



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0067197
(43) 공개일자 2020년06월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/46 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/468 (2013.01)
C07K 2317/10 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7014205
(22) 출원일자(국제) 2018년10월19일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년05월18일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/078675
(87) 국제공개번호 WO 2019/077092
국제공개일자 2019년04월25일
(30) 우선권주장
17197616.0 2017년10월20일
유럽특허청(EPO)(EP)

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

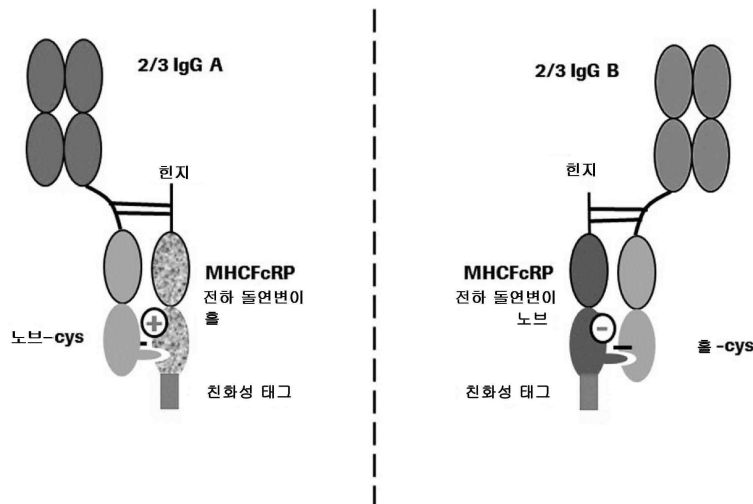
전체 청구항 수 : 총 46 항

(54) 발명의 명칭 단일특이적 항체로부터 다중특이적 항체의 생성 방법

(57) 요약

본원에는 정확하게 조립된 전체 길이 이중특이적 항체의 생성을 촉진시키는 비대칭 교란 돌연변이에 의해 1/2 로 불안정화된 2 개의 2/3-IgG 사이의 반-항체 교환 반응에 의한 다중특이적 항체의 생성 방법이 보고되어 있다. 상기 방법은 환원제의 부재하에서 수행될 수 있으며, 출발 2/3-IgG 에서 힌지 영역 디설피드 결합을 필요로 하지 않는다.

대표도



(52) CPC특허분류

C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/35 (2013.01)
C07K 2317/50 (2013.01)
C07K 2317/515 (2013.01)
C07K 2317/526 (2013.01)
C07K 2317/64 (2013.01)
C07K 2317/66 (2013.01)

(72) 발명자

조르쥬 기

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

호프만 아이케

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

마이어 클라우스

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

보르만 펠릭스

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

명세서

청구범위

청구항 1

하기의 단계를 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법:

- 다음을 포함하는 제 1 다량체:

a-1) 다음을 포함하는 제 1 폴리펩티드:

i) 면역글로불린 G CH3 도메인,

및

ii) 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 이의 일부,

및

a-2) 다음을 포함하는 제 2 폴리펩티드:

면역글로불린 G CH3 도메인,

여기에서,

a-3) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브-cys 를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함함,

또는

제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀-cys 를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,

a-4) 제 2 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 a-3) 하의 돌연변이와 상이하고, 제 1 다량체의 CH3-CH3 결합 자유 에너지를 증가시키는 돌연변이를 포함함,

및

다음을 포함하는 제 2 다량체:

b-1) 다음을 포함하는 제 3 폴리펩티드:

i) 면역글로불린 G CH3 도메인,

및

b-2) 다음을 포함하는 제 4 폴리펩티드:

i) 면역글로불린 G CH3 도메인,

및

ii) 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 이의 일부,

여기에서,

b-3) 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀-cys 를 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드는 돌연변이 노브-cys 를 포함하고, 제 3 폴리펩티드는 돌연변이 홀을 포함함,

또는

제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브-cys 를 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드는 돌연변이 홀-cys 를 포함하고, 제 3 폴리펩티드는 돌연변이 노브를 포함함,

b-4) 제 3 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 a-3), a-4) 및 b-3) 하의 돌연변이와 상이하고, 제 2 다량체의 CH3-

CH3 결합 자유 에너지를 증가시키는 돌연변이를 포함함,

를 배양하여, 제 2 및 제 3 폴리펩티드를 포함하는 제 3 다량체 및 제 1 및 제 4 폴리펩티드를 포함하는 제 4 다량체를 형성하는 단계,

및

- 제 4 다량체를 회수하여 폴리펩티드를 제조하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, a-4) 하의 돌연변이가 E357K 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 370 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하며, b-4) 하의 돌연변이가 K370E 이고, 제 4 폴리펩티드가 위치 357 에서 아미노산 잔기 E 를 포함하며 Kabat EU 지수에 따라서 번호 부여된 위치를 갖는 폴리펩티드의 제조 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, a-4) 하의 돌연변이가 D356K 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 439 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하며, b-4) 하의 돌연변이가 K439E 이고, 제 4 폴리펩티드가 위치 356 에서 아미노산 잔기 D 를 포함하며 Kabat EU 지수에 따라서 번호 부여된 위치를 갖는 폴리펩티드의 제조 방법.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 및/또는 제 2 폴리펩티드가 아미노산 서열 HTSPSP (SEQ ID NO: 85) 또는 아미노산 서열 HTPAPE (SEQ ID NO: 86) 를 포함하고, 제 4 및/또는 제 3 폴리펩티드가 아미노산 서열 HTSPSP (SEQ ID NO: 85) 또는 아미노산 서열 HTPAPE (SEQ ID NO: 86) 를 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법.

청구항 5

하기의 단계를 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법:

- 다음을 포함하는 제 1 다량체:

a-1) 다음을 포함하는 제 1 폴리펩티드:

i) 면역글로불린 G CH3 도메인,

및

ii) 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 이의 일부,

및

a-2) 다음을 포함하는 제 2 폴리펩티드:

면역글로불린 G CH3 도메인,

여기에서,

a-3) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함함,

또는

제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,

a-4) 제 2 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 a-3) 하의 돌연변이와 상이하고, 제 1 다량체의 CH3-CH3 결합 자유 에너지를 증가시키는 돌연변이를 포함함,

a-5) 제 1 및/또는 제 2 폴리펩티드는 아미노산 서열 HTSPSP (SEQ ID NO: 85) 또는 아미노산 서열 HTPAPE (SEQ ID NO: 86) 를 포함함,

및

다음을 포함하는 제 2 다량체:

b-1) 다음을 포함하는 제 3 폴리펩티드:

i) 면역글로불린 G CH3 도메인,

및

b-2) 다음을 포함하는 제 4 폴리펩티드:

i) 면역글로불린 G CH3 도메인,

및

ii) 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 이의 일부,

여기에서,

b-3) 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드는 돌연변이 노브를 포함하고, 제 3 폴리펩티드는 돌연변이 홀을 포함함,

또는

제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드는 돌연변이 홀을 포함하고, 제 3 폴리펩티드는 돌연변이 노브를 포함함,

b-4) 제 3 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 a-3), a-4) 및 b-3) 하의 돌연변이와 상이하고, 제 2 다량체의 CH3-CH3 결합 자유 에너지를 증가시키는 돌연변이를 포함함,

b-5) 제 4 및/또는 제 3 폴리펩티드는 아미노산 서열 HTSPPSP (SEQ ID NO: 85) 또는 아미노산 서열 HTPAPE (SEQ ID NO: 86) 를 포함함,

를 배양하여, 제 2 및 제 3 폴리펩티드를 포함하는 제 3 다량체 및 제 1 및 제 4 폴리펩티드를 포함하는 제 4 다량체를 형성하는 단계,

및

- 제 4 다량체를 회수하여 폴리펩티드를 제조하는 단계.

청구항 6

제 5 항에 있어서, a-4) 하의 돌연변이가 E357K 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 370 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하며, b-4) 하의 돌연변이가 K370E 이고, 제 4 폴리펩티드가 위치 357 에서 아미노산 잔기 E 를 포함하며 Kabat EU 지수에 따라서 번호 부여된 위치를 갖는 폴리펩티드의 제조 방법.

청구항 7

제 5 항에 있어서, a-4) 하의 돌연변이가 D356K 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 439 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하며, b-4) 하의 돌연변이가 K439E 이고, 제 4 폴리펩티드가 위치 356 에서 아미노산 잔기 D 를 포함하며 Kabat EU 지수에 따라서 번호 부여된 위치를 갖는 폴리펩티드의 제조 방법.

청구항 8

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 폴리펩티드가 제 2 폴리펩티드에서의 돌연변이된 아미노산 잔기와 상호 작용하는 위치(들)에서 CH3 도메인에서의 각각의 면역글로불린 G 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함하고, 제 4 폴리펩티드가 제 3 폴리펩티드에서의 돌연변이된 아미노산 잔기와 상호 작용하는 위치(들)에서 CH3 도메인에서의 각각의 면역글로불린 G 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법.

청구항 9

하기의 단계를 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법:

- 다음을 포함하는 제 1 다량체:

a-1) 다음을 포함하는 제 1 폴리펩티드:

i) 면역글로불린 G CH3 도메인,

및

ii) 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 이의 일부,

및

a-2) 다음을 포함하는 제 2 폴리펩티드:

면역글로불린 G CH3 도메인,

여기에서,

a-3) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함함,

또는

제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,

a-4) 제 1 폴리펩티드는 위치 370 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하고, 제 2 폴리펩티드는 돌연변이 E357K 를 포함함,

및

다음을 포함하는 제 2 다량체:

b-1) 다음을 포함하는 제 3 폴리펩티드:

i) 면역글로불린 G CH3 도메인,

및

b-2) 다음을 포함하는 제 4 폴리펩티드:

i) 면역글로불린 G CH3 도메인,

및

ii) 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 이의 일부,

여기에서,

b-3) 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드는 돌연변이 노브를 포함하고, 제 3 폴리펩티드는 돌연변이 홀을 포함함,

또는

제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드는 돌연변이 홀을 포함하고, 제 3 폴리펩티드는 돌연변이 노브를 포함함,

b-4) 제 3 폴리펩티드는 돌연변이 K370E 를 포함하고, 제 4 폴리펩티드는 위치 357 에서 아미노산 잔기 E 를 포함함,

를 배양하여, 제 2 및 제 3 폴리펩티드를 포함하는 제 3 다량체 및 제 1 및 제 4 폴리펩티드를 포함하는 제 4 다량체를 형성하는 단계,

및

- 제 4 다량체를 회수하여 폴리펩티드를 제조하는 단계,

Kabat EU 지수에 따라서 번호 부여된 위치를 가짐.

청구항 10

하기의 단계를 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법:

- 다음을 포함하는 제 1 다량체:

a-1) 다음을 포함하는 제 1 폴리펩티드:

i) 면역글로불린 G CH3 도메인,

및

ii) 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 이의 일부,

및

a-2) 다음을 포함하는 제 2 폴리펩티드:

면역글로불린 G CH3 도메인,

여기에서,

a-3) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함함,

또는

제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,

a-4) 제 1 폴리펩티드는 위치 439 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하고, 제 2 폴리펩티드는 돌연변이 D356K 를 포함함,

및

다음을 포함하는 제 2 다량체:

b-1) 다음을 포함하는 제 3 폴리펩티드:

i) 면역글로불린 G CH3 도메인,

및

b-2) 다음을 포함하는 제 4 폴리펩티드:

i) 면역글로불린 G CH3 도메인,

및

ii) 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 이의 일부,

여기에서,

b-3) 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드는 돌연변이 노브를 포함하고, 제 3 폴리펩티드는 돌연변이 홀을 포함함,

또는

제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드는 돌연변이 홀을 포함하고, 제 3 폴리펩티드는 돌연변이 노브를 포함함,

b-4) 제 3 폴리펩티드는 돌연변이 K439E 를 포함하고, 제 4 폴리펩티드는 위치 356 에서 아미노산 잔기 D 를 포함함,

를 배양하여, 제 2 및 제 3 폴리펩티드를 포함하는 제 3 다량체 및 제 1 및 제 4 폴리펩티드를 포함하는 제 4 다량체를 형성하는 단계,

및

- 제 4 다량체를 회수하여 폴리펩티드를 제조하는 단계,

Kabat EU 지수에 따라서 번호 부여된 위치를 가짐.

청구항 11

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 2 폴리펩티드 및 제 3 폴리펩티드를 포함하는 제 3 다량체의 CH₃-CH₃ 결합 자유 에너지가 제 1 다량체 및/또는 제 2 다량체의 CH₃-CH₃ 결합 자유 에너지보다 낮은 폴리펩티드의 제조 방법.

청구항 12

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드가 (단리 가능한) 이량체를 형성하고, 제 3 폴리펩티드 및 제 4 폴리펩티드가 (단리 가능한) 이량체를 형성하는 폴리펩티드의 제조 방법.

청구항 13

제 4 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 및/또는 제 2 폴리펩티드가 IgG 야생형 힌지 영역 아미노산 서열 HTCPCP (SEQ ID NO: 31) 대신 아미노산 서열 HTSPSP (SEQ ID NO: 85) 를 포함하고, 및/또는 제 1 및/또는 제 2 폴리펩티드가 IgG 야생형 힌지 영역 아미노산 서열 HTCPCPAPE (SEQ ID NO: 90) 대신 아미노산 서열 HTPAPE (SEQ ID NO: 86) 를 포함하며, 및/또는 제 3 및/또는 제 4 폴리펩티드가 IgG 야생형 힌지 영역 아미노산 서열 HTCPCP (SEQ ID NO: 31) 대신 아미노산 서열 HTSPSP (SEQ ID NO: 85) 을 포함하고, 및/또는 제 3 및/또는 제 4 폴리펩티드가 IgG 야생형 힌지 영역 아미노산 서열 HTCPCPAPE (SEQ ID NO: 90) 대신 아미노산 서열 HTPAPE (SEQ ID NO: 86) 를 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법.

청구항 14

제 5 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하고, 제 2 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하며, 제 3 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하고, 제 4 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법.

청구항 15

제 5 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브-cys 를 포함하고, 제 2 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하며, 제 3 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하고, 제 4 폴리펩티드가 돌연변이 홀-cys 를 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법.

청구항 16

제 1 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 내지 제 4 폴리펩티드가 각각 N-말단에서 C-말단 방향으로 IgG1 CH₂ 도메인 및 IgG1 CH₃ 도메인을 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법.

청구항 17

제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 내지 제 4 폴리펩티드가 각각 N-말단에서 C-말단 방향으로 i) 서로 독립적으로 아미노산 서열 DKTHTCPPC (SEQ ID NO: 65) 또는 아미노산 서열 DKHTSPSP (SEQ ID NO: 66) 또는 아미노산 서열 DKHTT (SEQ ID NO: 91), ii) IgG1 CH₂ 도메인, 및 iii) IgG1 CH₃ 도메인을 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법.

청구항 18

제 1 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 있어서, i) 제 1 및 제 4 폴리펩티드가 각각 IgG1 CH₁ 도메인 및 가변 도메인을 추가로 포함하고, 또는 ii) 제 1 또는 제 4 폴리펩티드가 IgG1 CH₁ 도메인을 포함하며, 다른 폴리펩티드가 경쇄 불변 도메인을 포함하고, 각각의 폴리펩티드가 가변 도메인을 추가로 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법.

청구항 19

제 18 항에 있어서, 제 1 폴리펩티드의 가변 도메인이 중쇄 가변 도메인이고, 제 4 폴리펩티드의 가변 도메인이 경쇄 가변 도메인이거나, 또는 그 반대이며, 이들 도메인이 폴리펩티드에서 결합 부위를 형성하는 폴리펩티드의 제조 방법.

청구항 20

제 1 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 및 제 4 폴리펩티드가 N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 서로 독립적으로 선택되는 폴리펩티드의 제조 방법:

- i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인,
- iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 중쇄 가변 도메인,
- iv) scFv, 임의로 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- v) scFab, 임의로 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- vi) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,
- vii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- viii) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- ix) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- x) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,
- xi) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- xii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 경쇄 가변 도메인,
- xiii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- xiv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드

링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인,

xv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인, 및

xvi) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 제 2 펩티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분은 표적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성함.

청구항 21

제 1 항 내지 제 20 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 및 제 2 다량체가 각각 제 1 폴리펩티드 및 제 4 폴리펩티드와 관련된 항체 경쇄를 추가로 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법.

청구항 22

제 1 항 내지 제 21 항 중 어느 한 항에 있어서,

제 1 다량체가

제 1 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:

i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인,

ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인,

iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 중쇄 가변 도메인,

iv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,

v) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인,

vi) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,

vii) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,

viii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 경쇄 가변 도메인,

ix) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,

x) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인,

xi) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인,

xii) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 제 2 펩티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분은 표적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성함,

돌연변이 노브 또는 돌연변이 홀을 포함함,

및

제 2 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:

SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인,

제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우 돌연변이 홀을 포함함,

교란 돌연변이 D356K, E357K, K370E, 또는 K439E 를 포함하고, 이로써 제 1 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 야생형 면역글로불린 IgG1 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 인간 면역글로불린 IgG1 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함함,

여기에서, 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드는 이량체를 형성함,

및

경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 포함하는 제 5 폴리펩티드,

여기에서, 상기 제 3 폴리펩티드는 디설피드 결합에 의해 제 1 폴리펩티드에 공유 결합됨,

를 포함하고,

제 2 다량체가

제 3 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:

SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인,

제 2 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 제 2 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우 돌연변이 홀을 포함함,

제 2 교란 돌연변이 D356K, E357K, K370E, 또는 K439E 를 포함하고, 이로써 제 5 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 야생형 IgG1 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 인간 IgG1 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함하며, 이로써 제 4 폴리펩티드에서의 교란 돌연변이는 제 2 폴리펩티드에서의 교란 돌연변이와 상이한 위치에 있음,

및

제 4 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:

i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인,

ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인,

iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 중쇄 가변 도메인,

iv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,

v) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인 및 제 2 중쇄 가변 도메인,

- vi) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 캡티드 링커, 및 scFv,
 - vii) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 캡티드 링커, 및 scFab,
 - viii) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 캡티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 경쇄 가변 도메인,
 - ix) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 캡티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
 - x) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 캡티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인,
 - xi) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 캡티드 링커, 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인, 및
 - xii) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 캡티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 제 2 캡티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분은 표적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성함,
- 제 4 폴리캡티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 제 4 폴리캡티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우 돌연변이 홀을 포함함,
- 여기에서, 상기 제 4 폴리캡티드 및 제 5 폴리캡티드는 이량체를 형성함,
- 및
- 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 포함하는 제 6 폴리캡티드,
- 여기에서, 상기 제 6 폴리캡티드는 디설피드 결합에 의해 제 4 폴리캡티드에 공유 결합됨
- 를 포함하는 폴리캡티드의 제조 방법.

청구항 23

제 1 항 내지 제 3 항 및 제 9 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서, 배양 단계가 환원제의 존재 또는 부재하에 있는 폴리캡티드의 제조 방법.

청구항 24

제 4 항 내지 제 8 항 및 제 13 항 내지 제 22 항 중 어느 한 항에 있어서, 배양 단계가 환원제의 부재하에 있는 폴리캡티드의 제조 방법.

청구항 25

제 1 항 내지 제 24 항 중 어느 한 항에 있어서, i) 제 2 폴리캡티드 및 제 3 폴리캡티드가 (C-말단) 태그를 추가로 포함하는 폴리캡티드의 제조 방법.

청구항 26

제 25 항에 있어서,

i) 태그가 아미노산 서열 HHHHHH (SEQ ID NO: 67) 또는 HHHHHHHH (SEQ ID NO: 68) 를 가지며, 회수가 금속 (니켈) 킬레이트 친화성 크로마토그래피 컬럼 상에서의 크로마토그래피에 의하고,

또는

ii) 태그가 아미노산 서열 EPEA (SEQ ID NO: 87) 를 가지며, 회수가 C-tag 친화성 크로마토그래피 컬럼 상에서

의 크로마토그래피에 의하는

폴리펩티드의 제조 방법.

청구항 27

하기의 단계를 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드의 식별 방법:

- a) 제 1 표적에 특이적으로 결합하는 제 1 의 다수의 다량체에서 선택되는 제 1 다량체 및 제 2 표적 (제 1 표적과 상이함) 에 특이적으로 결합하는 제 2 의 다수의 다량체에서 선택되는 제 2 다량체의 각각의 조합을 제 1 항 내지 제 26 항 중 어느 한 항에 따른 방법에 적용하여 다수의 다중특이적 폴리펩티드를 제조하는 단계,
- b) 단계 a) 에서 제조된 다수의 다중특이적 폴리펩티드의 각각의 구성원에 대해 결합 분석에서의 2 개의 표적에 대한 동시 결합을 개별적으로 측정하는 단계, 및
- c) 결합 분석의 결과에 기초하여 다수의 다량체성 폴리펩티드로부터 다량체성 폴리펩티드를 선택함으로써 다중 특이적 폴리펩티드를 식별하는 단계.

청구항 28

제 27 항에 있어서, 결합 분석이 ELISA 또는 SPR 방법인 다중특이적 폴리펩티드의 식별 방법.

청구항 29

돌연변이 노브를 포함하는 다량체성 폴리펩티드:

- a) 모두 면역글로불린 G CH3 도메인을 포함하는 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드, 여기에서,
 - a-1) i) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브-cys 를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하며, 또는 ii) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀-cys 를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,
 - a-2) 제 1 폴리펩티드는 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 결합 부위의 적어도 일부를 포함함,
 - a-3) 제 2 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 a-1) 하의 돌연변이와 상이한 교란 돌연변이를 포함하고, 이로써 제 1 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 각각의 야생형 면역글로불린 G 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 각각의 면역글로불린 G 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함함,
 - a-4) 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드는 이량체를 형성함,

또는

- b) 모두 면역글로불린 G CH3 도메인을 포함하는 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드, 여기에서,
 - b-1) i) 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀-cys 를 포함하며, 또는 ii) 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브-cys 를 포함함,
 - b-2) 제 1 폴리펩티드는 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 결합 부위의 적어도 일부를 포함함,
 - b-3) 제 2 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 b-1) 하의 돌연변이와 상이한 교란 돌연변이를 포함하고, 이로써 제 1 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 각각의 야생형 면역글로불린 G 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 각각의 면역글로불린 G 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함함,
 - b-4) 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드는 이량체를 형성함,

Kabat EU 지수에 따른 번호 부여를 가짐.

청구항 30

제 29 항에 있어서, 교란 돌연변이가 E357K 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 370 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하며; 또는 교란 돌연변이가 K370E 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 357 에서 아미노산 잔기 E 를 포함하는 다량체성 폴리펩티드.

청구항 31

제 29 항에 있어서, 제 1 교란 돌연변이가 D356K 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 439 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하며; 또는 교란 돌연변이가 K439E 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 356 에서 아미노산 잔기 D 를 포함하는 다량체성 폴리펩티드.

청구항 32

다음을 포함하는, 단리된 다량체성 폴리펩티드:

a-1) 다음을 포함하는 제 1 폴리펩티드:

i) 면역글로불린 G CH3 도메인,

및

ii) 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 이의 일부,

및

a-2) 다음을 포함하는 제 2 폴리펩티드:

면역글로불린 G CH3 도메인,

여기에서,

a-3) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브-cys 를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함함,

또는

제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀-cys 를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,

a-4) 제 2 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 a-3) 하의 돌연변이와 상이하고, 제 1 다량체의 CH3-CH3 결합 자유 에너지를 증가시키는 돌연변이를 포함함.

청구항 33

제 32 항에 있어서, a-4) 하의 돌연변이가 E357K 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 370 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하며; 또는 a-4) 하의 돌연변이가 K370E 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 357 에서 아미노산 잔기 E 를 포함하며 Kabat EU 지수에 따른 번호 부여를 갖는 단리된 다량체성 폴리펩티드.

청구항 34

제 32 항에 있어서, a-4) 하의 돌연변이가 D356K 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 439 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하며; 또는 a-4) 하의 돌연변이가 K439E 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 356 에서 아미노산 잔기 D 를 포함하며 Kabat EU 지수에 따른 번호 부여를 갖는 단리된 다량체성 폴리펩티드.

청구항 35

제 32 항 내지 제 34 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 및/또는 제 2 폴리펩티드가 아미노산 서열 HTSPSP (SEQ ID NO: 85) 또는 아미노산 서열 HTPAPE (SEQ ID NO: 86) 를 포함하는 단리된 다량체성 폴리펩티드.

청구항 36

다음을 포함하는, 단리된 다량체성 폴리펩티드:

a-1) 다음을 포함하는 제 1 폴리펩티드:

i) 면역글로불린 G CH3 도메인,

및

ii) 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 이의 일부,

및

a-2) 다음을 포함하는 제 2 폴리펩티드:

면역글로불린 G CH3 도메인,

여기에서,

a-3) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함함,

또는

제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,

a-4) 제 2 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 a-3) 하의 돌연변이와 상이하고, 제 1 다량체의 CH3-CH3 결합 자유 에너지를 증가시키는 돌연변이를 포함함,

a-5) 제 1 및/또는 제 2 폴리펩티드는 아미노산 서열 HTSPSP (SEQ ID NO: 85) 또는 아미노산 서열 HTPAPE (SEQ ID NO: 86) 를 포함함.

청구항 37

제 36 항에 있어서, a-4) 하의 돌연변이가 E357K 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 370 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하며; 또는 a-4) 하의 돌연변이가 K370E 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 357 에서 아미노산 잔기 E 를 포함하며 Kabat EU 지수에 따른 번호 부여를 갖는 단리된 다량체성 폴리펩티드.

청구항 38

제 36 항에 있어서, a-4) 하의 돌연변이가 D356K 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 439 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하며; 또는 a-4) 하의 돌연변이가 K439E 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 356 에서 아미노산 잔기 D 를 포함하며 Kabat EU 지수에 따른 번호 부여를 갖는 단리된 다량체성 폴리펩티드.

청구항 39

제 32 항 내지 제 36 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 폴리펩티드가 제 2 폴리펩티드에서의 돌연변이된 아미노산 잔기와 상호 작용하는 위치(들)에서 CH3 도메인에서의 각각의 면역글로불린 G 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함하는 단리된 다량체성 폴리펩티드.

청구항 40

다음을 포함하는, 단리된 다량체성 폴리펩티드:

a-1) 다음을 포함하는 제 1 폴리펩티드:

i) 면역글로불린 G CH3 도메인,

및

ii) 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 이의 일부,

및

a-2) 다음을 포함하는 제 2 폴리펩티드:

면역글로불린 G CH3 도메인,

여기에서,

a-3) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함함,

또는

제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,

a-4) 제 1 폴리펩티드는 위치 370 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하고, 제 2 폴리펩티드는 돌연변이 E357K 를 포함함,

또는

제 2 폴리펩티드는 돌연변이 K370E 를 포함하고, 제 1 폴리펩티드는 위치 357 에서 아미노산 잔기 E 를 포함함.

청구항 41

다음을 포함하는, 단리된 다량체성 폴리펩티드:

a-1) 다음을 포함하는 제 1 폴리펩티드:

i) 면역글로불린 G CH3 도메인,

및

ii) 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 이의 일부,

및

a-2) 다음을 포함하는 제 2 폴리펩티드:

면역글로불린 G CH3 도메인,

여기에서,

a-3) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함함,

또는

제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,

a-4) 제 1 폴리펩티드는 위치 439 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하고, 제 2 폴리펩티드는 돌연변이 D356K 를 포함함,

또는

제 2 폴리펩티드는 돌연변이 K439E 를 포함하고, 제 1 폴리펩티드는 위치 356 에서 아미노산 잔기 D 를 포함함.

청구항 42

제 29 항 내지 제 42 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 폴리펩티드가 N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 단리된 다량체성 폴리펩티드:

i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,

ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인,

iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 중쇄 가변 도메인,

iv) scFv, 임의로 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,

- v) scFab, 임의로 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- vi) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,
- vii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- viii) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- ix) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- x) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,
- xi) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- xii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 경쇄 가변 도메인,
- xiii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- xiv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인,
- xv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인, 및
- xvi) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 제 2 펩티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분은 표적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성함.

청구항 43

제 29 항 내지 제 42 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 폴리펩티드와 관련된 항체 경쇄를 추가로 포함하는 단리된 다량체성 폴리펩티드.

청구항 44

제 43 항에 있어서,

제 1 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:

- i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인,
- ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드

드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인,

iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 중쇄 가변 도메인,

iv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,

v) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인,

vi) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,

vii) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,

viii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 경쇄 가변 도메인,

ix) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,

x) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인,

xi) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인,

xii) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 제 2 펩티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분은 표적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성함,

및

제 2 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:

SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인,

제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우 돌연변이 홀을 포함함,

교란 돌연변이 D356K, E357K, K370E, 또는 K439E 를 포함하고, 이로써 제 1 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 야생형 면역글로불린 IgG1 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 인간 면역글로불린 IgG1 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함함,

및

제 3 폴리펩티드로서, 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 포함하는 폴리펩티드,

여기에서, 제 3 폴리펩티드는 디설피드 결합에 의해 제 1 폴리펩티드에 공유 결합됨,

를 포함하는 단리된 다량체성 폴리펩티드.

청구항 45

제 29 항 내지 제 44 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 2 폴리펩티드가 (C-말단) 태그를 추가로 포함하는 단리된

다량체성 폴리펩티드.

청구항 46

제 45 항에 있어서,

i) 태그가 아미노산 서열 HHHHHH (SEQ ID NO: 67) 또는 HHHHHHHH (SEQ ID NO: 68) 를 가지며,

또는

ii) 태그가 아미노산 서열 EPEA (SEQ ID NO: 87) 를 가지는

단리된 다량체성 폴리펩티드.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원에는 신규의 반-항체 교환 방법을 사용하는 이중- 및 다중특이적 항체의 용이하고 확장 가능한 생성 방법이 보고되어 있다.

배경 기술

[0002] 단일특이적 항체 유도체의 조립된 이중특이적 항체로의 생화학적 전환을 위한 현재의 기술 상태의 방법은 (i) 반-항체 상보 반응 및 (ii) IgG-IgG 교환 반응을 적용한다.

[0003] 이들 기술은, 예를 들어 WO 2015/046467, Rispens et al., J. Biol. Chem. 289 (2014) 6098-6109, US 9,409,989, WO 2013/060867, WO 2011/131746, WO 2011/133886, WO 2011/143545, WO 2010/151792, Gunasekaran et al., J. Biol. Chem. 285 (2010) 19637-19646, WO 2009/041613, WO 2009/089004, WO 2008/119353, WO 2007/114325, US 8,765,412, US 8,642,745, WO 2006/047340, WO 2006/106905, WO 2005/042582, WO 2005/062916, WO 2005/000898, US 7,183,076, US 7,951,917, Segal, D.M., et al., Curr. Opin. Immunol. 11 (1999) 558-562, WO 98/50431, WO 98/04592, Merchant, A.M., et al., Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681, WO 96/27011, Carter, P., et al., Immunotechnol. 2 (1996) 73, WO 93/11162, 및 Kostelny, S.A., et al., J. Immunol. 148 (1992) 1547-1553 에 개시되어 있다.

[0004] 단일특이적 항체 또는 항체 유도체를 bsAb 로 전환시키기 위한 기술 상태의 방법은, 예를 들어 조립 후 bsAb 제제의 처리 및 조성에 관한 제한과 같은 단점을 가진다.

[0005] 예를 들어, 반-항체 기술은 단일특이적 및 1 가 항체 측을 2 가 IgG 에 조립한다. 입력 분자의 발현 및 교환 반응 자체는 반-항체 뿐만 아니라, 2 가 (단일특이적) 항체 유도체와 같은 IgG 를 생성한다. 응집체는 또한 입력 물질 및 조립 반응의 산출물에도 존재한다. 둘 모두 (2 가 단일특이적 항체 및 응집체) 는 정교한 정제 접근법을 통해 조립된 bsAb 로부터 정량적으로 제거되거나, 또는 (정량적 제거가 높은 처리량 방식으로 는 달성하기 어렵기 때문에) 이들은 bsAb 제제를 어느 정도 '오염시키는' 것이 필요하다.

[0006] Fab-arm 교환 기술은, 예를 들어 단일특이적 2 가 IgG-유도체로부터 이중특이적 2 가 IgG 를 조립한다. 따라서, 교환 반응으로의 입력은 2 가, 즉, 기본적으로 활성화된 결합력이다. 결합력 또는 작용제 항체 스크리닝에 적용되어야 하는 교환 반응에서 남아있는 2 가 단일특이적 입력 물질의 완전한 부재를 보장하기 위해서, 임의의 남아있는 2 가 입력 및 교환 반응 동안에 형성될 수 있는 임의의 응집체의 완전한 제거를 보장해야 할 것이다. 입력 및 bsAb 의 높은 유사성으로 인해, 정량적 제거를 위한 정교한 절차가 필요하거나 (높은 처리량에서는 달성하기가 매우 어렵다), 또는 남아있는 2 가 입력 및 응집체는 최종 bsAb 제제를 어느 정도 오염시킬 것이다.

[0007] Labrijn, A.F., et al. 은 제어된 Fab-arm 교환에 의한 안정한 이중특이적 IgG1 의 효율적인 생성을 개시하고 있다 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110 (2013) 5145-5150).

[0008] WO 2014/081955 는 이중이량체성 항체 및 사용 방법을 개시하고 있다.

[0009] WO 2009/089004 는 정전 스티어링 효과를 사용하는 항체 Fc-이중이량체성 분자의 제조 방법을 개시하고 있다. 여기에서는, 도메인-도메인 상호 작용에 관여하는 4 개의 고유 전하 잔기 쌍 (Asp356---Lys439', Glu357---Lys370', Lys392---Asp399', Asp399---Lys409') 중에서, 단지 Lys409---Asp399' 만이 잔기가 구조적으로 보존

되고 묻히기 때문에, 공학에 적합한 것으로 개시되어 있다. 다른 3 개의 쌍의 경우에 있어서, 파트너 중 하나 이상은 용매 노출된다 (%ASA > 10).

[0010] WO 2018/155611 은 공유 결합에 의해 결합하지 않는 제 1 항원-결합 분자 및 제 2 항원-결합 분자의 조립을 개시하고 있으며, 이는 액체로 혼합될 때, 동종이량체보다 더욱 용이하게 이종이량체를 형성한다. 여기에서는, 하나의 구현예에 있어서, 보다 바람직하게는, EU 번호 부여 시스템에서의 위치 226 및 위치 229 중 하나 또는 둘 모두에서 시스템인 잔기에서의 다른 아미노산에 의한 치환이, EU 번호 부여 시스템에서의 위치 357 또는 위치 397 중 하나 이상에서 다른 아미노산 잔기에 의한 제 1 CH3 및 제 2 CH3 중 하나 또는 둘 모두의 치환과 조합되는 것으로 개시되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본원에는, 반-항체 교환 반응에 의한 다중특이적 항체의 생성 방법이 보고되어 있다. 출발 물질로서, 항체 경쇄, 항체 중쇄 및 항체 중쇄 Fc-영역 단편 (중쇄-중쇄 상호 작용은 바람직하게는 Fc-영역 단편에서, 비대칭 교란 돌연변이에 의해 불안정화됨) 을 포함하는 2/3-IgG 와 같은 비-완전한 항체가 유리한 것으로 밝혀졌다. 이러한 교란 돌연변이는 출발 비-완전한 항체의 해리 및 정확하게 조립된 (예를 들어, 전체 길이) 이중특이적 항체의 생성을 촉진시키는 것으로 밝혀졌다.

