



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0069367
(43) 공개일자 2020년06월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/00 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/32 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/00 (2013.01)
C07K 16/2863 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7014809
(22) 출원일자(국제) 2018년10월30일
심사청구일자 2020년05월22일
(85) 번역문제출일자 2020년05월22일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/079612
(87) 국제공개번호 WO 2019/086395
국제공개일자 2019년05월09일
(30) 우선권주장
17199608.5 2017년11월01일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
에프. 호프만-라 로슈 아게
스위스 체하-4070 바젤 그린짜체스트라쎄 124
(72) 발명자
브링크만 올리히
독일 82377 펜츠베르크 논넨발트 2 로세 디아그노
스틱스 게엠베하 씨/오
덕코프 슈테펜
독일 82377 펜츠베르크 논넨발트 2 로세 디아그노
스틱스 게엠베하 씨/오
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인코리아나

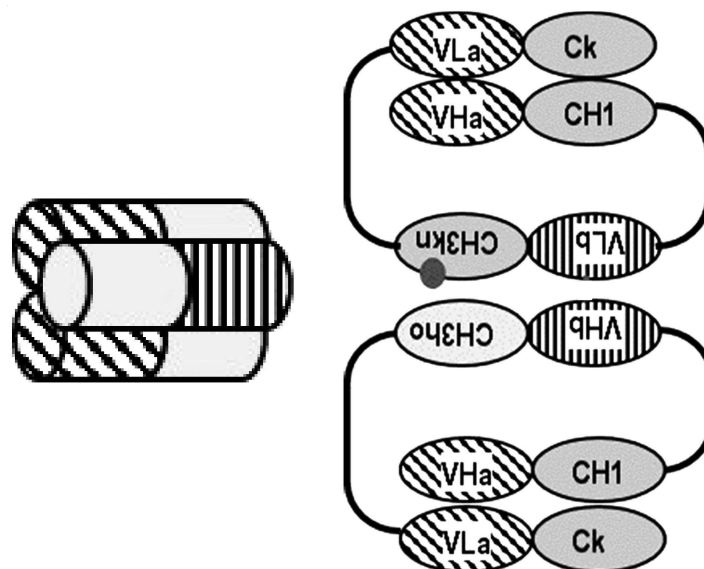
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 TRIFAB-콘톨스바디

(57) 요약

본원에는 각각 VH/VL-쌍 및 이에 의한 제1 및 제2 결합 부위를 포함하는 2개의 환형 융합 폴리펩티드를 포함하고, 이것에 의해 제3 VH/VL-쌍 및 이에 의한 제3 결합 부위가 2개의 환형 융합 폴리펩티드의 회합에 의해 형성되는 다중특이적 항체를 보고한다.

대표도



(52) CPC특허분류

C07K 16/2887 (2013.01)

C07K 16/2896 (2013.01)

C07K 16/32 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/526 (2013.01)

C07K 2317/60 (2013.01)

(72) 발명자

조르쥬 기

독일 82377 펜츠베르크 논넨발트 2 로세 디아그노
스틱스 게엠베하 씨/오

토레이 이름가르트

독일 82377 펜츠베르크 논넨발트 2 로세 디아그노
스틱스 게엠베하 씨/오

명세서

청구범위

청구항 1

3 개의 항원 결합 부위를 포함하고 2 개의 환형 융합 폴리펩티드로 이루어진 다중특이적 항체로서,
여기서

a) 제1 환형 융합 폴리펩티드는 제1 결합 도메인의 제1 부분, 제1 결합 도메인의 제2 부분 및 제3 결합 도메인의 제1 부분을 포함하고, 여기서

- 제1 결합 도메인의 제1 부분은 직접적으로 또는 제1 펩티드 링커를 통해 제3 결합 도메인의 제1 부분의 N-말단에 융합되고,
- 제1 결합 도메인의 제2 부분은 직접적으로 또는 제2 펩티드 링커를 통해 제3 결합 도메인의 제1 부분의 C-말단에 융합되고,
- 제1 결합 도메인의 제1 부분은 중쇄 Fab 단편 (VH1-CH1) 또는 경쇄 Fab 단편 (VL1-CL1)이고, 제1 결합 도메인의 제1 부분이 중쇄 Fab 단편이거나 그 반대인 경우, 제1 결합 도메인의 제2 부분이 경쇄 Fab 단편이고, 그리고
- 제1 결합 도메인의 제1 부분 및 제1 결합 도메인의 제2 부분은 서로 회합되어 제1 항원 결합 부위를 형성하고,

b) 제2 환형 융합 폴리펩티드는 제2 결합 도메인의 제1 부분, 제2 결합 도메인의 제2 부분 및 제3 결합 도메인의 제2 부분을 포함하고, 여기서

- 제2 결합 도메인의 제1 부분은 직접적으로 또는 제3 펩티드 링커를 통해 제3 결합 도메인의 제2 부분의 N-말단에 융합되고,
- 제2 결합 도메인의 제2 부분은 직접적으로 또는 제4 펩티드 링커를 통해 제3 결합 도메인의 제2 부분의 C-말단에 융합되고,
- 제2 결합 도메인의 제1 부분은 중쇄 Fab 단편 (VH2-CH1) 또는 경쇄 Fab 단편 (VL2-CL1)이고, 제2 결합 도메인의 제1 부분이 중쇄 Fab 단편이거나 그 반대인 경우, 제2 결합 도메인의 제2 부분이 경쇄 Fab 단편이고,
- 제2 결합 도메인의 제1 부분 및 제2 결합 도메인의 제2 부분은 서로 회합되어 제2 항원 결합 부위를 형성하고,

c) 제3 결합 도메인의 제1 부분 및 제3 결합 도메인의 제2 부분은 함께 제3 항원 결합 부위를 형성하고, 여기서

- 제3 결합 도메인의 제1 부분은 가변 중쇄-CH3 도메인 융합 폴리펩티드 (VH3-CH3) 또는 가변 경쇄-CH3 도메인 융합 폴리펩티드 (VL3-CH3)이고,
- 제3 결합 도메인의 제2 부분은 제2 결합 도메인의 제1 부분이 가변 경쇄-CH3 도메인 융합 폴리펩티드이거나 그 반대인 경우 가변 중쇄-CH3 도메인 융합 폴리펩티드이고,
- 제3 결합 도메인의 제1 부분 및 제3 결합 도메인의 제2 부분은 서로 회합되어 제3 항원 결합 부위를 형성하고,

여기서 2 개의 불변 중쇄 도메인 3 (CH3)은 하기에 의해 이중이량체화를 촉진하도록 변경되며:

i) 원래 아미노산 잔기보다 더 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 적어도 하나의 원래 아미노산 잔기를 치환함으로써 CH3 도메인 중 하나에서 돌기의 생성, 및 CH3 도메인 중 하나에서 생성된 돌기가 CH3 도메인의 다른 하나에서 생성된 공동에 위치할 수 있도록, 적어도 하나의 원래 아미노산 잔기를 원래 아미노산 잔기보다 더 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 치환함으로써 CH3 도메인 중 다른 하나에서 공동의 생성, 또는

CH3 도메인 중 하나에서 적어도 하나의 원래의 아미노산 잔기를 양전하 아미노산으로의 치환, 및 CH3 도메인 중

다른 하나에서 적어도 하나의 원래의 아미노산 잔기를 음전하 아미노산으로의 치환, 또는

ii) CH3 도메인 사이에 디설피드 결합이 형성되도록 각각의 CH3 도메인에 적어도 하나의 시스테인 잔기의 도입, 또는

iii) i) 및 ii)의 변형,

여기서 다중특이적 항체는 불변 중쇄 도메인 2 (CH2) 및 힌지 영역이 없는, 다중특이적 항체.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 제1 및/또는 제2 및/또는 제3 항원 결합 부위는 VH 및 VL 도메인 사이에 디설피드 결합을 형성하기 위해 하기 위치 (카바에 따른 번호지정)에서 서로 독립적으로 시스테인 잔기를 도입함으로써 이황화 안정화되는, 다중특이적 항체:

- 위치 44의 VH, 및 위치 100의 VL,
- 위치 105의 VH, 및 위치 43의 VL, 또는
- 위치 101의 VH, 및 위치 100의 VL.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 제1, 제2, 제3 및 제4 펩티드 링커는 적어도 5 개의 아미노산의 펩티드인, 다중특이적 항체.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제3 펩티드 링커는 SEQ ID NO: 38의 아미노산 서열을 갖고; 제2 및 제4 펩티드 링커는 SEQ ID NO: 16의 아미노산 서열을 갖는, 다중특이적 항체.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, VH3 도메인의 C-말단이 CH3 도메인 중 하나의 N-말단에 직접 연결되고, VL3 도메인의 C-말단이 CH3 도메인 중 다른 하나의 N-말단에 직접 연결되는, 다중특이적 항체.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 3 가인, 다중특이적 항체.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 이중특이적 (제1 결합 부위는 제1 항원에 결합하고, 제2 결합 부위는 제2 항원에 결합하고, 제3 결합 부위는 제3 항원에 결합함으로써, 제1, 제2 및 제3 항원 중 2 개는 동일한 항원이고 다른 하나는 상이한 항원임); 또는 삼중특이적 (제1 결합 부위는 제1 항원에 결합하고, 제2 결합 부위는 제2 항원에 결합하고, 제3 결합 부위는 제3 항원에 결합함으로써, 제1, 제2 및 제3 항원은 상이한 항원임)인, 다중특이적 항체.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 결합 도메인의 제1 부분 및 제1 결합 도메인의 제2 부분은 디설피드 결합에 의해 서로 공유적으로 회합되고, 및/또는 제2 결합 도메인의 제1 부분 및 제2 결합 도메인의 제2 부분은 디설피드 결합에 의해 서로 공유적으로 회합되어 있는, 다중특이적 항체.

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 결합 부위는 인간 CD3 에 특이적으로 결합하는, 다중특이적 항체.

청구항 10

하기 단계를 포함하는, 제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 따른 다중특이적 항체의 제조 방법:

- 다중특이적 항체를 인코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터로 숙주 세포를 형질전환하는 단계,
- 상기 다중특이적 항체의 합성을 허용하는 조건 하에서 상기 숙주 세포를 배양하는 단계, 및
- 상기 숙주 세포 배양물로부터 상기 다중특이적 항체를 회수하는 단계.

청구항 11

제 10 항에 따른 방법에 의해 제조된 다중특이적 항체.

청구항 12

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 따른 다중특이적 항체의 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 세트.

청구항 13

제 12 항에 따른 핵산을 포함하는 발현 벡터 또는 제 12 항에 따른 핵산 중 하나를 각각 포함하는 발현 벡터 세트.

청구항 14

제 12 항에 따른 핵산을 포함하는 숙주 세포.

청구항 15

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 따른 다중특이적 항체를 포함하고, 임의로 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 담체와 조합되는, 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 표적 결합 분자의 분야에 속한다. 본원에는 분자가 매우 소형이고 비교적 저분자량인 적어도 3 개의 항원 결합 부위를 포함하는 다중특이적 항체를 보고한다.

배경 기술

[0002] 1974년 Koehler 및 Milstein 에 의한 최초의 단일클론 항체의 개발 이후, 인간의 요법에 적합한 항체 개발에 수많은 노력이 기울여지고 있다. 이용가능해진 최초의 단일클론 항체는 마우스 및 래트에서 개발되었다. 인간의 요법에 사용될 때 이들 항체는 항-설치류 항체이기 때문에 원치 않는 부작용을 초래하였다. 이러한 원치 않는 부작용을 감소시키거나 또는 심지어 제거시키기 위해 수많은 노력이 기울여지고 있다.

[0003] 지난 수년간 지속적으로 많은 수의 인간 단일클론 항체 또는 인간화 단일클론 항체가 시장으로 나왔다. 잘 알려진 예로는 예를 들어 Hoffmann-La Roche (Basel)의 Herceptin® 및 MabThera® 를 포함한다.

[0004] 뿐만 아니라, 야생형 4개 사슬 Y-형 항체 형태로부터 유래된 신규한 항체 형태가 개발되었다. 이들 형태는 주로 이중특이적 및 다중특이적 형태이다. 검토를 위해 예를 들어 Kontermann, R., mAbs 4 (2012) 182-197 을 참조한다.

[0005] US 2009/0175867 에는 이펙터 (effector) 기능을 갖는 단쇄 다가 결합 단백질이 보고되어 있다.

[0006] WO 2014/131711 에는 이중특이적 항체가 보고되어 있는데 여기서 제2 및 제3 항원 결합 모이어티는 직접적으로 또는 면역글로불린 힌지 영역을 통해서 Fc 도메인에 융합될 수 있다.

[0007] EP 15176083 에는 전체 길이 항체와 비교하여 분자량이 감소된 신규한 항체 형태 및 이의 용도가 보고되어 있다.

[0008] WO 2007/048022 는 항체-폴리펩티드 융합 단백질 및 이의 제조 및 사용 방법을 개시한다.

[0009] WO 2007/146968 은 이펙터 기능을 갖는 단쇄 다가 결합 단백질을 개시한다.

[0010] EP 1 378 520 은 환형 단일 가닥 삼중특이적 항체를 개시한다.

[0011] WO 2016/087416 은 적어도 3개의 항원 결합 부위를 포함하는 다중특이적 항체를 개시하며, 여기서 2개의 항원 결합 부위는 제1 항원 결합 모이어티 및 제2 항원 결합 모이어티에 의해 형성되고 제3 항원 결합 부위는 가변 중쇄 도메인 (VH3) 및 가변 경쇄 도메인 (VL3)에 의해 형성됨을 개시한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본원에는 새로운 표적 결합제가 보고되어 있다. 이러한 새로운 표적 결합제는 3가, 이중 또는 삼중특이적, 이-환형 폴리펩티드이며, 여기서 각각의 환형 폴리펩티드는 3개의 가변 도메인-불변 도메인 (V-C) 이량체를 포함한다. 보다 상세하게는, 제1 폴리펩티드에서 N-말단 이량체, V_{1a} - C_{1a} 는 제1 결합 부위의 제1 부분을 포함하고, 중심 이량체, V_{2a} - C_{2a} 는, 제2 결합 부위의 제1 부분을 포함하고, C-말단 이량체, V_{1b} - C_{1b} 은, 제1 결합 부위의 제2 부분, V_{1a} - C_{1a} 및 V_{1b} - C_{1b} 을 포함한다. 제2 폴리펩티드는 중심 이량체로서 제2 결합 부위의 제2 부분, V_{2b} - C_{2b} , 및 N- 및 C- 말단 이량체로서 제3 결합 부위의 제1 및 제2 부분을 포함한다. 제1, 제2 및 제3 결합 부위의 각각의 제1 및 제2 부분은 서로 회합하여 완전하거나 기능적인 제1 내지 제3 결합 부위를 형성한다. 제1 및 제3 결합 부위의 제1 및 제2 부분의 회합에 의해 제1 및 제2 폴리펩티드 각각은 환형화된다. 각각의 회합은 비공유적으로 또는 공유적으로 서로 독립적으로 존재할 수 있다. 회합이 공유적인 경우에, 그것은 펩티드 결합에 의한 것이 아니라, 예를 들어 디설피드 결합에 의한 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본원에서 보고되는 바와 같은 일 양상은 3개의 항원 결합 부위를 포함하는 다중특이적 항체이고, 여기서

[0014] a) 제1 항원 결합 부위는 제1 결합 도메인의 제1 부분, 제1 결합 도메인의 제2 부분 및 제3 결합 도메인의 제1 부분을 포함하는, 제1 환형 융합 폴리펩티드에 의해 형성되고, 여기서

[0015] - 제1 결합 도메인의 제1 부분은 직접적으로 또는 제1 펩티드 링커를 통해 제3 결합 도메인의 제1 부분의 N-말단에 융합되고, 그리고

[0016] - 제1 결합 도메인의 제2 부분은 직접적으로 또는 제2 펩티드 링커를 통해 제3 결합 도메인의 제1 부분의 C-말단에 융합되고, 그리고

[0017] - 제1 결합 도메인의 제1 부분은 중쇄 Fab 단편 (VH_1 -CH1) 또는 경쇄 Fab 단편 (VL_1 -CL)이고, 제1 결합 도메인의 제1 부분이 중쇄 Fab 단편이거나 그 반대인 경우, 제1 결합 도메인의 제2 부분은 경쇄 Fab 단편이고, 그리고

[0018] - 제1 결합 도메인의 제1 부분 및 제1 결합 도메인의 제2 부분은 서로 회합되어 제1 항원 결합 부위를 형성하며,

[0019] b) 제2 항원 결합 부위는 제2 환형 융합 폴리펩티드에 의해 형성되고, 제2 결합 도메인의 제1 부분, 제2 결합 도메인의 제2 부분 및 제3 결합 도메인의 제2 부분을 포함하고, 여기서

[0020] - 제2 결합 도메인의 제1 부분은 직접적으로 또는 제3 펩티드 링커를 통해 제3 결합 도메인의 제2 부분의 N-말단에 융합되고, 그리고

[0021] - 제2 결합 도메인의 제2 부분은 직접적으로 또는 제4 펩티드 링커를 통해 제3 결합 도메인의 제2 부분의 C-말단에 융합되고, 그리고

[0022] - 제2 결합 도메인의 제1 부분은 중쇄 Fab 단편 (VH_2 -CH1) 또는 경쇄 Fab 단편 (VL_2 -CL)이고, 이로 인해 제2 결합 도메인의 제1 부분이 중쇄 Fab 단편이거나 그 반대인 경우, 제2 결합 도메인의 제2 부분은 경쇄 Fab 단편이고, (이로 인해 제2 결합 부위의 제1 부분은 제1 결합 부위의 제1 부분과 독립적으로 선택되고), 그리고

[0023] - 제2 결합 도메인의 제1 부분 및 제2 결합 도메인의 제2 부분은 서로 회합되어 제2 항원 결합 부위를 형성하며,

[0024] c) 제3 항원 결합 부위는 제3 결합 도메인의 제1 부분 및 제3 결합 도메인의 제2 부분에 의해 형성되고, 여기서

[0025] - 제3 결합 도메인의 제1 부분은 가변 중쇄-링커-CH3 도메인 융합 폴리펩티드 (VH_3 -L-CH3) 또는 가변 경쇄-링커

-CH3 도메인 융합 폴리펩티드 (VL₃-L-CH3)이고, 그리고

- [0026] - 제3 결합 도메인의 제2 부분은 제1 환형 융합 폴리펩티드에서 제3 결합 도메인의 제1 부분이 가변 경쇄-CH3 도메인 융합 폴리펩티드이거나 그 반대인 경우, 가변 중쇄-CH3 도메인 융합 폴리펩티드이고, 그리고
- [0027] -제3 결합 도메인의 제1 부분 및 제3 결합 도메인의 제2 부분은 서로 회합되어 제3 항원 결합 부위를 형성하며,
- [0028] 여기서 2개의 불변 중쇄 도메인 3 (CH3)은 하기에 의해 이중이량체화를 촉진하도록 변경된다:
- [0029] i) 원래 아미노산 잔기보다 더 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 적어도 하나의 원래 아미노산 잔기를 치환함으로써 CH3 도메인 중 하나에서 돌기의 생성, 및 CH3 도메인 중 하나에서 생성된 돌기가 CH3 도메인의 다른 하나에서 생성된 공동에 위치할 수 있도록, 적어도 하나의 원래 아미노산 잔기를 원래 아미노산 잔기보다 더 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 치환함으로써 CH3 도메인 중 다른 하나에서 공동의 생성, 또는
- [0030] CH3 도메인 중 하나에서 적어도 하나의 원래 아미노산 잔기를 양전하 아미노산으로 치환하고, CH3 도메인 중 다른 하나에서 적어도 하나의 원래 아미노산 잔기를 음전하 아미노산으로 치환, 또는
- [0031] ii) CH3 도메인 사이에 디설피드 결합이 형성되도록 각각의 CH3 도메인에 적어도 하나의 시스테인 잔기의 도입, 또는
- [0032] iii) i) 및 ii)의 변형.
- [0033] 일 구체예에서 다중특이적 항체는 상기 CH3 도메인에 대한 각각의 N-말단에 불변 중쇄 도메인 2 (CH2)를 포함하지만 힌지 영역을 포함하지는 않는다.
- [0034] 일 구체예에서 다중특이적 항체는 불변 중쇄 도메인 2 (CH2) 및 힌지 영역이 없다.
- [0035] 일 구체예에서 제1 및 제2 환형 융합 폴리펩티드는 각각 제3 항원 결합 도메인의 부분에 대한 N-말단의 결합 도메인의 정확히 일부 및 제3 결합 도메인의 부분에 대한 C-말단의 결합 도메인의 정확히 하나의 상이한 부분을 포함한다.
- [0036] 일 구체예에서 제1 환형 융합 폴리펩티드에서 제1 결합 도메인의 제1 부분 및 제1 결합 도메인의 제2 부분은 서로 공유적으로 회합되고 및/또는 제2 환형 융합 폴리펩티드에서 제2 결합 도메인의 제1 부분 및 제2 결합 도메인의 제2 부분이 서로 공유적으로 회합되어 있다. 일 구체예에서 공유적 회합은 펩티드 결합 이외의 결합에 의한 것이다. 바람직한 일 구체예에서, 공유적 회합은 디설피드 결합에 의한 것이다.
- [0037] 일 구체예에서
- [0038] i) 제1 또는 제2 결합 부위의 제1 부분의 CH1 도메인의 C-말단은 제3 결합 도메인의 부분의 N-말단에 접합되고, 제1 또는 제2 결합 부위의 제2 부분의 VL 도메인의 N-말단은 제3 결합 도메인의 C-말단에 접합되고, 또는
- [0039] ii) 제1 또는 제2 결합 부위의 제1 부분의 VH 도메인의 C-말단은 제3 결합 도메인의 부분의 N-말단에 접합되고, 제1 또는 제2 결합 부위의 제2 부분의 CL 도메인의 N-말단은 제3 결합 도메인의 C-말단에 접합된다.
- [0040] 일 구체예에서 제1 및/또는 제2 및/또는 제3 항원 결합 부위는 VH 및 VL 도메인 사이에 디설피드 결합을 형성하기 위해 하기 위치 (카바트에 따른 번호지정)에서 서로 독립적으로 시스테인 잔기를 도입함으로써 이항화 안정화된다:
- [0041] - 위치 44의 VH, 및 위치 100의 VL,
- [0042] - 위치 105의 VH, 및 위치 43의 VL, 또는
- [0043] - 위치 101의 VH, 및 위치 100의 VL.
- [0044] 일 구체예에서 제1 또는 제2 결합 도메인의 제1 부분은 항체 중쇄 Fab 단편 (VH+CH1)이고 제1 또는 제2 결합 도메인의 제2 부분은 항체 경쇄 Fab 단편 (VL+CL)이거나 또는 그 반대이다.
- [0045] 일 구체예에서 다중특이적 항체 융합 폴리펩티드는 이펙터 기능을 발휘한다. 일 구체예에서 이펙터 기능은 ADCC 또는/및 CDC이다.
- [0046] 일 구체예에서 제1 결합 도메인의 제1 부분은 SEQ ID NO: 16 또는 SEQ ID NO: 17의 제1 펩티드 링커를 통해 제3 결합 도메인의 부분의 N-말단에 융합되고 제1 결합 도메인의 제2 부분은 SEQ ID NO:16 또는 SEQ ID NO:17의 제2 펩티드 링커를 통해 제3 결합 도메인의 부분의 C-말단에 융합되며, 이로 인해 제1 및 제2 펩티드 링커는 서로

독립적으로 선택된다.

- [0047] 일 구체예에서 제2 결합 도메인의 제1 부분은 SEQ ID NO: 16 또는 SEQ ID NO: 17의 제1 펩티드 링커를 통해 제3 결합 도메인의 부분의 N-말단에 융합되고 제2 결합 도메인의 제2 부분은 SEQ ID NO: 16 또는 SEQ ID NO: 17의 제2 펩티드 링커를 통해 제3 결합 도메인의 부분의 C-말단에 융합되며, 이로 인해 제1 및 제2 펩티드 링커는 서로 독립적으로 선택된다.
- [0048] 바람직한 일 구체예에서 제1 결합 도메인의 제1 부분은 SEQ ID NO: 38의 제1 펩티드 링커를 통해 제3 결합 도메인의 부분의 N-말단에 융합되고 제1 결합 도메인의 제2 부분은 SEQ ID NO: 16의 제2 펩티드 링커를 통해 제3 결합 도메인의 부분의 C-말단에 융합되며, 제2 결합 도메인의 제1 부분은 SEQ ID NO: 38의 제1 펩티드 링커를 통해 제3 결합 도메인의 부분의 N-말단에 융합되고 제2 결합 도메인의 제2 부분은 SEQ ID NO: 16의 제2 펩티드 링커를 통해 제3 결합 도메인의 부분의 C-말단에 융합된다.
- [0049] 일 구체예에서 제3 결합 부위는 인간 CD3 또는 인간 CD4 또는 인간 CD28에 특이적으로 결합한다.
- [0050] 일 구체예에서 3 개의 항원 결합 부위를 포함하는 다중특이적 항체는 하기를 포함한다:
- [0051] N-말단에서 C-말단 방향으로 제1 결합 도메인의 제1 부분으로서 중쇄 Fab 단편 (VH-CH1), SEQ ID NO: 38의 링커, 제3 결합 도메인의 제1 부분으로서 가변 중쇄-CH3 도메인 융합 폴리펩티드, 여기서 CH3 도메인은 돌연변이 T366W (임의로 추가 돌연변이 S354C 또는 Y349C)를 포함하고, SEQ ID NO: 16의 링커 및 제1 결합 도메인의 제2 부분으로서 경쇄 Fab 단편 (VL-CL)을 포함하는 제1 환형 융합 폴리펩티드,
- [0052] 및
- [0053] N-말단에서 C-말단 방향으로 제2 결합 도메인의 제1 부분으로서 경쇄 Fab 단편 (VL-CL), SEQ ID NO: 38의 링커, 제3 결합 도메인의 제2 부분으로서 가변 경쇄-CH3 도메인 융합 폴리펩티드, 여기서 CH3 도메인은 돌연변이 T366S, L368A 및 Y407V (임의로 추가 돌연변이 Y349C 또는 S354C)를 포함하고, SEQ ID NO: 16의 링커 및 제2 결합 도메인의 제2 부분으로서 중쇄 Fab 단편 (VH-CH1)을 포함하는 제2 환형 융합 폴리펩티드,
- [0054] (카바트 EU 지수에 따른 번호지정)
- [0055] 및
- [0056] 인간 CD3 또는 CD4 또는 CD28에 특이적으로 결합하는 제3 결합 부위.
- [0057] 일 구체예에서 각각의 (환형) (단쇄) 융합 폴리펩티드는 N-말단에서 C-말단 방향으로 제3 결합 도메인의 부분 이전 (즉, 제3 결합 도메인의 부분에 대한 N-말단)에 정확하게 하나의 항체 가변 도메인 및 제3 결합 도메인의 부분 이후 (즉, 제3 결합 도메인의 부분에 대한 C-말단)에 정확하게 하나의 항체 가변 도메인을 포함한다.
- [0058] 일 구체예에서 표적은 세포 표면 항원 또는 세포 표면 수용체의 가용성 리간드이다.
- [0059] 일 구체예에서 결합 도메인은 Fab, DAF 또는 이중특이적 Fab이다.
- [0060] 일 구체예에서 제1 및/또는 제2 결합 도메인은 (통상의) Fab이고, 여기서 결합 도메인의 제1 부분은 항체 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 제1 항체 중쇄 불변 도메인 (CH1)의 적어도 N-말단 단편 (또는 전부)을 포함하고, 결합 도메인의 각각의 다른 부분은 항체 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 항체 경쇄 불변 도메인 (CL)의 적어도 N-말단 단편 (또는 전부)을 포함하거나, 또는 그 반대이다. 일 구체예에서 결합 도메인의 제1 부분은 N-말단에서 C-말단 방향으로 VH-CH1을 포함하고 결합 도메인의 제2 부분은 N-말단에서 C-말단 방향으로 VL-CL을 포함하거나, 또는 그 반대이다.
- [0061] 일 구체예에서 원래 아미노산 잔기보다 더 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기는 R, F, Y 및 W로부터 선택된다.
- [0062] 일 구체예에서 원래 아미노산 잔기보다 더 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기는 A, S, T 및 V로부터 선택된다.
- [0063] 일 구체예에서 원래 아미노산 잔기보다 더 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기는 R, F, Y 및 W로부터 선택되고, 원래 아미노산 잔기보다 더 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기는 A, S, T 및 V로부터 선택된다.
- [0064] 일 구체예에서 제3 결합 부위의 하나의 CH3 도메인은 T366W 돌연변이 (노브 돌연변이; 노브 측)를 포함하고, 제3 결합 부위의 다른 CH3 도메인은 돌연변이 T366S, L368A 및 Y407V (홀 돌연변이; 홀 측) (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)를 포함한다.

- [0065] 일 구체예에서 제3 결합 부위의 하나의 CH3 도메인은 T366W 돌연변이 (노브 돌연변이; 노브 측)를 포함하고, 제3 결합 부위의 다른 CH3 도메인은 돌연변이 T366S, L368A 및 Y407V (홀 돌연변이; 홀 측) (카밧의 EU 지수에 따른 번호지정)를 포함한다.
- [0066] 일 구체예에서 제3 결합 부위의 하나의 CH3 도메인은 S354C 및 T366W 돌연변이 (노브-cys 돌연변이; 노브-cys 측)를 포함하고, 제3 결합 부위의 다른 CH3 도메인은 돌연변이 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V (홀-cys 돌연변이; 홀-cys 측) (카밧의 EU 지수에 따른 번호지정)를 포함한다.
- [0067] 일 구체예에서 다중특이적 항체는 3개의 항원 결합 부위를 포함하고, 여기서
- [0068] a) 제1 항원 결합 부위는 제1 환형 융합 폴리펩티드의 제1 항체 중쇄 가변 도메인 (VH₁) 및 제1 항체 경쇄 가변 도메인 (VL₁) 쌍 (VH₁/VL₁-쌍)에 의해 형성되고, 여기서
- [0069] - VH₁은 제1 중쇄 Fab 단편 (VH₁-CH1)의 일부이고, VL₁은 제1 경쇄 Fab 단편 (VL₁-CL)의 일부이며,
- [0070] - VH₁-CH1은 제1 펩티드 링커를 통해 제1 가변 도메인-링커-항체 불변 도메인 3 융합 폴리펩티드 (V₃-L-CH3)의 N-말단 또는 C-말단에 접합되고 VL₁-CL은 제2 펩티드 링커를 통해 제1 V₃-L-CH3의 각각의 다른 말단에 접합되며,
- [0071] - VH₁-CH1 및 VL₁-CL은 서로 회합되어 있으며 VH₁/VL₁-쌍을 형성하고,
- [0072] b) 제2 항원 결합 부위는 제2 환형 융합 폴리펩티드의 제2 항체 중쇄 가변 도메인 (VH₂) 및 제2 항체 경쇄 가변 도메인 (VL₂) 쌍 (VH₂/VL₂-쌍)에 의해 형성되고, 여기서
- [0073] - VH₂은 제2 중쇄 Fab 단편 (VH₂-CH1)의 일부이고, VL₂은 제2 경쇄 Fab 단편 (VL₂-CL)의 일부이며,
- [0074] - VH₂-CH1은 제3 펩티드 링커를 통해 제2 가변 도메인-링커-항체 불변 도메인 3 융합 폴리펩티드 (V₃-L-CH3)의 N-말단 또는 C-말단에 접합되고 VL₂-CL은 제4 펩티드 링커를 통해 제2 V₃-L-CH3의 각각의 다른 말단에 접합되며,
- [0075] - VH₂-CH1 및 VL₂-CL은 서로 회합되어 있으며 VH₂/VL₂-쌍을 형성하고,
- [0076] c) 제3 항원 결합 부위는 제1 V₃-L-CH3 및 제2 V₃-L-CH3에 의해 형성되고, 여기서
- [0077] - 제1 V₃-L-CH3은 가변 중쇄 도메인-링커-항체 불변 도메인 3의 융합 폴리펩티드 (VH₃-L-CH3) 또는 가변 경쇄 도메인-링커-항체 불변 도메인 3 융합 폴리펩티드 (VL₃-L-CH3)일 수 있으며,
- [0078] - 제2 V₃-CH3은 제1 V₃-L-CH3이 가변 경쇄 도메인-링커-항체 불변 도메인 3 융합 폴리펩티드이거나 또는 그 반대인 경우 가변 중쇄 도메인-링커-항체 불변 도메인 3 융합 폴리펩티드이고,
- [0079] - VH₃-L-CH3 및 VL₃-L-CH3은 서로 회합되어 있으며 VH₃/VL₃-쌍을 형성하고,
- [0080] 여기서 2개의 항체 불변 도메인 3 (CH3)은 CH3 중 하나에 돌연변이 T366W 및 임의로 돌연변이 S354C를 도입하고 각각의 다른 CH3에 돌연변이 T366S, L368A 및 Y407V 및 임의로 돌연변이 Y349C를 도입함으로써 이중이량체화를 촉진하도록 변경되고 (카밧의 EU 지수에 따른 번호지정),
- [0081] 여기서 다중특이적 항체는 불변 도메인 2 (CH2) 및 힌지 영역이 없다.
- [0082] 일 구체예에서 제3 결합 도메인의 제1 및/또는 제2 부분에 링커가 존재하지 않는다 (즉, 제3 결합 도메인의 제1 부분은 가변 중쇄 도메인-항체 불변 도메인 3 융합 폴리펩티드이고 제3 결합 도메인의 제2 부분은 가변 경쇄 도메인-항체 불변 도메인 3 융합 폴리펩티드, 또는 그 반대이다).
- [0083] 일 구체예에서 제1 및 제2 결합 부위는 동일하거나 상이한 표적에 특이적으로 결합하고 제3 결합 부위는 제1 및 제2 결합 부위의 표적과 상이한 표적에 특이적으로 결합한다.

발명의 효과

- [0084] 본원에서 보고되는 일 양상은 본원에 보고되는 다중특이적 항체 및 세포독성제를 포함하는 면역접합체이다.
- [0085] 본원에서 보고되는 일 양상은 본원에 보고되는 다중특이적 항체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약

학 제형이다.

[0086] 본원에서 보고되는 일 양상은 의약으로 사용하기 위해 본원에 보고되는 다중특이적 항체이다.

[0087] 본원에서 보고되는 일 양상은 의약의 제조에 있어서 본원에 보고되는 다중특이적 항체의 용도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0088] I. 정의

[0089] 노브 인투 홀 (knob into hole) 이량체화 모듈 및 항체 공학에서의 그들 용도는 Carter P.; Ridgway J.B.B.; Presta L.G.: Immunotechnology, Volume 2, Number 1, February 1996, pp. 73-73(1) 에 기재되어 있다.

[0090] 인간 면역글로불린 경쇄 및 중쇄의 뉴클레오티드 서열에 관한 일반적 정보는: Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) 에서 제공된다.

[0091] 본원에서 사용되는, 중쇄 및 경쇄의 모든 불변 영역 및 도메인의 아미노산 위치는 Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) 에 기재된 카밧 번호지정 체계에 따라 번호지정되고 본원에서는 "카밧에 따른 번호지정" 으로 언급된다. 구체적으로, Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) 의 카밧 번호지정 체계 (647-660 페이지 참조)는 카파 및 람다 이소타입의 경쇄 불변 도메인 CL에 대해 사용되고, 카밧 EU 지수 번호지정 체계 (661-723 페이지 참조)는 불변 중쇄 도메인 (이 경우에 본원에서 "카밧 EU 지수에 따른 번호지정" 으로 지칭하여 추가로 명확히 되는, CH1, 힌지, CH2 및 CH3)에 사용된다.

[0092] 본 발명을 수행하기 위한 유용한 방법 및 기술은 예를 들어, Ausubel, F.M. (ed.), Current Protocols in Molecular Biology, Volumes I to III (1997); Glover, N.D., and Hames, B.D., ed., DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II (1985), Oxford University Press; Freshney, R.I. (ed.), Animal Cell Culture - a practical approach, IRL Press Limited (1986); Watson, J.D., et al., Recombinant DNA, Second Edition, CHSL Press (1992); Winnacker, E.L., From Genes to Clones; N.Y., VCH Publishers (1987); Celis, J., ed., Cell Biology, Second Edition, Academic Press (1998); Freshney, R.I., Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, second edition, Alan R. Liss, Inc., N.Y. (1987) 에 기재되어 있다.

