 세포에 의한 BCMA 종양 세포 및 GPRC5D 종양 세포의 사멸 능력을 평가하였다. 본 특허에서 선언된 돌연변이가 삼중특이적 항체에 미치는 효과는 본 개시의 전하 돌연변이 및 이황화 결합 재형성 돌연변이가 도입되지 않은 BCMA/GPRC5D/CD3 삼중특이적 항체(도 7a) 및 본 개시에서 선언된 돌연변이가 도입된 BCMA/GPRC5D/CD3 삼중특이적 항체(도 7b)에 기초하여 평가하였다.

[0718] PBMC(SallyBio, SLB-HP100A)를 액체 질소 탱크로부터 꺼내어 37° C에서 신속하게 해동하고, 예열된 1640 배지(Gibco, 22400-071)(0.1% DNase 함유)를 적가하여 10 mL의 혼합물을 수득하였다. 혼합물을 400 g에서 5분 동안 원심분리하고, 10 mL의 1640 배지를 사용하여 재현탁하고, 10 μL의 DNase를 첨가하고, 단층을 37° C, 5% CO2에서 밤새 배양하였다. 현탁된 세포를 피펫팅하고 400 g에서 5분 동안 원심분리하고, 1640 배지를 사용하여 재현탁하고, 계수하고, 세포 밀도를 4 X 10^6 세포/mL로 조정하고, 효과기 세포로서 사용하였다. BCMA 또는 GPRC5D-양성 H929 세포(ATCC, CRL-9068)를 표적 세포로서 사용하고, 400 g에서 5분 동안 원심분리하고, 1640 배지를 사용하여 재현탁하고, 계수하고, 세포 밀도를 2 X 10^5 세포/mL로 조정하였다. 조정된 세포 밀도를 갖는 표적 세포를 웰 당 100 μL로 96-웰 플레이트에 첨가하고; 구배 희석된 항체를 웰 당 50 μL로 96-웰 플레이트에 첨가한 다음; 효과기 세포 PBMC를 웰 당 50 μL로 96-웰 플레이트에 첨가하였다. 최종 효과기-표적 비율은 10:1이었다. 상기 96-웰 플레이트를 37° C, 5% CO2 인큐베이터에 넣고, 24시간 배양 후, 상청액을 수집하였다. 죽은 세포에 의해 상청액 내로 방출된 LDH의 수준을 LDH 시험 키트(CytoTox96 비방사성 세포독성 키트, Promega) 지침 매뉴얼에 따라 시험한 다음, 예시적인 항체에 의해 사멸된 MM 세포의 비율을 계산하였다.

[0719] 상기 시험 방법에 따라 수행된 실험에서, 예시적인 항체는 H929 세포에 대한 인간 PBMC의 사멸 효과를 투여량 의존적 방식으로 유도할 수 있다(도 8 참조).

[0720] 상기 시험 방법에 따라 수행된 실험에서, 예시적인 항체에 의해 유도된 것과 같은 BCMA 또는 GPRC5D-양성 H929 세포주에 대한 동일한 공여체로부터의 PBMC의 사멸 효과를 비교하였고, 본 특허에 의해 선언된 돌연변이가 도입되었는지 여부는 예시적인 항체의 사멸 효과에 영향을 미치지 않았다. 그러나, 본 특허에 의해 선언된 돌연변이를 도입한 후, 예시적인 항체는 하나의 세포주에서 발현되고 제조될 수 있어서, 2개의 세포주에서 발현, 제조, 및 시험관 내 재조합의 어려움을 줄일 수 있다.

[0721]

명세서에서	서열번호	참고	서열(돌연변이 부위는 밑줄이 그어져 있음)	설명
표 1	1	F126C	ASTKGPSV**C**PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	CH1(IgG1 의 CH1)은 126C 돌연변이를 함유함
	2	Q124C	RTVAAPSVFIFPPSDE**C**LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	CL(카파), 124C 돌연변이를 함유함
표 2: 조합 1	3	항체 1, 중쇄, Q39K 돌연변이	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR**K**APGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS	Q39K 를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-VH
	4	항체 1, 경쇄, Q38D 돌연변이	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQ**D**KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK	Q38D 를 포함하는 트라스투주맙 TZB-VL
	5	항체 2, 중쇄, Q39D 돌연변이	EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGWVR**D**APGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTTSRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGPGWYAADVWGQGTTVTVSS	Q39D 를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-VH
	6	항체 2 경쇄 Q38K 돌연변이	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQ**K**KPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQADLPAFAFGGGTKVEIK	Q38K 를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-VL
표 2: 조합 2	7	항체 1, 중쇄, L45K 돌연변이	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKG**K**EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS	L45K 를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-VH
	8	항체 1, 경쇄, Y87D 돌연변이	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATY**D**CQQHYTTPPTFGQGTKVEIK	Y87D 를 포함하는 트라스투주맙 TZB-VL
	9	항체 2, 중쇄, L45D 돌연변이	EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGWVRQAPGKG**D**EWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTTSRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGPGWYAADVWGQGTTVTVSS	L45D 를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-VH
	10	항체 2, 경쇄, Y87K 돌연변이	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY**K**CQQADLPAFAFGGGTKVEIK	Y87K 를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-VL

표 2: 조합 3	7	항체 1, 중쇄, L45K 돌연변이	서열번호 7	트라스투주맙 TZB(항-Her2)-VH
	11	항체 1, 경쇄, P44D 돌연변이	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKA**D**KLLIYSASF LYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK	P44D 를 포함하는 트라스투주맙 TZB-VL
	9	항체 2, 중쇄, L45D 돌연변이	서열번호 9	L45D 를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-VH
	12	항체 2, 경쇄, P44K 돌연변이	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKA**K**KLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQADLPAFAFGGGTKVEIK	P44K 를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-VL
표 2: 조합 4	13	항체 1, 중쇄, Y91K 돌연변이	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY**K**CSRWGGDGF YAMDYWGQGTLVTVSS	트라스투주맙 TZB(항-Her2)-VH
	14	항체 1, 경쇄, A43D 돌연변이	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGK**D**PKLLIYSASF LYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK	A43D 를 포함하는 트라스투주맙 TZB-VL
	15	항체 2, 중쇄, Y91D 돌연변이	EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTTSRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVY**D**CARGGPGW YAADVWGQGTTVTVSS	Y91D 를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-VH
	16	항체 2, 경쇄, A43K 돌연변이	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGK**K**PKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQADLPAFAFGGGTKVEIK	A43K 를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-VL
표 2: 조합 5	13	항체 1, 중쇄, Y91K 돌연변이	서열번호 13	Y91K 를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-VH
	11	항체 1, 경쇄, P44D 돌연변이	서열번호 11	트라스투주맙 TZB-VL
	15	항체 2, 중쇄,	서열번호 15	항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-VH

[0722]

		Y91D 돌연변이		
	12	항체 2, 경쇄, P44K 돌연변이	서열번호 12	항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-VL
표 3: 조합 1	21	항체 1, 중쇄, Q39K_F126C_C220S_노브	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR**K**APGKGLEWVARIY PTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGF YAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSV**C**PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKS**S**DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**C**RDELTKNQVSL **W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	트라스투주맙 TZB(항-Her2)-중쇄 Q39K, F126C, 및 C220S, 및 노브 돌연변이를 포함함
	3	항체 1, H VH	서열번호 3	
	22	항체 1, 경쇄, Q38D_Q124C_C214S	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQ**D**KPGKAPKLLIYSASF LYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDE**C**LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE**S**	Q38D, Q124C, 및 Q214S 돌연변이를 포함하는 트라스투주맙 TZB-경쇄
	4	항체 1, Q38D 를 포함하는 경쇄	서열번호 4	
	23	항체 2, 중쇄, Q39D_홀	EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGWVR**D**APGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTTSRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGPGW YAADVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSRDELTKNQVSL **S**C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**Y**SKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Q39D 및 홀 돌연변이를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-중쇄
	5	항체 2, 중쇄, Q39D_홀 VH	서열번호 5	Q39D 를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-VH

[0723]

	24	항체 2, 경쇄, Q38K	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQK**K**PGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQADLPAFAFGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	Q38K 돌연변이를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-경쇄
	6	항체 2, 경쇄, Q38K VL	서열번호 6	Q38K 를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-VL
표 3: 조합 2	25	항체 1, 중쇄, L45K_F126C_C220S_노브	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKG**K**EWVARIY PTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGF YAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSV**C**PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKS**S**DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**C**RDELTKNQVSL **W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	L45K, F126C, C220S 돌연변이, 및 노브 돌연변이를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-중쇄
	7	항체 1, H VH	서열번호 7	
	26	항체 1, 경쇄, Y87D_Q124C_C214S	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF LYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATY**D**CQQHYTTPPTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDE**C**LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE**S**	Y87D_Q124C_C214S 를 포함하는 트라스투주맙 TZB-경쇄
	8	항체 1, 경쇄 VL	서열번호 8	
	27	항체 2, 중쇄, L45D_홀	EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGWVRQAPGKG**D**EWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTTSRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGPGW YAADVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSRDELTKNQVSL **S**C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**Y**SKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	L45D 및 홀 돌연변이를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-중쇄
	9		서열번호 9	

[0724]

	28	항체 2, 경쇄, Y87K	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY**K**CQQADLPAFAFGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	Y87K 돌연변이를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-경쇄
	10	항체 2, 경쇄 VL Y87K	서열번호 10	
표 3: 조합 3	25	항체 1, 중쇄, L45K_F126C_C220S_노브	서열번호 25	L45K, F126C, C220S 돌연변이, 및 노브 돌연변이를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-중쇄
	29	항체 1, 경쇄, P44D_Q124C_C214S	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKA**D**KLLIYSASF LYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDE**C**LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE**S**	P44D_Q124C_C214S 를 포함하는 트라스투주맙 TZB-경쇄
	11		서열번호 11	트라스투주맙 TZB-VL, P44D 포함
	27	항체 2, 중쇄, L45D_홀	서열번호 27	항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-중쇄
	9		서열번호 9	L45D 를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-VH
	30	항체 2, 경쇄, P44K	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKA**K**KLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQADLPAFAFGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	P44K 돌연변이를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-경쇄
	12		서열번호 12	P44K 를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-VL
표 3: 조합 4	31	항체 1, 중쇄,	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY**K**CSRWGGDGF YAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSV**C**PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS	Y91K_F126C_C220S 및 노브 돌연변이를 포함하는

[0725]

		Y91K_F126C_C220S_노브	NTKVDKKVEPKS**S**DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**C**RDELTKNQVSL**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	트라스투주맙 TZB(항-Her2)-중쇄
		13	서열번호 13	Y91K 를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-VH
	32	항체 1, 경쇄, A43D_Q124C_C214S	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGK**D**PKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE**C**LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE**S**	A43D_Q124C_C214S 를 포함하는 트라스투주맙 TZB-경쇄
	14		서열번호 14	A43D 를 포함하는 트라스투주맙 TZB-VL
	33	항체 2, 중쇄, Y91D_홀	EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTTSRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVY**D**CARGGPGWYAADVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSRDELTKNQVSL**S**C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**Y**SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Y91D 및 홀 돌연변이를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-중쇄
			서열번호 15	
	34	항체 2, 경쇄, A43K	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGK**K**PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQADLPAFAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	A43K 돌연변이를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-경쇄
			서열번호 16	
표 3: 조합 5	31	항체 1, 중쇄, Y91K_F126C_C220S_노브	서열번호 31	Y91K_F126C_C220S 및 노브 돌연변이를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-중쇄
	13		서열번호 13	

[0726]

	29	항체 1, 경쇄, P44D_Q124C_C214S	서열번호 29	P44D, Q124C, 및 C214S 를 포함하는 트라스투주맙 TZB-경쇄
	33	항체 2, 중쇄, Y91D_홀	서열번호 33	Y91D 및 홀 돌연변이를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-중쇄
	30	항체 2, 경쇄, P44K	서열번호 30	P44K 돌연변이를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-경쇄
표 4: Her2/Hel_WT	39	TZB_HC_WT_노브	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**C**RDELTKNQVSL**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	노브 돌연변이를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-중쇄
	75	TZB_HC_WT_노브를 갖는 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS	트라스투주맙 TZB(항-Her2)-중쇄 VH
	40	TZB_LC_WT	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	트라스투주맙 TZB(항-Her2)-경쇄
	76	가변 영역 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK	트라스투주맙 TZB(항-Her2)-경쇄 VL
	41	Hel_HC_홀	EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTTSRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGPGWYAADVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD	홀 돌연변이를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임) 중쇄

[0727]

			WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSRDELTKNQVSL**S**C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**Y**SKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
	77	Hel_HC_홀 VH	EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTTSRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGPGW YAADVWGQGTTVTVSS	항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임) 중쇄 VH
	42	Hel_LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQADLPAFAFGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임) 경쇄
	78	Hel_LC VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQADLPAFAFGGGTKVEIK	항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임)-VL
표 4: Her2/Hel_126C_121C	43	TZB_HC_F126C_노브	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGF YAMDYWGQGTLVTVSS*ASTKGPSV**C**PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSC*DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**C**RDELTKNQVSL**W**CLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	F126C 및 노브 돌연변이를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-중쇄 이탤릭체로 표시된 것은 F126C 를 포함하는 CH1 임(서열번호 1)
	75	TZB_HC_WT_노브를 갖는 VH	서열번호 75	트라스투주맙 TZB(항-Her2)-중쇄 VH
	44	TZB_LC_S121C	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF LYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPP**C**DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	S121C 를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-경쇄
	76	가변 영역 VL	서열번호 76	트라스투주맙 TZB(항-Her2)-경쇄 VL
	41	Hel_HC_홀	서열번호 41	홀 돌연변이를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임) 중쇄
	42	Hel_LC	서열번호 42	항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임) 경쇄

[0728]

표 4: Her2/Hel_126C_124C	43	TZB_HC_F126C_노브	서열번호 43	F126C 및 노브 돌연변이를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-중쇄
	45	TZB_LC_Q124C	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF LYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK*R TVAAPSVFIFPPSDE**C**LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*	Q124C 를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-경쇄 Q124C 를 포함하는 CL 은 이탤릭체(서열번호 2)임
	76	가변 영역 VL	서열번호 76	트라스투주맙 TZB(항-Her2)-경쇄 VL
	41	Hel_HC_홀	서열번호 41	홀 돌연변이를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임) 중쇄
	42	Hel_LC	서열번호 42	항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임) 경쇄
표 4: Her2/PD-1_WT	39	TZB_HC_WT_노브	서열번호 39	노브 돌연변이를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-중쇄
	40	TZB_LC_WT	서열번호 40	트라스투주맙 TZB-경쇄
	46	IgG1AA-홀에서의 신틸리맙 -VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGLIIP MFDTAGYAQKFQGRVAITVDESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAEHSSTG TFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSRDELTKNQVSL**S**C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**Y**SKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	AA 돌연변이 및 홀 돌연변이를 포함하는 신틸리맙(항 PD-1) 중쇄
	79	신틸리맙 -VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGLIIP MFDTAGYAQKFQGRVAITVDESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAEHSSTG TFDYWGQGTLVTVSS	신틸리맙(항-PD-1) 중쇄 VH

[0729]