[0012] 본 발명에 따른 방법은 환원제의 존재, 뿐만 아니라, 부재하에서 수행될 수 있다. 후자의 경우에 있어서, 예를 들어 2/3-IgG 또는 완전한 항체와 같은 출발 항체에서는, 예를 들어 힌지 영역 디설피드 결합과 같은 중쇄-중쇄 디설피드 결합이 필요하지 않으며, 따라서 존재하지 않는다. 따라서, 본 발명에 따른 사슬-교환 반응 및 방법은 또한 초기 환원 없이 이중특이적 항체의 생체의 조립을 허용한다. 그러므로, 출발 분자 (2/3-IgG) 의 중쇄 사이의 분자내 디설피드 결합은, 예를 들어 돌연변이 유발 PCR 에 의해 제거될 수 있다. 2/3-IgG 의 정제는 단백질 L/SEC-방법에서 작업될 수 있으며, 이는 이들 분자에 대한 표준 정제 전략으로서 정의될 수 있다. 중쇄 사이의 모든 분자간 디설피드 결합의 부재에도 불구하고, 안정한, 즉, 단리 가능한 2/3-IgG 의 정확한 형성이 발생한다. 따라서, 출발 분자를 사용하여, 무-환원 사슬-교환 반응에 의한 이중특이적 항체의 생체의 생성을 실현하는 것이 가능하였다. 사슬-교환 반응 후, 형성된 이중특이적 항체의 정제는, 예를 들어 히스티딘-태그가 사용되는 경우, 니켈 흡수 크로마토그래피에 의해 실현될 수 있다. 이러한 무-환원 사슬-교환 반응을 사용하여, 환원적 사슬-교환 반응에 의존하는 기술 상태의 절차에 비해, 정제된 이중특이적 항체의 보다 높은 단백질 수율이 형성될 수 있다. 전체적으로, 본 발명에 따른 무-환원 사슬 교환 방법은 순수한 및 기능적인 이중특이적 항체의 보다 효율적인 제조를 가능하게 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 일반적으로, 본원에는 하기의 단계를 포함하는 (다중특이적) 결합제/다량체성 폴리펩티드의 제조 방법이 보고되어 있다:

[0014] - 모두 인간 면역글로불린 (IgG1) CH3 도메인을 포함하는 제 1 (단량체성) 폴리펩티드 및 제 2 (단량체성) 폴리펩티드를 포함하는 제 1 결합제(단일- 또는 이중특이적 및 이중단량체성인)/다량체성 폴리펩티드,

[0015] 여기에서, 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 이의 야생형 서열과 관련하여 하나 이상의 돌연변이를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 이의 야생형 서열과 관련하여 하나 이상의 돌연변이를 포함하며, 이로써 제 1 및 제 2 CH3 도메인에서의 2 개 이상의 돌연변이는 이종이량체의 형성을 야기함,

[0016] 여기에서, 제 1 폴리펩티드는 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 결합 부위의 적어도 일부를 포함함,

[0017] 여기에서, 제 2 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 이종이량체화에 필요한 돌연변이와 상이한 하나 이상의/제 1 교란 돌연변이 (및 E345R, Q347K, Y349W, Y349E, L351F, L351Y, S354E, S354V, D356S, D356A, D356K, E357S, E357A, E357L, E357F, E357K, K360S, K360E, Q362E, S364V, S364L, T366I, L368F, L368V, K370E, N390E, K392E, K392D, T394I, V397Y, D399A, D399K, S400K, D401R, F405W, Y407W, Y407L, Y407I, K409D, K409E, K409I, K439E, L441Y, C349Y, S366T, A368L, V407Y, C354S, 및 W366T 로 이루어진 돌연변이의 군에서 선택됨) 를 포함하고, 이로써 제 1 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 야생형 면역글로불린 (IgG1) 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 인간 면역글로불린 (IgG1) 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함함,

- [0018] 여기에서, 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드는 서로 공유적으로 또는 비-공유적으로 연결되고/공유 또는 비-공유 이량체를 형성하며/서로 공유적으로 또는 비-공유적으로 연결되고/공유 또는 비-공유 이량체임 (이로써 제 2 폴리펩티드에서의 교란 돌연변이는 제 2 폴리펩티드 및 제 1 폴리펩티드가 이종이량체를 형성할 때, 불안정화 상호 작용을 야기함),
- [0019] 및
- [0020] 모두 인간 면역글로불린 (IgG1) CH3 도메인을 포함하는 제 3 (단량체성) 폴리펩티드 및 제 4 (단량체성) 폴리펩티드를 포함하는 제 2 결합제(단일- 또는 이종특이적 및 이종단량체성임)/다량체성 폴리펩티드,
- [0021] 여기에서, 제 3 폴리펩티드의 CH3 도메인은 이의 야생형 서열과 관련하여 하나 이상의 돌연변이를 포함하고, 제 4 폴리펩티드의 CH3 도메인은 이의 야생형 서열과 관련하여 하나 이상의 돌연변이를 포함하며, 이로써 제 1 및 제 2 CH3 도메인에서의 2 개 이상의 돌연변이는 이종이량체의 형성을 야기함,
- [0022] 여기에서, 제 4 폴리펩티드는 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 결합 부위의 적어도 일부를 포함함,
- [0023] 여기에서, 제 3 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 이종이량체화에 필요한 돌연변이와 상이한 하나 이상의/제 2 교란 돌연변이 (및 E345R, Q347K, Y349W, Y349E, L351F, L351Y, S354E, S354V, D356S, D356A, D356K, E357S, E357A, E357L, E357F, E357K, K360S, K360E, Q362E, S364V, S364L, T366I, L368F, L368V, K370E, N390E, K392E, K392D, T394I, V397Y, D399A, D399K, S400K, D401R, F405W, Y407W, Y407L, Y407I, K409D, K409E, K409I, K439E, L441Y, C349Y, S366T, A368L, V407Y, C354S, 및 W366T 로 이루어진 돌연변이의 군에서 선택됨) 를 포함하고, 이로써 제 4 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 야생형 면역글로불린 (IgG1) 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 인간 면역글로불린 (IgG1) 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함하며, 이로써 제 3 폴리펩티드에서의 돌연변이는 제 2 폴리펩티드에서의 돌연변이와 상이한 위치에 있음,
- [0024] 여기에서, 제 3 폴리펩티드 및 제 4 폴리펩티드는 서로 공유적으로 또는 비-공유적으로 연결되고/공유 또는 비-공유 이량체를 형성하며/서로 비-공유적으로 또는 공유적으로 연결되고/비-공유 또는 공유 이량체임 (이로써 제 3 폴리펩티드에서의 교란 돌연변이는 제 3 폴리펩티드 및 제 4 폴리펩티드가 이종이량체를 형성할 때, 불안정화 상호 작용을 야기함),
- [0025] 여기에서, 제 2 폴리펩티드에서의 (제 1) 교란 돌연변이 및 제 3 폴리펩티드에서의 (제 2) 교란 돌연변이는 제 2 폴리펩티드 및 제 3 폴리펩티드가 이종이량체를 형성할 때, 인력 상호 작용을 야기함,
- [0026] 를 배양하는 단계,
- [0027] 및
- [0028] - 제 1 폴리펩티드 및 제 4 폴리펩티드를 포함하는 결합제를 회수하여, (다중특이적) 결합제를 제조하는 단계.
- [0029] 본원에는 하기의 단계를 포함하는 (다중특이적) 결합제/다량체성 폴리펩티드의 제조 방법이 보고되어 있다:
- [0030] - 모두 인간 면역글로불린 (IgG1) CH3 도메인을 포함하는 제 1 (단량체성) 폴리펩티드 및 제 2 (단량체성) 폴리펩티드를 포함하는 제 1 결합제(단일- 또는 이종특이적 및 이종단량체성임)/다량체성 폴리펩티드,
- [0031] 여기에서, i) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하며, 또는 ii) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,
- [0032] 여기에서, 제 1 폴리펩티드는 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 결합 부위의 적어도 일부를 포함함,
- [0033] 여기에서, 제 2 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 하나 이상의/제 1 교란 돌연변이 (E345R, Q347K, Y349W, Y349E, L351F, L351Y, S354E, S354V, D356S, D356A, D356K, E357S, E357A, E357L, E357F, E357K, K360S, K360E, Q362E, S364V, S364L, T366I, L368F, L368V, K370E, N390E, K392E, K392D, T394I, V397Y, D399A, D399K, S400K, D401R, F405W, Y407W, Y407L, Y407I, K409D, K409E, K409I, K439E, L441Y, C349Y, S366T, A368L, V407Y, C354S, 및 W366T 로 이루어진 돌연변이의 군에서 선택됨) 를 포함하고, 이로써 제 1 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 야생형 면역글로불린 (IgG1) 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 인간 면역글로불린 (IgG1) 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함함,
- [0034] 여기에서, 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드는 서로 공유적으로 또는 비-공유적으로 연결되고/공유 또는 비-

공유 이량체를 형성하며/서로 공유적으로 또는 비-공유적으로 연결되고/공유 또는 비-공유 이량체임 (이로써 제 2 폴리펩티드에서의 교란 돌연변이는 제 2 폴리펩티드 및 제 1 폴리펩티드가 이중이량체를 형성할 때, 불안정화 상호 작용을 야기함),

[0035] 및

[0036] 모두 인간 면역글로불린 (IgG1) CH3 도메인을 포함하는 제 3 (단량체성) 폴리펩티드 및 제 4 (단량체성) 폴리펩티드를 포함하는 제 2 결합제(단일- 또는 이중특이적 및 이중단량체성임)/다량체성 폴리펩티드,

[0037] 여기에서, i) 제 3 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 4 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하며, 또는 ii) 제 3 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 4 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하며, 이로써 i) 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드는 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 ii) 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드는 돌연변이 홀을 포함함,

[0038] 여기에서, 제 4 폴리펩티드는 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 결합 부위의 적어도 일부를 포함함,

[0039] 여기에서, 제 3 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 하나 이상의/제 2 교란 돌연변이 (E345R, Q347K, Y349W, Y349E, L351F, L351Y, S354E, S354V, D356S, D356A, D356K, E357S, E357A, E357L, E357F, E357K, K360S, K360E, Q362E, S364V, S364L, T366I, L368F, L368V, K370E, N390E, K392E, K392D, T394I, V397Y, D399A, D399K, S400K, D401R, F405W, Y407W, Y407L, Y407I, K409D, K409E, K409I, K439E, L441Y, C349Y, S366T, A368L, V407Y, C354S, 및 W366T 로 이루어진 돌연변이의 군에서 선택됨) 를 포함하고, 이로써 제 4 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 야생형 면역글로불린 (IgG1) 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 인간 면역글로불린 (IgG1) 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함하며, 이로써 제 3 폴리펩티드에서의 돌연변이는 제 2 폴리펩티드에서의 돌연변이와 상이한 위치에 있음,

[0040] 여기에서, 제 3 폴리펩티드 및 제 4 폴리펩티드는 서로 공유적으로 또는 비-공유적으로 연결되고/공유 또는 비-공유 이량체를 형성하며/서로 비-공유적으로 또는 공유적으로 연결되고/비-공유 또는 공유 이량체임 (이로써 제 3 폴리펩티드에서의 교란 돌연변이는 제 3 폴리펩티드 및 제 4 폴리펩티드가 이중이량체를 형성할 때, 불안정화 상호 작용을 야기함),

[0041] 여기에서, 제 2 폴리펩티드에서의 (제 1) 교란 돌연변이 및 제 3 폴리펩티드에서의 (제 2) 교란 돌연변이는 제 2 폴리펩티드 및 제 3 폴리펩티드가 이중이량체를 형성할 때, 인력 상호 작용을 야기함,

[0042] 를 배양하는 단계,

[0043] 및

[0044] - 제 1 폴리펩티드 및 제 4 폴리펩티드를 포함하는 결합제를 회수하여, (다중특이적) 결합제를 제조하는 단계.

[0045] 본 발명에 따른 하나의 방법은 하기의 단계를 포함하는 다량체성 폴리펩티드의 제조 방법이다:

[0046] - 모두 면역글로불린 G CH3 도메인을 포함하는 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드를 포함하는 제 1 다량체성 출발 폴리펩티드, 여기에서,

[0047] a-1) i) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하며, 또는 ii) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,

[0048] b-1) 제 1 폴리펩티드는 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 결합 부위의 적어도 일부를 포함함,

[0049] c-1) 제 2 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 a-1) 하의 돌연변이와 상이한 제 1 교란 돌연변이를 포함하고, 이로써 제 1 폴리펩티드는 제 1 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 각각의 야생형 면역글로불린 G 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 각각의 면역글로불린 G 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함함,

[0050] d-1) 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드는 이량체임,

[0051] 및

[0052] 모두 면역글로불린 G CH3 도메인을 포함하는 제 3 폴리펩티드 및 제 4 폴리펩티드를 포함하는 제 2 다량체성 출발 폴리펩티드, 여기에서,

- [0053] a-2) i) 제 3 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 4 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하며, 또는 ii) 제 3 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 4 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하며, 이로써 i) 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드는 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 ii) 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드는 돌연변이 홀을 포함함,
- [0054] b-2) 제 4 폴리펩티드는 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 결합 부위의 적어도 일부를 포함함,
- [0055] c-2) 제 3 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 a-2) 하의 돌연변이와 상이한 제 2 교란 돌연변이를 포함하고, 이로써 제 4 폴리펩티드는 제 2 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 각각의 야생형 면역글로불린 G 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 각각의 면역글로불린 G 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함함,
- [0056] d-2) 제 2 교란 돌연변이는 제 1 교란 돌연변이와 상이한 위치에 있음,
- [0057] e-2) 제 3 폴리펩티드 및 제 4 폴리펩티드는 이량체임,
- [0058] f-2) 제 2 폴리펩티드에서의 제 1 교란 돌연변이 및 제 3 폴리펩티드에서의 제 2 교란 돌연변이는 제 2 폴리펩티드 및 제 3 폴리펩티드가 이중이량체를 형성할 때, 인력 상호 작용을 야기함,
- [0059] 를 배양하는 단계,
- [0060] 및
- [0061] - 제 1 폴리펩티드 및 제 4 폴리펩티드를 포함하는 다량체성 폴리펩티드를 회수하여, 다량체성 폴리펩티드를 제조하는 단계.
- [0062] 하나의 구현예에 있어서, 제 1 내지 제 4 폴리펩티드는 각각 N-말단에서 C-말단 방향으로 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인 (변이체 인간 IgG1 CH2 도메인) 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인 (변이체 인간 IgG1 CH3 도메인) 을 포함한다.
- [0063] 하나의 구현예에 있어서, 제 1 내지 제 4 폴리펩티드는 각각 N-말단에서 C-말단 방향으로 i) 서로 독립적으로 아미노산 서열 DKHTCPCP (SEQ ID NO: 65) 또는 아미노산 서열 DKHTSPPS (SEQ ID NO: 66), ii) 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 iii) 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인을 포함한다.
- [0064] 하나의 구현예에 있어서, i) 제 1 및 제 4 폴리펩티드는 각각 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 CH1 도메인 ((변이체) 인간 IgG1 CH1 도메인) 및 (서로 독립적으로) (중쇄 또는 경쇄) 가변 도메인을 추가로 포함하고, 또는 ii) 제 1 또는 제 4 폴리펩티드는 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 CH1 도메인 ((변이체) 인간 IgG1 CH1 도메인) 을 포함하며, 각각의 다른 폴리펩티드는 경쇄 불변 도메인 ((변이체) 인간 카파 또는 람다 CL 도메인) 으로부터 유래된 도메인을 포함하고, 각각의 폴리펩티드는 가변 도메인을 추가로 포함한다. 하나의 구현예에 있어서, 제 1 폴리펩티드의 가변 도메인 및 제 4 폴리펩티드의 가변 도메인은 (상이한) 중쇄 가변 도메인이다. 하나의 구현예에 있어서, 제 1 폴리펩티드의 가변 도메인은 중쇄 가변 도메인이고, 제 4 폴리펩티드의 가변 도메인은 경쇄 가변 도메인이거나, 또는 그 반대이다.
- [0065] 하나의 구현예에 있어서, 제 1 및 제 4 폴리펩티드는 동일하거나 또는 상이한 N- 내지 C-말단 서열을 가질 수 있으며, 제 1 및 제 4 폴리펩티드가 상이한 경우, 이들은 N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 서로 독립적으로 선택된다:
- [0066] i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0067] ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인),
- [0068] iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), 및 중쇄 가변 도메인,
- [0069] iv) scFv, 임의로 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,

- [0070] v) scFab, 임의로 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0071] vi) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,
- [0072] vii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- [0073] viii) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인),
- [0074] ix) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- [0075] x) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,
- [0076] xi) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- [0077] xii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), 및 경쇄 가변 도메인,
- [0078] xiii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인),
- [0079] xiv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인 (으로부터 유래된 경쇄 불변 도메인),
- [0080] xv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인 (으로부터 유래된 경쇄 불변 도메인), 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- [0081] xvi) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 제 2 펩티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분 (및 동일한 폴리펩티드 연결의) 은 표적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성하고; 하나의 구현예에 있어서, 결합 도메인의 제 1 부분은 항체 중쇄 Fab 단편 (VH-CH1 또는 CH1-VH) 이고, 결합 도메인의 제 2 부분은 경쇄 Fab 단편 (VL-CL 또는 CL-VL) 이거나, 또는 그 반대임.
- [0082] 하나의 구현예에 있어서, 제 1 및 제 4 폴리펩티드 중 하나는 N-말단에서 C-말단 방향으로 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), 제 2 중쇄 가변 도메인, 제 1 경쇄 불변 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인을 포함하고, 제 1 및 제 4 폴리펩티드 중 다른 하나는 N-말단에서 C-말단 방향으로 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유

래된 CH3 도메인을 포함한다. 하나의 구현예에 있어서, 2 개의 중쇄 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 결합체는 제 1 경쇄 가변 도메인 및 제 2 경쇄 불변 도메인 (제 1 중쇄 가변 도메인과 쌍을 이룸) 을 포함하는 제 1 경쇄, 및 제 2 경쇄 가변 도메인 및 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인) (제 2 중쇄 가변 도메인과 쌍을 이룸) 을 포함하는 (도메인 교환된) 제 2 경쇄를 추가로 포함하며, 다른 결합체는 제 1 경쇄를 추가로 포함한다.

- [0083] 하나의 구현예에 있어서, 제 1 및 제 4 폴리펩티드 중 하나는 N-말단에서 C-말단 방향으로 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), 제 1 경쇄 가변 도메인, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인을 포함하고, 제 1 및 제 4 폴리펩티드 중 다른 하나는 N-말단에서 C-말단 방향으로 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인을 포함한다. 하나의 구현예에 있어서, 2 개의 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 결합체는 제 2 가변 경쇄 도메인 및 제 1 경쇄 불변 도메인 (제 1 중쇄 가변 도메인과 쌍을 이룸) 을 포함하는 제 1 경쇄, 및 제 2 중쇄 가변 도메인 및 제 2 경쇄 불변 도메인 (제 1 경쇄 가변 도메인과 쌍을 이룸) 을 포함하는 (도메인 교환된) 제 2 경쇄를 추가로 포함하며, 다른 결합체는 제 1 경쇄를 추가로 포함한다.
- [0084] 하나의 구현예에 있어서, 제 1 및 제 2 결합제/다량체성 출발 폴리펩티드는 각각 항체 경쇄를 추가로 포함한다.
- [0085] 하나의 구현예에 있어서,
- [0086] 제 1 결합제/다량체성 출발 폴리펩티드는
- [0087] 제 1 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [0088] i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0089] ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인),
- [0090] iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), 및 중쇄 가변 도메인,
- [0091] iv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인),
- [0092] v) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- [0093] vi) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,
- [0094] vii) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 제 1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- [0095] viii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), 및 경쇄 가변 도메인,

- [0096] ix) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인),
- [0097] x) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인 (으로부터 유래된 경쇄 불변 도메인),
- [0098] xi) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인 (으로부터 유래된 경쇄 불변 도메인), 및 제 2 중쇄 가변 도메인, 및
- [0099] xii) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 제 2 펩티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분 (및 동일한 폴리펩티드 연결의) 은 표적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성하고; 하나의 구현예에 있어서, 결합 도메인의 제 1 부분은 항체 중쇄 Fab 단편 (VH-CH1 또는 CH1-VH) 이고, 결합 도메인의 제 2 부분은 경쇄 Fab 단편 (VL-CL 또는 CL-VL) 이거나, 또는 그 반대임,
- [0100] 돌연변이 노브 또는 돌연변이 홀을 포함함,
- [0101] 및
- [0102] 제 2 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [0103] SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0104] 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우 돌연변이 홀을 포함함,
- [0105] E345R, Q347K, Y349W, Y349E, L351F, L351Y, S354E, S354V, D356S, D356A, D356K, E357S, E357A, E357L, E357F, E357K, K360S, K360E, Q362E, S364V, S364L, T366I, L368F, L368V, K370E, N390E, K392E, K392D, T394I, V397Y, D399A, D399K, S400K, D401R, F405W, Y407W, Y407L, Y407I, K409D, K409E, K409I, K439E, L441Y, C349Y, S366T, A368L, V407Y, C354S, 및 W366T 로 이루어진 돌연변이의 군에서 선택되는 제 1 교란 돌연변이를 포함하고, 이로써 제 1 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 야생형 면역글로불린 (IgG1) 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 인간 면역글로불린 (IgG1) 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함함,
- [0106] 여기에서, 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드는 서로 비-공유적으로 또는 공유적으로 연결되고/비-공유 또는 공유 이량체를 형성함 (이로써 제 2 폴리펩티드에서의 교란 돌연변이는 제 2 폴리펩티드 및 제 1 폴리펩티드가 이중이량체를 형성할 때, 불안정화 상호 작용을 야기함),
- [0107] 및
- [0108] 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 포함하는 제 3 폴리펩티드,
- [0109] 여기에서, 상기 제 3 폴리펩티드는 디설피드 결합에 의해 제 1 폴리펩티드에 공유 결합됨,
- [0110] 를 포함하고,
- [0111] 제 2 결합제/다량체성 출발 폴리펩티드는
- [0112] 제 4 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [0113] SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0114] 제 2 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 제 2 폴리펩티드가 돌연변이

노브를 포함하는 경우 돌연변이 홀을 포함함,

- [0115] E345R, Q347K, Y349W, Y349E, L351F, L351Y, S354E, S354V, D356S, D356A, D356K, E357S, E357A, E357L, E357F, E357K, K360S, K360E, Q362E, S364V, S364L, T366I, L368F, L368V, K370E, N390E, K392E, K392D, T394I, V397Y, D399A, D399K, S400K, D401R, F405W, Y407W, Y407L, Y407I, K409D, K409E, K409I, K439E, L441Y, C349Y, S366T, A368L, V407Y, C354S, 및 W366T 로 이루어진 돌연변이의 군에서 선택되는 제 2 교란 돌연변이를 포함하고, 이로써 제 5 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 야생형 면역글로불린 (IgG1) 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 인간 면역글로불린 (IgG1) 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함하며, 이로써 제 4 폴리펩티드에서의 교란 돌연변이는 제 2 폴리펩티드에서의 교란 돌연변이와 상이한 위치에 있음,
- [0116] 및
- [0117] 제 5 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [0118] i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0119] ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 CH1 도메인,
- [0120] iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 CH1 도메인, 및 중쇄 가변 도메인,
- [0121] iv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 제 1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 제 2 CH1 도메인,
- [0122] v) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 제 1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 제 2 CH1 도메인 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- [0123] vi) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,
- [0124] vii) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- [0125] viii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), 및 경쇄 가변 도메인,
- [0126] ix) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인),
- [0127] x) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인 (으로부터 유래된 경쇄 불변 도메인),
- [0128] xi) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인 (으로부터 유래된 경쇄 불변 도메인), 및 제 2 중쇄 가변 도메인, 및

- [0129] xii) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 제 2 펩티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분 (및 동일한 폴리펩티드 연결의) 은 표적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성하고; 하나의 구현예에 있어서, 결합 도메인의 제 1 부분은 항체 중쇄 Fab 단편 (VH-CH1 또는 CH1-VH) 이고, 결합 도메인의 제 2 부분은 경쇄 Fab 단편 (VL-CL 또는 CL-VL) 이거나, 또는 그 반대임,
- [0130] 제 4 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 제 4 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우 돌연변이 홀을 포함함,
- [0131] 여기에서, 제 4 폴리펩티드 및 제 5 폴리펩티드는 서로 비-공유적으로 또는 공유적으로 연결되고/비-공유 또는 공유 이량체를 형성함 (이로써 제 4 폴리펩티드에서의 교란 돌연변이는 제 4 폴리펩티드 및 제 5 폴리펩티드가 이중이량체를 형성할 때, 불안정화 상호작용을 야기함),
- [0132] 및
- [0133] 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 포함하는 제 6 폴리펩티드,
- [0134] 여기에서, 상기 제 6 폴리펩티드는 디설피드 결합에 의해 제 4 폴리펩티드에 공유 결합됨,
- [0135] 를 포함한다.
- [0136] 하나의 구현예에 있어서, 배양 단계는 환원제의 존재하에 있다.
- [0137] 하나의 구현예에 있어서, 배양 단계는 환원제의 부재하에 있다.
- [0138] 하나의 구현예에 있어서, i) 제 2 폴리펩티드 및 제 3 폴리펩티드, 또는 ii) 제 2 폴리펩티드 및 제 5 폴리펩티드는 (C-말단) 태그를 추가로 포함한다. 하나의 구현예에 있어서, 태그는 아미노산 서열 HHHHHH (SEQ ID NO: 67) 또는 HHHHHHHH (SEQ ID NO: 68) 를 가지며, 회수는 금속 (니켈) 킬레이트 친화성 크로마토그래피 컬럼 상에서의 크로마토그래피에 의한다. 하나의 구현예에 있어서, 태그는 아미노산 서열 EPEA (SEQ ID NO: 87) 를 가지며, 회수는 C-tag 친화성 크로마토그래피 컬럼 상에서의 크로마토그래피에 의한다.
- [0139] 하나의 구현예에 있어서,
- [0140] 제 1 결합제/다량체성 출발 폴리펩티드는
- [0141] 제 1 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [0142] i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0143] ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인),
- [0144] iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), 및 중쇄 가변 도메인,
- [0145] iv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인),
- [0146] v) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- [0147] vi) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인

인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,

- [0148] vii) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 제 1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- [0149] viii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), 및 경쇄 가변 도메인,
- [0150] ix) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인),
- [0151] x) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인 (으로부터 유래된 경쇄 불변 도메인),
- [0152] xi) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인 (으로부터 유래된 경쇄 불변 도메인), 및 제 2 중쇄 가변 도메인, 및
- [0153] xii) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 제 2 펩티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분 (및 동일한 폴리펩티드 연결의) 은 표적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성하고; 하나의 구현예에 있어서, 결합 도메인의 제 1 부분은 항체 중쇄 Fab 단편 (VH-CH1 또는 CH1-VH) 이고, 결합 도메인의 제 2 부분은 경쇄 Fab 단편 (VL-CL 또는 CL-VL) 이거나, 또는 그 반대임,
- [0154] 돌연변이 노브 또는 돌연변이 홀을 포함함,
- [0155] 및
- [0156] 제 2 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [0157] SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0158] 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우 돌연변이 홀을 포함함,
- [0159] D356S, D356A, D356K, E357S, E357A, E357L, E357F, E357K, K370E, 및 K439E 로 이루어진 돌연변이의 군에서 선택되는 제 1 교란 돌연변이를 포함하고, 이로써 제 1 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 야생형 면역글로불린 (IgG1) 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 인간 면역글로불린 (IgG1) 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함함,
- [0160] 여기에서, 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드는 서로 비-공유적으로 또는 공유적으로 연결되고/비-공유 또는 공유 이량체를 형성함 (이로써 제 2 폴리펩티드에서의 교란 돌연변이는 제 2 폴리펩티드 및 제 1 폴리펩티드가 이중이량체를 형성할 때, 불안정화 상호 작용을 야기함),
- [0161] 및
- [0162] 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 포함하는 제 3 폴리펩티드,
- [0163] 여기에서, 상기 제 3 폴리펩티드는 디설피드 결합에 의해 제 1 폴리펩티드에 공유 결합됨,
- [0164] 를 포함하고,
- [0165] 제 2 결합제/다량체성 출발 폴리펩티드는

- [0166] 제 4 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [0167] SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0168] 제 2 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 제 2 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우 돌연변이 홀을 포함함,
- [0169] D356S, D356A, D356K, E357S, E357A, E357L, E357F, E357K, K370E, 및 K439E 로 이루어진 돌연변이의 군에서 선택되는 제 2 교란 돌연변이를 포함하고, 이로써 제 5 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 야생형 면역글로불린 (IgG1) 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 인간 면역글로불린 (IgG1) 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함하며, 이로써 제 4 폴리펩티드에서의 교란 돌연변이는 제 2 폴리펩티드에서의 교란 돌연변이와 상이한 위치에 있음,
- [0170] 및
- [0171] 제 5 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [0172] i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0173] ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 CH1 도메인,
- [0174] iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 CH1 도메인, 및 중쇄 가변 도메인,
- [0175] iv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 제 1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 제 2 CH1 도메인,
- [0176] v) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 제 1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 제 2 CH1 도메인 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- [0177] vi) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,
- [0178] vii) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- [0179] viii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), 및 경쇄 가변 도메인,
- [0180] ix) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인),
- [0181] x) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인 (으로부터 유래된 경쇄 불변 도메인),
- [0182] xi) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인

인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인 (으로부터 유래된 경쇄 불변 도메인), 및 제 2 중쇄 가변 도메인, 및

- [0183] xii) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 제 2 펩티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분 (및 동일한 폴리펩티드 연결의) 은 표적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성하고; 하나의 구현예에 있어서, 결합 도메인의 제 1 부분은 항체 중쇄 Fab 단편 (VH-CH1 또는 CH1-VH) 이고, 결합 도메인의 제 2 부분은 경쇄 Fab 단편 (VL-CL 또는 CL-VL) 이거나, 또는 그 반대임,
- [0184] 제 4 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 제 4 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우 돌연변이 홀을 포함함,
- [0185] 여기에서, 제 4 폴리펩티드 및 제 5 폴리펩티드는 서로 비-공유적으로 또는 공유적으로 연결되고/비-공유 또는 공유 이량체를 형성함 (이로써 제 4 폴리펩티드에서의 교란 돌연변이는 제 4 폴리펩티드 및 제 5 폴리펩티드가 이중이량체를 형성할 때, 불안정화 상호작용을 야기함),
- [0186] 및
- [0187] 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 포함하는 제 6 폴리펩티드,
- [0188] 여기에서, 상기 제 6 폴리펩티드는 디설피드 결합에 의해 제 4 폴리펩티드에 공유 결합됨,
- [0189] 를 포함한다.
- [0190] 본원에서 보고되는 바와 같은 하나의 양태는 하기의 단계를 포함하는 (이중특이적) 결합제 조합의 식별 방법이다:
- [0191] - 제 1 의 다수의 (단일특이적) 결합제에서 선택되는 제 1 (단일특이적) 결합제 및 제 2 (그러나 제 1 의 다수의 단일특이적 결합제와는 상이함) 의 다수의 (단일특이적) 결합제에서 선택되는 제 2 (단일특이적) 결합제의 각각의 조합을 본 발명에 따른 방법에 적용하여 다수의 (이중특이적) 결합제를 제조하는 단계,
- [0192] - 제조된 다수의 결합제의 각각의 결합제의 2 개 이상의 항원에 대한 동시 결합 (의 양) 을, 예를 들어 ELISA 또는 SPR 분석과 같은 결합 분석에서 개별적으로 측정하는 단계, 및
- [0193] - 예를 들어 ELISA 또는 SPR 분석과 같은 결합 분석의 결과에 기초하여 다수의 결합제로부터 결합제를 선택함으로써, (이중특이적) 결합제 조합을 식별하는 단계.
- [0194] 본원에서 보고되는 바와 같은 하나의 양태는 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드를 포함하는 다량체성 폴리펩티드이다:
- [0195] 여기에서, 두 폴리펩티드는 인간 면역글로불린 (IgG1) CH3 도메인을 포함함,
- [0196] 여기에서, i) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하며, 또는 ii) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,
- [0197] 여기에서, 제 1 폴리펩티드는 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 결합 부위의 적어도 일부를 포함함,
- [0198] 여기에서, 제 2 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 하나 이상의 교란 돌연변이 (E345R, Q347K, Y349W, Y349E, L351F, L351Y, S354E, S354V, D356S, D356A, D356K, E357S, E357A, E357L, E357F, E357K, K360S, K360E, Q362E, S364V, S364L, T366I, L368F, L368V, K370E, N390E, K392E, K392D, T394I, V397Y, D399A, D399K, S400K, D401R, F405W, Y407W, Y407L, Y407I, K409D, K409E, K409I, K439E, L441Y, C349Y, S366T, A368L, V407Y, C354S, 및 W366T 로 이루어진 돌연변이의 군에서 선택됨) 를 포함하고, 이로써 제 1 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 야생형 면역글로불린 (IgG1) 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 인간 면역글로불린 (IgG1) 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함함,
- [0199] 여기에서, 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드는 서로 비-공유적으로 또는 공유적으로 연결되고/비-공유 또는 공유 이량체를 형성함 (이로써 제 2 폴리펩티드에서의 교란 돌연변이는 제 2 폴리펩티드 및 제 1 폴리펩티드가 이중이량체를 형성할 때, 불안정화 상호 작용을 야기함).

- [0200] 하나의 구현예에 있어서,
- [0201] 제 1 폴리펩티드는 N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [0202] i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0203] ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 CH1 도메인,
- [0204] iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 CH1 도메인, 및 중쇄 가변 도메인,
- [0205] iv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 제 1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 제 2 CH1 도메인,
- [0206] v) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 제 1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 제 2 CH1 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- [0207] vi) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv, 및
- [0208] vii) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- [0209] viii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), 및 경쇄 가변 도메인,
- [0210] ix) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인),
- [0211] x) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인 (으로부터 유래된 경쇄 불변 도메인),
- [0212] xi) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인 (으로부터 유래된 경쇄 불변 도메인), 및 제 2 중쇄 가변 도메인, 및
- [0213] xii) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 제 2 펩티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분 (및 동일한 폴리펩티드 연결의) 은 표적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성하고; 하나의 구현예에 있어서, 결합 도메인의 제 1 부분은 항체 중쇄 Fab 단편 (VH-CH1 또는 CH1-VH) 이고, 결합 도메인의 제 2 부분은 경쇄 Fab 단편 (VL-CL 또는 CL-VL) 이거나, 또는 그 반대임,
- [0214] 돌연변이 노브 또는 돌연변이 홀을 포함함,
- [0215] 이고,

- [0216] 제 2 폴리펩티드는 N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [0217] SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 돌연변이 노브 또는 돌연변이 홀을 포함하는 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0218] E345R, Q347K, Y349W, Y349E, L351F, L351Y, S354E, S354V, D356S, D356A, D356K, E357S, E357A, E357L, E357F, E357K, K360S, K360E, Q362E, S364V, S364L, T366I, L368F, L368V, K370E, N390E, K392E, K392D, T394I, V397Y, D399A, D399K, S400K, D401R, F405W, Y407W, Y407L, Y407I, K409D, K409E, K409I, K439E, L441Y, C349Y, S366T, A368L, V407Y, C354S, 및 W366T 로 이루어진 돌연변이의 군에서 선택되는 교란 돌연변이를 포함하고, 이로써 제 1 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 야생형 면역글로불린 (IgG1) 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 인간 면역글로불린 (IgG1) 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함함,
- [0219] 이다.
- [0220] 하나의 구현예에 있어서, 다량체성 폴리펩티드는 하나 이상의 디설피드 결합에 의해 제 1 폴리펩티드에 공유 결합된, 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 포함하는 제 3 폴리펩티드를 추가로 포함한다.
- [0221] 본원에서 보고되는 바와 같은 하나의 양태는 다음을 포함하는 조성물이다:
- [0222] 다음을 포함하는 제 1 이중삼량체성 폴리펩티드:
- [0223] 제 1 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [0224] i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0225] ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 CH1 도메인,
- [0226] iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 CH1 도메인, 및 중쇄 가변 도메인,
- [0227] iv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 제 1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 제 2 CH1 도메인,
- [0228] v) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 제 1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 제 2 CH1 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- [0229] vi) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv, 및
- [0230] vii) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- [0231] viii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), 및 경쇄 가변 도메인,
- [0232] ix) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인),
- [0233] x) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의

힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인 (으로부터 유래된 경쇄 불변 도메인),

- [0234] xi) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인 (으로부터 유래된 경쇄 불변 도메인), 및 제 2 중쇄 가변 도메인, 및
- [0235] xii) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 제 2 펩티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분 (및 동일한 폴리펩티드 연결의) 은 표적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성하고; 하나의 구현예에 있어서, 결합 도메인의 제 1 부분은 항체 중쇄 Fab 단편 (VH-CH1 또는 CH1-VH) 이고, 결합 도메인의 제 2 부분은 경쇄 Fab 단편 (VL-CL 또는 CL-VL) 이거나, 또는 그 반대임,
- [0236] 돌연변이 노브 또는 돌연변이 홀을 포함함,
- [0237] 및
- [0238] 제 2 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [0239] SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0240] 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우 돌연변이 홀을 포함함,
- [0241] E345R, Q347K, Y349W, Y349E, L351F, L351Y, S354E, S354V, D356S, D356A, D356K, E357S, E357A, E357L, E357F, E357K, K360S, K360E, Q362E, S364V, S364L, T366I, L368F, L368V, K370E, N390E, K392E, K392D, T394I, V397Y, D399A, D399K, S400K, D401R, F405W, Y407W, Y407L, Y407I, K409D, K409E, K409I, K439E, L441Y, C349Y, S366T, A368L, V407Y, C354S, 및 W366T 로 이루어진 돌연변이의 군에서 선택되는 교란 돌연변이를 포함하고, 이로써 제 1 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 야생형 면역글로불린 (IgG1) 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 인간 면역글로불린 (IgG1) 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함함,
- [0242] 및
- [0243] 제 3 폴리펩티드로서, 디설피드 결합에 의해 제 1 폴리펩티드에 공유 결합된, 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 포함하는 폴리펩티드,
- [0244] 및
- [0245] 다음을 포함하는 제 2 이중삼량체성 폴리펩티드:
- [0246] 제 1 (제 4) 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [0247] SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0248] 제 1 이중삼량체의 제 2 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 제 1 이중삼량체의 제 2 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우 돌연변이 홀을 포함함,
- [0249] E345R, Q347K, Y349W, Y349E, L351F, L351Y, S354E, S354V, D356S, D356A, D356K, E357S, E357A, E357L, E357F, E357K, K360S, K360E, Q362E, S364V, S364L, T366I, L368F, L368V, K370E, N390E, K392E, K392D, T394I, V397Y, D399A, D399K, S400K, D401R, F405W, Y407W, Y407L, Y407I, K409D, K409E, K409I, K439E, L441Y, C349Y, S366T, A368L, V407Y, C354S, 및 W366T 로 이루어진 돌연변이의 군에서 선택되는 제 2 교란 돌연변이를 포함하고, 이로써 제 2 (제 5) 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 야생형 면역글로불린 (IgG1) 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 인간 면역글로불린 (IgG1) 야생형 아

미노산 잔기(들)을 포함하며, 이로써 제 1 (제 4) 폴리펩티드에서의 교란 돌연변이는 제 1 이중삼량체의 제 2 폴리펩티드에서의 교란 돌연변이와 상이한 위치에 있음,

- [0250] 및
- [0251] 제 2 (제 5) 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [0252] i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0253] ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 CH1 도메인,
- [0254] iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 CH1 도메인, 및 중쇄 가변 도메인,
- [0255] iv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 제 1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 제 2 CH1 도메인,
- [0256] v) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 제 1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 제 2 CH1 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- [0257] vi) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,
- [0258] vii) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- [0259] viii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), 및 경쇄 가변 도메인,
- [0260] ix) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인),
- [0261] x) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인 (으로부터 유래된 경쇄 불변 도메인),
- [0262] xi) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인 (으로부터 유래된 CH1 도메인), SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인 (으로부터 유래된 경쇄 불변 도메인), 및 제 2 중쇄 가변 도메인, 및
- [0263] xii) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 제 2 펩티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분 (및 동일한 폴리펩티드 연결의) 은 표적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성하고; 하나의 구현예에 있어서, 결합 도메인의 제 1 부분은 항체 중쇄 Fab 단편 (VH-CH1 또는 CH1-VH) 이고, 결합 도메인의 제 2 부분은 경쇄 Fab 단편 (VL-CL 또는 CL-VL) 이거나, 또는 그 반대임,

[0264] 제 1 (제 4) 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 제 1 (제 4) 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우 돌연변이 홀을 포함함,

[0265] 및

[0266] 제 3 (제 6) 폴리펩티드로서, 디설피드 결합에 의해 제 1 (제 4) 폴리펩티드에 공유 결합된, 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 포함하는 폴리펩티드,

[0267] 여기에서, i) 제 1 이중삼량체의 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 1 이중삼량체의 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하며, 또는 ii) 제 1 이중삼량체의 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 1 이중삼량체의 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하며, 이로써 i) 제 1 이중삼량체의 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우, 제 2 이중삼량체 (제 4) 폴리펩티드의 제 1 폴리펩티드는 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 ii) 제 1 이중삼량체의 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우, 제 2 이중삼량체 (제 4) 폴리펩티드의 제 1 폴리펩티드는 돌연변이 홀을 포함함,

[0268] 여기에서, 제 1 이중삼량체의 제 2 폴리펩티드 및 제 2 이중삼량체 (제 4) 폴리펩티드의 제 1 폴리펩티드는 동일한 위치에 교란 돌연변이를 포함하지 않으며/상이한 위치에 교란 돌연변이를 포함함.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0269] 본 발명은, 적어도 부분적으로, 출발 물질로서 비-완전한, 즉, 이중특이적으로 결합하지 않는 항체를 사용하여, 반-항체 교환 반응에 의해 다중특이적 항체가 형성될 수 있다는 발견에 기초한다. 예시적인 비-완전한 항체는, 소위 2/3-IgG 이다. 예시적인 2/3-IgG 는 항체 경쇄, 항체 중쇄 (중쇄 및 경쇄는 서로 공유적으로 연결되어, 이들의 VH 및 VL 도메인의 쌍에 의해 결합 부위를 형성함) 및 항체 중쇄 Fc-영역 단편을 포함한다. 상기 중쇄 Fc-영역 단편은 그 자체가, 예를 들어 완전한 또는 연장된 또는 변이체 항체 중쇄의 일부일 수 있다.

2/3-IgG 에 존재하는 바와 같은 중쇄::중쇄 Fc-영역 단편 쌍 및 (기능적) 결합 부위는 본 발명에 따른 교환 반응에 필요한 최소의 구조적 요소를 정의한다. 비-완전한 항체에서, 예를 들어 상기 2/3-IgG 에서, Fc-영역 사이의 상호 작용은 바람직하게는 Fc-영역 단편에 존재하는 비대칭 교란 돌연변이에 의해 불안정화된다. 상기 교란 돌연변이는 보다 양호한 일치하는 상보적인 비-완전한 항체가 존재하는 경우, 출발 비-완전한 항체의 해리 및 정확하게 조립된 완전한 이중특이적 항체의 생성을 촉진시킨다.