[0093] 재조합 DNA 기술의 사용은 핵산 유도체의 생성을 가능하게 한다. 그러한 유도체는, 예를 들어, 치환, 변경, 교환, 결실 또는 삽입에 의해 개별 또는 여러 뉴클레오티드 위치에서 변형될 수 있다. 변형 또는 유도체화는, 예를 들어, 부위 지정 돌연변이유발의 수단에 의해 수행될 수 있다. 이러한 변형은 당업자에 의해 용이하게 수행될 수 있다 (예를 들어, Sambrook, J., et al., Molecular Cloning: A laboratory manual (1999) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA; Hames, B.D., and Higgins, S.G., Nucleic acid hybridization - a practical approach (1985) IRL Press, Oxford, England 참조).

[0094] 본원과 첨부된 청구항에서 사용된 바와 같이, 단수형 "한", "하나" 및 "그" 는 달리 명확하게 명시하지 않으면 복수 인용을 포함한다는 것을 주의해야만 한다. 따라서, 예를 들어, "세포" 에 대한 언급은 다수의 이러한 세포 및 당업자에게 공지된 이의 균등물 등을 포함한다. 또한, 용어 "한" (또는 "하나"), "하나 이상" 및 "적어도 하나"는 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있다. 용어 "포함하는", "포괄하는", 및 "갖는" 도 역시 상호교환적으로 사용될 수 있다는 것에 주의해야 된다.

[0095] 용어 "약" 은 그 후에 이어지는 수치값의 $\pm 20\%$ 의 범위를 의미한다. 일 구체예에서 용어 '약'은 그 후에 이어지는 수치값의 $\pm 10\%$ 범위를 의미한다. 일 구체예에서 용어 '약'은 그 후에 이어지는 수치값의 $\pm 5\%$ 범위를 의미한다.

[0096] "친화성" 은 분자 (예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 이의 결합 파트너 (예를 들어, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 총합의 강도를 의미한다. 달리 표시하지 않으면, 본원에서 사용시, "결합 친화성"은 결합쌍 (예를 들어, 항체 및 항원)의 구성원 간 1:1 상호작용을 반영하는 고유한 결합 친화성을 의미한다. 그 파트너 Y에 대한 분자 X의 친화성은 일반적으로 해리 상수 (kd)로 나타낼 수 있다. 친화성은 본원에 기재되는 것들을 포함하여, 당업계에 공지된 일반적인 방법으로 측정될 수 있다.

[0097] 용어 "항체-의존적 세포의 세포독성 (ADCC)" 은 Fc 수용체 결합에 의해 매개되는 기능이며 이펙터 세포의 존재

하에서 항체 Fc-영역에 의해 매개되는 표적 세포의 용해를 의미한다. ADCC는 일 구체예에서 이펙터 세포 예컨대 신선하게 단리된 PBMC (말초 혈액 단핵 세포) 또는 단핵구 또는 NK (자연 살해) 세포와 같은, 버피 코트로 부터 정제된 이펙터 세포의 존재 하에서 본원에서 보고되는 바와 같은 다중환형 융합 폴리펩티드를 포함하는 Fc-영역으로의 표적 발현 적혈구 세포 (예를 들어, 재조합 표적을 발현하는 K562 세포)의 조제물의 처리에 의해 측정된다. 표적 세포는 Cr-51로 표지되고 이후에 다중환형 융합 폴리펩티드와 함께 배양된다. 표지된 세포를 이펙터 세포와 함께 배양하고 상청액을 방출된 Cr-51에 대해 분석한다. 대조군은 다중환형 융합 폴리펩티드 없이 이펙터 세포와 표적 내피 세포의 배양을 포함한다. ADCC를 매개하는 초기 단계를 유도시키는 다중환형 융합 폴리펩티드의 능력은 Fc γ 수용체 발현 세포, 예컨대 Fc γ RI 및/또는 Fc γ RIIA를 재조합적으로 발현하는 세포 또는 NK 세포 (본질적으로 Fc γ RIIIA를 발현함)와의 결합을 측정하여 조사한다. 바람직한 일 구체예에서 NK 세포 상의 Fc γ R 의 결합을 측정한다.

[0098] 용어 "에 결합" 은 표적에 대한 결합 부위의 결합, 예를 들어 개별 항원에 대한 항체 중쇄 가변 도메인 및 항체 경쇄 가변 도메인 (VH/VL-쌍)을 포함하는 항체 결합 부위의 결합을 의미한다. 이러한 결합은 예를 들어, BIAcore® 어세이 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)를 사용하여 결정할 수 있다.

[0099] 예를 들어, BIAcore® 어세이에 관한 가능한 일 구체예에서 항원은 표면에 결합되고 항체 결합 부위의 결합은 표면 플라스몬 공명 (SPR)으로 측정된다. 결합의 친화성은 용어 k_a (결합 상수: 복합체를 형성하는 결합에 대한 속도 상수), k_d (해리 상수: 복합체의 해리에 대한 속도 상수), 및 KD (k_d/k_a)로 정의된다. 대안적으로, SPR 센서그램의 결합 신호는 공명 신호 높이 및 해리 거동에 대해서, 기준 반응 신호와 직접적으로 비교할 수 있다.

[0100] 용어 "BiFab" 는 2쌍의 V_1-C_1/V_2-C_2 를 포함하는 분자를 나타내고 여기서 V는 항체 가변 도메인을 나타내며 C는 항체 불변 도메인을 나타내고, 서로 회합되어 있다. 예를 들어, 쌍은 VH_1-CH1/VL_1-CL 및 VH_2-CH3_1/VL_2-CH3_2 일 수 있다. 마찬가지로, 용어 "TriFab" 은 3쌍의 V_1-C_1/V_2-C_2 를 포함하는 분자를 나타내고 여기서 V는 항체 가변 도메인을 나타내며 C는 항체 불변 도메인을 나타내고, 서로 회합되어 있다. 예를 들어, 쌍은 VH_1-CH1/VL_1-CL , VH_2-CH1/VL_2-CL 및 VH_3-CH3_1/VL_3-CH3_2 일 수 있다.

[0101] 용어 "CH1 도메인" 은 대략 EU 위치 118 에서 EU 위치 215 (EU 번호지정 체계)로 연장된 항체 중쇄 폴리펩티드의 일부분을 의미한다. 일 구체예에서 CH1 도메인은 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKV (SEQ ID NO: 01)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0102] 용어 "CH2 도메인" 은 대략 EU 위치 231에서 EU 위치 340 (카밧에 따른 EU 번호지정 체계)으로 연장된 항체 중쇄 폴리펩티드의 일부분을 의미한다. 일 구체예에서 CH2 도메인은 APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVWDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQESTYRW SVLTVLHQDW LNKKEYCKV SNKALPAPIE KTISKAK (SEQ ID NO: 02)의 아미노산 서열을 포함한다. CH2 도메인은 다른 도메인과 밀접하게 쌍형성하지 않는다는 점에서 독특하다. 대신에, 2개의 N-연결된 분지형 탄수화물 사슬이 온전한 천연 Fc-영역의 2개 CH2 도메인 사이에 개재된다. 탄수화물은 도메인-도메인 쌍형성에 대한 대체물을 제공할 수 있고 CH2 도메인을 안정화시키는데 도움을 줄 수 있을 것으로 추측되었다. Burton, Mol. Immunol. 22 (1985) 161-206.

[0103] 용어 "CH3 도메인" 은 대략 EU 위치 341에서 EU 위치 446으로 연장된 항체 중쇄 폴리펩티드의 일부분을 의미한다. 일 구체예에서 CH3 도메인은 GQPREPQVYT LPSSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSP (SEQ ID NO: 03)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0104] 본원에서 사용되는 용어 "세포독성제" 는 세포 기능을 억제 또는 방해하고 및/또는 세포 사멸 또는 파괴를 야기시키는 물질을 의미한다. 세포독성제는 제한없이, 방사능 동위원소 (예를 들어, At-211, I-131, I-125, Y-90, Re-186, Re-188, Sm-153, Bi-212, P-32, Pb-212 및 Lu의 방사능 동위원소); 화학요법제 또는 약물 (예를 들어, 메토트렉세이트, 아드리아마이신, 빈카 알칼로이드류 (빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드), 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로람부실, 다우노루비신 또는 다른 인터칼레이팅제 (intercalating agent)); 성장 억제제; 효소 및 이의 단편 예컨대 핵분해 효소; 항생제; 그의 단편 및/또는 변이체를 포함하는, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적 활성 독소 또는 소형 분자 독소와 같은 독소; 및 하기에 개시된 다양한 항종양제 또는 항암제를 포함한다.

[0105] 용어 "보체-의존적 세포독성 (CDC)" 은 보체의 존재 하에서 본원에 보고된 바와 같은 항체의 Fc-영역에 의해 유

도되는 세포의 용해를 의미한다. CDC는 일 구체예에서 보체의 존재 하에서 본원에 보고된 바와 같은 다중환형 융합 폴리펩티드로 표적 발현 인간 내피 세포를 처리하여 측정된다. 세포는 일 구체예에서 칼세인으로 표지된다. CDC는 30 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 20% 또는 그 이상의 표적 세포의 용해를 유도하면 확인된다. 보체 인자 C1q 에 대한 결합은 ELISA 에서 측정될 수 있다. 이러한 어세이에서 이론적으로 ELISA 플레이트는 농도 범위의 다중환형 융합 폴리펩티드로 코팅되고, 여기서 정제된 인간 C1q 또는 인간 혈청을 첨가한다. C1q 결합은 C1q 에 대해 유도되는 항체, 이후 퍼옥시다아제-표지된 접합체에 의해 검출된다. 결합의 검출 (최대 결합 B_{max}) 은 퍼옥시다제 기질 ABTS® (2,2'-아지노-디-[3-에틸벤즈티아졸린-6-술포네이트]) 에 대한 405 nm (OD405)에서의 광학 밀도로서 측정된다.

[0106] "이펙터 기능"은 항체의 Fc-영역에 기인하는 그들의 생물학적 활성을 의미하고, 이는 유래되는 항체 클래스에 따라 다양하다. 항체 이펙터 기능의 예에는: C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성 (CDC); Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC); 식균작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B-세포 수용체)의 하향 조절; 및 B-세포 활성화를 포함한다.

[0107] Fc 수용체 결합 의존적 이펙터 기능은 조혈 세포 상 특화된 세포 표면 수용체인, Fc 수용체 (FcR)와 항체의 Fc-영역의 상호작용에 의해 매개될 수 있다. Fc 수용체는 면역글로불린 슈퍼패밀리에 속하며, 면역 복합체의 식균작용에 의한 항체-코팅된 병원체의 제거, 및 항체 의존적 세포 매개 세포독성 (ADCC)을 통해, 적혈구와 Fc-영역을 나타내는 다양한 기타 세포 표적 (예를 들어 종양 세포)의 용해 둘 모두를 매개하는 것으로 나타난다 (예를 들어, Van de Winkel, J.G. and Anderson, C.L., J. Leukoc. Biol. 49 (1991) 511-524 참조). FcR 은 면역글로불린 이소타입에 대한 그들의 특이성으로 정의되고: IgG 유형 Fc-영역에 대한 Fc 수용체는 Fc γ R로 지칭된다. Fc 수용체 결합은 예를 들어, Ravetch, J.V. and Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492; Capel, P.J., et al., Immunomethods 4 (1994) 25-34; de Haas, M., et al., J. Lab. Clin. Med. 126 (1995) 330-341; Gessner, J.E., et al., Ann. Hematol. 76 (1998) 231-248 에 기재되어 있다.

[0108] IgG 유형 항체의 Fc-영역에 대한 수용체 (Fc γ R)의 가교는 식균작용, 항체-의존적 세포의 세포독성, 및 염증성 매개인의 방출을 비롯하여, 면역 복합체 청소 및 항체 생산의 조절을 포함하는 광범위하게 다양한 이펙터 기능을 촉발시킨다. 인간에서, 3가지 클래스의 Fc γ R 이 특징구명되었고, 하기와 같다:

[0109] - Fc γ RI (CD64)은 높은 친화성으로 단량체 IgG 에 결합하고 마크로파지, 단핵구, 호중구 및 호산구 상에서 발현된다. Fc-영역 IgG 에서 아미노산 잔기 E233-G236, P238, D265, N297, A327 및 P329 (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정) 중 적어도 하나의 변형은 Fc γ RI 와의 결합을 감소시킨다. IgG1 및 IgG4 로 치환된, 위치 233-236 에서의 IgG2 잔기는 Fc γ RI 에 대한 결합을 10^3 -배로 감소시켰으며, 항체-민감화 적혈구 세포에 대한 인간 단핵구 반응을 제거하였다 (Armour, K.L., et al., Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2613-2624).

[0110] - Fc γ RII (CD32) 는 중간 내지 낮은 친화성으로 복합 IgG 에 결합하고 광범위하게 발현된다. 이러한 수용체는 2개의 서브-타입, Fc γ RIIA 및 Fc γ RIIB 로 분류될 수 있다. Fc γ RIIA 는 사멸에 관련되는 많은 세포 (예를 들어 대식세포, 단핵구, 호중구) 상에서 발견되며 사멸 과정을 활성화시킬 수 있는 것으로 보인다. Fc γ RIIB 는 억제 과정에서 역할을 하는 것으로 보이고 B 세포, 대식세포 및 비만 세포 및 호산구 상에서 발견된다. B 세포 상에서 이것은 추가의 면역글로불린 생산 및 예를 들어 IgE 클래스로의 이소타입 전환을 억제하는 기능을 하는 것으로 보인다. 대식세포 상에서, Fc γ RIIB 는 Fc γ RIIA 를 통해 매개되는 바와 같이 식균작용을 저해하는 작용을 한다. 호산구 및 비만 세포 상에서 B-형태는 그의 별개 수용체에 대한 IgE 결합을 통해 이들 세포의 활성화를 억제하는 것을 도울 수 있다. Fc γ RIIA 에 대한 감소된 결합은 예를 들어 아미노산 잔기 E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, R292 및 K414 (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정) 중 적어도 하나에서 돌연변이를 갖는 IgG Fc-영역을 포함하는 항체에 대해 발견된다.

[0111] - Fc γ RIII (CD16) 은 중간 내지 저친화성으로 IgG 에 결합하며 2개 유형으로서 존재한다. Fc γ RIIIA 는 NK 세포, 대식세포, 호산구 및 일부 단핵구 및 T 세포 상에서 발견되며 ADCC 를 매개한다. Fc γ RIIIB 는 호중구 상에서 고도로 발현된다. Fc γ RIIIA 에 대한 감소한 결합이 예를 들어 아미노산 잔기 E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, S239, E269, E293, Y296, V303, A327, K338 및 D376 (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정) 중 적어도 하나에서 돌연변이를 갖는 IgG Fc-영역을 포함하는 항체에 대해 발견된다.

[0112] Fc 수용체에 대한 인간 IgG1 상의 결합 부위의 맵핑, 상술한 돌연변이 위치, 및 Fc γ RI 및 Fc γ RIIA 에 대한 결합 측정 방법이 Shields, R.L., et al. J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604 에 기재되어 있다.

- [0113] 작용제, 예를 들어 약학 제형의 "유효량"은 바람직한 치료적 또는 예방법적 결과를 획득하는데 필요한 시간 기간 동안 및 용량에서, 유효한 양을 의미한다.
- [0114] 용어 "에피토프"는 표적과 결합 부위 사이의 특이적 결합에 요구되는 소정 표적의 일부분을 의미한다. 에피토프는 연속적일 수 있으며, 즉 표적에 존재하는 인접한 구조적 요소에 의해 형성될 수 있고, 또는 불연속적일 수 있는데, 즉 표적의 1차 서열, 예컨대 표적으로서 단백질의 아미노산 서열에서 상이한 위치이지만, 표적이 천연 환경, 예컨대 체액에서 채택하는 3차원 구조에서는 밀접하게 가까운 구조적 요소에 의해 형성된다.
- [0115] 본원에서 사용되는 용어 "Fc 수용체"는 수용체와 회합된 세포질 (cytoplasmatic) ITAM 서열의 존재에 의해 특징지어지는 활성화 수용체를 나타낸다 (예를 들어, Ravetch, J.V. and Bolland, S., Annu. Rev. Immunol. 19 (2001) 275-290 참조). 이러한 수용체는 Fc γ RI, Fc γ RIIA 및 Fc γ RIIIA 이다. 용어 "Fc γ R에 대해 결합하지 않음"은 10 μ g/ml의 항체 농도에서 본원에서 보고되는 바와 같은 항체의 NK 세포에 대한 결합이 WO 2006/029879에서 보고된 바와 같이 항-OX40L 항체 LC.001에 대해 발견된 결합의 10% 또는 그 이하인 것을 나타낸다.
- [0116] IgG4는 감소된 FcR 결합을 나타내지만, 다른 IgG 서브클래스의 항체는 강력한 결합을 나타낸다. 그러나, Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (Fc 탄수화물 손실), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 및 His435는 변경되는 경우 FcR 결합을 감소시키는데 제공하는 잔기이다 (Shields, R.L., et al. J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604; Lund, J., et al., FASEB J. 9 (1995) 115-119; Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324; and EP 0 307 434).
- [0117] 용어 "힌지 영역"은 야생형 항체 중쇄에서 CH1 도메인 및 CH2 도메인을 연결하는, 예를 들어 카바트의 EU 번호 체계에 따른 약 위치 216에서 약 위치 230까지, 또는 카바트의 EU 번호 체계에 따른 약 위치 226에서 약 위치 230까지의 항체 중쇄 폴리펩티드의 일부분을 의미한다. 다른 IgG 서브클래스의 힌지 영역은 IgG1 서브클래스 서열의 힌지-영역 시스테인 잔기와와의 정렬에 의해 결정될 수 있다.
- [0118] 힌지 영역은 보통은 동일한 아미노산 서열을 갖는 2개의 폴리펩티드로 이루어진 이량체 분자이다. 힌지 영역은 일반적으로 약 25개 아미노산 잔기를 포함하고 회합된 표적 결합 부위가 독립적으로 움직일 수 있도록 유연하다. 힌지 영역은 3개의 도메인: 상부, 중간, 및 하부 힌지 도메인으로 다시 나눌 수 있다 (예를 들어, Roux, et al., J. Immunol. 161 (1998) 4083 참조).
- [0119] 용어 "전체 길이 항체", "온전한 항체", 및 "전체 항체"는 천연 항체 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖는 항체를 의미하고자 본원에서 상호교환적으로 사용된다.
- [0120] 용어 "숙주 세포", "숙주 세포주" 및 "숙주 세포 배양물"은 상호교환적으로 사용되고 이러한 세포의 자손을 포함하는, 외인성 핵산이 도입된 세포를 의미한다. 숙주 세포는 초대 형질전환된 세포 및 계대수와 무관하게 이로부터 유래된 자손을 포함하는 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"를 포함한다. 자손은 부모 세포와 핵산 함량이 완전하게 동일하지 않을 수 있으나, 돌연변이를 함유할 수 있다. 본래의 형질전환된 세포에서 스크리닝된 또는 선별된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이체 자손이 본원에 포함된다.
- [0121] "면역접합체"는 세포독성제를 포함하지만 이에 제한되지 않는, 하나 이상의 분자 (들)에 접합된 본원에 보고된 바와 같은 다중특이적 항체이다.
- [0122] "개체" 또는 "대상체"는 포유동물이다. 포유동물은 제한없이, 가축 (예를 들어, 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류 (예를 들어, 인간 및 인간 이외의 영장류 예컨대 원숭이), 토끼 및 설치류 (예를 들어, 마우스 및 래트)를 포함한다. 일정 구체예에서, 개체 또는 대상체는 인간이다.
- [0123] "단리된" 항체는 이의 자연 환경의 성분으로부터 분리된 것이다. 일부 구체예에서, 항체는 예를 들어, 전기영동적 (예를 들어, SDS-PAGE, 등전위 초점 (IEF), 모세관 전기영동) 또는 크로마토그래피 (예를 들어, 크기-배제 크로마토그래피 또는 이온 교환 또는 역상 HPLC)에 의해 측정되는 바와 같이 95% 또는 99% 초과로 순도로서 정제된다. 항체 순도의 측정 방법에 대한 검토를 위해, 예를 들어, Flatman, S. et al., J. Chrom. B 848 (2007) 79-87를 참조한다.
- [0124] "단리된" 핵산은 그의 자연적 환경의 성분으로부터 분리된 핵산 분자를 나타낸다. 단리된 핵산은 대개는 핵산 분자를 함유하는 세포에 함유된 핵산 분자를 포함하지만, 핵산 분자는 염색체외에 또는 이의 천연 염색체 위치와 상이한 염색체 위치에 존재한다.
- [0125] 용어 "중쇄"는 (N-말단에서 C-말단 방향으로) 중쇄 가변 도메인 (VH), 항체 불변 도메인 1 (CH1), 힌지 영역,

항체 불변 도메인 2 (CH2) 및 항체 불변 도메인 3 (CH3)을 포함하는 천연 IgG 항체의 더 긴 폴리펩티드 사슬을 나타낸다. 항체 또는 Fc-영역의 "클래스"는 중쇄 또는 이의 단편이 보유하는 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을 의미한다. 5가지 주요 클래스: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 이들 중 몇몇은 서브클래스 (이소타입), 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2로 더 나뉠 수 있다. 상이한 클래스의 면역글로불린에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 라고 지칭된다.

[0126] 용어 "경쇄"는 (N- 내지 C- 말단 방향으로) 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 경쇄 불변 도메인 (CL)을 포함하는 천연 IgG 항체의 더 짧은 폴리펩티드 사슬을 나타낸다. 항체의 경쇄는 이의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기반으로 카파 (κ) 및 람다 (λ) 라고 불리는 2개 유형 중 하나로 지정될 수 있으며, 인간 카파 경쇄 불변 도메인에 대한 SEQ ID NO: 04 및 인간 람다 경쇄 불변 도메인에 대한 SEQ ID NO: 05을 참조한다.

[0127] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동종의 항체의 집단으로부터 얻어진 항체를 나타내며, 즉, 집단을 포함하는 개별 항체는 동일하고 및/또는 동일한 에피토프에 결합하며, 그 예외는, 예를 들어, 자연 발생적 돌연변이를 함유하거나 또는 모노클로날 항체 제제의 생산 동안 발생하는 가능한 변이체 항체이며, 그러한 변이체는 일반적으로 소량으로 존재한다. 통상 상이한 결정부 (에피토프)에 대해 유도된 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와 반대로, 모노클로날 항체 제제의 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정부에 대해 유도된다. 따라서, 수식어 "모노클로날"은 실질적으로 동종의 항체 집단으로부터 얻어진 항체의 특징을 나타내며, 임의의 특별한 방법에 의한 항체의 생산을 요구하는 것으로 여겨져서는 안된다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 하이브리도마 방법, 재조합 DNA 방법, 파지-디스플레이 방법, 및 인간 면역글로불린 유전자좌의 전부 또는 일부를 함유하는 트랜스제닉 동물을 이용하는 방법을 포함하나 그에 제한되지 않는 다양한 기술에 의해 제조될 수 있으며, 이러한 방법 및 기타 예시적 모노클로날 항체 제조 방법은 본원에 기재되어 있다.

[0128] "노출된 다중특이적 항체"는 모이어티 (예를 들어, 세포독성 모이어티) 또는 방사능표지에 접합되지 않은 다중 특이적 항체를 말한다. 노출된 다중특이적 항체는 약학 제형에 존재할 수 있다.

[0129] "고유성의 항체"는 다양한 구조를 가진 자연 발생적 면역글로불린 분자를 말한다. 예를 들어, 고유의 IgG 항체는 디설피드-결합된 2개의 동일한 경쇄 및 2개의 동일한 중쇄로 구성된, 약 150,000 달톤의 헤테로사량체성 당단백질이다. N-말단에서 C-말단으로, 각각의 중쇄는 가변 중쇄 도메인 또는 중쇄 가변 도메인으로 불리 는 가변 영역 (VH), 후속하여 3개의 불변 도메인 (CH1, CH2 및 CH3)을 가지고, 이로 인해 제1 및 제2 불변 도메인 사이에 힌지 영역이 위치한다. 유사하게, N-말단에서 C-말단으로, 각각의 경쇄는 가변 경쇄 도메인 또는 경쇄 가변 도메인이라고도 불리는 가변 영역 (VL), 후속하여 불변 경쇄 (CL) 도메인을 갖는다. 항체의 경쇄는 이의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기반으로 카파 (κ) 및 람다 (λ) 라고 불리는, 2개 유형 중 하나로 지정 될 수 있다.

[0130] 용어 "패키지 삽입부"는 치료 제품의 사용에 관한 증상, 용법, 용량, 투여, 병용 요법, 금기 사항 및/또는 경고에 대한 정보를 함유하는, 치료 제품의 상업적 패키지에 통상적으로 포함되는 지시서를 의미하는데 사용된다.

[0131] 용어 "파라토프"는 표적과 결합 부위 간 특이적 결합에 요구되는 소정 항체 분자의 부분을 의미한다. 파라 토프는 연속적일 수 있는데, 즉 결합 부위에 존재하는 인접한 아미노산 잔기에 의해 형성될 수 있고, 또는 불연 속적일 수 있으며, 다시 말해 아미노산 잔기의 CDR의 아미노산 서열에서처럼, 아미노산 잔기의 1차 서열에서 상 이한 위치이지만, 결합 부위가 채택하는, 3차 구조에서 밀접하게 가까운, 아미노산 잔기에 의해 형성될 수 있다.

[0132] 용어 "펩티드 링커"는 천연 및/또는 합성 기원의 링커를 의미한다. 펩티드 링커는 아미노산의 선형 사슬로 이루어지며 여기서 20개의 천연 발생 아미노산은 펩티드 결합에 의해 연결된 단량체 빌딩 블록이다. 이 사 슬은 1 내지 50개 아미노산 잔기, 바람직하게는 1 내지 28개 아미노산 잔기, 특히 바람직하게는 3 내지 25개 아 미노산 잔기의 길이를 갖는다. 펩티드 링커는 천연 발생 폴리펩티드의 서열 또는 반복적인 아미노산 서열을 함유할 수 있다. 펩티드 링커는 환형 융합 폴리펩티드의 도메인이, 이 도메인이 올바르게 폴딩될 수 있고 적절하게 존재할 수 있도록 함으로써, 그들의 생물학적 활성을 수행할 수 있도록 보장하는 기능을 갖는다. 바람직하게 펩티드 링커는 글리신, 글루타민, 및/또는 세린 잔기가 풍부하도록 지정된 "합성 펩티드 링커" 이다. 이들 잔기는 예를 들어, 최대 5개 아미노산의 작은 반복 단위, 예컨대 GGGG (SEQ ID NO: 06), GGGG (SEQ ID NO: 07), QQQG (SEQ ID NO: 08), QQQG (SEQ ID NO: 09), SSSG (SEQ ID NO: 10) 또는 SSSG (SEQ ID NO: 11)로 배열된다. 이러한 소형 반복 단위는 예를 들어 (GGG)2 (SEQ ID NO: 12), (GGG)3 (SEQ ID NO:

13), (GGGS)4 (SEQ ID NO: 14), (GGGS)5 (SEQ ID NO: 15), (GGGS)2 (SEQ ID NO: 16), (GGGS)3 (SEQ ID NO: 19), GG(GGGS)3 (SEQ ID NO: 20) 및 (GGGS)6 (SEQ ID NO: 21)와 같이, 다량체 단위를 형성하도록 2회 내지 5회 반복될 수 있다. 다량체 단위의 아미노-말단 및/또는 카복시-말단에서, 최대 6개의 추가적인 임의의, 천연 발생 아미노산이 첨가될 수 있다. 다른 합성 펩티드 링커는 예를 들어 링커 GSSSSSSSSSSSSSG (SEQ ID NO: 22)에서의 세틴처럼, 10 내지 20회 반복되는 단일 아미노산으로 구성되고, 아미노-말단 및/또는 카복시-말단에, 최대 6개의 추가적인 임의의 천연 발생 아미노산을 포함할 수 있다. 모든 펩티드 링커는 핵산 분자에 의해 인코딩될 수 있으며 따라서 재조합적으로 발현될 수 있다. 링커는 그 자체가 펩티드이므로, 항원-항원 펩티드가 2개 아미노산 사이에 형성되는 펩티드 결합을 통해 링커에 연결된다.

[0133] 용어 "약학 제형"은 그에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성을 유효하게 하는 형태이고, 제형이 투여되는 대상체에게 허용불가하게 독성인 추가 성분을 함유하지 않는 조제물을 의미한다.

[0134] "약학적으로 허용가능한 담체"는 대상체에게 비독성인, 약학 제형 중 활성 성분 이외의 성분을 나타낸다. 약학적으로 허용가능한 담체는 완충제, 부형제, 안정화제 또는 보존제를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0135] 본원에서 사용되는 바와 같은, "치료" (및 이의 문법적 변형 예컨대 "치료하다" 또는 "치료하는")는 치료하는 개체의 자연적인 과정을 변경시키려고 시도하는 임상적 중재를 의미하고, 예방법을 위해서 또는 임상 병리학 과정 동안 수행될 수 있다. 치료의 바람직한 효과는 비제한적으로, 질환의 발생 또는 재발의 예방, 증상의 경감, 질환의 임의의 직접 또는 간접적 병리학적 결과의 감소, 전이의 예방, 질환의 진행 속도의 감소, 질환 상태의 개선 또는 일시적 완화, 및 차도 또는 개선된 예후를 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 항체는 질환의 발생을 지연시키거나 또는 질환의 진행을 지체시키는데 사용된다.

[0136] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체의 항원에 대한 결합에 관여하는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 나타낸다. 천연 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인 (각각, VH 및 VL)은 일반적으로 유사한 구조를 갖는데, 각각의 도메인은 4개의 보존된 프레임워크 영역 (FR) 및 3개의 초가변 영역 (HVR)을 포함한다 (예를 들어, Kindt, T.J. et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), page 91 참조). 단일 VH 또는 VL 도메인은 항원-결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다. 또한, 특정 항원에 결합하는 항체는 각각 상보성 VL 또는 VH 도메인의 라이브러리를 스크리닝하기 위해서 항원에 결합하는 항체로부터의 VH 또는 VL 도메인을 사용하여 단리될 수 있다 (예를 들어, Portolano, S., et al., J. Immunol. 150 (1993) 880-887; Clackson, T., et al., Nature 352 (1991) 624-628 참조).

[0137] 본원에서 사용되는, 용어 "백터"는 연결된 다른 핵산을 전파시킬 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 이 용어는 자기-복제 핵산 구조로서의 백터를 비롯하여 그에 도입된 숙주 세포의 게놈에 통합되는 백터를 포함한다. 일정 백터는 그들이 작동적으로 연결된 핵산의 발현을 유도할 수 있다. 이러한 백터는 본원에서 "발현 백터"로 언급된다.

[0138] 본 발명은 상이한 구조 및 특이성의 폴리펩티드를 사용하여 하기에서 예시된다. 이들은 본 발명을 예시하기 위해서만 제시된다. 이것은 제한으로서 해석되어서는 안된다. 진정한 범위는 청구항에 기재된다.

[0139] II. 본원에 보고되는 다중특이적 항체

[0140] 본원에는 각각 VH/VL-쌍 및 이에 의한 제1 및 제2 결합 부위를 포함하는 2개의 환형 융합 폴리펩티드를 포함하고, 이로 인해 제3 VH/VL-쌍 및 이에 의한 제3 결합 부위가 2개의 환형 융합 폴리펩티드의 회합에 의해 형성되는 다중특이적 항체를 보고한다.

[0141] 본 발명은 적어도 부분적으로, (전체 길이) 중쇄의 C-말단에 대한 경쇄 가변 도메인, 또는 전체 길이 경쇄에 대한 중쇄 가변 도메인의 융합이, 그 결과로서 동일한 폴리펩티드의 각각의 VH 및 VL 도메인 (VH/VL-쌍)을 포함하는 기능성 결합 부위의 형성을 일으킨다는 발견을 기반으로 하며, 즉, 단일 폴리펩티드 사슬 내 가변 경쇄 도메인 및 가변 중쇄 도메인의 쌍이 기능성 VH/VL-쌍을 형성하여 사슬내 환형화에 의해 기능성 결합 부위를 형성한다는 발견을 기반으로 한다. 이러한 환형 폴리펩티드에서 N-말단 부분은 결합 도메인의 제1 부분을 포함하고 C-말단 부분은 결합 도메인의 제2 부분을 포함한다. 결합 도메인의 제1 부분 및 결합 도메인의 제2 부분은 (서로 회합되어) 완전하거나 또는 기능성 결합 부위를 형성한다. 이로 인해 폴리펩티드는 환형화된다.

[0142] 본 발명은 적어도 부분적으로 2개의 환형 융합 폴리펩티드를 포함하는 다중특이적 항체가 제공될 수 있고, 여기서 각각의 환형 융합 폴리펩티드는 VH/VL-쌍에 의해 형성된 기능성 결합 부위를 포함하고, 추가의 결합 부위는 2개의 환형 융합 폴리펩티드의 회합에 의해 형성된다.