	47	pcDNA3.1-SP-IgKCL 에서의 신틸리맙 -VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLISAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANHLPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	카파 경쇄 불변 영역을 포함하는 신틸리맙(항 PD-1) 경쇄
	80	신틸리맙 -VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLISAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANHLPFTFGGGTKVEIK	신틸리맙(항-PD-1) 경쇄 VL
표 4: Her2/PD-1_126C_121C	43	TZB_HC_F126C_노브	서열번호 43	F126C 및 노브 돌연변이를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-중쇄
	44	TZB_LC_S121C	서열번호 44	S121C 를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-경쇄
	46	IgG1AA-홀에서의 신틸리맙 -VH	서열번호 46	AA 돌연변이 및 홀 돌연변이를 포함하는 신틸리맙(항 PD-1) 중쇄
	47	pcDNA3.1-SP-IgKCL 에서의 신틸리맙 -VL	서열번호 47	카파 경쇄 불변 영역을 포함하는 신틸리맙(항 PD-1) 경쇄
표 4: Her2/PD-1_126C_124C	43	TZB_HC_F126C_노브	서열번호 43	F126C 및 노브 돌연변이를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-중쇄
	45	TZB_LC_Q124C	서열번호 45	Q124C 를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-경쇄
	46	IgG1AA-홀에서의 신틸리맙 -VH	서열번호 46	AA 돌연변이 및 홀 돌연변이를 포함하는 신틸리맙(항 PD-1) 중쇄
	47	pcDNA3.1-SP-IgKCL 에서의 신틸리맙 -VL	서열번호 47	카파 경쇄 불변 영역을 포함하는 신틸리맙(항 PD-1) 경쇄
표 7: 조합 1	43	항체 1, 중쇄, F126C_노브	서열번호 43	

[0730]

	45	항체 1, 경쇄, Q124C	서열번호 45	
	41	항체 2, 중쇄, 홀	서열번호 41	
	42	항체 2, 경쇄	서열번호 42	
표 7: 조합 2	48	항체 1, 중쇄, F126C_C220S_노브	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSV**C**PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS**S**DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**C**RDELTKNQVSL**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	F126C 및 C220S 를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-중쇄
	75	TZB_HC_WT_노브를 갖는 VH	서열번호 75	트라스투주맙 TZB(항-Her2)-중쇄 VH
	49	항체 1, 경쇄, Q124C_C214S	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE**C**LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE**S**	Q124C 및 C214S 를 포함하는 트라스투주맙 TZB(항-Her2)-경쇄
	76	가변 영역 VL	서열번호 76	트라스투주맙 TZB(항-Her2)-경쇄 VL
	41	항체 2 중쇄 홀	서열번호 41	홀 돌연변이를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임) 중쇄
	42	항체 2 경쇄	서열번호 42	항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임) 경쇄
표 7: 조합 3	21	항체 1, 중쇄, Q39K_F126C_C220S_노브	서열번호 21	트라스투주맙 TZB(항-Her2)-중쇄

[0731]

				Q39K, F126C, 및 C220S, 및 노브 돌연변이를 포함함
	22	항체 1 경쇄 Q38D_Q124C_C214S	서열번호 22	Q38D, Q124C, 및 Q214S 돌연변이를 포함하는 트라스투주맙 TZB-경쇄
	41	항체 2 중쇄 홀	서열번호 41	홀 돌연변이를 포함하는 항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임) 중쇄
	42	항체 2 경쇄	서열번호 42	항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임) 경쇄
표 8: Her2/PD-1	21	TZB_HC_Q39K_F126C_C220S_노브	서열번호 21	트라스투주맙 TZB(항-Her2)-중쇄 Q39K, F126C, 및 C220S, 및 노브 돌연변이를 포함함
	22	TZB_LC_Q38D_Q124C_C214S	서열번호 22	Q38D, Q124C, 및 Q214S 돌연변이를 포함하는 트라스투주맙 TZB-경쇄
	46	IgG1AA-홀에서의 신틸리맙 VH	서열번호 46	신틸리맙 H
	47	pcDNA3.1-SP-IgKCL 에서의 신틸리맙 VL	서열번호 47	신틸리맙 경쇄
표 8: Her2/CD47	21	TZB_HC_Q39K_F126C_C220S_노브	서열번호 21	트라스투주맙 TZB(항-Her2)-중쇄 Q39K, F126C, 및 C220S, 및 노브 돌연변이를 포함함
	22	TZB_LC_Q38D_Q124C_C214S	서열번호 22	Q38D, Q124C, 및 Q214S 돌연변이를 포함하는 트라스투주맙 TZB-경쇄
	50	CD47_HC_홀	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGKTGSAAWG	ADI26630 H

[0732]

			QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSRDELTKNQVSL**S**C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**Y**SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
	81		QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGKTGSAAWGQGTLVTVSS	ADI26630 중쇄 VH
	51	CD47_LC	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTVSFPITFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	ADI26630 경쇄
	82		DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTVSFPITFGGGTKVEIK	ADI26630 경쇄 VL
표 8: Her2/cMET	21	TZB_HC_Q39K_F126C_C220S_노브	서열번호 21	트라스투주맙 TZB(항-Her2)-중쇄 Q39K, F126C, 및 C220S, 및 노브 돌연변이를 포함함
	22	TZB_LC_Q38D_Q124C_C214S	서열번호 22	Q38D, Q124C, 및 Q214S 돌연변이를 포함하는 트라스투주맙 TZB-경쇄
	52	cMet_HC_홀	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMIDPSNSDTRFNPNFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSRDELTKNQVSL**S**C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**Y**SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	오나투주맙 H
	18		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMIDPSNSDTRFNPNFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQGTLVTVSS	오나투주맙 중쇄 VH

[0733]

	53	cMet_LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYTSSQKNYLAWYQQKPGKAPKLLI YWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYAYPWTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	오나투주맙 경쇄
	17		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYTSSQKNYLAWYQQKPGKAPKLLI YWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYAYPWTFGQG TKVEIK	오나투주맙 경쇄 VL
표 10: WT	39	TZB_HC_WT_노브	서열번호 39	트라스투주맙 TZB-중쇄
	40	TZB_LC_WT	서열번호 40	트라스투주맙 TZB-경쇄
	41	Hel_HC_홀	서열번호 41	난백 리소자임 항체 Hel H
	42	Hel_LC	서열번호 42	항-Hel 항체(항-계란 난백 리소자임) 경쇄
표 10: 조합 1~조합 5 는 표 3 과 정확히 동일함				
표 11: 2+1N-말단 구성: 이황화 결합만 재형성	56	5E_LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDSYGITFMNWYQQKPGQPPKLLIYA ASNQGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGQGTK LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC	GPRC5D 항체 경쇄
	83		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDSYGITFMNWYQQKPGQPPKLLIYA ASNQGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGQGTK LEIK	GPRC5D 항체 경쇄, 돌연변이 없음
	84		RASESVDSYGITFMN	GPRC5D 항체 경쇄 VL-CDR1

[0734]

	85		AASNQGS	GPRC5D 항체 경쇄 VL-CDR2
	86		QQSKEVPWT	GPRC5D 항체 경쇄 VL-CDR3
	57	5E_HC_InnoA 이노바디 돌연변이 (S364R+D399K)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVRQAPGQGLEWMGYI NPYNDVSQHQGKFKGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLG LRVLAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV<u>R</u>L TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL<u>K</u>SDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	GPRC5D 항체 H
	87		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVRQAPGQGLEWMGYI NPYNDVSQHQGKFKGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLG LRVLAYWGQGTLVTVSS	GPRC5D 항체 중쇄 VH, 돌연변이 없음
	88		GYVMH	GPRC5D 항체 중쇄 VH-CDR1
	89		YINPYNDVSQHQGKFKG	GPRC5D 항체 중쇄 VH-CDR2
	90		EGRLGLRVLAY	GPRC5D 항체 중쇄 VH-CDR3
	58	5E_sp34.24_CS_HC_InnoB(F126C+C220S+Y349T+K370S+K409D)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVRQAPGQGLEWMGYI NPYNDVSQHQGKFKGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLG LRVLAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTF NTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKST LYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGQSYVSWFAYWGQGTTVTVSSASTKGP SV<u>C</u>PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS<u>S</u>DKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQV<u>T</u>TLPPSREEMTKNQVSLTCLV<u>S</u>GFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYS<u>D</u>LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK	GPRC5D VH+sp34.24 VH+Fc

[0735]

[0736]

	87		서열번호 87	GPRC5D VH 돌연변이 없음
	91		EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGN FGQSYVSWFAYWGQGTTVTVSS	sp34.24 VH, 돌연변이 없음
	59	SP34Vk_CS_LC(Q124C+C214S)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKAPKGLIGG TNKRAPGVPSRFSGSLIGDKATLTISSLQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDE**C**LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGE**S**	sp34.24 경쇄
	92		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKAPKGLIGG TNKRAPGVPSRFSGSLIGDKATLTISSLQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTK VEIK	sp34.24 VL, 돌연변이 없음
표 11: 2+1N-말단 구성: 이황화 결합 재형성 및 전하 돌연변이	60	5E_K_LC(Q38K)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDSYGITFMNWYQ**K**KPGQPPKLLIY AASNQGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGQGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC	Q38K 돌연변이를 포함하는 GPRC5D 항체 경쇄
	93		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDSYGITFMNWYQ**K**KPGQPPKLLIY AASNQGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGQGT KLEIK	Q38K 돌연변이를 포함하는 GPRC5D 항체 경쇄-VL
	61	5E_D_HC_InnoA 이노바디 돌연변이 (S364R+D399K)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVR**D**APGQGLEWMGYI NPYNDVSQHQGKFKGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLG LRVLAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV**R**L TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL**K**SDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Q39D 돌연변이를 포함하는 GPRC5D 항체 중쇄
	94		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVR**D**APGQGLEWMGYI NPYNDVSQHQGKFKGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLG LRVLAYWGQGTLVTVSS	Q39D 돌연변이를 포함하는 GPRC5D 항체 VH
	62	5E_D_SP34.24_KCS_HC_InnoB 이노 돌연변이 (GPRC5D:Q39D)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVR**D**APGQGLEWMGYI NPYNDVSQHQGKFKGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLG LRVLAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS	GPRC5D VH+sp34.24 VH+Fc, GPRC5D VH 는 Q39D 돌연변이를 포함함

[0737]

		(sp34.24: Q39K+F126C+C220S+Y349T+K370S+K409D)	NTKVDKKVEPKSCGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTF NTYAMNWVR**K**ASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKST LYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGQSYVSWFAYWGQGTTVTVSSASTKGP SV**C**PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS**S**DKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQV**T**TLPPSREEMTKNQVSLTCLV**S**GFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYS**D**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK	sp34.24 VH 는 Q39K 돌연변이를 포함함
	95		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVR**D**APGQGLEWMGYI NPYNDVSQHQGKFKGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLG LRVLAYWGQGTLVTVSS	Q39D 돌연변이를 포함하는 GPRC5D 항체-VH
	96		EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVR**K**ASGKGLEWVGRI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGN FGQSYVSWFAYWGQGTTVTVSS	Q39K 돌연변이를 포함하는 sp34.24 VH
	63	SP34Vk_DCS_LC(Q38D+Q124C+C214S)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSTGAVTTSNYANWVQ**D**KPGKAPKGLIGG TNKRAPGVPSRFSGSLIGDKATLTISSLQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDE**C**LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGE**S**	sp34.24 경쇄, 여기서 sp34.24 VL 은 Q38D 돌연변이를 포함함
	97		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSTGAVTTSNYANWVQ**D**KPGKAPKGLIGG TNKRAPGVPSRFSGSLIGDKATLTISSLQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTK VEIK	Q38D 돌연변이를 포함하는 sp34.24 VL
표 11: 2+1C-말단 구성: 이황화 결합만 재형성	56	5E_LC	서열번호 56	GPRC5D 항체 경쇄
	57	5E_HC_InnoA 이노바디 돌연변이	서열번호 57	GPRC5D 항체 H

		(S364R+D399K)		
	64	5E_HC_InnoB_sp34.24_CS (Y349T+K370S+K409D+126C+220S)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVRQAPGQGLEWMGYI NPYNDVSQHQGKFKGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLG LRVLAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVTTLPPSREEMTKNQVSL TCLVSGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGQSYVSWFAYWG QGTTVTVSSASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSS	GPRC5D VH+Fc+sp34.24 VH, 두 VH 모두에서 돌연변이 없음
	87		서열번호 87	GPRC5D VH, 돌연변이 없음
	91		서열번호 91	sp34.24 VH, 돌연변이 없음
	59	SP34Vk_CS_LC(Q124C+C214S)	서열번호 59	변형된 sp34.24 경쇄
표 11: 2+1C-말단 구성: 이황화 결합 재형성 및 전하 돌연변이	60	5E_K_LC(Q38K)	서열번호 60	GPRC5D 항체 경쇄
	61	5E_D_HC_InnoA 이노바디 돌연변이 (Q39D+S364R+D399K)	서열번호 61	GPRC5D 항체 H
	65	5E_D_HC_InnoB_sp34.24_KCS 이노바디 돌연변이(Q39D+Y349T+K370S+K409D)+(Q39K+F126C+C220S)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVRDAPGQGLEWMGYI NPYNDVSQHQGKFKGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLG LRVLAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVTTLPPSREEMTKNQVSL TCLVSGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRKASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYAD	GPRC5D VH+Fc+sp34.24 VH, GPRC5D VH 는 Q39D 돌연변이를 포함함, sp34.24 VH 는 Q39K 돌연변이를 포함함

[0738]

			SVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGQSYVSWFAYWG QGTTVTVSSASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSS	
	95		서열번호 95	Q39D 돌연변이를 포함하는 GPRC5D 항체-VH
	96		서열번호 96	Q39K 돌연변이를 포함하는 sp34.24 VH
	63	SP34Vk_DCS_LC(Q38D+Q124C+C214S)	서열번호 63	변형된 sp34.24 경쇄
표 11: 2+2C-말단 구성: 이황화 결합만 재형성	56	5E_LC	서열번호 56	GPRC5D 항체 경쇄
	66	5E_HC_sp34.24_CS(F126C+C220S)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVRQAPGQGLEWMGYI NPYNDVSQHQGKFKGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLG LRVLAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGQSYVSWFAYWG QGTTVTVSSASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSS	GPRC5D VH+Fc+sp34.24 VH, GPRC5D VH 및 sp34.24 VH 에서의 돌연변이 없음
	87		서열번호 87	GPRC5D VH, 돌연변이 없음
	91		서열번호 91	sp34.24 VH, 돌연변이 없음
	59	SP34Vk_CS_LC	서열번호 59	변형된 sp34.24 경쇄
표 11: 2+2C-말단 구성:	60	5E_K_LC	서열번호 60	GPRC5D 항체 LC, 여기서 VL 은 Q38K 돌연변이를 함유함

[0739]

이황화 결합 재형성 및 전하 돌연변이	67	5E_D_HC_sp34.24_KCS (Q39D)+(Q39K+F126C+C220S)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVR**D**APGQGLEWMGYINPYNDVSQHQGKFKGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLGLRVLAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVR**K**ASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGQSYVSWFAYWGQGTTVTVSSASTKGPSV**C**PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS**S**	GPRC5D VH+Fc+sp34.24 VH, GPRC5D VH 는 Q39D 돌연변이를 포함함, sp34.24 VH 는 Q39K 돌연변이를 포함함
	95		서열번호 95	Q39D 돌연변이를 포함하는 GPRC5D 항체 H-VH
	96		서열번호 96	Q39K 돌연변이를 포함하는 sp34.24VH
	63	SP34Vk_DCS_LC	서열번호 63	변형된 sp34.24 경쇄
도 7a: BCMA/GPRC5D/CD3	68	GPRC5D_HC_노브(T366W)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDVSQHQGKFKGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLGLRVLAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	GPRC5D 항체 H
	87		서열번호 87	GPRC5D VH, 돌연변이 없음
	56	GPRC5D_LC	서열번호 56	GPRC5D 항체 경쇄
	69	CD3_HC_홀_BCMAscFv(T366S+L368A+Y407V)+(G100C+G44C)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHYNFGQSYVSWFAYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV	sp34.87 VH + Fc + 38497 scFv

[0740]

			NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL**S**C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**V**SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGAGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISRYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQKYFDITFG**C**GTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIVSSSYYWTWIRQPPGK**C**LEWIGSISIAGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRGDQILDVWSQGTMVTVSS	
	102		EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHYNFGQSYVSWFAYWGQGTTVTVSS	sp34.87 VH
	103	G44C	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIVSSSYYWTWIRQPPGK**C**LEWIGSISIAGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRGDQILDVWSQGTMVTVSS	BCMA-38497 VH, 돌연변이 없음
	104		SSSYYWT	BCMA-38497 VH-CDR1
	105		SISIAGSTYYNPSLKS	BCMA-38497 VH-CDR2
	106		DRGDQILDV	BCMA-38497 VH-CDR3
	107	G100C	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISRYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQKYFDITFG**C**GTKVEIK	BCMA-38497 VL
	108		RASQSISRYLN	BCMA-38497 VL-CDR1
	109		AASSLQS	BCMA-38497 VL-CDR2
	110		QQKYFDIT	BCMA-38497 VL-CDR3
	111	(G100C+G44C)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISRYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQKYFDITFG**C**GTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIVSSSYYWTWIRQPPGK**C**LEWIGSISIAGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRGDQILDVWSQGTMVTVSS	BCMA-38497VL-VH scFv
	70	CD3_LC	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGDKAALTLLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGQGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	sp34.87 경쇄

[0741]

	112		QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT NKRAPGVPARFSGSLLGDKAALTLLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGQGT KLTVL	sp34.87 경쇄 가변 영역, 돌연변이 없음
도 7b: 전하 및 시스테인 돌연변이를 갖는 BCMA/GPRC5D/CD3	71	GPRC5D_KCS_HC_노브(Q39K+F126C+C220S+T366W)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVR**K**APGQGLEWMGY INPYNDVSQHQGKFKGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRL GLRVLAYWGQGTLVTVSSASTKGPSV**C**PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKS**S**DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS L**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Q39K, F126C, 및 C220S 돌연변이를 포함하는 GPRC5D 항체 중쇄, 및 노브 돌연변이
	113	Q39K	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVR**K**APGQGLEWMGY INPYNDVSQHQGKFKGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRL GLRVLAYWGQGTLVTVSS	Q39K 돌연변이를 포함하는 GPRC5D 항체 중쇄 VH
	72	GPRC5D_DCS_LC Q39K+F126C+C220S	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDSYGITFMNWYQ**D**KPGQPPKLLIYA ASNQGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGQGTK LEIKRTVAAPSVFIFPPSDE**C**LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGE**S**	Q38D, Q124C, 및 C214S 돌연변이를 포함하는 GPRC5D 항체 경쇄
	19	Q38D	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDSYGITFMNWYQ**D**KPGQPPKLLIYA ASNQGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGQGTK LEIK	Q38D 돌연변이를 포함하는 GPRC5D 항체 경쇄
	73	CD3_D_HC_홀_BCMAscFv (Q39D+T366S+L368A+Y407V)+(G100C+G44C)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVR**D**ASGKGLEWVGRI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHYN FGQSYVSWFAYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSL**S**C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**V**SKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGAGGGGSGGGGSDIQMTQSP SSLSASVGDRVTITCRASQSISRYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQKYFDITFG**C**GTKVEIKGGGGSGGGGS GGGGSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIVSSSYYWTWIRQPPGK**C**LE	sp34.87 VH + Fc + 38497 scFv 38497 은 BCMA 항체임

[0742]

		WIGSISIAGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRG DQILDVWSQGTMVTVSS	
	103	서열번호 103	BCMA-38497 VH, 돌연변이 없음
	107	서열번호 107	BCMA-38497 VL
	111	G100C+G44C	서열번호 111	BCMA-38497VL-VH scFv
	114	Q39D	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVR**D**ASGKGLEWVGRI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHYN FGQSYVSWFAYWGQGTTVTVSS	Q39D 돌연변이를 포함하는 sp34.87VH
	74	CD3_K_LC Q39K	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ**K**KPGQAPRGLIGG TNKRAPGVPARFSGSLLGDKAALTLLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGQG TKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV APTECS	Q38K 돌연변이를 포함하는 sp34.87 경쇄
	115	Q39K	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ**K**KPGQAPRGLIGG TNKRAPGVPARFSGSLLGDKAALTLLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGQG TKLTVL	Q38K 돌연변이를 포함하는 sp34.87 경쇄
	116	야생형 IgG1 CH1 도메인	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSC	
	117	야생형 IgG1 CH2 도메인	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAK	
	118	야생형 IgG1 CH3 도메인	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
	119		DKTHTCPXCP, 여기서 X 는 S 또는 P 임	
	120		HTCPXCP, 여기서 X 는 S 또는 P 임	
	121		CPXCP, 여기서 X 는 S 또는 P 임	
	122	인간 IgG1 Fc 영역 폴리펩티드	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK	

[0743]

	123	인간 IgG4 Fc 영역 폴리펩티드	PPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAvLHNH YTQKSLSLSLGK	
	124	Y349C, T366S, L368A, 및 Y407V 를 포함하는 인간 IgG1 Fc 영역	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSRDELTKNQVSL**S**C**A**VKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**V**SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	
	125	S354C 및 T366W 를 포함하는 인간 IgG1 Fc 영역	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**C**RDELTKNQVSL**W**CLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	
	126	S364R 및 D399K 돌연변이를 포함하는 인간 IgG1 Fc 영역	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV**R**LTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVL**K**SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	
	127	Y349T, K370S, 및 K409D 돌연변이를 포함하는 인간 IgG1 Fc 영역	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV**T**TLPPSREEMTKNQVSLTCLV**S**GFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS**D**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	
	128	인간 카파 경쇄 CL 영역(Q124C 및 C214S 포함)	RTVAAPSVFIFPPSDE**C**LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE **S**	
	54	인간 카파 경쇄 CL 영역	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
	55	인간 람다 경쇄 CL 영역	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGV ETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	
	129	인간 IgG1 CH1	ASTKGPSV**C**PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS**S**	

[0744]

		(F126C 및 C220S 포함)		
	130	T366S, L368A, 및 Y407V 를 포함하는 인간 IgG1 Fc 영역, 및 LALA 돌연변이	DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV**Y**TLPPSRDELTKNQVSL**S**C**A**VKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**V**SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	
	131	T366W 및 LALA 돌연변이를 포함하는 인간 IgG1 Fc 영역	DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**S**RDELTKNQVSL**W**CLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	
	132	인간 IgG1 CH1 (H168C 포함)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV**C**TFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	
	133	인간 IgG1 CH1 (H168C+C220S 포함)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV**C**TFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS**S**	
	134	인간 IgG1 CH1 (F170C 포함)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT**C** PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	
	135	인간 IgG1 CH1 (F170C+C220S 포함)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT**C** PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS**S**	
	136	인간 IgG1 CH1 (V173C 포함)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP A**C**LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	
	137	인간 IgG1 CH1 (V173C+C220S 포함)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP A**C**LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS**S**	
	138	인간 IgG1 CH1 (L128C 포함)	ASTKGPSVFP**C**APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	
	139	인간 IgG1 CH1 (L128C+C220S 포함)	ASTKGPSVFP**C**APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS**S**	

[0745]

	140	인간 IgG1 CH1 (S134C 포함)	ASTKGPSVFPLAPSSKCTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	
	141	인간 IgG1 CH1 (S134C+C220S 포함)	ASTKGPSVFPLAPSSKCTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSS	
	142	인간 IgG1 CH1 (S136C 포함)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTCGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	
	143	인간 IgG1 CH1 (S136C+C220S 포함)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTCGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSS	
	144	인간 IgG1 CH1 (P171C 포함)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF CAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	
	145	인간 IgG1 CH1 (P171C+C220S 포함)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF CAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSS	
	146	인간 IgG1 CH1 (T139C 포함)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGCAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	
	147	인간 IgG1 CH1 (T139C+C220S 포함)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGCAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSS	
	148	인간 카파 경쇄 CL 영역(T164C 를 포함함)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVCEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	
	149	인간 카파 경쇄 CL 영역(T164C 및 C214S 를 포함함)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVCEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE S	
	150	인간 카파 경쇄 CL 영역(S162C 를 포함함)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ECVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	

[0746]

	151	인간 카파 경쇄 CL 영역(S162C 및 C214S 포함)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ECVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE S	
	152	인간 카파 경쇄 CL 영역(Q160C 포함)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSC ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	
	35	인간 카파 경쇄 CL 영역(Q160C 및 C214S 포함)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSC ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE S	
	36	인간 카파 경쇄 CL 영역(F118C 포함)	RTVAAPSVFICPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	
	37	인간 카파 경쇄 CL 영역(F118C 및 C214S 포함)	RTVAAPSVFICPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE S	
	38	인간 카파 경쇄 CL 영역(F116C 포함)	RTVAAPSVCIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	
	98	인간 카파 경쇄 CL 영역(F116C 및 C214S 포함)	RTVAAPSVCIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE S	
	99	인간 카파 경쇄 CL 영역(S114C 를 포함함)	RTVAAPCVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	
	100	인간 카파 경쇄 CL 영역(S114C 및 C214S 포함)	RTVAAPCVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE S	
	101	T366S, L368A, 및 Y407V 를 포함하는 인간 IgG1 Fc 영역	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	

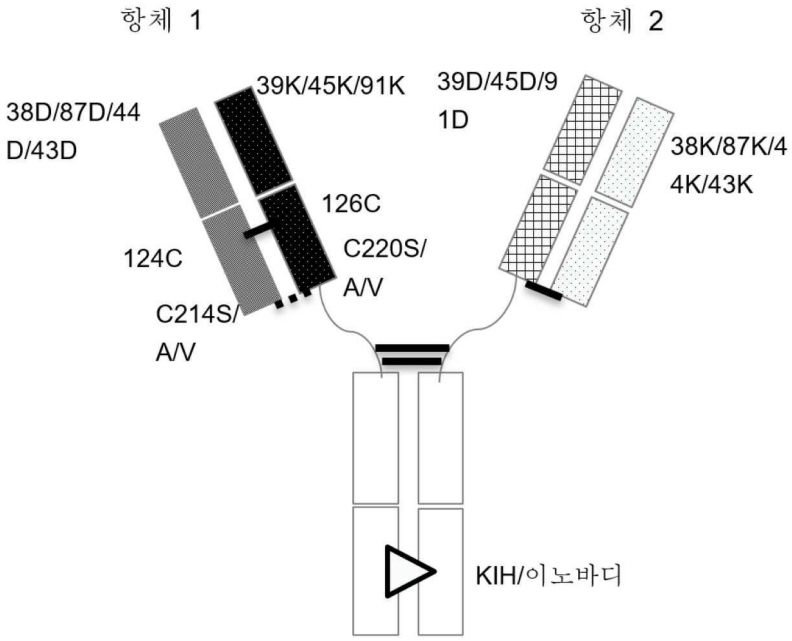
[0747]

	20	T366W 를 포함하는 인간 IgG1 Fc 영역	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	

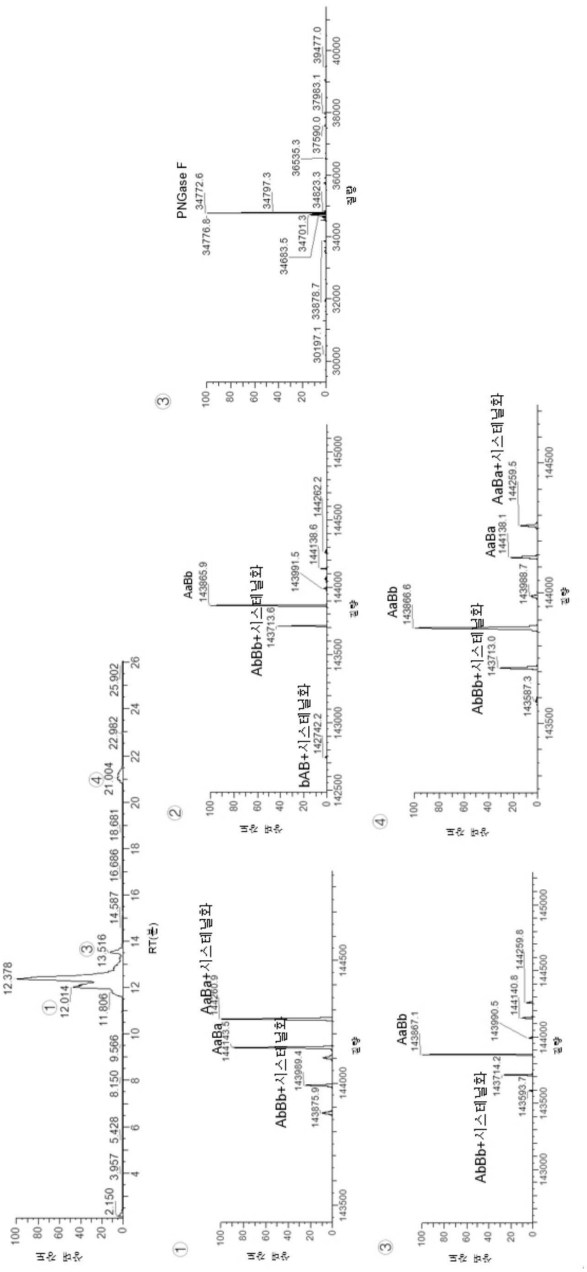
[0748]

도면

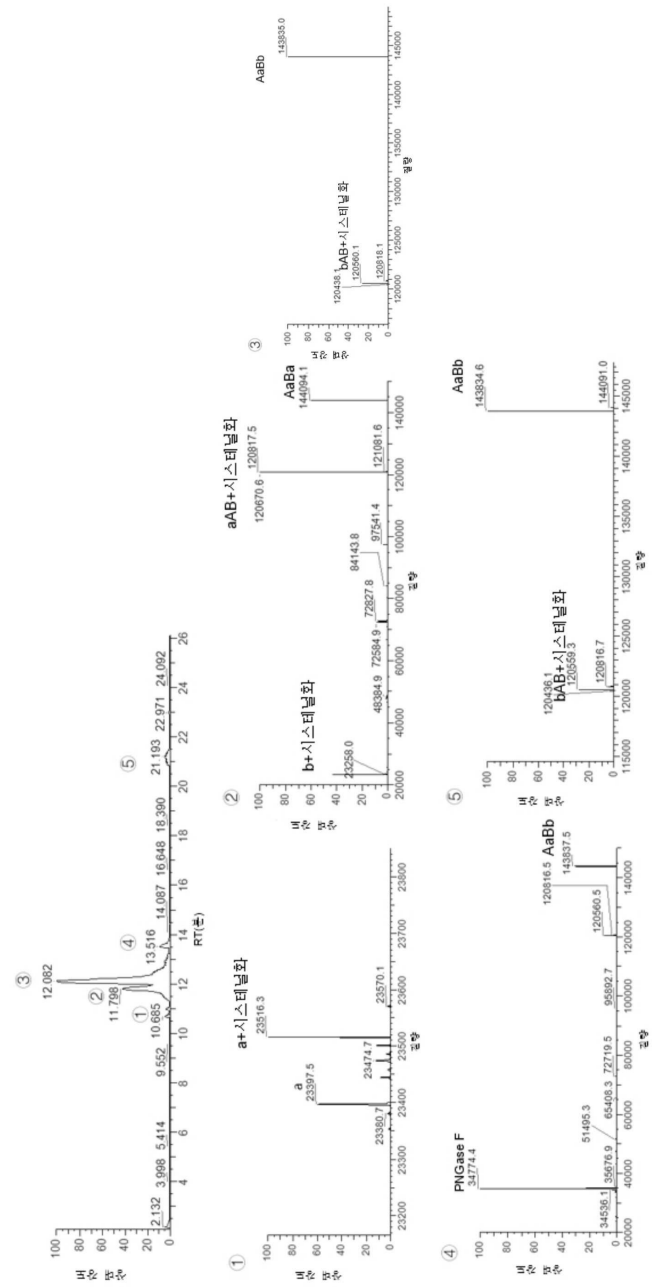
도면1


항체 1
항체 2
38D/87D/44
D/43D
39K/45K/91K
39D/45D/9
1D
38K/87K/4
4K/43K
126C
124C
C220S/
A/V
C214S/
A/V
KIH/이노바디