[0270] 본 발명은, 적어도 부분적으로, 상기에서 설명한 바와 같은 출발 화합물을 사용함으로써, 환원제의 부재하에서도 본 발명의 방법이 수행될 수 있다는 추가의 발견에 기초한다. 즉, Fc-영역 단편 및 중쇄 사이의 디설피드 결합이 필요하지 않다. 따라서, 힌지 영역 디설피드 결합 및 다른 중쇄-중쇄 디설피드 결합은 출발 비-완전한 항체로부터 제거될 수 있다. 상기 중쇄-중쇄 디설피드 결합이 없는 출발 비-완전한 항체의 생성 및 교환 반응 및 다중특이적 항체의 제조는 여전히 효율적으로 작동하는 것으로 밝혀졌다.

[0271] I. 정의

[0272] 본원에서 사용되는 바와 같은, 중쇄 및 경쇄의 모든 불변 영역 및 도메인의 아미노산 위치는 문헌 [Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)] 에 기재된 Kabat 번호 부여 시스템에 따라 번호 부여되고, 본원에서 "Kabat 에 따른 번호 부여" 로 지칭된다. 특히, 문헌 [Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)] 의 Kabat 번호 부여 시스템 (647-660 페이지 참조) 은 카파 및 람다 이소타입의 경쇄 불변 도메인 CL에 대해 사용되고, Kabat EU 지수 번호 부여 시스템 (661-723 페이지 참조) 은 불변 중쇄 도메인 (이 경우에 본원에서 "Kabat EU 지수에 따른 번호 부여" 로 지칭하여 더 명확히 되는 CH1, 힌지, CH2 및 CH3) 에 대해 사용된다.

[0273] 2 가 이중특이적 항체의 중쇄의 Fc-영역에서의 CH3 도메인은, 예를 들어 WO 96/027011, [Ridgway, J.B., et al., Protein Eng. 9 (1996) 617-621]; 및 [Merchant, A.M., et al., Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681] 에서 몇가지 예로 상세하게 설명되어 있는 "노브-인투-홀" 기술에 의해 변경될 수 있다. 이러한 방법에서, 2 개의 CH3 도메인의 상호작용 표면은 이들 2 개 CH3 도메인을 함유하는 양 중쇄 모두의 이중이량체화를 증가시키도록 변경된다. (2 개 중쇄의) 각각의 2 개 CH3 도메인은 "노브"일 수 있는 반면, 나머지는 "홀"이다. 디설피드 브릿지의 도입은 이중이량체를 더욱 안정화시키고 (Merchant, A.M., et al., Nature Biotech. 16

(1998) 677-681; Atwell, S., et al., J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35), 수율을 증가시킨다.

- [0274] 항체 중쇄의 CH3 도메인에서의 돌연변이 T366W 는 "노브 돌연변이" 로서 표시되고, 항체 중쇄의 CH3 도메인에서의 돌연변이 T366S, L368A, Y407V 는 "돌연변이 홀" 로서 표시된다 (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여). 또한, 예를 들어 "노브 돌연변이" ("노브-cys 돌연변이" 또는 "돌연변이 노브-cys" 로서 표시됨) 를 사용하여 S354C 돌연변이를 중쇄의 CH3 도메인에 도입함으로써, 및 "홀 돌연변이" ("홀-cys 돌연변이" 또는 "돌연변이 홀-cys" 로서 표시됨) 를 사용하여 Y349C 돌연변이를 중쇄의 CH3 도메인에 도입함으로써 (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여), 또는 그 반대로 함으로써, CH3 도메인 사이의 추가의 사슬간 디설파이드 브릿지가 사용될 수 있다 (Merchant, A.M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681).
- [0275] 인간 면역글로불린 경쇄 및 중쇄의 뉴클레오티드 서열에 관한 일반적인 정보는 문헌 [Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)] 에 제공되어 있다.
- [0276] 본 발명을 수행하는데 유용한 방법 및 기술은 예를 들어, 하기 문헌들에 기재되어 있다: [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)].
- [0277] 재조합 DNA 기술의 사용은 핵산 유도체의 생성을 가능하게 한다. 이러한 유도체는 예를 들어, 치환, 변경, 교환, 결실 또는 삽입에 의해서 각각 또는 몇몇개 뉴클레오티드 위치가 변형될 수 있다. 변형 또는 유도체화는 예를 들어, 부위 지정 돌연변이유발법을 통해서 수행될 수 있다. 이러한 변형은 당업자가 쉽게 수행할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [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).
- [0278] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 바와 같은, 단수형 "한", "하나" 및 "그" 는 달리 명확하게 명시하지 않으면 복수 인용을 포함한다는 것을 주의해야만 한다. 따라서, 예를 들어, "한 세포" 에 대한 언급은 다수의 이러한 세포 및 당업자에게 공지된 이의 균등물 등을 포함한다. 역시, 용어 "한" (또는 "하나"), "하나 이상" 및 "적어도 하나" 는 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있다. 용어 "포함하는", "포괄하는", 및 "가지는" 도 역시 상호교환적으로 사용될 수 있다는 것에 주의한다.
- [0279] 용어 "약" 은 이후에 후속되는 수치값의 +/- 20 % 범위를 의미한다. 하나의 구현예에 있어서, 용어 '약' 은 이후에 후속되는 수치값의 +/- 10 % 범위를 의미한다. 하나의 구현예에 있어서, 용어 '약' 은 이후에 후속되는 수치값의 +/- 5 % 범위를 의미한다.
- [0280] 용어 "아미노산 치환" 또는 "아미노산 돌연변이" 는 상이한 "대체" 아미노산 잔기로의 사전결정된 부모 아미노산 서열의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 대체를 의미한다. 대체 잔기 또는 잔기들은 "천연 발생 아미노산 잔기" (즉, 유전자 코드에 의해 코딩됨)일 수 있고 알라닌 (Ala); 아르기닌 (Arg); 아스파라긴 (Asn); 아스파르트산 (Asp); 시스테인 (Cys); 글루타민 (Gln); 글루탐산 (Glu); 글리신 (Gly); 히스티딘 (His); 이소류신 (Ile); 류신 (Leu); 리신 (Lys); 메티오닌 (Met); 페닐알라닌 (Phe); 프롤린 (Pro); 세린 (Ser); 트레오닌 (Thr); 트립토판 (Trp); 티로신 (Tyr); 및 발린 (Val) 으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 하나의 구현예에 있어서, 대체 잔기는 시스테인이 아니다. 하나 이상의 비천연 발생 아미노산 잔기에 의한 치환이 또한 본원에서의 아미노산 치환의 정의에 포괄된다. "비천연 발생 아미노산 잔기"는 폴리펩티드 사슬 내에 인접한 아미노산 잔기에 공유적으로 결합할 수 있는, 상기 열거된 천연 발생 아미노산 잔기 이외의 잔기를 의미한다. 비천연 발생 아미노산 잔기의 예에는 노르류신, 오르니틴, 노르발린, 호모세린, aib 및 다른 아미노산 잔기 유사체 예컨대 문헌 [Ellman, et al., Meth. Enzym. 202 (1991) 301-336] 에 기술된 것들이 포함된다. 이러한 비천연 발생 아미노산 잔기를 생성시키기 위해서, Noren 등 (Science 244 (1989) 182) 및/또는 Ellman 등 (상동) 의 절차가 사용될 수 있다. 간략하게, 이들 절차는 서프레스 tRNA 의 비천연 발생 아미노산 잔기에 의한 화학적 활성화 이후 RNA 의 시험관내 전사 및 번역을 포함한다. 비천연 발생 아미노산은 또한 펩티드에, 화학적 펩티드 합성 및 재조합적으로 제조된 폴리펩티드, 예컨대 항체 또는 항체 단편과 이들 펩

티드의 후속 융합을 통해 통합될 수 있다.

- [0281] 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. 하나의 구현예에 있어서, ADCC 는 이펙터 세포 예컨대 신선하게 분리된 PBMC (말초 혈액 단핵 세포) 또는 단핵구 또는 NK (자연 살해) 세포와 같은 버피 코트로부터 정제된 이펙터 세포의 존재하에서 본원에서 보고하는 바와 같은 2/3-IgG 를 포함하는 Fc-영역 으로의 표적 발현 적혈구 세포 (예를 들어, 재조합 표적을 발현하는 K562 세포) 의 조제물의 처리에 의해 측정 된다. 표적 세포는 Cr-51로 표지되고 이후에 2/3-IgG 와 인큐베이션된다. 표지된 세포는 이펙터 세포와 인큐베이션되고 상청액을 방출된 Cr-51에 대해 분석한다. 대조군은 2/3-IgG 없이 이펙터 세포와 표적 내피 세포의 인큐베이션을 포함한다. ADCC 를 매개하는 초기 단계를 유도시키는 2/3-IgG 의 능력은 Fc γ 수용체 발현 세포, 예컨대 Fc γ RI 및/또는 Fc γ RIIA 를 재조합적으로 발현하는 세포 또는 NK 세포 (본질적으로 Fc γ RIIA 를 발현함) 와의 결합을 측정하여 조사된다. 하나의 바람직한 구현예에 있어서, NK 세포 상의 Fc γ R 과의 결합이 측정된다.
- [0282] 용어 "CH1 도메인" 은 대략 EU 위치 118 에서 EU 위치 215 (EU 번호 부여 시스템) 로 연장된 항체 중쇄 폴리펩티드의 일부분을 의미한다. 하나의 구현예에 있어서, CH1 도메인은 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSVG HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSC (SEQ ID NO: 27) 의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0283] 용어 "CH2 도메인" 은 대략 EU 위치 231 에서 EU 위치 340 (Kabat 에 따른 EU 번호 부여 시스템) 으로 연장된 항체 중쇄 폴리펩티드의 일부분을 의미한다. 하나의 구현예에 있어서, CH2 도메인은 APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVWDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQESTYRW SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAK (SEQ ID NO: 28) 의 아미노산 서열을 포함한다. CH2 도메인은 다른 도메인과 밀접하게 쌍형성하지 않는다는 점에서 독특하다. 대신에, 2 개의 N-연결된 분지형 탄수화물 사슬이 온전한 천연 Fc-영역의 2 개 CH2 도메인 사이에 개재된다. 탄수화물은 도메인-도메인 쌍형성에 대한 대체물을 제공할 수 있고 CH2 도메인을 안정화시키는 데 도움을 줄 수 있을 것으로 추측되었다. 문헌 [Burton, Mol. Immunol. 22 (1985) 161-206].
- [0284] 용어 "CH3 도메인"은 대략 EU 위치 341에서 EU 위치 446 으로 확장된 항체 중쇄 폴리펩티드의 일부분을 의미한다. 하나의 구현예에 있어서, CH3 도메인은 GQPREPQVYT LPSPRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSP (SEQ ID NO: 29) 의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0285] 용어 "포함하는" 은 또한 용어 "이루어지는" 을 포함한다.
- [0286] 용어 "보체-의존적 세포독성 (CDC)" 은 보체의 존재하에서 본원에서 보고되는 바와 같은 항체의 Fc-영역에 의해 유도되는 세포의 용해를 의미한다. 하나의 구현예에 있어서, CDC 는 보체의 존재하에서 본원에서 보고되는 바와 같은 2/3-IgG 로 표적 발현 인간 내피 세포를 처리하여 측정된다. 하나의 구현예에 있어서, 세포는 칼 세인으로 표지화된다. CDC는 30 μ g/mL 의 농도에서 20 % 또는 그 이상의 표적 세포의 용해를 유도하면 확인 된다. 보체 인자 C1q 와의 결합은 ELISA로 측정할 수 있다. 이러한 어세이에서 이론적으로 ELISA 플레이트는 농도 범위의 2/3-IgG 로 코팅되고, 여기에서 정제된 인간 C1q 또는 인간 혈청을 첨가한다. C1q 결합 은 C1q 에 대해 유도된 항체, 이후 퍼옥시다제-표지된 접합체에 의해 검출된다. 결합의 검출 (최대 결합 Bmax) 은 퍼옥시다제 기질 ABTS® (2,2'-아지노-디-[3-에틸벤즈티아졸린-6-술포네이트]) 에 대한 405 nm (OD405) 에서의 광학 밀도로서 측정된다.
- [0287] "이펙터 기능"은 항체의 Fc-영역에 기인하는 그들의 생물학적 활성을 의미하고, 이것은 그것이 유래되는 항체 클래스에 따라 다양하다. 항체 이펙터 기능의 예는 C1q 결합 및 보체 의존적 세포독성 (CDC); Fc 수용체 결합; 항체-의존적 세포-매개된 세포독성 (ADCC); 식균작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B-세포 수용체) 의 하향 조절; 및 B-세포 활성화를 포함한다.
- [0288] Fc 수용체 결합 의존적 이펙터 기능은 조혈 세포 상의 특수화된 세포 표면 수용체인, Fc 수용체 (FcR) 와 항체 의 Fc-영역의 상호작용에 의해 매개될 수 있다. Fc 수용체는 면역글로불린 슈퍼패밀리에 속하고, 항체 의존적 세포 매개된 세포독성 (ADCC) 을 통해, 적혈구 및 Fc-영역을 제시하는 다양한 다른 세포 표적 (예를 들어, 종양 세포) 의 용해, 및 면역 복합체의 식균작용에 의한 항체-코팅된 병원체의 제거 둘 모두를 매개하는 것으로 확인되었다 (예를 들어, 문헌 [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 수용체를 Fc γ R 로 지칭한다. Fc 수용체 결합은 예를 들어, 문헌 [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 기술되어 있다.

[0289] 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 특정 규명되었고, 다음과 같다:

[0290] - Fc γ RI (CD64) 은 높은 친화성으로 단량체 IgG 에 결합하고 마크로파지, 단핵구, 호중구 및 호산구 상에서 발견된다. Fc-영역 IgG 에서 아미노산 잔기 E233-G236, P238, D265, N297, A327 및 P329 (Kabat 의 EU 지수에 따른 번호 부여) 중 적어도 하나의 변형은 Fc γ RI 와의 결합을 감소시킨다. IgG1 및 IgG4 로 치환된 위치 233-236 의 IgG2 잔기는 Fc γ RI 와의 결합을 10³ 배 만큼 감소시켰고 항체-감작된 적혈 세포에 대한 인간 단핵구 반응을 제거시켰다 (Armour, K.L., et al., Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2613-2624).

[0291] - Fc γ RII (CD32) 는 중간 내지 낮은 친화성으로 복합 IgG 에 결합하고 광범위하게 발견된다. 이러한 수용체는 2개의 아형, Fc γ RIIA 및 Fc γ RIIB 로 분류될 수 있다. Fc γ RIIA 는 사멸에 관여되는 많은 세포 (예를 들어, 마크로파지, 단핵구, 호중구) 상에서 발견되며 사멸 과정을 활성화시킬 수 있는 것으로 보인다. Fc γ RIIB 는 억제 과정에서 역할을 하는 것으로 보이고 B 세포, 마크로파지 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. 마크로파지 상에서, Fc γ RIIB 는 Fc γ RIIA 를 통한 매개로서 식균작용을 억제하는 작용을 한다. 호산구 및 비만 세포 상에서, B-형태는 이의 별개 수용체와 IgE 결합을 통해서 이들 세포의 활성화를 억제하는데 도움을 줄 수 있다. Fc γ RIIA 에 대한 감소된 결합이 예를 들어 아미노산 잔기 E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, R292, 및 K414 (Kabat 의 EU 지수에 따른 번호 부여) 중 적어도 하나에 돌연변이를 갖는 IgG Fc-영역을 포함하는 항체에서 발견된다.

[0292] - Fc γ RIII (CD16) 은 중간 내지 낮은 친화성으로 IgG 에 결합하고 2 개 유형으로서 존재한다. Fc γ RIIIA 는 NK 세포, 마크로파지, 호산구 및 일부 단핵구 및 T 세포 상에서 발견되며 ADCC 를 매개한다. Fc γ RIIIB 는 호산구 상에서 고도로 발견된다. Fc γ RIIIA 에 대한 감소된 결합은 예를 들어 아미노산 잔기 E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, S239, E269, E293, Y296, V303, A327, K338 및 D376 (Kabat 의 EU 지수에 따른 번호 부여) 중 적어도 하나에 돌연변이를 갖는 IgG Fc-영역을 포함하는 항체에 대해서 확인된다.

[0293] Fc 수용체에 대한 인간 IgG1 상의 결합 부위의 맵핑, 상기 언급된 돌연변이 부위 및 Fc γ RI 및 Fc γ RIIA 와의 결합 측정 방법은 문헌 [Shields, R.L., et al. J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604] 에 기술되어 있다.

[0294] 용어 "힌지 영역" 은 야생형 항체 중쇄에서, CH1 도메인 및 CH2 도메인을 연결하는, 예를 들어 Kabat 의 EU 번호 시스템에 따라서 약 위치 221 에서 약 위치 230 까지, 또는 Kabat 의 EU 번호 시스템에 따라서 약 위치 226 에서 약 위치 230 까지의 항체 중쇄 폴리펩티드의 일부분을 의미한다. 다른 IgG 서브클래스의 힌지 영역은 IgG1 서브클래스 서열의 힌지-영역 시스템 잔기와의 정렬에 의해 결정될 수 있다.

[0295] 힌지 영역은 통상적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 2 개의 폴리펩티드로 이루어진 이량체성 분자이다. 하나의 구현예에 있어서, 힌지 영역은 아미노산 서열 DKTHTCPXCP (SEQ ID NO: 30) 를 가지며, 여기에서 X 는 S 또는 P 이다. 하나의 구현예에 있어서, 힌지 영역은 아미노산 서열 HTPXCP (SEQ ID NO: 31) 를 가지며, 여기에서 X 는 S 또는 P 이다. 하나의 구현예에 있어서, 힌지 영역은 아미노산 서열 CPXCP (SEQ ID NO: 32) 를 가지며, 여기에서 X 는 S 또는 P 이다. 하나의 구현예에 있어서, 힌지 영역은 내부 디설파이드 결합을 갖지 않는다. 이것은, SEQ ID NO: 32 (및 마찬가지로, SEQ ID NO: 30 및 31) 에서의 시스템 잔기를 세린 잔기로 치환함으로써, 또는 CPXC 스트레치 (SEQ ID NO: 89) 를 SEQ ID NO: 30, 31 또는 32 의 힌지 영역으로부터 결실시킴으로써 달성된다.

[0296] 용어 "펩티드 링커"는 천연 및/또는 합성 기원의 링커를 의미한다. 펩티드 링커는 아미노산의 선형 사슬로 이루어지며, 여기에서 20개의 천연 발생 아미노산은 펩티드 결합에 의해 연결된 단량체 빌딩 블록이다. 이 사슬은 1 내지 50 개 아미노산 잔기, 바람직하게는 1 내지 28 개 아미노산 잔기, 특히 바람직하게는 3 내지 25 개 아미노산 잔기의 길이를 가진다. 펩티드 링커는 천연 발생 폴리펩티드의 서열 또는 반복적인 아미노산 서열을 함유할 수 있다. 펩티드 링커는 2/3-IgG 의 도메인이, 이 도메인이 올바르게 폴딩될 수 있고 적절하

게 존재할 수 있도록 함으로써 그들의 생물학적 활성을 수행할 수 있도록 보장하는 기능을 가진다. 바람직하게, 펩티드 링커는 글리신, 글루타민, 및/또는 세린 잔기가 풍부하도록 지정된 "합성 펩티드 링커"이다. 이들 잔기는 예를 들어, 최대 5 개 아미노산의 작은 반복 단위, 예컨대 GGGS (SEQ ID NO: 69), GGGGS (SEQ ID NO: 70), QQQG (SEQ ID NO: 71), QQQQG (SEQ ID NO: 72), SSSG (SEQ ID NO: 73) 또는 SSSSG (SEQ ID NO: 74)로 배열된다. 이러한 소형 반복 단위는 다량체 단위, 예를 들어 (GGGS)₂ (SEQ ID NO: 75), (GGGS)₃ (SEQ ID NO: 76), (GGGS)₄ (SEQ ID NO: 77), (GGGS)₅ (SEQ ID NO: 78), (GGGS)₂ (SEQ ID NO: 79), (GGGS)₃ (SEQ ID NO: 80), 또는 (GGGS)₄ (SEQ ID NO: 81)를 형성하도록 2 회 내지 5 회 반복될 수 있다. 하나의 구현예에 있어서, 펩티드 링커는 SEQ ID NO: 69 내지 82의 링커의 군에서 선택된다. 하나의 구현예에 있어서, 각각의 펩티드 링커는 SEQ ID NO: 69 내지 82로 이루어진 링커의 군에서 서로 독립적으로 선택된다. 하나의 바람직한 구현예에 있어서, 펩티드 링커/각각의 펩티드 링커는 SEQ ID NO: 75 내지 81로 이루어진 링커의 군에서 (서로 독립적으로) 선택된다. 다량체 단위의 아미노-말단 및/또는 카복시-말단에서, 최대 6 개의 추가적인 임의의, 천연 발생 아미노산이 첨가될 수 있다. 다른 합성 펩티드 링커는 예를 들어 링커 GSSSSSSSSSSSSSG (SEQ ID NO: 82)에서의 세린처럼, 10 회 내지 20 회 반복되는 단일 아미노산으로 구성되고, 아미노-말단 및/또는 카복시-말단에, 최대 6 개의 추가적인 임의의 천연 발생 아미노산을 포함할 수 있다. 모든 펩티드 링커는 핵산 분자에 의해 코딩될 수 있으며 따라서 재조합적으로 발현될 수 있다. 링커는 그 자체가 펩티드이므로, 항원-항체 복합체가 2 개 아미노산 사이에 형성되는 펩티드 결합에 의해 링커에 연결된다.

- [0297] "항체 단편"은 미손상 항체가 결합하는 항원에 결합하는 미손상 항체의 일부를 포함하는 미손상 항체 외의 분자를 나타낸다. 항체 단편의 예는 2/3-IgG, Fv, scFv, Fab, scFab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 디아바디; 선형 항체; 단일-사슬 항체 분자 (예를 들어, scFv); 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 비제한적으로 포함한다. 특정 항체 단편의 검토를 위해서는, [Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134]를 참조한다. scFv 단편의 검토를 위해서는, 예를 들어 문헌 [Plueckthun, A., In: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg and Moore (eds.), Springer-Verlag, New York (1994), pp. 269-315]; 또한 WO 93/16185; US 5,571,894 및 US 5,587,458을 참조한다.
- [0298] 디아바디는 이가 또는 이중특이적일 수 있는 2 개의 항원-결합 위치를 갖는 항체 단편이다. 예를 들어, EP 0 404 097; WO 1993/01161; 문헌 [Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134]; 및 문헌 [Holliger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448]을 참조한다. 트리아바디 및 테트라바디는 또한 문헌 [Hudson, P.J., et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134]에 기재되어 있다.
- [0299] 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부, 또는 항체의 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 항체 단편이다. 특정 구현예에서, 단일-도메인 항체는 인간 단일-도메인 항체이다 (문헌 [Domantis, Inc., Waltham, MA]; 예를 들어, US 6,248,516 참조).
- [0300] 항체 단편은 미손상 항체의 단백질분해 소화 뿐 아니라 재조합 숙주 세포 (예를 들어, 대장균 (E. coli) 또는 파지)에 의한 생성을 비제한적으로 포함하는 각종 기법에 의해 만들어질 수 있다.
- [0301] 용어 "항체 단편"은 또한 2 개의 상이한 항원에 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 "이중 작용 (Dual Acting) Fab" 또는 "DAF"를 포함한다 (예를 들어, US 2008/0069820 참조).
- [0302] "단일특이적 항체"는 하나의 항원에 대해 단일 결합 특이성을 갖는 항체를 의미한다. 단일특이적 항체는 전체 길이 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, 2/3-IgG, F(ab')₂) 또는 이의 조합 (예를 들어, 전체 길이 항체 + 추가의 scFv 또는 Fab 단편)으로서 제조될 수 있다.
- [0303] "다중특이적 항체"는 동일한 항원 또는 2 개의 상이한 항원 상의 2 개 이상의 상이한 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖는 항체를 의미한다. 다중특이적 항체는 전체 길이 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, F(ab')₂ 이중특이적 항체) 또는 이의 조합 (예를 들어, 전체 길이 항체 + 추가의 scFv 또는 Fab 단편)으로서 제조될 수 있다. 또한, 2 개, 3 개 또는 그 이상 (예를 들어, 4 개)의 기능성 항원 결합 부위를 갖는 조작된 항체가 보고되어 있다 (예를 들어, US 2002/0004587 A1 참조). 하나의 다중특이적 항체는 이중특이적 항체이다. 다중특이적 항체는 또한 항체 Fc-이종이량체성 분자를 제조하기 위한 정전 스티어링 효과를 조합함으로써 제조될 수 있다 (WO 2009/089004).
- [0304] 용어 "∼와의 결합"은 이의 표적에 대한 결합 부위의 결합, 예를 들어 개별 항원에 대한 항체 중쇄 가변 도메인 및 항체 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체 결합 부위의 결합을 의미한다. 이러한 결합은, 예를 들어

BIAcore® 어세이 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) 를 사용하여 결정할 수 있다. 즉, 용어 "(항원에) 결합" 은 이의 항원에 대한 생체의 분석에서의 항체의 결합을 의미한다. 하나의 구현예에 있어서, 결합은, 항체가 표면에 결합되고 항체에 대한 항원의 결합이 표면 플라스몬 공명 (SPR) 에 의해 측정되는 결합 분석에서 결정된다. 결합은, 예를 들어 10^{-8} M 이하, 일부 구현예에 있어서 10^{-13} 내지 10^{-8} M, 일부 구현예에 있어서 10^{-13} 내지 10^{-9} M 의 결합 친화성 (K_D) 을 의미한다. 용어 "결합" 은 또한 용어 "특이적으로 결합" 을 포함한다.

[0305] 예를 들어, BIAcore® 어세이의 하나의 가능한 구현예에 있어서, 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 센서그래프의 결합 신호는 공명 신호 높이 및 해리 거동에 대해서, 기준 반응 신호와 직접적으로 비교할 수 있다.

[0306] 결합은 BIAcore 어세이 (GE Healthcare Biosensor AB, Uppsala, Sweden) 에 의해 조사될 수 있다. 결합의 친화성은 용어 k_a (항체/항원 복합체로부터 항체의 결합에 대한 속도 상수), k_d (해리 상수), 및 K_D (k_d/k_a) 로 정의된다.

[0307] 용어 "결합 부위" 는 표적에 대해 결합 특이성을 나타내는 임의의 단백질성 엔터티를 의미한다. 이것은, 예를 들어 수용체, 수용체 리간드, 안티칼린, 애퍼타디, 항체 등일 수 있다. 따라서, 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "결합 부위" 는, 제 2 폴리펩티드에 의해 특이적으로 결합하거나 또는 특이적으로 결합할 수 있는 폴리펩티드를 의미한다. 하나의 구현예에 있어서, 결합 부위는 항체 중쇄 가변 도메인, 항체 경쇄 가변 도메인, 항체 중쇄 및 항체 경쇄 가변 도메인의 쌍, 수용체 또는 이의 기능성 단편, 수용체 리간드 또는 이의 기능성 단편, 효소 또는 이의 기질로 이루어진 폴리펩티드의 군에서 선택된다.

[0308] 항체의 경우에 있어서, 결합 부위는 3 개 이상의 HVR (예를 들어, VHH 의 경우) 또는 6 개의 HVR (예를 들어, 자연 발생, 즉, 통상적인 항체의 경우) 을 포함한다. 일반적으로, 항원 결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기는 결합 부위를 형성하고 있다. 이들 잔기는 통상적으로 항체 중쇄 가변 도메인 및 동족 항체 경쇄 가변 도메인의 쌍에 함유된다. 항체의 항원-결합 부위는 "초가변 영역" 또는 "HVR" 로부터의 아미노산 잔기를 포함한다. "프레임워크" 또는 "FR" 영역은, 본원에서 정의하는 바와 같은 초가변 영역 잔기 이외의 가변 도메인 영역이다. 그러므로, 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 도메인은 N-말단에서 C-말단으로 영역 FR1, HVR1/CDR1, FR2, HVR2/CDR2, FR3, HVR3/CDR3, 및 FR4 (면역글로불린 프레임워크) 를 포함한다. 특히, 중쇄 가변 도메인의 HVR3/CDR3 영역은, 항원 결합에 가장 기여하고 항체의 결합 특이성을 정의하는 영역이다. "기능성 결합 부위" 는 이의 표적에 특이적으로 결합할 수 있다. 용어 "특이적으로 결합" 은 생체의 분석에서, 하나의 구현예에 있어서 결합 분석에서, 이의 표적에 대한 결합 부위의 결합을 의미한다. 이러한 결합 분석은 결합 이벤트가 검출될 수 있는 한, 임의의 분석일 수 있다. 예를 들어, 항체가 표면에 결합하고 항원이 항체에 결합하는 분석은 표면 플라스몬 공명 (SPR) 에 의해 측정된다. 대안적으로, 브릿징 ELISA 가 사용될 수 있다. 결합은 10^{-8} M 이하, 일부 구현예에 있어서 10^{-13} 내지 10^{-8} M, 일부 구현예에 있어서 10^{-13} 내지 10^{-9} M 의, 이의 표적에 대한 항체 (결합체) 로부터의 결합 친화성 (K_D) 을 의미한다.

[0309] 항체의 "클래스" 는, 이의 중쇄가 보유하는 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을 의미한다. 5 가지 주요 클래스의 항체: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM 이 있으며, 이들 중 몇몇은 서브클래스 (이소타입), 예를 들어 IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, 및 IgA₂ 로 추가로 나뉠 수 있다 상이한 클래스의 면역글로불린에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , β , ϵ , γ , 및 μ 으로 불린다.

[0310] 용어 "Fc-영역" 은 힌지 영역, CH2 도메인 및 CH3 도메인의 적어도 일부를 함유하는 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 나타낸다. 하나의 구현예에 있어서, 인간 IgG 중쇄 Fc-영역은 Asp221 로부터, 또는 Cys226 으로부터, 또는 Pro230 으로부터 중쇄의 카르복실-말단까지 연장된다. 그러나, Fc-영역의 C-말단 리신 (Lys447) 은 존재할 수 있거나 또는 존재하지 않을 수 있다. Fc-영역은, 사슬 사이의 디설피드 결합을 형성하는 힌지 영역 시스테인 잔기를 통해 서로 공유적으로 연결될 수 있는 2 개의 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드로 구성된다.

[0311] 본원에서 보고되는 바와 같은 방법에서 제조되는 바와 같은 항체는 Fc-영역, 하나의 구현예에 있어서, 인간 기원에서 유래된 Fc-영역을 포함한다. 하나의 구현예에 있어서, Fc-영역은 인간 불변 영역의 모든 부분을 포

함한다. 항체의 Fc-영역은 보체 활성화, C1q 결합, C3 활성화 및 Fc 수용체 결합에 직접적으로 관여한다.

보체 시스템에 대한 항체의 영향은 특정한 조건에 의존하는 반면, C1q 와의 결합은 Fc-영역에서의 정의된 결합 부위에 의해 야기된다. 이러한 결합 부위는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Lukas, T.J., et al., J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560]; [Brunhouse, R., and Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917]; [Burton, D.R., et al., Nature 288 (1980) 338-344]; [Thommesen, J.E., et al., Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004]; [Idusogie, E.E., et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184]; [Hezareh, M., et al., J. Virol. 75 (2001) 12161-12168]; [Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324]; 및 EP 0 307 434 에 기재되어 있다. 이러한 결합 부위는, 예를 들어 L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 및 P329 (Kabat 의 EU 지수에 따른 번호 부여) 이다. 서브클래스 IgG1, IgG2 및 IgG3 의 항체는 통상적으로 보체 활성화, C1q 결합 및 C3 활성화를 나타내는 반면, IgG4 는 보체 시스템을 활성화시키지 않고, C1q 에 결합하지 않으며, C3 을 활성화시키지 않는다. "항체의 Fc-영역" 은 당업자에게 충분히 공지된 용어이며, 항체의 파파인 절단을 기반으로 정의된다. 하나의 구현예에 있어서, Fc-영역은 인간 Fc-영역이다. 하나의 구현예에 있어서, Fc-영역은 돌연변이 S228P 및/또는 L235E (Kabat 의 EU 지수에 따른 번호 부여) 를 포함하는 인간 IgG4 서브클래스의 것이다. 하나의 구현예에 있어서, Fc-영역은 돌연변이 L234A 및 L235A 및 임의로 P329G (Kabat 의 EU 지수에 따른 번호 부여) 를 포함하는 인간 IgG1 서브클래스의 것이다.

[0312] 용어 "전체 길이 항체" 는 천연 항체 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖는 항체를 나타낸다. 전체 길이 항체는 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 각각 포함하는 2 개의 전체 길이 항체 경쇄, 및 중쇄 가변 도메인, 제 1 불변 도메인, 힌지 영역, 제 2 불변 도메인 및 제 3 불변 도메인을 각각 포함하는 2 개의 전체 길이 항체 중쇄를 포함한다. 전체 길이 항체는 추가의 도메인, 예를 들어 전체 길이 항체의 사슬 중 하나 이상에 컨쥬게이트된 추가의 scFv 또는 scFab 를 포함할 수 있다. 이들 컨쥬게이트는 또한 용어 전체 길이 항체에 의해 포함된다.

[0313] 용어 "숙주 세포", "숙주 세포주" 및 "숙주 세포 배양물" 은 상호 교환적으로 사용되고, 그러한 세포의 자손을 포함하여, 외생성 핵산이 도입된 세포를 의미한다. 숙주 세포는 초대 형질 전환된 세포 및 계대수와 무관하게 그로부터 유래된 자손을 포함하는 "형질 전환체" 및 "형질 전환된 세포" 를 포함한다. 자손은 부모 세포와 핵산 내용물이 완전하게 동일하지 않을 수 있으며, 돌연변이를 함유할 수 있다. 본래의 형질 전환된 세포에서 스크리닝 또는 선별된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이체 자손이 본원에서 포함된다.

[0314] 용어 "유래된" 은, 변이체 아미노산 서열이 하나 이상의 위치에서 변형/돌연변이를 도입함으로써 부모 아미노산 서열로부터 취득되는 것을 나타낸다. 따라서, 유래된 아미노산 서열은 하나 이상의 상응하는 위치에서 상응하는 부모 아미노산 서열과 상이하다. 하나의 구현예에 있어서, 부모 아미노산 서열로부터 유래된 아미노산 서열은 상응하는 위치에서 1 내지 15 개의 아미노산 잔기가 상이하다. 하나의 구현예에 있어서, 부모 아미노산 서열로부터 유래된 아미노산 서열은 상응하는 위치에서 1 내지 10 개의 아미노산 잔기가 상이하다. 하나의 구현예에 있어서, 부모 아미노산 서열로부터 유래된 아미노산 서열은 상응하는 위치에서 1 내지 6 개의 아미노산 잔기가 상이하다. 마찬가지로, 유래된 아미노산 서열은 이의 부모 아미노산 서열과 높은 아미노산 서열 동일성을 가진다. 하나의 구현예에 있어서, 부모 아미노산 서열로부터 유래된 아미노산 서열은 80 % 이상의 아미노산 서열 동일성을 가진다. 하나의 구현예에 있어서, 부모 아미노산 서열로부터 유래된 아미노산 서열은 90 % 이상의 아미노산 서열 동일성을 가진다. 하나의 구현예에 있어서, 부모 아미노산 서열로부터 유래된 아미노산 서열은 95 % 이상의 아미노산 서열 동일성을 가진다.

[0315] 하나의 구현예에 있어서, 하나 또는 둘 모두의 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 01 의 Fc-영역 폴리펩티드로부터 유래되고, SEQ ID NO: 01 의 Fc-영역 폴리펩티드와 비교하여 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 가진다. 하나의 구현예에 있어서, Fc-영역 폴리펩티드는 약 1 내지 약 10 개의 아미노산 돌연변이를 포함하고/가지며, 하나의 구현예에 있어서, 약 1 내지 약 5 개의 아미노산 돌연변이를 포함한다/가진다. 하나의 구현예에 있어서, Fc-영역 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 01 의 인간 Fc-영역 폴리펩티드와 약 80 % 이상의 상동성을 가진다. 하나의 구현예에 있어서, Fc-영역 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 01 의 인간 Fc-영역 폴리펩티드와 약 90 % 이상의 상동성을 가진다. 하나의 구현예에 있어서, Fc-영역 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 01 의 인간 Fc-영역 폴리펩티드와 약 95 % 이상의 상동성을 가진다.

[0316] SEQ ID NO: 01, 또는 02, 또는 03, 또는 04 의 인간 Fc-영역 폴리펩티드로부터 유래된 Fc-영역 폴리펩티드는 함유되는 아미노산 변형에 의해 추가로 정의된다. 따라서, 예를 들어, 용어 P329G 는 SEQ ID NO: 01, 또는 02, 또는 03, 또는 04 의 인간 Fc-영역 폴리펩티드에 비해, 아미노산 위치 329 에서 프롤린의 글리신으로의 돌

연변이를 갖는 인간 Fc-영역 폴리펩티드로부터 유래된 Fc-영역 폴리펩티드를 나타낸다.

[0317] 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드는 하기의 아미노산 서열을 포함한다:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO: 01).

[0318] 하기의 Fc-영역은 야생형 인간 IgG1 Fc-영역으로부터 유래된 변이체이다.

[0320] 돌연변이 L234A, L235A 를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 유래 Fc-영역 폴리펩티드는 하기의 아미노산 서열을 포함한다:

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO: 05).

[0321]

[0322] Y349C, T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 유래 Fc-영역 폴리펩티드는 하기의 아미노산 서열을 포함한다:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO: 06).

[0323]

[0324] S354C, T366W 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 유래 Fc-영역 폴리펩티드는 하기의 아미노산 서열을 포함한다:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO: 07).

[0325]

[0326] L234A, L235A 돌연변이 및 Y349C, T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 유래 Fc-영역 폴리펩티드는 하기의 아미노산 서열을 포함한다:

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO: 08).

[0327]

[0328] L234A, L235A 및 S354C, T366W 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 유래 Fc-영역 폴리펩티드는 하기의 아미노산 서열을 포함한다:

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO: 09).

[0329]

P329G 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 유래 Fc-영역 폴리펩티드는 하기의 아미노산 서열을 포함한다:

[0330]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO: 10).

[0331]

L234A, L235A 돌연변이 및 P329G 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 유래 Fc-영역 폴리펩티드는 하기의 아미노산 서열을 포함한다:

[0332]

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO: 11).

[0333]

P329G 돌연변이 및 Y349C, T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 유래 Fc-영역 폴리펩티드는 하기의 아미노산 서열을 포함한다:

[0334]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO: 12).

[0335]

P329G 돌연변이 및 S354C, T366W 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 유래 Fc-영역 폴리펩티드는 하기의 아미노산 서열을 포함한다:

[0336]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO: 13).

[0337]

L234A, L235A, P329G 및 Y349C, T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 유래 Fc-영역 폴리펩티드는 하기의 아미노산 서열을 포함한다:

[0338]

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO: 14).

[0339]

L234A, L235A, P329G 돌연변이 및 S354C, T366W 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 유래 Fc-영역 폴리펩티드는 하기의 아미노산 서열을 포함한다:

[0340]

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO: 15).

[0341]

[0342] 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드는 하기의 아미노산 서열을 포함한다:

ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL (SEQ ID NO: 04).

[0343]

[0344] 하기의 Fc-영역은 야생형 인간 IgG4 Fc-영역으로부터 유래된 변이체이다.

[0345] S228P 및 L235E 돌연변이를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 유래 Fc-영역 폴리펩티드는 하기의 아미노산 서열을 포함한다:

ESKYGPPCPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL (SEQ ID NO: 16).