- [0143] 본 발명은 적어도 부분적으로, 개별 항체 가변 도메인을 제3 결합 도메인의 일부 및 이중이량체화 도메인의 융합 폴리펩티드의 각각의 N-말단 및 C-말단에 연결시키는 펩티드 링커들의 길이를 변형시킴으로써, 최종 다중특이적 항체 내 환형 융합 폴리펩티드에 의해 형성된 2 개 결합 부위의 지오메트리/거리를 조정하는 것이 가능하다는 발견을 기반으로 한다.
- [0144] 본 발명은 적어도 부분적으로, 이량체, 즉 이중환형, 융합 폴리펩티드의 결합 지오메트리가 제1/제3 펩티드 링커 및 제2/제4 펩티드 링커의 길이 (즉, 링커 길이 비율)에 따라서 변화될 수 있다는 발견을 기반으로 한다. 이로 인해 서로에 대해 2개의 Fab-유사 결합 아암의 지오메트리를 고정시키는 것이 가능하다.
- [0145] 본원에는 3개의 항원 결합 부위를 포함하는 다중특이적 항체를 개시하고, 여기서
- [0146] a) 제1 항원 결합 부위는 제1 결합 도메인의 제1 부분, 제1 결합 도메인의 제2 부분 및 제3 결합 도메인의 제1 부분을 포함하는 제1 환형 융합 폴리펩티드에 의해 형성되고, 여기서
- [0147] - 제1 결합 도메인의 제1 부분은 직접적으로 또는 제1 펩티드 링커를 통해 제3 결합 도메인의 제1 부분의 N-말단에 융합되고,
- [0148] - 제1 결합 도메인의 제2 부분은 직접적으로 또는 제2 펩티드 링커를 통해 제3 결합 도메인의 제1 부분의 C-말단에 융합되고,
- [0149] - 제1 결합 도메인의 제1 부분은 중쇄 Fab 단편 (VH₁-CH1) 또는 경쇄 Fab 단편 (VL₁-CL)이고, 제1 결합 도메인의 제1 부분이 중쇄 Fab 단편이거나 그 반대인 경우, 제1 결합 도메인의 제2 부분은 경쇄 Fab 단편이고,
- [0150] - 제1 결합 도메인의 제1 부분 및 제1 결합 도메인의 제2 부분은 서로 회합되어 제1 항원 결합 부위를 형성하며,
- [0151] b) 제2 항원 결합 부위는 제2 환형 융합 폴리펩티드에 의해 형성되고, 제2 결합 도메인의 제1 부분, 제2 결합 도메인의 제2 부분 및 제3 결합 도메인의 제2 부분을 포함하고, 여기서
- [0152] - 제2 결합 도메인의 제1 부분은 직접적으로 또는 제3 펩티드 링커를 통해 제3 결합 도메인의 제2 부분의 N-말단에 융합되고,
- [0153] - 제2 결합 도메인의 제2 부분은 직접적으로 또는 제4 펩티드 링커를 통해 제3 결합 도메인의 제2 부분의 C-말단에 융합되고,
- [0154] - 제2 결합 도메인의 제1 부분은 중쇄 Fab 단편 (VH₂-CH1) 또는 경쇄 Fab 단편 (VL₂-CL)이고, 제2 결합 도메인의 제1 부분이 중쇄 Fab 단편이거나 그 반대인 경우 제2 결합 도메인의 제2 부분은 경쇄 Fab 단편이고,
- [0155] - 제2 결합 도메인의 제1 부분 및 제2 결합 도메인의 제2 부분은 서로 회합되어 제2 항원 결합 부위를 형성하며,
- [0156] c) 제3 항원 결합 부위는 제3 결합 도메인의 제1 부분 및 제3 결합 도메인의 제2 부분에 의해 형성되고, 여기서
- [0157] - 제3 결합 도메인의 제1 부분은 가변 중쇄-CH3 도메인 융합 폴리펩티드 (VH₃-CH3) 또는 가변 경쇄-CH3 도메인 융합 폴리펩티드 (VL₃-CH3)이고,
- [0158] - 제3 결합 도메인의 제2 부분은 제1 환형 융합 폴리펩티드에서 제2 결합 도메인의 제1 부분이 가변 경쇄-CH3 도메인 융합 폴리펩티드이거나 그 반대인 경우 가변 중쇄-CH3 도메인 융합 폴리펩티드이고,
- [0159] - 제3 결합 도메인의 제1 부분 및 제3 결합 도메인의 제2 부분은 서로 회합되어 제3 항원 결합 부위를 형성하고,
- [0160] 여기서 2 개의 불변 중쇄 도메인 3 (CH3)은 하기에 의해 이중이량체화를 촉진하도록 변경되며:
- [0161] i) 원래 아미노산 잔기보다 더 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 적어도 하나의 원래 아미노산 잔기를 치환함으로써 CH3 도메인 중 하나에서 돌기의 생성, 및 CH3 도메인 중 하나에서 생성된 돌기가 CH3 도메인의 다른 하나에서 생성된 공동에 위치할 수 있도록, 적어도 하나의 원래 아미노산 잔기를 원래 아미노산 잔기보다 더 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 치환함으로써 CH3 도메인 중 다른 하나에서 공동의 생성, 또는
- [0162] CH3 도메인 중 하나에서 적어도 하나의 원래 아미노산 잔기를 양전하 아미노산으로 치환하고, CH3 도메인 중 다

른 하나에서 적어도 하나의 원래 아미노산 잔기를 음전하 아미노산으로 치환, 또는

- [0163] ii) CH3 도메인 사이에 디설피드 결합이 형성되도록 각각의 CH3 도메인에 적어도 하나의 시스테인 잔기의 도입, 또는
- [0164] iii) i) 및 ii)의 변형,
- [0165] 여기서 다중특이적 항체는 불변 중쇄 도메인 2 (CH2) 및 힌지 영역이 없다.
- [0166] 일 구체예에서 다중특이적 항체는 3 개의 항원 결합 부위를 포함하고, 여기서
- [0167] a) 제1 항원 결합 부위는 제1 환형 융합 폴리펩티드의 제1 항체 중쇄 가변 도메인 (VH₁) 및 제 1 항체 경쇄 가변 도메인 (VL₁) 쌍 (VH₁/ VL₁-쌍)에 의해 형성되고, 여기서
- [0168] - VH₁은 제1 중쇄 Fab 단편 (VH₁-CH1)의 일부이고 VL₁은 제1 경쇄 Fab 단편 (VL₁-CL)의 일부이며,
- [0169] - VH₁-CH1은 제1 펩티드 링커를 통해 제1 가변 도메인-링커-항체 불변 도메인 3 융합 폴리펩티드 (V₃-L-CH3)의 N-말단 또는 C-말단에 접합되고 VL₁-CL은 제2 펩티드 링커를 통해 제1 V₃-CH3의 각각의 다른 말단에 접합되며,
- [0170] - VH₁-CH1 및 VL₁-CL은 서로 회합되어 있으며 VH₁/VL₁- 쌍을 형성하고,
- [0171] b) 제2 항원 결합 부위는 제2 환형 융합 폴리펩티드의 제2 항체 중쇄 가변 도메인 (VH₂) 및 제2 항체 경쇄 가변 도메인 (VL₂) 쌍 (VH₂/VL₂-쌍)에 의해 형성되고, 여기서
- [0172] - VH₂은 제2 중쇄 Fab 단편 (VH₂-CH1)의 일부이고, VL₂은 제2 경쇄 Fab 단편 (VL₂-CL)의 일부이며,
- [0173] - VH₂-CH1은 제3 펩티드 링커를 통해 제2 가변 도메인-링커-항체 불변 도메인 3 융합 폴리펩티드 (V₃-L-CH3)의 N-말단 또는 C-말단에 접합되고 VL₂-CL은 제4 펩티드 링커를 통해 제2 V₃-CH3의 각각의 다른 말단에 접합되며,
- [0174] - VH₂-CH1 및 VL₂-CL은 서로 회합되어 있으며 VH₂/VL₂- 쌍을 형성하고,
- [0175] c) 제3 항원 결합 부위는 제1 V₃-L-CH3 및 제2 V₃-L-CH3에 의해 형성되고, 여기서
- [0176] - 제1 V₃-L-CH3은 가변 중쇄 도메인-링커-항체 불변 도메인 3 융합 폴리펩티드 (VH₃-L-CH3) 또는 가변 경쇄 도메인-링커-항체 불변 도메인 3 융합 폴리펩티드 (VL₃-L-CH3)일 수 있으며,
- [0177] - 제2 V₃-L-CH3은 제1 V₃-L-CH3이 가변 경쇄 도메인-링커-항체 불변 도메인 3 융합 폴리펩티드이거나 또는 그 반대인 경우 가변 중쇄 도메인-링커-항체 불변 도메인 3 융합 폴리펩티드이고,
- [0178] - VH₃-L-CH3 및 VL₃-L-CH3은 서로 회합되어 있으며 VH₃/VL₃-쌍을 형성하고,
- [0179] 여기서 2개의 항체 불변 도메인 3 (CH3)은 CH3 중 하나에 돌연변이 T366W 및 임의로 돌연변이 S354C를 도입하고 각각의 다른 CH3에 돌연변이 T366S, L368A 및 Y407V 및 임의로 돌연변이 Y349C를 도입함으로써 이중이량체화를 촉진하도록 변경되고 (카바의 EU 지수에 따른 번호지정),
- [0180] 여기서 다중특이적 항체는 불변 도메인 2 (CH2) 및 힌지 영역이 없다.
- [0181] 제1 및/또는 제2 결합 도메인의 제1 부분 및 이의 각각의 제2 부분은 서로 비공유적으로 또는 공유적으로 회합될 수 있다. 회합이 공유적이면, 이는 펩티드 결합 이외의 결합, 예를 들어 디설피드 결합에 의한다.
- [0182] 본원에 보고되는 바와 같은 다중특이적 항체에 함유된 환형 융합 폴리펩티드는 각각의 단일 사슬 폴리펩티드이다. 단리된 환형 융합 폴리펩티드의 일반 구조는 도 1 에 도시되어 있다.
- [0183] 본원에 보고되는 바와 같은 다중특이적 항체는 제1 환형 융합 폴리펩티드 및 제2 환형 융합 폴리펩티드를 포함하는 이량체 환형 융합 폴리펩티드, 즉 이중환형이며, 여기서 제1 및 제2 환형 융합 폴리펩티드는 동일하거나 상이하다.
- [0184] 본원에 보고되는 바와 같은 다중특이적 항체의 환형 융합 폴리펩티드는 각각의 결합 도메인의 N-말단 및 C-말단 융합된 부분 외에 제3 결합 부위의 일부를 포함하는 코어 영역 뿐 아니라 이중이량체화 도메인을 포함한다.

이 경우 코어 영역의 구조적 특성은 이량체화 기능의 제공이다. 제1 환형 융합 폴리펩티드의 이중이량체화 도메인은 일 구체예에서 적어도 하나의 디설피드 결합에 의해, 적어도 하나의 비-펩티드 결합에 의해 제2 환형 융합 폴리펩티드의 이중이량체화 도메인에 접합될 수 있다.

[0185] 본원의 기본 이중환형 융합 폴리펩티드는 또한 콘톨스바디로 지칭된다. 이중환형 융합 폴리펩티드/콘톨스바디의 일반 구조는 도 2 에 도시되어 있다.

[0186] 정상 IgG 항체와 비교하여, 콘톨스바디는 오직 하나의 사슬을 이용하고 결합 부위 (VH/VL-쌍)를 제공하기 위한 중쇄 및 경쇄는 아니다. 본원에 보고되는 바와 같은 다중특이적 항체에 기반된 콘톨스바디의 특수성은 제3 결합 부위 (VH/VL-쌍)가 2 개의 환형 융합 폴리펩티드의 이량체화에 의해 형성되고 이러한 제3 결합 부위/결합 도메인의 일부가 중쇄 Fab 단편 및 경쇄 Fab 단편 사이에 위치한다.

[0187] 제3 결합 부위가 없는 이량체 환형 융합 폴리펩티드는 본원에 보고된 다중특이적 항체의 기초를 형성하는 이중 환형 융합 폴리펩티드의 특이적 특성을 나타내는데 하기에 사용된다. Fab 단편 외에 또한 단리된 가변 도메인이 결합 부위의 일부로서 사용될 수 있다.

[0188] 이러한 예로 중쇄 Fab 단편 및 경쇄 Fab 단편 사이에 이량체화 도메인으로 "힌지-CH2-CH3" 도메인을 갖는 단쇄 융합 폴리펩티드는 그들의 Fc-영역을 통해 이량체화되고, 여기서 2개의 Fab는 서로에 대해 그들 배향이 고정된다. 대조적으로, 정상 IgG 유형 항체에서 2개의 Fab는 보다 탄력적이며 훨씬 상이하게 배향된다.

[0189] *서로에 대한 2개 결합 부위의 지오메트리는 적용되는 링커의 길이에 의해 콘톨스바디 내에서 조정될 수 있다. 본원에서 보고되는 바와 같은 다중특이적 항체의 기초를 형성하는 이중환형 융합 폴리펩티드 및 IgG 유형의 정상 항체의 결합 부위 간 배향 및 공간적 거리는 도 3 에 도시되어 있다.

[0190] IgG 유형의 통상적인 항체의 결합 부위 간 공간적 거리는 약 80 Å (옴스트롬) 또는 그 이상이다. 본원에서 보고되는 바와 같은 이중환형 융합 폴리펩티드의 결합 부위 간 공간적 거리는 이중환형 융합 폴리펩티드를 형성하는 개별 환형 융합 폴리펩티드에서 펩티드 링커의 길이 및 길이 비율에 따라서 약 20 Å 내지 약 50 Å 일 수 있다. 의도하는 지오메트리에 따라서, 펩티드 링커가 선택된다. 일 구체예에서 제1 내지 제4 펩티드 링커는 SEQ ID NO: 06 내지 SEQ ID NO: 22로 이루어진 펩티드 링커의 군으로부터 서로 독립적으로 선택된다.

[0191] II.1. 이중환형 융합 폴리펩티드로부터 형성된 비교 단일특이성, 2가 항체

[0192] 단일특이적 이중환형 융합 폴리펩티드는 2 개의 환형 융합 폴리펩티드를 포함하고 여기서 각각의 환형 융합 폴리펩티드는 동일 표적 상의 동일 에피토프에 특이적으로 결합하며, 다시 말해서 동일한 결합 부위를 포함한다.

[0193] 예시적인 단일특이적 이중환형 융합 폴리펩티드는 항-Her2 콘톨스바디 (SEQ ID NO: 23의 환형 융합 폴리펩티드를 포함함)이다. 환형 융합 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 벡터로 HEK293 세포를 형질감염시켜 이를 제조하였다.

[0194] 통상의 단백질 A 친화성 크로마토그래피가 배양 상청액의 Fc-영역 함유 부분을 추출하는데 적합한 것으로 확인되었다. 대안적으로, 정제를 위해 GSG 펩티드 링커를 통해 연결된 헥사히스티딘 C-말단 태그 (SEQ ID NO: 24)를 사용할 수 있다.

[0195] 분취용 크기 배제 크로마토그래피를 제2 정제 단계에서 사용하여 대개 환형 융합 폴리펩티드의 고차원 구조물인, 생성물 관련 불순물로부터 환형 융합 폴리펩티드를 분리시켰다 (IgG 유형 항체의 경우처럼 크로마토그램에서도 소량의 응집체가 역시 확인됨) (예를 들어, 도 4 참조). 이러한 구성체의 전형적인 수율은 평균 10 mg/리터이다. 항-Her2 콘톨스바디가 몇몇 배치에서 발현되었다 (0.5 리터 내지 2 리터의 진탕 플라스크 규모). 생성물 품질은 질량 분광법으로 분석하였다 (도 5 참조). 생성물의 정제는 95% 가 넘는 순도 등급으로 확인하였다.

[0196] 항-Her2 콘톨스바디의 결합은 IgG 유형의 통상적인 항-Her2 항체와 비교하여 분자의 친화성 및 화합성을 평가하기 위해 2 가지 상이한 설정으로 표면 플라스몬 공명 (SPR, 예를 들어 BIAcore)을 사용하여 결정하였다.

[0197] 제1 설정 (하기 표의 1: 친화성의 경우)에서, 각각의 항-Her2 콘톨스바디는 SPR 칩 표면에 접합된 항-인간 Fc-영역 항체로 포획하였다. 피분석물로서 Her2 세포의 도메인 (ECD)을 사용하였다. 제2 설정(하기 표의 2: 화합성의 경우)에서, 항-Her2 항체 퍼투주맵 (Perjeta®로 시판됨)을 칩 표면 상에 고정시켰고 그리하여 Her2의 ECD를 포획하였다. 피분석물로서 각각의 콘톨스바디를 사용하였다. IgG 유형 기준 항체 트라스투주맵, 2가 항-Her2 콘톨스바디의 화합성은 피분석물의 농도 시리즈를 사용하여 측정하였다. 양쪽 설정의

기준으로서 항-Her2 항체 트라스투주맙 (Herceptin®로 시판됨)을 사용하였다.

설정	분자	k_a [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_d [s ⁻¹]	t(1/2) [min]	K_D [M]	비율 R_{max} exp./theor.
1	트라스투주맙	6.8E+05	5.2E-04	22.2	7.7E-10	114
1	콘톨스바디	2.1E+05	1.9E-03	6.1	9.1E-09	41
2	트라스투주맙	1.03E+06	6.36E-05	181.7	6.2E-11	101.5
2	콘톨스바디	1.11E+06	6.59E-05	175.4	5.9E-11	102.3

[0198]

[0199]

콘톨스바디는 IgG 유형의 통상적인 항체와 비교하여 훨씬 더 조밀하다.

[0200]

항-Her2 콘톨스바디는 증식 어세이에서 시험되었다. 화학적으로 가교된 트라스투주맙 Fab를 사용한 Scheer 등 (Scheer et al., PLoS One 7 (2012) e51817)과 유사하게, 항-Her2 콘톨스바디는 세포 표면 상에 수용체를 동원시켰고 활성화 신호를 촉진하였다. 수용체 줄기부 도메인 상에 위치하는 Her2 에피토프에 대한 결합제인 트라스투주맙은 수용체들을 서로 멀리 유지시키며, 결과적으로 증식을 길항한다. 트라스투주맙 및 이중환형 항-Her2 콘톨스바디 각각은 항증식성 및 전증식성이다.

[0201]

FcRn 수용체에 결합하는 항-Her2 콘톨스바디의 능력을 결정하였다. IgG 유형, IgG1 서브클래스의 항체인 트라스투주맙과 비교하여, 항-Her2 콘톨스바디의 인간 FcRn 수용체에 대한 결합은 놀랍게도 더 높았고, 즉 이중환형 콘톨스바디에 대해 대략 10x 이다. 시노물구스 FcRn에 대하여 트라스투주맙 및 콘톨스바디는 유사하게 행동하고, 이량체 콘톨스바디는 트라스투주맙보다 4.5배 더 친화력이 있다.

[0202]

트립토판 자가형광을 사용하여, 제1 열변성 온도 T_m 은 콘톨스바디에 대해 대략 63 °C 이다. 정적 광 산란을 사용하여, 약 66 °C 의 집계 개시 온도를 콘톨스바디에 대해 결정하였다. 동적 광 산란을 사용하여, 약 66 °C 의 집계 개시 온도를 콘톨스바디에 대해 결정하였다. 모든 실험에서 제형은 20 mM His/His*HCl, 140 mM NaCl 중 1 mg/mL 콘톨스바디였다.

[0203]

혼합된 Fab가 형성되지 않았다는 것을 질량 분광법으로 확인할 수 있었다.

[0204]

이중환형 단일특이적 콘톨스바디의 다른 예는 항-cMET 콘톨스바디 (SEQ ID NO: 25의 환형 융합 폴리펩티드), 및 상이한 가변 도메인을 갖는 항-CD20 콘톨스바디 ((1) SEQ ID NO: 26의 환형 융합 폴리펩티드; (2) SEQ ID NO: 27의 환형 융합 폴리펩티드)이다. 하기 표에서 이들 콘톨스바디의 발현 속도, 수율 및 품질을 제공한다.

	항-cMET 콘톨스바디	항-CD20 콘톨스바디 (1)	항-CD20 콘톨스바디 (2)
발현 부피 [ml]	250	500	500
농도 [mg/ml]	0.60	1.06	1.0
양 (mg)	0.78	3.1	5.7
단량체 % (분석적 SEC)	100.00	97.9	98.4
주 피크 % (CE-SDS)	96.30	99.3	99.6
수율 [mg/l]	3.12	6.2	11.4

[0205]

[0206]

모든 콘톨스바디는 2 내지 15 mg/L 범위의 수율로 HEK-293 세포에서 일시적으로 발현되었다. 단백질 A 컬럼 이후 생성물은 85 % 이상이었고 SEC 컬럼 크로마토그래피를 통해서 일반적으로 96% 이상의 순도까지 부산물로부터 정제되었다.

[0207]

II.2. 이중환형 융합 폴리펩티드로부터 형성된 비교 이중특이적, 2가 항체

[0208]

이중특이적 다중환형 융합 폴리펩티드는 2 개의 환형 융합 폴리펩티드를 포함하고 여기서 각각의 환형 융합 폴리펩티드는 상이한 표적 및/또는 동일 표적 상의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합하며, 즉 상이한 특이성의

적어도 두개의 결합 부위를 포함한다.

- [0209] 이러한 이론에 국한되지 않으나 단쇄 폴리펩티드 내 결합 부위의 상응하는 도메인의 자가 조립이 사슬간 회합보다 우세하며, 즉 달리 말해서, 단일 환형 융합 폴리펩티드의 발현 이후, 결합 부위의 개별적인, 비기능성 도메인이 회합되어 기능성 결합 부위를 형성하는 것으로 상정된다. 예를 들어, 기능성 결합 부위가 Fab이면 Fab 부분, 즉 중쇄 단편 (VH-CH1) 및 경쇄 단편 (VL-CL)은 구성적, 결합 능력의 Fab 모이어티를 형성하고, 이렇게 먼저 조립된 환형 융합 폴리펩티드의 한쪽 절반 항체는 다른 환형 융합 폴리펩티드와 연속하여 회합하여 이중환형 융합 폴리펩티드 (2개의 단일 환형 융합 폴리펩티드의 이량체를 포함하는 콘트롤스바디)를 형성한다. 다중 특이적 이중환형 융합 폴리펩티드를 수득하기 위해서 단리된 환형 융합 폴리펩티드의 이중이량체화가 촉진되어야 한다. 하나의 예시적인 이중이량체화 촉진 요소는 노브-인투-홀 (knob-into-hole) 기술에 따른 돌연변이이다.
- [0210] 최종 이중특이적 콘트롤스바디의 2개 결합 부위의 지오메트리/거리를 변화시키기 위해서 펩티드 링커의 길이를 변형시키는 것이 가능하고, 단일특이적 콘트롤스바디에 대해서도 동일한 사실이다.
- [0211] 서로에 대한 결합 부위 (들)의 상대적 위치 (들)를 변화시킴으로써 결합 부위의 지오메트리/거리를 변형시키는 것이 가능하다.
- [0212] 예를 들어, 결합 부위로서 Fab의 경우에, 중쇄 Fab 단편 및 경쇄 Fab 단편의 도메인의 서열을 도치시킬 수 있는데, 즉 예를 들어 중쇄 Fab 단편은 각각 도메인 서열 VH-CH1 또는 CH1-VH (N-말단에서 C-말단으로)를 가질 수 있고, 유사하게 경쇄 Fab 단편은 도메인 서열 VL-CL 또는 CL-VL (N-말단에서 C-말단으로)을 가질 수 있거나 또는 혼합될 수 있다. 링커가 제3 결합 부위의 일부의 중심 융합 폴리펩티드 및 코어 도메인 전후에, 즉 제3 결합 부위의 일부의 융합 폴리펩티드 및 항체 불변 도메인 3 전후에 존재하는 것으로 가정하면, Fab 단편은 코어 도메인과 관련하여 그 배향이 제한된다. 결과적으로, VH 도메인의 상대적 위치는 Fc-영역에 가깝거나 (여기서 "VH-인" 으로 불림), 또는 Fc-영역으로부터 훨씬 더 떨어져 있게 된다 (여기서 "VH-아웃" 이라 불림) (도 6 및 7 참조).
- [0213] CrossMab 기술, 즉 하나의 아암에서 도메인 교환을 사용하여 조립 거동을 변형시키는 것이 또한 가능하다. 이것은 교환 또는 비교환 아암에서 전하 변이체와 추가로 조합될 수 있다. 이중특이적 이중환형 융합 폴리펩티드의 제조에 사용되는 개별 배향의 항-cMET 환형 융합 폴리펩티드의 예시적인 사슬은 도 8 에 도시하며 VH-아웃, VH-인, 그리고 이들 상이한 사슬 조합의 개별 발현 속도, 수율 및 품질은 하기 표에서 제공한다.

	VH-아웃- 노브/VH- 아웃-홀	VH-인- 노브/VH- 아웃-홀	VH-아웃- 노브/VH- 아웃- 홀-CH- CL-교차	VH-인-노브 /VH-아웃- 홀-CH-CL- 교차	VH-아웃- 노브/VH- 인-홀-VH- VL-교차	VH-인-노 브/VH-인- 홀-VH-VL- 교차
발현 부피 [ml]	250	250	250	250	250	250
농도 [mg/ml]	1.80	0.60	0.48	1.17	0.36	0.65
양 [mg]	2.88	0.60	0.81	1.17	0.43	0.65
	VH-아웃- 노브/VH- 아웃-홀	VH-인- 노브/VH- 아웃-홀	VH-아웃- 노브/VH- 아웃- 홀-CH- CL-교차	VH-인-노브 /VH-아웃- 홀-CH-CL- 교차	VH-아웃- 노브/VH- 인-홀-VH- VL-교차	VH-인-노 브/VH-인- 홀-VH-VL- 교차
단량체 (분석적 SEC) [%]	98.10	93.80	97.34	97.90	98.74	98.88
주 피크 (CE-SDS) [%]	96.80	98.80	95.73	100.00	100.00	100.00
수율 [mg/l]	11.52	2.40	3.24	4.68	1.72	2.60

[0214]

[0215]

[0216]

[0217]

[0218]

[0219]

[0220]

[0221]

[0222]

VH-아웃-노브 = SEQ ID NO: 28,

VH-인-노브 = SEQ ID NO: 29,

VH-아웃-홀 = SEQ ID NO: 30,

VH-아웃-홀-CH-CL-교차 = SEQ ID NO: 31,

VH-인-홀-VH-VL-교차 = SEQ ID NO: 32.

통상의 이중특이적 항체를 제조하는데 일반적으로 적용가능한 기술이 또한 사용되고 채택되어 이중특이적 이중 환형 융합 폴리펩티드를 제조할 수 있다.

예를 들어, 다중특이적 항체를 만들기 위한 기법은 비제한적으로, 상이한 특이성을 갖는 2 개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 재조합 동시-발현 (Milstein, C. and Cuello, A.C., Nature 305 (1983) 537-540, WO 93/08829, 및 Traunecker, A. et al., EMBO J. 10 (1991) 3655-3659 참조), 및 "노브-인-홀 (knob-in-hole)" 조작 (예를 들어, US 5,731,168 참조)을 포함한다. 다중-특이적 항체는 또한, 항체 Fc-이종이량체 분자를 만들기 위한 정전 스티어링 효과 (electrostatic steering effect) 조작 (WO 2009/089004); 2 개 이상의 항체 또는 단편의 교차결합 (예를 들어, US 4,676,980, 및 Brennan, M. et al., Science 229 (1985) 81-83 참조); 이중특이적 항체를 생성하기 위한 류신 지퍼 사용 (예를 들어, Kostelny, S.A. et al., J. Immunol. 148 (1992) 1547-1553 참조); 이중특이적 항체 단편을 생성하기 위한 "디아바디" 기술 사용 (예를 들어, Holliger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448 참조); 및 단일 사슬 Fv (sFv) 이량체 사용 (예를 들어, Gruber, M et al., J. Immunol. 152 (1994) 5368-5374 참조); 및 삼중특이적 항체 제조 (예를 들어, Tutt, A. et al., J. Immunol. 147 (1991) 60-69) 에 의해 제조할 수 있다.

일반적으로, 2개 결합 부위의 배향을 고정시키는데 지오메트리적 제한이 요구될 때마다, 콘톨스바디가 사용될 수 있다.

- [0223] II.3 본 발명에 따른 이중환형 융합 폴리펩티드로부터 형성된 이중- 및 삼중특이적, 3가 항체
- [0224] 본 발명에 따른 예시적인 다중특이적 항체의 디자인 및 조성이 도 9 에 도시되어 있다. 3 개의 결합 부위를 포함하는 이러한 항체는 TriFab-콘트롤스바디로 지칭될 수 있다.
- [0225] 도 9 하부에서 결합 부위가 TriFab-콘트롤스바디에서 반대 위치에 배열되어 있음을 알 수 있다. 따라서, TriFab-콘트롤스바디는 정의되고 제한된 유연성을 가진 단단한 분자이다. 그것은 매우 특별하고 정의된 지오메트리를 갖는다. 그것의 항원에 결합하면 자석과 같이 두 개의 항원 (상기 항원을 나타내는 세포)을 극에 연결시킨다.
- [0226] 예시적인 TriFab-콘트롤스바디는 항-LeY/비오틴 항체이다. 그것은 2 개의 환형 융합 폴리펩티드를 포함하며, 첫 번째는 다음과 같은 도메인의 서열을 갖는다:
- [0227] 항-LeY 항체 VH - CH1 - 펩티드 링커 1 - 항 비오틴 항체 VL - 링커 - 노브 돌연변이가 있는 CH3 - 펩티드 링커 2 - 항-LeY 항체 VL - CL (κ)
- [0228] 각각의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 34에 열거되어 있다.
- [0229] 두 번째 환형 융합 폴리펩티드는 다음과 같은 도메인의 서열을 갖는다:
- [0230] 항-LeY 항체 VH - CH1 - 펩티드 링커 1 - 항 비오틴 항체 VL - 링커 - 홀 돌연변이가 있는 CH3 - 펩티드 링커 2 - 항-LeY 항체 VL - CL (κ)
- [0231] 각각의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 35에 열거되어 있다.
- [0232] 분자는 실시예에 기재된 방법과 유사하게 발현되었고 정제되었다.
- [0233] 도 10 은 카파선택(KappaSelect) 정제 배양 상청액의 SEC 및 SDS-PAGE 를 나타낸다.
- [0234] 분자의 동일성은 하기 표의 데이터에서 도 11 에 나타난 바와 같이 MS 에 의해 확인되었다:

	기대된 질량 [Da]	결정된 질량 [Da]
전체 분자	148582	148586
사슬 A	73635	73635
사슬 B	74980	74980

- [0235]
- [0236] 분자의 기능성은 LeY-Bio TriFab-콘트롤스바디의 이중특이성을 나타내는 FACS 분석으로 확인하였다. TriFab-콘트롤스바디는 항-LeY 결합 특이성을 통해 세포 표면에 결합한다. 항-비오틴 결합 부위를 통한 형광성 비오틴-Cy5 접합체의 포획에 의해 세포-결합된 TriFab-콘트롤스바디는 FACS 분석에서 검출 가능하게 되고, 즉 세포-회합된 Cy5 신호는 결합 부위, 즉 개개의 환형 융합 폴리펩티드 내 위치한 결합 부위를 비롯하여 두 개의 환형 융합 폴리펩티드의 이량체화에 의해 형성된 결합 부위의 동시 기능성을 나타낸다. FACS 데이터는 도 12 에 나타낸다.
- [0237] 본원에서는 3개의 항원 결합 부위를 포함하고 2개의 환형 융합 폴리펩티드로 구성된 다중특이적 항체를 개시하고, 여기서
- [0238] a) 제1 환형 융합 폴리펩티드는 제1 결합 도메인의 제1 부분, 제1 결합 도메인의 제2 부분 및 제3 결합 도메인의 제1 부분을 포함하고, 여기서
- [0239] - 제1 결합 도메인의 제1 부분은 직접적으로 또는 제1 펩티드 링커를 통해 제3 결합 도메인의 제1 부분의 N-말단에 융합되고,
- [0240] - 제1 결합 도메인의 제2 부분은 직접적으로 또는 제2 펩티드 링커를 통해 제3 결합 도메인의 제1 부분의 C-말단에 융합되고,
- [0241] - 제1 결합 도메인의 제1 부분은 중쇄 Fab 단편 (VH₁-CH1) 또는 경쇄 Fab 단편 (VL₁-CL)이고, 제1 결합 도메인

의 제1 부분이 중쇄 Fab 단편이거나 그 반대인 경우, 제1 결합 도메인의 제2 부분은 경쇄 Fab 단편이고,

- [0242] - 제1 결합 도메인의 제1 부분 및 제1 결합 도메인의 제2 부분은 서로 회합되어 제1 항원 결합 부위를 형성하며,
- [0243] b) 제2 환형 융합 폴리펩티드는 제2 결합 도메인의 제1 부분, 제2 결합 도메인의 제2 부분 및 제3 결합 도메인의 제2 부분을 포함하고, 여기서
- [0244] - 제2 결합 도메인의 제1 부분은 직접적으로 또는 제3 펩티드 링커를 통해 제3 결합 도메인의 제2 부분의 N-말단에 융합되고,
- [0245] - 제2 결합 도메인의 제2 부분은 직접적으로 또는 제4 펩티드 링커를 통해 제3 결합 도메인의 제2 부분의 C-말단에 융합되고,
- [0246] - 제2 결합 도메인의 제1 부분은 중쇄 Fab 단편 (VH_2-CH1) 또는 경쇄 Fab 단편 (VL_1-CL)이고, 제2 결합 도메인의 제1 부분이 중쇄 Fab 단편이거나 그 반대인 경우, 제2 결합 도메인의 제2 부분은 경쇄 Fab 단편이고,
- [0247] - 제2 결합 도메인의 제1 부분 및 제2 결합 도메인의 제2 부분은 서로 회합되어 제2 항원 결합 부위를 형성하며,
- [0248] c) 제3 결합 도메인의 제1 부분 및 제3 결합 도메인의 제2 부분은 함께 제3 항원 결합 부위를 형성하고,
- [0249] - 제3 결합 도메인의 제1 부분은 가변 중쇄-CH3 도메인 융합 폴리펩티드 (VH_3-CH3) 또는 가변 경쇄-CH3 도메인 융합 폴리펩티드 (VL_3-CH3)이고,
- [0250] - 제3 결합 도메인의 제2 부분은 제1 환형 융합 폴리펩티드에서 제2 결합 도메인의 제1 부분이 가변 경쇄-CH3 도메인 융합 폴리펩티드이거나 그 반대인 경우의 가변 중쇄-CH3 도메인 융합 폴리펩티드이고,
- [0251] - 제3 결합 도메인의 제1 부분 및 제3 결합 도메인의 제2 부분은 서로 회합되어 제3 항원 결합 부위를 형성하고,
- [0252] 여기서 2개의 불변 중쇄 도메인 3 (CH3)은 하기에 의해 이중이량체화를 촉진하도록 변경되며:
- [0253] i) 원래 아미노산 잔기보다 더 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 적어도 하나의 원래 아미노산 잔기를 치환함으로써 CH3 도메인 중 하나에서 돌기의 생성, 및 CH3 도메인 중 하나에서 생성된 돌기가 CH3 도메인의 다른 하나에서 생성된 공동에 위치할 수 있도록, 적어도 하나의 원래 아미노산 잔기를 원래 아미노산 잔기보다 더 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 치환함으로써 CH3 도메인 중 다른 하나에서 공동의 생성, 또는
- [0254] CH3 도메인 중 하나에서 적어도 하나의 원래 아미노산 잔기를 양전하 아미노산으로 치환하고, CH3 도메인 중 다른 하나에서 적어도 하나의 원래 아미노산 잔기를 음전하 아미노산으로 치환, 또는
- [0255] ii) CH3 도메인 사이에 디설피드 결합이 형성되도록 각각의 CH3 도메인에 적어도 하나의 시스테인 잔기의 도입, 또는
- [0256] iii) i) 및 ii)의 변형,
- [0257] 여기서 다중특이적 항체는 불변 중쇄 도메인 2 (CH2) 및 힌지 영역이 없다.
- [0258] 모든 양상의 일 구체예에서 제1 및 제2 환형 융합 폴리펩티드는 각각 제3 항원 결합 도메인의 부분에 대한 N-말단의 결합 도메인의 정확히 일부 및 제3 결합 도메인의 부분에 대한 C-말단의 결합 도메인의 정확히 하나의 상이한 부분을 포함한다.
- [0259] 모든 양상의 일 구체예에서 제1 환형 융합 폴리펩티드에서 제1 결합 도메인의 제1 부분 및 제1 결합 도메인의 제2 부분은 서로 공유적으로 회합되고 및/또는 제2 환형 융합 폴리펩티드에서 제2 결합 도메인의 제1 부분 및 제2 결합 도메인의 제2 부분이 서로 공유적으로 회합되어 있다. 일 구체예에서 공유적 회합은 펩티드 결합 이외의 결합에 의한 것이다. 바람직한 일 구체예에서, 공유적 회합은 디설피드 결합이다.
- [0260] 모든 양상의 일 구체예에서
- [0261] i) 제1 또는 제2 결합 부위의 제1 부분의 CH1 도메인의 C-말단은 제3 결합 도메인의 부분의 N-말단에 접합되고, 제1 또는 제2 결합 부위의 제2 부분의 VL 도메인의 N-말단은 제3 결합 도메인의 C-말단에 접합되거나,

- [0262] ii) 제1 또는 제2 결합 부위의 제1 부분의 VH 도메인의 C-말단은 제3 결합 도메인의 부분의 N-말단에 접합되고, 제1 또는 제2 결합 부위의 제2 부분의 CL 도메인의 N-말단은 제3 결합 도메인의 C-말단에 접합된다.
- [0263] 모든 양상의 일 구체예에서 제3 항원 결합 부위는 VH와 VL 도메인 사이에 디설피드 결합을 형성하기 위해 하기 위치 (카밧에 따른 번호지정)에서 서로 독립적으로 시스테인 잔기를 도입함으로써 이황화 안정화된다:
- [0264] - 위치 44의 VH, 및 위치 100의 VL,
- [0265] - 위치 105의 VH, 및 위치 43의 VL, 또는
- [0266] - 위치 101의 VH, 및 위치 100의 VL.
- [0267] 모든 양상의 일 구체예에서 제1 또는 제2 결합 도메인의 제1 부분은 항체 중쇄 Fab 단편 (VH+CH1)이고 제1 또는 제2 결합 도메인의 제2 부분은 항체 경쇄 Fab 단편 (VL+CL)이거나 또는 그 반대이다.
- [0268] 모든 양상의 일 구체예에서 다중특이적 항체 융합 폴리펩티드는 이펙터 기능을 발휘한다. 일 구체예에서 이펙터 기능은 ADCC 및/또는 CDC이다.
- [0269] 모든 양상의 일 구체예에서 제1 결합 도메인의 제1 부분은 SEQ ID NO: 16 또는 SEQ ID NO: 17의 제1 펩티드 링커를 통해서 제3 결합 도메인의 부분의 N-말단에 융합되고 제1 결합 도메인의 제2 부분은 SEQ ID NO: 16 또는 SEQ ID NO: 17의 제2 펩티드 링커를 통해서 제3 결합 도메인의 부분의 C-말단에 융합되며, 이로 인해 제1 및 제2 펩티드 링커는 서로 독립적으로 선택된다.
- [0270] 모든 양상의 일 구체예에서 제2 결합 도메인의 제1 부분은 SEQ ID NO: 16 또는 SEQ ID NO: 17의 제1 펩티드 링커를 통해서 제3 결합 도메인의 부분의 N-말단에 융합되고 제2 결합 도메인의 제2 부분은 SEQ ID NO: 16 또는 SEQ ID NO: 17의 제2 펩티드 링커를 통해서 제3 결합 도메인의 부분의 C-말단에 융합되며, 이로 인해 제1 및 제2 펩티드 링커는 서로 독립적으로 선택된다.
- [0271] 모든 양상의 일 구체예에서 각각의 (환형) (단쇄) 융합 폴리펩티드는 N-말단에서 C-말단 방향으로 제3 결합 도메인의 부분 이전 (즉, 제3 결합 도메인의 부분에 대한 N-말단)에 정확하게 하나의 항체 가변 도메인 및 제3 결합 도메인의 부분 이후 (즉, 제3 결합 도메인의 부분에 대한 C-말단)에 정확하게 하나의 항체 가변 도메인을 포함한다.
- [0272] 모든 양상의 일 구체예에서 표적은 세포 표면 항원 또는 세포 표면 수용체의 가용성 리간드이다.
- [0273] 모든 양상의 일 구체예에서 결합 도메인은 Fab, DAF 또는 이중특이적 Fab이다.
- [0274] 모든 양상의 일 구체예에서 제1 및/또는 제2 결합 도메인은 (통상의) Fab이고, 여기서 결합 도메인의 제1 부분은 항체 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 제1 항체 중쇄 불변 도메인 (CH1)의 적어도 N-말단 단편 (또는 전부)을 포함하고, 결합 도메인의 각각의 다른 부분은 항체 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 항체 경쇄 불변 도메인 (CL)의 적어도 N-말단 단편 (또는 전부)을 포함하거나, 또는 그 반대이다. 일 구체예에서 결합 도메인의 제1 부분은 N-말단에서 C-말단 방향으로 VH-CH1을 포함하고 결합 도메인의 제2 부분은 N-말단에서 C-말단 방향으로 VL-CL을 포함하거나, 또는 그 반대이다.
- [0275] 모든 양상의 일 구체예에서 원래 아미노산 잔기보다 더 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기는 R, F, Y 및 W로부터 선택된다.
- [0276] *모든 양상의 일 구체예에서 원래 아미노산 잔기보다 더 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기는 A, S, T 및 V로부터 선택된다.
- [0277] 모든 양상의 일 구체예에서 원래 아미노산 잔기보다 더 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기는 R, F, Y 및 W로부터 선택되고, 원래 아미노산 잔기보다 더 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기는 A, S, T 및 V로부터 선택된다.
- [0278] 모든 양상의 일 구체예에서 제3 결합 부위의 하나의 CH3 도메인은 T366W 돌연변이 (노브 돌연변이; 노브 측)를 포함하고, 제3 결합 부위의 다른 CH3 도메인은 돌연변이 T366S, L368A 및 Y407V (홀 돌연변이; 홀 측) (카밧의 EU 지수에 따른 번호지정)를 포함한다.
- [0279] 모든 양상의 일 구체예에서 제3 결합 부위의 하나의 CH3 도메인은 T366W 돌연변이 (노브 돌연변이; 노브 측)를 포함하고, 제3 결합 부위의 다른 CH3 도메인은 돌연변이 T366S, L368A 및 Y407V (홀 돌연변이; 홀 측) (카밧의

EU 지수에 따른 번호지정) 를 포함한다.