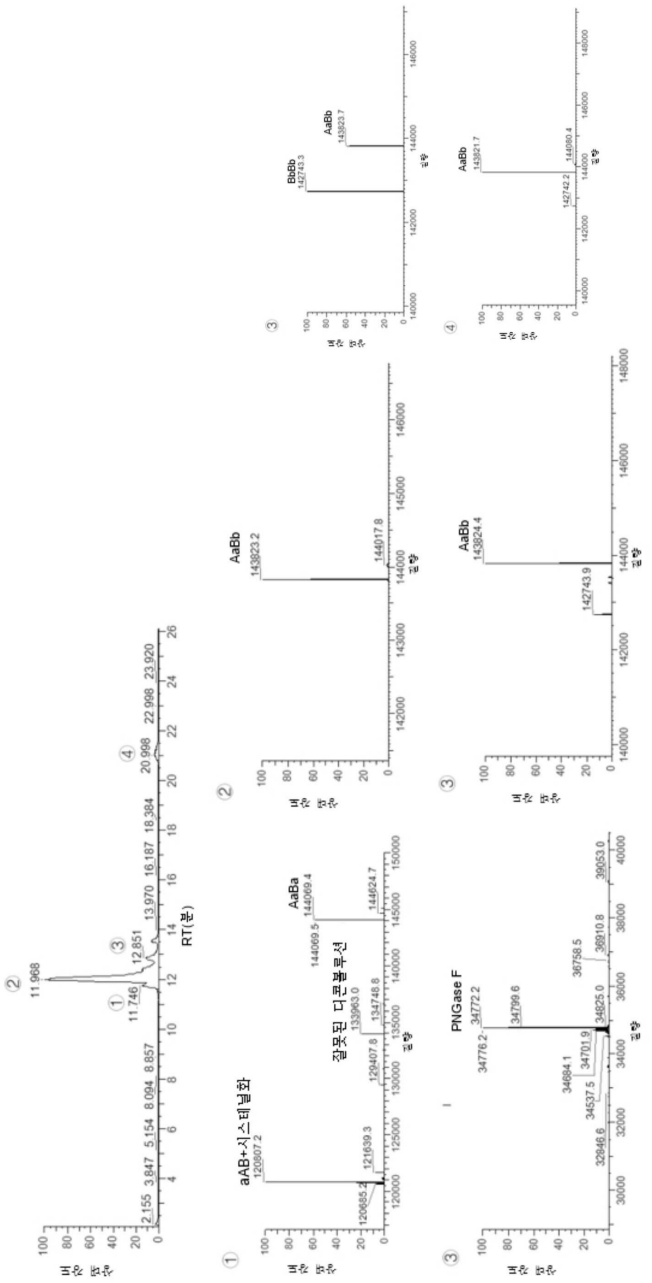
도면2a



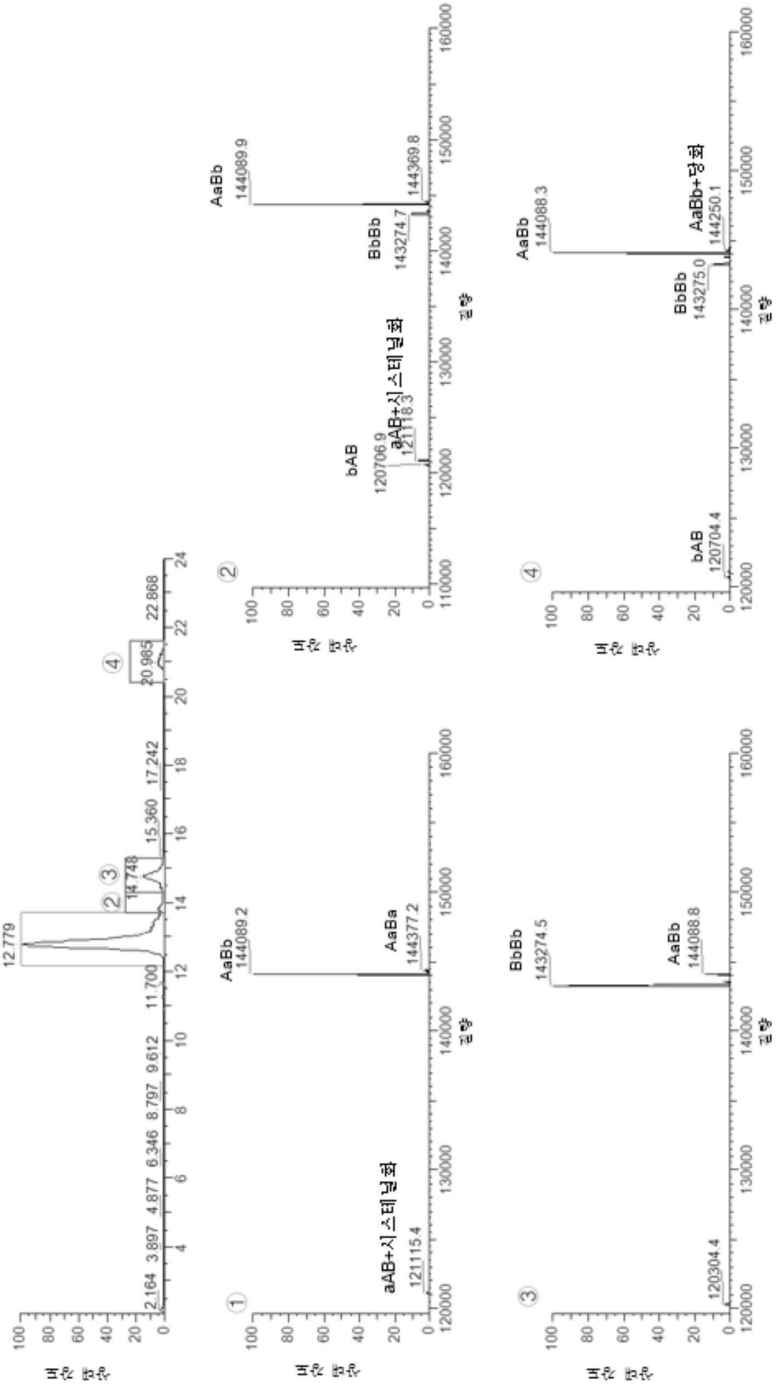
도면2b


RT(분)
a+시스테닐화
b+시스테닐화
aAB+시스테닐화
bAB+시스테닐화
PNGase F
AaBa
AaBb
상대 강도
질량

도면2c

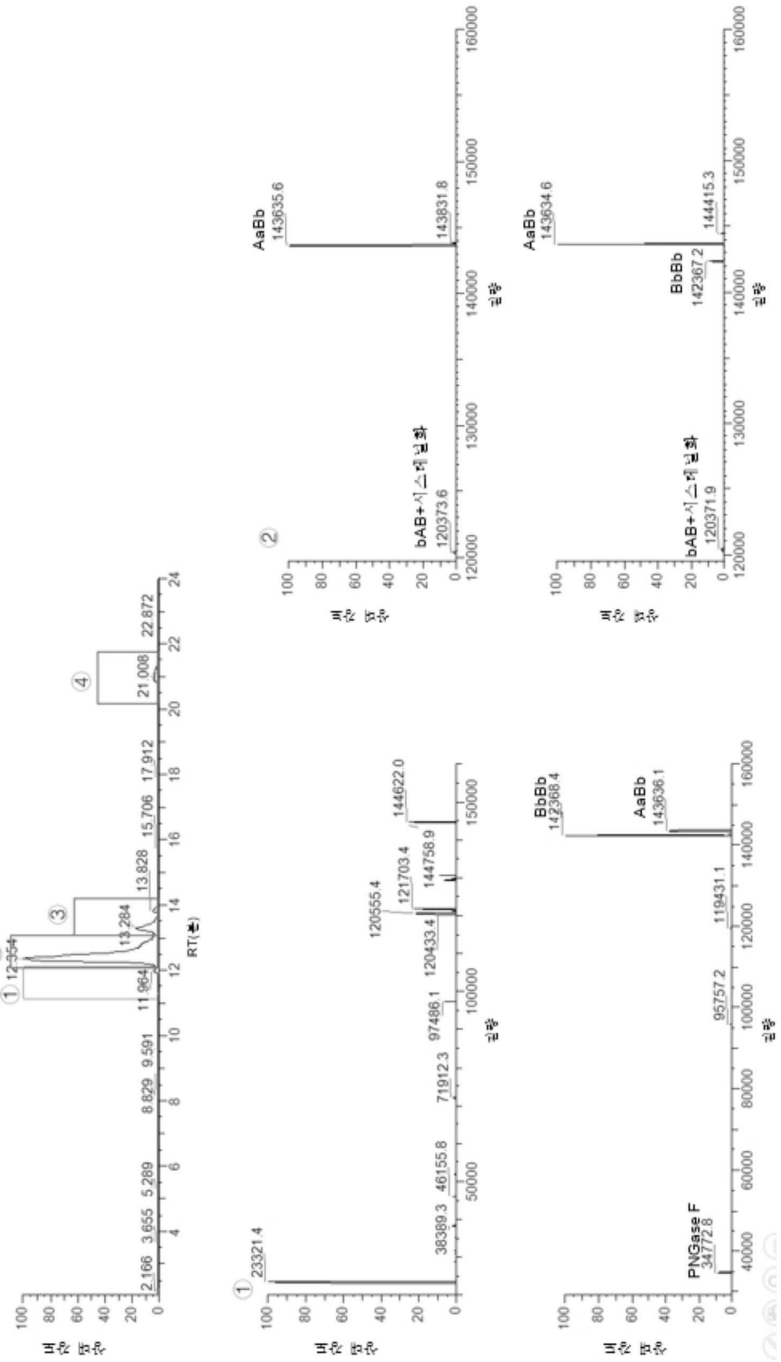


도면3a

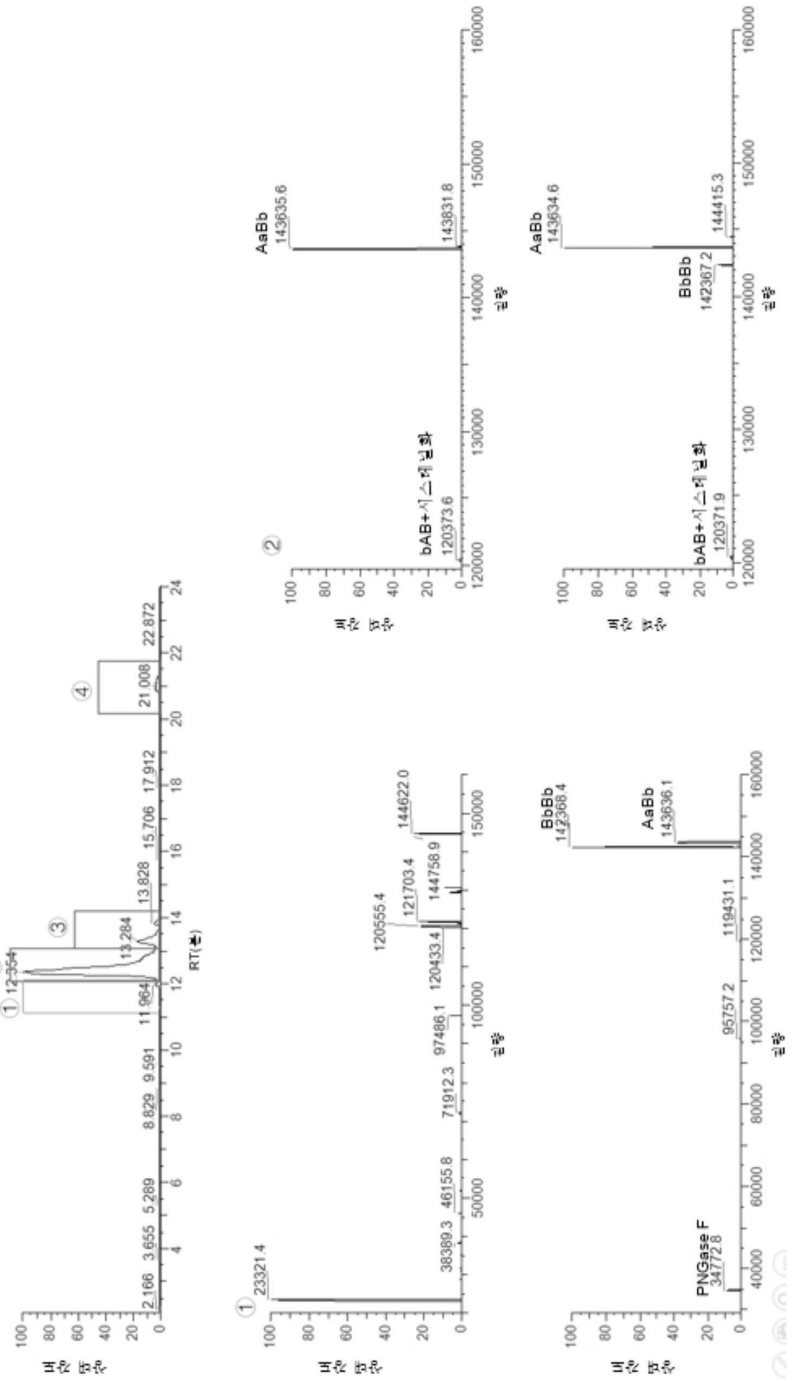


AaBb
144089.9
BbBb
143274.7
144369.8
bAB
120706.9
aAB+시스테닐화
AaBb
144088.3
AaBb+당화
144250.1
BbBb
143275.0
bAB
120704.4
AaBb
144089.2
AaBa
144377.2
aAB+시스테닐화
121115.4
BbBb
143274.5
AaBb
144088.8
120304.4
12.779
14.748
15.360
17.242
20.985
22.868
2.164
3.897
4.877
6.346
8.797
9.612
11.700