[0346]

[0347] S228P, L235E 돌연변이 및 P329G 돌연변이를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 유래 Fc-영역 폴리펩티드는 하기의 아미노산 서열을 포함한다:

ESKYGPPCPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL (SEQ ID NO: 17).

[0348]

[0349] S354C, T366W 돌연변이를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 유래 Fc-영역 폴리펩티드는 하기의 아미노산 서열을 포함한다:

ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL (SEQ ID NO: 18).

[0350]

[0351] Y349C, T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 유래 Fc-영역 폴리펩티드는 하기의 아미노산 서열을 포함한다:

ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL (SEQ ID NO: 19).

[0352]

[0353] S228P, L235E 및 S354C, T366W 돌연변이를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 유래 Fc-영역 폴리펩티드는 하기의 아미노

산 서열을 포함한다:

ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVK
GFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL (SEQ ID NO: 20).

[0354]

S228P, L235E 및 Y349C, T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 유래 Fc-영역 폴리펩티드는 하기의 아미노산 서열을 포함한다:

ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPQSQEEMTKNQVSLSCAVK
GFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL (SEQ ID NO: 21).

[0356]

P329G 돌연변이를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 유래 Fc-영역 폴리펩티드는 하기의 아미노산 서열을 포함한다:

ESKYGPPCPCSCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL (SEQ ID NO: 22).

[0358]

P329G 및 Y349C, T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 유래 Fc-영역 폴리펩티드는 하기의 아미노산 서열을 포함한다:

ESKYGPPCPCSCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPQSQEEMTKNQVSLSCAVK
GFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL (SEQ ID NO: 23).

[0360]

P329G 및 S354C, T366W 돌연변이를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 유래 Fc-영역 폴리펩티드는 하기의 아미노산 서열을 포함한다:

ESKYGPPCPCSCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVK
GFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL (SEQ ID NO: 24).

[0362]

S228P, L235E, P329G 및 Y349C, T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 유래 Fc-영역 폴리펩티드는 하기의 아미노산 서열을 포함한다:

ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPQSQEEMTKNQVSLSCAVK
GFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL (SEQ ID NO: 25).

[0364]

S228P, L235E, P329G 및 S354C, T366W 돌연변이를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 유래 Fc-영역 폴리펩티드는 하기의

[0365]

아미노산 서열을 포함한다:

ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVHLQDNLNGKEY
KCKVSNKGLGSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCVMHEALHNHYTQKSLSL (SEQ ID NO: 26).

[0366]

[0367]

"인간화" 항체는 비인간 HVR 유래의 아미노산 잔기 및 인간 FR 유래의 아미노산 잔기를 포함하는 항체를 의미한다. 특정한 구현예에 있어서, 인간화 항체는 적어도 하나, 및 전형적으로 2개의 가변 도메인 중 실질적으로 전부를 포함하게 될 것이며, 여기에서 HVR (예를 들어, CDR) 의 전체 또는 실질적으로 전체는 비인간 항체의 것에 해당되며, FR의 전체 또는 실질적으로 전체는 인간 항체의 것에 해당된다. 인간화 항체는 임의로 인간 항체로부터 유래되는 항체 불변 영역의 적어도 일부분을 포함할 수 있다. 항체, 예를 들어 비인간 항체의 "인간화 형태"는 인간화를 거친 항체를 의미한다.

[0368]

본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 "초가변 영역" 또는 "HVR"은 서열이 초가변성 ("상보성 결정 영역" 또는 "CDR")이고/이거나 구조적으로 정의된 루프 ("초가변 루프") 를 형성하고/하거나, 항원-접촉 잔기 ("항원 접촉 부") 를 함유하는, 아미노산 잔기 스트레치를 포함하는 항체 가변 도메인의 각각의 영역을 의미한다. 일반적으로, 항체는 6개의 HVR을 포함하는데, 3개는 중쇄 가변 도메인 VH (H1, H2, H3) 에 존재하고, 3개는 경쇄 가변 도메인 VL (L1, L2, L3) 에 존재한다.

[0369]

HVR은

[0370]

(a) 아미노산 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), 및 96-101 (H3) 에 존재하는 초가변 루프 (Chothia, C. and Lesk, A.M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917);

[0371]

(b) 아미노산 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2), 및 95-102 (H3) 에 존재하는 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.);

[0372]

(c) 아미노산 잔기 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2), 및 93-101 (H3) 에 존재하는 항원 접촉부 (MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)); 및

[0373]

(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

[0374]

을 포함한다.

[0375]

달리 표시하지 않으면, HVR 잔기 및 가변 도메인의 다른 잔기 (예를 들어, FR 잔기) 는 Kabat 등 (상동) 에 따라서 본원에서 번호 부여된다.

[0376]

용어 "경쇄" 는 천연 IgG 항체의 보다 짧은 폴리펩티드 사슬을 의미한다. 항체의 경쇄는 이의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여, 카파 (κ) 및 람다 (λ) 로 불리는 2 가지 유형 중 하나에 할당될 수 있다. 인간 카파 경쇄 불변 도메인에 대해서는 SEQ ID NO: 33, 및 인간 람다 경쇄 불변 도메인에 대해서는 SEQ ID NO: 34 를 참조한다.

[0377]

용어 "파라토프" 는 표적과 결합 부위 사이의 특이적 결합에 요구되는 소정의 항체 분자의 부분을 의미한다. 파라토프는 연속적일 수 있고, 즉, 결합 부위에 존재하는 인접한 아미노산 잔기에 의해 형성될 수 있거나, 또는 불연속적일 수 있으며, 즉, HVR/CDR 의 아미노산 서열에서 처럼, 1 차 서열에서 순차적으로 상이한 위치에 있지만, 결합 부위가 채택하는 3 차 구조에서 밀접하게 가까운 아미노산 잔기에 의해 형성될 수 있다.

[0378]

"단리된" 항체는 이의 천연 환경의 성분으로부터 분리된 것이다. 일부 구현예에 있어서, 항체는, 예를 들어 전기영동 (예를 들어, SDS-PAGE, 등전점 맞춤법 (IEF), 모세관 전기영동, CE-SDS) 또는 크로마토그래피 (예를 들어, 크기 배제 크로마토그래피 또는 이온 교환 또는 역상 HPLC) 에 의해 결정시, 95 % 또는 99 % 를 초과하는 순도로 정제된다. 항체 순도의 평가 방법의 고찰을 위해, 예를 들어 문헌 [Flatman, S. et al., J. Chrom. B 848 (2007) 79-87] 을 참조한다.

[0379]

"단리된" 핵산은 이의 천연 환경의 성분으로부터 분리된 핵산 분자를 의미한다. 단리된 핵산은 대개는 핵산

분자를 함유하는 세포에 함유된 핵산 분자를 포함하지만, 핵산 분자는 염색체외에 또는 이의 천연 염색체 위치와 상이한 염색체 위치에 존재한다.

- [0380] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 "단일 클론 항체" 는 실질적으로 균질한 항체의 개체군으로부터 수득된 항체를 의미하고, 즉, 그 개체군을 포함하는 개별 항체는 동일하고/하거나 동일한 에피토프에 결합하지만, 천연 발생 돌연변이를 함유하거나 또는 단일 클론 항체 제제의 제조 동안에 발생하는 가능한 변이체 항체는 예외적이며, 이러한 변이체는 일반적으로 소량으로 존재한다. 전형적으로 상이한 결정부 (에피토프) 에 대하여 유도된 상이한 항체를 포함하는 다클론 항체 제제와 대조적으로, 단일 클론 항체 제제의 각각의 단일 클론 항체는 항원 상의 단일 결정부에 대해 유도된다. 따라서, 한정어 "단일 클론" 은 실질적으로 균질한 항체 개체군으로부터 수득되는 항체의 특징을 의미하며, 임의의 특정 방법에 의한 항체의 제조를 요구하는 것으로 해석하지 않는다. 예를 들어, 본 발명에 따라서 사용되는 단일 클론 항체는 비제한적으로, 하이브리도마 방법, 재조합 DNA 방법, 파지-디스플레이 방법, 및 인간 면역글로불린 유전자좌의 전부 또는 일부를 함유하는 유전자 이식 동물을 이용하는 방법을 포함하여, 다양한 기술에 의해 제조될 수 있으며, 단일 클론 항체를 제조하기 위한 이러한 방법 및 다른 예시적인 방법은 본원에서 기술된다.
- [0381] "천연 항체" 는 다양한 구조를 갖는 천연 발생 면역글로불린 분자를 의미한다. 예를 들어, 천연 IgG 항체는 디설피드-결합된 2개의 동일한 경쇄 및 2개의 동일한 중쇄로 구성된 약 150,000 달톤의 이중사량체성 당단백질이다. N-말단에서 C-말단으로, 각각의 중쇄는 가변 중쇄 도메인 또는 중쇄 가변 도메인이라고도 불리는 가변 영역 (VH) 과 후속하여 3개의 불변 도메인 (CH1, CH2, 및 CH3) 을 가진다. 유사하게, N-말단에서 C-말단으로, 각각의 경쇄는 가변 경쇄 도메인 또는 경쇄 가변 도메인이라고도 불리는 가변 영역 (VL) 과 후속하여 불변 경쇄 (CL) 도메인을 가진다. 항체의 경쇄는 이의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기반으로 카파 (κ) 및 람다 (λ) 라고 불리는, 2개 유형 중 하나로 지정될 수 있다.
- [0382] 용어 "약학 제제" 는 그에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성을 유효하게 하는 형태이고, 제제가 투여되는 대상에게 허용 불가능하게 독성인 추가의 성분을 함유하지 않는 제제를 의미한다.
- [0383] "약학적으로 허용 가능한 담체" 는 활성 성분 이외에, 대상에게 무해한 약학 제제 중의 성분을 의미한다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 비제한적으로, 완충제, 부형제, 안정화제, 또는 보존제를 포함한다.
- [0384] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 "재조합 항체" 는 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 모든 항체 (키메라, 인간화 및 인간) 를 의미한다. 이것은 NS0, HEK, BHK 또는 CHO 세포와 같은 숙주 세포로부터, 또는 숙주 세포로 형질 전환된 재조합 발현 플라스미드를 사용하여 발현된 인간 면역글로불린 유전자 또는 항체에 대해 형질 전환된 동물 (예를 들어, 마우스) 로부터 단리된 항체를 포함한다. 이러한 재조합 항체는 재배열된 형태로 가변 및 불변 영역을 가진다. 본원에서 보고되는 바와 같은 재조합 항체는 생체내 체세포 초돌연변이에 제공될 수 있다. 따라서, 재조합 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은 인간 생식 계열 VH 및 VL 서열로부터 유래된 및 이와 관련된 서열인 반면, 생체내 인간 항체 생식 계열 레퍼토리 내에 자연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다.
- [0385] 본 출원에서 사용되는 바와 같은, 용어 "원자가" 는 (항체) 분자에서의 특정한 수의 결합 부위의 존재를 의미한다. 이와 같이, 용어 "2 가", "4 가", 및 "6 가" 는 각각 (항체) 분자에서의 2 개의 결합 부위, 4 개의 결합 부위, 및 6 개의 결합 부위의 존재를 의미한다. 본원에서 보고되는 바와 같은 이중특이적 항체는 하나의 바람직한 구현예에 있어서, "2 가" 또는 "3 가" 이다.
- [0386] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인" 은 항체와 이의 항원과의 결합에 관여하는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 의미한다. 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인 (각각 VH 및 VL) 은 유전적으로 유사한 구조를 가지며, 각각의 도메인은 4 개의 프레임 영역 (FR) 및 3 개의 초가변 영역 (HVR) 을 포함한다 (예를 들어, 문헌 [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 부여하는데 충분할 수 있다. 또한, 특정한 항원에 결합하는 항체는 각각 상보성 VL 또는 VH 도메인의 라이브러리를 스크리닝하기 위해서 항원에 결합하는 항체로부터 VH 또는 VL 도메인을 사용하여 단리될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Portolano, S. et al., J. Immunol. 150 (1993) 880-887; Clackson, T. et al., Nature 352 (1991) 624-628] 참조).
- [0387] 용어 "변이체" 는 부모 분자의 아미노산 서열과 상이한 아미노산 서열을 갖는 분자를 의미한다. 전형적으로, 이러한 분자는 하나 이상의 변경, 삽입, 또는 결실을 가진다. 하나의 구현예에 있어서, 변형된 항체 또는 변형된 융합 폴리펩티드는, 자연적으로 발생하지 않는 Fc-영역의 적어도 일부를 포함하는 아미노산

서열을 포함한다. 이러한 분자는 Fc-영역의 부모 도메인과 100 % 미만의 서열 동일성을 가진다. 하나의 구현예에 있어서, 변이체는 부모 도메인 또는 Fc-영역의 아미노산 서열과 약 75 % 내지 100 % 미만, 특히 약 80 % 내지 100 % 미만, 특히 약 85 % 내지 100 % 미만, 특히 약 90 % 내지 100 % 미만, 및 특히 약 95 % 내지 100 % 미만의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 가진다. 하나의 구현예에 있어서, 부모 도메인 또는 Fc-영역 및 변이체 도메인 또는 Fc-영역은 1 개 (단일), 2 개 또는 3 개의 아미노산 잔기가 상이하다.

[0388] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 "도메인 교차" 는 항체 중쇄 VH-CH1 단편 및 이의 상응하는 동족 항체 경쇄의 쌍에서, 즉 항체 결합 아암 (arm) (즉, Fab 단편) 에서, 도메인 서열은 적어도 하나의 중쇄 도메인이 이의 상응하는 경쇄 도메인에 의해 치환되고 그 반대의 경우이기도 하다는 점에서 도메인 서열이 천연 서열로부터 벗어나는 것을 의미한다. 3 가지 일반적인 유형의 도메인 교체가 존재하는데, (i) VL-CH1 도메인 서열을 갖는 도메인 교차 경쇄 및 VH-CL 도메인 서열을 갖는 도메인 교차 중쇄 단편 (또는 VH-CL-힌지-CH2-CH3 도메인 서열을 갖는 전체 길이 항체 중쇄) 을 야기시키는 CH1 및 CL 도메인의 교차, (ii) VH-CL 도메인 서열을 갖는 도메인 교차 경쇄 및 VL-CH1 도메인 서열을 갖는 도메인 교차 중쇄 단편을 야기시키는 VH 및 VL 도메인의 도메인 교차, 및 (iii) VH-CH1 도메인 서열을 갖는 도메인 교차 경쇄 및 VL-CL 도메인 서열을 갖는 도메인 교차 중쇄 단편을 야기시키는 완전한 경쇄 (VL-CL) 및 완전한 VH-CH1 중쇄 단편의 도메인 교차 ("Fab 교차") 가 있다 (모든 상기에 언급된 도메인 서열은 N-말단에서 C-말단 방향으로 표시됨).

[0389] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 상응하는 중쇄 및 경쇄 도메인에 대하여 "서로 대체되는"은 상기 언급된 도메인 교차를 의미한다. 이와 같이, CH1 및 CL 도메인이 "서로 대체되는" 경우, 이것은 항목 (i) 및 최종 중쇄 및 경쇄 도메인 서열 하에서 언급된 도메인 교차를 의미한다. 따라서, VH 및 VL이 "서로 대체되는" 경우에, 이것은 항목 (ii) 하에 언급된 도메인 교차를 의미하고, CH1 및 CL 도메인이 "서로 대체되고" VH1 및 VL 도메인이 "서로 대체되는" 경우, 이것은 항목 (iii) 하에 언급된 도메인 교차를 의미한다. 도메인 교차를 포함하는 이중특이적 항체는 예를 들어, WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254 및 문헌 [Schaefer, W. et al, Proc. Natl. Acad. Sci USA 108 (2011) 11187-11192]에 보고되어 있다.

[0390] 본원에서 보고되는 바와 같은 방법으로 제조된 다중특이적 항체는 또한 상기 항목 (i) 하에 언급된 바와 같은 CH1 및 CL 도메인의 도메인 교차, 또는 상기 항목 (ii) 하에 언급된 VH 및 VL 도메인의 도메인 교차를 포함하는 Fab 단편을 포함할 수 있다. 동일한 항원에 특이적으로 결합하는 Fab 단편은 동일한 도메인 서열의 것이도록 제작된다. 그러므로, 도메인 교차가 있는 하나를 초과하는 Fab 단편이 다중특이적 항체에 함유되는 경우에, 상기 Fab 단편은 동일한 항원에 특이적으로 결합한다.

[0391] II. 본 발명에 따른 특정한 방법 및 화합물

[0392] 다중특이적 항체, 예를 들어 이중- 또는 삼중특이적 항체에 사용하기 위한 결합체의 최상의 조합의 확인을 위해, 가능한 많은 조합으로서 테스트하는 것이 바람직하다. 그러므로, 다수의 상이한 결합 부위를 각각 상이한 결합 특이성, 즉, 결합체와 서로 조합할 수 있으며, 결합 또는 기능 분석에서 최상의 조합을 위해 스크리닝할 수 있는 방법이 요구된다.

[0393] 예를 들어, 제 1 결합 특이성을 갖는 제 1 의 다수의 결합 부위의 각각의 결합체 (예를 들어, 상이한 경쇄 가변 도메인 및 중쇄 가변 도메인 쌍, Fv 단편) 는 제 2 결합 특이성을 갖는 제 2 의 다수의 부위의 각각의 결합체와 조합된다 (예를 들어, 동일한 항원 상의 상이한 에피토프 또는 상이한 항원에 결합). 이것은, 상기 제 1 의 다수의 결합 부위와 상기 제 2 의 다수의 각각의 결합 부위의 각각의 조합을 포함하는 조합 매트릭스의 제조를 야기한다. 부가적으로, 및 바람직하게는, 원자가 및 기능과 관련하여 상이한 포맷이 또한 이러한 조합 매트릭스에 포함된다. 이어서, 생성된 다중특이적 항체는 원하는 기능을 보유하는 조합 및 포맷을 확인하기 위해서 분석한다 (예를 들어, 약물 개발에 바람직하고 중요한 기능적 성능 및/또는 파라미터에 따라서 순위를 매김). 2 개의 특이성의 조합 매트릭스의 크기는 입력 분자의 선형으로 증가하는 수에 따라 기하 급수적으로 성장하며, 예를 들어 100 'A-결합체' 및 100 'B-결합체' 는 10,000 개의 상이한 'A+B-bsAb' (bsAb = 이중특이적 항체) 를 생성한다. 개별 디자인 및 발현 카세트의 생성, 이어서 발현 및 정제를 통한 이러한 다수의 상이한 A+B bsAb 의 생성은 번거롭고, 평가될 수 있는 매트릭스의 크기에 제한을 가한다.

[0394] 적어도 2 가지 작업은 많은 상이한 입력 엔터티 (상이한 특이성, 에피토프, 형태, 친화성, 및/또는 원자가) 의 생성 및 선별 조합: 결합력-매개된 결합 개선 및 작용제 bsAb 의 생성으로부터 이점을 제공한다.

[0395] 결합력-매개된 결합 개선은 2 가- (또는 심지어 다가-) bsAb 에 대한 2 개의 (상이한) 1 가 결합 부위의 물리적 연결에 의해서만 달성되는 결합 기능을 갖는 1 가 형태의 결합 기능이 부족하거나 또는 없는 항체 유도체에 기

초한다. 2 가- 또는 다가는 2 개의 상이한 결합 부위의 결합에 따라 특이성을 갖는 결합력을 생성한다.

- [0396] 이중- 또는 다중특이적 작용제 항체의 원리는 유사하다: 기능은 하나의 1 가 결합 엔터티의 결합이 활성을 갖지 않으면서 상이한 항원의 동시 결합 (이것은 가교를 포함할 수 있음) 을 통해 도출된다.
- [0397] 상기 원리의 공통 분모는 (개별 1 가 결합 엔터티의 기능이 없거나 또는 거의 부족한 것과) 2 가- 또는 다가 조합의 바람직한 기능이다. 바람직한 결합 부위 조합의 확인은 결합력-매개된 결합 또는 작용제 bsAb (2 가- 또는 다가에 의해 매개됨) 의 결합 및/또는 기능의 평가에 기초한다. 따라서, 이러한 스크리닝을 위해, 예를 들어 본 발명에 따른 교환 반응을 통해 생성된 시험 항체, 즉, bsAb 는 위양성 결과를 생성할 수 있기 때문에, 임의의 남아있는 (2 가) 단일특이적 분자를 함유하지 않는 것이 요구된다. 동일한 이유로, 동일하거나 또는 훨씬 더 혼란스러운 것은 다가 반응 부산물, 예를 들어 응집체이다.
- [0398] A) 단일특이적 1 가 IgG 유도체를 이중특이적 2 가 IgG 로 전환시키는 방법
- [0399] 본 발명에 따른 방법은 단일특이적 (1 가) 항체 또는 항체 단편을 2 가 bsAb 로 전환시키는 것을 달성한다. 상기 방법은 반응 동안에 형성된 응집체 뿐만 아니라, 2가 이지만 단일특이적인 부산물 및 비전환 출발 물질의 용이한 제거를 허용한다. 즉, 본 발명에 따른 방법은 특히 2 가 단일특이적 항체 및 바람직하지 않은 응집체가 최종 제제에 존재하는 것을 회피하는 적어도 2 가지 문제를 해결한다.
- [0400] 이것을 달성하기 위해서, 2 개의 기능적 반-항체 (오직 단일특이적) 가 출발 물질로서 사용된다. 예시적으로, 소위 2/3-IgG 가 출발 물질로서 사용될 수 있다. 2/3-IgG 는 제 1 세트의 노브-인트루-홀 (KiH) 돌연변이를 갖는 중쇄, 이에 상보적인 경쇄, 및 Fc-영역으로 구성되며, 이는 각각의 상보적인 제 2 세트의 노브-인트루-홀 돌연변이에 의해 중쇄의 Fc-영역에 상보적이게 된다. 상보적 Fc-영역은, 예를 들어 Fc-영역 중쇄 단편 또는 제 2 중쇄일 수 있다. 원하는 이중- (다중-) 특이적 항체의 정확한 조립을 추가로 촉진시키기 위해서, 상보적 Fc-영역은 제 2 의 상보적 세트의 KiH 돌연변이 이외에, 추가의 교란 (불안정화) 반발 전하 도입 돌연변이를 포함한다. 추가로, 상보적 Fc-영역은, 반응 후에 바람직하지 않은 추출물 및 생성물의 효율적인 제거를 위해 친화성 태그 (예를 들어, His6 또는 C-Tag) 를 포함할 수 있다. 제 2 의 2/3-IgG 는, 예를 들어 혼합시 항체-반이 서로 교환되면 인력 돌연변이로 변하는 상보적 교란 돌연변이를 포함한다.
- [0401] 본 발명에 따른 교환 반응/방법은 하기의 단계를 포함한다:
- [0402] - 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드를 포함하는 제 1 (출발) 이중이량체성 폴리펩티드와, 제 3 폴리펩티드 및 제 4 폴리펩티드를 포함하는 제 2 (출발) 이중이량체성 폴리펩티드를 배양하여, 제 2 및 제 3 폴리펩티드를 교차 교환함으로써 제 3 및 제 4 이중이량체성 폴리펩티드를 형성하는 단계, 및
- [0403] - 제 1 폴리펩티드 및 제 4 폴리펩티드를 포함하는 제 4 (교환된) 이중이량체성 폴리펩티드를 회수하는 단계,
- [0404] 여기에서,
- [0405] i) 제 2 폴리펩티드는, 제 2 폴리펩티드에서의 상기 돌연변이를 제외하고, 상기 제 1 이중이량체성 폴리펩티드와 동일한 (이중이량체성) 폴리펩티드와 비교하여, 제 1 이중이량체성 폴리펩티드의 불안정화를 야기하는 (제 1 교란) 돌연변이를 포함함,
- [0406] ii) 제 3 폴리펩티드는, 제 3 폴리펩티드에서의 상기 돌연변이를 제외하고, 상기 제 2 (이중이량체성) 폴리펩티드와 동일한 이중이량체성 폴리펩티드와 비교하여, 제 2 이중이량체성 폴리펩티드의 불안정화를 야기하는 (제 2 교란) 돌연변이를 포함함,
- [0407] iii) 제 2 폴리펩티드에서의 (제 1 교란) 돌연변이 및 제 3 폴리펩티드에서의 (제 2 교란) 돌연변이는 제 1 (출발) 이중이량체성 폴리펩티드 및/또는 제 2 (출발) 이중이량체성 폴리펩티드와 비교하여, 상기 제 2 폴리펩티드 및 상기 제 3 폴리펩티드를 포함하는 제 3 (교환된) 이중이량체성 폴리펩티드의 안정화를 야기함,
- [0408] iv) 제 4 (교환된) 이중이량체성 폴리펩티드는 제 1 (출발) 이중이량체성 폴리펩티드 및/또는 제 2 (출발) 이중이량체성 폴리펩티드와 비교하여, 보다 안정함.
- [0409] 따라서, 본 발명은, 적어도 부분적으로, 이중이량체성 폴리펩티드에 단일 (한쪽, 쌍이 아님) 불안정화 (교란) 돌연변이를 추가하는 것이, 둘 모두 새로 형성된 교환된 이중이량체성 폴리펩티드가 출발 이중이량체성 폴리펩티드와 비교하여 개선된 안정성 (즉, 보다 낮은 CH3-CH3 결합 자유 에너지) 을 갖는 것을 야기하기 때문에, 또한 하나의 단일 (한쪽, 쌍이 아님) 불안정화 (교란) 돌연변이를 포함하는 제 2 이중이량체성 폴리펩티드와의 폴리펩티드 사슬 교환을 촉진시키는데 충분하다는 발견에 기초한다. 따라야 하는 유일한 단서는, 불안정화

(교란) 돌연변이가 각각의 폴리펩티드가 서로 연결되면 서로 상호 작용하는 위치에서 도입된다는 것이다.

[0410] 이 방법은 상기에서 설명한 바와 같은 기준을 충족시키는 임의의 이중이량체성 폴리펩티드에 적용될 수 있다.

[0411] 그럼에도 불구하고, 본 발명에 따른 방법은 약학 분야에서 특히 유용하다.

[0412] 본 발명에 따른 방법으로, 교환 반응 동안에 서로 연결되는 각각의 이중이량체성 출발 폴리펩티드의 각각의 폴리펩티드가 하나 이상의 결합 부위를 포함하는 경우, 이중특이적 결합체의 커다란 라이브러리를 생성하는 것이 용이하게 가능하다. 따라서, 본 발명에 따른 방법에서 수득된 교환된 이중이량체성 폴리펩티드 중 하나는 이들 결합 부위를 포함할 것이다.

[0413] 이중이량체성 폴리펩티드의 생성을 위한 상이한 방법이 당업계로부터 공지되어 있다. 출발 이중이량체성 폴리펩티드의 형성에 요구되는 돌연변이가 본 발명에 따른 교환 반응에 필요한 (교란) 불안정화 돌연변이를 방해하거나 또는 이와 중첩되지 않는 한, 임의의 이들 방법이 사용될 수 있다.

[0414] 약학 분야로 돌아오면, 항체는 가장 널리 사용되는 부류의 결합제이다. 항체는 이들의 불변 영역에서, 특히 중쇄의 CH3 도메인 사이에서의 상호 작용을 통해 이량체화된다.

[0415] 따라서, 본 발명은, 적어도 부분적으로, 본 발명에 따른 방법을 수행하기 위해, 한 쌍의 CH3 도메인 중 하나의 CH3 도메인에 단일 불안정화 돌연변이를 도입하는 것이 충분하다는 발견에 기초한다. 보다 상세하게는, 제 1 출발 이중이량체성 폴리펩티드의 오직 하나의 CH3 도메인에 위치 357 에서 제 1 불안정화 돌연변이의 도입, 및 제 2 출발 폴리펩티드의 오직 하나의 CH3 도메인에 위치 370 에서 제 2 불안정화 돌연변이의 도입은, 2 개의 출발 이중이량체성 폴리펩티드를 배양할 때, 이들 출발 폴리펩티드 사이의 폴리펩티드 사슬의 자발적 교환을 촉진시키는 것으로 밝혀졌다. 생성된 교환된 폴리펩티드 중 하나는 각각 위치 357 및 370 에서 돌연변이를 갖는 CH3 도메인 쌍을 포함하며, 이는 교환된 이중이량체의 안정화를 야기한다. 마찬가지로, 위치 356 및 439 에서 돌연변이를 갖는 것이 달성될 수 있다. 모든 위치의 번호 부여는 Kabat 의 EU 지수에 따른다. 하나의 바람직한 돌연변이의 쌍은 E357K 및 K370E 이다. 또다른 바람직한 돌연변이의 쌍은 D356K 및 K439E 이다. 본 발명에 따른 방법은 당해 잔기가 고도로 보존되기 때문에, 임의의 IgG 서브클래스, 즉, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 에 적용될 수 있다. 하나의 바람직한 구현예에 있어서, CH3 도메인은 IgG1 서브클래스의 것이다.

[0416] 본 발명은, 적어도 부분적으로, 출발 이중이량체성 폴리펩티드의 폴리펩티드 사슬이 출발 이중이량체성 폴리펩티드의 형성 및 단리를 허용하기 위해서, 예를 들어 디설피드 결합을 통해 서로 공유적으로 연결되는 것을 필요로 하지 않는다는 발견에 기초한다. 보다 상세하게는, 출발 폴리펩티드는 이미 이중이량체이기 때문에, 이들은 이중이량체화를 위한 추가의 돌연변이를 포함할 것이다. 이들 돌연변이는 불안정화 (교란) 단일의 한 쪽 돌연변이의 존재하에서도, 출발 이중이량체를 안정화시키는데 충분한 것으로 밝혀졌다. 이로써, 출발 이중이량체성 폴리펩티드에서 사슬의 공유 연결에 대한 필요성은 더 이상 제공되지 않는다. 따라서, 하나의 구현예에 있어서, 출발 이중이량체성 폴리펩티드를 함유하는 힌지 영역의 경우, 이들 힌지 영역은 돌연변이 C226S 및 C229S, 또는 전체 CPXC (SEQ ID NO: 89) 서열 (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여) 의 결실을 포함한다.

[0417] 이중이량체성 출발 폴리펩티드의 사슬을 포함하는 Fc-영역 사이의 디설피드 결합의 생략에 의해, 교환 반응을 개시하기 위해서 환원제를 첨가할 필요가 없다. 이것은 온화한 반응 조건을 허용한다. 또한, 디설피드 결합은 출발 이중이량체성 폴리펩티드, 예를 들어 Fab 단편에서 존재할 수 있다.

[0418] 본 발명은, 적어도 부분적으로, 교환된 이중이량체성 폴리펩티드, 예를 들어 결합 부위를 포함하는 것은, 교환 반응 후에만 디설피드 결합의 형성에 의해 추가로 안정화될 수 있다는 발견에 기초한다. 예를 들어, 이중이량체성 항체의 형성을 위해 충분히 확립된 돌연변이는 노브-인트루-홀 돌연변이이다. 이들은 2 개의 변이체로서 존재한다: 추가의 디설피드 결합이 있음 및 없음. 따라서, 하나의 대안적인 출발 이중이량체성 폴리펩티드는 출발 이중이량체성 폴리펩티드의 형성을 위한 노브-인트루-홀 돌연변이를 포함하며, 결합 부위를 보유하는 폴리펩티드 사슬에서만 노브-인트루-홀 시스템 잔기를 제공한다. 이로써, 결합 부위를 포함하는 교환된 이중이량체성 폴리펩티드에서만, 상응하는 매칭 위치에서 디설피드 결합의 형성에 요구되는 두 시스템 잔기가 존재한다. 따라서, 상기 교환된 생성물에서만, 디설피드 결합이 형성된다. 이것은 표적 교환된 이중이량체성 폴리펩티드의 추가의 안정화를 야기한다.

[0419] 본 발명은, 적어도 부분적으로, (교란) 불안정화 돌연변이를 또한 포함하는 각각의 폴리펩티드 사슬에서의 태그의 존재가, 결합 부위를 포함하는 교환된 이중이량체성 폴리펩티드의 개선된 정제를 제공한다는 발견에 기초한다.

다. 이러한 분리는 결합 부위를 포함하는 교환된 이중이량체성 폴리펩티드 만이 상기 태크를 포함하지 않기 때문에, 비-반응된 출발 물질 및 비-표적 교환된 이중이량체성 폴리펩티드로부터 가능하다.

[0420] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 "이중이량체성" 은, 아미노산 서열에서 부분적으로 또는 완전히 동일하지 않으며, 본 발명의 요건을 충족시키는 2 개 이상의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다. 상기 용어는 또한 이들 중 적어도 2 개가 본 발명에 따른 이중이량체성이기만 하면, 3 개 이상의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 따라서, 용어 "다량체성" 은, 적어도 2 개가 이중이량체성이며, 본 발명의 요건을 충족시키는 3 개 이상의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다.

[0421] 용어 "교란 돌연변이" 는 (이중)이량체성 폴리펩티드의 불안정화를 야기하는 돌연변이를 의미한다. 이러한 불안정화는 일반적으로 아미노산 잔기의 전하를 변화시킴으로써, 예를 들어 양으로 하전된 아미노산 잔기를 음으로 하전된 아미노산 잔기로 교환하거나, 또는 그 반대로 함으로써 달성된다. 이러한 교환은 상호 작용하는 위치에서 유사한 변화 및, 따라서 전하 반발을 야기한다. 하나의 바람직한 돌연변이의 쌍은 E357K 및 K370E 이다. 또다른 바람직한 돌연변이의 쌍은 D356K 및 K439E 이다. 추가로, 본 발명에 따른 방법은 당해 잔기가 고도로 보존되기 때문에, 임의의 IgG 서브클래스, 즉, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 에 적용될 수 있다. 하나의 바람직한 구현예에 있어서, CH3 도메인은 IgG1 서브클래스의 것이다.

[0422] 이량체 안정성에 대한 CH3 도메인 돌연변이의 효과를 평가하는 방법은 WO 2009/089004 (본원에 참고로 포함됨)에 개시되어 있다. 여기에, EGAD 소프트웨어를 사용하여 CH3-CH3 도메인 결합 자유 에너지를 평가하는 방법이 요약되어 있다 (또한, Pokala, N. and Handel, T.M., J. Mol. Biol. 347 (2005) 203-227 참조, 전체가 본원에 참고로 포함됨):

[0423] EGAD 는 CH3 도메인 계면에서 만들어진 다양한 돌연변이의 결합 자유 에너지를 대략적으로 비교하는데 사용될 수 있다. 돌연변이체의 결합 자유 에너지는 $\Delta \Delta G_{mut} = \mu (\Delta G_{mut} - \Delta G_{wt})$ (mut = 돌연변이체, wt = 야생형) 으로서 정의된다. 여기에서, μ (= 0.1, 일반적으로) 은 실험 에너지와 비교할 때, 결합 친화성의 예측된 변화를 1 의 기울기를 갖도록 정규화하는데 사용되는 계수 인자이다. 자유 해리 에너지 (ΔG) 는 복합체 (ΔG_{bound}) 와 자유 상태 (ΔG_{free}) 사이의 에너지 차이로서 정의된다.

[0424] 본 발명은 구체적이고, 예시적인 출발 물질, 즉, 2/3-IgG 를 사용하여 하기에서 예시된다. 이것은 일반적인 기본 개념의 예시로서 제공되며, 본 발명의 제한으로서 해석되지 않아야 한다. 본 발명의 실제 범위는 청구 범위에 기재되어 있다.

[0425] 도 1 은 본 발명에 따른 방법에서 예시적인 출발 화합물로서 사용되는 2/3-IgG 의 설계 및 모듈 구성을 보여준다. 2/3-IgG 는 다음의 3 개의 개별 사슬로 구성된다: 하나의 경쇄 (통상적으로 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 포함하는 전체 길이 경쇄), 하나의 중쇄 (통상적으로 중쇄 가변 도메인 및 힌지 영역을 포함하는 모든 중쇄 불변 도메인을 포함하는 전체 길이 중쇄), 및 하나의 상보적 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드 (통상적으로 적어도 힌지 및 CH2-CH3 의 단편을 포함하는 중쇄 Fc-영역 단편). 경쇄 및 중쇄의 가변 도메인은 기능성 결합 부위, 즉, VH-VL 쌍을 형성한다. 중쇄 (통상적으로 인간 IgG1 서브클래스의 중쇄) 는 노브-인트루-홀 Fc-영역 이중이량체의 형성을 가능하게 하기 위해서 CH3 도메인에, i) 노브 돌연변이 또는 홀 돌연변이 (항체 중쇄의 CH3 도메인에서의 돌연변이 T366W 는 "노브 돌연변이" 로서 표시되고, 항체 중쇄의 CH3 도메인에서의 돌연변이 T366S/L368A/Y407V 의 조합은 "홀 돌연변이" 로서 표시된다 (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여)), 또는 ii) 노브-cys 돌연변이 또는 홀-cys 돌연변이 (항체 중쇄의 CH3 도메인에서의 돌연변이 T366W/S354C 의 조합은 "노브-cys 돌연변이" 로서 표시되고, 항체 중쇄의 CH3 도메인에서의 돌연변이 T366S/L368A/Y407V/Y349C 의 조합은 "홀-cys 돌연변이" 로서 표시되며; 역전된 설정이 마찬가지로 가능하다: T366W/Y349C 및 T366S/L368A/Y407V/S354C (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여)) 를 함유한다. 상보적 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드는 또한 '더미-Fc', 즉, VH 및 CH1 이 결여되고, 힌지 영역 서열 (또는 이의 단편) 로 N-말단에서 시작하며, 이의 C-말단에 정제 태그, 예를 들어 His6 또는 His8 또는 C-Tag 가 있는 IgG1 유도체로서 표시될 수 있다. 또한, 2/3-IgG 의 상보적 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드는 이의 CH3 도메인에, 중쇄에서의 돌연변이에 따라 노브 돌연변이 또는 홀 돌연변이를 함유한다. 노브-돌연변이 또는 홀-돌연변이 이외에, 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드는 야생형 서열과 관련하여 하나의 (즉, 단일의 추가의) 반발 전하를 도입하는 하나 이상의 교란 (즉, 불안정화) 돌연변이를 포함한다: 예를 들어 각각 K370E 또는 K439E 와 조합된 각각 D356K 또는 E357K (SEQ ID NO: 35, 36, 37 및 38, 이것은 또한 본 발명의 양태이다) (도 2 참조). 이러한 돌연변이된 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드는 이하에서 MHCFcRP 로서 표시된다.