- [0280] *모든 양상의 일 구체예에서 제3 결합 부위의 하나의 CH3 도메인은 S354C 및 T366W 돌연변이 (노브-cys 돌연변이; 노브-cys 측)를 포함하고, 제3 결합 부위의 다른 CH3 도메인은 돌연변이 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V (홀 -cys 돌연변이; 홀-cys 측) (카밧의 EU 지수에 따른 번호지정) 를 포함한다.
- [0281] 본원에서 보고되는 바와 같은 일 양상은 3개의 항원 결합 부위를 포함하는 다중특이적 항체이고, 여기서
- [0282] a) 제1 항원 결합 부위는 제1 환형 융합 폴리펩티드의 제1 항체 중쇄 가변 도메인 (VH₁) 및 제1 항체 경쇄 가변 도메인 (VL₁) 쌍 (VH₁/ VL₁-쌍)에 의해 형성되고, 여기서
- [0283] - VH₁은 제1 중쇄 Fab 단편 (VH₁-CH1)의 일부이고, VL₁은 제1 경쇄 Fab 단편 (VL₁-CL)의 일부이며,
- [0284] - VH₁-CH1은 제1 펩티드 링커를 통해 제1 가변 도메인-항체 불변 도메인 3의 융합 폴리펩티드 (V₃-CH3)의 N-말단 또는 C-말단에 접합되고 VL₁-CL은 제2 펩티드 링커를 통해 제1 V₃-CH3의 각각의 다른 말단에 접합되며,
- [0285] - VH₁-CH1 및 VL₁-CL은 서로 회합되어 있으며 VH₁/VL₁-쌍을 형성하고,
- [0286] b) 제2 항원 결합 부위는 제2 환형 융합 폴리펩티드의 제2 항체 중쇄 가변 도메인 (VH₂) 및 제2 항체 경쇄 가변 도메인 (VL₂) 쌍 (VH₂/ VL₂-쌍)에 의해 형성되고, 여기서
- [0287] - VH₂은 제2 중쇄 Fab 단편 (VH₂-CH1)의 일부이고, VL₂은 제2 경쇄 Fab 단편 (VL₂-CL)의 일부이며,
- [0288] - VH₂-CH1은 제3 펩티드 링커를 통해 제2 가변 도메인-항체 불변 도메인 3의 융합 폴리펩티드 (V₃-CH3)의 N-말단 또는 C-말단에 접합되고 VL₂-CL은 제4 펩티드 링커를 통해 제2 V₃-CH3의 각각의 다른 말단에 접합되며,
- [0289] - VH₂-CH1 및 VL₂-CL은 서로 회합되어 있으며 VH₂/VL₂-쌍을 형성하고,
- [0290] c) 제3 항원 결합 부위는 제1 V₃-CH3 및 제2 V₃-CH3에 의해 형성되고, 여기서
- [0291] - 제1 V₃-CH3은 가변 중쇄-항체 불변 도메인 3의 융합 폴리펩티드 (VH₃-CH3) 또는 가변 경쇄-항체 불변 도메인 3의 융합 폴리펩티드 (VL₃-CH3)일 수 있으며,
- [0292] - 제2 V₃-CH3은 제1 V₃-CH3이 가변 경쇄-항체 불변 도메인 3의 융합 폴리펩티드이거나 또는 그 반대인 경우 가변 중쇄-항체 불변 도메인 3의 융합 폴리펩티드이고,
- [0293] - VH₃-CH3 및 VL₃-CH3은 서로 회합되어 있으며 VH₃/VL₃-쌍을 형성하고,
- [0294] 여기서 2 개의 항체 불변 도메인 3 (CH3)은 CH3 중 하나에 돌연변이 T366W 및 임의로 돌연변이 S354C를 도입하고 각각의 다른 CH3에 돌연변이 T366S, L368A 및 Y407V 및 임의로 돌연변이 Y349C를 도입함으로써 이중이량체화를 촉진하도록 변경되고 (카밧의 EU 지수에 따른 번호지정),
- [0295] 여기서 다중특이적 항체는 불변 도메인 2 (CH2) 및 힌지 영역이 없다.
- [0296] 일 구체예에서 제3 결합 도메인의 제1 및/또는 제2 부분에 링커가 존재하지 않는다 (즉, 제3 결합 도메인의 제1 부분은 가변 중쇄 도메인-항체 불변 도메인 3 융합 폴리펩티드이고 제3 결합 도메인의 제2 부분은 가변 경쇄 도메인-항체 불변 도메인 3 융합 폴리펩티드, 또는 그 반대이다).
- [0297] 일 구체예에서 링커 L은 펩티드형 링커이다. 일 구체예에서 링커 L은 SEQ ID NO: 33 의 아미노산 서열을 갖는다.
- [0298] 위에서 언급되지 않은 다른 모든 구체예도 이 양상에 관한 것이다.
- [0299] 본원에서 보고되는 바와 같은 일 양상은 (적어도) 3개의 항원 결합 VH/VL-쌍을 포함하는 다중특이적 항체이고,
- [0300] 여기서 다중특이적 항체는 하기를 포함/구성하며,
- [0301] *a) N-말단에서 C-말단 방향으로 하기를 포함하는 제1 환형 융합 폴리펩티드:

- [0302] i) 제1 가변 중쇄 도메인 (VH₁),
- [0303] ii) 항체 중쇄 불변 도메인 1 (CH1),
- [0304] iii) 제1 펩티드 링커,
- [0305] iv) 제2 가변 중쇄 도메인 (VH₂),
- [0306] v) 제1 CH3 도메인 (CH3₁),
- [0307] vi) 제2 펩티드 링커,
- [0308] vii) 제1 가변 경쇄 도메인 (VL₁), 및
- [0309] viii) 항체 경쇄 불변 도메인 (CL),
- [0310] 여기서 i) 및 vii)에서 확인된 도메인은 서로 회합되고 제1 항원에 특이적으로 결합하는 제1 VH/VL-쌍이고,
- [0311] 및
- [0312] b) N-말단에서 C-말단 방향으로 하기를 포함하는 제2 환형 융합 폴리펩티드:
- [0313] i) 제3 가변 중쇄 도메인 (VH₃),
- [0314] ii) 항체 중쇄 불변 도메인 1 (CH1),
- [0315] iii) 제3 펩티드 링커,
- [0316] iv) 제2 가변 경쇄 도메인 (VL₂),
- [0317] v) 제2 CH3 도메인 (CH3₂),
- [0318] vi) 제4 펩티드 링커,
- [0319] vii) 제3 가변 경쇄 도메인 (VL₃), 및
- [0320] viii) 항체 경쇄 불변 도메인 (CL),
- [0321] 여기서 i) 및 vii)에서 확인된 도메인은 서로 회합되고 제2 항원에 특이적으로 결합하는 제2 VH/VL-쌍이고,
- [0322] 여기서 CH3 도메인은 원래 아미노산 잔기보다 더 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 적어도 하나의 원래 아미노산 잔기를 치환함으로써 CH3 도메인 중 하나에서 돌기의 생성, 및 CH3 도메인 중 하나에서 생성된 돌기가 CH3 도메인의 다른 하나에서 생성된 공동에 위치할 수 있도록, 적어도 하나의 원래 아미노산 잔기를 원래 아미노산 잔기보다 더 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 치환함으로써 CH3 도메인 중 다른 하나에서 공동의 생성에 의해 이중이량체화를 촉진하도록 변경되고,
- [0323] 여기서 a) v) 및 b) v)에서 확인된 도메인은 디설피드 결합에 의해 서로 접합되며 (제1 환형 융합 폴리펩티드 및 제2 융합 폴리펩티드의 이량체를 형성하기 위해),
- [0324] 그리고
- [0325] 여기서 a) iv) 및 b) iv)에서 확인된 도메인은 서로 회합되고 제3 항원에 특이적으로 결합하는 제3 VH/VL-쌍이다.
- [0326] 일 구체예에서 제1 항원 및 제2 항원은 동일한 항원이며 제3 항원은 이들과 상이한 항원이다.
- [0327] 위에서 언급되지 않은 다른 모든 구체예도 이 양상에 관한 것이다.
- [0328] 모든 양상의 일 구체예에서 제1 및 제2 결합 부위는 동일한 (제1) 항원에 특이적으로 결합하고 제3 결합 부위는 상이한 (제2) 항원에 특이적으로 결합한다.
- [0329] 모든 양상의 일 구체예에서 제1 결합 부위는 제1 항원에 특이적으로 결합하고, 제2 결합 부위는 제2 항원에 특이적으로 결합하고, 그리고 제3 결합 부위는 제3 항원에 특이적으로 결합하며, 제1 제2 및 제3 항원은 상이한 항원이다.

[0330] **III. 결합 부위**

[0331] III.1. 항체 단편 유도된 결합 부위

[0332] 일정 구체예에서, 본원에서 보고되는 바와 같은 다중특이적 항체의 결합 부위는 항체 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 항체 경쇄 가변 도메인 (VL)으로 구성된다.

[0333] 일정 구체예에서, 다중특이적 항체의 결합 부위 중 하나 또는 두 개는 항체 단편이다. 항체 단편은 제한없이, Fab, Fab', Fab'-SH, 및 Fv 단편을 포함한다. 일정 항체 단편의 검토를 위해서는, Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134 를 참조한다. scFv 단편의 검토를 위해서는, 예를 들어 Plueckthun, A., In: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg and Moore (eds.), Springer-Verlag, New York (1994), pp. 269-315을 참조하고, 또한 WO 93/16185; US 5,571,894 및 US 5,587,458을 참조한다. 회수 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하고 생체내 반감기가 증가된 Fab 단편의 검토를 위해, US 5,869,046을 참조한다.

[0334] 항체 단편은 또한 "이중 작용성 Fab" 또는 "DAF" 일 수 있다 (예를 들어, US 2008/0069820 참조).

[0335] 항체 단편은 본원에 기재된 바와 같이, 미손상 항체의 단백질을 분해 소화 뿐 아니라 재조합 숙주 세포 (예를 들어, 대장균 (E. coli) 또는 파지)에 의한 생성을 비제한적으로 포함하는, 다양한 기술에 의해 제조할 수 있다.

[0336] 결합 부위가 Fab 이면, Fab 는 통상의 Fab, DAF 또는 이중특이적 Fab 일 수 있다.

[0337] 통상의 Fab의 경우, 결합 도메인의 한 부분은 항체 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 제1 항체 중쇄 불변 도메인 (CH1)의 적어도 N-말단 단편 (또는 전부)을 포함하고 각각의 다른 부분의 결합 도메인은 항체 경쇄 가변 도메인 (VL) 항체 경쇄 불변 도메인 (CL)의 적어도 N-말단 단편 (또는 전부)을 포함한다. 이들 도메인의 순서는 이의 회합 및 (기능성) 결합 부위의 형성이 가능하다면 (즉, 방해되지 않으면) 임의적일 수 있다.

[0338] 일 구체예에서 결합 도메인의 한 부분은 N-말단에서 C-말단 방향으로 VH-CH1을 포함하고 결합 도메인의 다른 부분은 N-말단에서 C-말단 방향으로 VL-CL을 포함한다.

[0339] 이중특이적 Fab의 경우에, 결합 도메인의 한 부분은 항체 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 제1 항체 중쇄 불변 도메인 (CH1)의 적어도 N-말단 단편 (또는 전부)을 포함하고 각각의 다른 결합 도메인은 항체 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 항체 경쇄 불변 도메인 (CL)의 적어도 N-말단 단편 (또는 전부)을 포함하며, 여기서 상기 결합 도메인은 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 경쇄 가변 도메인 (VL)의 상보적 쌍에 2개의 비중첩 파라토프를 포함하고, 이때 제1 파라토프는 VL 도메인의 CDR1 및 CDR3 및 VH 도메인의 CDR2로부터의 잔기를 포함하고, 제2 파라토프는 VH 도메인의 CDR1 및 CDR3 및 VL 도메인의 CDR2로부터의 잔기를 포함한다.

[0340] 일 구체예에서 제1 파라토프는 VL 도메인의 CDR1 및 CDR3 및 VH 도메인의 CDR2로부터의 잔기를 포함하고, 제2 파라토프는 VH 도메인의 CDR1 및 CDR3 및 VL 도메인의 CDR2로부터의 잔기를 포함한다.

[0341] 일 구체예에서 결합 부위의 중쇄 가변 도메인은 인간 VH3 패밀리에 중쇄 서열을 기반으로 하고 결합 부위의 경쇄 가변 도메인은 인간 Vkappa1 패밀리에 경쇄 서열을 기반으로 한다.

[0342] 일 구체예에서 결합 부위의 중쇄 가변 도메인은 인간 VH3 패밀리에 중쇄 서열을 기반으로 하고 결합 부위의 경쇄 가변 도메인은 인간 Vlambda1 패밀리에 경쇄 서열을 기반으로 한다.

[0343] III.2. 키메라 및 인간화 항체 유래된 결합 부위

[0344] *일정 구체예에서, 다중특이적 항체에서 결합 부위 중 하나 또는 둘 또는 세개는 키메라 항체, 예를 들어 인간화 항체로부터 유래된 키메라 도메인이다.

[0345] "프레임워크" 또는 "FR" 은 초가변 영역 (HVR) 잔기 이외의 다른 가변 도메인 잔기를 의미한다. 가변 도메인의 FR 은 일반적으로 4개 FR 도메인: FR1, FR2, FR3, 및 FR4로 이루어진다. 따라서, HVR 및 FR 서열은 일반적으로 VH (또는 VL) 에서 하기의 서열로 표시된다: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

[0346] 본원에서 사용하는 바와 같은 용어 "과가변 영역" 또는 "HVR" 은, 서열에서 과가변인 아미노산 잔기 스트레치 ("상보성 결정 영역" 또는 "CDR") 를 포함하고/하거나 구조적으로 규정된 루프 ("과가변 루프") 를 형성하고/하거나 항원-접촉 잔기 ("항원 접촉부") 를 함유하는 항체 가변 도메인의 영역 각각을 나타낸다. 일반적으로, 항체는 6 개의 HVR 을 포함하는데; 3 개는 VH (H1, H2, H3) 에 있고, 3 개는 VL (L1, L2, L3) 에 있다.

- [0347] HVR 은 하기를 포함한다:
- [0348] (a) 아미노산 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), 및 96-101 (H3) 에서 발생 하는 과가변 루프 (Chothia, C. and Lesk, A.M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917);
- [0349] (b) 아미노산 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2), 및 95-102 (H3) 에서 발생 하는 CDR (Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242.);
- [0350] (c) 아미노산 잔기 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2), 및 93-101 (H3)에 존재하 는 항원 접촉부 (MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)); 및
- [0351] (d) 아미노산 잔기 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3), 및 94-102 (H3) 를 포함하는, (a), (b), 및/또는 (c) 의 조합.
- [0352] 달리 표시하지 않으면, HVR 잔기 및 가변 도메인의 다른 잔기 (예를 들어, FR 잔기)는 본원에서 Kabat et al., 상동에 따라서 번호지정된다.
- [0353] 일정 구체예에서, 키메라 항체는 인간화 항체이다. 전형적으로, 비-인간 항체는 모체 비-인간 항체의 특이 성 및 친화성을 유지하면서 인간에 대한 면역원성을 감소시키도록 인간화된다. 일반적으로, 인간화 항체는 HVR, 예를 들어 CDR (또는 이의 일부) 이 비-인간 항체로부터 유래되고, FR (또는 이의 일부) 이 인간 항체 서 열로부터 유래된 하나 이상의 가변 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 인간화 항체 중의 일부 FR 잔기는 비-인간 항체 (예를 들어, HVR 잔기가 유래된 항체) 유래의 상응하는 잔기로 치환되어, 예를 들어 항체 특이성 또는 친화성이 복원되거나 또는 개선된다.
- [0354] "인간화" 항체는 비-인간 HVR 로부터의 아미노산 잔기 및 인간 FR 로부터의 아미노산 잔기를 포함하는 항체를 의미한다. 일정 구체예에서, 인간화 항체는 실질적으로 적어도 하나, 및 통상 2 개 모두의 가변 도메인을 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 HVR (예를 들어, CDR) 은 비-인간 항체의 것들에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 은 인간 항체의 것들에 상응한다. 인간화 항체는 임의로 인간 항체로부터 유 래된 항체 불변 영역의 적어도 일부분을 포함할 수 있다. 항체, 예를 들어 비-인간 항체의 "인간화 형태" 는, 인간화를 거친 항체를 나타낸다.
- [0355] 인간화 항체 및 이의 제조 방법은 예를 들어, Almagro, J.C. and Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633 에 설명되어 있으며, 예를 들어 Riechmann, I. et al., Nature 332 (1988) 323-329; Queen, C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033; US 5, 821,337, US 7,527,791, US 6,982,321 및 US 7,087,409; Kashmiri, SV et al., Methods 36 (2005) 25-34 (특이성 결정 영역 (SDR) 그 래프팅을 기재 함); Padlan, E.A., Mol. Immunol. 28 (1991) 489-498 ("재포장"을 기재함); Dall'Acqua, W.F. et al., Methods 36 (2005) 43-60 ("FR 서플링"을 기재함); 및 Osbourn, J. et al., Methods 36 (2005) 61-68 및 Klimka, A. et al., Br. J. Cancer 83 (2000) 252-260 (FR 서플링에 대한 "가이드 선택" 접근법을 기재함) 에 추가로 기재되어 있다.
- [0356] 인간화에 사용될 수 있는 인간 프레임워크 영역은 "최적 적합" 방법을 사용하여 선택된 프레임워크 영역을 포함 하지만 이에 제한되지 않는다 (예를 들어, Sims, M.J. et al., J. Immunol. 151 (1993) 2296-2308 참조; 경쇄 또는 중쇄 가변 영역의 특정 하위 군의 인간 항체의 공통 서열로부터 유래된 프레임워크 영역 (예를 들어, Carter, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289; 및 Presta, L.G. et al., J. Immunol. 151 (1993) 2623-2632 참조); 인간 성숙 (신체적으로 돌연변이된) 프레임워크 영역 또는 인간 생식 계열 프레임 워크 영역 (예를 들어, Almagro, J.C. and Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633 참조); 및 FR 라이브러리 스크리닝으로부터 유래된 프레임워크 영역 (예를 들어, Baca, M. et al., J. Biol. Chem. 272 (1997) 10678-10684 및 Rosok, M.J. et al., J. Biol. Chem. 271 (1996) 22611-22618 참조).
- [0357] III.3. 인간 항체 유래된 결합 부위
- [0358] 일정 구체예에서, 본원에서 보고되는 바와 같은 다중특이적 항체의 하나 또는 두 개 또는 세 개의 결합 부위는 항체 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 항체 경쇄 가변 도메인 (VL)으로 구성된다. 일정 구체예에서, 가변 도메인 은 인간 항체로부터 유래된다.
- [0359] 인간 항체는 당업계에 공지된 다양한 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 인간 항체는 일반적으로 van Dijk, M.A. and van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Pharmacol. 5 (2001) 368-374 and in Lonberg, N., Curr. Opin.

Immunol. 20 (2008) 450-459에 기재되어 있다.

[0360] 인간 항체는 항원 공격에 반응하여 인간 가변 영역을 갖는 온전한 인간 항체 또는 온전한 항체를 생성하도록 변형된 트랜스제닉 동물에게 면역원을 투여함으로써 제조될 수 있다. 이러한 동물은 전형적으로 내생성 면역글로불린 유전자좌를 대체하거나, 또는 염색체외로 존재하거나 또는 동물의 염색체에 무작위적으로 통합된, 인간 면역글로불린 유전자좌의 전부 또는 일부를 함유한다. 이러한 트랜스제닉 마우스에서, 내생성 면역글로불린 유전자좌는 일반적으로 불활성화된다. 트랜스제닉 동물로부터 인간 항체를 수득하는 방법의 검토를 위해, Lonberg, N., Nat. Biotech. 23 (2005) 1117-1125을 참조한다. 또한 예를 들어, XENOMOUSE™ 기술을 설명하는 US 6,075,181 및 US 6,150,584; HuMab® 기술을 설명하는 US 5,770,429; K-M MOUSE® 기술을 설명하는 US 7,041,870; VelociMouse® 기술을 설명하는 US 2007/0061900; 면역재구성 마우스를 설명하는 WO 2007/131676을 참조한다. 이러한 동물에 의해 생성된 온전한 항체 유래의 인간 가변 영역은 더욱 변형될 수 있다.

[0361] 인간 항체는 또한 하이브리도마-기반 방법으로 제조될 수 있다. 인간 모노클로날 항체의 생성을 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 헤테로골수종 세포주가 기재되어 있다 (예를 들어, Kozbor, D., J. Immunol. 133 (1984) 3001-3005; Brodeur, B.R. et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York (1987), pp. 51-63; and Boerner, P. et al., J. Immunol. 147 (1991) 86-95 참고). 인간 B-세포 하이브리도마 기술을 통해 생성된 인간 항체가 또한 Li, J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (2006) 3557-3562에 기재되어 있다. 부가적인 방법은 예를 들어, US 7,189,826 (하이브리도마 세포주로부터의 모노클로날 인간 IgM 항체의 제조를 기재함) 및 Ni, J., Xiandai Mianyixue 26 (2006) 265-268 (인간-인간 하이브리도마를 기재함)에 기재된 것들을 포함한다. 인간 하이브리도마 기술 (트리오마 기술)은 또한 Vollmers, H.P. and Brandlein, S., Histology and Histopathology 20 (2005) 927-937 및 Vollmers, H.P. and Brandlein, S., Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology 27 (2005) 185-191 에 기재되어 있다.

[0362] 인간 항체는 또한 인간-유래 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변 도메인 서열을 단리하여 생성될 수 있다. 이러한 가변 도메인 서열은 이후에 바람직한 인간 불변 도메인과 조합될 수 있다. 항체 라이브러리로부터 인간 항체를 선택하는 기술은 하기에 기술한다.

[0363] III.4. 라이브러리-유래된 항체 결합 부위

[0364] 일정 구체예에서, 본원에서 보고되는 바와 같은 다중특이적 항체의 하나 또는 두개 또는 세개의 결합 부위는 항체 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 항체 경쇄 가변 도메인 (VL)으로 구성된다. 일정 구체예에서, 가변 도메인은 바람직한 활성 또는 활성들을 갖는 항체에 대해 조합 라이브러리를 스크리닝하여 단리된다.

[0365] 예를 들어, 파지 디스플레이 라이브러리를 생성시키고 이러한 라이브러리를 바람직한 결합 특징을 보유하는 항체에 대해 스크리닝하기 위한 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있다. 이러한 방법들은 예를 들어, Hoogenboom, H.R. et al., Methods in Molecular Biology 178 (2001) 1-37에서 검토되어 있고, 추가적으로 예를 들어, McCafferty, J. et al., Nature 348 (1990) 552-554; Clackson, T. et al., Nature 352 (1991) 624-628; Marks, J.D. et al., J. Mol. Biol. 222 (1992) 581-597; Marks, J.D. and Bradbury, A., Methods in Molecular Biology 248 (2003) 161-175; Sidhu, S.S. et al., J. Mol. Biol. 338 (2004) 299-310; Lee, C.V. et al., J. Mol. Biol. 340 (2004) 1073-1093; Fellouse, F.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (2004) 12467-12472; 및 Lee, C.V. et al., J. Immunol. Methods 284 (2004) 119-132에 기재되어 있다.

[0366] 특정한 파지 디스플레이 방법에서, VH 및 VL 유전자의 레퍼토리는 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에 의해 개별적으로 클로닝되고 파지 라이브러리에서 무작위로 재조합되며, 이들은 이후 Winter, G. et al., Ann. Rev. Immunol. 12 (1994) 433-455에 기재된 바와 같이 항원-결합 파지에 대해 스크리닝될 수 있다. 파지는 전형적으로 단쇄 Fv (scFv) 단편 또는 Fab 단편으로서, 항체 단편을 디스플레이한다. 면역화된 공급원 유래의 라이브러리는 하이브리도마 제작 요구없이 면역원에 대한 고친화성 결합 부위를 제공한다. 대안적으로, 나이트 레퍼토리(예를 들어, 인간 유래)는 Griffiths, A.D. et al., EMBO J. 12 (1993) 725-734에 기재된 바와 같이 임의의 면역화없이 광범위한 비-자기- 및 또한 자기-항원에 단일 공급원을 제공하기 위해 클로닝될 수 있다. 마지막으로, 나이트 라이브러리는 또한 Hoogenboom, H.R. and Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388에 기재된 바와 같이, 줄기 세포로부터 비-재배열된 V-유전자 분절을 클로닝하고, 고도의 가변 CDR3 영역을 인코딩하고 시험관 내 재배열을 달성하기 위해 랜덤 서열을 함유하는 PCR 프라이머를 사용함으로써 종합적으로 제조될 수 있다. 인간 항체 파지 라이브러리를 기재하는 특허 공개문헌은, 예를 들어: US 5,750,373, 및 US 2005/0079574, US 2005/0119455, US 2005/0266000, US 2007/0117126, US 2007/0160598, US

2007/0237764, US 2007/0292936, 및 US 2009/0002360을 포함한다.

[0367] 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체 또는 항체 단편은 본원에서 인간 항체 또는 인간 항체 단편으로 간주한다.

[0368] IV. 이중-다량(이량)체화 도메인

[0369] 본원에서 보고되는 바와 같은 다중특이적 항체를 형성하도록 두개의 환형 융합 폴리펩티드의 정확한 회합을 보장하기 위해서 상이한 기술들이 사용될 수 있다. 그들 중 하나가 소위 "노브-인-홀" 조작법이다 (예를 들어, US 5,731,168 참조). 다중환형 융합 폴리펩티드는 또한 Fc-이종이량체 분자의 제조를 위한 정전기 조향 효과의 조작 (WO 2009/089004); 둘 이상의 환형 융합 폴리펩티드의 가교 (예를 들어, US 4,676,980 및 Brennan, M. et al., Science 229 (1985) 81-83 참조); 이중환형 융합 폴리펩티드의 제조를 위해 류신 지퍼의 사용 (예를 들어, Kostelny, S.A. et al., J. Immunol. 148 (1992) 1547-1553 참조)에 의해서도 제조될 수 있다.

[0370] "CH3 도메인" 은 Fc 영역에서 CH2 도메인으로의 잔기 C-말단의 스트레치를 포함한다 (즉, 약 341 위치의 아미노산 잔기로부터 약 447 위치의 아미노산 잔기까지). 본 발명에 따른 항체 내에서, 하나의 각각의 CH3 도메인은 제3 결합 부위의 VH₃ 및 VL₃의 C-말단에 배열된다. 본원의 "CH3 도메인" 은 변이체 CH3 도메인이며, 여기서 천연 CH3 도메인의 아미노산 서열은 다중특이적 항체 내에서 서로 대면하는 2 개의 CH3 도메인의 이량체화를 촉진하기 위해 적어도 하나의 별개의 아미노산 치환 (즉, CH3 도메인의 아미노산 서열의 변형)을 겪었다.

[0371] 이종이량체화를 지지하기 위한 CH3-변형에 대한 여러 접근법이 예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954, WO 2013/096291 에 기재되어 있다.

[0372] 전형적으로, 당업계에 공지된 이종이량체화 접근법에서, 하나의 중쇄의 CH3 도메인 및 다른 중쇄의 CH3 도메인은 둘 다 상보적인 방식으로 조작되어 하나의 조작된 CH3 도메인을 포함하는 중쇄는 더 이상 동일한 구조의 다른 중쇄와 동종이량체화될 수 없다. 그로 인해, 하나의 조작된 CH3 도메인을 포함하는 중쇄는 상보적인 방식으로 조작된 CH3 도메인을 포함하는 다른 중쇄와 이종이량체화되도록 강제된다.

[0373] 당업계에 공지된 하나의 이종이량체화 접근법은 소위 "노브-인투-홀" 기술이며, 예를 들어 본원에 참조로 포함된 WO 96/027011, Ridgway, J.B., et al., Protein Eng. 9 (1996) 617-621; Merchant, A.M., et al., Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681; 및 WO 98/050431 에서 여러 예시를 제공하며 상세하게 기재되어 있다. "노브-인투-홀" 기술에서, 항체의 3차 구조에서 2개의 CH3 도메인 사이에 형성된 계면 내에서, 각각의 CH3 도메인 상의 특정 아미노산은 CH3 도메인 중 하나에서 돌기 ("노브")를 생성하고 CH3 도메인 중 다른 하나에서 공동 ("홀")을 생성하도록 조작된다. 다중특이적 항체의 3차 구조에서 하나의 CH3 도메인에 도입된 돌기는 다른 CH3 도메인에 도입된 공동에 위치될 수 있다.

[0374] 다중특이적 항체의 일 구체예에서, CH3 도메인은 노브-인투-홀 기술에 따라 변경되었다. 상기 구체예에 따른 다중특이적 항체는 본원에서 "CH3(KiH)-조작된 다중특이적 항체" (여기서 약어 "KiH"는 "노브-인투-홀 기술"을 나타냄)로도 지칭된다. 따라서, 본 발명에 따르면 CH3(KiH)-조작된 다중특이적 항체 내 CH3 도메인은 원래 아미노산 잔기보다 더 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 적어도 하나의 원래 아미노산 잔기를 치환함으로써 CH3 도메인 중 하나에서 돌기의 생성; 및 CH3 도메인 중 다른 하나에서 생성된 돌기가 CH3 도메인의 다른 하나에서 생성된 공동에 위치할 수 있도록, 적어도 하나의 원래 아미노산 잔기를 원래 아미노산 잔기보다 더 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 치환함으로써 CH3 도메인 중 다른 하나에서 공동의 생성에 의해 이종이량체화를 촉진하도록 변경된다.

[0375] 다시 말해서, 본 구체예는 항체 불변 도메인 3을 포함하는 제1 폴리펩티드 및 항체 불변 도메인 3을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 본 발명에 따른 CH3(KiH)-조작된 다중특이적 항체에 관한 것으로, 여기서 항체의 3차 구조에서 제1 폴리펩티드의 CH3 도메인 및 제2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 각각의 CH3 도메인 사이에 위치한 계면을 형성하며, 여기서 제1 폴리펩티드의 CH3 도메인 및 제2 폴리펩티드의 CH3 도메인의 각각의 아미노산 서열은 항체의 3차 구조에서 상기 계면 내에 위치한 아미노산 세트를 각각 포함하고,

[0376] - 여기서 하나의 폴리펩티드의 CH3 도메인 내 계면에 위치한 아미노산 세트로부터 적어도 하나의 아미노산 잔기가 원래 아미노산 잔기보다 더 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 치환되어, 계면 내 돌기를 생성하고, 여기서 돌기는 하나의 폴리펩티드의 CH3 도메인 내 위치하며, 여기서 상기 돌기는 계면 내 다른 폴리펩티드의 CH3 도메인에 위치한 공동 내에 위치할 수 있고; 그리고

- [0377] - 여기서 다른 폴리펩티드의 CH3 도메인 내 계면에 위치한 아미노산 세트로부터 적어도 하나의 아미노산 잔기가 원래 아미노산 잔기보다 더 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 치환되어, 계면 내 공동을 생성하고, 여기서 공동은 다른 폴리펩티드의 CH3 도메인 내 위치하며, 여기서 상기 공동에 상기 하나의 폴리펩티드의 CH3 도메인에 위치한 계면 내 돌기가 위치할 수 있다.
- [0378] 본 발명에 따른 상기 CH3(KiH)-조작된 다중특이적 항체의 일 구체예에서 원래 아미노산 잔기보다 더 큰 측쇄 부피를 갖는 상기 아미노산 잔기는 R, F, Y 및 W로부터 선택된다.
- [0379] 본 발명에 따른 상기 CH3(KiH)-조작된 다중특이적 항체의 일 구체예에서 원래 아미노산 잔기보다 더 작은 측쇄 부피를 갖는 상기 아미노산 잔기는 A, S, T 및 V로부터 선택된다.
- [0380] 본 발명에 따른 상기 CH3(KiH)-조작된 다중특이적 항체의 일 구체예에서 원래 아미노산 잔기보다 더 큰 측쇄 부피를 갖는 상기 아미노산 잔기는 R, F, Y 및 W로부터 선택되고; 원래 아미노산 잔기보다 더 작은 측쇄 부피를 갖는 상기 아미노산 잔기는 A, S, T 및 V로부터 선택된다.
- [0381] 본 발명에 따른 상기 CH3(KiH)-조작된 다중특이적 항체의 일 구체예에서, CH3 도메인 중 하나는 T366W 돌연변이를 포함하고, 각각의 다른 CH3 도메인은 T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이 (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)를 포함한다.
- [0382] 본 발명에 따른 상기 CH3(KiH)-조작된 다중특이적 항체의 일 구체예에서, CH3 도메인 중 하나는 T366W 및 G407Y 돌연변이를 포함하고, 각각의 다른 CH3 도메인은 T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이 (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)를 포함한다.
- [0383] 본 발명에 따른 상기 CH3(KiH)-조작된 다중특이적 항체의 다른 구체예에서, CH3 도메인 중 하나는 T366W, R409D 및 K370E 돌연변이를 포함하고, 각각의 다른 CH3 도메인은 T366S, L368A, Y407V, D399K 및 E357K 돌연변이 (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)를 포함한다.
- [0384] 상기 정의된 바와 같은 노브-인트루-홀 기술에 따른 변형에 대안으로 또는 조합하여, 본 발명에 따른 다중특이적 항체의 CH3 도메인은 당업계에 공지된 다른 이중이량체화 접근법, 바람직하게는 WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954 및 WO 2013/096291에 기재된 것에 기초하여 이중이량체화를 촉진하도록 변경된다.
- [0385] 다중특이적 항체의 다른 구체예에서, 노브-인트루-홀 기술에 따른 변형에 대안적으로 또는 조합하여 CH3 도메인은 CH3/CH3-도메인-계면의 특정 아미노산 위치에서 반대 전하를 갖는 하전된 아미노산의 도입 (예를 들어, EP 1870459에 기재된 바와 같음)에 의해 변경된다. 본 구체예에 따른 다중특이적 항체는 본원에서 또한 "CH3(+/-)-조작된 다중특이적 항체" (여기서 약어 "+/-" 는 각각의 CH3 도메인에서 도입된 반대 대전된 아미노산을 지칭함) 를 지칭한다. 따라서, CH3(+/-)-조작된 다중특이적 항체 내에서 본 구체예에 따르면 CH3 도메인은 CH3 도메인 중 하나에서 적어도 하나의 원래 아미노산 잔기를 양전하 아미노산으로 치환; 및 CH3 도메인 중 다른 하나에서 적어도 하나의 원래 아미노산 잔기를 음전하 아미노산으로 치환에 의해 이중이량체화를 촉진하도록 변경된다.
- [0386] 다시 말해서, 본 구체예는 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 본 발명에 따른 CH3(+/-)-조작된 다중특이적 항체에 관한 것이고, 여기서 상기 항체의 3차 구조에서 제1 폴리펩티드의 CH3 도메인 및 제2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 각각의 항체 CH3 도메인 사이에 위치한 계면을 형성하고, 여기서 제1 폴리펩티드의 CH3 도메인 및 제2 폴리펩티드의 CH3 도메인의 각각의 아미노산 서열은 각각 항체의 3차 구조에서 상기 계면 내 위치한 아미노산 세트를 포함하고, 여기서 하나의 폴리펩티드의 CH3 도메인 내 계면에 위치한 아미노산 세트로부터 제1 아미노산은 양전하 아미노산으로 치환되고, 다른 폴리펩티드의 CH3 도메인 내 계면에 위치한 아미노산 세트로부터 제2 아미노산은 음전하 아미노산으로 다른 중쇄의 CH3 도메인 내 경계면에 위치된 아미노산 세트로부터 제2 아미노산이 음전하 아미노산으로 치환된다.
- [0387] 본 발명에 따른 상기 CH3(+/-)-조작된 다중특이적 항체의 일 구체예에서 양전하 아미노산은 K, R 및 H 로부터 선택되고; 음전하 아미노산은 E 또는 D 로부터 선택된다.
- [0388] 본 발명에 따른 상기 CH3(+/-)-조작된 다중특이적 항체의 일 구체예에서 양전하 아미노산은 K 및 R 로부터 선택되고; 음전하 아미노산은 E 또는 D 로부터 선택된다.
- [0389] 본 발명에 따른 상기 CH3(+/-)-조작된 다중특이적 항체의 일 구체예에서 양전하 아미노산은 K 이고; 음전하 아

미노산은 E 이다.