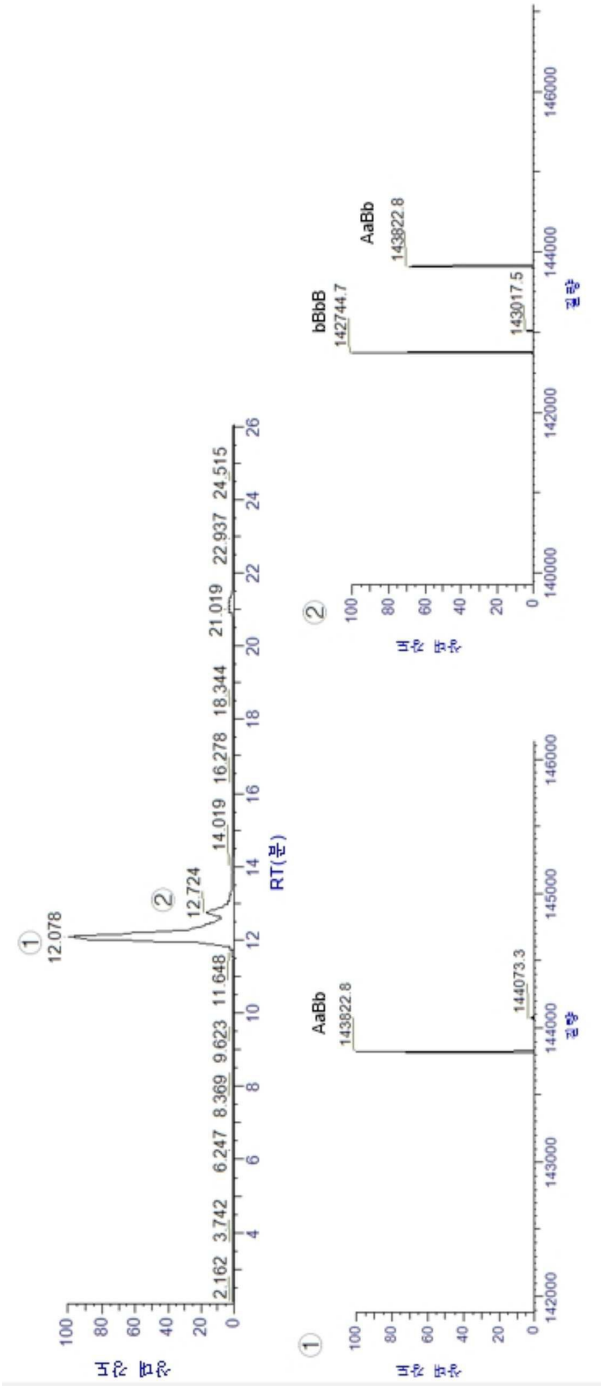
도면3b



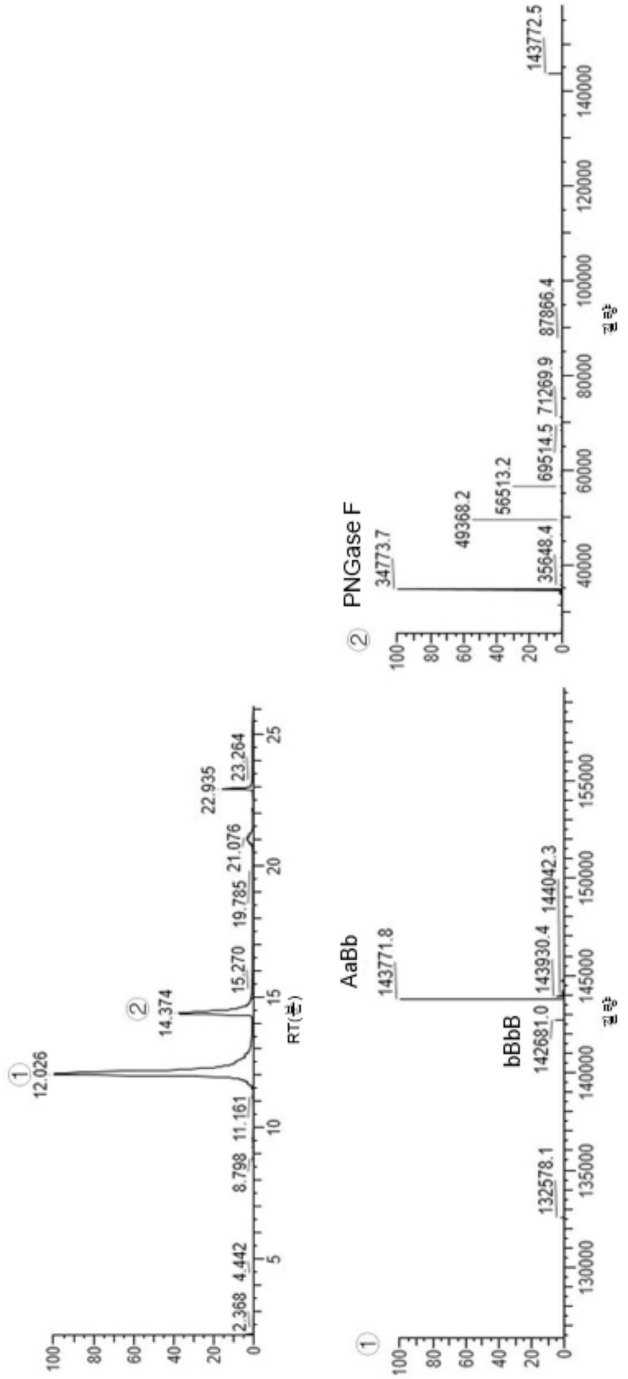
도면3c



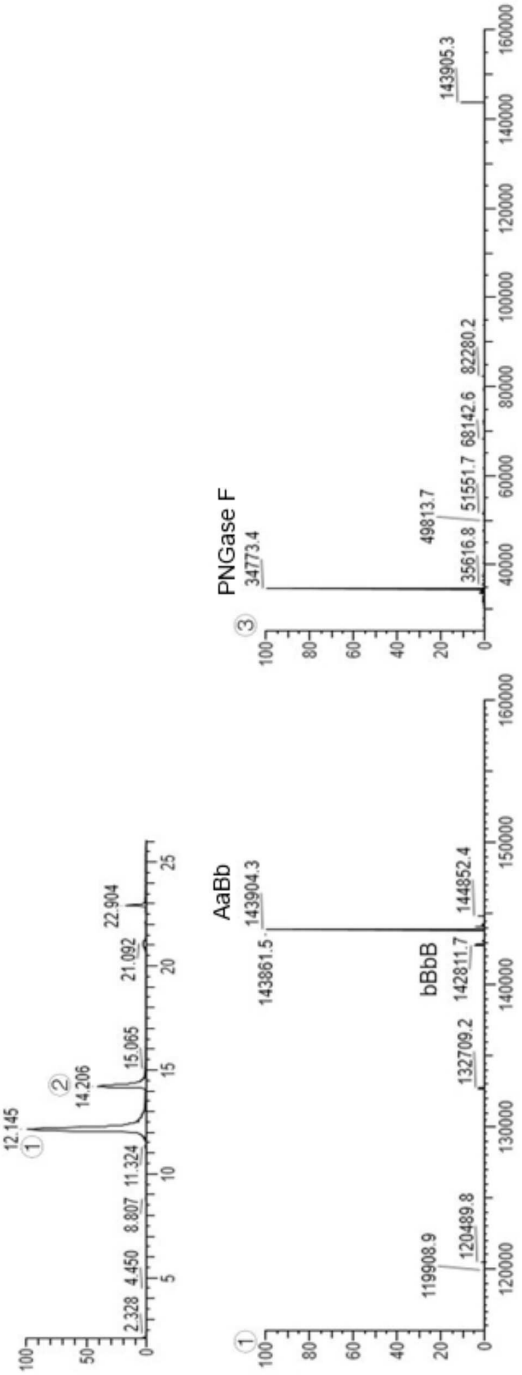
도면4a


상대 강도
RT(분)
①
12.078
②
12.724
2.162
3.742
6.247
8.369
9.623
11.648
14.019
16.278
18.344
21.019
22.937
24.515
AaBb
143822.8
144073.3
bBbB
142744.7
143017.5
질량

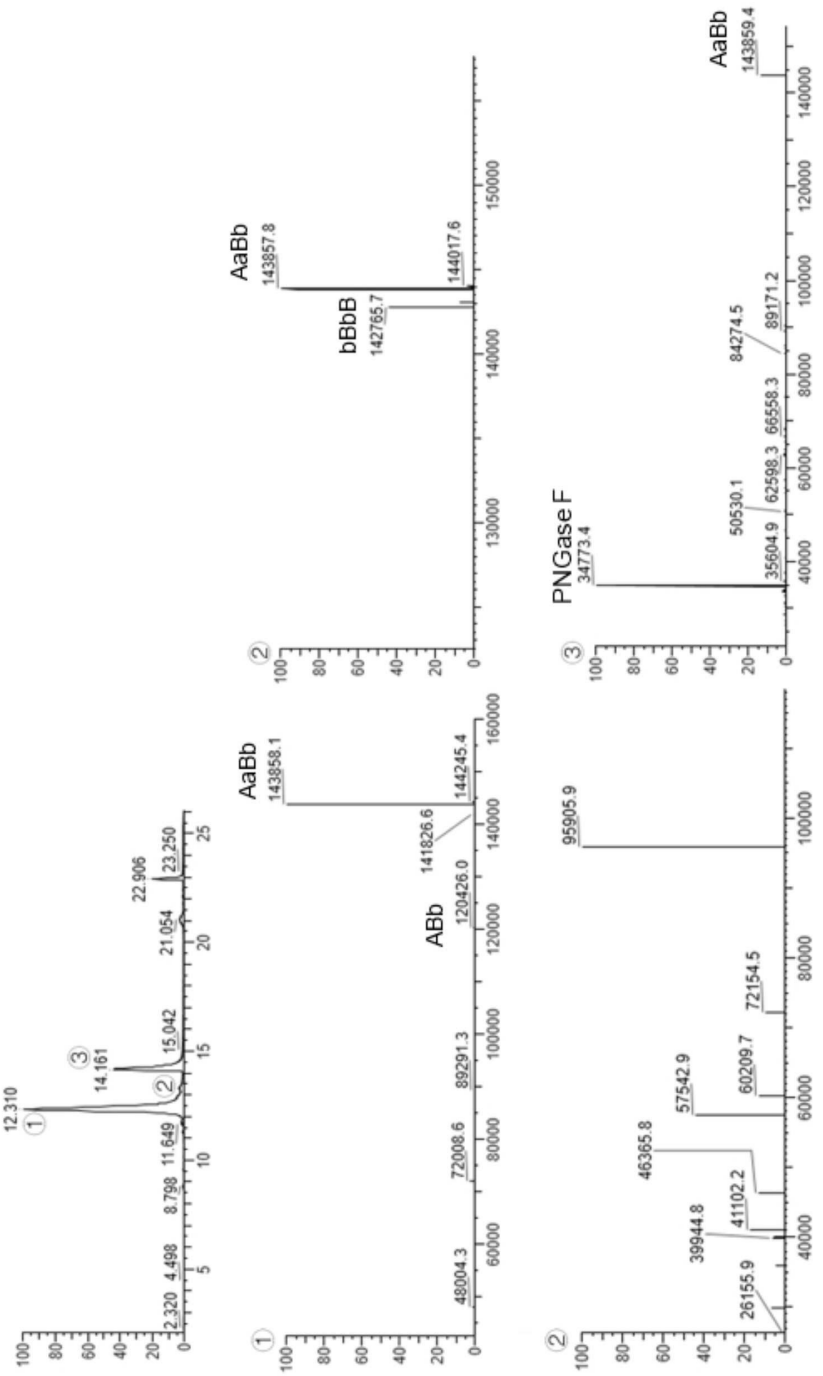
도면4b


①
12.026
②
14.374
2.368
4.442
8.798
11.161
15.270
19.785
21.076
22.935
23.264
RT(분)
AaBb
143771.8
bBbB
132578.1
142681.0
143930.4
144042.3
PNGase F
34773.7
35648.4
49368.2
56513.2
69514.5
71269.9
87866.4
143772.5
질량

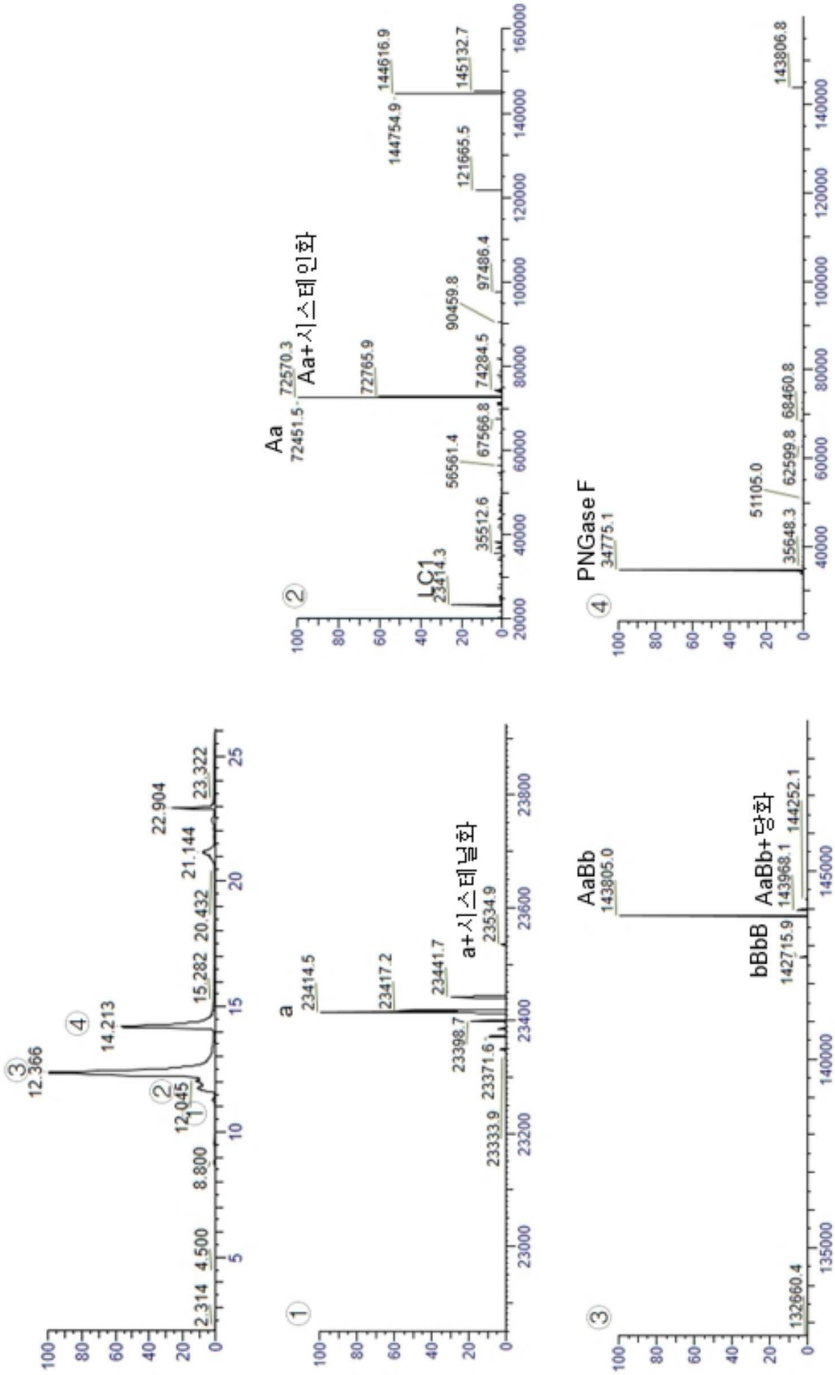
도면4c


12.145
14.206
15.065
21.092
22.904
2.328
4.450
8.807
11.324
AaBb
143904.3
143861.5
bBbB
144852.4
142811.7
132709.2
119908.9
120489.8
PNGase F
34773.4
49813.7
35616.8
51551.7
68142.6
82280.2
143905.3

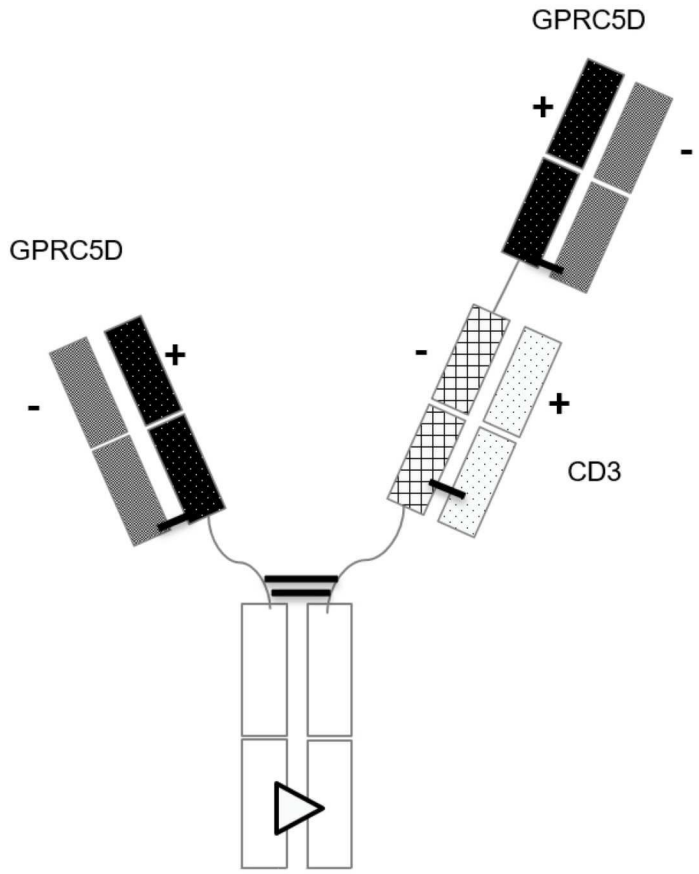
도면4d


12.310
14.161
15.042
21.054
22.906
23.250
2.320
4.498
8.798
11.649
AaBb
143857.8
bBbB
142765.7
144017.6
AaBb
143858.1
ABb
141826.6
120426.0
144245.4
48004.3
72008.6
89291.3
PNGase F
34773.4
95905.9
50530.1
62598.3
66558.3
84274.5
89171.2
AaBb
143859.4
26155.9
39944.8
41102.2
46365.8
57542.9
60209.7
72154.5