[0426] 중쇄 및 MHCFcRP 는 내부의 노브-인트루-홀 돌연변이의 분포에 따라 다음의 2 가지 유형의 이중이량체를 형성할

수 있다:

- [0427] i) 중쇄-노브(-cys)::MHCFcRP-홀, 및
- [0428] ii) 중쇄-홀(-cys)::MHCFcRP-노브.
- [0429] 따라서, 2/3-IgG 는 관련된 경쇄를 갖는 이중이량체, 즉, 이중삼량체이다. 그러나, 이들은 MHCFcRP 에서의 전하 돌연변이가 중쇄에, 대응하는 반대 부분이 없기 때문에 다소 '결함' 이 있고, 중쇄에 존재하는 경우, MHCFcRP 는 중쇄에 대한 사슬간 디설피드 결합을 형성하는데 필요한 추가의 CH3 시스테인이 결여되어 있다.
- [0430] 2/3-IgG 는 정상 IgG 와 유사한 수율로 발현 및 정제될 수 있는 1 가, 비-이량체화/응집성, 1-아암 항체 유도체이다 (도 3 참조). 이것은 출발 물질의 1 가를 보장한다. 2 가 2/3-IgG 가 사용되는 경우, 이것은 단일 특이적일 뿐만 아니라, 이중특이적일 수 있다.
- [0431] 그러나, 이들 결합이 있는 2/3-IgG 를 구성하는 폴리펩티드는 도 4 에 나타낸 바와 같이, 이중특이적 항체로 재배열될 수 있다.
- [0432] 2 개의 출발 분자 사이의 교환 반응은 KiH (노브-인투-홀) 중쇄 (H-사슬) 의 서로에 대한 보다 양호한 상보성에 의해 (유리 시스테인 잔기가 존재하는 경우, 전하 반발 및 임의로 디설피드 결합의 형성 없음), 뿐만 아니라 2 개의 MHCFcRP 의 서로에 대한 보다 양호한 상보성에 의해 유도된다. 상기 반응에서, 2 개의 출발 분자의 Fc-영역 복합체는 폴리펩티드를 해리 및 교환하여, 2 개의 보다 바람직한 복합체를 형성한다. 이것은 다음과 같이 반응을 주도한다:
- [0433] 2/3-IgG(A)-tag + 2/3-IgG(B)-tag
- [0434] (출발 이중이량체성 폴리펩티드)
- [0435] →
- [0436] bsAb(AB) + MHCFcRP(A)-MHCFcRP(B)-tag
- [0437] (교환된 이중이량체성 폴리펩티드)
- [0438] 도 4 에 도시된 예에서, 출발 2/3-IgG(A) 의 중쇄 (노브-cys) 및 출발 2/3-IgG(B) 의 중쇄 (홀-cys) 는 대응하는 이중특이적 항체 이중삼량체 (2xHC + 2xLC) 를 형성한다.
- [0439] 교환 반응은 (힌지-영역/중쇄간 디설피드 결합이 존재하는 경우) 디설피드 결합을 파괴하기 위해서 환원 단계에 의해 개시된다. 힌지-영역-디설피드-결합-비함유 2/3-IgG 가 사용되는 경우, 환원 단계는 생략될 수 있다 (하기 참조). 이후에, 사슬 재배열이 자발적으로 발생한다.
- [0440] 모든 2/3-IgG 출발 분자, 모든 이량체성 MHCFcRP 부산물, 뿐만 아니라, 교환 반응 동안에 형성될 수 있는 모든 응집체는 하나 이상의 친화성 태그 (예를 들어, His6 또는 His8 또는 C-Tag) 를 포함한다. 따라서, 단일 및 단순한, 뿐만 아니라, 높은-처리량의 호환성 흡수 (친화성 크로마토그래피) 단계가, 응집체를 포함하는 모든 원하지 않는 분자를 제거하기 위해서 사용될 수 있다. 예를 들어, His6 태그의 경우에 있어서, 이 단계는 금속 킬레이트 친화성 크로마토그래피이다 (도 6 및 7 참조). 생성된 정제된 bsAb 는 원하는 기능을 갖는 bsAb 를 식별하기 위해서 스크리닝 절차에 직접 적용될 수 있다 (도 8 참조).
- [0441] 하기의 실시예, 특히 실시예 1 내지 5 를 참조한다.
- [0442] B) 1 가- 및/또는 2 가 단일- 또는 이중특이적 IgG 유도체를 2 가-, 3 가- 또는 4 가의 이중-, 삼중- 또는 사중 특이적 항체로 전환시키는 방법
- [0443] 본 발명에 따른 방법으로, 상이한 결합 특이성을 조합할 뿐만 아니라, 동시에 상이한 포맷 내에서 및 상이한 원자가로 이들 조합을 생성하는 것이 가능하다. 이것은, 이전 섹션에서 설명한 바와 같은 방법에 사용된 출발 물질을 확장함으로써 달성된다.
- [0444] 예를 들어, 이전 섹션에서 설명한 바와 같은 2/3-IgG 로부터 출발하여, MHCFcRP 는 변경되지 않고 유지되지만, 중쇄는 다른 포맷으로 사용된다. 이러한 포맷은, 예를 들어 C-말단 또는 N-말단에 하나의 결합 부위, 또는 각각의 말단에 하나씩 2 개의 결합 부위 (N-말단에 하나 및 C-말단에 하나) 를 갖는 사슬일 수 있다 (도 9 및 10 참조).
- [0445] 이 예에 있어서, 3 개의 상이한 출발 포맷 (N-말단 결합 부위, C-말단 결합 부위, N- 및 C-말단 결합 부위) 은

본 발명에 따른 방법에서 서로 조합되어, 개별 결합 부위의 상이한 결합 부위, 상이한 원자가, 상이한 형태 및 상이한 3 차원 배열/위치를 갖는 9 개의 상이한 bsAb 포맷을 야기한다 (도 11 참조).

[0446] 예로서, 50 개의 '결합제-A' 및 50 개의 '결합제-B' 출발 분자는 각각 3 개의 포맷 (N-말단 결합 부위, C-말단 결합 부위, N- 및 C-말단 결합 부위) 으로 발현되어, 출발 분자로서 각각의 결합제에 대해 2/3-IgG 의 150 (3*50) 개의 제제를 야기할 수 있다. 이어서, 이들은 본 발명에 따른 방법과 섞여 조합될 수 있다. 이것은 22,500 (50*3*50*3) 개의 상이한 bsAb 를 생성한다.

[0447] bsAb 의 생성을 위해, 교환 구동 원리 (결합 입력 분자를 대응하는 출력 분자로 전환) 는 변경되지 않는다. 또한, MHCFCrP 도 유지된다. 따라서, 중쇄 만이 변화/다양화된다.

[0448] 도 1 및 9-10 은 3 개의 상이한 출발 분자 (N-말단, C-말단, N- 및 C-말단 결합 부위를 갖는 2/3-IgG) 가 본 발명에 따른 교환 반응에서 서로 조합되어, 9 개의 상이한 이중특이적 포맷을 야기할 수 있다는 것을 보여준다. 이들은 원자가, 형태 및 개별 결합 부위의 상이한 위치가 상이하다.

[0449] 이러한 이론에 구애되지 않고, 2 개의 상이한 2/3-IgG 의 결합이 있는 이중다량체의 일시적 분리에 기초한 교환 반응은, 우선적으로 대응하는 Fc-영역 이중이량체를 함유하는 생성물을 야기할 것으로 추정된다. 그러므로, 교환은 단일특이적 2/3-IgG 를 이중특이적 IgG (상이한 포맷) 뿐만 아니라, 상응하는 Fc-영역 이중이량체로 전환시킨다.

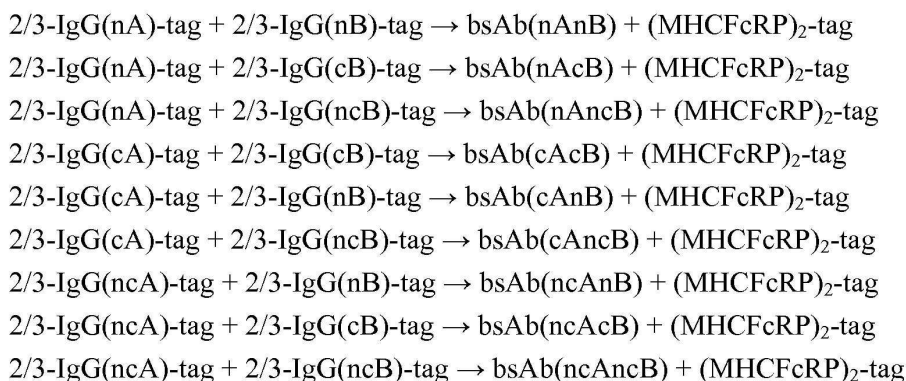
[0450] 교환 반응의 예시적인 설명을 위해, 입력 분자는 다음과 같이 지칭된다:

[0451] - 중쇄 (H-사슬) 의 정상 N-말단에 Fab arm 을 갖는 분자의 경우, 'nA 또는 nB',

[0452] - H-사슬의 C-말단에 Fab arm 을 갖는 분자의 경우, 'cA 또는 cB',

[0453] - H-사슬의 N-말단 뿐만 아니라, C-말단에 Fab arm 을 갖는 분자의 경우, 'ncA 또는 ncB'.

[0454] 상이한 포맷-교환 반응은 다음과 같다:



[0455]

[0456] 힌지-영역 디설피드 결합이 존재하는 경우, 교환 반응은 사슬간 힌지 영역 디설피드 결합을 파괴하기 위해서 환원 단계에 의해 개시된다. 사슬 교환 및 재배열이 자발적으로 발생하였다. 모든 입력 분자, 모든 부산물, 뿐만 아니라, 교환 반응 동안에 잠재적으로 형성될 수 있는 모든 응집체는 친화성 태그 (예를 들어, His6) 를 보유한다. 그러나, 교환 반응에서 생성된 바람직한 bsAb 는 친화성-태그를 갖지 않으며, 따라서 NiNTA 친화성 크로마토그래피 (흡수) 를 통해 제거되었다. 남아있는 bsAb (상이한 포맷) 는 최적의 기능성을 갖는 포맷의 bsAb 를 식별하고 순위를 지정하기 위해서 스크리닝 절차 및 분석에 직접 적용될 수 있다.

[0457] 실시예 6 및 7 참조.

[0458] 본 발명에 따른 방법의 일반적인 적용 가능성을 나타내기 위해서, 추가의 2/3-IgG-기반 포맷 변이체가 제조되고, 본 발명에 따른 교환 반응에 적용된다.

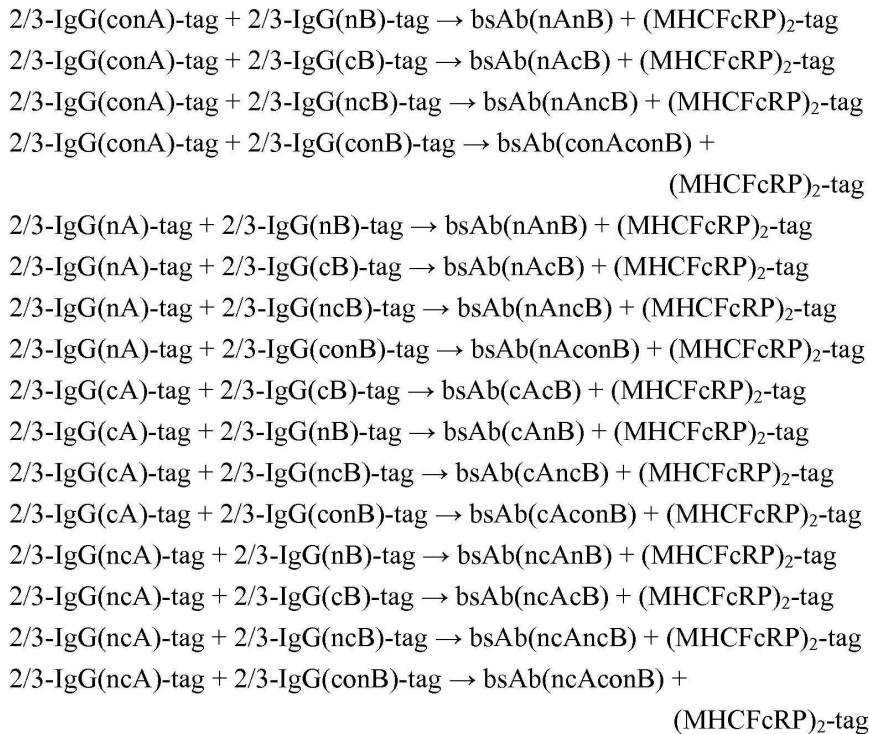
[0459] i) 비-항체 결합제:

[0460] 또다른 포맷에서, 하나의 2/3-IgG 의 Fab-영역을 애피타디로 대체하였다 (도 19 참조). 또한, 교환 반응이 일어났다 (도 23, ELISA 결과 참조).

[0461] 실시예 13 참조.

- [0462] ii) Fab-영역에서 제 3 결합 부위 (VH/VL-쌍) 의 첨가:
- [0463] 또다른 포맷에서, 2/3-IgG 중 하나는 제 2 Fab-영역 (Fab-확장된-2/3-IgG; 도 26 참조) 을 포함하였다. 또한, 교환 반응이 일어났다 (도 27 참조).
- [0464] 교환 반응의 설명을 위해, 입력 분자는 다음과 같이 지칭된다:
- [0465] - 중쇄 (Fab-확장된-2/3-IgG) 의 정상 n-말단에 2 개의 Fab arm 을 갖는 분자의 경우, 'dA',
- [0466] - 중쇄 (H-사슬) 의 정상 N-말단에 Fab arm 을 갖는 분자의 경우, 'nB',
- [0467] - H-사슬의 C-말단에 Fab arm 을 갖는 분자의 경우, 'cB',
- [0468] - H-사슬의 N-말단 뿐만 아니라, C-말단에 Fab arm 을 갖는 분자의 경우, 'ncB'.
- [0469] 상이한 포맷-교환 반응은 다음과 같다:
- $$2/3\text{-IgG(dA)-tag} + 2/3\text{-IgG(nB)-tag} \rightarrow \text{bsAb(dAnB)} + (\text{MHCFcRP})_2\text{-tag}$$
- $$2/3\text{-IgG(dA)-tag} + 2/3\text{-IgG(cB)-tag} \rightarrow \text{bsAb(dAcB)} + (\text{MHCFcRP})_2\text{-tag}$$
- $$2/3\text{-IgG(dA)-tag} + 2/3\text{-IgG(ncB)-tag} \rightarrow \text{bsAb(dAncB)} + (\text{MHCFcRP})_2\text{-tag}$$
- [0470]
- [0471] 실시예 9, 15 및 16 참조.
- [0472] iii) 제약된 결합제:
- [0473] 또다른 포맷에서, 2/3-IgG 중 하나는 WO 2017/191101 (본원에 참고로 포함됨) 에 기재된 바와 같이, Fab-영역 대신에 제약된 결합제를 포함하였다 (제약된-2/3-IgG, conA, conB; 도 31 참조). 또한, 교환 반응이 일어났다 (도 32, 33 및 34 참조).
- [0474] 교환 반응의 설명을 위해, 입력 분자는 다음과 같이 지칭된다:
- [0475] - Fc-영역에 대한 결합 부위 N-말단의 제 1 부분 및 Fc-영역에 대한 결합 부위 C-말단의 제 2 부분을 포함하는 제약된 결합 부위를 갖는 분자의 경우 (여기에서, 제 1 및 제 2 부분은 서로 연결되어 결합 부위를 형성하고, 이들 분자는 원형이다), 'conA 또는 conB',
- [0476] - 중쇄 (H-사슬) 의 정상 N-말단에 Fab arm 을 갖는 분자의 경우, 'nA 또는 nB',
- [0477] - H-사슬의 C-말단에 Fab arm 을 갖는 분자의 경우, 'cA 또는 cB',
- [0478] - H-사슬의 N-말단 뿐만 아니라, C-말단에 Fab arm 을 갖는 분자의 경우, 'ncA 또는 ncB'.

[0479] 상이한 포맷-교환 반응은 다음과 같다:



[0480]

[0481] 실시예 21 참조.

[0482] C) Fc-영역 사슬간 디설피드 결합 및 환원 단계의 제거

[0483] 중쇄 사슬간 디설피드 결합은 항체를 안정화시키고, 힌지에 연결된 Fab arm의 유연성을 정의한다. 출발 항체를 포함하는 힌지-영역의 교환 접근법은, 교환 반응이 완료될 때 환원제를 제거할 뿐만 아니라, 교환 반응 전 또는 동안에 이들 디설피드의 환원을 필요로 한다 (실시예 3 및 7 참조). 일부 접근법의 경우, 이러한 환원 단계를 회피하기 위해서 교환 생성물의 다운스트림 처리를 용이하게 하는 것이 바람직할 수 있다.

[0484] 따라서, 본원에는, 힌지 영역을 갖지만, 사슬간 힌지 영역 디설피드 결합을 갖지 않는 출발 분자의 교환 반응이 본 발명의 또다른 양태로서 보고되어 있다.

[0485] 이것을 예시하기 위해서, Fc-영역에서의 모든 디설피드 결합이 제거된 2/3-IgG를 생성하였다. 이러한 디설피드-제거된 2/3-IgG는 이들 사슬간 디설피드 결합 없이도, 효과적인 방식으로 생성 및 정제될 수 있는 것으로 밝혀졌다 (도 15 참조). 본 발명에 따른 방법에서 이러한 디설피드-제거된 2/3-IgG를 출발 분자로서 사용하는 경우, 교환 반응 후의 출발 분자의 환원 및 환원제의 제거는 생략될 수 있다. 이로써, bsAb를 생성하기 위한 개선된 절차가 제공된다 (처리 단계가 적고 부산물이 적음). 이들 디설피드-제거된 2/3-IgG로부터 생성된 bsAb는 기능적이고 안정하며, 사슬간 디설피드 결합 없이, 비-공유적 Fc-Fc 상호 작용에 의해 함께 유지된다 (도 16 및 17 참조).

[0486] 따라서, Fc-Fc/힌지-영역 사슬간 디설피드 결합의 제거는 교환 반응을 개시하기 위한 환원 단계의 필요성을 제거한다. 생성된 bsAb는 Fc-영역 사슬간 디설피드 결합 없이, 비-공유적 Fc-Fc 상호 작용에 의해 함께 유지되는 기능성 이중특이적 분자이다. 따라서, Fc-Fc 사슬간 디설피드의 제거는 환원 및 재산화의 필요없이, 즉, 생리학적인 조건하에서 상응하는 Fc-영역 불일치 구동 교환 반응을 허용한다. 이것은 제조 및 (높은 처리량) 스크리닝 절차를 용이하게 한다.

[0487] 하나의 구현예에 있어서, 힌지 영역은 디설피드 결합이 없다. 디설피드 결합이 없는 힌지 영역은 SEQ ID NO: 32의 서열에서 시스테인 잔기 대신 세린 잔기를 포함한다. 반응은 힌지 영역 디설피드 결합이 있거나 없어도 효율적이다 (도 24, 실시예 3 또는 12에 따른 ELISA).

[0488] 디설피드 결합의 제거 이외에, 또한 힌지 영역은 단축될 수 있다. 이러한 변형된 힌지 영역을 사용함으로써, 개별 결합 부위 사이에 상이한 거리를 제공하는 이중특이적 항체가 수득될 수 있다 (도 25 참조).

조). 따라서, 하나의 구현예에 있어서, 힌지 영역은 SEQ ID NO: 31 (HTCPXCP, X = S 또는 P), 또는 SEQ ID NO: 85 (HTSPXSP, X = S 또는 P), 또는 SEQ ID NO: 86 (HTPAPE; CPXC 또는 SEQ ID NO. 31 이 삭제됨) 의 아미노산 서열을 가진다.

[0489] 실시예 10, 11, 18 및 19 참조.

[0490] 2/3-IgG 의 조립-농도는 사슬 교환 반응의 효율, 및 이로써 형성된 이중특이적 항체의 양에 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다. 효율적인 사슬-교환 반응을 보장하기 위한 하나의 구현예에 있어서, 2/3-IgG 의 농도는 적어도 0.1 μ M, 즉, 0.1 μ M 이상 (최대 1 M) 이고, 하나의 바람직한 구현예에 있어서, 1 μ M 이상이다.

[0491] 실시예 20 및 도 30 참조.

[0492] 하나의 바람직한 구현예에 있어서, 출발 다량체는 동물 농도로 혼합된다.

[0493] D) Fc-영역 변이체

[0494] 특정한 구현예에 있어서, 하나 이상의 추가의 아미노산 변형이 본원에서 제공된 2/3-IgG 의 Fc-영역에 도입되어, Fc-영역 변이체를 생성할 수 있다. Fc-영역 변이체는 하나 이상의 아미노산 위치에 아미노산 변형 (예를 들어, 치환) 을 포함하는 인간 Fc-영역 서열 (예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc-영역) 을 포함할 수 있다.

[0495] 특정한 구현예에 있어서, 본 발명은 생체내 반감기가 중요하지만 일정 이펙터 기능 (예컨대 보체 및 ADCC) 은 불필요하거나 또는 유해한 적용에 바람직한 후보가 되게 하는, 이펙터 기능의 전부가 아닌 일부를 보유하는 2/3-IgG 변이체를 고려한다. 시험관 내 및/또는 생체내 세포독성 어세이를 수행하여 CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인할 수 있다. 예를 들어, Fc 수용체 (FcR) 결합 어세이를 수행하여, 2/3-IgG 가 Fc γ R 결합은 결여되었지만 (그에 따라 ADCC 활성이 결여될 가능성이 있음), FcRn 결합 능력을 보유한다는 것을 보장할 수 있다. ADCC 의 매개를 위한 주요 세포, NK 세포는 오직 Fc γ RIII 만을 발현하지만, 그에 반해 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈 세포 상에서 FcR 발현은 문헌 [Ravetch, J.V. and Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492] 의 464 페이지의 표 3 에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 어세이의 비제한적인 예는 US 5,500,362 (예를 들어, 문헌 [Hellstrom, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 7059-7063]; 및 [Hellstrom, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 1499-1502] 참조); US 5,821,337 (문헌 [Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361] 참조) 에 기술되어 있다. 대안적으로, 비방사능 어세이 방법이 이용될 수 있다 (예를 들어, 유세포측정을 위한 ACTI™ 비방사능 세포독성 어세이 (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); 및 CytoTox 96® 비방사능 세포독성 어세이 (Promega, Madison, WI) 참조). 이러한 어세이에 유용한 이펙터 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 살해 (NK) 세포를 포함한다. 대안적으로, 또는 부가적으로, 관심 분자의 ADCC 활성은 예를 들어 문헌 [Clynes, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 652-656] 에 개시된 바와 같은 동물 모델에서, 생체내에서 평가될 수 있다. C1q 결합 어세이는 또한 항체가 C1q 에 결합할 수 없고 그래서 CDC 활성이 결여된 것을 확인하기 위해 수행될 수 있다 (예를 들어, WO 2006/029879 및 WO 2005/100402의 C1q 및 C3c 결합 ELISA 참조). 보체 활성화를 평가하기 위해서, CDC 어세이를 수행할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Gazzano-Santoro, H. et al., J. Immunol. Methods 202 (1996) 163-171]; [Cragg, M.S. et al., Blood 101 (2003) 1045-1052]; 및 [Cragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103 (2004) 2738-2743] 참조). FcRn 결합 및 생체내 청소/반감기 결정은 또한 당분야에 공지된 방법을 사용하여 수행될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Petkova, S.B. et al., Int. Immunol. 18 (2006): 1759-1769] 참조).

[0496] 감소된 이펙터 기능을 갖는 Fc-영역을 포함하는 2/3-IgG 는 Fc-영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329 중 하나 이상의 치환을 갖는 것들을 포함한다 (US 6,737,056). 이러한 Fc-영역 돌연변이체는 알라닌으로 잔기 265 및 297의 치환을 갖는 소위 "DANA" Fc-영역 돌연변이체를 포함하는, 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327 중 둘 이상에 치환을 갖는 Fc-영역 돌연변이체를 포함한다 (US 7,332,581).

[0497] 특정한 2/3-IgG 는 FcR 에 대한 개선되거나 또는 축소된 결합을 갖는 Fc-영역 변이체를 포함한다 (예를 들어, US 6,737,056; WO 2004/056312, 및 문헌 [Shields, R.L. et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604] 참조).

[0498] 특정한 구현예에 있어서, 2/3-IgG 는 ADCC 를 개선시키는 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 Fc-영역의 위치 298, 333, 및/또는 334 에서의 치환 (잔기의 EU 번호 부여) 을 갖는 Fc-영역 변이체를 포함한다.

- [0499] 일부 구현예에 있어서, 예를 들어, US 6,194,551, WO 99/51642, 및 문헌 [Idusogie, E.E. et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184] 에 기술된 바와 같이, 변경된 (즉, 개선되거나 또는 축소된) C1q 결합 및/또는 보체 의존적 세포독성 (CDC) 을 일으키는 변경이 Fc-영역에 만들어진다.
- [0500] 태아에 모체 IgG 의 전달을 담당하는, 신생 Fc 수용체 (FcRn) 에 대한 결합이 개선되고 반감기가 증가된 항체 (Guyer, R.L. et al., J. Immunol. 117 (1976) 587-593, 및 Kim, J.K. et al., J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434) 가 US 2005/0014934 에 기술되어 있다. 그들 항체는 FcRn 에 대한 Fc-영역의 결합을 개선시키는 하나 이상의 치환을 갖는 Fc-영역을 그 안에 포함한다. 이러한 Fc-영역 변이체는 Fc-영역 잔기: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 또는 434 중 하나 이상에서의 치환, 예를 들어 Fc-영역 잔기 434 의 치환을 갖는 것들을 포함한다 (US 7,371,826).
- [0501] 또한, Fc-영역 변이체의 다른 예에 관하여 문헌 [Duncan, A.R. and Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740]; US 5,648,260; US 5,624,821; 및 WO 94/29351 을 참조한다.
- [0502] 모든 양태의 하나의 구현예에 있어서, 2/3-IgG 는 다음을 포함한다 (Kabat 의 EU 지수에 따른 모든 위치):
- [0503] i) 둘 모두의 Fc-영역 폴리펩티드에서 돌연변이 P329G, L234A 및 L235A 를 갖는 인간 IgG1 서브클래스의 Fc-영역, 또는
- [0504] ii) 둘 모두의 Fc-영역 폴리펩티드에서 돌연변이 P329G, S228P 및 L235E 를 갖는 인간 IgG4 서브클래스의 Fc-영역, 또는
- [0505] iii) 둘 모두의 Fc-영역 폴리펩티드에서 돌연변이 P329G, L234A, L235A, I253A, H310A, 및 H435A 를 갖는, 또는 둘 모두의 Fc-영역 폴리펩티드에서 돌연변이 P329G, L234A, L235A, H310A, H433A, 및 Y436A 를 갖는 인간 IgG1 서브클래스의 Fc-영역, 또는
- [0506] iv) 둘 모두의 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 P329G, L234A 및 L235A 를 포함하는 인간 IgG1 서브클래스의 이중량체성 Fc-영역 및
- [0507] a) 하나의 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 T366W 를 포함하고, 다른 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 T366S, L368A 및 Y407V 를 포함함, 또는
- [0508] b) 하나의 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 T366W 및 Y349C 를 포함하고, 다른 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 T366S, L368A, Y407V, 및 S354C 를 포함함, 또는
- [0509] c) 하나의 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 T366W 및 S354C 를 포함하고, 다른 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 T366S, L368A, Y407V 및 Y349C 를 포함함,
- [0510] 또는
- [0511] v) 둘 모두의 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 P329G, S228P 및 L235E 를 포함하는 인간 IgG4 서브클래스의 이중량체성 Fc-영역 및
- [0512] a) 하나의 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 T366W 를 포함하고, 다른 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 T366S, L368A 및 Y407V 를 포함함, 또는
- [0513] b) 하나의 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 T366W 및 Y349C 를 포함하고, 다른 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 T366S, L368A, Y407V, 및 S354C 를 포함함, 또는
- [0514] c) 하나의 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 T366W 및 S354C 를 포함하고, 다른 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 T366S, L368A, Y407V 및 Y349C 를 포함함,
- [0515] 또는
- [0516] vi) i), ii), 및 iii) 중 하나와 iv), 및 v) 중 하나의 조합.
- [0517] 본원에서 보고되는 바와 같은 모든 양태의 하나의 구현예에 있어서, CH3 도메인을 포함하는 2/3-IgG 는 추가적인 C-말단 글리신-리신 디펩티드 (G446 및 K447, Kabat EU 지수에 따른 번호 부여) 를 포함한다. 본원에서 보고되는 바와 같은 모든 양태의 하나의 구현예에 있어서, CH3 도메인을 포함하는 2/3-IgG 는 추가적인 C-말단 글리신 잔기 (G446, Kabat EU 지수에 따른 번호 부여) 를 포함한다.
- [0518] 하나의 구현예에 있어서, 본원에서 보고되는 바와 같은 2/3-IgG 는 돌연변이 PVA236, L234A/L235A, 및/또는

GLPSS331 (Kabat 의 EU 지수에 따른 번호 부여) 를 갖는 인간 서브클래스 IgG1, 또는 서브클래스 IgG4 인 것을 특징으로 하는 Fc-영역을 포함한다. 또다른 구현예에 있어서, 2/3-IgG 는 임의의 IgG 클래스의 Fc-영역, 하나의 구현예에 있어서, E233, L234, L235, G236, D270, N297, E318, K320, K322, A327, A330, P331 및/또는 P329 (Kabat 의 EU 지수에 따른 번호 부여) 에 적어도 하나의 돌연변이를 함유하는, IgG1 또는 IgG4 서브클래스의 Fc-영역을 포함하는 것을 특징으로 한다. 또다른 구현예에 있어서, 2/3-IgG 는 돌연변이 S228P, 또는 돌연변이 S228P 및 L235E (Angal, S., et al., Mol. Immunol. 30 (1993) 105-108) (Kabat 의 EU 지수에 따른 번호 부여) 를 함유하는 인간 IgG4 서브클래스의 Fc-영역을 포함한다.

[0519] 본원에서 보고되는 바와 같은 2/3-IgG 에 포함되는 Fc-영역 폴리펩티드의 C-말단은 아미노산 잔기 PGK로 종결된 완전한 C-말단일 수 있다. C-말단은 C-말단 아미노산 잔기 중 하나 또는 두개가 제거된 단축된 C-말단일 수 있다. 하나의 바람직한 구현예에 있어서, C-말단은 아미노산 잔기 PG 로 종결된 단축된 C-말단이다.

[0520] E) 이중이량체화

[0521] 이중이량체화를 지원하기 위한 CH3-변형에 대한 몇몇 접근법이 예를 들어, 본원에 참고로 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 기술되어 있다.

[0522] 전형적으로, 당분야에 공지된 접근법에서, 제 1 중쇄의 CH3 도메인 및 제 2 중쇄의 CH3 도메인은 둘 모두 하나의 조작된 CH3 도메인을 포함하는 중쇄가 동일 구조의 다른 중쇄와 더 이상 동종이량체화될 수 없도록 상보적인 방식으로 조작된다 (예를 들어, CH3-조작된 제 1 중쇄는 더 이상 다른 CH3-조작된 제 1 중쇄와 동종이량체화될 수 없고, CH3-조작된 제 2 중쇄는 더 이상 다른 CH3-조작된 제 2 중쇄와 동종이량체화될 수 없음). 그리하여, 하나의 조작된 CH3 도메인을 포함하는 중쇄는 상보적인 방식으로 조작된 CH3 도메인을 포함하는 다른 중쇄와 이중이량체화된다. 이러한 구현예의 경우에 있어서, 제 1 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 CH3 도메인 및 제 2 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 CH3 도메인이 아미노산 치환에 의해 상보적인 방식으로 조작되고, 그 결과로 제 1 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드 및 제 2 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드는 이중이량체화되는 반면, 제 1 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드 및 제 2 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드는 더 이상 동종이량체화되지 않는다 (예를 들어, 입체적 이유로).

[0523] 상기에서 인용되고 포함된 당분야에 공지된 중쇄 이중이량체화를 지원하기 위한 상이한 접근법들은, 본원에서 보고되는 바와 같은 이중이량체성/다량체성 폴리펩티드 (예를 들어, 2/3-IgG) 를 제공하는데 사용되는 상이한 대안으로서 고려된다.

[0524] 본원에서 보고되는 바와 같은 2/3-IgG 의 CH3 도메인은 예를 들어, WO 96/027011, [Ridgway, J.B., et al., Protein Eng. 9 (1996) 617-621]; 및 [Merchant, A.M., et al., Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681] 에서 몇가지 예로 상세하게 설명되어 있는 "노브-인투-홀" 기술에 의해 변경될 수 있다. 이러한 방법에서, 2 개의 CH3 도메인의 상호작용 표면은 이들 2 개 CH3 도메인을 함유하는 양 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드 모두의 이중이량체화를 증가시키도록 변경된다. (2 개의 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의) 각각의 2 개의 CH3 도메인은 "노브" 일 수 있는 반면, 나머지는 "홀" 이다. 디설피드 브릿지는 이중이량체를 더욱 안정화시키고 (Merchant, A.M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681; Atwell, S., et al., J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35), 본 발명에 따른 교환 반응에서 수율을 증가시킨다.

[0525] 하나의 바람직한 구현예에 있어서, 본원에서 보고되는 바와 같은 2/3-IgG 는 "노브 사슬" 의 CH3 도메인에 T366W 돌연변이, 및 "홀-사슬" 의 CH3 도메인에 T366S, L368A, Y407V 돌연변이 (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여) 를 포함한다. 또한, CH3 도메인 사이의 추가적인 사슬간 디설피드 브릿지가, 예를 들어 노브 사슬의 CH3 도메인 중 하나에 Y349C 돌연변이, 및 홀 사슬의 CH3 도메인 중 하나에 E356C 돌연변이 또는 S354C 돌연변이를 도입함으로써 사용될 수 있다 (Merchant, A.M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681) (본 발명에 따른 교환 반응에서는 2 개의 다량체가 출발 물질로서 사용되며, 상기 다량체의 CH3 도메인 중 하나만이 추가의 시스테인 잔기를 포함하여, 교환된 생성물에서만 추가의 디설피드 결합이 형성된다). 따라서, 또다른 바람직한 구현예에 있어서, 본원에서 보고되는 바와 같은 2/3-IgG 는 제 1 다량체의 CH3 도메인 중 하나에 Y349C 및 T366W 돌연변이, 및 제 2 다량체의 각각의 상보적인 CH3 도메인에 E356C, T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이를 포함하거나; 또는 본원에서 보고되는 바와 같은 2/3-IgG 는 제 1 다량체의 CH3 도메인 중 하나에 Y349C 및 T366W 돌연변이, 및 제 2 다량체의 각각의 상보적인 CH3 도메인에 S354C, T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이를 포함한다 (하나의 CH3 도메인 내 추가적인 Y349C 돌연변이 및 상응하는 CH3 도메인 내 추가적인 E356C 또는 S354C 돌연변이는 사슬간 디설피드 브릿지를 형성함) (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여).

- [0526] 그러나 또한, EP 1 870 459A1에 기술된 바와 같은 다른 노브-인-홀 기술이 대안적으로 또는 추가적으로 사용될 수 있다. 하나의 구현예에 있어서, 본원에서 보고되는 바와 같은 2/3-IgG 는 "노브 사슬" 의 CH3 도메인에 R409D 및 K370E 돌연변이, 및 "홀-사슬"의 CH3 도메인에 D399K 및 E357K 돌연변이를 포함한다 (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여).
- [0527] 하나의 구현예에 있어서, 본원에서 보고되는 바와 같은 2/3-IgG 는 "노브 사슬" 의 CH3 도메인에 T366W 돌연변이 및 "홀 사슬"의 CH3 도메인에 T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이, 그리고 추가적으로 "노브 사슬" 의 CH3 도메인에 R409D 및 K370E 돌연변이 및 "홀 사슬" 의 CH3 도메인에 D399K 및 E357K 돌연변이를 포함한다 (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여).
- [0528] 하나의 구현예에 있어서, 본원에서 보고되는 바와 같은 2/3-IgG 는 CH3 도메인 중 하나에 Y349C 및 T366W 돌연변이 및 상보적인 CH3 도메인에 S354C, T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이를 포함하거나, 또는 본원에서 보고되는 바와 같은 2/3-IgG 는 CH3 도메인 중 하나에 Y349C 및 T366W 돌연변이 및 상보적인 CH3 도메인에 S354C, T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이, 그리고 추가적으로 "노브 사슬" 의 CH3 도메인에 R409D 및 K370E 돌연변이 및 "홀 사슬" 의 CH3 도메인에 D399K 및 E357K 돌연변이를 포함한다 (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여).
- [0529] "노브-인투-홀 기술" 이외에, 이중이량체화가 강화되도록 2/3-IgG 의 중쇄의 CH3 도메인을 변형시키기 위한 다른 기술이 당분야에 공지되어 있다. 이들 기술은 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 기술된 것들이 본원에서 보고되는 바와 같은 2/3-IgG 와 조합하여 "노브-인투-홀 기술"에 대한 대안으로서 본원에서 고려된다.
- [0530] 본원에서 보고되는 바와 같은 2/3-IgG 의 하나의 구현예에 있어서, EP 1 870 459 A1 에 기술된 접근법을 사용하여 2/3-IgG 의 제 1 중쇄 및 제 2 중쇄의 이중이량체화를 지원한다. 이러한 접근법은 제 1 및 제 2 중쇄 둘 모두 사이의 CH3/CH3-도메인-계면 내 특이적 아미노산 위치에 반대 전하를 갖는 하전된 아미노산의 도입을 기반으로 한다.
- [0531] 따라서, 이러한 구현예는 본원에서 보고되는 바와 같은 2/3-IgG 에 관한 것으로서, 여기에서 다량체의 3차 구조에서 제 1 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 CH3 도메인 및 제 2 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 CH3 도메인은 각각의 CH3 도메인 사이에 위치하는 계면을 형성하고, 제 1 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 CH3 도메인 및 제 2 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 CH3 도메인의 각각의 아미노산 서열은 각각 2/3-IgG 의 3차 구조의 상기 계면 내에 위치하는 아미노산 세트를 포함하며, 하나의 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 CH3 도메인의 계면에 위치하는 아미노산 세트로부터 제 1 아미노산은 양으로 하전된 아미노산으로 치환되고, 다른 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 CH3 도메인의 계면에 위치하는 아미노산 세트로부터 제 2 아미노산은 음으로 하전된 아미노산으로 치환된다. 이러한 구현예에 따른 2/3-IgG 는 본원에서 또한 "CH3(+/-)-조작된 2/3-IgG" 라고 한다 (여기에서 약어 "+/-" 는 각각의 CH3 도메인에 도입된 반대로 하전된 아미노산을 의미함).
- [0532] 본원에서 보고되는 바와 같은 상기 CH3(+/-)-조작된 2/3-IgG 의 하나의 구현예에 있어서, 양으로 하전된 아미노산은 K, R 및 H 에서 선택되고, 음으로 하전된 아미노산은 E 또는 D 에서 선택된다.
- [0533] 본원에서 보고되는 바와 같은 상기 CH3(+/-)-조작된 2/3-IgG 의 하나의 구현예에 있어서, 양으로 하전된 아미노산은 K 및 R 에서 선택되고, 음으로 하전된 아미노산은 E 또는 D 에서 선택된다.
- [0534] 본원에서 보고되는 바와 같은 상기 CH3(+/-)-조작된 2/3-IgG 의 하나의 구현예에 있어서, 양으로 하전된 아미노산은 K 이고, 음으로 하전된 아미노산은 E 이다.
- [0535] 본원에서 보고되는 바와 같은 상기 CH3(+/-)-조작된 2/3-IgG 의 하나의 구현예에 있어서, 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 409 의 아미노산 R 은 D 로 치환되고, 위치 370 의 아미노산 K 는 E 로 치환되며, 다른 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 399 의 아미노산 D 는 K 로 치환되고, 위치 357 의 아미노산 E 는 K 로 치환된다 (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여).
- [0536] 본원에서 보고되는 바와 같은 2/3-IgG 의 하나의 구현예에 있어서, WO 2013/157953 에 기술된 접근법이 2/3-IgG 의 제 1 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드 및 제 2 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 이중이량체화를 지원하는데 사용된다. 본원에서 보고되는 바와 같은 상기 2/3-IgG 의 하나의 구현예에 있어서, 하나의 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 366 의 아미노산 T 는 K 로 치환되고, 다른 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 351 의 아미노산 L 은 D 로 치환된다 (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여). 본원에서 보고되는 바와 같은

상기 2/3-IgG 의 또다른 구현예에 있어서, 하나의 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 366 의 아미노산 T 는 K 로 치환되고, 위치 351 의 아미노산 L 은 K 로 치환되며, 다른 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 351 의 아미노산 L 은 D 로 치환된다 (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여).