- [0390] CH3 도메인 중 하나에서 본 발명에 따른 상기 CH3 (+/-)-조작된 다중특이적 항체의 일 구체예에서 위치 409의 아미노산 R (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)은 D로 치환되고 위치 370의 아미노산 K (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)은 E로 치환되고; 각각의 다른 CH3 도메인에서 위치 399의 아미노산 D (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)은 K로 치환되고 위치 357의 아미노산 E (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)은 K로 치환된다.
- [0391] 다중특이적 항체의 다른 구체예에서, CH3 도메인은 이황화 안정화된다. 본 구체예에 따른 다중특이적 항체는 본원에서 "CH3(S-S)-조작된 다중특이적 항체" (여기서 약어 "S-S"는 이황화 안정화를 나타냄)로도 지칭된다. 따라서, CH3(S-S)-조작된 다중특이적 항체 내에서 본 구체예에 따르면 CH3 도메인은 CH3 도메인 사이에 디설피드 결합이 형성되도록 각각의 CH3 도메인에 적어도 하나의 시스테인 잔기를 도입함으로써 이중이량체화를 촉진하도록 변경된다.
- [0392] 다시 말해서, 본 구체예는 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 본 발명에 따른 CH3(S-S)-조작된 다중특이적 항체에 관한 것으로, 여기서 상기 항체의 3차 구조에서 제1 폴리펩티드의 CH3 도메인 및 제2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 각각의 항체 CH3 도메인 사이에 위치한 계면을 형성하고, 여기서 제1 폴리펩티드의 CH3 도메인 및 제2 폴리펩티드의 CH3 도메인 각각의 아미노산 서열은 각각 항체의 3차 구조의 상기 계면 내 위치한 아미노산 세트를 포함하고, 하나의 폴리펩티드의 CH3 도메인의 계면 내 위치한 아미노산 세트로부터 제1 아미노산은 시스테인으로 치환되고; 다른 폴리펩티드의 CH3 도메인의 계면에 위치한 아미노산 세트로부터 제2 아미노산이 시스테인으로 치환되고, 여기서 제2 아미노산은 계면 내에서 제1 아미노산과 마주보고, 하나의 폴리펩티드의 CH3 도메인과 다른 폴리펩티드의 CH3 도메인 사이의 이황화 가교는 도입된 시스테인 잔기를 통해 형성될 수 있다.
- [0393] CH3(S-S)-조작된 다중특이적 항체의 일 구체예에서 CH3 도메인은 CH3 도메인 중 하나에서 E356C 또는 S354C 돌연변이에 의해 이황화 안정화되고 다른 CH3 도메인에서 Y349C 돌연변이에 의해 안정화된다 (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정). CH3(S-S)-조작된 다중특이적 항체의 일 구체예에서 CH3 도메인은 CH3 도메인 중 하나에서 S354C 돌연변이 및 다른 CH3 도메인에서 Y349C 돌연변이에 의해 이황화 안정화된다 (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정).
- [0394] 다중특이적 항체의 또 다른 바람직한 구체예에서, CH3 도메인은 노브-인투-홀 기술에 따라 이황화 안정화되고 변경된다. 본 구체예에 따른 다중특이적 항체는 본원에서 "CH3(KSS)-조작된 다중특이적 항체" (여기서 약어 "K"는 노브-인투-홀 기술을 나타내고 "SS"는 이황화 안정화를 나타냄)로도 지칭된다. 따라서, 본 구체예에 따르면, CH3(KSS)-조작된 다중특이적 항체 내 CH3 도메인은 원래 아미노산 잔기보다 더 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 적어도 하나의 원래 아미노산 잔기를 치환함으로써 CH3 도메인 중 하나에서 돌기의 생성; 및 CH3 도메인 중 하나에서 생성된 돌기가 CH3 도메인의 다른 하나에서 생성된 공동에 위치할 수 있도록, 적어도 하나의 원래 아미노산 잔기를 원래 아미노산 잔기보다 더 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 치환함으로써 CH3 도메인 중 다른 하나에서 공동의 생성; 및 CH3 도메인 사이에 디설피드 결합이 형성되도록 각각의 CH3 도메인에서 적어도 하나의 시스테인 잔기의 도입에 의해 이중이량체화를 촉진하도록 변경된다.
- [0395] 다시 말해서, 본 구체예는 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 본 발명에 따른 CH3(KSS)-조작된 다중특이적 항체에 관한 것으로, 여기서 항체의 3차 구조에서 제1 폴리펩티드의 CH3 도메인 및 제2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 각각의 항체 CH3 도메인 사이에 위치한 계면을 형성하며, 여기서 제1 폴리펩티드의 CH3 도메인 및 제2 폴리펩티드의 CH3 도메인의 각각의 아미노산 서열은 항체의 3차 구조에서 상기 계면 내에 위치한 아미노산 세트를 각각 포함하고,
- [0396] - 여기서 하나의 폴리펩티드의 CH3 도메인 내 계면에 위치한 아미노산 세트로부터 적어도 하나의 아미노산 잔기가 원래 아미노산 잔기보다 더 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 치환되어, 계면 내 돌기를 생성하고, 여기서 돌기는 하나의 폴리펩티드의 CH3 도메인 내 위치하며, 여기서 상기 돌기는 계면 내 다른 폴리펩티드의 CH3 도메인에 위치한 공동 내에 위치할 수 있고; 그리고
- [0397] - 여기서 다른 폴리펩티드의 CH3 도메인의 계면에 위치하는 아미노산 세트로부터 적어도 하나의 아미노산 잔기가 원래 아미노산 잔기보다 더 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 치환되어, 계면 내의 공동을 생성하고, 여기서 공동은 다른 폴리펩티드의 CH3 도메인에 위치하며, 공동 내에서 하나의 폴리펩티드의 CH3 도메인에 위치한 계면 내의 돌기가 위치할 수 있고; 그리고 여기서
- [0398] - 하나의 폴리펩티드의 CH3 도메인의 계면에 위치한 아미노산 세트로부터 제1 아미노산이 시스테인으로 치환되

고; 그리고 다른 폴리펩티드의 CH3 도메인의 계면에 위치한 아미노산 세트로부터 제2 아미노산이 시스테인으로 치환되고, 여기서 제2 아미노산은 계면 내에서 제1 아미노산을 향하고; 하나의 폴리펩티드의 CH3 도메인과 다른 폴리펩티드의 CH3 도메인 사이의 이황화 가교가 도입된 시스테인 잔기를 통해 형성될 수 있다.

- [0399] 본 발명에 따른 상기 CH3(KSS)-조작된 다중특이적 항체의 일 구체예에서 E356C 또는 S354C 돌연변이는 "노브" 사슬의 CH3 도메인에 도입되고 Y349C 돌연변이는 "홀" 사슬의 CH3 도메인에 도입된다.
- [0400] 본 발명에 따른 상기 CH3(KSS)-조작된 다중특이적 항체의 일 구체예에서 원래 아미노산 잔기보다 더 큰 측쇄 부피를 갖는 상기 아미노산 잔기는 R, F, Y 및 W로부터 선택된다.
- [0401] 본 발명에 따른 상기 CH3(KSS)-조작된 다중특이적 항체의 일 구체예에서 원래 아미노산 잔기보다 더 작은 측쇄 부피를 갖는 상기 아미노산 잔기는 A, S, T 및 V로부터 선택된다.
- [0402] 본 발명에 따른 상기 CH3(KSS)-조작된 다중특이적 항체의 일 구체예에서 원래 아미노산 잔기보다 더 큰 측쇄 부피를 갖는 상기 아미노산 잔기는 R, F, Y 및 W로부터 선택되고; 원래 아미노산 잔기보다 더 작은 측쇄 부피를 갖는 상기 아미노산 잔기는 A, S, T 및 V로부터 선택된다.
- [0403] 본 발명에 따른 상기 CH3(KSS)-조작된 다중특이적 항체의 일 구체예에서 원래 아미노산 잔기보다 더 큰 측쇄 부피를 갖는 상기 아미노산 잔기는 R, F, Y 및 W로부터 선택되고; 원래 아미노산 잔기보다 더 작은 측쇄 부피를 갖는 상기 아미노산 잔기는 A, S, T 및 V로부터 선택되고, CH3 도메인은 CH3 도메인 중 하나에서 E356C 또는 S354C 돌연변이(일 구체예에서 S354C 돌연변이) 및 다른 CH3 도메인에서 Y349C 돌연변이(카밧의 EU 지수에 따른 번호지정)에 의해 이황화 안정화된다.
- [0404] 본 발명에 따른 상기 CH3(KSS)-조작된 다중특이적 항체의 일 구체예에서, 하나의 폴리펩티드의 CH3 도메인("노브"를 포함하는 폴리펩티드)은 T366W 돌연변이를 포함하고, 다른 폴리펩티드의 CH3 도메인("홀"을 포함하는 폴리펩티드)은 T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이(카밧의 EU 지수에 따른 번호지정)를 포함하고, CH3 도메인은 CH3 도메인 중 하나에서 E356C 또는 S354C 돌연변이(일 구체예에서 S354C 돌연변이) 및 다른 CH3 도메인에서의 Y349C 돌연변이(카밧의 EU 지수에 따른 번호지정)에 의해 이황화 안정화된다.
- [0405] 본 발명에 따른 상기 CH3(KSS)-조작된 다중특이적 항체의 일 구체예에서, 하나의 폴리펩티드의 CH3 도메인("노브"를 포함하는 폴리펩티드)은 T366W 및 G407V 돌연변이를 포함하고, 다른 폴리펩티드의 CH3 도메인("홀"을 포함하는 폴리펩티드)은 T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이(카밧의 EU 지수에 따른 번호지정)를 포함하고, CH3 도메인은 CH3 도메인 중 하나에서 E356C 또는 S354C 돌연변이(일 구체예에서 S354C 돌연변이) 및 다른 CH3 도메인에서의 Y349C 돌연변이(카밧의 EU 지수에 따른 번호지정)에 의해 이황화 안정화된다.
- [0406] 본 발명에 따른 상기 CH3(KSS)-조작된 다중특이적 항체의 다른 구체예에서, 하나의 폴리펩티드의 CH3 도메인("노브"를 포함하는 폴리펩티드)은 T366W, R409D 및 K370E 돌연변이를 포함하고, 다른 폴리펩티드의 CH3 도메인("홀"을 포함하는 폴리펩티드)은 T366S, L368A, Y407V, D399K 및 E357K 돌연변이(카밧의 EU 지수에 따른 번호지정)를 포함하고, CH3 도메인은 CH3 도메인 중 하나에서 E356C 또는 S354C 돌연변이(일 구체예에서 S354C 돌연변이) 및 Y349C 돌연변이(카밧의 EU 지수에 따른 번호지정)에 의해 이황화 안정화된다.
- [0407] 다중특이적 항체의 또 다른 바람직한 구체예에서, CH3 도메인은 이황화 안정화되고 CH3/CH3-도메인-인터페이스의 특정 아미노산 위치에서 반대 전하를 갖는 하전된 아미노산의 도입에 의해 변경된다. 본 구체예에 따른 다중특이적 항체는 본원에서 또한 "CH3(+/-/SS)-조작된 다중특이적 항체"(여기서 약어 "+/-"는 반대 전하의 아미노산을 나타내고 "SS"는 이황화 안정화를 나타냄)로도 지칭된다. 따라서, 본 구체예에 따르면, CH3(+/-/SS)-조작된 다중특이적 항체 내에서 CH3 도메인은 CH3 도메인 중 하나에서 적어도 하나의 원래 아미노산 잔기를 양전하 아미노산으로 치환; 및 CH3 도메인 중 다른 하나에서 적어도 하나의 원래 아미노산 잔기를 음전하 아미노산으로 치환; 및 CH3 도메인 사이에 디설피드 결합이 형성되도록 각각의 CH3 도메인에 적어도 하나의 시스테인 잔기의 추가적인 도입에 의해 이중이황체화를 촉진하도록 변경된다.
- [0408] 다시 말해서, 본 구체예는 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 본 발명에 따른 CH3(+/-/SS)-조작된 다중특이적 항체에 관한 것으로, 여기서 항체의 3차 구조에서 제1 폴리펩티드의 CH3 도메인 및 제2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 각각의 항체 CH3 도메인 사이에 위치한 계면을 형성하며, 여기서 제1 폴리펩티드의 CH3 도메인 및 제2 폴리펩티드의 CH3 도메인의 각각의 아미노산 서열은 항체의 3차 구조에서 상기 계면 내에 위치한 아미노산 세트를 각각 포함하고,
- [0409] - 여기서 하나의 폴리펩티드의 CH3 도메인의 계면에 위치한 아미노산 세트로부터 제1 아미노산은 양전하 아미노

산으로 치환되고; 그리고

- [0410] - 여기서 다른 폴리펩티드의 CH₃ 도메인의 계면에 위치한 아미노산 세트로부터 제2 아미노산은 음전하 아미노산으로 치환되고; 그리고 여기서
- [0411] - 하나의 폴리펩티드의 CH₃ 도메인의 계면에 위치한 아미노산 세트로부터 제1 아미노산이 시스테인으로 치환되고; 그리고 다른 폴리펩티드의 CH₃ 도메인의 계면에 위치한 아미노산 세트로부터 제2 아미노산이 시스테인으로 치환되고, 여기서 제2 아미노산은 계면 내에서 제1 아미노산을 향하고; 하나의 폴리펩티드의 CH₃ 도메인과 다른 폴리펩티드의 CH₃ 도메인 사이의 이황화 가교가 도입된 시스테인 잔기를 통해 형성될 수 있다.
- [0412] 본 발명의 일 구체예에서, 다중특이적 항체의 제3 결합부위는 이황화 안정화된다. 따라서, VH₃ 및 VL₃ 도메인은 VH₃ 도메인에서 적어도 하나의 시스테인 잔기 및 VL₃ 도메인에서 하나의 시스테인 잔기에서의 도입에 의해 변경되고 이러한 디설피드 결합은 VH₃ 및 VL₃ 도메인 사이에서 형성된다. 본 발명의 일 구체예에서, 다중특이적 항체의 제3 결합 부위는 VH₃ 및 VL₃ 도메인 사이에 디설피드 결합을 형성하기 위해 하기 위치에서 서로 독립적으로 시스테인 잔기를 도입함으로써 이황화 안정화된다 (카밧에 따른 번호지정):
- [0413] - 위치 44의 VH₃, 및 위치 100의 VL₃;
- [0414] - 위치 105의 VH₃, 및 위치 43의 VL₃; 또는
- [0415] - 위치 101의 VH₃, 및 위치 100의 VL₃.
- [0416] 바람직한 일 구체예에서 제3 결합 부위는 위치 44의 VH₃ 도메인 및 위치 100의 VL₃ 도메인에서 시스테인 잔기의 도입에 의해 이황화 안정화된다.
- [0417] 본 발명의 바람직한 일 구체예에서, 다중특이적 항체의 제3 결합 부위는 이황화 안정화되고 CH₃ 도메인은 이황화 안정화된다.
- [0418] 이러한 이론에 구속되지 않고, 본 발명에 따른 다중특이적 항체의 변형된 폴리펩티드의 상이한 도메인에서 이러한 변형에 의해 형성된 적어도 2 개의 이황화 결합은 야생형 IgG 힌지 이황화 상호작용을 대체하고, 이에 의해 항원이 제3 결합 부위에 접근하는 것을 허용하면서 이중이량체화를 지지한다.
- [0419] 본 발명의 일 구체예에서, 다중특이적 항체의 제1 및/또는 제2 결합 부위는 또한 VH와 VL 도메인 사이에 디설피드 결합을 형성하기 위해 하기 위치에서 서로 독립적으로 시스테인 잔기를 도입함으로써 이황화 안정화된다 (카밧에 따른 번호지정):
- [0420] - 위치 44의 VH, 및 위치 100의 VL;
- [0421] - 위치 105의 VH, 및 위치 43의 VL; 또는
- [0422] - 위치 101의 VH, 및 위치 100의 VL.
- [0423] 일 구체예에서, 본 발명에 따른 CH₃(S-S)-조작된 다중특이적 항체의 제3 결합 부위는 VH₃ 및 VL₃ 도메인 사이에 디설피드 결합을 형성하기 위해 하기 위치에서 서로 독립적으로 시스테인 잔기를 도입함으로써 이황화 안정화된다 (카밧에 따른 번호지정):
- [0424] - 위치 44의 VH₃, 및 위치 100의 VL₃;
- [0425] - 위치 105의 VH₃, 및 위치 43의 VL₃; 또는
- [0426] - 위치 101의 VH₃, 및 위치 100의 VL₃.
- [0427] 본 발명의 바람직한 일 구체예에서, 본 발명에 따른 CH₃(S-S)-조작된 다중특이적 항체의 제3 결합 부위는 위치 44의 VH₃ 도메인 및 위치 100의 VL₃ 도메인에서 시스테인 잔기의 도입에 의해 이황화 안정화된다.
- [0428] 본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명에 따른 CH₃(S-S)-조작된 다중특이적 항체의 제3 결합 부위는 위치 44의 VH₃ 도메인 및 위치 100의 VL₃ 도메인에 시스테인 잔기의 도입에 의해 이황화 안정화되고; CH₃ 도메인은 CH₃ 도메인 중 하나에서 E356C 또는 S354C 돌연변이 및 다른 CH₃ 도메인에서 Y349C 돌연변이에 의해 이황화 안

정화된다 (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정).

- [0429] 본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 이중이량체화는 CH₃ 도메인 내에서 노브-인투-홀 변형에 의해 지지되며, 또한, 다중특이적 항체의 제3 결합 부위 및 CH₃ 도메인은 각각, 이황화 안정화된다. 본 구체예에 따른 다중 특이적 항체에서, 노브-인투-홀 변형된 중쇄의 이중이량체화는 인공 쇠간 디설피드 결합에 의해 추가로 지지되며, 이는 - 공지된 노브-인투-홀 접근법과 달리 - CH₃ 도메인이 아닌, 상이한 도메인 내 (즉, VH₃ 및 VL₃ 도메인 사이)에 위치한다. 본 구체예에 따른 항체 내 제3 결합 모듈의 이중이량체화 (VH₃-CH₃ 및 VL₃-CH₃ 폴리펩티드를 포함함)는 4가지 뚜렷한 상호 작용에 의해 촉진된다: (i) VH₃ 및 VL₃ 간의 자연스러운 상호작용, (ii) VH₃/VL₃ 계면에서의 이황화 안정화, (iii) CH₃/CH₃ 계면에서의 이황화 안정화; 및 (iv) CH₃/CH₃ 계면에서의 노브-인투-홀 변형. 이에 의해, 이중이량체의 형성은 동종이량체 형성보다 촉진되고 항체의 안정성이 향상된다.
- [0430] 일 구체예에서, 본 발명에 따른 CH₃(KSS)-조작된 다중특이적 항체의 제3 결합 부위는 VH₃ 및 VL₃ 도메인 사이에 디설피드 결합을 형성하기 위해 하기 위치에서 서로 독립적으로 시스테인 잔기를 도입함으로써 이황화 안정화된 다 (카바트에 따른 번호지정):
- [0431] - 위치 44의 VH₃, 및 위치 100의 VL₃;
- [0432] - 위치 105의 VH₃, 및 위치 43의 VL₃; 또는
- [0433] - 위치 101의 VH₃, 및 위치 100의 VL₃.
- [0434] 본 발명의 하나의 바람직한 구체예에서, 본 발명에 따른 CH₃(KSS)-조작된 다중특이적 항체의 제3 결합 부위는 위치 44의 VH₃ 도메인 및 위치 100의 VL₃ 도메인에서 시스테인 잔기의 도입에 의해 이황화 안정화된다.
- [0435] 본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명에 따른 CH₃(KSS)-조작된 다중특이적 항체의 제3 결합 부위는 위치 44의 VH₃ 도메인 및 위치 100의 VL₃ 도메인에서 시스테인 잔기의 도입에 의해 이황화 안정화되고; 원래 아미노산 잔기보다 더 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기는 R, F, Y 및 W로부터 선택되고; 원래 아미노산 잔기보다 더 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기는 A, S, T 및 V로부터 선택되고, CH₃ 도메인은 CH₃ 도메인 중 하나에서 E356C 또는 S354C 돌연변이(일 구체예에서 S354C 돌연변이) 및 다른 CH₃ 도메인에서 Y349C 돌연변이 (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)에 의해 이황화 안정화된다.
- [0436] 본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명에 따른 CH₃(KSS)-조작된 다중특이적 항체의 제3 결합 부위는 위치 44의 VH₃ 도메인 및 위치 100의 VL₃ 도메인에서 시스테인 잔기의 도입에 의해 이황화 안정화되고; 하나의 폴리펩티드의 CH₃ 도메인 ("노브"를 포함하는 폴리펩티드)은 T366W 돌연변이를 포함하고, 다른 폴리펩티드의 CH₃ 도메인 ("홀"을 포함하는 폴리펩티드)은 T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이 (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)를 포함하고, CH₃ 도메인은 CH₃ 도메인 중 하나에서 E356C 또는 S354C 돌연변이 (일 구체예에서 S354C 돌연변이) 및 다른 CH₃ 도메인에서의 Y349C 돌연변이 (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)에 의해 이황화 안정화된다.
- [0437] 본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명에 따른 CH₃(KSS)-조작된 다중특이적 항체의 제3 결합 부위는 위치 44의 VH₃ 도메인 및 위치 100의 VL₃ 도메인에서 시스테인 잔기의 도입에 의해 이황화 안정화되고; 하나의 폴리펩티드의 CH₃ 도메인 ("노브"를 포함하는 폴리펩티드)은 T366W 및 G407Y 돌연변이를 포함하고, 다른 폴리펩티드의 CH₃ 도메인 ("홀"을 포함하는 폴리펩티드)은 T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이 (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)를 포함하고, CH₃ 도메인은 CH₃ 도메인 중 하나에서 E356C 또는 S354C 돌연변이 (일 구체예에서 S354C 돌연변이) 및 다른 CH₃ 도메인에서의 Y349C 돌연변이 (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)에 의해 이황화 안정화된다.
- [0438] 본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명에 따른 CH₃(KSS)-조작된 다중특이적 항체의 제3 결합 부위는 위치 44의 VH₃ 도메인 및 위치 100의 VL₃에서 시스테인 잔기의 도입에 의해 이황화 안정화되고; 하나의 폴리펩티드의 CH₃ 도메인 ("노브"를 포함하는 폴리펩티드)은 T366W, R409D 및 K370E 돌연변이를 포함하고, 다른 폴리펩티드의 CH₃ 도메인 ("홀"을 포함하는 폴리펩티드)은 T366S, L368A, Y407V, D399K 및 E357K 돌연변이 (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)를 포함하고, CH₃ 도메인은 CH₃ 도메인 중 하나에서 E356C 또는 S354C 돌연변이 (일 구체예에서 S354C 돌연변이) 및 Y349C 돌연변이 (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)에 의해 이황화 안정화된다.

- [0439] 본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 이중이량체화는 그만큼 CH3/CH3-도메인-계면의 특정 아미노산 위치에서 반대 전하를 갖는 하전된 아미노산의 도입에 의해 지지되고, 추가로 다중특이적 항체의 제3 결합 부위 및 CH3 도메인은 각각 이항화 안정화된다. 본 구체예에 따른 다중특이적 항체에서, 변형된 폴리펩티드의 이중이량체화는 인공 쇄간 디설피드 결합에 의해 추가로 지지되며, 이는 CH3 도메인이 아닌, 상이한 도메인 내 (즉, VH₃ 및 VL₃ 도메인 사이)에 위치한다. 일 구체예에서, 본 발명에 따른 CH3(+/-/SS)-조작된 다중특이적 항체의 제3 결합 부위는 VH₃ 및 VL₃ 도메인 사이에 디설피드 결합을 형성하기 위해 하기 위치에서 시스테인 잔기의 도입에 의해 이항화 안정화된다 (카밧에 따른 번호지정):
- [0440] - 위치 44의 VH₃, 및 위치 100의 VL₃;
- [0441] - 위치 105의 VH₃, 및 위치 43의 VL₃; 또는
- [0442] - 위치 101의 VH₃, 및 위치 100의 VL₃.
- [0443] 본 발명의 바람직한 일 구체예에서, 본 발명에 따른 CH3(+/-/SS)-조작된 다중특이적 항체의 제3 결합 부위는 위치 44의 VH₃ 도메인 및 위치 100의 VL₃ 도메인에서 시스테인 잔기의 도입에 의해 이항화 안정화된다.
- [0444] 이중이량체화를 강제하기 위해 다중특이적 항체의 중쇄의 CH3 도메인을 변형시키기 위한 추가 기술 ("노브-인투-홀" 기술을 제외함)이 당업계에 공지되어 있다. 이들 기술, 특히 WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954 및 WO 2013/096291 에 기재된 것들은 본원에 따른 다중특이적 항체와 조합하여 "노브-인투-홀 기술"에 대한 대안으로서 본원에서 고려된다. 이중이량체화를 지지하기 위해 이들 변형 중 하나를 포함하는 다중특이적 항체는 본원에서 "CH3-조작된" 다중특이적 항체로서 추가로 지칭된다.
- [0445] EP 1870459 에 기재된 접근법에 따르면 CH3 도메인의 이중이량체화는 CH3/CH3-도메인-계면에서 제1 및 제2 중쇄들 다 사이의 CH3/CH3-도메인-계면에서 특정 아미노산 위치에서 반대 전하를 갖는 하전된 아미노산의 도입에 기초한다 (본원에서 "CH3(+/-)-조작된 다중특이적 항체"로 추가로 지칭됨).
- [0446] 본 발명에 따른 다중특이적 항체의 일 구체예에서 WO 2013/157953 에 기재된 접근법은 다중특이적 항체의 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드의 이중이량체화를 지지하는데 사용된다. 본 발명에 따른 상기 CH3-조작된 다중특이적 항체의 일 구체예에서, 하나의 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 366의 아미노산 T (카밧의 EU 지수에 따른 번호지정)는 K로 치환되고; 다른 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 351의 아미노산 L (카밧의 EU 지수에 따른 번호지정)은 D로 치환된다. 본 발명에 따른 상기 CH3-조작된 다중특이적 항체의 다른 구체예에서, 위치 366의 아미노산 T (카밧의 EU 지수에 따른 번호지정)는 K로 치환되고 위치 351의 아미노산 L (카밧의 EU 지수에 따른 번호지정)은 K로 치환되며; 다른 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 351의 아미노산 L (카밧의 EU 지수에 따른 번호지정)은 D로 치환된다.
- [0447] 본 발명에 따른 상기 CH3-조작된 다중특이적 항체의 다른 구체예에서, 하나의 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 366의 아미노산 T (카밧의 EU 지수에 따른 번호지정)는 K로 치환되고 위치 351의 L (카밧의 EU 지수에 따른 번호지정)은 K로 치환되며; 그리고 다른 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 351의 아미노산 L (카밧의 EU 지수에 따른 번호지정)은 D로 치환된다. 추가로 하기 치환 중에서 적어도 하나는 다른 폴리펩티드의 CH3 도메인에 포함된다: 위치 349에서의 아미노산 Y (카밧의 EU 지수에 따른 번호지정)는 E로 치환되고, 위치 349에서의 아미노산 Y (카밧의 EU 지수에 따른 번호지정)는 D로 치환되고 위치 368에서의 아미노산 L (카밧의 EU 지수에 따른 번호지정)은 E로 치환된다. 일 구체예에서 위치 368의 아미노산 L (카밧의 EU 지수에 따른 번호지정)은 E로 치환된다.
- [0448] 본 발명에 따른 다중특이적 항체의 일 구체예에서 WO 2012/058768 에 기재된 접근법은 다중특이적 항체의 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드의 이중이량체화를 지지하는데 사용된다. 본 발명에 따른 상기 CH3-조작된 다중특이적 항체의 일 구체예에서, 하나의 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 351의 아미노산 L (카밧의 EU 지수에 따른 번호지정)은 Y로 치환되고 위치 407의 아미노산 Y (카밧의 EU 지수에 따른 번호지정)은 A로 치환되고; 다른 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 366의 아미노산 T (카밧의 EU 지수에 따른 번호지정)는 A로 치환되고 위치 409의 아미노산 K (카밧의 EU 지수에 따른 번호지정)는 F로 치환된다. 다른 구체예에서, 상기 언급된 치환에 더하여, 다른 폴리펩티드의 CH3 도메인 내 위치 411 (원래 T), 399 (원래 D), 400 (원래 S), 405 (원래

F), 390 (원래 N) 및 392 (원래 K)에서 적어도 하나의 아미노산이 치환된다. 바람직한 치환은 하기와 같다:

- [0449] - 위치 411의 아미노산 T (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)를 N, R, Q, K, D, E 및 W로부터 선택된 아미노산으로 치환;
- [0450] - 위치 399의 아미노산 D (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)를 R, W, Y 및 K로부터 선택된 아미노산으로 치환;
- [0451] - 위치 400의 아미노산 S (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)를 E, D, R 및 K로부터 선택된 아미노산으로 치환;
- [0452] - 위치 405의 아미노산 F (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)를 I, M, T, S, V 및 W로부터 선택된 아미노산으로 치환;
- [0453] - 위치 390의 아미노산 N (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)을 R, K 및 D로부터 선택된 아미노산으로 치환; 및
- [0454] - 위치 392의 아미노산 K (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)를 V, M, R, L, F 및 E로부터 선택된 아미노산으로 치환.
- [0455] 본 발명에 따른 상기 CH3-조작된 다중특이적 항체 (WO 2012/058768에 따라 조작됨)의 다른 구체예에서, 하나의 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 351의 아미노산 L (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)은 Y로 치환되고 위치 407의 아미노산 Y (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)는 A로 치환되며; 다른 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 366의 아미노산 T (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)는 V로 치환되고 위치 409의 아미노산 K (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)는 F로 치환된다. 본 발명에 따른 상기 CH3-조작된 다중특이적 항체의 다른 구체예에서, 하나의 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 407의 아미노산 Y (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)는 A로 치환되고; 다른 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 366의 아미노산 T (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)는 A로 치환되고 위치 409의 아미노산 K (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)는 F로 치환된다. 상기 마지막으로 위에서 언급한 구체예에서, 상기 다른 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 392의 아미노산 K (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)는 E로 치환되고, 위치 411의 아미노산 T (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)는 E로 치환되고, 위치 399의 아미노산 D (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)는 R로 치환되고 위치 400의 아미노산 S (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)는 R로 치환된다.
- [0456] 본 발명에 따른 다중특이적 항체의 일 구체예에서 WO 2011/143545 에 기재된 접근법은 다중특이적 항체의 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드의 이중이량체화를 지지하는데 사용된다. 본 발명에 따른 상기 CH3-조작된 다중특이적 항체의 일 구체예에서, 양 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 아미노산 변형은 위치 368 및/또는 409 에서 도입된다.
- [0457] 본 발명에 따른 다중특이적 항체의 일 구체예에서 WO 2011/090762 에 기재된 접근법은 다중특이적 항체의 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드의 이중이량체화를 지지하는데 사용된다. WO 2011/090762는 "노브-인투-홀" 기술에 따른 아미노산 변형에 관한 것이다. 본 발명에 따른 CH3(KiH)-조작된 다중특이적 항체의 일 구체예에서, 하나의 폴리펩티드의 CH3 도메인 내 위치 366의 아미노산 T (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)는 W로 치환되고; 다른 폴리펩티드의 CH3 도메인 내 위치 407의 아미노산 Y (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)는 A로 치환된다. 본 발명에 따른 상기 CH3(KiH)-조작된 다중특이적 항체의 다른 구체예에서, 하나의 폴리펩티드의 CH3 도메인 내 위치 366의 아미노산 T (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)는 Y로 치환되고; 다른 폴리펩티드의 CH3 도메인 내 위치 407의 아미노산 Y (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)는 T로 치환된다.
- [0458] 본 발명에 따른 다중특이적 항체의 일 구체예에서, 이것은 IgG2 이소타입이고, WO 2011/090762 에 기재된 접근법은 다중특이적 항체의 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드의 이중이량체화를 지지하는데 사용된다.
- [0459] 본 발명에 따른 다중특이적 항체의 일 구체예에서, WO 2009/089004 에 기재된 접근법은 다중특이적 항체의 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드의 이중이량체화를 지지하는데 사용된다. 본 발명에 따른 상기 CH3-조작된 다중특이적 항체의 일 구체예에서, 하나의 폴리펩티드의 CH3 도메인 내 위치 392의 아미노산 K 또는 N (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)은 음전하 아미노산 (하나의 바람직한 구체예에서 E 또는 D, 하나의 바람직한 구체예에서 D) 으로 치환되고; 다른 폴리펩티드의 CH3 도메인 내 위치 399의 아미노산 D 위치 356의 아미노산 E 또는 D 또는 위치 357의 아미노산 E (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)는 양전하 아미노산 (바람직한 일 구체예에서 K 또는 R, 바람직한 일 구체예에서 K, 바람직한 일 구체예에서 위치 399 또는 356의 아미노산은 K로 치환됨)으로 치환된다. 추가의 일 구체예에서, 상기에 언급된 치환 이외에도, 하나의 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 409의 아미노산 K 또는 R (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)은 음전하 아미노산 (하나의 바람직한 구체예에서 E 또는 D, 하나의 바람직한 구체예에서 D)으로 치환된다. 보다 추가의 일 구체예에서, 상기 언급된 치환 이외

에 또는 대안적으로, 하나의 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 439의 아미노산 K 및/또는 위치 370의 아미노산 K (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)는 서로 독립적으로 음전하 아미노산 (하나의 바람직한 구체예에서 E 또는 D, 하나의 바람직한 구체예에서 D)으로 치환된다.

[0460] 본 발명에 따른 다중특이적 항체의 일 구체예에서, WO 2007/147901 에 기재된 접근법은 다중특이적 항체의 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드의 이중이량체화를 지지하는데 사용된다. 본 발명에 따른 Ch3-조작된 다중특이적 항체의 일 구체예에서, 하나의 폴리펩티드의 CH3 도메인 내 위치 253의 아미노산 K (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)는 E로 치환되고, 위치 282의 아미노산 D (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)는 K로 치환되고 위치 322의 아미노산 K (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)는 D로 치환되며; 다른 폴리펩티드의 CH3 도메인 내 위치 239의 아미노산 D (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)는 K로 치환되고, 위치 240의 아미노산 E (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)는 K로 치환되고 위치 292의 아미노산 K (카바트의 EU 지수에 따른 번호지정)는 D로 치환된다.

[0461] 본 발명에 따른 다중특이적 항체의 일 구체예에서, WO 2007/110205 에 기재된 접근법은 다중특이적 항체의 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드의 이중이량체화를 지지하는데 사용된다.

[0462] 상기 확인된 이중이량체화 전략에 의해 CH3 도메인을 조작하는 것 이외의 또는 대안적으로, 추가적인 쇄간 이황화 브릿지의 도입은 이중이량체를 안정화시킨다 (Atwell, S., et al., J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35; Merchant, A.M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681). 이것은 또한 본원에서 "CH3 도메인의 이황화 안정화" 로 지칭된다.