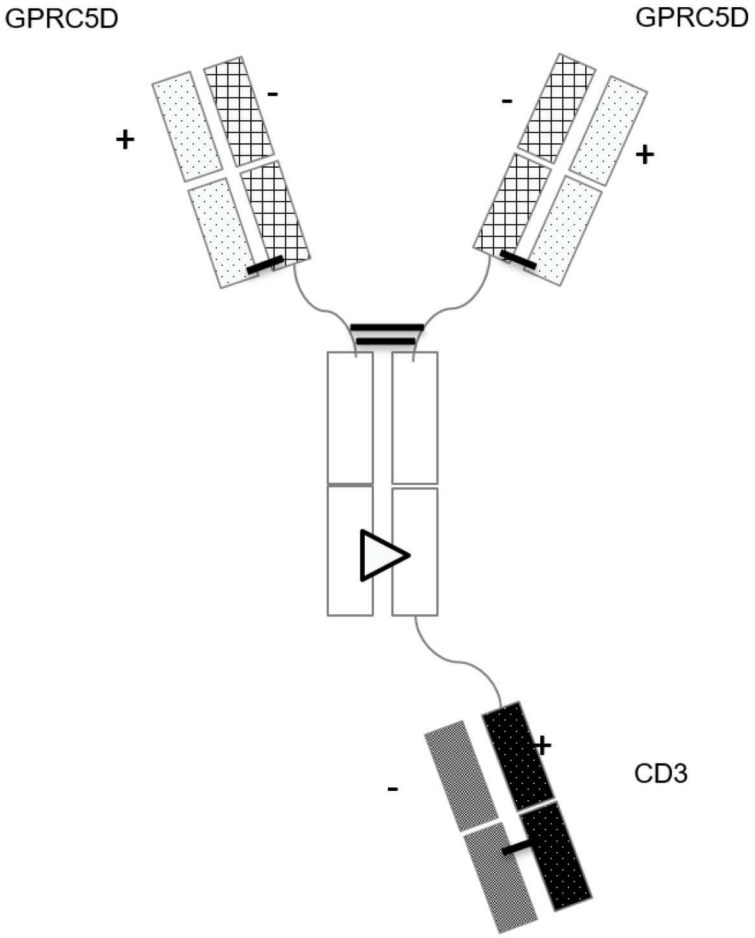
도면4e


①
②
③
④
12.045
12.366
14.213
15.282
20.432
21.144
22.904
23.322
a
234145
23417.2
23441.7
23398.7
23371.6
23333.9
23534.9
a+시스테닐화
Aa
72451.5
72570.3
72765.9
Aa+시스테인화
LC1
23414.3
56561.4
67566.8
35512.6
90459.8
74284.5
97486.4
121665.5
144754.9
144616.9
145132.7
PNGase F
34775.1
35648.3
51105.0
62599.8
68460.8
143806.8
AaBb
143805.0
bBbB
142715.9
AaBb+당화
143968.1
144252.1
132660.4

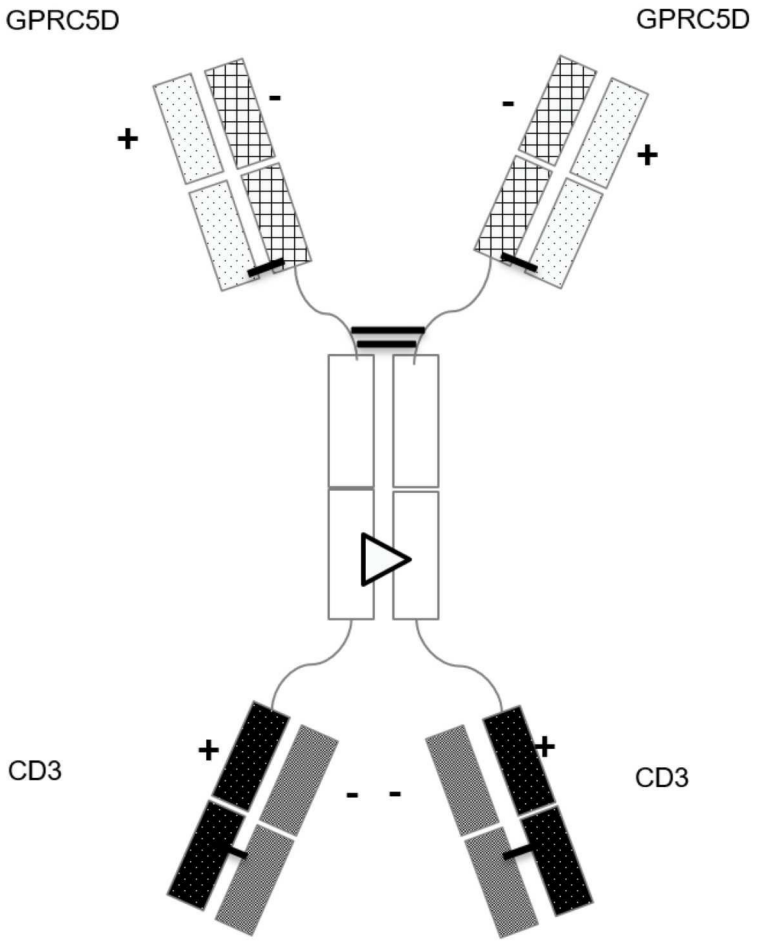
도면5a



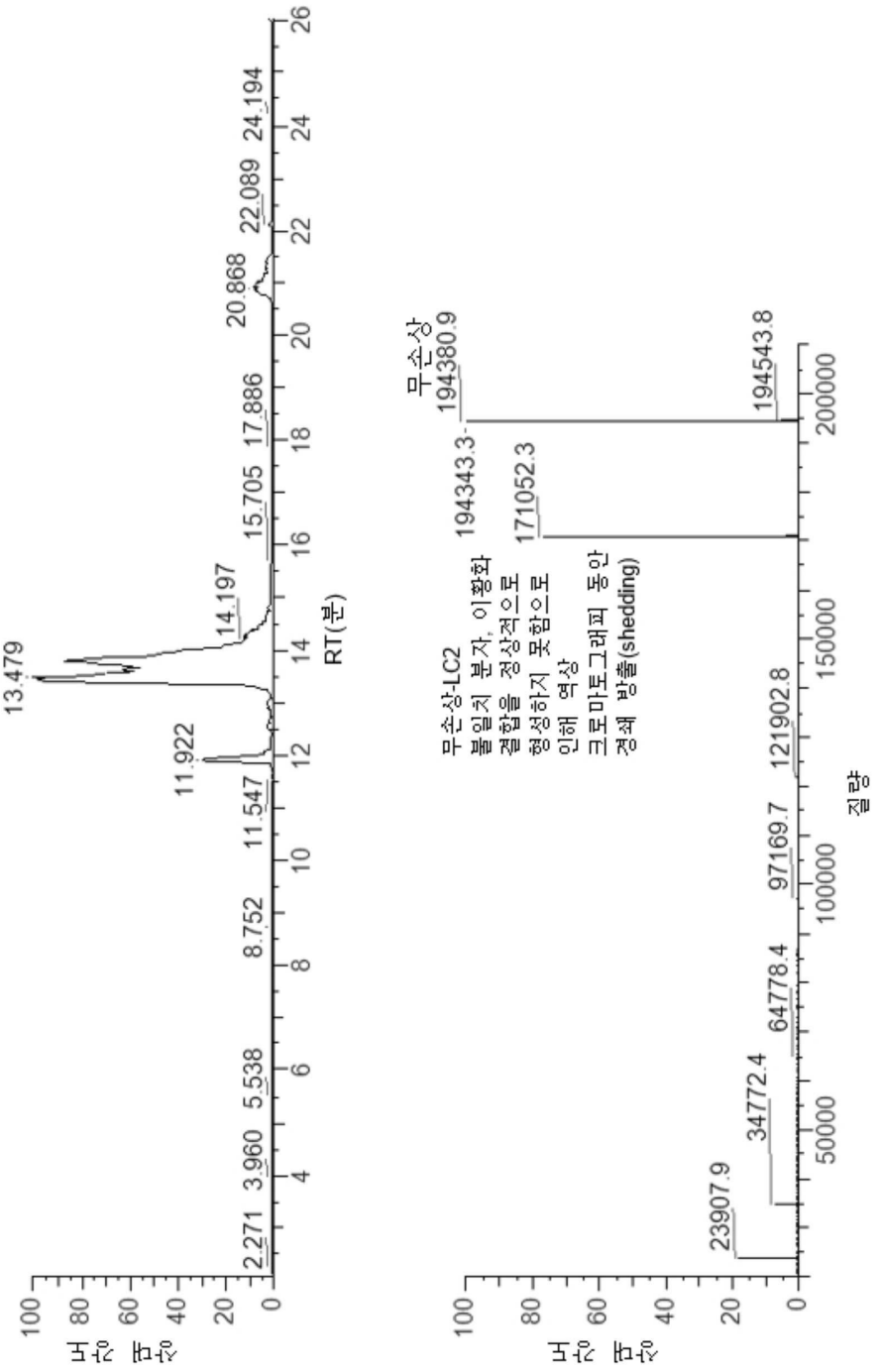
도면5b



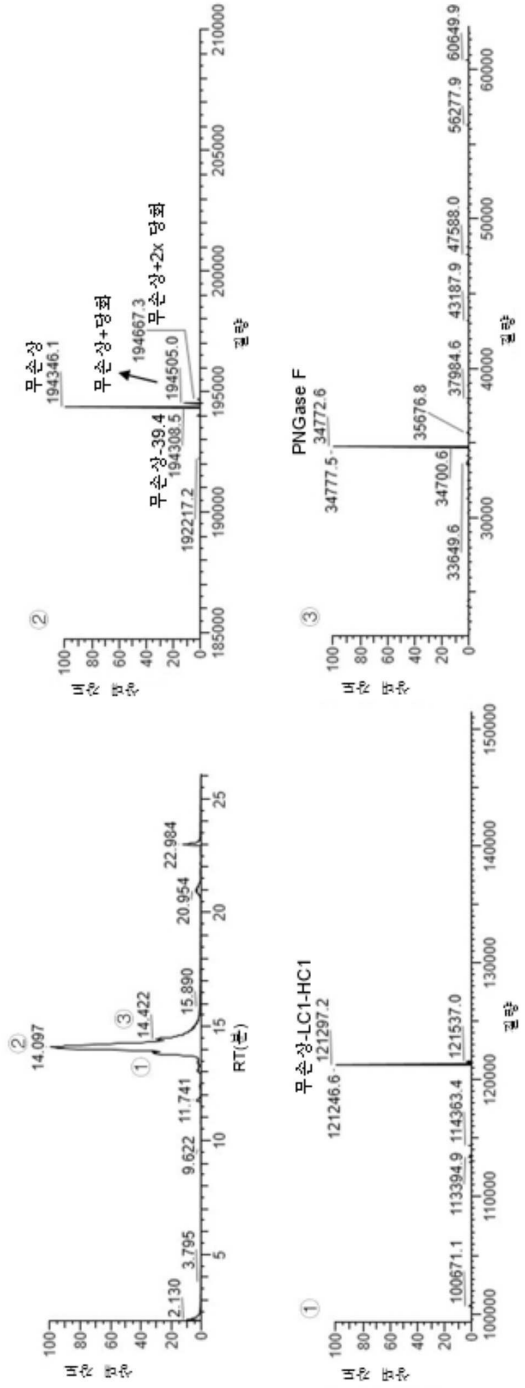
도면5c



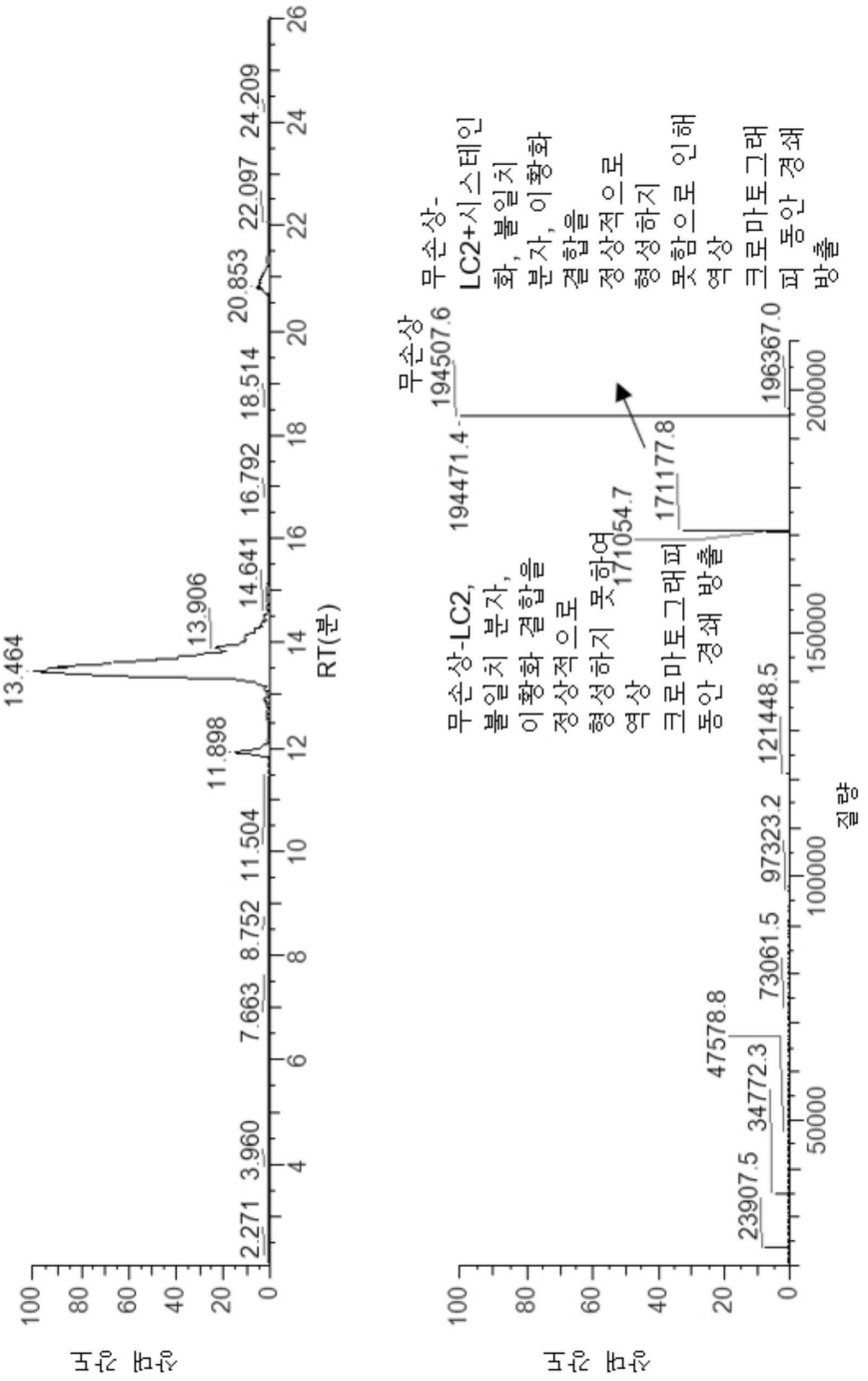
도면6a


13.479
14.197
11.922
15.705
17.886
20.868
22.089
24.194
11.547
8.752
5.538
3.960
2.271
RT(분)
무손상
194380.9
194343.3
171052.3
194543.8
121902.8
97169.7
64778.4
34772.4
23907.9
무손상-LC2
불일치 분자 이황화
결합을 정상적으로
형성하지 못함으로
인해 역상
크로마토그래피 동안
경쇄 방출(shedding)
질량