[0537] 본원에서 보고되는 바와 같은 상기 2/3-IgG 의 또다른 구현예에 있어서, 하나의 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 366 의 아미노산 T 는 K 로 치환되고, 위치 351 의 아미노산 L 은 K 로 치환되며, 다른 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 351 의 아미노산 L 은 D 로 치환된다 (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여). 추가로, 하기의 치환 중 하나 이상은 다른 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 CH3 도메인에 포함된다: 위치 349 의 아미노산 Y 는 E 로 치환되고, 위치 349 의 아미노산 Y 는 D 로 치환되며, 위치 368 의 아미노산 L 은 E 로 치환된다 (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여). 하나의 구현예에 있어서, 위치 368 의 아미노산 L 은 E 로 치환된다 (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여).

[0538] 본원에서 보고되는 바와 같은 2/3-IgG 의 하나의 구현예에 있어서, WO 2012/058768 에 기술된 접근법이 2/3-IgG 의 제 1 Fc-영역 폴리펩티드 및 제 2 Fc-영역 폴리펩티드의 이중이량체화를 지원하는데 사용된다. 본원에서 보고되는 바와 같은 상기 2/3-IgG 의 하나의 구현예에 있어서, 하나의 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 351 의 아미노산 L 은 Y 로 치환되고, 위치 407 의 아미노산 Y 는 A 로 치환되며, 다른 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 366 의 아미노산 T 는 A 로 치환되고, 위치 409 의 아미노산 K 는 F 로 치환된다 (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여). 또다른 구현예에 있어서, 상기에서 언급한 치환 이외에, 다른 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 411 (본래 T), 399 (본래 D), 400 (본래 S), 405 (본래 F), 390 (본래 N) 및 392 (본래 K) 의 아미노산 중 하나 이상은 치환된다 (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여). 바람직한 치환은 다음과 같다:

[0539] - 위치 411 의 아미노산 T 를 N, R, Q, K, D, E 및 W 에서 선택되는 아미노산으로 치환 (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여);

[0540] - 위치 399 의 아미노산 D 를 R, W, Y, 및 K 에서 선택되는 아미노산으로 치환 (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여);

[0541] - 위치 400 의 아미노산 S 를 E, D, R 및 K 에서 선택되는 아미노산으로 치환 (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여);

[0542] - 위치 405 의 아미노산 F 를 I, M, T, S, V 및 W 에서 선택되는 아미노산으로 치환 (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여);

[0543] - 위치 390 의 아미노산 N 을 R, K 및 D 에서 선택되는 아미노산으로 치환 (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여); 및

[0544] - 위치 392 의 아미노산 K 를 V, M, R, L, F 및 E 에서 선택되는 아미노산으로 치환 (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여).

[0545] 본원에서 보고되는 바와 같은 상기 2/3-IgG (WO 2012/058768 에 따라서 조작됨) 의 또다른 구현예에 있어서, 하나의 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 351 의 아미노산 L 은 Y 로 치환되고, 위치 407 의 아미노산 Y 는 A 로 치환되며, 다른 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 366 의 아미노산 T 는 V 로 치환되고, 위치 409 의 아미노산 K 는 F 로 치환된다 (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여). 본원에서 보고되는 바와 같은 상기 2/3-IgG 의 또다른 구현예에 있어서, 하나의 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 407 의 아미노산 Y 는 A 로 치환되고, 다른 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 366 의 아미노산 T 는 A 로 치환되며, 위치 409 의 아미노산 K 는 F 로 치환된다 (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여). 상기 마지막 언급한 구현예에 있어서, 상기 다른 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 392 의 아미노산 K 는 E 로 치환되고, 위치 411 의 아미노산 T 는 E 로 치환되며, 위치 399 의 아미노산 D 는 R 로 치환되고, 위치 400 의 아미노산 S 는 R 로 치환된다 (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여).

[0546] 본원에서 보고되는 바와 같은 2/3-IgG 의 하나의 구현예에 있어서, WO 2011/143545 에 기술된 접근법이 2/3-IgG 의 제 1 Fc-영역 폴리펩티드 및 제 2 Fc-영역 폴리펩티드의 이중이량체화를 지원하는데 사용된다. 본원에서 보고되는 바와 같은 상기 2/3-IgG 의 하나의 구현예에 있어서, 둘 모두의 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 CH3 도메인 내 아미노산 변형은 위치 368 및/또는 409 에 도입된다 (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여).

[0547] 본원에서 보고되는 바와 같은 2/3-IgG 의 하나의 구현예에 있어서, WO 2011/090762 에 기술된 접근법이 2/3-IgG

의 제 1 Fc-영역 폴리펩티드 및 제 2 Fc-영역 폴리펩티드의 이중이량체화를 지원하는데 사용된다. WO 2011/090762 는 "노브-인트루-홀" 기술에 따른 아미노산 변형에 관한 것이다. 본원에서 보고되는 바와 같은 상기 CH3(KiH)-조작된 2/3-IgG 의 하나의 구현예에 있어서, 하나의 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 366 의 아미노산 T 는 W 로 치환되고, 다른 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 407 의 아미노산 Y 는 A 로 치환된다 (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여). 본원에서 보고되는 바와 같은 상기 CH3(KiH)-조작된 2/3-IgG 의 또다른 구현예에 있어서, 하나의 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 366 의 아미노산 T 는 Y 로 치환되고, 다른 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 407 의 아미노산 Y 는 T 로 치환된다 (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여).

[0548] IgG2 이소타입인, 본원에서 보고되는 바와 같은 2/3-IgG 의 하나의 구현예에 있어서, WO 2011/090762 에 기술된 접근법이 2/3-IgG 의 제 1 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드 및 제 2 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 이중이량체화를 지원하는데 사용된다.

[0549] 본원에서 보고되는 바와 같은 2/3-IgG 의 하나의 구현예에 있어서, WO 2007/147901 에 기술된 접근법이 2/3-IgG 의 제 1 Fc-영역 폴리펩티드 및 제 2 Fc-영역 폴리펩티드의 이중이량체화를 지원하는데 사용된다. 본원에서 보고되는 바와 같은 상기 2/3-IgG 의 하나의 구현예에 있어서, 하나의 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 253 의 아미노산 K 는 E 로 치환되고, 위치 282 의 아미노산 D 는 K 로 치환되며, 위치 322 의 아미노산 K 는 D 로 치환되고, 다른 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 CH3 도메인에서 위치 239 의 아미노산 D 는 K 로 치환되며, 위치 240 의 아미노산 E 는 K 로 치환되고, 위치 292 의 아미노산 K 는 D 로 치환된다 (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여).

[0550] 본원에서 보고되는 바와 같은 2/3-IgG 의 하나의 구현예에 있어서, WO 2007/110205 에 기술된 접근법이 2/3-IgG 의 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드의 이중이량체화를 지원하는데 사용된다.

[0551] 본원에서 보고되는 바와 같은 모든 양태의 하나의 구현예에 있어서, 2/3-IgG 는 IgG 유형 항체의 불변 도메인 구조를 가진다. 본원에서 보고되는 바와 같은 모든 양태의 하나의 또다른 구현예에 있어서, 2/3-IgG 는 상기 2/3-IgG 가 인간 서브클래스 IgG1 의 Fc-영역, 또는 돌연변이 L234A 및 L235A 및 임의로 P329G 를 갖는 인간 서브클래스 IgG1 의 Fc-영역을 포함하는 것을 특징으로 한다. 본원에서 보고되는 바와 같은 모든 양태의 하나의 또다른 구현예에 있어서, 2/3-IgG 는 상기 2/3-IgG 가 인간 서브클래스 IgG2 의 Fc-영역을 포함하는 것을 특징으로 한다. 본원에서 보고되는 바와 같은 모든 양태의 하나의 또다른 구현예에 있어서, 2/3-IgG 는 상기 2/3-IgG 가 인간 서브클래스 IgG3 의 Fc-영역을 포함하는 것을 특징으로 한다. 본원에서 보고되는 바와 같은 모든 양태의 하나의 또다른 구현예에 있어서, 2/3-IgG 는 상기 2/3-IgG 가 인간 서브클래스 IgG4 의 Fc-영역, 또는 추가의 돌연변이 S228P 및 L235E 및 임의로 P329G 를 갖는 인간 서브클래스 IgG4 의 Fc-영역을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0552] 모든 양태의 하나의 구현예에 있어서, 2/3-IgG 는 제 1 Fc-영역 폴리펩티드 및 제 2 Fc-영역 폴리펩티드를 포함하고, 여기에서,

[0553] i) 제 1 및 제 2 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 Y436A 를 포함하거나, 또는

[0554] ii) 제 1 및 제 2 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 I253A, H310A 및 H435A 를 포함하거나, 또는

[0555] iii) 제 1 및 제 2 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 H310A, H433A 및 Y436A 를 포함하거나, 또는

[0556] iv) 제 1 및 제 2 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 L251D, L314D 및 L432D 를 포함하거나, 또는

[0557] v) 제 1 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 Y436A 를 포함하고, 제 2 Fc-영역 폴리펩티드는

[0558] a) 돌연변이 I253A, H310A 및 H435A, 또는

[0559] b) 돌연변이 H310A, H433A 및 Y436A, 또는

[0560] c) 돌연변이 L251D, L314D 및 L432D

[0561] 를 포함하거나, 또는

[0562] vi) 제 1 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 I253A, H310A 및 H435A 를 포함하고, 제 2 Fc-영역 폴리펩티드는

[0563] a) 돌연변이 H310A, H433A 및 Y436A, 또는

- [0564] b) 돌연변이 L251D, L314D 및 L432D
- [0565] 를 포함하거나, 또는
- [0566] vii) 제 1 Fc-영역 폴리펩티드는 돌연변이 H310A, H433A 및 Y436A 를 포함하고, 제 2 Fc-영역 폴리펩티드는
- [0567] a) 돌연변이 L251D, L314D 및 L432D
- [0568] 를 포함한다.
- [0569] III. 본 발명의 구현예의 예시적인 세트
- [0570] 본 발명의 구현예의 제 1 의 예시적인 세트:
- [0571] 1. 하기의 단계를 포함하는 다량체성 폴리펩티드의 제조 방법:
- [0572] - 모두 면역글로불린 G CH3 도메인을 포함하는 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드를 포함하는 제 1 다량체성 폴리펩티드,
- [0573] 여기에서, i) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하며, 또는 ii) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,
- [0574] 여기에서, 제 1 폴리펩티드는 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 결합 부위의 적어도 일부를 포함함,
- [0575] 여기에서, 제 2 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 제 1 교란 돌연변이를 포함하고, 이로써 제 1 폴리펩티드는 제 1 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 각각의 야생형 면역글로불린 G 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 각각의 면역글로불린 G 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함함,
- [0576] 여기에서, 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드는 이량체임,
- [0577] 및
- [0578] 모두 면역글로불린 G CH3 도메인을 포함하는 제 3 폴리펩티드 및 제 4 폴리펩티드를 포함하는 제 2 다량체성 폴리펩티드,
- [0579] 여기에서, i) 제 3 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 4 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하며, 또는 ii) 제 3 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 4 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하며, 이로써 i) 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드는 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 ii) 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드는 돌연변이 홀을 포함함,
- [0580] 여기에서, 제 4 폴리펩티드는 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 결합 부위의 적어도 일부를 포함함,
- [0581] 여기에서, 제 3 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 제 2 교란 돌연변이를 포함하고, 이로써 제 4 폴리펩티드는 제 2 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 각각의 야생형 면역글로불린 G 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 각각의 면역글로불린 G 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함함,
- [0582] 여기에서, 제 2 교란 돌연변이는 제 1 교란 돌연변이와 상이한 위치에 있음,
- [0583] 여기에서, 제 3 폴리펩티드 및 제 4 폴리펩티드는 이량체임,
- [0584] 여기에서, 제 2 폴리펩티드에서의 제 1 교란 돌연변이 및 제 3 폴리펩티드에서의 제 2 교란 돌연변이는 제 2 폴리펩티드 및 제 3 폴리펩티드가 이중이량체를 형성할 때, 인력 상호 작용을 야기함,
- [0585] 를 배양하는 단계,
- [0586] 및
- [0587] - 제 1 폴리펩티드 및 제 4 폴리펩티드를 포함하는 결합제를 회수하여, (다중특이적) 결합제를 제조하는 단계.
- [0588] 2. 구현예 1 에 있어서, 제 1 내지 제 4 폴리펩티드가 각각 N-말단에서 C-말단 방향으로 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인 및 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인을 포함하는 방법.
- [0589] 3. 구현예 1 내지 2 중 어느 하나에 있어서, 제 1 내지 제 4 폴리펩티드가 각각 N-말단에서 C-말단 방향으로 i)

서로 독립적으로 아미노산 서열 DKTHTCPPC (SEQ ID NO: 65) 또는 아미노산 서열 DKHTSPPS (SEQ ID NO: 66),
ii) IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 iii) IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인을 포함하는 방법.

- [0590] 4. 구현예 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, i) 제 1 및 제 4 폴리펩티드가 각각 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 CH1 도메인 및 가변 도메인을 추가로 포함하고, 또는 ii) 제 1 또는 제 4 폴리펩티드가 IgG1 CH1 도메인으로부터 유래된 CH1 도메인을 포함하며, 다른 폴리펩티드가 경쇄 불변 도메인으로부터 유래된 도메인을 포함하고, 각각의 폴리펩티드가 가변 도메인을 추가로 포함하는 방법.
- [0591] 5. 구현예 4 에 있어서, 제 1 폴리펩티드의 가변 도메인이 중쇄 가변 도메인이고, 제 4 폴리펩티드의 가변 도메인이 경쇄 가변 도메인이거나, 또는 그 반대이며, 제 1 및 제 4 폴리펩티드가 이량체를 형성할 때, 이들 도메인이 결합 부위를 형성하는 방법.
- [0592] 6. 구현예 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 제 1 및 제 4 폴리펩티드가 N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 서로 독립적으로 선택되는 방법:
- [0593] i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0594] ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [0595] iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 중쇄 가변 도메인,
- [0596] iv) scFv, 임의로 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0597] v) scFab, 임의로 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0598] vi) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,
- [0599] vii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- [0600] viii) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [0601] ix) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- [0602] x) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,
- [0603] xi) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- [0604] xii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 경쇄 가변 도메인,
- [0605] xiii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [0606] xiv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2

중쇄 가변 도메인, 및 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인,

- [0607] xv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인, 및
- [0608] xvi) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 제 2 펩티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분은 표적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성함.
- [0609] 7. 구현예 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, 제 1 및 제 2 결합제가 항체 경쇄를 추가로 포함하는 방법.
- [0610] 8. 구현예 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서,
- [0611] 제 1 결합제가
- [0612] 제 1 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [0613] i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0614] ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [0615] iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 중쇄 가변 도메인,
- [0616] iv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [0617] v) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 CH1 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- [0618] vi) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,
- [0619] vii) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- [0620] viii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 경쇄 가변 도메인,
- [0621] ix) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [0622] x) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인,
- [0623] xi) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- [0624] xii) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 제 2 펩티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분은 표

적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성함,

- [0625] 돌연변이 노브 또는 돌연변이 홀을 포함함,
- [0626] 및
- [0627] 제 2 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [0628] SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0629] 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우 돌연변이 홀을 포함함,
- [0630] E345R, Q347K, Y349W, Y349E, L351F, L351Y, S354E, S354V, D356S, D356A, D356K, E357S, E357A, E357L, E357F, E357K, K360S, K360E, Q362E, S364V, S364L, T366I, L368F, L368V, K370E, N390E, K392E, K392D, T394I, V397Y, D399A, D399K, S400K, D401R, F405W, Y407W, Y407L, Y407I, K409D, K409E, K409I, K439E, L441Y, C349Y, S366T, A368L, V407Y, C354S, 및 W366T 로 이루어진 돌연변이의 군에서 선택되는 교란 돌연변이를 포함하고, 이로써 제 1 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 야생형 면역글로불린 IgG1 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 인간 면역글로불린 IgG1 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함함,
- [0631] 여기에서, 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드는 이량체임,
- [0632] 및
- [0633] 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 포함하는 제 3 폴리펩티드,
- [0634] 여기에서, 상기 제 3 폴리펩티드는 디설피드 결합에 의해 제 1 폴리펩티드에 공유 결합됨,
- [0635] 를 포함하고,
- [0636] 제 2 결합제가
- [0637] 제 4 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [0638] SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0639] 제 2 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 제 2 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우 돌연변이 홀을 포함함,
- [0640] E345R, Q347K, Y349W, Y349E, L351F, L351Y, S354E, S354V, D356S, D356A, D356K, E357S, E357A, E357L, E357F, E357K, K360S, K360E, Q362E, S364V, S364L, T366I, L368F, L368V, K370E, N390E, K392E, K392D, T394I, V397Y, D399A, D399K, S400K, D401R, F405W, Y407W, Y407L, Y407I, K409D, K409E, K409I, K439E, L441Y, C349Y, S366T, A368L, V407Y, C354S, 및 W366T 로 이루어진 돌연변이의 군에서 선택되는 제 2 교란 돌연변이를 포함하고, 이로써 제 5 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 야생형 IgG1 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 인간 IgG1 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함하며, 이로써 제 4 폴리펩티드에서의 교란 돌연변이는 제 2 폴리펩티드에서의 교란 돌연변이와 상이한 위치에 있음,
- [0641] 및
- [0642] 제 5 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [0643] i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0644] ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [0645] iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 중쇄 가변 도메인,
- [0646] iv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2

도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,

- [0647] v) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- [0648] vi) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,
- [0649] vii) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- [0650] viii) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 경쇄 가변 도메인,
- [0651] ix) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [0652] x) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인,
- [0653] xi) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인, 및
- [0654] xii) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 제 2 펩티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분은 표적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성함,
- [0655] 제 4 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 제 4 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우 돌연변이 홀을 포함함,
- [0656] 여기에서, 제 4 폴리펩티드 및 제 5 폴리펩티드는 이량체임,
- [0657] 및
- [0658] 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 포함하는 제 6 폴리펩티드,
- [0659] 여기에서, 상기 제 6 폴리펩티드는 디설피드 결합에 의해 제 4 폴리펩티드에 공유 결합됨,
- [0660] 를 포함하는 방법.
- [0661] 9. 구현예 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 배양 단계가 환원제의 존재하에 있는 방법.
- [0662] 10. 구현예 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, i) 제 2 폴리펩티드 및 제 3 폴리펩티드, 또는 ii) 제 2 폴리펩티드 및 제 5 폴리펩티드가 (C-말단) 태그를 추가로 포함하는 방법.
- [0663] 11. 구현예 10 에 있어서, 태그가 아미노산 서열 HHHHHH (SEQ ID NO: 67) 또는 HHHHHHHH (SEQ ID NO: 68) 를 가지며, 회수가 금속 (니켈) 킬레이트 친화성 크로마토그래피 컬럼 상에서의 크로마토그래피에 의하는 방법.
- [0664] 12. 하기의 단계를 포함하는 결합제 조합의 식별 방법:
- [0665] - 제 1 의 다수의 결합제에서 선택되는 제 1 결합제 및 제 2 의 다수의 결합제에서 선택되는 제 2 결합제의 각각의 조합을 구현예 1 내지 11 중 어느 하나에 따른 방법에 적용하여 다수의 결합제를 제조하는 단계,
- [0666] - 제조된 다수의 결합제의 각각의 결합제의 2 개 이상의 항원에 대한 동시 결합을 ELISA 분석에서 개별적으로 측정하는 단계, 및

- [0667] - ELISA 의 결과에 기초하여 다수의 결합체로부터 결합체를 선택함으로써 결합체 조합을 식별하는 단계.
- [0668] 13. 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드를 포함하는 다량체성 폴리펩티드:
- [0669] 여기에서, 두 폴리펩티드는 인간 면역글로불린 CH3 도메인을 포함함,
- [0670] 여기에서, i) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하며, 또는 ii) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,
- [0671] 여기에서, 제 1 폴리펩티드는 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 결합 부위의 적어도 일부를 포함함,
- [0672] 여기에서, 제 2 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 하나 이상의 교란 돌연변이를 포함하고, 이로써 제 1 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 각각의 야생형 면역글로불린 G 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 각각의 면역글로불린 G 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함함,
- [0673] 여기에서, 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드는 이량체임.
- [0674] 14. 제 13 항에 있어서,
- [0675] 제 1 폴리펩티드가 N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [0676] i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0677] ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [0678] iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 중쇄 가변 도메인,
- [0679] iv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [0680] v) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- [0681] vi) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,
- [0682] vii) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- [0683] viii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 경쇄 가변 도메인,
- [0684] ix) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [0685] x) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인,
- [0686] xi) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인, 및
- [0687] xii) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1

CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 제 2 펩티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분은 표적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성함,

[0688] 및 돌연변이 노브 또는 돌연변이 홀을 포함함,

[0689] 이고,

[0690] 제 2 폴리펩티드가 N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:

[0691] SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 돌연변이 노브 또는 돌연변이 홀을 포함하는 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,

[0692] E345R, Q347K, Y349W, Y349E, L351F, L351Y, S354E, S354V, D356S, D356A, D356K, E357S, E357A, E357L, E357F, E357K, K360S, K360E, Q362E, S364V, S364L, T366I, L368F, L368V, K370E, N390E, K392E, K392D, T394I, V397Y, D399A, D399K, S400K, D401R, F405W, Y407W, Y407L, Y407I, K409D, K409E, K409I, K439E, L441Y, C349Y, S366T, A368L, V407Y, C354S, 및 W366T 로 이루어진 돌연변이의 군에서 선택되는 교란 돌연변이를 포함하고, 이로써 제 1 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 각각의 야생형 번역글로불린 IgG1 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 각각의 번역글로불린 IgG1 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함함,

[0693] 이며,

[0694] 디설피드 결합에 의해 제 1 폴리펩티드에 공유 결합된, 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 포함하는 제 3 폴리펩티드인

[0695] 다량체성 폴리펩티드.

[0696] 15. 다음을 포함하는 조성물:

[0697] 다음을 포함하는 제 1 이중삼량체성 폴리펩티드:

[0698] 제 1 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:

[0699] i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,

[0700] ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인,

[0701] iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 중쇄 가변 도메인,

[0702] iv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,

[0703] v) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인,

[0704] vi) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,

[0705] vii) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,

[0706] viii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 경쇄 가변 도메인,

[0707] ix) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인

인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,

- [0708] x) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인,
- [0709] xi) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인, 및
- [0710] xii) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 제 2 펩티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분은 표적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성함,
- [0711] 돌연변이 노브 또는 돌연변이 홀을 포함함,
- [0712] 및
- [0713] 제 2 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [0714] SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0715] 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우 돌연변이 홀을 포함함,
- [0716] E345R, Q347K, Y349W, Y349E, L351F, L351Y, S354E, S354V, D356S, D356A, D356K, E357S, E357A, E357L, E357F, E357K, K360S, K360E, Q362E, S364V, S364L, T366I, L368F, L368V, K370E, N390E, K392E, K392D, T394I, V397Y, D399A, D399K, S400K, D401R, F405W, Y407W, Y407L, Y407I, K409D, K409E, K409I, K439E, L441Y, C349Y, S366T, A368L, V407Y, C354S, 및 W366T 로 이루어진 돌연변이의 군에서 선택되는 교란 돌연변이를 포함하고, 이로써 제 1 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 각각의 야생형 면역글로불린 IgG1 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 각각의 면역글로불린 IgG1 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함함,
- [0717] 및
- [0718] 제 3 폴리펩티드로서, 디설피드 결합에 의해 제 1 폴리펩티드에 공유 결합된, 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 포함하는 폴리펩티드,
- [0719] 및
- [0720] 다음을 포함하는 제 2 이중삼량체성 폴리펩티드:
- [0721] 제 4 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [0722] SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0723] 제 1 이중삼량체의 제 2 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 제 1 이중삼량체의 제 2 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우 돌연변이 홀을 포함함,
- [0724] E345R, Q347K, Y349W, Y349E, L351F, L351Y, S354E, S354V, D356S, D356A, D356K, E357S, E357A, E357L, E357F, E357K, K360S, K360E, Q362E, S364V, S364L, T366I, L368F, L368V, K370E, N390E, K392E, K392D, T394I, V397Y, D399A, D399K, S400K, D401R, F405W, Y407W, Y407L, Y407I, K409D, K409E, K409I, K439E, L441Y, C349Y, S366T, A368L, V407Y, C354S, 및 W366T 로 이루어진 돌연변이의 군에서 선택되는 제 2 교란 돌연변이를 포함하고, 이로써 제 5 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 각각의 야생형 면역글로불린 IgG1 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 각각의 면역글로불린 IgG1 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함하며, 이로써 제 4 폴리펩티드에서의 교란 돌연변이는 제 2 폴리펩티드에서의 교란 돌연변

이와 상이한 위치에 있음,

- [0725] 및
- [0726] 제 5 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [0727] i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0728] ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [0729] iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 중쇄 가변 도메인,
- [0730] iv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [0731] v) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- [0732] vi) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,
- [0733] vii) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- [0734] viii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 경쇄 가변 도메인,
- [0735] ix) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [0736] x) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인,
- [0737] xi) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인, 및
- [0738] xii) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 제 2 펩티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분은 표적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성함,
- [0739] 제 1 (제 4) 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 제 1 (제 4) 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우 돌연변이 홀을 포함함,
- [0740] 및
- [0741] 제 6 폴리펩티드로서, 디설피드 결합에 의해 제 4 폴리펩티드에 공유 결합된, 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 포함하는 폴리펩티드,
- [0742] 여기에서, i) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하며, 또는 ii) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하며, i) 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드

는 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 ii) 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드는 돌연변이 홀을 포함함,

[0743] 여기에서, 제 2 및 제 4 폴리펩티드는 동일한 위치에 교란 돌연변이를 포함하지 않음.

[0744] 본 발명의 구현예의 제 2 의 예시적인 세트:

[0745] 1. 하기의 단계를 포함하는 다량체성 폴리펩티드의 제조 방법:

[0746] - 모두 번역글로불린 G CH3 도메인을 포함하는 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드를 포함하는 제 1 다량체성 출발 폴리펩티드, 여기에서,

[0747] a-1) i) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브-cys 를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하며, 또는 ii) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀-cys 를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,

[0748] b-1) 제 1 폴리펩티드는 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 결합 부위의 적어도 일부를 포함함,

[0749] c-1) 제 2 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 a-1) 하의 돌연변이와 상이한 제 1 교란 돌연변이를 포함하고, 이로써 제 1 폴리펩티드는 제 1 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 각각의 야생형 번역글로불린 G 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 각각의 번역글로불린 G 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함함,

[0750] d-1) 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드는 이량체를 형성함,

[0751] 및

[0752] 모두 번역글로불린 G CH3 도메인을 포함하는 제 3 폴리펩티드 및 제 4 폴리펩티드를 포함하는 제 2 다량체성 출발 폴리펩티드, 여기에서,

[0753] a-2) i) 제 3 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 4 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀-cys 를 포함하며, 또는 ii) 제 3 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 4 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브-cys 를 포함하며, 이로써 i) 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀-cys 를 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드는 돌연변이 노브-cys 를 포함하고, 또는 ii) 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브-cys 를 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드는 돌연변이 홀-cys 를 포함함,

[0754] b-2) 제 4 폴리펩티드는 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 결합 부위의 적어도 일부를 포함함,

[0755] c-2) 제 3 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 a-2) 하의 돌연변이와 상이한 제 2 교란 돌연변이를 포함하고, 이로써 제 4 폴리펩티드는 제 2 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 각각의 야생형 번역글로불린 G 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 각각의 번역글로불린 G 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함함,

[0756] d-2) 제 2 교란 돌연변이는 제 1 교란 돌연변이와 상이한 위치에 있음,

[0757] e-2) 제 3 폴리펩티드 및 제 4 폴리펩티드는 이량체를 형성함,

[0758] f-2) 제 2 폴리펩티드에서의 제 1 교란 돌연변이 및 제 3 폴리펩티드에서의 제 2 교란 돌연변이는 제 2 폴리펩티드 및 제 3 폴리펩티드가 이종이량체를 형성할 때, 인력 상호 작용을 야기함 (야기하도록 설계됨),

[0759] 를 배양하는 단계,

[0760] 및

[0761] - 제 1 폴리펩티드 및 제 4 폴리펩티드를 포함하는 다량체성 폴리펩티드를 회수하여, 다량체성 폴리펩티드를 제조하는 단계,

[0762] Kabat EU 지수에 따른 번호 부여를 가짐.

[0763] 2. 구현예 1 에 있어서, 제 1 교란 돌연변이가 E357K 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 370 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하며, 제 2 교란 돌연변이가 K370E 이고, 제 4 폴리펩티드가 위치 357 에서 아미노산 잔기 E 를 포함하는 방법.

[0764] 3. 구현예 1 에 있어서, 제 1 교란 돌연변이가 D356K 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 439 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하며, 제 2 교란 돌연변이가 K439E 이고, 제 4 폴리펩티드가 위치 356 에서 아미노산 잔기 D 를 포함하

는 방법.

[0765] 4. 하기의 단계를 포함하는 다량체성 폴리펩티드의 제조 방법:

[0766] - 모두 번역글로불린 G CH3 도메인을 포함하는 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드를 포함하는 제 1 다량체성 출발 폴리펩티드, 여기에서,

[0767] a-1) i) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하며, 또는 ii) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,

[0768] b-1) 제 1 폴리펩티드는 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 결합 부위의 적어도 일부를 포함함,

[0769] c-1) 제 2 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 a-1) 하의 돌연변이와 상이한 제 1 교란 돌연변이를 포함하고, 이로써 제 1 폴리펩티드는 제 1 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 각각의 야생형 번역글로불린 G 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 각각의 번역글로불린 G 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함함,

[0770] d-1) 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드는 이량체를 형성함,

[0771] e-1) 제 1 폴리펩티드는 힌지 영역에서 IgG1 야생형 아미노산 서열 HTCPCP (SEQ ID NO: 31) 대신 아미노산 서열 HTSPSP (SEQ ID NO: 85) 를 포함함,

[0772] 및

[0773] 모두 번역글로불린 G CH3 도메인을 포함하는 제 3 폴리펩티드 및 제 4 폴리펩티드를 포함하는 제 2 다량체성 출발 폴리펩티드, 여기에서,

[0774] a-2) i) 제 3 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 4 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하며, 또는 ii) 제 3 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 4 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하며, 이로써 i) 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드는 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 ii) 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드는 돌연변이 홀을 포함함,

[0775] b-2) 제 4 폴리펩티드는 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 결합 부위의 적어도 일부를 포함함,

[0776] c-2) 제 3 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 a-2) 하의 돌연변이와 상이한 제 2 교란 돌연변이를 포함하고, 이로써 제 4 폴리펩티드는 제 2 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 각각의 야생형 번역글로불린 G 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 각각의 번역글로불린 G 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함함,

[0777] d-2) 제 2 교란 돌연변이는 제 1 교란 돌연변이와 상이한 위치에 있음,

[0778] e-2) 제 3 폴리펩티드 및 제 4 폴리펩티드는 이량체를 형성함,

[0779] f-2) 제 2 폴리펩티드에서의 제 1 교란 돌연변이 및 제 3 폴리펩티드에서의 제 2 교란 돌연변이는 제 2 폴리펩티드 및 제 3 폴리펩티드가 이중이량체를 형성할 때, 인력 상호 작용을 야기함,

[0780] g-2) 제 2 폴리펩티드는 IgG1 야생형 힌지 영역 아미노산 서열 HTCPCP (SEQ ID NO: 31) 대신 아미노산 서열 HTSPSP (SEQ ID NO: 85) 를 포함하고, 또는 IgG1 야생형 힌지 영역 서열 HTCPCPAPE (SEQ ID NO: 90) 대신 아미노산 서열 HTPAPE (SEQ ID NO: 85) 를 포함함,

[0781] 를 배양하는 단계,

[0782] 및

[0783] - 제 1 폴리펩티드 및 제 4 폴리펩티드를 포함하는 다량체성 폴리펩티드를 회수하여, 다량체성 폴리펩티드를 제조하는 단계,

[0784] Kabat EU 지수에 따른 번호 부여를 가짐.

[0785] 5. 구현예 4 에 있어서, 제 1 교란 돌연변이가 E357K 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 370 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하며, 제 2 교란 돌연변이가 K370E 이고, 제 4 폴리펩티드가 위치 357 에서 아미노산 잔기 E 를 포함하는 방법.

[0786] 6. 구현예 4 에 있어서, 제 1 교란 돌연변이가 D356K 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 439 에서 아미노산 잔기 K

를 포함하며, 제 2 교란 돌연변이가 K439E 이고, 제 4 폴리펩티드가 위치 356 에서 아미노산 잔기 D 를 포함하는 방법.

[0787] 7. 하기의 단계를 포함하는 다량체성 폴리펩티드의 제조 방법:

[0788] - 모두 번역글로불린 G CH3 도메인을 포함하는 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드를 포함하는 제 1 다량체성 출발 폴리펩티드, 여기에서,

[0789] a-1) i) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하며, 또는 ii) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,

[0790] b-1) 제 1 폴리펩티드는 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 결합 부위의 적어도 일부를 포함함,

[0791] c-1) 제 2 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 제 1 교란 돌연변이로서 돌연변이 E357K 를 포함하고, 제 1 폴리펩티드는 위치 370 에서 아미노산 잔기 K 를 포함함,

[0792] d-1) 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드는 이량체를 형성함,

[0793] 및

[0794] 모두 번역글로불린 G CH3 도메인을 포함하는 제 3 폴리펩티드 및 제 4 폴리펩티드를 포함하는 제 2 다량체성 출발 폴리펩티드, 여기에서,

[0795] a-2) i) 제 3 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 4 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하며, 또는 ii) 제 3 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 4 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하며, 이로써 i) 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드는 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 ii) 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드는 돌연변이 홀을 포함함,

[0796] b-2) 제 4 폴리펩티드는 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 결합 부위의 적어도 일부를 포함함,

[0797] c-2) 제 3 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 제 2 교란 돌연변이로서 돌연변이 K370E 를 포함하고, 제 4 폴리펩티드는 위치 357 에서 아미노산 잔기 E 를 포함함,

[0798] d-2) 제 3 폴리펩티드 및 제 4 폴리펩티드는 이량체를 형성함,

[0799] f-2) 제 2 폴리펩티드에서의 제 1 교란 돌연변이 및 제 3 폴리펩티드에서의 제 2 교란 돌연변이는 제 2 폴리펩티드 및 제 3 폴리펩티드가 이중이량체를 형성할 때, 인력 상호 작용을 야기함,

[0800] 를 배양하는 단계,

[0801] 및

[0802] - 제 1 폴리펩티드 및 제 4 폴리펩티드를 포함하는 다량체성 폴리펩티드를 회수하여, 다량체성 폴리펩티드를 제조하는 단계,

[0803] Kabat EU 지수에 따른 번호 부여를 가짐.