[0463] V. 재조합 방법 및 조성물

[0464] 본 발명에 따른 다중특이적 항체는 예를 들어, US 4,816,567 에 기재된 바와 같은 재조합 방법 및 조성물을 사용하여 제조될 수 있다. 일 구체예에서, 본원에 기재된 다중특이적 항체를 인코딩하는 하나 이상의 단리된 핵산이 제공된다. 이러한 핵산은 하나의 환형 융합 폴리펩티드를 포함하는 아미노산 서열 및 임의로 또한 제2 환형 융합 폴리펩티드를 포함하는 아미노산 서열을 인코딩할 수 있다 (예를 들어, 이중환형 융합 폴리펩티드의 제1 환형 융합 폴리펩티드 및 제2 환형 융합 폴리펩티드). 추가의 구체예에서, 이러한 핵산을 포함하는 하나 이상의 벡터 (예를 들어, 발현 벡터)가 제공된다. 추가의 구체예에서, 이러한 핵산을 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 이러한 일 구체예에서, 숙주 세포는 본 발명에 따른 다중특이적 항체의 경우 제1 환형 융합 폴리펩티드 및 제2 환형 융합 폴리펩티드를 포함하는 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산을 포함하는 제1 벡터, 및 제2 환형 융합 폴리펩티드를 포함하는 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산을 포함하는 제2 벡터 또는 이들 2개의 핵산을 포함하는 단일 벡터를 포함한다 (예를 들어, 형질전환된다). 일 구체예에서, 숙주 세포는 진핵 세포, 예를 들어 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 림프구 세포 (예를 들어, Y0, NS0, Sp2/0 세포) 이다.

일 구체예에서, 본 발명에 따른 다중특이적 항체의 제조 방법이 제공되며, 여기서 상기 방법은 다중특이적 항체를 인코딩하는 핵산을 포함하는 숙주세포를 상기 제공된 바와 같이, 다중특이적 항체의 발현에 적합한 조건 하에서, 배양하는 것을 포함하고, 임의로 다중특이적 항체를 숙주 세포 (또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 회수하는 것을 포함한다.

[0465] 본 발명에 따른 다중특이적 항체의 재조합 생성에 있어서, 상기 기재된 바와 같이, 환형 융합 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산은 숙주 세포에서 추가 클로닝 및/또는 발현을 위해 하나 이상의 벡터에 단리 및 삽입된다. 이러한 핵산은 통상의 절차를 사용하여 쉽게 제조할 수 있다.

[0466] 다중특이적 항체-인코딩 벡터의 클로닝 또는 발현을 위해 적합한 숙주 세포는 본원에 기재된 원핵세포 또는 진핵세포를 포함한다. 예를 들어, 특히 글리코실화 및 Fc 이펙터 기능이 필요하지 않을 때, 본 발명에 따른 다중특이적 항체는 박테리아에서 생산될 수 있다. 박테리아에서 항체 단편 및 폴리펩티드의 발현을 위해, 예를 들어 US 5,648,237, US 5,789,199 및 US 5,840,523 을 참조한다 (또한, 대장균에서 항체 단편의 발현을 기재하는 Charlton, K.A., In: Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254 참조함). 발현 후, 다중특이적 항체는 가용성 분획의 박테리아 세포 페이스트로부터 단리될 수 있고, 추가로 정제될 수 있다.

[0467] 원핵생물 이외에도, 사상 진균 또는 효모와 같은 진핵 미생물은 환형 융합 폴리펩티드-인코딩하는 벡터에 대한 클로닝 또는 발현 숙주로 적합하고, 진균 및 효모 균주를 포함하며 이들의 글리코실화 경로가 "인간화" 됨으로써, 그 결과로 부분적으로 또는 완전히 인간 글리코실화 패턴을 갖는 다중특이적 항체를 생산한다 (Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22 (2004) 1409-1414; Li, H. et al., Nat. Biotech. 24 (2006) 210-215 참조).

[0468] 본 발명에 따른 글리코실화된 다중특이적 항체의 발현을 위해 적합한 숙주 세포는 또한 다세포성 유기체 (무척

추동물 및 척추동물) 에서 유래한다. 무척추동물 세포의 예로서는 식물 세포와 곤충 세포를 포함한다. 특히 스포돔테라 프루기페르다 (*Spodoptera frugiperda*) 세포의 형질감염을 위해, 곤충 세포와 조합하여 사용될 수 있는 수많은 배큘로바이러스 주가 동정되었다.

[0469] 식물 세포 배양이 또한 숙주로서 이용될 수 있다 (예를 들어, US 5,959,177, US 6,040,498, US 6,420,548, US 7,125,978 및 US 6,417,429 (유전자이식 식물에서 항체 생산을 위한 PLANTIBODIES™ 기술을 기재함) 참조).

[0470] 척추동물 세포는 또한 숙주로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 현탁 성장에 적합화된 포유동물 세포주가 유용할 수 있다. 유용한 포유 동물 숙주 세포주의 다른 예는 SV40 (COS-7)에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 계통; 인간 배아 신장 계통 (예를 들어, Graham, F.L. et al., J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74 에 기재된 293 또는 293 세포); 아기 햄스터 신장 세포 (BHK); 마우스 세르틀리 세포 (예를 들어, Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252 에 기재된 TM4 세포); 원숭이 신장 세포 (CV1); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76); 인간 자궁 경부암종 세포 (HELA); 개 신장 세포 (MDCK; 버팔로 랫트 간 세포 (BRL 3A); 인간 폐 세포 (W138); 인간 간 세포 (Hep G2); 마우스 유선 종양 (MMT 060562); TRI 세포, 예를 들어 Mather, J.P. et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68 에 기재됨; MRC 5 세포; 및 FS4 세포가 있다. 다른 유용한 포유 동물 숙주 세포주는 DHFR⁻ CHO 세포를 포함하는 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 (Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220); 및 Y0, NS0 및 Sp2/0과 같은 골수종 세포주를 포함한다. 항체 생산에 적합한 특정한 포유동물 숙주 세포주의 검토를 위해서는, 예를 들어, Yazaki, P. and Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268 을 참조한다.

[0471] VI. 어세이

[0472] 본 발명에 따른 다중특이적 항체는 그의 표적에 대한 폴리펩티드의 결합을 결정하기 위해 당업계에 공지된 다양한 어세이에 의해 그들의 물리적/화학적 특성 및/또는 생물학적 활성을 동정하거나, 그에 대해 스크리닝하거나, 또는 그를 특징구명할 수 있다.

[0473] VII. 면역 접합체

[0474] 본 발명은 또한 하나 이상의 세포독성제, 예컨대 화학치료제 또는 약물, 성장 억제제, 독소 (예를 들어, 단백질 독소, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적으로 활성인 독소, 또는 이의 절편), 또는 방사능 동위원소에 접합된 본원에 보고되는 다중특이적 항체를 포함하는 면역접합체를 제공한다.

[0475] 일 구체예에서, 면역접합체는 본 발명에 따른 다중특이적 항체이며, 본 발명에 따른 다중특이적 항체 내 약물 접합체는 메이탄시노이드 (US 5,208,020, US 5,416,064 및 EP 0 425 235 B1 참조); 모노메틸 아우리스타틴 약물 모이어티 DE 및 DF (MMAE 및 MMAF)와 같은 아우리스타틴 (US 5,635,483, US 5,780,588 및 US 7,498,298 참조); 돌라스타틴; 칼리케아미신 또는 이의 유도체 (US 5,712,374, US 5,714,586, US 5,739,116, US 5,767,285, US 5,770,701, US 5,770,710, US 5,773,001 및 US 5,877,296; Hinman, L.M. et al., Cancer Res. 53 (1993) 3336-3342; 및 Lode, H.N. et al., Cancer Res. 58 (1998) 2925-2928 참조); 다우노마이신 또는 독소루비신과 같은 안트라사이클린 (Kratz, F. et al., Curr. Med. Chem. 13 (2006) 477-523; Jeffrey, S.C. et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 16 (2006) 358-362; Torgov, M.Y. et al., Bioconjug. Chem. 16 (2005) 717-721; Nagy, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (2000) 829-834; Dubowchik, G.M. et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12 (2002) 1529-1532; King, H.D. et al., J. Med. Chem. 45 (2002) 4336-4343; 및 US 6,630,579 참조); 메토트렉세이트; 빈데신; 도세탁셀, 파클리탁셀, 라로탁셀, 테세탁셀 및 오르타탁셀과 같은 타산; 트리코테센; 및 CC1065를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 하나 이상의 약물에 접합된다.

[0476] 다른 구체예에서, 면역접합체는 제한없이 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 사슬 (슈도모나스 에루지노사 (*Pseudomonas aeruginosa*) 유래), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 알루라이트 포르디 (*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 파이토라카 아메리카나 (*Phytolaca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 (*Momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 (*sapaonaria officinalis*) 억제제, 젤로닌, 미토젤린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함하는, 효소적 활성 독소 또는 이의 단편에 접합된 본 발명에 따른 다중특이적 항체를 포함한다.

- [0477] 다른 구체예에서, 면역접합체는 방사능 원자에 접합되어 방사성접합체를 형성하는 본 발명에 따른 다중특이적 항체를 포함한다. 다양한 방사능 동위원소가 방사성접합체의 생성에 이용가능하다. 예에는 ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{212}Pb 및 Lu의 방사능 동위원소가 포함된다. 방사성접합체가 검출용으로 사용될 때, 이것은 신티그래프 실험용 방사능 원자, 예를 들어 $\text{TC}^{99\text{m}}$ 또는 ^{123}I , 또는 핵 자기 공명 (NMR) 영상법 (자기 공명 영상법, MRI라고도 알려짐)을 위한 스핀 표지, 예컨대 아이오딘-123, 아이오딘-131, 인듐-111, 플루오린-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망간 또는 철을 포함할 수 있다.
- [0478] 본 발명에 따른 다중특이적 항체 및 세포독성제의 콘주게이트는 다양한 2-작용성 단백질 커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 2-작용성 유도체 (예컨대 디메틸 아디피미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예컨대 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대 비스 (p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠) 을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 Vitetta, E.S. et al., Science 238 (1987) 1098-1104 에 기재된 대로 제조될 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이트 토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민 펜타아세트산 (MX-DTPA)은 환형 융합 폴리펩티드에 방사성뉴클레오타이드의 접합을 위한 예시적인 킬레이트화제이다 (WO 94/11026 참조). 링커는 세포에서 세포독성 약물의 방출을 용이하게 하는 "절단성 링커" 일 수 있다. 예를 들어, 산-불안정성 링커, 펩티다제-민감성 링커, 광불안정성 링커, 디메틸 링커 또는 디술피드-함유 링커 (Chari, R.V. et al., Cancer Res. 52 (1992) 127-131; US 5,208,020) 가 사용될 수 있다.
- [0479] 본원에서 면역접합체는 제한없이 상업적으로 (예를 들어, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A로부터) 입수할 수 있는, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 술포-EMCS, 술포-GMBS, 술포-KMUS, 술포-MBS, 술포-SIAB, 술포-SMCC, 및 술포-SMPB 및 SVSB (숙신이미딜-(4-비닐술포)벤조에이트)를 포함하는, 가교-링커제를 사용해 제조된 이러한 접합체를 분명하게 고려하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0480] **VIII. 진단 및 검출을 위한 방법 및 조성물**
- [0481] 일정 구체예에서, 본 발명에 따른 임의의 다중특이적 항체는 생물학적 샘플 중 이의 표적의 존재를 검출하는데 유용하다. 본원에서 사용되는 용어 "검출하는" 은 정량적 또는 정성적 검출을 포괄한다. 일정 구체예에서, 생물학적 샘플은 혈액, 혈청, 혈장, 세포 또는 조직을 포함한다.
- [0482] 일 구체예에서, 진단 또는 검출 방법에서 사용하기 위한 본 발명에 따른 다중특이적 항체가 제공된다. 추가 양상에서, 생물학적 샘플 중 본 발명에 따른 다중특이적 항체의 표적의 존재를 검출하는 방법이 제공된다. 일정 구체예에서, 본 방법은 다중특이적 항체와 이의 표적의 결합을 가능하게 하는 조건 하에서 본 발명에 따른 다중특이적 항체와 생물학적 샘플을 접촉시키는 단계, 및 다중특이적 항체 및 이의 표적 사이에 복합체가 형성되었는지 여부를 검출하는 단계를 포함한다. 이러한 방법은 시험관내 또는 생체내 방법일 수 있다. 일 구체예에서, 본 발명에 따른 다중특이적 항체는 상기 다중특이적 항체로 치료할 수 있는 대상체를 선택하는데 사용된다.
- [0483] 특정 실시예에서, 본 발명에 따른 표지된 다중특이적 항체가 제공된다. 표지는 제한없이 직접적으로 검출되는 표지 또는 모이어티 (예컨대 형광발광성, 발색성, 전자-밀집성, 화학발광성, 및 방사능 표지) 뿐 아니라, 예를 들어 효소 반응 또는 분자 상호작용을 통해, 간접적으로 검출되는 모이어티, 예컨대 효소 또는 리간드를 포함한다. 예시적인 표지는 제한없이, 방사능동위원소 ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , 및 ^{131}I , 형광단 예컨대 희토 킬레이트 또는 플루오레세인 및 이의 유도체, 로다민 및 이의 유도체, 단실, 엠벨리페론, 루세리퍼라제, 예를 들어 반딧불이 루시퍼라제 및 박테리아 루시퍼라제 (US 4,737,456), 루시페린, 2,3-디히드로프탈라진디온, 홀스래디시 퍼옥시다제 (HRP), 알칼리 포스파타제, β -갈락토시다제, 글루코아밀라제, 리소자임, 사카라이드 옥시다제, 예를 들어 글루코스 옥시다제, 갈락토스 옥시다제, 및 글루코스-6-포스페이트 디히드로게나제, 복소환 옥시다제 예컨대 우리카제 및 잔틴 옥시다제 (염료 전구체 예컨대 HRP, 락토퍼옥시다제, 또는 마이크로퍼옥시다제를 산화시키도록 과산화수소를 적용하는 효소와 커플링), 바이오틴/아비딘, 스핀 표지, 박테리오파지 표지, 안정한 자유 라디칼 등을 포함한다.

[0484] IX. 약학 제형

[0485] 본 발명에 따른 다중특이적 항체의 약학 제형은 원하는 정도의 순도를 갖는 이러한 항체를 하나 이상의 선택적인 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합함으로써 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980)), 동결건조된 제형 또는 수용액의 형태로 제조된다. 약학적으로 허용가능한 담체는 사용되는 투여량 및 농도에서 수여자에게 일반적으로 무독성이고, 제한 없이: 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 기타 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 산화제; 보존제 (예컨대 옥타데실 디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드; 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레솔); 저분자량 (약 10 개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리(비닐피롤리돈); 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신; 글루코오스, 만노오스 또는 텍스트린을 포함하는 당당류, 이당류 및 기타 탄수화물; 킬레이트제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로오스, 만니톨, 트레할로오스 또는 소르비톨; 염-형성 반대-이온, 예컨대 나트륨; 금속 복합체 (예를 들어, Zn-단백질 복합체); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 이 포함된다. 본원에서 예시적인 약학적으로 허용가능한 담체는 간질성 약물 분산제 예컨대 가용성 중성-활성 히알루로니다제 당단백질 (sHASEGP), 예를 들어, 인간 가용성 PH-20 히알루로니다제 당단백질, 예컨대 rhuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.)을 포함한다. 특정한 예시적 sHASEGP 및 rhuPH20 포함하는 사용 방법이 US 2005/0260186 및 US 2006/0104968 에 기재되어 있다. 하나의 양상에서, sHASEGP 는 하나 이상의 부가적인 글리코사미노글리카나제, 예컨대 콘드로이티나제와 조합된다.

[0486] 예시적인 동결건조된 항체 제형이 US 6,267,958 에 기재되어 있다. 수성 항체 제형은 US 6,171,586 및 WO 2006/044908 에 기재된 것들을 포함하며, 후자의 제형은 히스티딘-아세테이트 완충제를 포함한다.

[0487] 본원에서 제형은 또한 치료하려는 특정 징후에 필요하다면 하나를 초과하는 활성 성분, 바람직하게 서로 부정적으로 영향을 미치지 않는 상보적 활성을 갖는 것들을 함유할 수도 있다. 이러한 활성 성분은 의도하는 목적에 효과적인 양으로 조합하여 적합하게 존재한다.

[0488] 활성 성분은 예를 들어, 코아세르베이션 기술에 의해 또는 계면 중합에 의해 제조된 미세캡슐, 예를 들어, 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-미세캡슐 및 폴리-(메틸 메타크릴레이트) 미세캡슐, 콜로이드 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 미세구, 미세에멀션, 나노입자 및 나노캡슐) 또는 마크로에멀션에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980) 에 개시되어 있다.

[0489] 지속-방출형 조제물을 제조할 수 있다. 지속-방출형 조제물의 적합한 예는 환형 융합 폴리펩티드를 함유하는 고형 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 이러한 매트릭스는 성형 물품의 형태, 예를 들어 필름 또는 미세캡슐의 형태이다.

[0490] 생체내 투여에 사용되는 제형은 일반적으로 멸균된다. 멸균성은 예를 들어 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 쉽게 수행될 수 있다.

[0491] X. 치료 방법 및 조성물

[0492] 본 발명에 따른 임의의 다중특이적 항체는 치료 방법에 사용될 수 있다.

[0493] 일 양상에서, 의약으로서 사용하기 위한 본 발명에 따른 다중특이적 항체가 제공된다. 추가의 양상에서, 질환의 치료에서 사용하기 위한 본 발명에 따른 다중특이적 항체가 제공된다. 일정 구체예에서, 치료 방법에 사용하기 위한 다중특이적 항체가 제공된다. 일정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 다중특이적 항체의 유효량을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 질환을 갖는 개체를 치료하는 방법에 사용하기 위한 다중특이적 항체를 제공한다. 하나의 이러한 구체예에서, 상기 방법은 적어도 하나의 추가적 치료제의 유효량을 개체에 투여하는 것을 추가로 포함한다. 임의의 상기 구체예에 따른 "개체" 는 바람직하게 인간이다.

[0494] 추가의 양상에서, 본 발명은 의약의 생산 또는 제조에서 본 발명에 따른 다중특이적 항체의 용도를 제공한다. 일 구체예에서, 의약은 질환의 치료를 위한 것이다. 추가의 구체예에서, 의약은 의약의 유효량을 상기 질환을 갖는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 질환을 치료하는 방법에서 사용을 위한 것이다. 이러한 일 구체예에서, 상기 방법은 적어도 하나의 추가적 치료제의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 임의의 상기 구체예에 따른 "개체" 는 인간일 수 있다.

- [0495] 추가의 양상에서, 본 발명은 질환을 치료하기 위한 방법을 제공한다. 일 구체예에서, 상기 방법은 이러한 질환을 갖는 개체에게 본 발명에 따른 다중특이적 항체의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 이러한 일 구체예에서, 방법은 유효량의 적어도 하나의 추가적 치료제를 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 임의의 상기 구체예에 따라 "개체" 는 인간일 수 있다.
- [0496] 추가의 양상에서, 본 발명은 예를 들어, 상기 치료 방법 중 임의의 것에 사용하기 위한, 본 발명에 따른 임의의 다중특이적 항체를 포함하는 약학 제형을 제공한다. 일 구체예에서, 약학 제형은 본 발명에 따른 임의의 다중특이적 항체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 다른 구체예에서, 약학 제형은 본 발명에 따른 임의의 다중특이적 항체 및 적어도 하나의 추가적인 치료제를 포함한다.
- [0497] 본 발명에 따른 다중특이적 항체는 단독으로 또는 요법에서 다른 작용제와 조합으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 다중특이적 항체는 적어도 하나의 부가적인 치료제와 공동-투여될 수 있다.
- [0498] 상기에 언급된 이러한 병용 요법은 조합 투여 (둘 이상의 치료제가 동일 또는 개별 제형에 포함된 경우), 및 개별 투여를 포괄하고, 이러한 경우에서, 본 발명에 따른 다중특이적 항체의 투여는 추가적인 치료제 또는 치료제들의 투여 이전에, 그와 동시에, 및/또는 그 이후에 일어날 수 있다. 일 구체예에서, 다중특이적 항체의 투여 및 추가적인 치료제의 투여는 서로 약 1개월 이내, 또는 약 1주, 2주 또는 3주 이내, 또는 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일 또는 6일 이내에 일어난다. 본 발명에 따른 적합한 다중특이적 항체는 또한 방사선 요법과 함께 사용될 수 있다.
- [0499] 본 발명에 따른 다중특이적 항체 (및 임의의 추가적인 치료제)는 비경구, 폐내, 및 비내, 및 국소 치료를 위해 바람직한 경우 병변내 투여를 포함하는, 임의의 적합한 수단으로 투여될 수 있다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내, 또는 피하 투여를 포함한다. 투약은 임의의 적합한 경로, 예를 들어 주사, 예컨대 부분적으로 투여가 단시간인지 또는 만성인지 여부에 따라서, 정맥내 또는 피하 주사에 의할 수 있다. 제한 없이 다양한 시점에 단회 또는 다수회 투여, 볼러스 투여, 및 펄스 주입을 포함한 다양한 투약 스케줄이 본 명세서에서 고려된다.
- [0500] 본 발명에 따른 다중특이적 항체는 양호한 의료 행위에 일관되는 방식으로 제형화되고, 용량화되고 투여되어진다. 이러한 점에서 고려되는 인자들은 치료하려는 특정 장애, 치료하려는 특정 포유동물, 개별 환자의 임상적 상태, 장애의 원인, 작용제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄, 및 의료 종사자에게 공지된 다른 인자들을 포함한다. 다중특이적 항체는 논의의 장애를 예방 또는 치료하는데 현재 사용되는 하나 이상의 작용제일 필요는 없으나, 임의로 제형화된다. 이러한 기타 작용제의 유효량은 제형 내에 존재하는 다중특이적 항체의 양, 장애 또는 치료의 유형, 및 상기 논의된 기타 인자에 따라 다르다. 이들은 일반적으로 본 명세서에서 기술된 바와 동일한 용량 및 투여 경로로 사용되거나, 또는 본 명세서에 기술된 용량의 약 1 내지 99%, 또는 임의의 용량으로, 실험적으로/임상적으로 적당하다고 결정된 임의의 경로에 의해 사용된다.
- [0501] 질환의 예방 또는 치료를 위해, 본 발명에 따른 다중특이적 항체의 적합한 투약량 (단독으로 또는 하나 이상의 기타 부가적인 치료제와 조합으로 사용되는 경우) 은 치료하고자 하는 질환의 유형, 다중특이적 항체의 유형, 질환의 심각도 및 경과, 다중특이적 항체가 예방적 또는 치료적 목적에 따라 투여되는 지의 여부, 이전 요법, 환자의 임상적 이력 및 다중특이적 항체에 대한 반응, 및 참여하는 의사의 재량에 따라 다를 것이다. 다중특이적 항체는 1 회로 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 적합하게 투여된다. 질환의 유형 및 심각도에 따라, 약 1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 15 mg/kg (예를 들어, 0.5 mg/kg - 10 mg/kg) 의 다중특이적 항체가, 예를 들어, 하나 이상의 개별적 투여에 의한 것인지, 또는 연속 투입에 의한 것인지에 따라, 환자에 대한 투여를 위한 초기 후보 투약량일 수 있다. 한가지 전형적인 1일 용량은 상기 언급된 인자들에 따라서, 약 1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 100 mg/kg 또는 그 이상의 범위일 수 있다. 수 일 또는 그 이상 동안 반복 투여를 위해서, 병태에 따라서, 치료는 일반적으로 질환 증상의 바람직한 저해가 일어날 때까지 지속되어진다. 다중특이적 항체의 하나의 예시적인 투약량은 약 0.05 mg/kg 내지 약 10 mg/kg 의 범위일 것이다. 따라서, 약 0.5 mg/kg , 2.0 mg/kg , 4.0 mg/kg 또는 10 mg/kg (또는 이의 임의 조합) 중 하나 이상의 용량이 환자에게 투여될 수 있다. 이러한 용량은 간헐적으로, 예를 들어 매주 또는 3 주마다 (예를 들어 환자가 약 2 내지 약 20, 또는 예를 들어 약 6 회 용량의 다중특이적 항체를 받도록) 투여될 수 있다. 초기에 더 높은 적재 용량 이후에 하나 이상의 낮은 용량을 투여할 수 있다. 그러나, 다른 용량 계획이 유용할 수 있다. 이러한 요법의 진행은 통상의 기술 및 어세이를 통해 쉽게 모니터링된다.
- [0502] 임의의 상기 제형 또는 치료 방법은 본 발명에 따른 다중특이적 항체 이외에 또는 이를 대신하여 본 발명의 먼

역접합체를 사용하여 수행할 수 있다는 것을 이해한다.

[0503] **XI. 제조 물품**

[0504] 본 발명의 다른 양상에서, 장애의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용한 재료를 함유하는 제조 물품이 제공된다. 제조 물품은 용기 및 용기와 연합되거나 용기 위에 있는 라벨 또는 패키지를 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어, 병, 바이알, 주사기, IV 용액 백 등을 포함한다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 재료로 형성될 수 있다. 용기는 조성물 그 자체 또는 상태를 치료, 예방 및/또는 진단하는데 유효한 또다른 조성물과 조합된 조성물을 담고 있고 멸균 접근 포트 (예를 들어 용기는 정맥내 용액 백 또는 피하 주사 바늘에 의해 관통가능한 마개를 가진 바이알일 수 있음) 를 가질 수 있다. 조성물 내 적어도 하나의 활성제는 본 발명에 따른 다중특이적 항체이다. 표지 또는 포장 삽입물은 조성물이 선택된 병태를 치료하는데 사용된다는 것을 표시한다. 게다가, 제조 물품은 (a) 그 안에 조성물이 함유된 제1 용기로서, 여기서 조성물은 본 발명에 따른 다중특이적 항체를 포함하는 것인 제1 용기; 및 (b) 그 안에 조성물이 함유된 제2 용기로서, 여기서 조성물은 세포독성제 또는 아니면 다른 치료제를 더 포함하는 것인 제2 용기를 포함할 수 있다. 본 발명의 이러한 구체예에서 제조 물품은 조성물이 특정 병태를 치료하는데 사용될 수 있다는 것을 표시하는 포장 삽입물을 더 포함할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 제조 물품은 약학적으로-허용가능한 완충제, 예컨대 주사용 정균수 (BWFI), 포스페이트-완충된 염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 (또는 제3) 용기를 더 포함할 수 있다. 이것은 다른 완충액, 희석액, 필터, 바늘, 및 주사기를 포함하여, 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 재료를 추가로 포함할 수 있다.

[0505] 본원에서 인용하는 모든 문헌 (과학, 서적 또는 특허)은 참조로 포함된다.

[0506] 하기의 실시예 및 도면은 본 발명의 이해를 돕기 위해 제공되고, 본 발명의 진정한 범위는 첨부된 특허청구범위에 제시되어 있다. 본 발명의 사상에서 벗어나지 않고, 제시된 절차들에 수정이 가하여질 수 있음이 이해된다.

[0507] **도면의 설명**

[0508] **도 1:** 본원에 보고되는 환형 융합 폴리펩티드의 일반 구조의 개략도.

[0509] **도 2:** 본원에 보고되는 이중환형 융합 폴리펩티드의 일반 구조의 개략도.

[0510] **도 3:** 본원에 보고되는 예시적인 이중환형 융합 폴리펩티드와 보통의 IgG 유형 항체의 결합 부위 간 배향 및 공간적 거리.

[0511] **도 4:** 상이한 콘톨스바디 형태의 UV 흡광 크로마토그램 (280 nm).

[0512] **도 5:** 질량 분광법에 의한 본원에 보고되는 환형 융합 폴리펩티드의 생성물 품질 분석.

[0513] **도 6+7:** "VH-인" 배향 (Fc-영역과 가까움) 및 "VH-아웃" 배향 (Fc-영역으로부터 더 떨어져 있음)의 VH 도메인의 배향 및 상대적 위치의 개략도.

[0514] **도 8:** 본원에서 보고되는 이중특이적 이중환형 융합 폴리펩티드의 제조에 사용되는 개별 배향의 항-cMET 환형 융합 폴리펩티드의 예시적인 사슬.

[0515] **도 9:** 2개의 원형 융합 폴리펩티드 및 제3 VH/VL-쌍을 포함하는 본 발명에 따른 다중특이적 항체; 위 그림: 스케치, 아래 그림: 3차원 모델.

[0516] **도 10:** LeY/비오틴 TriFab 콘톨스바디의 카파선택트 (KappaSelect) 정제 배양 상청액의 SEC 크로마토그램 (상부) 및 SDS-PAGE (하부).

[0517] **도 11:** TriFab-콘톨스바디 LeY/비오틴의 m/z 스펙트럼.

[0518] **도 12:** LeY/비오틴-TriFab-콘톨스바디의 FACS 분석.

[0519] **도 13:** 이중특이적 항-LeY/CD3 TriFab 콘톨스바디의 개략도.

[0520] **도 14:** 항-LeY/CD3 TriFab 콘톨스바디의 쿠마시-염색된 SDS PAGE 겔; kDa = 킬로달톤 (분자량 마커); nr = 감소되지 않음; r = 감소됨.

[0521] **도 15:** MCF7 세포와의 배양에 사용되는 이중특이적 항-LeY/CD3 TriFab 콘톨스바디 및 이중특이적 TriFab의 개략도.

- [0522] **도 16:** 항-LeY TriFab (양성 대조군)의 MCF7 세포의 용량-의존적 세포 사멸, ii) 항-LeY/X TriFab (X는 MCF7 상에 존재하지 않음; 음성 대조군), iii) 본 발명에 따른 항-LeY/CD3 TriFab 콘트롤스바디.
- [0523] **XII. 실시예**
- [0524] 다음은 본 발명의 방법 및 조성물의 예이다. 상기 제공된 일반 설명을 고려하여, 다양한 다른 구체예가 실시될 수 있다는 것이 이해된다.
- [0525] **재료 및 방법**
- [0526] 제조합 DNA 기술
- [0527] Sambrook, J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 에 기재된 바와 같이 표준 방법을 사용하여 DNA 를 조작했다. 분자 생물학적 시약은 제조사의 지침서에 따라 사용했다.
- [0528] 유전자 및 올리고뉴클레오타이드 합성
- [0529] 원하는 유전자 분절을 Genart GmbH (Regensburg, Germany) 에서의 화학 합성으로 제조하였다. 합성된 유전자 단편을 대장균 (E. coli) 플라스미드에 전파/증폭을 위해 클로닝하였다. 서브클로닝된 유전자 단편의 DNA 서열을 DNA 시퀀싱으로써 확인하였다. 대안적으로, 짧은 합성 DNA 단편을 화학적으로 합성된 올리고뉴클레오타이드를 어닐링함으로써 또는 PCR 을 통해 어셈블링하였다. 각각의 올리고뉴클레오타이드는 metabion GmbH (Planegg-Martinsried, Germany)에서 제조하였다.
- [0530] 시약
- [0531] 모든 시판되는 화학물, 항체 및 키트는 달리 명시되어 있지 않으면 제조사의 프로토콜에 따라 제공된 대로 사용하였다.
- [0532] **실시예 1**
- [0533] **환형 융합 폴리펩티드를 위한 발현 플라스미드의 구축**
- [0534] 본원에 보고된 바와 같은 환형 융합 폴리펩티드의 발현을 위해서 다음의 기능성 요소들을 포함하는 전사 유닛을 사용하였다:
- [0535] - 인트론 A 를 포함하는 인간 사이토메갈로바이러스 (P-CMV) 로부터 조기 초기 인핸서 (immediate early enhancer) 및 프로모터,
- [0536] - 인간 중쇄 면역글로불린 5'-비번역 영역 (5'UTR),
- [0537] - 쥐과동물 면역글로불린 중쇄 시그널 서열,
- [0538] - 각각의 환형 융합 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산, 및
- [0539] - 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 서열 (BGH pA).
- [0540] 발현되는 원하는 유전자를 포함하는 발현 유닛/카세트 외에 기본/표준 포유류 발현 플라스미드는 하기를 포함한다:
- [0541] - 대장균 (E.coli) 내 이러한 플라스미드의 복제를 허용하는 벡터 pUC18 로부터의 복제 개시점, 및
- [0542] - 대장균 (E.coli)에서 암피실린 내성을 부여하는 베타-락타마아제 유전자.
- [0543] **실시예 2**
- [0544] **환형 융합 폴리펩티드의 발현**
- [0545] 환형 융합 폴리펩티드의 일시적 발현은 형질감염 시약 293-free (Novagen) 를 사용하여 현탁-적합화된 HEK293F (FreeStyle 293-F 세포; Invitrogen) 세포에서 수행하였다.
- [0546] 세포는 125 mL 진탕 플라스크 중에 해동시킨 후, 적어도 4회, 희석하여, 계대하였다 (30mL 부피) (37 °C, 7% CO₂, 85% 습도, 135rpm에서 배양/진탕).

- [0547] 세포를 250mL 부피로 3×10^5 세포/mL로 확장시켰다. 3일 후에, 세포를 분할시켰고 1-리터 진탕 플라스크에 250 mL 부피로 7×10^5 세포/mL의 밀도로 새롭게 시딩하였다. 대략 $1.4 - 2.0 \times 10^6$ 세포/mL의 세포 밀도로 24 시간 후에 형질감염시킬 것이다.
- [0548] 형질감염 이전에 250 μ g 플라스미드-DNA를 예열 (수조; 37 °C)된 Opti-MEM (Gibco)을 사용해 10mL 의 최종 부피로 희석하였다. 용액을 부드럽게 혼합하고 실온에서 5 분 이하 배양하였다. 이어서 333.3 μ L 293-free 형질감염 시약을 DNA-OptiMEM-용액에 첨가하였다. 이후 용액을 조심스럽게 혼합하였고 실온에서 15 내지 20분 동안 배양하였다. 혼합물의 전체 부피를 250mL HEK-세포-배양-부피의 1L 진탕 플라스크에 첨가하였다.
- [0549] 37 °C, 7% CO₂, 85% 습도, 135 rpm 에서 6일 또는 7일 동안 배양/진탕한다.
- [0550] 상청액을 2,000rpm, 4 °C 에서, 10 분 동안 제1 원심분리-단계를 통해 수확하였다. 이어서, 상청액을 4,000 rpm, 4 °C 에서, 20 분 동안 2차 원심분리를 위해 새로운 원심분리-플라스크로 옮겼다. 이후에 세포-무함유-상청액을 0.22 μ m 보틀-탐-필터를 통해 여과시켰고 냉동고 (-20 °C)에 저장하였다.
- [0551] **실시예 3**
- [0552] **환형 융합 폴리펩티드의 정제**
- [0553] 항체-함유 배양 상청액을 여과하였고 2회 크로마토그래피 단계를 통해 정제하였다. 항체를 PBS (1mM KH₂PO₄, 10mM Na₂HPO₄, 137mM NaCl, 2.7mM KCl), pH 7.4로 평형화시킨 HiTrap MabSelectSuRe (GE Healthcare)를 사용하여 친화성 크로마토그래피를 통해 포획하였다. 미결합된 단백질은 평형화 완충액으로 세척하여 제거하였고, 항체는 50mM 시트레이트 완충액, pH 2.8으로 회수하였으며, 직후에 용리액을 1M Tris-base, pH 9.0를 사용해 pH 6.0으로 중화시켰다. Superdex 200™ (GE Healthcare) 상에서 크기 배제 크로마토그래피를 2차 정제 단계로서 사용하였다. 크기 배제 크로마토그래피는 20 mM 히스티딘 완충액, 0.14M NaCl, pH 6.0 에서 수행하였다. 항체 함유 용액을 Biomax-SK 멤브레인 (Millipore, Billerica, MA)이 장착된 Ultrafree-CL 원심분리 필터 유닛을 사용해 농축하고 -80 °C 에 저장하였다.
- [0554] **실시예 4**
- [0555] **항-Her2 환형 융합 폴리펩티드의 결합**
- [0556] 표면 플라스몬 공명 Her2 수용체 결합
- [0557] **칩 표면:**CM5-칩
- [0558] **T:**어세이 설정 1 및 2를 위해 각각, 37 °C 및 25 °C
- [0559] **러닝 완충액:**PBS + 0.05% (v/v) Tween 20
- [0560] **희석 완충액:** 러닝 완충액 + 0.1% BSA
- [0561] **피분석물:** c(HER2 ECD) = 어세이 설정 1의 경우 0.41-900nM;
- [0562] c(이량체 항-Her2 콘트롤스바디) = 3.7-300nM,
- [0563] c(트라스투주맵) = 어세이 설정 2의 경우 3.7-300nM
- [0564] **리간드:** 어세이 설정 1의 경우 항-인간 Fc-영역 항체를 통해 결합 된 이량체 항-Her2 콘트롤스바디, 트라스투주맵; 어세이 설정 2의 경우 퍼투주맵을 통해 결합된 Her2-ECD.
- [0565] 반응 단위는 분자량에 정비례한다. 피분석물 결합의 이론적 최대값은 Her2 ECD의 공지된 결합 수준을 기초로 한다. 100% = 1 분자 이량체 항-Her2 콘트롤스바디 또는 트라스투주맵은 각각, 2개의 분자 HER2 ECD에 결합한다.
- [0566] **실시예 5**
- [0567] **ADCC 어세이-ACEA**
- [0568] BT-474 세포를 아큐타제(Accutase)로 "가용화" 시켰고, 배지 중에서 계수하여, 2×10^5 세포/mL의 세포 밀도가

되게 하였다. 50 μ l 배지를 96 웰 플레이트에서 각각의 웰에 피펫팅하고, 배경 효과를 ACEA에서 측정하고, 마지막으로 50 μ l 세포 현탁액/웰 (=10,000 세포/웰)을 첨가하였다. 플레이트를 ACEA 에 위치시켜 15분 후에 세포 지수를 측정하였다. 이어서 배지를 피펫팅으로 제거하였으며, 세척 단계를 AIM-V 배지로 수행하였고, 3가지 상이한 농도의 50 μ l 항체를 첨가하였다. 자연 살해 세포를 계수하였고 6x10E5의 세포 밀도로 AIM-V에 위치시켰다. ACEA에 50 μ l (30,000 세포/웰 ad E/T 3:1)를 첨가하고 5분 마다 세포 지수를 측정하였다. 24시간 이후에, 실험을 중지하였고 2시간 및 4시간 후 ADCC를 계산하였다.