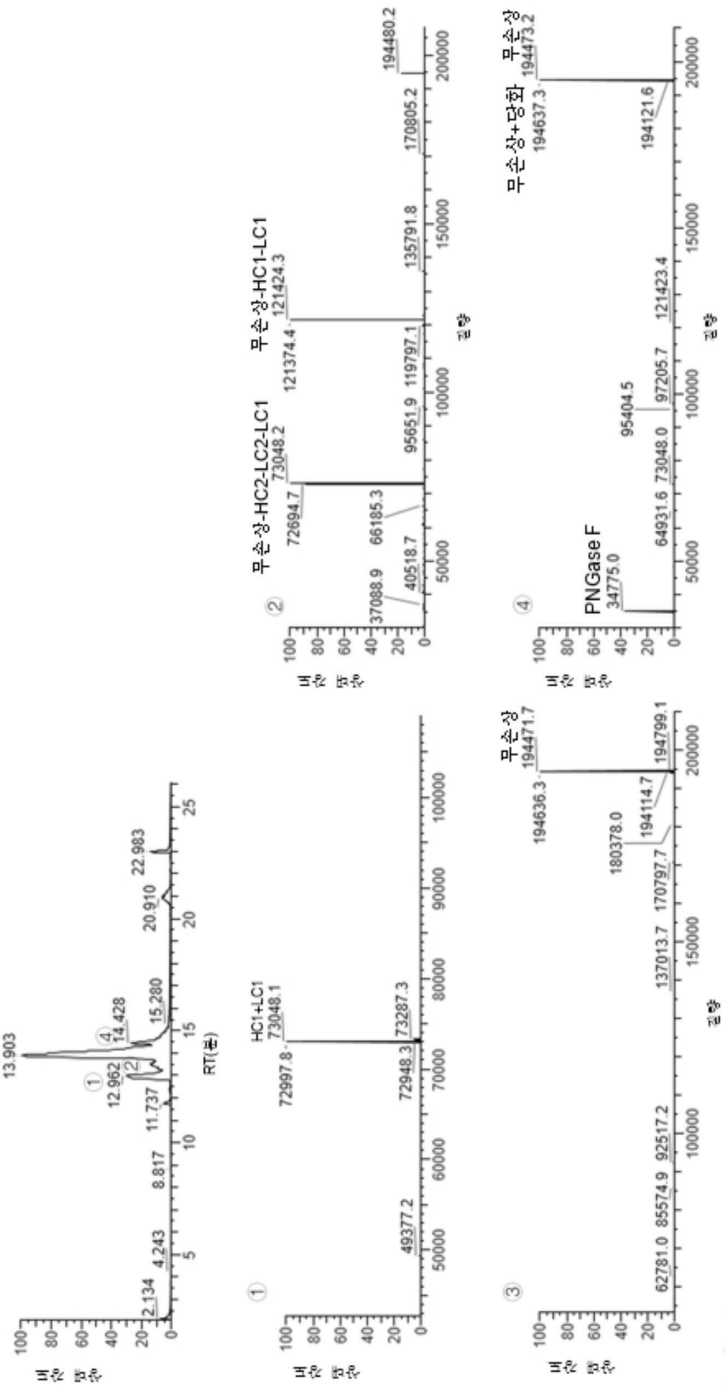
도면6b


무손상
194346.1
무손상+당화
194667.3
무손상+2x 당화
194505.0
무손상-39.4
194308.5
192217.2
PNGase F
34772.6
34777.5
35676.8
34700.6
33649.6
37984.6
43187.9
47588.0
56277.9
60649.9
무손상-LC1-HC1
121297.2
121246.6
121537.0
100671.1
113394.9
114363.4
2.130
3.795
9.622
11.741
14.097
14.422
15.890
20.954
22.984
RT(분)
상대 강도
결합

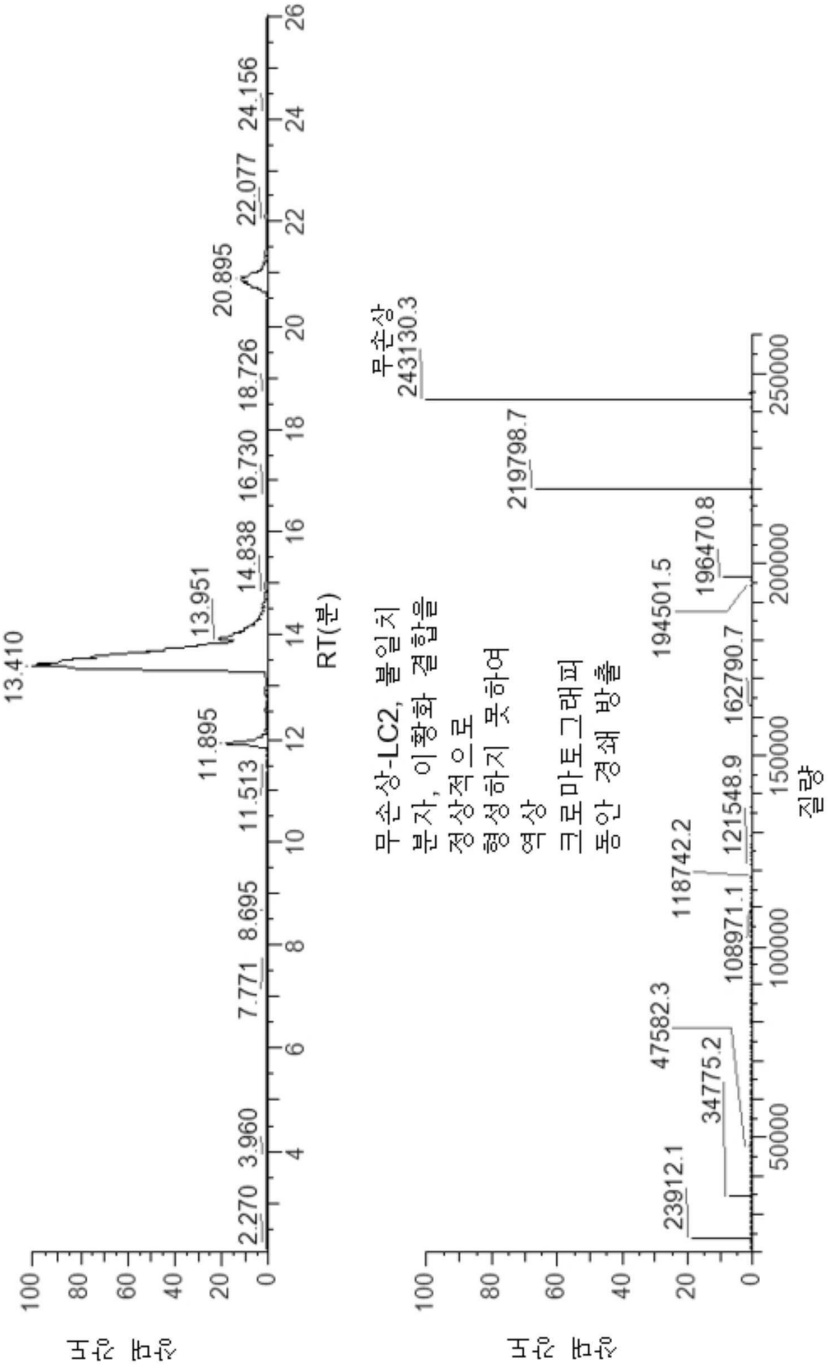
도면6c


상대 강도
RT(분)
2.271
3.960
7.663
8.752
11.504
11.898
13.464
13.906
14.641
16.792
18.514
20.853
22.097
24.209
무손상-LC2, 불일치 분자, 이황화 결합을 정상적으로 형성하지 못함으로 역상 크로마토그래피 동안 경쇄 방출
무손상 194507.6
194471.4
171054.7
171177.8
47578.8
23907.5
34772.3
73061.5
97323.2
121448.5
무손상-LC2+시스테인 화, 불일치 분자, 이황화 결합을 정상적으로 형성하지 못함으로 역상 크로마토그래피 동안 경쇄 방출
196367.0
질량

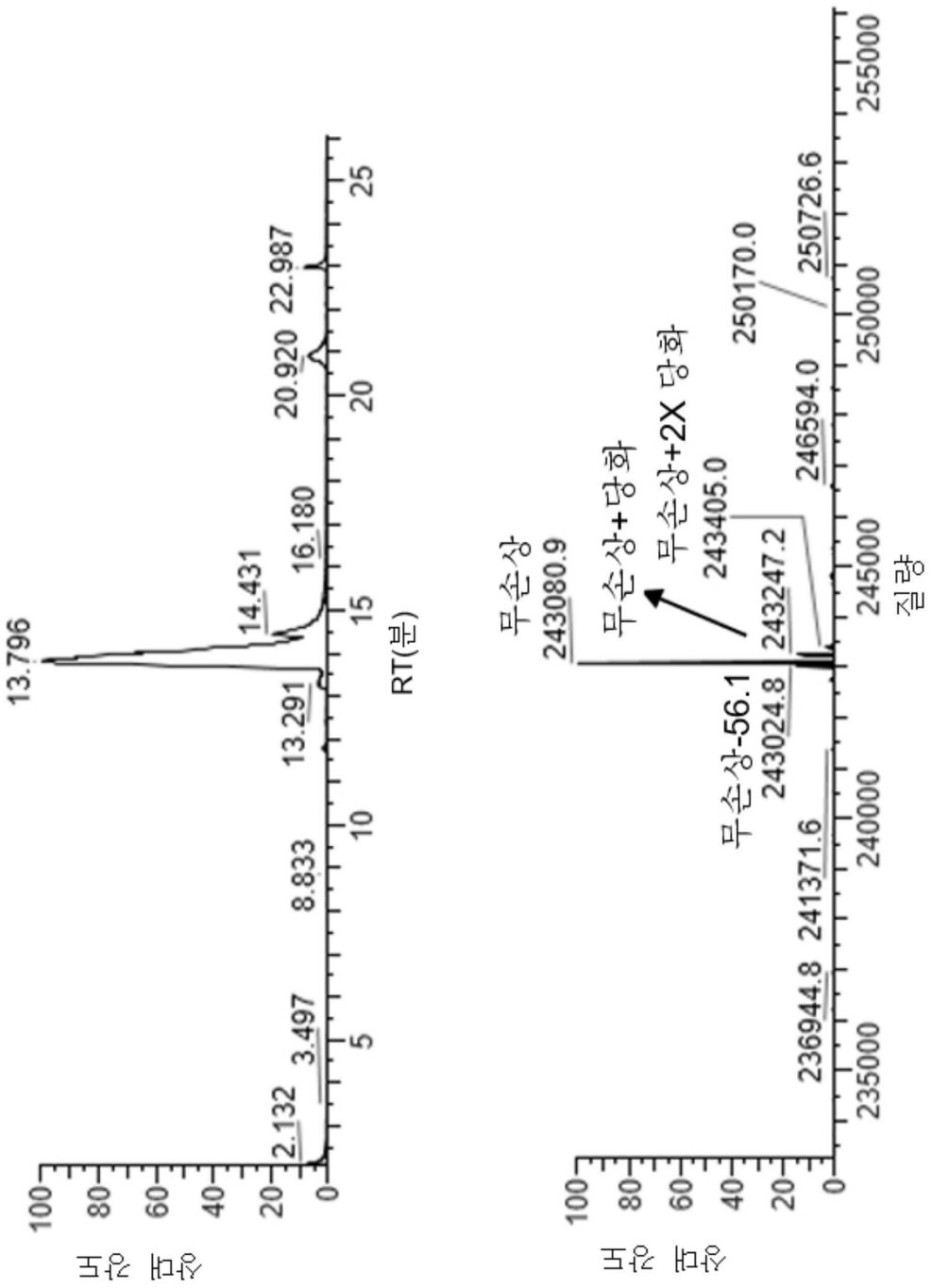
도면6d



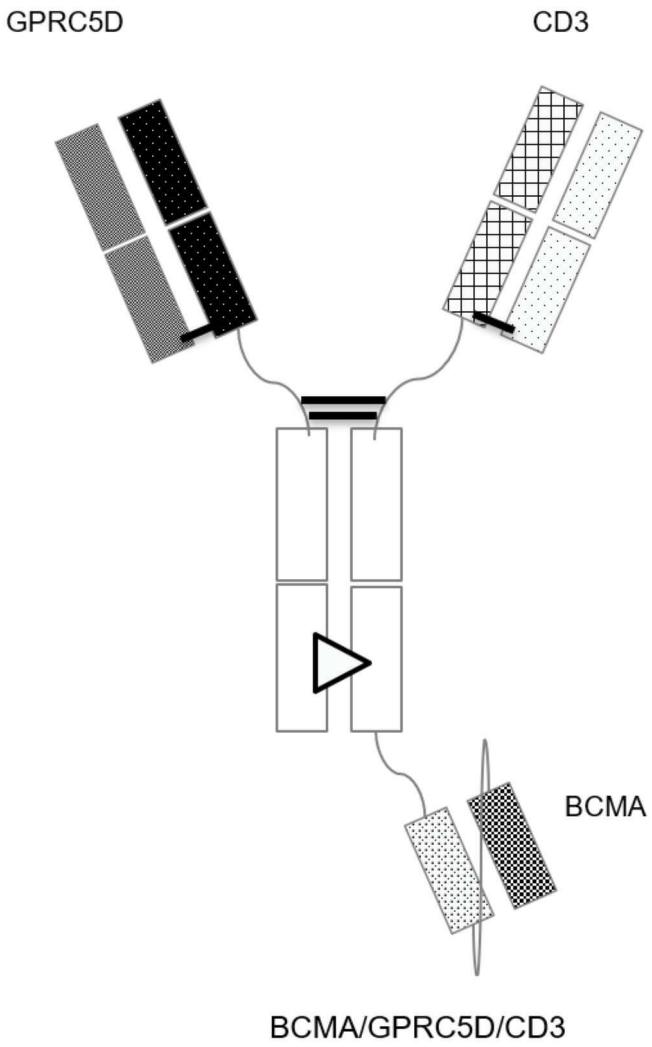
도면6e


상대 강도
RT(분)
13.410
13.951
11.895
11.513
14.838
16.730
18.726
20.895
22.077
24.156
2.270
3.960
7.771
8.695
무손상-LC2, 불일치
분자, 이황화 결합을
정상적으로
형성하지 못하여
역상
크로마토그래피
동안 경쇄 방출
무손상
243130.3
219798.7
194501.5
196470.8
162790.7
121548.9
118742.2
108971.1
47582.3
34775.2
23912.1
질량