[0804] 8. 하기의 단계를 포함하는 다량체성 폴리펩티드의 제조 방법:

[0805] - 모두 번역글로불린 G CH3 도메인을 포함하는 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드를 포함하는 제 1 다량체성 출발 폴리펩티드, 여기에서,

[0806] a-1) i) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하며, 또는 ii) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,

[0807] b-1) 제 1 폴리펩티드는 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 결합 부위의 적어도 일부를 포함함,

[0808] c-1) 제 2 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 제 1 교란 돌연변이로서 돌연변이 D356K 를 포함하고, 제 1 폴리펩티드는 위치 439 에서 아미노산 잔기 K 를 포함함,

[0809] d-1) 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드는 이량체를 형성함,

- [0810] 및
- [0811] 모두 면역글로불린 G CH3 도메인을 포함하는 제 3 폴리펩티드 및 제 4 폴리펩티드를 포함하는 제 2 다량체성 출발 폴리펩티드, 여기에서,
- [0812] a-2) i) 제 3 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 4 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하며, 또는 ii) 제 3 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 4 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하며, 이로써 i) 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드는 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 ii) 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드는 돌연변이 홀을 포함함,
- [0813] b-2) 제 4 폴리펩티드는 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 결합 부위의 적어도 일부를 포함함,
- [0814] c-2) 제 3 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 제 2 교란 돌연변이로서 돌연변이 K439E 를 포함하고, 제 4 폴리펩티드는 위치 356 에서 아미노산 잔기 D 를 포함함,
- [0815] d-2) 제 3 폴리펩티드 및 제 4 폴리펩티드는 이량체를 형성함,
- [0816] e-2) 제 2 폴리펩티드에서의 제 1 교란 돌연변이 및 제 3 폴리펩티드에서의 제 2 교란 돌연변이는 제 2 폴리펩티드 및 제 3 폴리펩티드가 이중이량체를 형성할 때, 인력 상호 작용을 야기함,
- [0817] 를 배양하는 단계,
- [0818] 및
- [0819] - 제 1 폴리펩티드 및 제 4 폴리펩티드를 포함하는 다량체성 폴리펩티드를 회수하여, 다량체성 폴리펩티드를 제조하는 단계,
- [0820] Kabat EU 지수에 따른 번호 부여를 가짐.
- [0821] 9. 구현예 4 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하고, 제 2 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하며, 제 3 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하고, 제 4 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 방법.
- [0822] 10. 구현예 4 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브-cys 를 포함하고, 제 2 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하며, 제 3 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하고, 제 4 폴리펩티드가 돌연변이 홀-cys 를 포함하는 방법.
- [0823] 11. 구현예 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 제 1 내지 제 4 폴리펩티드가 각각 N-말단에서 C-말단 방향으로 IgG1 CH2 도메인 및 IgG1 CH3 도메인을 포함하는 방법.
- [0824] 12. 구현예 1 내지 3 및 7 내지 11 중 어느 하나에 있어서, 제 1 내지 제 4 폴리펩티드가 각각 N-말단에서 C-말단 방향으로 i) 서로 독립적으로 아미노산 서열 DKTHCPCPC (SEQ ID NO: 65) 또는 아미노산 서열 DKHTSPPS (SEQ ID NO: 66) 또는 아미노산 서열 DKTHT (SEQ ID NO: 91), ii) IgG1 CH2 도메인, 및 iii) IgG1 CH3 도메인을 포함하는 방법.
- [0825] 13. 구현예 1 내지 12 중 어느 하나에 있어서, i) 제 1 및 제 4 폴리펩티드가 각각 IgG1 CH1 도메인 및 가변 도메인을 추가로 포함하고, 또는 ii) 제 1 또는 제 4 폴리펩티드가 IgG1 CH1 도메인을 포함하며, 다른 폴리펩티드가 경쇄 불변 도메인을 포함하고, 각각의 폴리펩티드가 가변 도메인을 추가로 포함하는 방법.
- [0826] 14. 구현예 13 에 있어서, 제 1 폴리펩티드의 가변 도메인이 중쇄 가변 도메인이고, 제 4 폴리펩티드의 가변 도메인이 경쇄 가변 도메인이거나, 또는 그 반대이며, 제 1 및 제 4 폴리펩티드가 이량체를 형성할 때, 이들 도메인이 결합 부위를 형성하는 방법.
- [0827] 15. 구현예 1 내지 14 중 어느 하나에 있어서, 제 1 및 제 4 폴리펩티드가 하기에서 서로 독립적으로 선택되는 방법:
- [0828] A) N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군:
- [0829] i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,

- [0830] ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [0831] iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 중쇄 가변 도메인,
- [0832] iv) scFv, 임의로 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0833] v) scFab, 임의로 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0834] vi) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,
- [0835] vii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- [0836] viii) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [0837] ix) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- [0838] x) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,
- [0839] xi) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- [0840] xii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 경쇄 가변 도메인,
- [0841] xiii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [0842] xiv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인,
- [0843] xv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인, 및
- [0844] xvi) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 제 2 펩티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분은 표적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성함,
- [0845] 또는
- [0846] B) N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군:

- [0847] i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0848] ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [0849] iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 중쇄 가변 도메인,
- [0850] iv) scFv, 임의로 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0851] v) scFab, 임의로 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [0852] vi) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,
- [0853] vii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- [0854] viii) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [0855] ix) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- [0856] x) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,
- [0857] xi) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- [0858] xii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 경쇄 가변 도메인,
- [0859] xiii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [0860] xiv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인,
- [0861] xv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인, 및
- [0862] xvi) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 제 2 펩티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분은 표적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성함.
- [0863] 16. 구현예 1 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 제 1 및 제 2 다량체성 출발 폴리펩티드가 항체 경쇄를 추가로 포함하는 방법.
- [0864] 17. 구현예 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서,

- [0865] A) 제 1 다량체성 출발 폴리펩티드가
- [0866] 제 1 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [0867] i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인,
- [0868] ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [0869] iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 중쇄 가변 도메인,
- [0870] iv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [0871] v) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- [0872] vi) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,
- [0873] vii) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- [0874] viii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 경쇄 가변 도메인,
- [0875] ix) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [0876] x) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인,
- [0877] xi) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- [0878] xii) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 제 2 펩티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분은 표적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성함,
- [0879] 돌연변이 노브 또는 돌연변이 홀을 포함함,
- [0880] 및
- [0881] 제 2 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [0882] SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인,
- [0883] 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우 돌연변이 홀을 포함함,
- [0884] 교란 돌연변이 D356K, E357K, K370E, 또는 K439E 를 포함하고, 이로써 제 1 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 야생형 면역글로불린 IgG1 에서 상호 작용하는 아미노산 위치에서의 아미노산 서열에 인간 면역글로불린 IgG1 야생형 아미노산 잔기를 포함함,

- [0885] 여기에서, 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드는 이량체를 형성함,
- [0886] 및
- [0887] 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 포함하는 제 3 폴리펩티드,
- [0888] 여기에서, 상기 제 3 폴리펩티드는 디설파이드 결합에 의해 제 1 폴리펩티드에 공유 결합됨,
- [0889] 를 포함하고,
- [0890] 제 2 다량체성 출발 폴리펩티드가
- [0891] 제 4 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [0892] SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인,
- [0893] 제 2 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 제 2 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우 돌연변이 홀을 포함함,
- [0894] 제 2 교란 돌연변이 D356K, E357K, K370E, 또는 K439E 를 포함하고, 이로써 제 5 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 야생형 IgG1 에서 상호 작용하는 아미노산 위치에서의 아미노산 서열에 인간 IgG1 야생형 아미노산 잔기를 포함하며, 이로써 제 4 폴리펩티드에서의 교란 돌연변이는 제 2 폴리펩티드에서의 교란 돌연변이와 상이한 위치에 있음,
- [0895] 및
- [0896] 제 5 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [0897] i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인,
- [0898] ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [0899] iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 중쇄 가변 도메인,
- [0900] iv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [0901] v) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- [0902] vi) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,
- [0903] vii) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- [0904] viii) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 경쇄 가변 도메인,
- [0905] ix) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [0906] x) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인,
- [0907] xi) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인, 및 제 2 중쇄

가변 도메인, 및

- [0908] xii) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 제 2 펩티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분은 표적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성함,
- [0909] 제 4 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 제 4 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우 돌연변이 홀을 포함함,
- [0910] 여기에서, 상기 제 4 폴리펩티드 및 제 5 폴리펩티드는 이량체를 형성함,
- [0911] 및
- [0912] 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 포함하는 제 6 폴리펩티드,
- [0913] 여기에서, 상기 제 6 폴리펩티드는 디설피드 결합에 의해 제 4 폴리펩티드에 공유 결합됨,
- [0914] 를 포함하며,
- [0915] 또는
- [0916] B) 제 1 다량체성 출발 폴리펩티드가
- [0917] 제 1 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [0918] i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인,
- [0919] ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [0920] iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 중쇄 가변 도메인,
- [0921] iv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [0922] v) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- [0923] vi) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,
- [0924] vii) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- [0925] viii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 경쇄 가변 도메인,
- [0926] ix) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [0927] x) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인,
- [0928] xi) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- [0929] xii) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 제 2 펩티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결

합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분은 표적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성함,

[0930]

돌연변이 노브 또는 돌연변이 홀을 포함함,

[0931]

및

[0932]

제 2 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:

[0933]

SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인,

[0934]

제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우 돌연변이 홀을 포함함,

[0935]

교란 돌연변이 D356K, E357K, K370E, 또는 K439E 를 포함하고, 이로써 제 1 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 야생형 면역글로불린 IgG1 에서 상호 작용하는 아미노산 위치에서의 아미노산 서열에 인간 면역글로불린 IgG1 야생형 아미노산 잔기를 포함함,

[0936]

여기에서, 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드는 이량체를 형성함,

[0937]

및

[0938]

경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 포함하는 제 3 폴리펩티드,

[0939]

여기에서, 상기 제 3 폴리펩티드는 디섀피드 결합에 의해 제 1 폴리펩티드에 공유 결합됨,

[0940]

를 포함하고,

[0941]

제 2 다량체성 출발 폴리펩티드가

[0942]

제 4 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:

[0943]

SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인,

[0944]

제 2 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 제 2 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우 돌연변이 홀을 포함함,

[0945]

제 2 교란 돌연변이 D356K, E357K, K370E, 또는 K439E 를 포함하고, 이로써 제 5 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 야생형 IgG1 에서 상호 작용하는 아미노산 위치에서의 아미노산 서열에 인간 IgG1 야생형 아미노산 잔기를 포함하며, 이로써 제 4 폴리펩티드에서의 교란 돌연변이는 제 2 폴리펩티드에서의 교란 돌연변이와 상이한 위치에 있음,

[0946]

및

[0947]

제 5 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:

[0948]

i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인,

[0949]

ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인,

[0950]

iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 중쇄 가변 도메인,

[0951]

iv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,

[0952]

v) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인 및 제 2 중쇄 가변 도메인,

[0953]

vi) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,

[0954]

vii) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,

- [0955] viii) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 경쇄 가변 도메인,
- [0956] ix) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [0957] x) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인,
- [0958] xi) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인, 및
- [0959] xii) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 제 2 펩티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분은 표적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성함,
- [0960] 제 4 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 제 4 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우 돌연변이 홀을 포함함,
- [0961] 여기에서, 상기 제 4 폴리펩티드 및 제 5 폴리펩티드는 이량체를 형성함,
- [0962] 및
- [0963] 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 포함하는 제 6 폴리펩티드,
- [0964] 여기에서, 상기 제 6 폴리펩티드는 디설피드 결합에 의해 제 4 폴리펩티드에 공유 결합됨,
- [0965] 를 포함하는 방법.
- [0966] 18. 구현예 1 내지 17 중 어느 하나에 있어서, 배양 단계가 환원제의 존재하에 있는 방법.
- [0967] 19. 구현예 1 내지 18 중 어느 하나에 있어서, i) 제 2 폴리펩티드 및 제 3 폴리펩티드, 또는 ii) 제 2 폴리펩티드 및 제 5 폴리펩티드가 (C-말단) 태그를 추가로 포함하는 방법.
- [0968] 20. 구현예 19 에 있어서,
- [0969] i) 태그가 아미노산 서열 HHHHHH (SEQ ID NO: 67) 또는 HHHHHHHH (SEQ ID NO: 68) 를 가지며, 회수가 금속 (니켈) 킬레이트 친화성 크로마토그래피 컬럼 상에서의 크로마토그래피에 의하고,
- [0970] 또는
- [0971] ii) 태그가 아미노산 서열 EPEA (SEQ ID NO: 87) 를 가지며, 회수가 C-tag 친화성 크로마토그래피 컬럼 상에서의 크로마토그래피에 의하는
- [0972] 방법.
- [0973] 21. 하기의 단계를 포함하는, 다량체성 폴리펩티드 조합의 식별 방법:
- [0974] a) 제 1 의 다수의 다량체성 폴리펩티드에서 선택되는 제 1 다량체성 출발 폴리펩티드 및 제 2 의 다수의 다량체성 폴리펩티드에서 선택되는 제 2 다량체성 출발 폴리펩티드의 각각의 조합을 구현예 1 내지 20 중 어느 하나에 따른 방법에 따라서 적용하여 다수의 다량체성 폴리펩티드를 제조하는 단계,
- [0975] b) 단계 a) 에서 제조된 다수의 다량체성 폴리펩티드의 각각의 다량체성 폴리펩티드의 2 개 이상의 항원에 대한 동시 결합을 결합 분석에서 개별적으로 측정하는 단계, 및
- [0976] c) 결합 결과에 기초하여 다수의 다량체성 폴리펩티드로부터 다량체성 폴리펩티드를 선택함으로써 다량체성 폴리펩티드 조합을 식별하는 단계.
- [0977] 22. 구현예 21 에 있어서, 결합 분석이 ELISA 또는 SPR 방법인 방법.
- [0978] 23. 돌연변이 노브를 포함하는 다량체성 폴리펩티드:

- [0979] a) 모두 면역글로불린 G CH3 도메인을 포함하는 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드, 여기에서,
- [0980] a-1) i) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브-cys 를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하며, 또는 ii) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀-cys 를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,
- [0981] a-2) 제 1 폴리펩티드는 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 결합 부위의 적어도 일부를 포함함,
- [0982] a-3) 제 2 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 a-1) 하의 돌연변이와 상이한 교란 돌연변이를 포함하고, 이로써 제 1 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 각각의 야생형 면역글로불린 G 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 각각의 면역글로불린 G 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함함,
- [0983] a-4) 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드는 이량체를 형성함,
- [0984] 또는
- [0985] b) 모두 면역글로불린 G CH3 도메인을 포함하는 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드, 여기에서,
- [0986] b-1) i) 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀-cys 를 포함하며, 또는 ii) 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브-cys 를 포함함,
- [0987] b-2) 제 1 폴리펩티드는 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 결합 부위의 적어도 일부를 포함함,
- [0988] b-3) 제 2 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 b-1) 하의 돌연변이와 상이한 교란 돌연변이를 포함하고, 이로써 제 1 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 각각의 야생형 면역글로불린 G 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 각각의 면역글로불린 G 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함함,
- [0989] b-4) 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드는 이량체를 형성함,
- [0990] Kabat EU 지수에 따른 번호 부여를 가짐.
- [0991] 24. 구현예 23 에 있어서, 교란 돌연변이가 E357K 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 370 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하며; 또는 교란 돌연변이가 K370E 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 357 에서 아미노산 잔기 E 를 포함하는 다량체성 폴리펩티드.
- [0992] 25. 구현예 23 에 있어서, 제 1 교란 돌연변이가 D356K 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 439 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하며; 또는 교란 돌연변이가 K439E 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 356 에서 아미노산 잔기 D 를 포함하는 다량체성 폴리펩티드.
- [0993] 26. 다음을 포함하는 다량체성 폴리펩티드:
- [0994] a) 모두 면역글로불린 G CH3 도메인을 포함하는 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드, 여기에서,
- [0995] a-1) i) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하며, 또는 ii) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,
- [0996] a-2) 제 1 폴리펩티드는 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 결합 부위의 적어도 일부를 포함함,
- [0997] a-3) 제 2 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 a-1) 하의 돌연변이와 상이한 교란 돌연변이를 포함하고, 이로써 제 1 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 각각의 야생형 면역글로불린 G 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 각각의 면역글로불린 G 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함함,
- [0998] a-4) 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드는 이량체를 형성함,
- [0999] a-5) 제 1 및/또는 제 2 폴리펩티드는 IgG1 야생형 힌지 영역 아미노산 서열 HTCPCP (SEQ ID NO: 31) 대신 아미노산 서열 HTSPSP (SEQ ID NO: 85) 를 포함하고, 또는 IgG1 야생형 힌지 영역 서열 HTCPCPAPE (SEQ ID NO: 90) 대신 아미노산 서열 HTPAPE (SEQ ID NO: 85) 를 포함함,
- [1000] 또는
- [1001] b) 모두 면역글로불린 G CH3 도메인을 포함하는 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드, 여기에서,

- [1002] b-1) i) 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하며, 또는 ii) 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,
- [1003] b-2) 제 1 폴리펩티드는 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 결합 부위의 적어도 일부를 포함함,
- [1004] b-3) 제 2 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 a-2) 하의 돌연변이와 상이한 교란 돌연변이를 포함하고, 이로써 제 1 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 각각의 야생형 면역글로불린 G 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 각각의 면역글로불린 G 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함함,
- [1005] b-4) 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드는 이량체를 형성함,
- [1006] b-5) 제 1 및/또는 제 2 폴리펩티드는 IgG1 야생형 힌지 영역 아미노산 서열 HTCPCP (SEQ ID NO: 31) 대신 아미노산 서열 HTSPSP (SEQ ID NO: 85) 를 포함하고, 또는 IgG1 야생형 힌지 영역 서열 HTCPCPAPE (SEQ ID NO: 90) 대신 아미노산 서열 HTPAPE (SEQ ID NO: 85) 를 포함함.
- [1007] 27. 구현예 26 에 있어서, 교란 돌연변이가 E357K 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 370 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하며; 또는 교란 돌연변이가 K370E 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 357 에서 아미노산 잔기 E 를 포함하는 다량체성 폴리펩티드.
- [1008] 28. 구현예 26 에 있어서, 제 1 교란 돌연변이가 D356K 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 439 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하며; 또는 교란 돌연변이가 K439E 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 356 에서 아미노산 잔기 D 를 포함하는 다량체성 폴리펩티드.
- [1009] 29. 다음을 포함하는 다량체성 폴리펩티드:
- [1010] a) 모두 면역글로불린 G CH3 도메인을 포함하는 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드, 여기에서,
- [1011] a-1) i) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하며, 또는 ii) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,
- [1012] a-2) 제 1 폴리펩티드는 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 결합 부위의 적어도 일부를 포함함,
- [1013] a-3) 제 2 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 돌연변이 E357K 를 포함하고, 제 1 폴리펩티드는 위치 370 에서 아미노산 잔기 K 를 포함함,
- [1014] a-4) 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드는 이량체를 형성함,
- [1015] 또는
- [1016] b) 모두 면역글로불린 G CH3 도메인을 포함하는 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드, 여기에서,
- [1017] b-1) i) 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하며, 또는 ii) 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,
- [1018] b-2) 제 1 폴리펩티드는 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 결합 부위의 적어도 일부를 포함함,
- [1019] b-3) 제 2 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 돌연변이 K370E 를 포함하고, 제 1 폴리펩티드는 위치 357 에서 아미노산 잔기 E 를 포함함,
- [1020] b-4) 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드는 이량체를 형성함,
- [1021] Kabat EU 지수에 따른 번호 부여를 가짐.
- [1022] 30. 다음을 포함하는 다량체성 폴리펩티드:
- [1023] a) 모두 면역글로불린 G CH3 도메인을 포함하는 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드, 여기에서,
- [1024] a-1) i) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하며, 또는 ii) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,

- [1025] a-2) 제 1 폴리펩티드는 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 결합 부위의 적어도 일부를 포함함,
- [1026] a-3) 제 2 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 돌연변이 D356K 를 포함하고, 제 1 폴리펩티드는 위치 439 에서 아미노산 잔기 K 를 포함함,
- [1027] a-4) 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드는 이량체를 형성함,
- [1028] 또는
- [1029] b) 모두 면역글로불린 G CH3 도메인을 포함하는 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드, 여기에서,
- [1030] b-1) i) 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하며, 또는 ii) 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,
- [1031] b-2) 제 1 폴리펩티드는 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 결합 부위의 적어도 일부를 포함함,
- [1032] b-3) 제 2 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 돌연변이 K439E 를 포함하고, 제 1 폴리펩티드는 위치 356 에서 아미노산 잔기 D 를 포함함,
- [1033] b-4) 제 3 폴리펩티드 및 제 4 폴리펩티드는 이량체를 형성함,
- [1034] Kabat EU 지수에 따른 번호 부여를 가짐.
- [1035] 31. 구현예 26 내지 30 중 어느 하나에 있어서, 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하고, 제 2 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하며; 또는 제 2 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하고, 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 다량체성 폴리펩티드.
- [1036] 32. 구현예 26 내지 30 중 어느 하나에 있어서, 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브-cys 를 포함하고, 제 2 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하며; 또는 제 2 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하고, 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀-cys 를 포함하는 다량체성 폴리펩티드.
- [1037] 33. 구현예 29 내지 32 중 어느 하나에 있어서, 제 1 폴리펩티드 및/또는 제 2 폴리펩티드가 IgG1 야생형 힌지 영역 아미노산 서열 HTCPPCP (SEQ ID NO: 31) 대신 아미노산 서열 HTSPPSP (SEQ ID NO: 85) 를 포함하고, 또는 IgG1 야생형 힌지 영역 서열 HTCPPCPAPE (SEQ ID NO: 90) 대신 아미노산 서열 HTPAPE (SEQ ID NO: 85) 를 포함하는 다량체성 폴리펩티드.
- [1038] 34. 구현예 22 내지 33 중 어느 하나에 있어서,
- [1039] A)
- [1040] 제 1 폴리펩티드가 N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [1041] i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인,
- [1042] ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [1043] iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 중쇄 가변 도메인,
- [1044] iv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [1045] v) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- [1046] vi) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,

- [1047] vii) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- [1048] viii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 경쇄 가변 도메인,
- [1049] ix) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [1050] x) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인,
- [1051] xi) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인, 및
- [1052] xii) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 제 2 펩티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분은 표적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성함,
- [1053] 이고,
- [1054] 제 2 폴리펩티드가 N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [1055] SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인,
- [1056] 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우 돌연변이 홀을 포함함,
- [1057] 돌연변이 D356K, E357K, K370E, 또는 K439E 에서 선택되는 돌연변이를 포함하고, 이로써 제 1 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 각각의 야생형 면역글로불린 IgG1 에서 상호 작용하는 아미노산 위치에서의 아미노산 서열에 각각의 면역글로불린 IgG1 야생형 아미노산 잔기를 포함함,
- [1058] 이며,
- [1059] 디설피드 결합에 의해 제 1 폴리펩티드에 공유 결합된, 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 포함하는 제 3 폴리펩티드
- [1060] 이고;
- [1061] 또는
- [1062] B)
- [1063] 제 1 폴리펩티드가 N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [1064] i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인,
- [1065] ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [1066] iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 중쇄 가변 도메인,
- [1067] iv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [1068] v) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인,

- [1069] vi) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,
- [1070] vii) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- [1071] viii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 경쇄 가변 도메인,
- [1072] ix) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [1073] x) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인,
- [1074] xi) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인, 및
- [1075] xii) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 제 2 펩티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분은 표적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성함,
- [1076] 이고,
- [1077] 제 2 폴리펩티드가 N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [1078] SEQ ID NO: 65 또는 66 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인,
- [1079] 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우 돌연변이 홀을 포함함,
- [1080] 돌연변이 D356K, E357K, K370E, 또는 K439E 에서 선택되는 돌연변이를 포함하고, 이로써 제 1 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 각각의 야생형 면역글로불린 IgG1 에서 상호 작용하는 아미노산 위치에서의 아미노산 서열에 각각의 면역글로불린 IgG1 야생형 아미노산 잔기를 포함함,
- [1081] 이며,
- [1082] 디설피드 결합에 의해 제 1 폴리펩티드에 공유 결합된, 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 포함하는 제 3 폴리펩티드인
- [1083] 다량체성 폴리펩티드.
- [1084] 본 발명의 구현예의 제 3 의 예시적인 세트:
- [1085] 1. 하기의 단계를 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법:
- [1086] - 다음을 포함하는 제 1 다량체:
- [1087] 다음을 포함하는 제 1 폴리펩티드:
- [1088] i) 면역글로불린 G CH3 도메인,
- [1089] 및
- [1090] ii) 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 이의 일부,
- [1091] 및
- [1092] 다음을 포함하는 제 2 폴리펩티드:
- [1093] 면역글로불린 G CH3 도메인,
- [1094] 여기에서,

- [1095] a-1) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브-cys 를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함함,
- [1096] 또는
- [1097] 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀-cys 를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,
- [1098] a-2) 제 2 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 a-1) 하의 돌연변이와 상이한 제 1 돌연변이를 포함하고, 제 1 돌연변이의 도입은 제 1 다량체의 CH3-CH3 결합 자유 에너지를 증가시킴,
- [1099] 및
- [1100] 다음을 포함하는 제 2 다량체:
- [1101] 다음을 포함하는 제 3 폴리펩티드:
- [1102] i) 면역글로불린 G CH3 도메인,
- [1103] 및
- [1104] 다음을 포함하는 제 4 폴리펩티드:
- [1105] i) 면역글로불린 G CH3 도메인,
- [1106] 및
- [1107] ii) 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 이의 일부,
- [1108] 여기에서,
- [1109] b-1) 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀-cys 를 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드는 돌연변이 노브-cys 를 포함하고, 제 3 폴리펩티드는 돌연변이 홀을 포함함,
- [1110] 또는
- [1111] 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브-cys 를 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드는 돌연변이 홀-cys 를 포함하고, 제 3 폴리펩티드는 돌연변이 노브를 포함함,
- [1112] b-2) 제 3 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 a-1), a-2) 및 b-1) 하의 돌연변이와 상이한 제 2 돌연변이를 포함하고, 제 2 돌연변이의 도입은 제 2 다량체의 CH3-CH3 결합 자유 에너지를 증가시킴,
- [1113] 를 배양하여, 제 2 및 제 3 폴리펩티드를 포함하는 제 3 다량체 및 제 1 및 제 4 폴리펩티드를 포함하는 제 4 다량체를 형성하는 단계,
- [1114] 및
- [1115] - 제 4 다량체를 회수하여 폴리펩티드를 제조하는 단계.
- [1116] 2. 구현예 1 에 있어서, a-2) 하의 돌연변이가 E357K 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 370 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하며, b-2) 하의 돌연변이가 K370E 이고, 제 4 폴리펩티드가 위치 357 에서 아미노산 잔기 E 를 포함하며 Kabat EU 지수에 따라서 번호 부여된 위치를 갖는 방법.
- [1117] 3. 구현예 1 에 있어서, a-2) 하의 돌연변이가 D356K 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 439 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하며, b-2) 하의 돌연변이가 K439E 이고, 제 4 폴리펩티드가 위치 356 에서 아미노산 잔기 D 를 포함하며 Kabat EU 지수에 따라서 번호 부여된 위치를 갖는 방법.
- [1118] 4. 구현예 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 제 1 및/또는 제 2 폴리펩티드가 아미노산 서열 HTSPSP (SEQ ID NO: 85) 또는 아미노산 서열 HTPAPE (SEQ ID NO: 86) 를 포함하고, 제 4 및/또는 제 3 폴리펩티드가 아미노산 서열 HTSPSP (SEQ ID NO: 85) 또는 아미노산 서열 HTPAPE (SEQ ID NO: 86) 를 포함하는 방법.
- [1119] 5. 하기의 단계를 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법:
- [1120] - 다음을 포함하는 제 1 다량체:

- [1121] 다음을 포함하는 제 1 폴리펩티드:
- [1122] i) 면역글로불린 G CH3 도메인,
- [1123] 및
- [1124] ii) 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 이의 일부,
- [1125] 및
- [1126] 다음을 포함하는 제 2 폴리펩티드:
- [1127] 면역글로불린 G CH3 도메인,
- [1128] 여기에서,
- [1129] a-1) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함함,
- [1130] 또는
- [1131] 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,
- [1132] a-2) 제 2 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 a-1) 하의 돌연변이와 상이한 제 1 돌연변이를 포함하고, 제 1 돌연변이의 도입은 제 1 다량체의 CH3-CH3 결합 자유 에너지를 증가시킴,
- [1133] a-3) 제 1 및/또는 제 2 폴리펩티드는 아미노산 서열 HTSPSP (SEQ ID NO: 85) 또는 아미노산 서열 HTPAPE (SEQ ID NO: 86) 를 포함함,
- [1134] 및
- [1135] 다음을 포함하는 제 2 다량체:
- [1136] 다음을 포함하는 제 3 폴리펩티드:
- [1137] i) 면역글로불린 G CH3 도메인,
- [1138] 및
- [1139] 다음을 포함하는 제 4 폴리펩티드:
- [1140] i) 면역글로불린 G CH3 도메인,
- [1141] 및
- [1142] ii) 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 이의 일부,
- [1143] 여기에서,
- [1144] b-1) 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드는 돌연변이 노브를 포함하고, 제 3 폴리펩티드는 돌연변이 홀을 포함함,
- [1145] 또는
- [1146] 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드는 돌연변이 홀을 포함하고, 제 3 폴리펩티드는 돌연변이 노브를 포함함,
- [1147] b-2) 제 3 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 a-1), a-2) 및 b-1) 하의 돌연변이와 상이한 돌연변이를 포함하고, 제 2 돌연변이의 도입은 제 2 다량체의 CH3-CH3 결합 자유 에너지를 증가시킴,
- [1148] b-3) 제 4 및/또는 제 3 폴리펩티드는 아미노산 서열 HTSPSP (SEQ ID NO: 85) 또는 아미노산 서열 HTPAPE (SEQ ID NO: 86) 를 포함함,
- [1149] 를 배양하여, 제 2 및 제 3 폴리펩티드를 포함하는 제 3 다량체 및 제 1 및 제 4 폴리펩티드를 포함하는 제 4 다량체를 형성하는 단계,

- [1150] 및
- [1151] - 제 4 다량체를 회수하여 폴리펩티드를 제조하는 단계.
- [1152] 6. 구현예 5 에 있어서, a-2) 하의 돌연변이가 E357K 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 370 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하며, b-2) 하의 돌연변이가 K370E 이고, 제 4 폴리펩티드가 위치 357 에서 아미노산 잔기 E 를 포함하며 Kabat EU 지수에 따라서 번호 부여된 위치를 갖는 방법.
- [1153] 7. 구현예 5 에 있어서, a-2) 하의 돌연변이가 D356K 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 439 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하며, b-2) 하의 돌연변이가 K439E 이고, 제 4 폴리펩티드가 위치 356 에서 아미노산 잔기 D 를 포함하며 Kabat EU 지수에 따라서 번호 부여된 위치를 갖는 방법.
- [1154] 8. 구현예 1 또는 5 중 어느 하나에 있어서, 제 1 폴리펩티드가 제 2 폴리펩티드에서의 돌연변이된 아미노산 잔기와 상호 작용하는 위치에서 CH3 도메인에서의 각각의 면역글로불린 G 야생형 아미노산 잔기를 포함하고, 제 4 폴리펩티드가 제 3 폴리펩티드에서의 돌연변이된 아미노산 잔기와 상호 작용하는 위치(들)에서 CH3 도메인에서의 각각의 면역글로불린 G 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함하는 방법.
- [1155] 9. 하기의 단계를 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법:
- [1156] - 다음을 포함하는 제 1 다량체:
- [1157] 다음을 포함하는 제 1 폴리펩티드:
- [1158] i) 면역글로불린 G CH3 도메인,
- [1159] 및
- [1160] ii) 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 이의 일부,
- [1161] 및
- [1162] 다음을 포함하는 제 2 폴리펩티드:
- [1163] 면역글로불린 G CH3 도메인,
- [1164] 여기에서,
- [1165] a-1) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함함,
- [1166] 또는
- [1167] 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,
- [1168] a-2) 제 1 폴리펩티드는 위치 370 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하고, 제 2 폴리펩티드는 돌연변이 E357K 를 포함함,
- [1169] 및
- [1170] 다음을 포함하는 제 2 다량체:
- [1171] 다음을 포함하는 제 3 폴리펩티드:
- [1172] i) 면역글로불린 G CH3 도메인,
- [1173] 및
- [1174] 다음을 포함하는 제 4 폴리펩티드:
- [1175] i) 면역글로불린 G CH3 도메인,
- [1176] 및
- [1177] ii) 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 이의 일부,
- [1178] 여기에서,

- [1179] b-1) 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드는 돌연변이 노브를 포함하고, 제 3 폴리펩티드는 돌연변이 홀을 포함함,
- [1180] 또는
- [1181] 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드는 돌연변이 홀을 포함하고, 제 3 폴리펩티드는 돌연변이 노브를 포함함,
- [1182] b-2) 제 3 폴리펩티드는 돌연변이 K370E 를 포함하고, 제 4 폴리펩티드는 위치 357 에서 아미노산 잔기 E 를 포함함,
- [1183] 를 배양하여, 제 2 및 제 3 폴리펩티드를 포함하는 제 3 다량체 및 제 1 및 제 4 폴리펩티드를 포함하는 제 4 다량체를 형성하는 단계,
- [1184] 및
- [1185] - 제 4 다량체를 회수하여 폴리펩티드를 제조하는 단계,
- [1186] Kabat EU 지수에 따라서 번호 부여된 위치를 가짐.
- [1187] 10. 하기의 단계를 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법:
- [1188] - 다음을 포함하는 제 1 다량체:
- [1189] 다음을 포함하는 제 1 폴리펩티드:
- [1190] i) 면역글로불린 G CH3 도메인,
- [1191] 및
- [1192] ii) 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 이의 일부,
- [1193] 및
- [1194] 다음을 포함하는 제 2 폴리펩티드:
- [1195] 면역글로불린 G CH3 도메인,
- [1196] 여기에서,
- [1197] a-1) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함함,
- [1198] 또는
- [1199] 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,
- [1200] a-2) 제 1 폴리펩티드는 위치 439 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하고, 제 2 폴리펩티드는 돌연변이 D356K 를 포함함,
- [1201] 및
- [1202] 다음을 포함하는 제 2 다량체:
- [1203] 다음을 포함하는 제 3 폴리펩티드:
- [1204] i) 면역글로불린 G CH3 도메인,
- [1205] 및
- [1206] 다음을 포함하는 제 4 폴리펩티드:
- [1207] i) 면역글로불린 G CH3 도메인,
- [1208] 및
- [1209] ii) 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 이의 일부,

- [1210] 여기에서,
- [1211] b-1) 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드는 돌연변이 노브를 포함하고, 제 3 폴리펩티드는 돌연변이 홀을 포함함,
- [1212] 또는
- [1213] 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우, 제 4 폴리펩티드는 돌연변이 홀을 포함하고, 제 3 폴리펩티드는 돌연변이 노브를 포함함,
- [1214] b-2) 제 3 폴리펩티드는 돌연변이 K439E 를 포함하고, 제 4 폴리펩티드는 위치 356 에서 아미노산 잔기 D 를 포함함,
- [1215] 를 배양하여, 제 2 및 제 3 폴리펩티드를 포함하는 제 3 다량체 및 제 1 및 제 4 폴리펩티드를 포함하는 제 4 다량체를 형성하는 단계,
- [1216] 및
- [1217] - 제 4 다량체를 회수하여 폴리펩티드를 제조하는 단계,
- [1218] Kabat EU 지수에 따라서 번호 부여된 위치를 가짐.
- [1219] 11. 구현에 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 제 2 폴리펩티드 및 제 3 폴리펩티드를 포함하는 제 3 다량체의 CH3-CH3 결합 자유 에너지가 제 1 다량체 및/또는 제 2 다량체의 CH3-CH3 결합 자유 에너지보다 낮은 방법.
- [1220] 12. 구현에 1 내지 11 중 어느 하나에 있어서, 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드가 (단리 가능한) 이량체를 형성하고, 제 3 폴리펩티드 및 제 4 폴리펩티드가 (단리 가능한) 이량체를 형성하는 방법.
- [1221] 13. 구현에 4 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 제 1 및/또는 제 2 폴리펩티드가 IgG 야생형 힌지 영역 아미노산 서열 HTCPCP (SEQ ID NO: 31) 대신 아미노산 서열 HTSPSP (SEQ ID NO: 85) 를 포함하고, 및/또는 제 1 및/또는 제 2 폴리펩티드가 IgG 야생형 힌지 영역 아미노산 서열 HTCPCPAPE (SEQ ID NO: 90) 대신 아미노산 서열 HTPAPE (SEQ ID NO: 86) 를 포함하며, 및/또는 제 3 및/또는 제 4 폴리펩티드가 IgG 야생형 힌지 영역 아미노산 서열 HTCPCP (SEQ ID NO: 31) 대신 아미노산 서열 HTSPSP (SEQ ID NO: 85) 를 포함하고, 및/또는 제 3 및/또는 제 4 폴리펩티드가 IgG 야생형 힌지 영역 아미노산 서열 HTCPCPAPE (SEQ ID NO: 90) 대신 아미노산 서열 HTPAPE (SEQ ID NO: 86) 를 포함하는 방법.
- [1222] 14. 구현에 5 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하고, 제 2 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하며, 제 3 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하고, 제 4 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 방법.
- [1223] 15. 구현에 5 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브-cys 를 포함하고, 제 2 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하며, 제 3 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하고, 제 4 폴리펩티드가 돌연변이 홀-cys 를 포함하는 방법.
- [1224] 16. 구현에 1 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 제 1 내지 제 4 폴리펩티드가 각각 N-말단에서 C-말단 방향으로 IgG1 CH2 도메인 및 IgG1 CH3 도메인을 포함하는 방법.
- [1225] 17. 구현에 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 제 1 내지 제 4 폴리펩티드가 각각 N-말단에서 C-말단 방향으로 i) 서로 독립적으로 아미노산 서열 DKHTCPPC (SEQ ID NO: 65) 또는 아미노산 서열 DKHTSPPS (SEQ ID NO: 66) 또는 아미노산 서열 DKHT (SEQ ID NO: 91), ii) IgG1 CH2 도메인, 및 iii) IgG1 CH3 도메인을 포함하는 방법.
- [1226] 18. 구현에 1 내지 17 중 어느 하나에 있어서, i) 제 1 및 제 4 폴리펩티드가 각각 IgG1 CH1 도메인 및 가변 도메인을 추가로 포함하고, 또는 ii) 제 1 또는 제 4 폴리펩티드가 IgG1 CH1 도메인을 포함하며, 다른 폴리펩티드가 경쇄 불변 도메인을 포함하고, 각각의 폴리펩티드가 가변 도메인을 추가로 포함하는 방법.
- [1227] 19. 구현에 18 에 있어서, 제 1 폴리펩티드의 가변 도메인이 중쇄 가변 도메인이고, 제 4 폴리펩티드의 가변 도메인이 경쇄 가변 도메인이거나, 또는 그 반대이며, 이들 도메인이 폴리펩티드에서 결합 부위를 형성하는 방법.
- [1228] 20. 구현에 1 내지 19 중 어느 하나에 있어서, 제 1 및 제 4 폴리펩티드가 N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 서로 독립적으로 선택되는 방법:
- [1229] i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도

메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,

- [1230] ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [1231] iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 중쇄 가변 도메인,
- [1232] iv) scFv, 임의로 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [1233] v) scFab, 임의로 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [1234] vi) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,
- [1235] vii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- [1236] viii) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [1237] ix) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- [1238] x) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,
- [1239] xi) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- [1240] xii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 경쇄 가변 도메인,
- [1241] xiii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [1242] xiv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인,
- [1243] xv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인, 및
- [1244] xvi) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 제 2 펩티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분은 표적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성함.
- [1245] 21. 구현예 1 내지 20 중 어느 하나에 있어서, 제 1 및 제 2 다량체가 각각 제 1 폴리펩티드 및 제 4 폴리펩티드

드와 관련된 항체 경쇄를 추가로 포함하는 방법.