[0569] 실시예 6

[0570] 질량 분광 분석

[0571] PNGase F는 Roche Diagnostics GmbH (14.3 U/ μ l; 소듐 포스페이트, EDTA 및 글리세롤 중 용액)에서 입수하였다. IgG 항체의 힌지 영역에서 특이적으로 절단하는 프로테아제를 소화 이전에 동결건조물로부터 신선하게 재구성시켰다.

[0572] PNGase F를 사용한 효소적 탈당화

[0573] 50 μ g 콘톨스마디를 10mM 의 인산염완충액, pH 7.1 에서 0.6mg/mL 의 최종 농도로 희석시켰고, 1 μ l의 PNGase F 를 사용해 37 °C 에서 16시간 동안 탈당화시켰다.

[0574] 효소적 절단

[0575] 탈당화된 샘플을 200mM Tris 완충액, pH 8.0 을 사용하여 0.5mg/mL 의 최종 농도로 희석시킨 후, IgG 특이적 프로테아제로 37 °C 에서 1시간 동안 소화시켰다.

[0576] ESI-QTOF 질량 분광법

[0577] 샘플을 40% 아세토니트릴과 2% 포름산 (v/v)을 사용하여 Sephadex G25 컬럼 (Kronlab, 5x250mm, TAC05/250G0-SR) 상의 HPLC에 의해 탈염화시켰다. 전체 질량은 TriVersa NanoMate 소스 (Advion)가 장착된 maXis 4G UHR-QTOF MS 시스템 상의 ESI-QTOF MS (Bruker Daltonik)를 통해 결정하였다. 소듐 요오다이드를 사용해 교정을 수행하였다 (Waters ToF G2-샘플 키트 2 파트: 700008892-1). 소화된 콘톨스마디의 경우, 1000-4000 m/z (ISCID: 30 eV)에서 데이터를 획득하였다. 미가공 질량 스펙트럼을 평가하였고 개별 상대 물질량으로 전환시켰다. 결과의 시각화를 위해서, 사유 소프트웨어를 사용하여 디콘볼루션된 질량 스펙트럼을 생성시켰다.

[0578] 실시예 7

[0579] TriFab-콘톨스마디의 정제

[0580] 항체-함유 배양 상청액을 여과하였고 2회 크로마토그래피 단계를 통해 정제하였다. 분자에 CH2 도메인이 없기 때문에 기능적 Fc-영역의 부재로 인해, TriFab-콘톨스마디는 표준 단백질 L (카파선택트; KappaSelect) 친화성 크로마토그래피로 정제하였다. 항체를 PBS (1mM KH₂PO₄, 10mM Na₂HPO₄, 137mM NaCl, 2.7mM KCl), pH 7.4 로 평형화시킨 카파선택트 (GE Healthcare)를 사용하여 친화성 크로마토그래피를 통해 포획하였다. 미결합된 단백질은 평형화 완충액으로 세척하여 제거하였고, 항체는 50mM 시트레이트 완충액, pH 2.8으로 회수하였으며, 직후에 용리액을 1M Tris-base, pH 9.0를 사용해 pH 6.0으로 중화시켰다. Superdex 200TM (GE Healthcare) 상에서 크기 배제 크로마토그래피를 2차 정제 단계로서 사용하였다. 크기 배제 크로마토그래피는 20 mM 히스티딘 완충액, 0.14M NaCl, pH 6.0에서 수행하였다. 항체 함유 용액을 Biomax-SK 멤브레인 (Millipore, Billerica, MA)이 장착된 Ultrafree-CL 원심분리 필터 유닛을 사용해 농축하고 -80 °C 에 저장하였다.

[0581] 실시예 8

[0582] TriFab-콘톨스마디의 FACS 분석

[0583] 생성된 TriFab-콘톨스마디의 결합 기능을 평가하기 위해 FACS 분석을 적용하였다. 따라서, LeY-항원 발현 MCF7 세포를 비오틴-Cy5 접합체 (음성 대조군) 또는 비오틴-Cy5 접합체에 의해 세포를 세척한 후 음성 대조군으로서 비결합 TriFab-콘톨스마디 (음성 대조군 II)에 노출시키거나, 또는 비오틴-Cy5가 첨가된 TriFab-콘톨스마디에 연속적으로 첨가하여 세포의 형광을 평가하였다. 도 12은 그 결과를 보여준다.

[0584] **실시예 9**

[0585] **T 세포 유도 종양 세포 사멸을 효율적으로 증대하는 TriFab 콘트롤스바디**

[0586] T-세포-유도된 종양 세포 사멸에서 TriFab 콘트롤스바디 형태의 적합성을 평가하기 위해, 제3 결합 실체로서 항-CD3 결합 실체가 사용되었다 (도 13). VH 및 VL 서열은 US 2015/0166661 A1에 기재된 바와 같은 CD3-바인더의 예시적인 서열이다. 임의의 항-CD3 Fv가 본원에서 치환될 수 있다. 이것은 단순히 예로서 선택되었다. 이 항-LeY/CD3 TriFab 콘트롤스바디는 SEQ ID NO: 36 및 SEQ ID NO: 37의 폴리펩티드를 포함한다.

[0587] 항-LeY/CD3 TriFab 콘트롤스바디의 발현 및 정제 (상기 실시예에 요약된 바와 같이 수행됨)는 8 mg/L 발현량의 수율로 달성되었다. 쿠마시 (Comassie)-염색된 SDS PAGE 분석에서 명확한 밴드가 예상된 중량으로 존재한다 (도 14).

[0588] LeY 양성 MCF7 세포를 96 웰 플레이트에 시딩하고 밤새 배양한 다음, 상이한 농도의 i) 양성 대조군으로서 항-LeY TriFab, ii) MCF7 세포 상에 X가 존재하지 않는 항-LeY/X TriFab, 및 iii) 항-LeY/CD3 TriFab 콘트롤스바디에 노출시켰다 (도 15). T 세포-매개 사멸을 평가하기 위해, 건강한 공여자의 전혈로부터의 PBMC (제조업자의 지시 (GE Healthcare)에 따라 Ficoll® Paque Plus 정제를 통해 분리됨)를 5 : 1 비로 첨가하였다. 그 후 배양물을 37 °C 및 5 % CO₂ 에서 48 시간동안 유지시켰고, 이후 종양 세포 용해도를 평가하였다 (제조업자의 지시 (Cytotoxicity Detection Kit (LDH), Roche)에 따라 LDH 방출 분석을 적용함). TriFab 콘트롤스바디는 낮은 피코몰 범위에서도 용량 의존적 사멸을 유도한다는 것을 확인하였다. 양성 대조군인 항-LeY/CD3 TriFab (~120 pM)에 비해 TriFab 콘트롤스바디는 IC₅₀ 값이 현저히 낮았다 (~ 2.4 pM) (도 16).

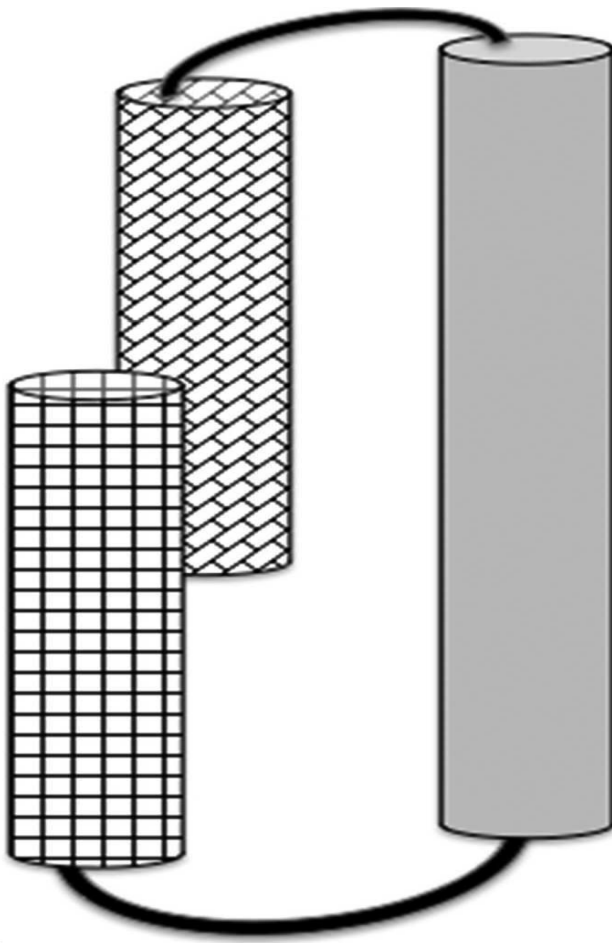
[0589] 다른 LeY/CD3 TriFab 콘트롤스바디의 발현 수율:

사슬 1	사슬 2	수율
VH/CH1-DKTH(GGGGS)2-VL/CH3(노브-cys)-(GGGGS)2-VL/CL	VH/CH1-DKTH(GGGGS)2-VH/CH3(홀-cys)-(GGGGS)2-VL/CL	1 mg/L 미만
VH/CH1-DKTH(GGGGS)2-VH/CL(노브-cys)-(GGGGS)2-VL/CL	VH/CH1-DKTH(GGGGS)2-VL/CH3(홀-cys)-(GGGGS)2-VL/CL	1 mg/L 미만
VH/CH1-DKTHGGGGS-VH/CH3(노브-cys)-(GGGGS)2-VL/CL	VH/CH1-DKTHGGGGS-VL/CH3(홀-cys)-(GGGGS)2-VL/CL	1 mg/L 미만
VH/CH1-DKTHGGGGS-VH/CH3(노브-cys)-(GGGGS)2-VL/CL	VL/CL-DKTHGGGGS-VL/CH3(홀-cys)-(GGGGS)2-VH/CH1	약 8 mg/L

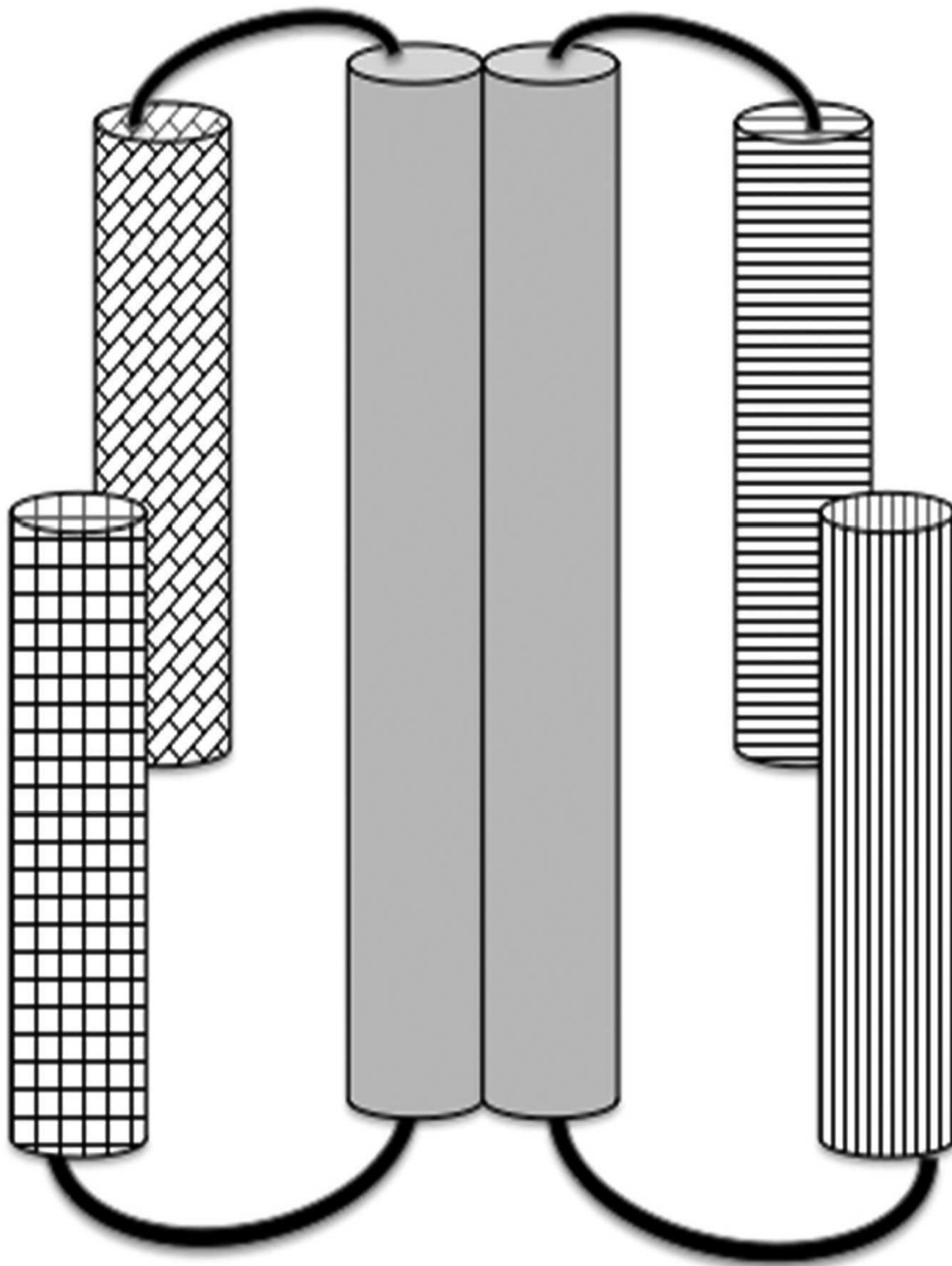
[0590]

도면

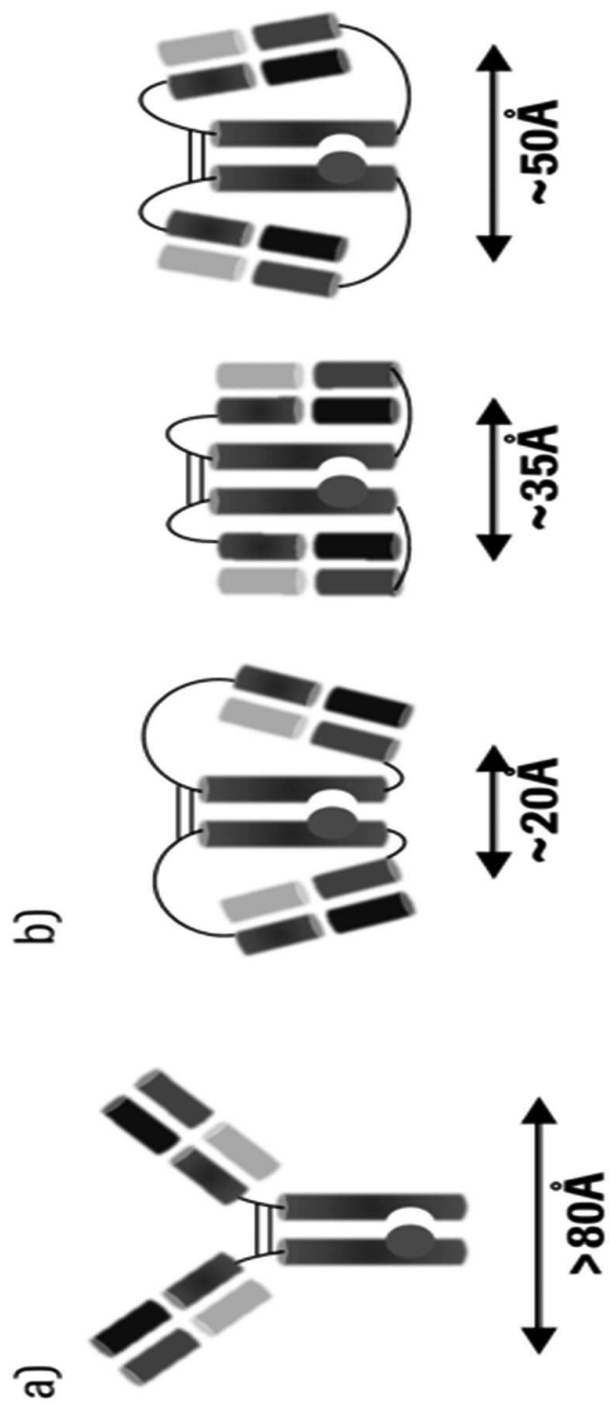
도면1



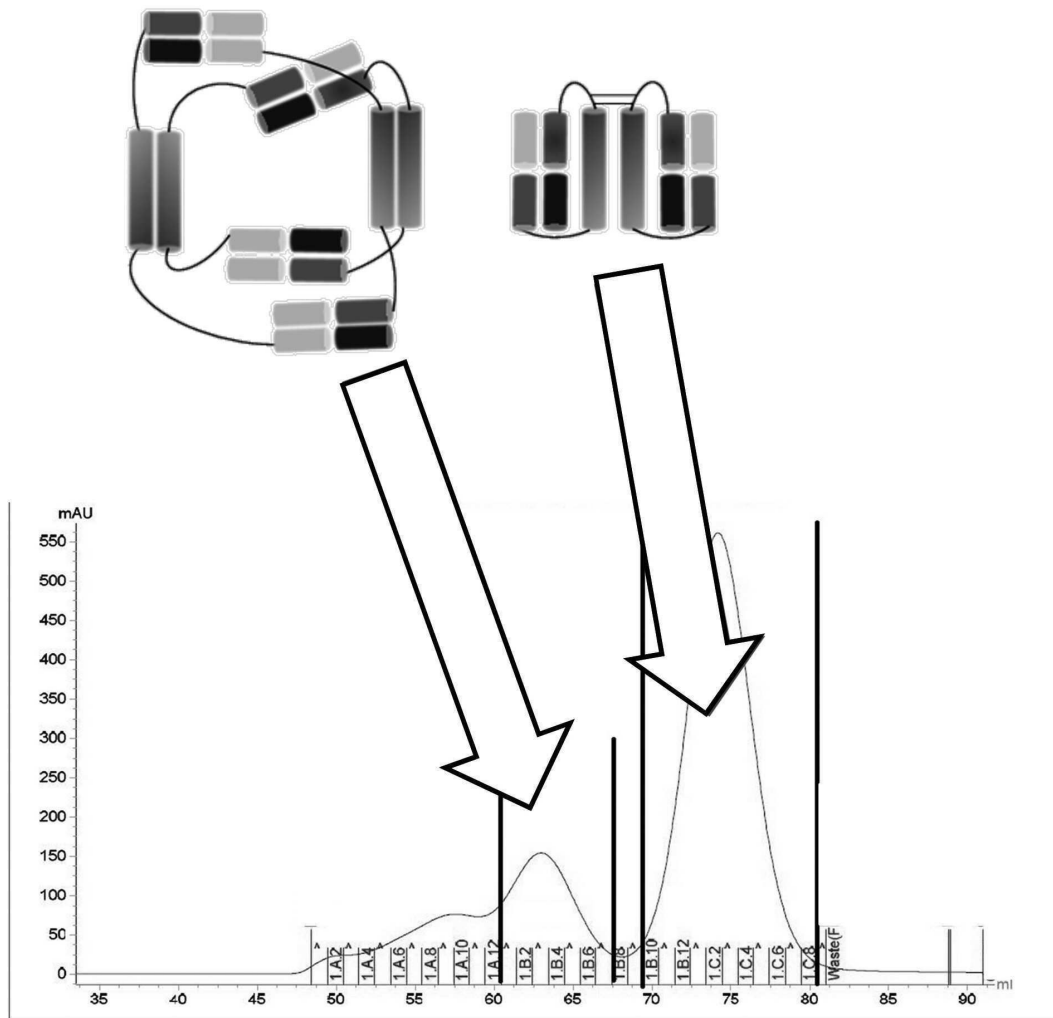
도면2



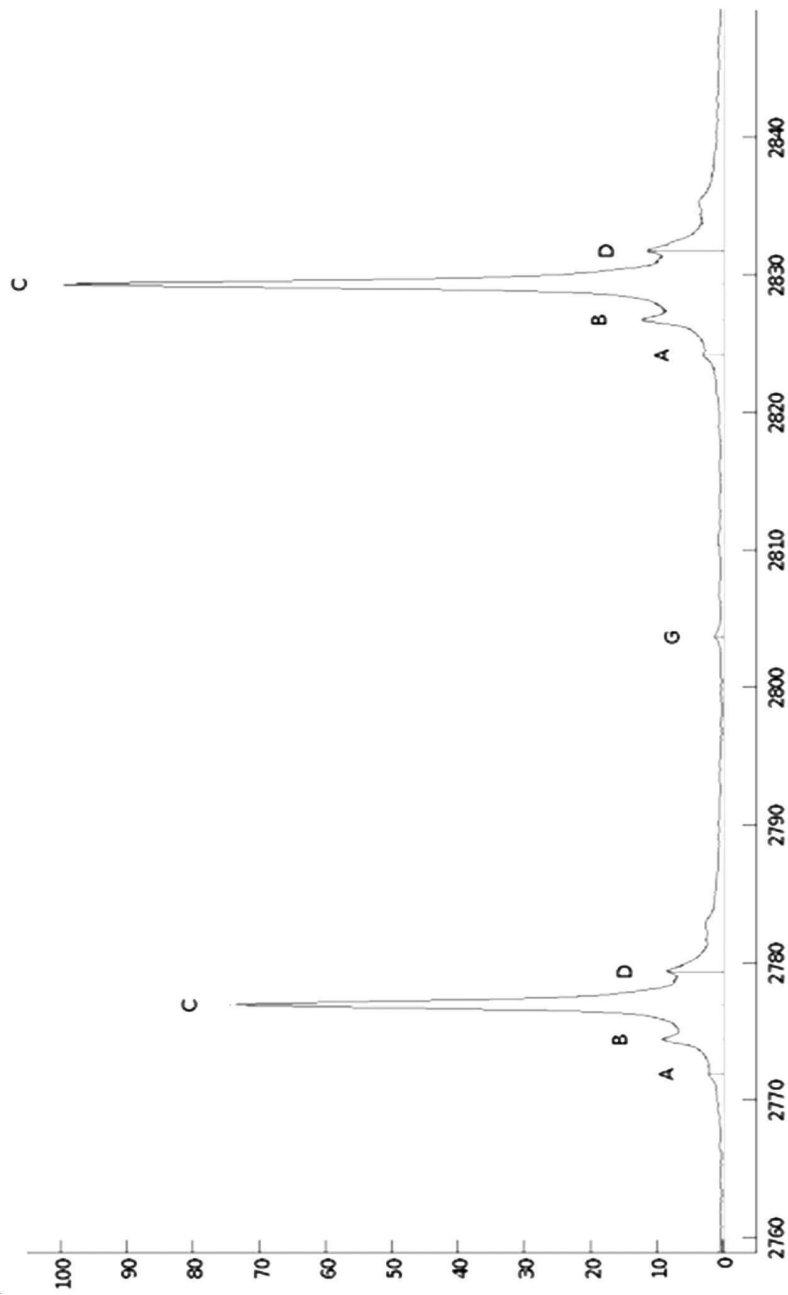
도면3



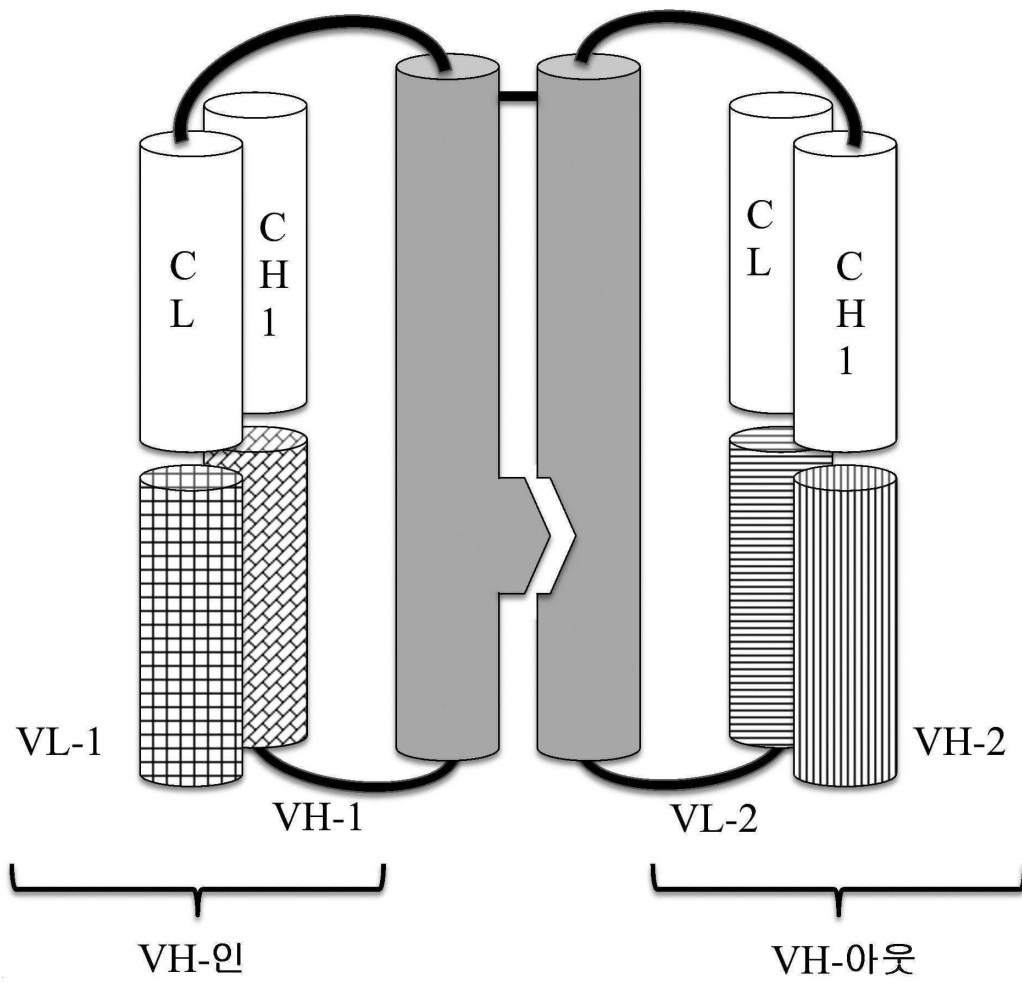
도면4



도면5

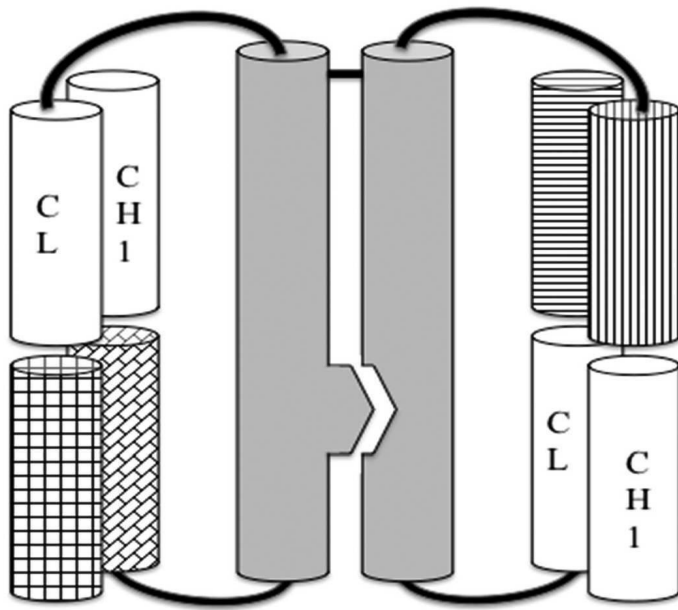


도면6

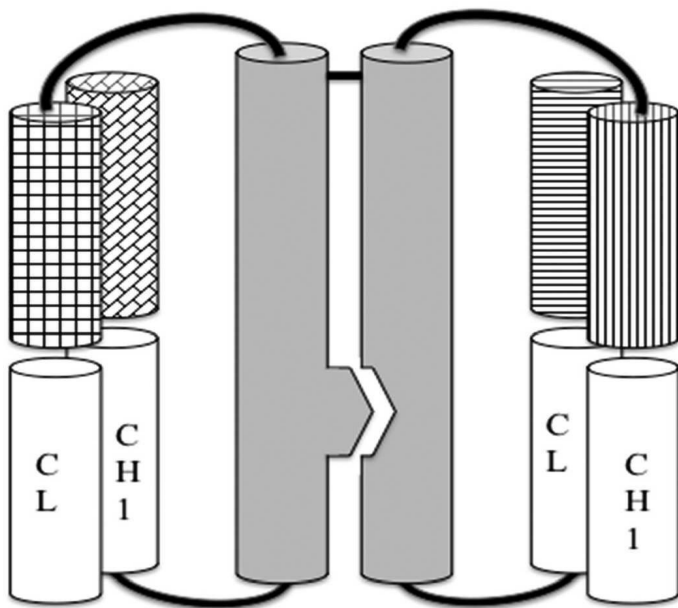


도면7

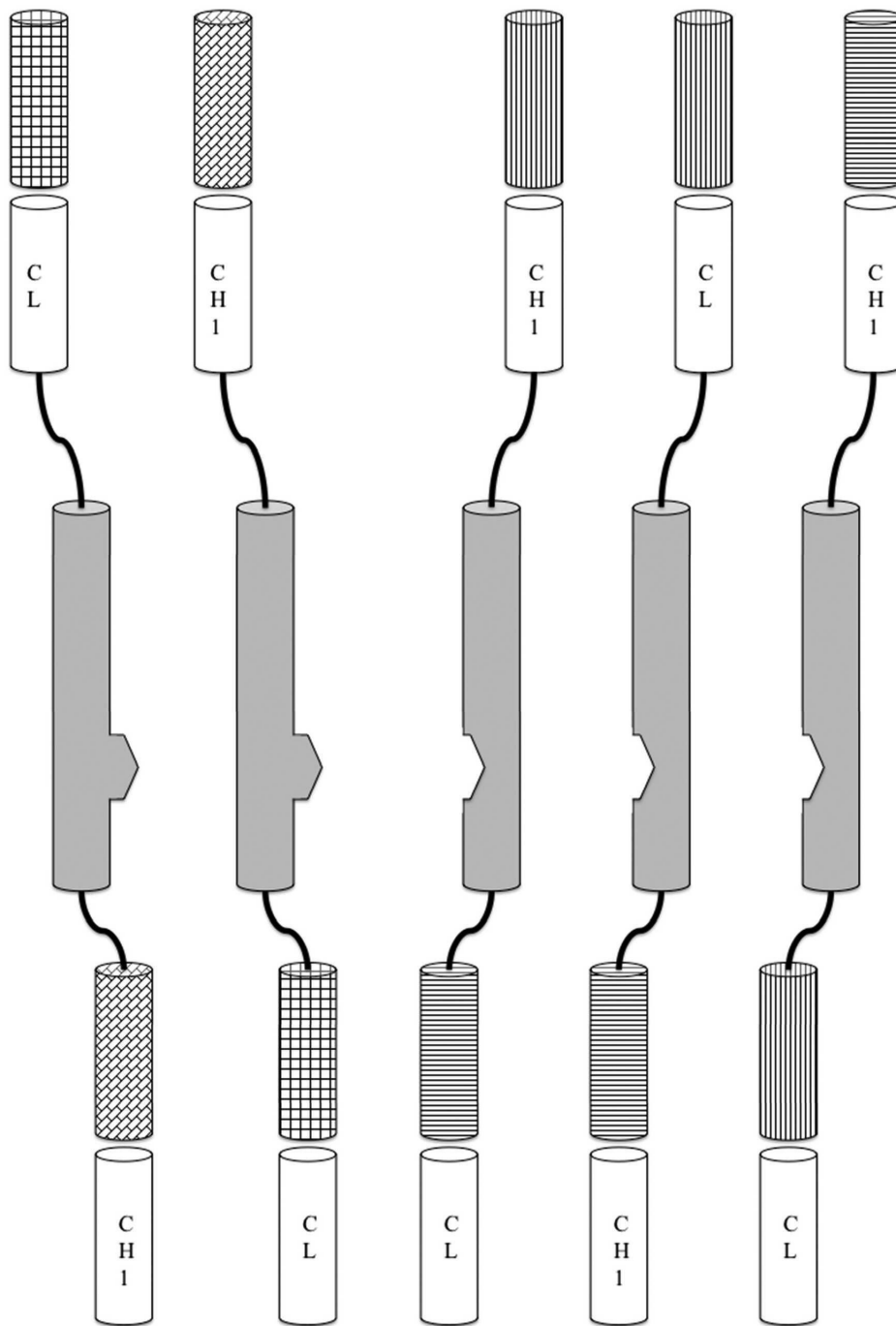
A



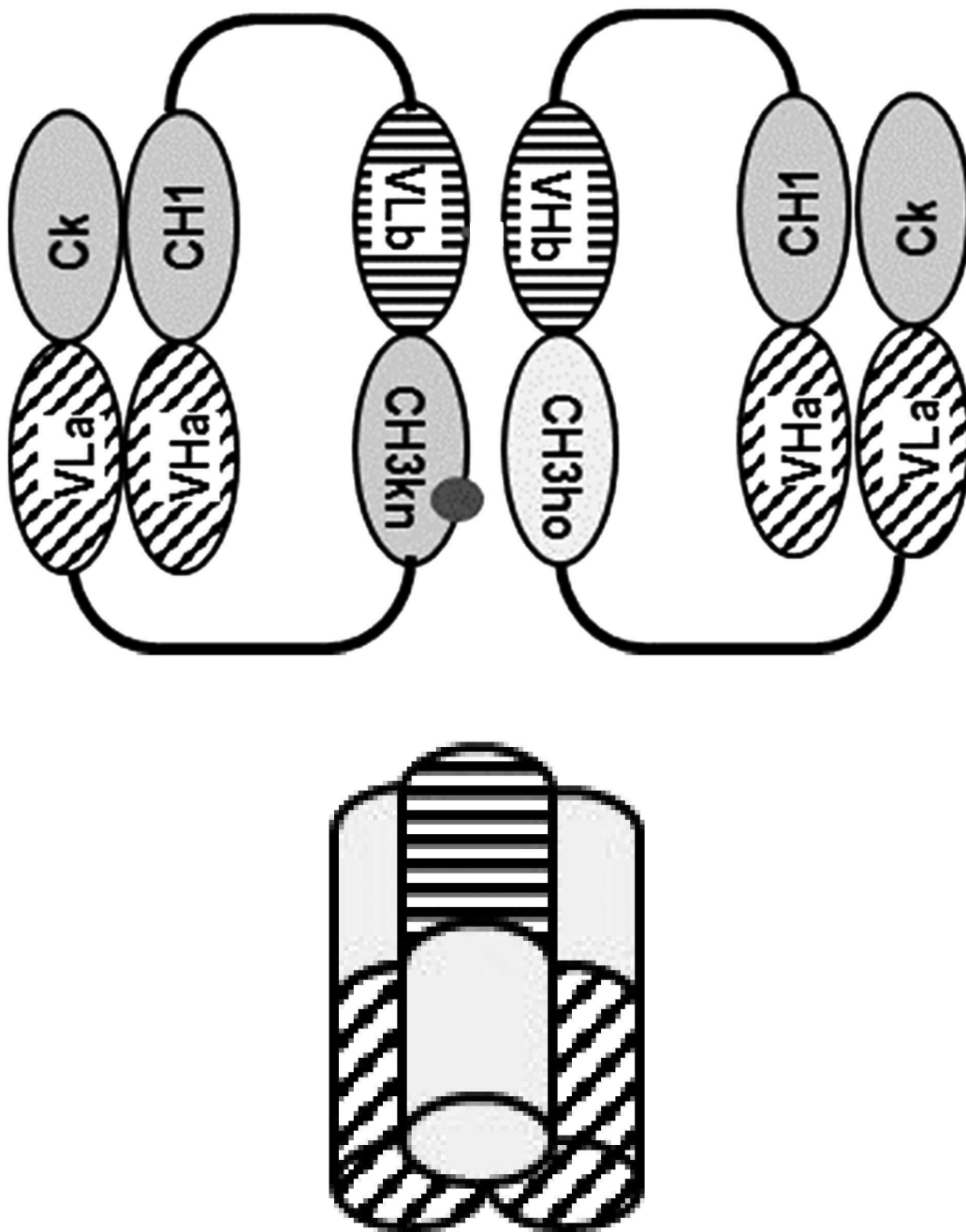
B



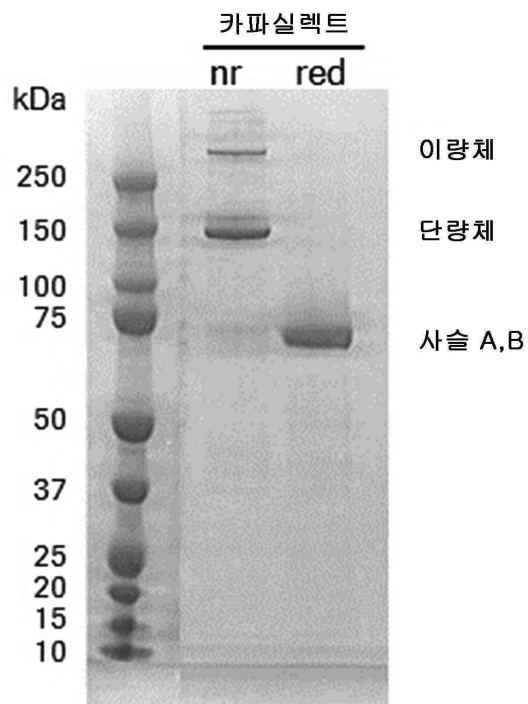
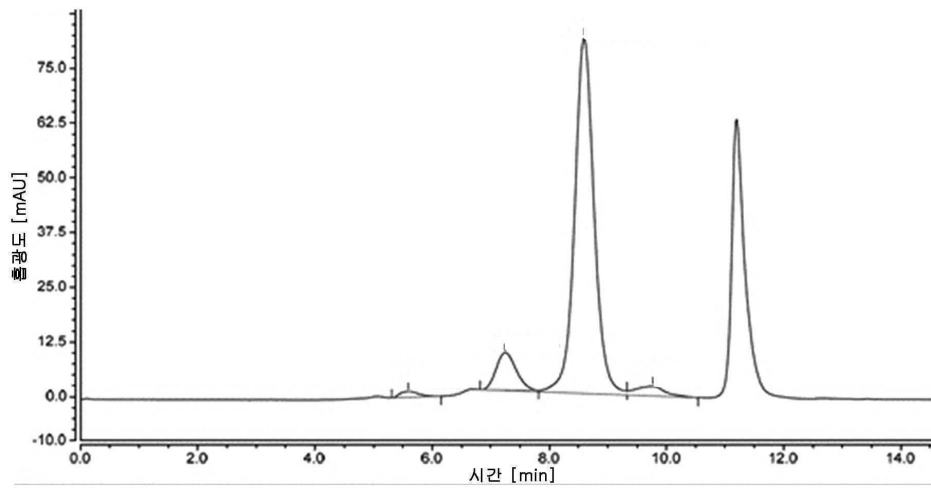
도면8