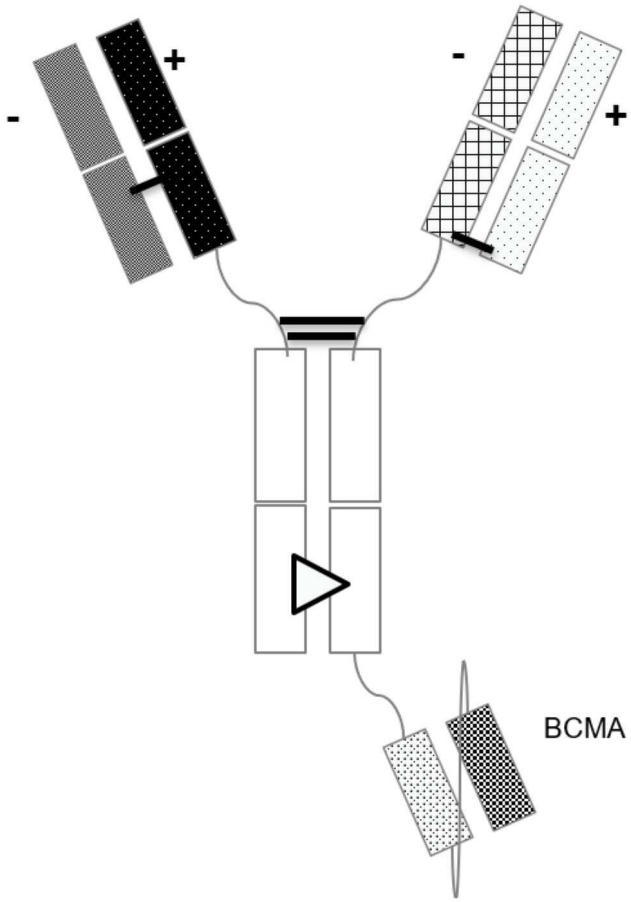
도면6f


상대 강도
RT(분)
13.796
14.431
16.180
20.920
22.987
13.291
8.833
3.497
2.132
상대 강도
질량
무손상
243080.9
무손상+당화
무손상+2X 당화
243405.0
250170.0
250726.6
246594.0
243247.2
243024.8
무손상-56.1
236944.8
241371.6

도면7a

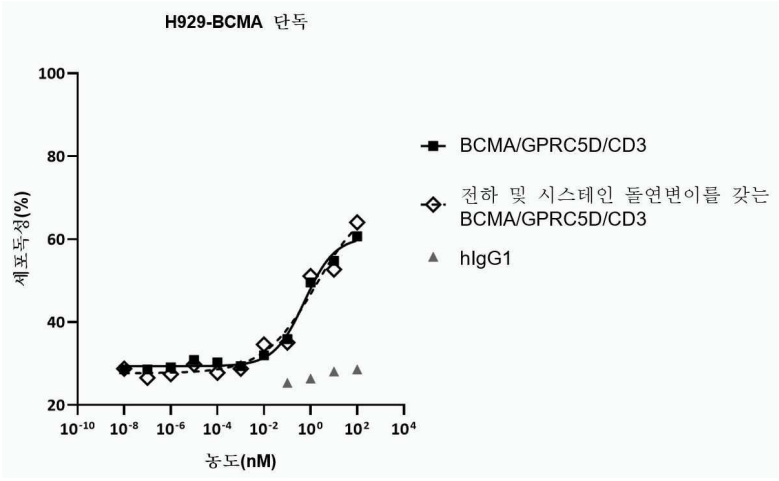


도면7b

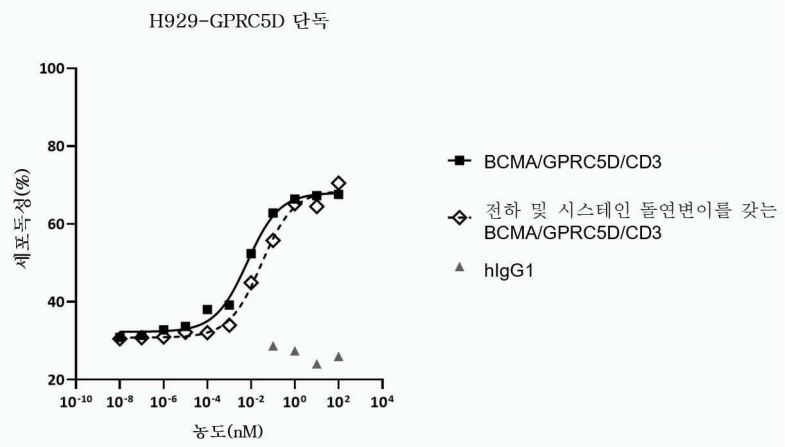


전하 및 시스테인 돌연변이를 갖는 BCMA/GPRC5D/CD3

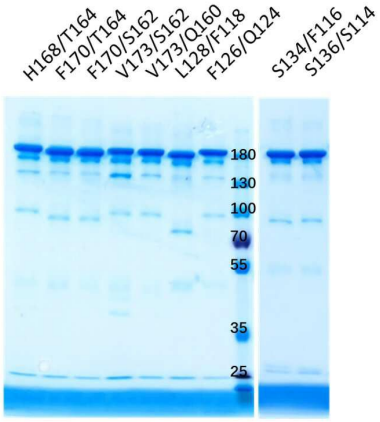
도면8a



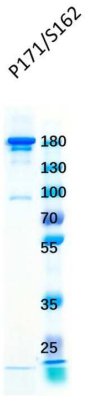
도면8b



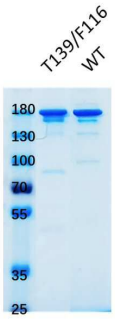
도면9a



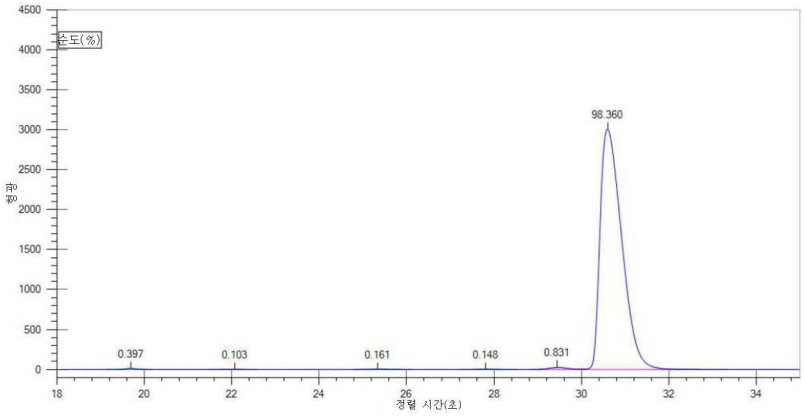
도면9b



도면9c

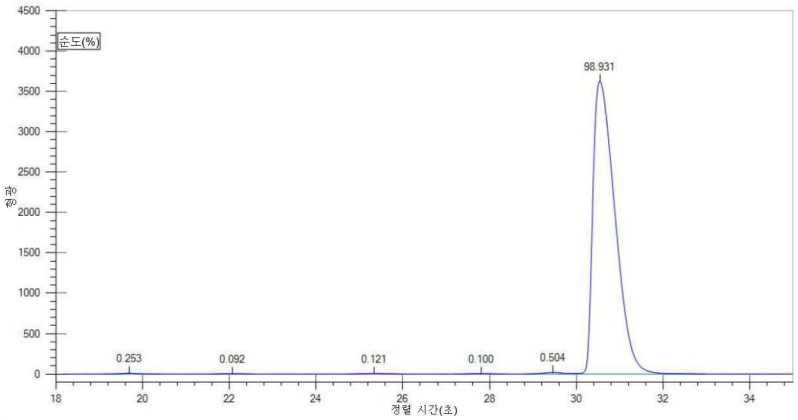


도면9d



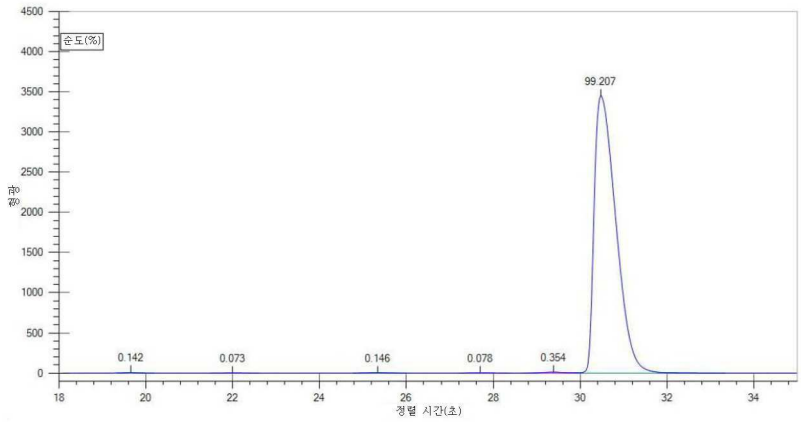
F126C/Q124C 이황화 결합 재형성된 항체

도면9e



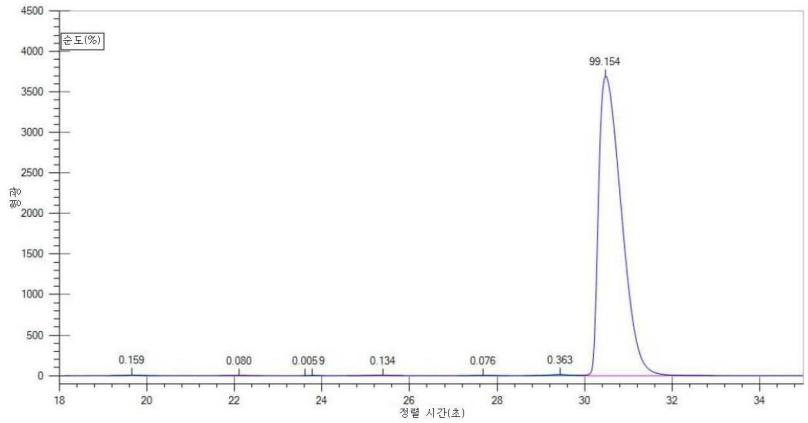
H168C/T164C 이황화 결합 재형성된 항체

도면9f



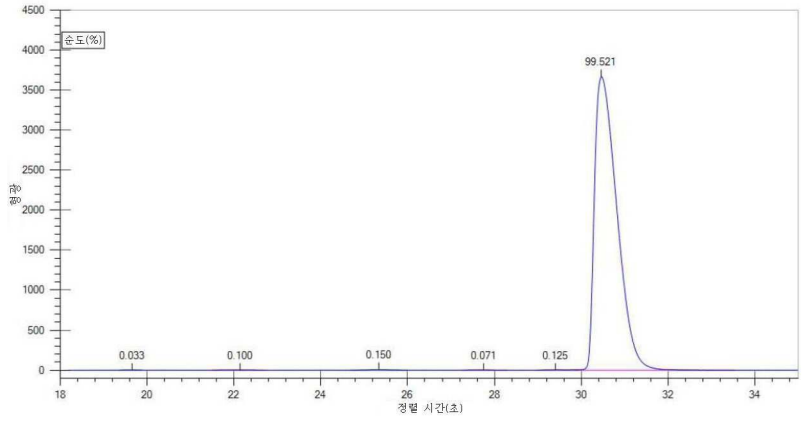
F170C/T164C 이황화 결합 재형성된 항체

도면9g



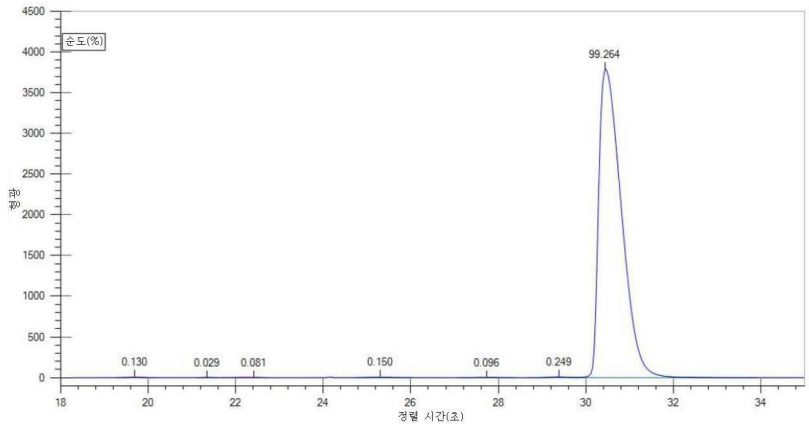
F170C/S162C 이황화 결합 재형성된 항체

도면9h



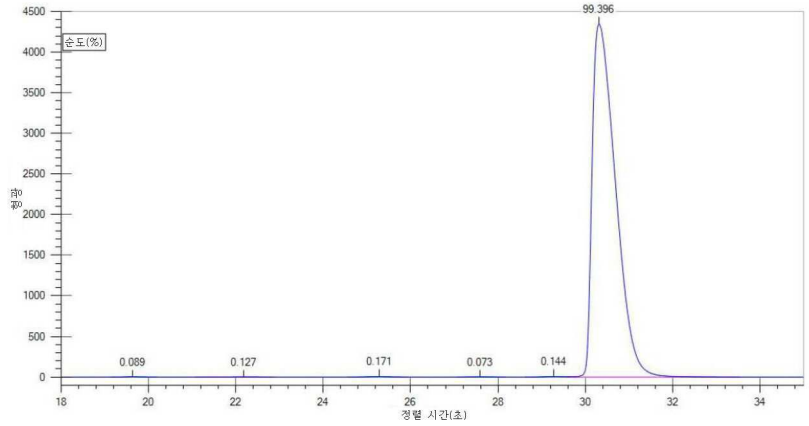
V173C/S162C 이황화 결합 재형성된 항체

도면9i



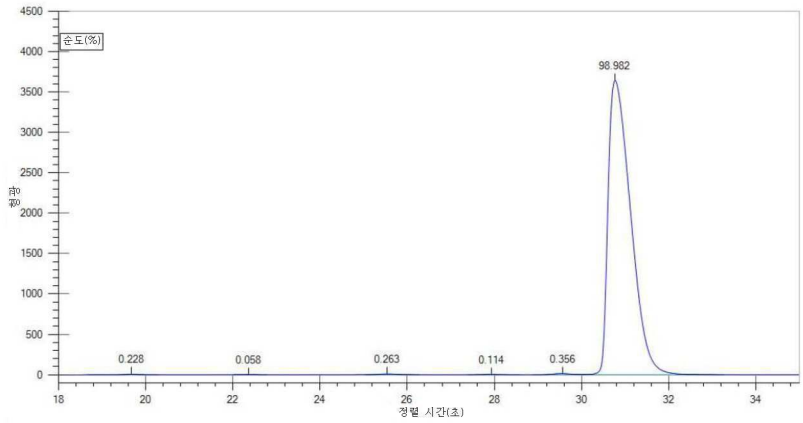
V173C/Q160C 이황화 결합 재형성된 항체

도면9j



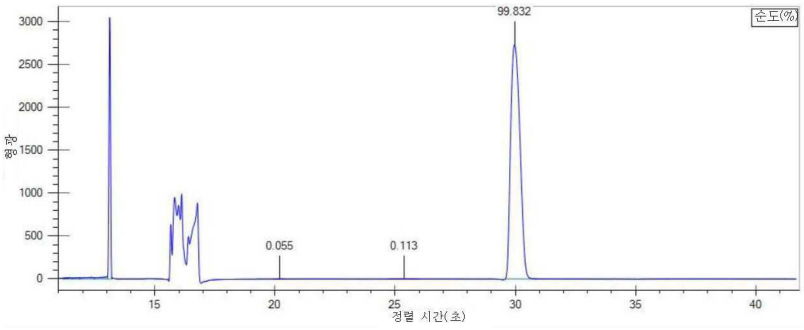
S134C/F116C 이황화 결합 재형성된 항체

도면9k



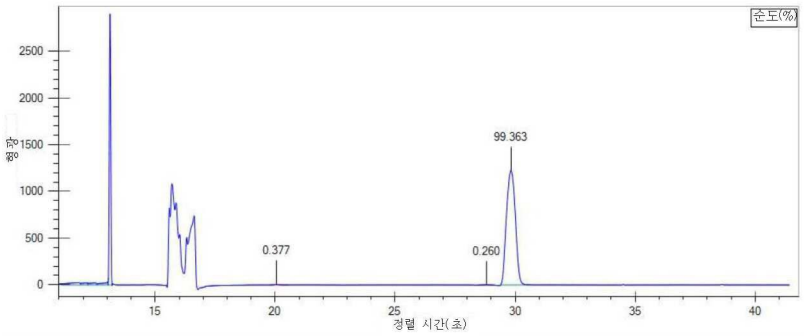
S136C/S114C 이황화 결합 재형성된 항체

도면91



P171/S162 이황화 결합 재형성된 항체

도면9m



T139/F116 이황화 결합 재형성된 항체

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.