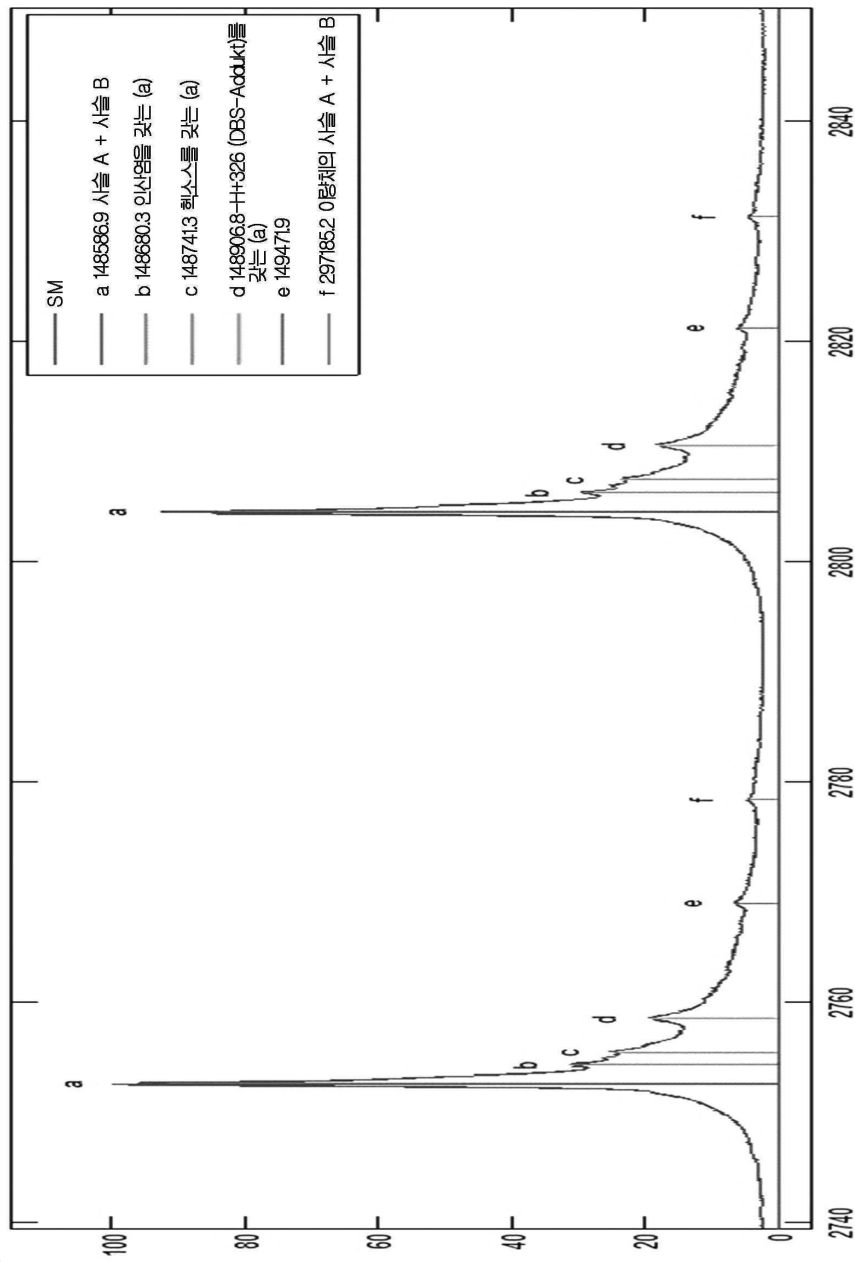
도면9



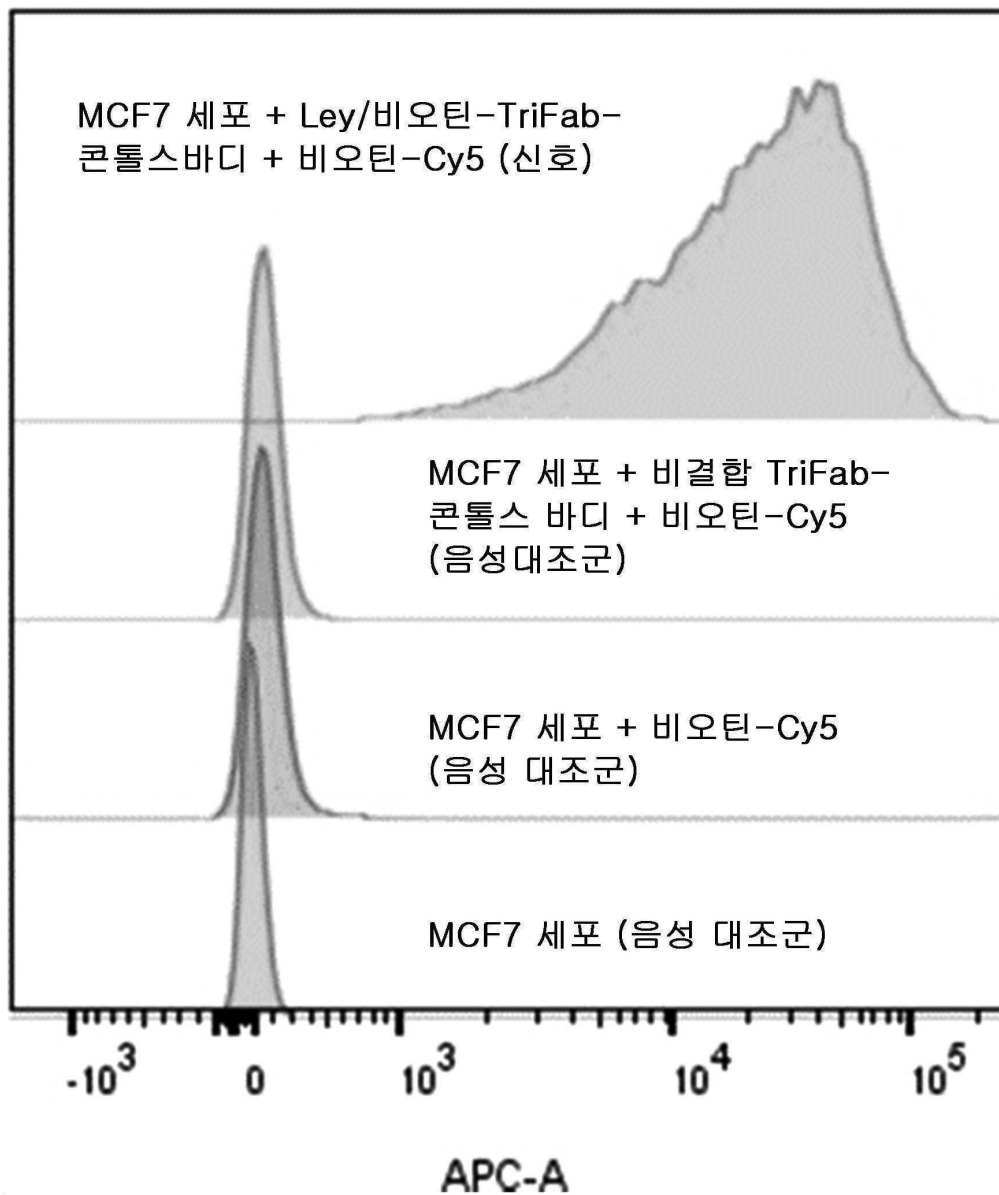
도면10



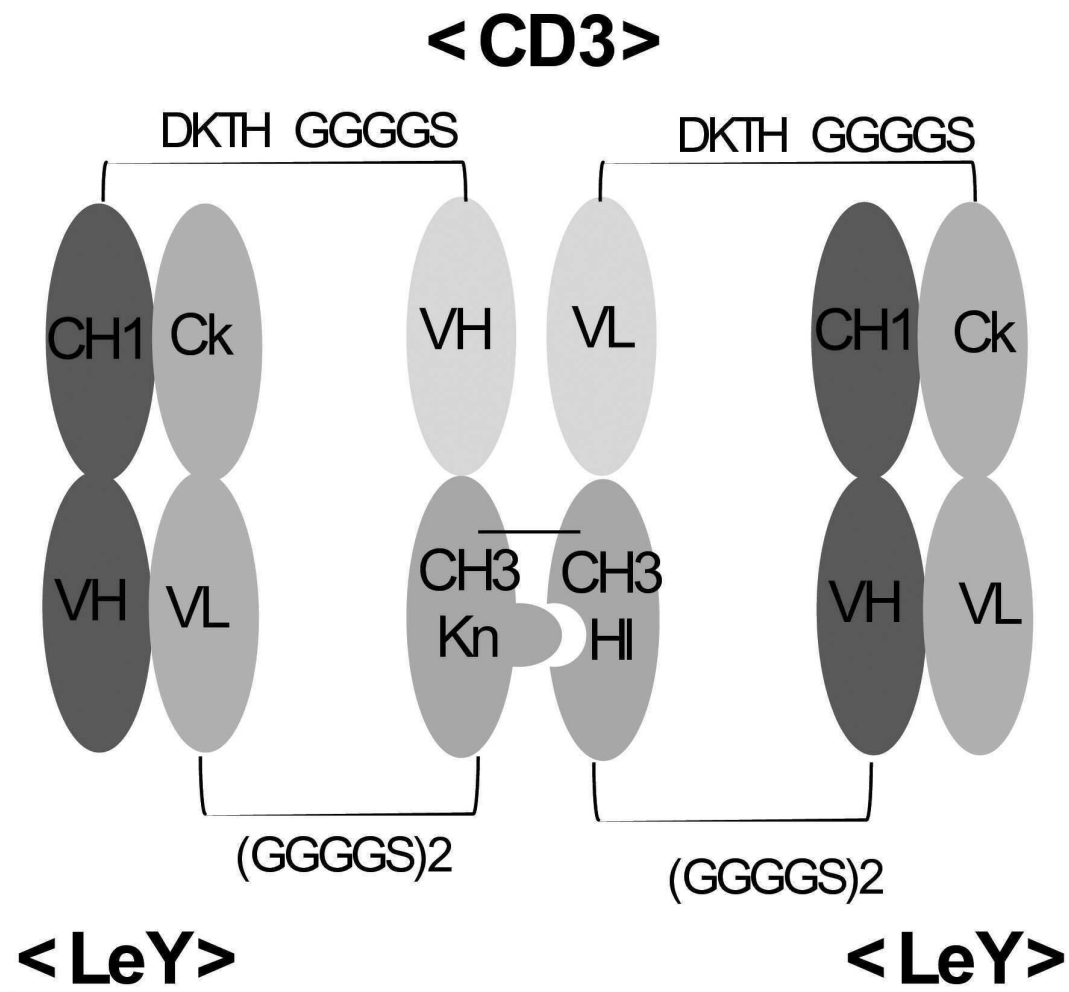
도면11



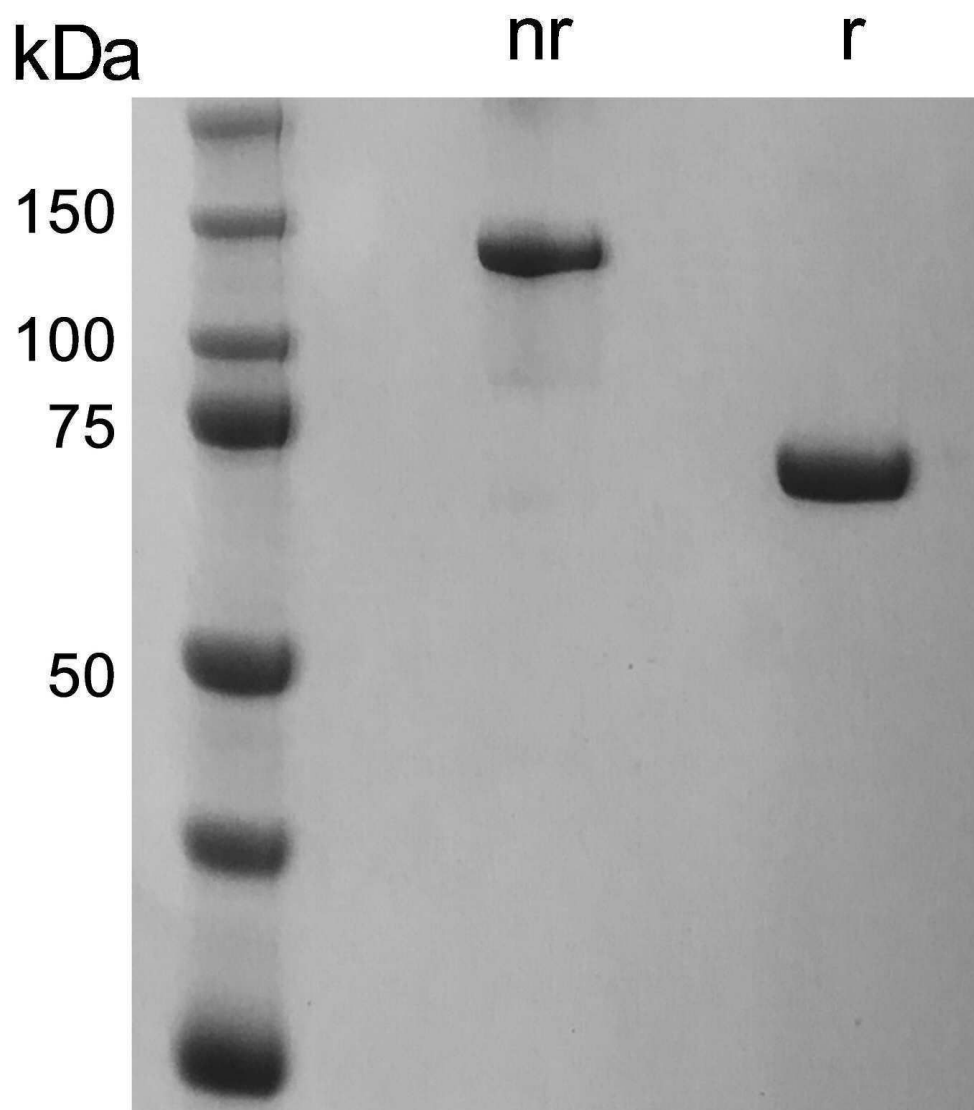
도면12



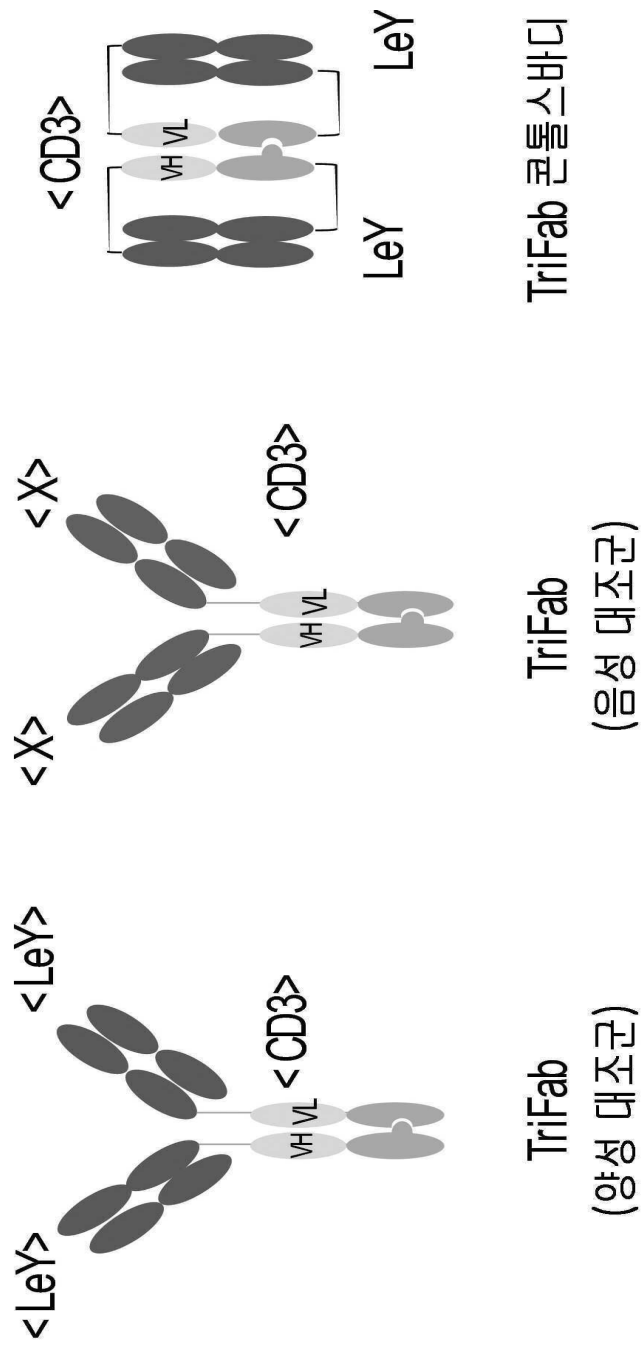
도면13



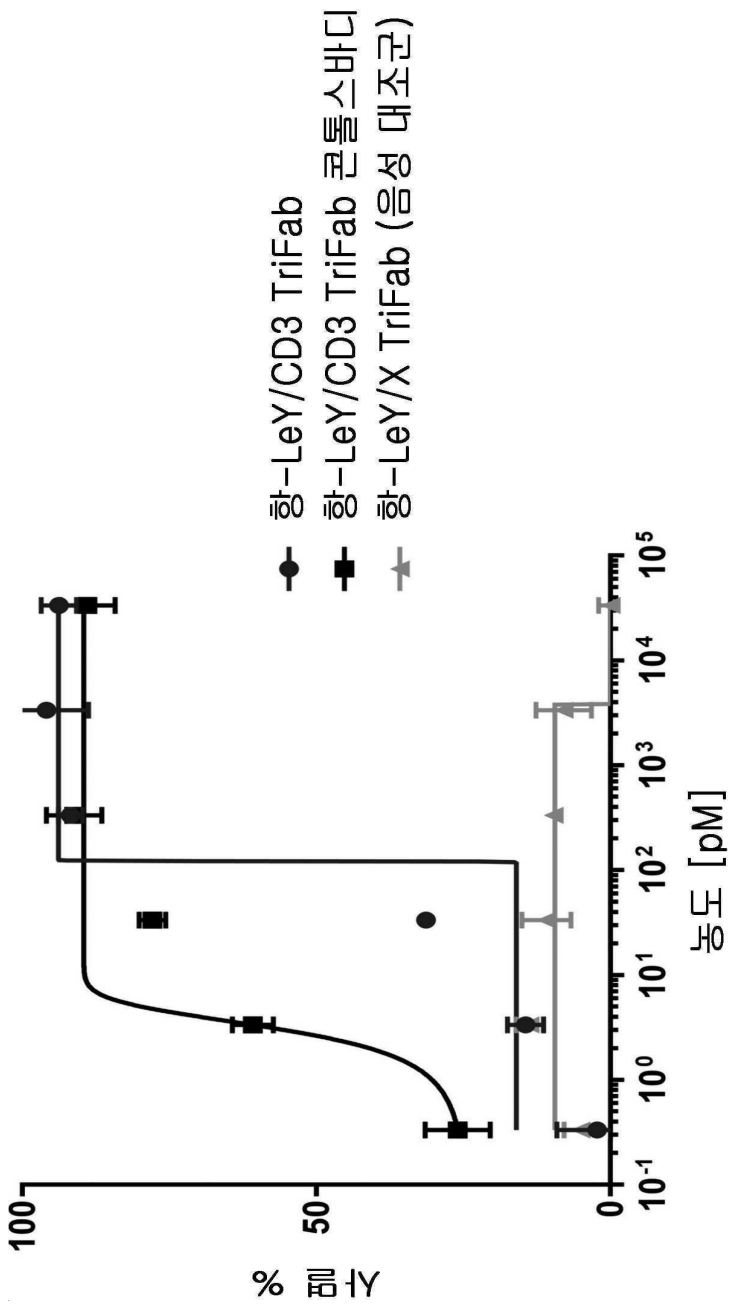
도면14



도면15



도면16



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> TriFab-Contorsbody

<130> P34509-W0

<150> EP17199608.5

<151> 2017-11-01

<160> 38

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Val

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

20 25 30

Trp Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

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

<210> 3

<211> 105

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp

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

65 70 75 80
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 100 105

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

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

85 90 95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 5

<211> 105

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

35 40 45
Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
50 55 60
Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
65 70 75 80
His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
85 90 95
Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 6

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptidic linker

<400> 6

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptidic linker

<400> 7

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 8

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptidic linker

<400> 8

Gln Gln Gln Ser

1

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptidic linker

<400> 9

Gln Gln Gln Gln Ser

1 5

<210> 10

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptidic linker

<400> 10

Ser Ser Ser Gly

1

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptidic linker

<400> 11

Ser Ser Ser Ser Gly

1 5

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptidic linker

<400> 12

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptidic linker

<400> 13

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

1 5 10

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptidic linker

<400> 14

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

1 5 10 15

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptidic linker

<400> 15

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptidic linker

<400> 16

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptidic linker

<400> 17

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

1 5 10 15

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptidic linker

<400> 18

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 19

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptidic linker

<400> 19

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly

20

<210> 20

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptidic linker

<400> 20

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

1 5 10 15

Gly Ser

<210> 21

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptidic linker

<400> 21

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptidic linker

<400> 22

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

1 5 10 15

Gly

<210> 23

<211> 693

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> anti-Her2 circular fusion polypeptide

<400> 23

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly
210 215 220
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
225 230 235 240
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
245 250 255
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
260 265 270
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
275 280 285
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
290 295 300
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
305 310 315 320
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
325 330 335
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala

340 345 350
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 355 360 365
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly

 370 375 380
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 385 390 395 400
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 405 410 415
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 420 425 430
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

 435 440 445
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly
 450 455 460
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 465 470 475 480
 Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 485 490 495
 Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

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

 565 570 575
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 580 585 590

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
595 600 605

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
610 615 620

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

625 630 635 640

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
645 650 655

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
660 665 670

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Ser Gly His
675 680 685

His His His His His
690

<210

> 24

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> His-tag

<400> 24

His His His His His His

1 5

<210> 25

<211> 692

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-cMet circular fusion polypeptide

<400> 25

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr

20 25 30

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

 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 210 215 220

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

275 280 285
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315 320
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 325 330 335
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 340 345 350

 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 355 360 365
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 405 410 415

 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 450 455 460
 Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
 465 470 475 480

 Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
 485 490 495
 Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Gly Leu
 500 505 510
 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Leu Pro
 515 520 525

Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
530 535 540

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
545 550 555 560

Tyr Cys Ala Pro Ser Tyr Tyr Tyr Gly Gly Lys His Val Ala Leu Phe
565 570 575

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
580 585 590

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
595 600 605

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
610 615 620

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
625 630 635 640

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
645 650 655

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
660 665 670

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
675 680 685

Pro Lys Ser Cys
690

<210> 26

<211> 693

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD20 circular fusion polypeptide (1)

<400> 26

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20	25	30
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile		
35	40	45
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe		
50	55	60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly		
100	105	110
Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
115	120	125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
130	135	140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		
145	150	155
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala		
165	170	175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val		
180	185	190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His		
195	200	205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys		
210	215	220
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys		
225	230	235
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu		
245	250	255
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
260	265	270

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
275 280 285

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
290 295 300

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
305 310 315 320

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
325 330 335

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
340 345 350

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
355 360 365

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
370 375 380

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
385 390 395 400

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
405 410 415

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
420 425 430

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
435 440 445

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly
450 455 460

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala
465 470 475 480

Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala
485 490 495

Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser
500 505 510

Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val

515 520 525
Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr
530 535 540

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
545 550 555 560
Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
565 570 575
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
580 585 590
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
595 600 605

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
610 615 620
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
625 630 635 640
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
645 650 655
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
660 665 670

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Ser Gly His
675 680 685

His His His His His

690

<210> 27

<211> 697

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD20 circular fusion polypeptide (2)

<400> 27

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser

				20				25				30			
Trp	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
35				40				45							
Gly	Arg	Ile	Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asp	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe
50				55				60							
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65				70				75				80			
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
85				90				95							
Ala	Arg	Asn	Val	Phe	Asp	Gly	Tyr	Trp	Leu	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
100				105				110							
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
115				120				125							
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
130				135				140							
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
145				150				155				160			
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
165				170				175							
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
180				185				190							
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
195				200				205							
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Gly	Gly
210				215				220							
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro
225				230				235				240			
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
245				250				255							
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
260				265				270							

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 275 280 285

 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 290 295 300
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350

 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 355 360 365
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 405 410 415

 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 420 425 430
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 435 440 445
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 450 455 460
 Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu
 465 470 475 480

 Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys
 485 490 495
 Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln
 500 505 510
 Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu

515 520 525
 Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 530 535 540

 Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr
 545 550 555 560
 Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 565 570 575
 Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
 580 585 590
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
 595 600 605

 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 610 615 620
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 625 630 635 640
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
 645 650 655
 Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
 660 665 670

 Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 675 680 685
 Gly Ser Gly His His His His His His
 690 695
 <210> 28
 <211> 689
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> anti-cMet circular fusion polypeptide VH-out-knob
 <400> 28
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp

20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Leu Pro Ser Leu

50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Pro Ser Tyr Tyr Tyr Gly Gly Lys His Val Ala Leu Phe Ala Tyr

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Ser Cys Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys

225 230 235 240

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

245 250 255

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

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

 275 280 285
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 290 295 300
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 305 310 315 320
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 325 330 335
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

 340 345 350
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 355 360 365
 Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
 370 375 380
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 385 390 395 400
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

 405 410 415
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 420 425 430
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 435 440 445
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 450 455 460
 Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr

 465 470 475 480
 Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
 485 490 495
 Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln
 500 505 510

Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val Tyr Asn Ala Lys Thr

515 520 525

Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr

530 535 540

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr

545 550 555 560

Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly

565 570 575

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

Cys

<210> 29

<211> 692

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-cMet circular fusion polypeptide VH-in-knob

<400> 29

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

210 215 220

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

225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

260 265 270
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

275 280 285
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

290 295 300
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

305 310 315 320
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

325 330 335
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

340 345 350
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr

355 360 365
Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

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

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

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

420 425 430
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

435 440 445
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

450 455 460
Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro

465 470 475 480
Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr

485 490 495
Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Gly Leu

500 505 510

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Leu Pro
515 520 525
Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
530 535 540
Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
545 550 555 560
Tyr Cys Ala Pro Ser Tyr Tyr Tyr Gly Gly Lys His Val Ala Leu Phe
565 570 575
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
580 585 590
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
595 600 605
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
610 615 620
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
625 630 635 640
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
645 650 655
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
660 665 670
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
675 680 685
Pro Lys Ser Cys
690
<210> 30
<211> 685
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> anti-cMet circular fusion polypeptide VH-out-hole
<400> 30
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

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

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

 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser
 210 215 220
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
 225 230 235 240
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 245 250 255

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
260 265 270

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
275 280 285

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
290 295 300

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
305 310 315 320

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
325 330 335

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
340 345 350

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser
355 360 365

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys
370 375 380

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
385 390 395 400

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
405 410 415

Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
420 425 430

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
435 440 445

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly
450 455 460

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala
465 470 475 480

Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala
485 490 495

Ser Ser Ser Val Ser His Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

500 505 510
Ala Pro Arg Leu Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val
515 520 525

Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
530 535 540
Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys His Gln
545 550 555 560
Arg Thr Asn Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
565 570 575
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
580 585 590

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
595 600 605
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
610 615 620
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
625 630 635 640
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Ser Leu Ser Lys Ala Asp
645 650 655

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
660 665 670
Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
675 680 685

<210> 31

<211> 686

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-cMet circular fusion polypeptide VH-out-hole-CH-CL-crossed

<400> 31

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

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

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

 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 145 150 155 160
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 165 170 175
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 180 185 190
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 195 200 205

 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly
 210 215 220
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys
 225 230 235 240
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 245 250 255
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

260 265 270
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 275 280 285
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 290 295 300
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 305 310 315 320
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 325 330 335

 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 340 345 350
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr
 355 360 365
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
 370 375 380
 Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 385 390 395 400

 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 405 410 415
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 420 425 430
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 435 440 445
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 450 455 460

 Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr
 465 470 475 480
 Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu
 485 490 495
 Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser His Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln
 500 505 510

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu
515 520 525

Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp
530 535 540

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr
545 550 555 560

Phe Cys His Gln Arg Thr Asn Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr
565 570 575

Lys Leu Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
580 585 590

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
595 600 605

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
610 615 620

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
625 630 635 640

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
645 650 655

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
660 665 670

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
675 680 685

<210> 32

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-cMet circular fusion polypeptide VH-out-hole-VH-VL-crossed

<400> 32

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser His Leu

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

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

 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 145 150 155 160
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 165 170 175
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 180 185 190
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 195 200 205

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

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
 450 455 460

 Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile
 465 470 475 480
 Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr Phe Ile Asn Trp
 485 490 495
 Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Tyr
 500 505 510
 Pro Tyr Asn Gly Asn Thr Phe Tyr Asp Gln Ser Phe Gln Gly Gln Val

515
 Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser
 530 535 540
 Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Asp
 545 550 555 560
 Tyr Asn Tyr Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 565 570 575
 Ser Ala Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 580 585 590

Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe					
595						600					605									
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln					
610						615					620									
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser					
625						630					635					640				
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu					
645						650					655									

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
660 665 670
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
675 680

<210> 33

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 33

Lys Ala Lys

1

<210> 34

<211> 681

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LeY-biotin-knob

<400> 34

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

1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30
Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45
Ala Tyr Ile Ser Asn Asp Asp Ser Ser Ala Ala Tyr Ser Asp Thr Val

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

65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Arg Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Arg Gly Leu Ala Trp Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

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

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

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

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

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

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

195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

210 215 220

Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr
 225 230 235 240
 Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
 245 250 255
 Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln
 260 265 270
 Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Lys Thr
 275 280 285
 Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 290 295 300
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr
 305 310 315 320
 Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ser Ile Tyr Thr Phe Gly Cys Gly
 325 330 335
 Thr Lys Leu Glu Ile Lys Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365
 Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val
 450 455 460
 Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln

465 470 475 480
 Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ile Ile Val His Ser Asn Gly
 485 490 495
 Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys
 500 505 510
 Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg

 515 520 525
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg
 530 535 540
 Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His
 545 550 555 560
 Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 565 570 575
 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu

 580 585 590
 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 595 600 605
 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 610 615 620
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 625 630 635 640
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His

 645 650 655
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 660 665 670
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 675 680

<210> 35

<211> 694

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LeY-biotin-hole

<400> 35

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Asn Asp Asp Ser Ser Ala Ala Tyr Ser Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Leu Ala Trp Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val
225 230 235 240

Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser
245 250 255

Cys Lys Ser Ser Gly Phe Asn Asn Lys Asp Thr Phe Phe Gln Trp Val
260 265 270

Arg Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro
275 280 285

Ala Asn Gly Phe Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr
290 295 300

Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser
305 310 315 320

Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Asp Thr
325 330 335

Tyr Gly Ala Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
340 345 350

Val Ser Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr
355 360 365

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
370 375 380

Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
420 425 430

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455 460

Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Leu Met Thr
465 470 475 480

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

485 490 495
 Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ile Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
 500 505 510
 Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 515 520 525

 Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 530 535 540
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala
 545 550 555 560
 Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe
 565 570 575
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 580 585 590

 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 595 600 605
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 610 615 620
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 625 630 635 640
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 645 650 655

 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 660 665 670
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 675 680 685
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 690
 <210> 36
 <211> 686
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LeY-CD3-knob chain

<400> 36

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Asn Asp Asp Ser Ser Ala Ala Tyr Ser Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Leu Ala Trp Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Thr His Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
225 230 235 240

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 245 250 255
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 260 265 270

 Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asn
 275 280 285
 Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp
 290 295 300
 Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu
 305 310 315 320
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Tyr Ser Asn Tyr Tyr
 325 330 335

 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln
 340 345 350
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu
 355 360 365
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 370 375 380
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 385 390 395 400

 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 405 410 415
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 420 425 430
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 435 440 445
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 450 455 460

 Gly Gly Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 465 470 475 480
 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ile Ile

485 490 495
 Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 500 505 510
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 515 520 525

 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 530 535 540
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
 545 550 555 560
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
 565 570 575
 Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 580 585 590

 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 595 600 605
 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 610 615 620
 Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 625 630 635 640
 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 645 650 655

 Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 660 665 670
 Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 675 680 685

 <210> 37
 <211> 679
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LeY-CD3-hole chain
 <400> 37
 Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ile Ile Val His Ser

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

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

 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Gly

 210 215 220
 Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
 225 230 235 240
 Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 245 250 255

Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 260 265 270
 Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 275 280 285
 Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 290 295 300
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr
 305 310 315 320
 Tyr Cys Thr Gln Ser Phe Ile Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 325 330 335
 Val Glu Ile Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly
 435 440 445
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Lys Leu Val Glu Ser
 450 455 460
 Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala
 465 470 475 480
 Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln
 485 490 495
 Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Asn Asp Asp

500 505 510
 Ser Ser Ala Ala Tyr Ser Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
 515 520 525
 Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Arg Leu Lys

 530 535 540
 Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Ala Trp Gly
 545 550 555 560
 Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 565 570 575
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 580 585 590
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

 595 600 605
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 610 615 620
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 625 630 635 640
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 645 650 655
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

 660 665 670
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 675
 <210> 38
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DKTHGGGGS - linker
 <400> 38
 Asp Lys Thr His Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5