- [1246] 22. 구현예 1 내지 21 중 어느 하나에 있어서,
- [1247] 제 1 다량체가
- [1248] 제 1 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [1249] i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인,
- [1250] ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [1251] iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 중쇄 가변 도메인,
- [1252] iv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [1253] v) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- [1254] vi) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,
- [1255] vii) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- [1256] viii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 경쇄 가변 도메인,
- [1257] ix) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [1258] x) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인,
- [1259] xi) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- [1260] xii) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 제 2 펩티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분은 표적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성함,
- [1261] 돌연변이 노브 또는 돌연변이 홀을 포함함,
- [1262] 및
- [1263] 제 2 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [1264] SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인,
- [1265] 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우 돌연변이 홀을 포함함,
- [1266] 교란 돌연변이 D356K, E357K, K370E, 또는 K439E 를 포함하고, 이로써 제 1 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의

아미노산 잔기와 야생형 면역글로불린 IgG1 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 인간 면역글로불린 IgG1 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함함,

- [1267] 여기에서, 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드는 이량체를 형성함,
- [1268] 및
- [1269] 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 포함하는 제 5 폴리펩티드,
- [1270] 여기에서, 상기 제 3 폴리펩티드는 디설피드 결합에 의해 제 1 폴리펩티드에 공유 결합됨,
- [1271] 를 포함하고,
- [1272] 제 2 다량체가
- [1273] 제 3 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [1274] SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인,
- [1275] 제 2 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 제 2 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우 돌연변이 홀을 포함함,
- [1276] 제 2 교란 돌연변이 D356K, E357K, K370E, 또는 K439E 를 포함하고, 이로써 제 5 폴리펩티드는 교란 돌연변이에 서의 아미노산 잔기와 야생형 IgG1 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 인간 IgG1 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함하며, 이로써 제 4 폴리펩티드에서의 교란 돌연변이는 제 2 폴리펩티드에서의 교란 돌연변이와 상이한 위치에 있음,
- [1277] 및
- [1278] 제 4 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [1279] i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인,
- [1280] ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [1281] iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 중쇄 가변 도메인,
- [1282] iv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [1283] v) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- [1284] vi) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,
- [1285] vii) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- [1286] viii) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 경쇄 가변 도메인,
- [1287] ix) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [1288] x) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인,

- [1289] xi) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인, 및
- [1290] xii) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 제 2 펩티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분은 표적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성함,
- [1291] 제 4 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 제 4 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우 돌연변이 홀을 포함함,
- [1292] 여기에서, 상기 제 4 폴리펩티드 및 제 5 폴리펩티드는 이량체를 형성함,
- [1293] 및
- [1294] 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 포함하는 제 6 폴리펩티드,
- [1295] 여기에서, 상기 제 6 폴리펩티드는 디설피드 결합에 의해 제 4 폴리펩티드에 공유 결합됨,
- [1296] 를 포함하는 방법.
- [1297] 23. 구현예 1 내지 3 및 9 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 배양 단계가 환원제의 존재 또는 부재하에 있는 방법.
- [1298] 24. 구현예 4 내지 8 및 13 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 배양 단계가 환원제의 부재하에 있는 방법.
- [1299] 25. 구현예 1 내지 24 중 어느 하나에 있어서, i) 제 2 폴리펩티드 및 제 3 폴리펩티드가 (C-말단) 태그를 추가로 포함하는 방법.
- [1300] 26. 구현예 25 에 있어서,
- [1301] i) 태그가 아미노산 서열 HHHHHH (SEQ ID NO: 67) 또는 HHHHHHHH (SEQ ID NO: 68) 를 가지며, 회수가 금속 (니켈) 킬레이트 친화성 크로마토그래피 컬럼 상에서의 크로마토그래피에 의하고,
- [1302] 또는
- [1303] ii) 태그가 아미노산 서열 EPEA (SEQ ID NO: 87) 를 가지며, 회수가 C-tag 친화성 크로마토그래피 컬럼 상에서의 크로마토그래피에 의하는
- [1304] 방법.
- [1305] 27. 하기의 단계를 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드의 식별 방법:
- [1306] a) 제 1 표적에 특이적으로 결합하는 제 1 의 다수의 다량체에서 선택되는 제 1 다량체 및 제 2 표적 (제 1 표적과 상이함) 에 특이적으로 결합하는 제 2 의 다수의 다량체에서 선택되는 제 2 다량체의 각각의 조합을 구현예 1 내지 26 중 어느 하나에 따른 방법에 적용하여 다수의 다중특이적 폴리펩티드를 제조하는 단계,
- [1307] b) 단계 a) 에서 제조된 다수의 다중특이적 폴리펩티드의 각각의 구성원에 대해 결합 분석에서의 2 개의 표적에 대한 동시 결합을 개별적으로 측정하는 단계, 및
- [1308] c) 결합 분석의 결과에 기초하여 다수의 다량체성 폴리펩티드로부터 다량체성 폴리펩티드를 선택함으로써 다중특이적 폴리펩티드를 식별하는 단계.
- [1309] 28. 구현예 27 에 있어서, 결합 분석이 ELISA 또는 SPR 방법인 방법.
- [1310] 29. 다음을 포함하는, 단리된 다량체성 폴리펩티드:
- [1311] a) 모두 번역글로불린 G CH3 도메인을 포함하는 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드, 여기에서,
- [1312] a-1) i) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브-cys 를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하며, 또는 ii) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀-cys 를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,

- [1313] a-2) 제 1 폴리펩티드는 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 결합 부위의 적어도 일부를 포함함,
- [1314] a-3) 제 2 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 a-1) 하의 돌연변이와 상이한 교란 돌연변이를 포함하고, 이로써 제 1 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 각각의 야생형 번역글로불린 G 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 각각의 번역글로불린 G 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함함,
- [1315] a-4) 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드는 이량체를 형성함,
- [1316] 또는
- [1317] b) 모두 번역글로불린 G CH3 도메인을 포함하는 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드, 여기에서,
- [1318] b-1) i) 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀-cys 를 포함하며, 또는 ii) 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브-cys 를 포함함,
- [1319] b-2) 제 1 폴리펩티드는 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 결합 부위의 적어도 일부를 포함함,
- [1320] b-3) 제 2 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 b-1) 하의 돌연변이와 상이한 교란 돌연변이를 포함하고, 제 1 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 각각의 야생형 번역글로불린 G 에서 상호 작용하는 아미노산 위치(들)에서의 아미노산 서열에 각각의 번역글로불린 G 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함함,
- [1321] b-4) 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드는 이량체를 형성함,
- [1322] Kabat EU 지수에 따른 번호 부여를 가짐.
- [1323] 30. 구현예 29 에 있어서, 교란 돌연변이가 E357K 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 370 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하며; 또는 교란 돌연변이가 K370E 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 357 에서 아미노산 잔기 E 를 포함하는 다량체성 폴리펩티드.
- [1324] 31. 구현예 29 에 있어서, 제 1 교란 돌연변이가 D356K 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 439 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하며; 또는 교란 돌연변이가 K439E 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 356 에서 아미노산 잔기 D 를 포함하는 다량체성 폴리펩티드.
- [1325] 32. 다음을 포함하는, 단리된 다량체성 폴리펩티드:
- [1326] 다음을 포함하는 제 1 폴리펩티드:
- [1327] i) 번역글로불린 G CH3 도메인,
- [1328] 및
- [1329] ii) 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 이의 일부,
- [1330] 및
- [1331] 다음을 포함하는 제 2 폴리펩티드:
- [1332] 번역글로불린 G CH3 도메인,
- [1333] 여기에서,
- [1334] a-1) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브-cys 를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함함,
- [1335] 또는
- [1336] 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀-cys 를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,
- [1337] a-2) 제 2 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 a-1) 하의 돌연변이와 상이한 추가의 돌연변이를 포함하고, 추가의 돌연변이의 도입은 제 1 다량체의 CH3-CH3 결합 자유 에너지를 증가시킴.
- [1338] 33. 구현예 32 에 있어서, a-2) 하의 돌연변이가 E357K 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 370 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하며; 또는 a-2) 하의 돌연변이가 K370E 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 357 에서 아미노산 잔기 E 를

포함하며 Kabat EU 지수에 따라서 번호 부여된 위치를 갖는 단리된 다량체성 폴리펩티드.

- [1339] 34. 구현예 32 에 있어서, a-2) 하의 돌연변이가 D356K 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 439 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하며; 또는 a-2) 하의 돌연변이가 K439E 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 356 에서 아미노산 잔기 D 를 포함하며 Kabat EU 지수에 따라서 번호 부여된 위치를 갖는 단리된 다량체성 폴리펩티드.
- [1340] 35. 구현예 32 내지 34 중 어느 하나에 있어서, 제 1 및/또는 제 2 폴리펩티드가 아미노산 서열 HTSPSP (SEQ ID NO: 85) 또는 아미노산 서열 HTPAPE (SEQ ID NO: 86) 를 포함하는 단리된 다량체성 폴리펩티드.
- [1341] 36. 다음을 포함하는, 단리된 다량체성 폴리펩티드:
- [1342] 다음을 포함하는 제 1 폴리펩티드:
- [1343] i) 면역글로불린 G CH3 도메인,
- [1344] 및
- [1345] ii) 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 이의 일부,
- [1346] 및
- [1347] 다음을 포함하는 제 2 폴리펩티드:
- [1348] 면역글로불린 G CH3 도메인,
- [1349] 여기에서,
- [1350] a-1) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함함,
- [1351] 또는
- [1352] 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,
- [1353] a-2) 제 2 폴리펩티드는 CH3 도메인에서 a-1) 하의 돌연변이와 상이한 추가의 돌연변이를 포함하고, 추가의 돌연변이의 도입은 제 1 다량체의 CH3-CH3 결합 자유 에너지를 증가시킴,
- [1354] a-3) 제 1 및/또는 제 2 폴리펩티드는 아미노산 서열 HTSPSP (SEQ ID NO: 85) 또는 아미노산 서열 HTPAPE (SEQ ID NO: 86) 를 포함함.
- [1355] 37. 구현예 36 에 있어서, a-2) 하의 돌연변이가 E357K 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 370 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하며; 또는 a-2) 하의 돌연변이가 K370E 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 357 에서 아미노산 잔기 E 를 포함하며 Kabat EU 지수에 따라서 번호 부여된 위치를 갖는 단리된 다량체성 폴리펩티드.
- [1356] 38. 구현예 36 에 있어서, a-2) 하의 돌연변이가 D356K 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 439 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하며; 또는 a-2) 하의 돌연변이가 K439E 이고, 제 1 폴리펩티드가 위치 356 에서 아미노산 잔기 D 를 포함하며 Kabat EU 지수에 따라서 번호 부여된 위치를 갖는 단리된 다량체성 폴리펩티드.
- [1357] 39. 구현예 32 내지 36 중 어느 하나에 있어서, 제 1 폴리펩티드가 제 2 폴리펩티드에서의 돌연변이된 아미노산 잔기와 상호 작용하는 위치(들)에서 CH3 도메인에서의 각각의 면역글로불린 G 야생형 아미노산 잔기(들)을 포함하는 단리된 다량체성 폴리펩티드.
- [1358] 40. 다음을 포함하는, 단리된 다량체성 폴리펩티드:
- [1359] 다음을 포함하는 제 1 폴리펩티드:
- [1360] i) 면역글로불린 G CH3 도메인,
- [1361] 및
- [1362] ii) 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 이의 일부,
- [1363] 및
- [1364] 다음을 포함하는 제 2 폴리펩티드:

- [1365] 면역글로불린 G CH3 도메인,
- [1366] 여기에서,
- [1367] a-1) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함함,
- [1368] 또는
- [1369] 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,
- [1370] a-2) 제 1 폴리펩티드는 위치 370 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하고, 제 2 폴리펩티드는 돌연변이 E357K 를 포함함,
- [1371] 또는
- [1372] 제 2 폴리펩티드는 돌연변이 K370E 를 포함하고, 제 1 폴리펩티드는 위치 357 에서 아미노산 잔기 E 를 포함함.
- [1373] 41. 다음을 포함하는, 단리된 다량체성 폴리펩티드:
- [1374] 다음을 포함하는 제 1 폴리펩티드:
- [1375] i) 면역글로불린 G CH3 도메인,
- [1376] 및
- [1377] ii) 하나 이상의 기능성 결합 부위 또는 이의 일부,
- [1378] 및
- [1379] 다음을 포함하는 제 2 폴리펩티드:
- [1380] 면역글로불린 G CH3 도메인,
- [1381] 여기에서,
- [1382] a-1) 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함함,
- [1383] 또는
- [1384] 제 1 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 홀을 포함하고, 제 2 폴리펩티드의 CH3 도메인은 돌연변이 노브를 포함함,
- [1385] a-2) 제 1 폴리펩티드는 위치 439 에서 아미노산 잔기 K 를 포함하고, 제 2 폴리펩티드는 돌연변이 D356K 를 포함함,
- [1386] 또는
- [1387] 제 2 폴리펩티드는 돌연변이 K439E 를 포함하고, 제 1 폴리펩티드는 위치 356 에서 아미노산 잔기 D 를 포함함.
- [1388] 42. 구현예 29 내지 41 중 어느 하나에 있어서, 제 1 폴리펩티드가 N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 단리된 다량체성 폴리펩티드:
- [1389] i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [1390] ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [1391] iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 중쇄 가변 도메인,

- [1392] iv) scFv, 임의로 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [1393] v) scFab, 임의로 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인,
- [1394] vi) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,
- [1395] vii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- [1396] viii) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [1397] ix) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- [1398] x) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,
- [1399] xi) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- [1400] xii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 경쇄 가변 도메인,
- [1401] xiii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [1402] xiv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인,
- [1403] xv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인, 및
- [1404] xvi) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인으로부터 유래된 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인으로부터 유래된 CH3 도메인, 임의로 제 2 펩티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분은 표적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성함.
- [1405] 43. 구현예 29 내지 42 중 어느 하나에 있어서, 제 1 폴리펩티드와 관련된 항체 경쇄를 추가로 포함하는 단리된 다량체성 폴리펩티드.
- [1406] 44. 구현예 43 에 있어서,
- [1407] 제 1 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [1408] i) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인,
- [1409] ii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티

드 링커, 중쇄 가변 도메인, 및 인간 IgG1 CH1 도메인,

- [1410] iii) SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 중쇄 가변 도메인,
- [1411] iv) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [1412] v) 제 1 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- [1413] vi) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFv,
- [1414] vii) 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 및 scFab,
- [1415] viii) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 경쇄 가변 도메인,
- [1416] ix) 중쇄 가변 도메인, 제 1 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 경쇄 가변 도메인, 및 제 2 인간 IgG1 CH1 도메인,
- [1417] x) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 제 2 중쇄 가변 도메인, 및 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인,
- [1418] xi) 제 1 중쇄 가변 도메인, 인간 IgG1 CH1 도메인, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 펩티드 링커, 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인, 및 제 2 중쇄 가변 도메인,
- [1419] xii) 결합 도메인의 제 1 부분, 임의로 제 1 펩티드 링커, SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 인간 IgG1 CH3 도메인, 임의로 제 2 펩티드 링커, 및 결합 도메인의 제 2 부분, 여기에서, 상기 결합 도메인의 제 1 부분 및 결합 도메인의 제 2 부분은 표적에 특이적으로 결합하는 기능성 결합 부위를 형성함,
- [1420] 및
- [1421] 제 2 폴리펩티드로서, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함하는 폴리펩티드의 군에서 선택되는 폴리펩티드:
- [1422] SEQ ID NO: 65 또는 66 또는 91 의 힌지 영역, 인간 IgG1 CH2 도메인, 및 인간 IgG1 CH3 도메인,
- [1423] 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 홀을 포함하는 경우 돌연변이 노브를 포함하고, 또는 제 1 폴리펩티드가 돌연변이 노브를 포함하는 경우 돌연변이 홀을 포함함,
- [1424] 교란 돌연변이 D356K, E357K, K370E, 또는 K439E 를 포함하고, 이로써 제 1 폴리펩티드는 교란 돌연변이에서의 아미노산 잔기와 야생형 면역글로불린 IgG1 에서 상호 작용하는 아미노산 위치에서의 아미노산 서열에 인간 면역글로불린 IgG1 야생형 아미노산 잔기를 포함함,
- [1425] 및
- [1426] 제 3 폴리펩티드로서, 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 포함하는 폴리펩티드,
- [1427] 여기에서, 제 3 폴리펩티드는 디설피드 결합에 의해 제 1 폴리펩티드에 공유 결합됨,
- [1428] 를 포함하는 단리된 다량체성 폴리펩티드.
- [1429] 45. 구현예 29 내지 44 중 어느 하나에 있어서, 제 2 폴리펩티드가 (C-말단) 태그를 추가로 포함하는 단리된 다량체성 폴리펩티드.

- [1430] 46. 구현에 45 에 있어서,
- [1431] i) 태그가 아미노산 서열 HHHHHH (SEQ ID NO: 67) 또는 HHHHHHHH (SEQ ID NO: 68) 를 가지며,
- [1432] 또는
- [1433] ii) 태그가 아미노산 서열 EPEA (SEQ ID NO: 87) 을 가지는
- [1434] 단리된 다량체성 폴리펩티드.
- [1435] 하기의 실시예, 서열 및 도면은 본 발명의 이해를 돕기 위해서 제공되며, 그 진정한 범위는 첨부된 청구범위에 기재되어 있다. 본 발명의 사상을 벗어나지 않으면서, 기술된 절차에서 변형이 이루어질 수 있는 것으로 이해된다.
- [1436] **도면의 간단한 설명**
- [1437] **도 1:** 본 발명에 따른 방법에 사용될 수 있는 2/3-IgG 의 설계 및 모듈 조성.
- [1438] **도 2:** 노브-cys 및 홀-cys 중쇄 (상부) 및 노브-cys 중쇄 및 MHCfCRP (중간부 및 하부) 사이의 상호 작용. 공유적 디설파이드 결합은 점선으로 표시되고, 인력 상호 작용 쌍은 전체 구 사이의 선으로 표시되며, 반발성 상호 작용 또는 결과적인 입체 장애는 이중 화살표로 표시된다.
- [1439] **도 3:** 상이한 MHCfCRP 를 갖는 정제된 2/3-IgG 의 SEC 크로마토그램: 세포 배양 상청액으로부터 단백질 A 추출 후 2/3-IgG 제제의 SEC 프로파일이 도시되고; 각각의 프로파일의 주요 피크는 2/3-IgG 를 나타내며; 형광 또는 생체 특이성을 가짐 (실시예 2 참조).
- [1440] **도 4:** 2/3-IgG 로 예시된 본 발명에 따른 교환 반응에 의한 bsAb (이중특이적 항체) 의 생성.
- [1441] **도 5:** TCEP (2/3 입력 IgG 와 관련한 x 몰 당량) 는 힌지-디설파이드 결합을 (부분적으로) 감소시키기 위해서 적용된다. SEC 는 2/3-IgG 출발 분자, 생성된 bsAb 및 이량체성 MHCfCRP 를 구별한다. 상이한 TCEP 농도에서의 모든 반응은 동일한 배양 시간 (삼각형: bsAb; 교차: 2/3-IgG, 다이아몬드: 이량체성 MHCfCRP) 후에 중단하였다.
- [1442] **도 6:** 원하는 bsAb 생성물로부터 원하지 않는 비-반응 입력 분자 및 부산물의 제거.
- [1443] **도 7:** NiNTA-정제의 SDS-파지; n.r. = 비-환원; r = 환원; NiNTA-결합 (상부 패널) 은 NiNTA 로부터 용리된 단백질 분리를 나타내고, NiNTA 통과액 (하부 패널) 은 His-6 또는 His-8 Tag 를 함유하지 않는 단백질이다; n.r. = 비-환원, r. = 환원; M = 마커.
- [1444] **도 8:** 본 발명에 따른 교환 반응에 의해 생성된 bsAb 의 이중특이적 기능성. 기능성은 이중특이적 항체의 결합 부위의 동시 결합을 검출할 수 있는 브릿징 ELISA 에 의해 평가하였다. ELISA 플레이트에 코팅된 항원 A 는 플루오레세인 (fluos-BSA) 이었으며, 항원 B 는 bio-Cy5 였으며, 이는 이의 형광에 의해 검출된다.
- [1445] **도 9:** 중쇄의 C-말단에 결합 부위를 갖는 2/3-IgG-교환 반응에 대한 예시적인 2/3-IgG.
- [1446] **도 10:** 중쇄의 N-말단 및 C-말단에 결합 부위를 갖는 2/3-IgG-교환 반응에 대한 예시적인 2/3-IgG.
- [1447] **도 11:** 2/3-IgG 로 예시된, 상이한 결합 특이성 및 포맷의 출발 물질을 사용한 IgG-교환 반응.
- [1448] **도 12:** 예시적인 2/3-IgG 를 사용하여 본 발명에 따른 교환 반응을 통해 생성된 상이한 bsAb 포맷 매트릭스. 매트릭스는 플루오레세인 결합 엔터티 및 바이오시티나미드 결합 엔터티로 생성하였다. 입력 분자 및 교환-유도된 출력 분자는 도 10 에 도시되어 있다. 생성된 bsAb 의 기능성은 포획 항원으로서 fluos-BSA 및 bio-Cy5 를 사용해 ELISA 를 브릿징하여 이중특이적 결합 기능성을 검출함으로써 평가하였다. 브릿징 ELISA 로부터 유도된 신호는 모든 포맷이 이중특이적 결합 효능을 가진다는 것을 보여준다.
- [1449] **도 13:** 소형화된 높은 처리량 및 자동화 호환성 접근법을 사용하는 본 발명에 따른 교환 반응을 통한 bsAb 다양성의 생성 및 특성화를 위한 매트릭스.
- [1450] **도 14:** HTS 기술과 본 발명의 방법에 따른 교환을 통한 이중특이적 항체 형성. 이중특이적 항체 형성을 나타내는 농도 의존성 형광 신호를 보여주는 예시적인 브릿징 ELISA 의 신호가 도시되어 있다. Fluos-bio 브릿징 ELISA, 교차: fluos [홀 / K370E] + bio [노브 / E357K], 다이아몬드: bio [홀 / K370E] + fluos [노브 / E357K]. 모든 다른 곡선: 동족 교환 파트너가 없는 2/3 IgG 입력 분자는 브릿징 신호를 나타내지 않는다.

- [1451] **도 15:** 힌지-영역 및 CH3 도메인 사슬간 디설피드 결합이 없는 2/3-IgG 로 예시된 본 발명에 따른 교환 반응의 반응식. 이것은 환원제를 첨가할 필요없이 본 발명에 따른 방법에서의 사슬-교환 반응을 가능하게 한다.
- [1452] **도 16:** 사슬간 디설피드 브릿지가 없는 2/3-IgG 를 표준 IgG 와 같은 배양 상청액에 분비하고, 표준 단백질 A 친화성 및 크기 배제 크로마토그래피로 정제하고, 발현 생성물로서 원하는 100 kDa 2/3-IgG 를 확인하는 SDS-PAGE 로 분석하였다. 이것은 사슬간 디설피드 브릿지가 없는 정제된 2/3-IgG-유도체의 정확한 조립, 뿐만 아니라, 원하지 않는 이량체 및 응집체의 부재를 입증한다. i) 항-bio 항체 경쇄 (SEQ ID NO: 39) + 힌지 영역 시스테인 잔기가 없는 항-bio 항체 중쇄-노브 (SEQ ID NO: 57) + 힌지 영역 시스테인 잔기가 없는 MHCFCRP-홀-E357K (SEQ ID NO: 62) (왼쪽) 및 ii) 항-fluos 항체 경쇄 (SEQ ID NO: 42) + 힌지 영역 디설피드 결합이 없는 항-fluos 항체 전체 길이 중쇄-홀 (SEQ ID NO: 60) + 힌지 영역 시스테인 잔기가 없는 MHCFCRP-노브-K370E (SEQ ID NO: 63) (오른쪽) 의 정제.
- [1453] **도 17:** 힌지-영역 디설피드 결합이 없는 출발 물질을 사용한 본 발명에 따른 교환 반응의 결과: 양성 대조군으로서 정제된 bsAb 를 갖는 입력 분자의 2.5 μ M 농도는 Fc-영역 사슬간 디설피드 결합이 없는 단일특이적 2/3-IgG 입력 분자와의 사슬 교환을 통한 성공적인 bsAb 생성을 증명한다.
- [1454] **도 18:** 2/3 IgG (왼쪽) 및 IgG (오른쪽) 로 예시된 본 발명에 따른 교환 반응에 의한 bsAb (이중특이적 항체) 의 생성.
- [1455] **도 19:** Fab 가 애피바디 (왼쪽) 및 IgG (오른쪽) 로 대체된 2/3 IgG 로 예시된 본 발명에 따른 교환 반응에 의한 bsAb (이중특이적 항체) 의 생성.
- [1456] **도 20:** 세포 배양 상청액으로부터 cOmplete™ His-Tag 정제 후 본 발명에 따른 교환 반응에 사용하기 위한 정제된 애피바디 구조체의 SEC 크로마토그램; 수평선은 추가 연구를 위해 풀링된 분획을 나타낸다.
- [1457] **도 21:** 본 발명에 따른 교환 반응에 사용되는 SEC-정제된 애피바디 구조체의 SDS-PAGE; M = 마커, S = 샘플.
- [1458] **도 22:** ELISA 분석 계획. 반응물은 His-tag 를 가지며, Ni-코팅된 플레이트에 결합할 수 있지만, 기능성 비오틴(Bio)-결합 엔터티를 갖지 않으며, 따라서 Bio-Cy5 에 결합하지 않는다. 본 발명에 따른 교환 반응에서 사슬 교환 시에만, 기능성 항-비오틴 결합 부위가 생성되며, 이는 Bio-Cy5 포획 및 형광 신호 검출을 가능하게 한다.
- [1459] **도 23:** ELISA 분석 결과. ELISA 는 Fab arm 및 비-항체 결합 스캐폴드를 보유한 엔터티 사이의 사슬 교환을 확인한다.
- [1460] **도 24:** 힌지-영역 디설피드 결합을 갖거나 갖지 않는, 즉, 환원 (적색) 및 비-환원 (녹색) 조건하에서 2/3-IgG 로 수행된 본 발명에 따른 교환 반응. 교환 반응은 실시예에 기재된 브릿징 분석을 사용하여 모니터링하였다. 음성 대조군 (회색) 은 모두 단일특이적 2/3-IgG 출발 분자였다.
- [1461] **도 25:** IgG1 힌지 영역의 변형에 의해, 즉, 디설피드 결합의 제거에 의해, 또는 힌지 영역의 단축에 의해, 개별 결합 부위 사이의 상이한 거리가 조작될 수 있다.
- [1462] **도 26:** 제 2 Fab-영역을 포함하는 2/3-IgG 와의 본 발명에 따른 교환 반응.
- [1463] **도 27:** 정제된 Fab-확장된 2/3-IgG 의 SEC 크로마토그램.
- [1464] **도 28:** 비오틴- 또는 FITC-표지된 단백질의 연속 주입 (비오틴-표지를 먼저, FITC-표지를 두번째로, 및 FITC-표지를 먼저 주입하고, 비오틴-표지를 두번째로) 에 의해 수득된 이중특이적 항체 <FITC><CD3>-노브-HC (dA)+<비오틴>-홀-nc-His (ncB) 에 대한 SPR 센서그램.
- [1465] **도 29:** C-tag 를 포함하는 출발 2/3-IgG 및 본 발명에 따른 교환 반응 후의 반응 혼합물에 대한 비-환원 CE-SDS 크로마토그램. 출발 2/3-IgG A 는 Fluo-노브-n-HC + 홀-MHCFCRP(E357K)-C-Tag 이고, 출발 2/3-IgG B 는 비오틴-홀-n-HC + 노브-MHCFCRP(K370E)-C-Tag 이다. 이중특이적 항체가 형성되고, 통과액에 수집될 수 있다는 것을 알 수 있다. C-tag MHCFCRP 는 C-tag 수지로의 교환 반응 후에 결합되고, 이로부터 용리될 수 있다. 이로써, 분리 및 정제가 달성된다.
- [1466] **도 30:** 교환 반응의 농도 의존성.
- [1467] **도 31:** 제약된 결합 부위를 포함하는 2/3-IgG 와의 본 발명에 따른 교환 반응.

- [1468] 도 32: 수득된 conAconB 교환 반응 생성물에 대한 분석 SEC 크로마토그램.
- [1469] 도 33: 수득된 conAconB 교환 반응 생성물에 대한 비-환원 CE-SDS 크로마토그램.
- [1470] 도 34: cMET- 및 Fluo-표지된 단백질의 연속 주입에 의해 수득된 이중특이적 항체 <cMET>-홀-HC (conA)+<Fluo>-노브-c-His (ncB) 에 대한 SPR 센서그램.
- [1471] **실시예**
- [1472] **실시예 1**
- [1473] **2/3-IgG 의 설계 및 모듈 조성**
- [1474] **일반 적요**
- [1475] 도 1 은 본 발명에 따른 방법에 사용되는 2/3-IgG 의 설계 및 모듈 조성을 보여준다. 이들 2/3-IgG 는 다음의 3 개의 개별 사슬로 구성된다: 하나의 경쇄 (통상적으로 경쇄 가변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 포함하는 전체 길이 경쇄), 하나의 중쇄 (통상적으로 중쇄 가변 도메인 및 힌지 영역을 포함하는 모든 중쇄 불변 도메인을 포함하는 전체 길이 중쇄), 및 하나의 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드 (통상적으로 힌지-CH2-CH3 을 포함하는 중쇄 Fc-영역 단편). 경쇄 및 중쇄의 가변 도메인은 기능성 결합 부위를 포함한다. 중쇄 (통상적으로 인간 IgG1 서브클래스로부터 유래됨) 는 노브-인트루-홀 Fc-영역 이량체의 형성을 가능하게 하기 위해서 CH3 도메인에 노브-cys 돌연변이 또는 홀-cys 돌연변이를 함유한다 (항체 중쇄의 CH3 도메인에서의 돌연변이 T366W 및 S354C 는 "노브-cys 돌연변이" 로서 표시되며, 항체 중쇄의 CH3 도메인에서의 돌연변이 T366S, L368A, Y407V, Y349C 는 "홀-cys 돌연변이" 로서 표시된다 (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여)). 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드는 소위 '더미-Fc'/HCFcRP (하기 참조), 즉, VH 및 CH1 이 결합되고, 힌지 영역 서열로 N-말단에서 시작하며, 이의 C-말단에 His6 태그가 있는 IgG1 유도체이다. 또한, 2/3-IgG 의 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드는 이의 CH3 도메인에 노브 돌연변이 또는 홀 돌연변이를 함유한다 (항체 중쇄의 CH3 도메인에서의 돌연변이 T366W 는 "노브 돌연변이" 로서 표시되며, 항체 중쇄의 CH3 도메인에서의 돌연변이 T366S, L368A, Y407V 는 "홀 돌연변이" 로서 표시된다 (Kabat EU 지수에 따른 번호 부여)). 노브- 또는 홀-돌연변이 이외에, 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드는 야생형 서열과 관련하여 하나의 (즉, 단일의 추가의) 반발 전하를 도입하는 불안정화 돌연변이를 포함한다: D356K 또는 E357K 또는 K370E 또는 K439E; SEQ ID NO: 35 내지 38; 이러한 돌연변이된 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드는 이하에서 MHCFcRP 로서 표시된다.
- [1476] 중쇄 및 MHCFcRP 는 노브-인트루-홀 돌연변이의 분포에 따라 다음의 2 가지 유형의 이중이량체를 형성할 수 있다:
- [1477] i) 중쇄-노브::MHCFcRP-홀, 및
- [1478] ii) 중쇄-홀::MHCFcRP-노브.
- [1479] 그러나, 이들 이중이량체는, 상보적 Fc-영역이 중쇄에 사슬간 디설피드를 형성하는데 필요한 추가의 CH3 시스템이 결합되어 있으며, 또한 이들은 대응하는 중쇄 반대부분이 없는 전하 돌연변이를 함유하기 때문에, 다소 '결함' 이 있다.
- [1480] **실시예 2**
- [1481] **본 발명에 따른 2/3-IgG 의 발현 및 정제**
- [1482] 2/3-IgG 의 발현은 첨단 기술을 통해 경쇄, 중쇄 (노브 또는 홀 돌연변이를 가짐) 및 대응하는 MHCFcRP (홀 또는 노브) 를 코딩하는 플라스미드를 포유 동물 세포 (예를 들어, HEK293) 에 공동-형질 주입함으로써 달성하였다.
- [1483] 보다 상세하게는, 예를 들어, 일시적 형질 주입 (예를 들어, HEK293 세포에서) 에 의한 2/3-IgG 의 제조를 위해, CMV-Intron A 프로모터를 갖거나 갖지 않는 cDNA 조직 또는 CMV 프로모터를 갖는 게놈 조직에 기초한 발현 플라스미드를 적용하였다.
- [1484] 항체 발현 카세트 이외에, 플라스미드는 다음을 함유하였다:
- [1485] - 대장균에서 이러한 플라스미드의 복제를 허용하는 복제의 기점,
- [1486] - 대장균에서 암피실린 내성을 부여하는 β -락타마아제 유전자, 및

- [1487] - 진핵 세포에서 선택 가능한 마커로서 생쥐로부터의 디하이드로폴레이트 리덕타아제 유전자.
- [1488] 각각의 항체 유전자의 전사 단위는 하기의 요소로 구성되었다:
- [1489] - 5'-말단에 고유한 제한 부위,
- [1490] - 인간 시토크로마틴으로부터의 즉각적인 초기 인핸서 및 프로모터,
- [1491] - 이어서, cDNA 조직의 경우에 Intron A 서열,
- [1492] - 인간 항체 유전자의 5'-비번역 영역,
- [1493] - 번역글로불린 중쇄 신호 서열,
- [1494] - cDNA 로서의 또는 게놈 조직에서의 항체 사슬 (번역글로불린 엑손-인트론 조직이 유지됨),
- [1495] - 폴리아데닐화 신호 서열을 갖는 3'-비번역 영역, 및
- [1496] - 3'-말단에 고유한 제한 부위.
- [1497] 항체 사슬을 포함하는 융합 유전자는 PCR 및/또는 유전자 합성에 의해 생성하였으며, 공지의 재조합 방법 및 기술로 해당하는 핵산 세그먼트의 연결에 의해, 예를 들어 각각의 플라스미드에서 고유한 제한 부위를 사용하여 조립하였다. 서브클로닝된 핵산 서열은 DNA 서열 분석에 의해 확인하였다. 일시적 형질 주입을 위해, 형질 전환된 대장균 배양물 (Nucleobond AX, Macherey-Nagel)로부터 플라스미드 제조에 의해 다량의 플라스미드를 제조하였다.
- [1498] 표준 세포 배양 기술은 문헌 [Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. and Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc.]에 기재된 바와 같이 사용하였다.
- [1499] 2/3-IgG는 제조사의 지시에 따라서 HEK293-F 시스템 (Invitrogen)을 사용하여 각각의 플라스미드로 일시적 형질 주입에 의해 생성하였다. 간략하게, 무혈청 FreeStyle™ 293 발현 배지 (Invitrogen)에서의 진탕 플라스크에서 또는 교반 발효기에서 현탁액 중에 성장하는 HEK293-F 세포 (Invitrogen)에, 각각의 발현 플라스미드 및 293fectin™ 또는 펙틴 (Invitrogen)을 형질 주입하였다. 2 L 진탕 플라스크 (Corning)의 경우, HEK293-F 세포를 600 mL에 1×10^6 세포/mL의 밀도로 시딩하고, 120 rpm, 8 % CO₂에서 배양하였다. 다음날, 세포에, A) 600 µg 총 플라스미드 DNA (1 µg/mL)를 갖는 20 mL Opti-MEM (Invitrogen) 및 B) 20 mL Opti-MEM + 1.2 mL 293fectin 또는 펙틴 (2 µg/mL)의 약 42 mL 혼합물을 대략 1.5×10^6 세포/mL의 세포 밀도로 형질 주입하였다. 글루코오스 소비에 따라서, 글루코오스 용액을 발효 과정 동안에 첨가하였다. 정확히 조립된 2/3-IgG를 표준 IgG와 같은 배양 상청액에 분비하였다. 분비된 2/3-IgG를 함유하는 상청액을 5-10 일 후에 수확하고, 2/3-IgG를 상청액으로부터 직접 정제하거나, 또는 상청액을 냉동 및 저장하였다.
- [1500] 2/3-IgG는 Fc-영역을 함유하기 때문에, 이들은 표준 단백질 A 친화성 크로마토그래피를 적용하여 정제하였다.
- [1501] MabSelectSure-Sepharose™ (GE Healthcare, Sweden) 및 Superdex 200 크기 배제 (GE Healthcare, Sweden) 크로마토그래피를 사용한 친화성 크로마토그래피에 의해 세포 배양 상청액으로부터 항체를 정제하였다.
- [1502] 간략하게, 멸균 여과된 세포 배양 상청액을 PBS 완충액 (10 mM Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl 및 2.7 mM KCl, pH 7.4)으로 평형화된 MabSelectSuRe 수지 상에서 포획하고, 평형 완충액으로 세정하고, pH 3.0의 25 mM 나트륨 시트레이트로 용출시켰다. 용출된 항체 분획을 모으고, 2 M Tris, pH 9.0으로 중화시켰다. 20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl, pH 6.0으로 평형화된 Superdex 200 26/60 GL (GE Healthcare, Sweden) 컬럼을 사용한 크기 배제 크로마토그래피로 항체 풀을 추가로 정제하였다. 2/3-IgG 함유 분획을 모으고, Vivaspin 한외 여과 장치 (Sartorius Stedim Biotech S.A., France)를 사용하여 필요한 농도로 농축시키고, -80 °C에서 저장하였다.
- [1503] 순도 및 완전성은 미세 유체 Labchip 기술 (Caliper Life Science, USA)을 사용한 CE-SDS에 의한 각각의 정제 후에 분석하였다. 제조사의 지침에 따라 HT Protein Express Reagent Kit를 사용한 CE-SDS 분석을 위해 단백질 용액 (5 µL)을 제조하고, HT Protein Express Chip을 사용한 LabChip GXII 시스템 상에서 분석하였다. LabChip GX 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하였다.

[1504] 하기의 2/3-IgG 는 상응하는 L-사슬, H-사슬 및 MHCFcRP 코딩 플라스미드의 공동-발현에 의해 생성하였다:

		항-플루오레세인-2/3-IgG- 노브-cys +		항-바이오시티나미드-2/3- IgG-홀-cys +	
	MHCFcRP	D356K-홀	E357K-홀	K370E- 노브	K439E- 노브
HEK293	단백질 A [mg/L]	122	94	129	117
	SEC [% 수율]	>70	>50	>70	>70
Expi™	단백질 A [mg/L]	>200	>200	>200	>200
	SEC [% 수율]	>90	>90	>80	>80

[1505]

[1506] 상응하는 SEC 크로마토그램을 도 3 에 나타낸다.

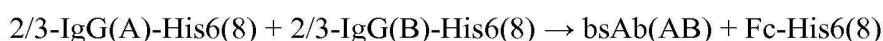
[1507] 상기에서 기술한 바와 같은 단백질 A 방법 이외에, 마찬가지로 단백질 L 이 사용될 수 있다.

[1508] 간략하게, 멸균 여과된 세포 배양 상청액을 PBS 완충액 (10 mM Na2HPO4, 1 mM KH2PO4, 137 mM NaCl 및 2.7 mM KCl, pH 7.4) 으로 평형화된 KappaSelect 수지 상에서 포획하고, 평형 완충액으로 세정하고, pH 2.5 의 50 mM 나트륨 시트레이트로 용출시켰다. 용출된 항체 분획을 모으고, 1 M Tris, pH 9.0 으로 중화시켰다. 20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl, pH 6.0 으로 평형화된 Superdex 200 26/60 GL (GE Healthcare, Sweden) 컬럼을 사용한 크기 배제 크로마토그래피로 항체 풀을 추가로 정제하였다. 2/3-IgG 함유 분획을 모으고, Vivaspin 한 외 여과 장치 (Sartorius Stedim Biotech S.A., France) 를 사용하여 필요한 농도로 농축시키고, -80 °C 에서 저장하였다.

[1509] **실시예 3**

[1510] **2/3-IgG-교환 반응에 의한 이중특이적 항체 (bsAb) 의 생성**

[1511] 경쇄, 중쇄 및 MHCFcRP 를 함유하는 2/3-IgG 는 다음의 2 가지 유형의 KiH 이중이량체에서 생성되었다: 전체 길이 중쇄-노브::MHCFcRP-홀 및 전체 길이 중쇄-홀::MHCFcRP-노브. 두 유형의 2/3-IgG 는, MHCFcRP 가 중쇄에 사슬간 디설피드를 형성하는데 필요한 추가의 CH3 시스테인이 결합되어 있으며, MHCFcRP 가 대응하는 전체 길이 중쇄 반대 부분이 없는 전하 돌연변이를 함유하기 때문에, 다소 '결함' 이 있다. 그러나, 이러한 결함이 있는 이중이량체를 구성하는 모듈은 도 4 에 나타낸 바와 같이, 대응하는 전하를 갖는 이중특이적 이중이량체에 재배열될 수 있다. 2/3-IgG A 의 전체 길이 중쇄 (노브-cys) 및 2/3-IgG B 로부터의 전체 길이 중쇄 (홀-cys) 는 대응하는 이중이량체를 형성한다. 대응하는 이중이량체는 또한 MHCFcRP (홀-전하) 가 MHCFcRP (노브-전하) 와 상호 작용할 때 형성된다. 따라서, 2 개의 상이한 2/3-IgG 의 출발 이중이량체의 일시적 분리 에 기초한 교환 반응은 우선적으로 (전하) 대응하는 이중이량체를 함유하는 생성물을 야기하였다. 그러므로, 교환 반응은 2 개의 단일특이적 2/3-IgG 를 하나의 이중특이적 IgG 및 하나의 MHCFcRP 이중이량체로 전환시켰다:



[1512]

[1513] 교환 반응은 특히 힌지-영역 사슬간 디설피드 결합을 파괴하기 위해서 환원 단계 (예를 들어, 다양한 농도의 2-MEA 또는 TCEP 의 적용) 에 의해 개시되었다. 이후에, 사슬 재배열이 자발적으로 발생하였다.

[1514] 상이한 TCEP 농도가 이러한 교환을 개시하기 위해서 적용되었다.

[1515] 그러므로, 항-플루오레세인-2/3-IgG 및 항-바이오시티나미드-2/3-IgG 입력 분자를, 384 웰 REMP® 플레이트

(Brooks, #1800030) 상에서 표시된 TCEP 농도를 갖는 총 부피 40 μ l 의 1xPBS + 0.05 % Tween 20 에서 100 μ g /ml 의 단백질 농도로 동물량으로 혼합하였다. 원심 분리 후, 플레이트를 밀봉하고, 27 °C 에서 1 시간 동안 배양하였다.

[1516] 이어서, 비오틴 - 플루오레세인 브릿징 ELISA 를 사용하여 이중특이적 항체를 정량화하였다.

[1517] 그러므로, 백색 Nunc® MaxiSorp™ 384 웰 플레이트를 1 μ g/ml 알부민-플루오레세인 이소티오시아네이트 컨주게이트 (Sigma, #A9771) 로 코팅하고, 4 °C 에서 밤새 배양하였다. 90 μ l PBST-완충액 (PBST, bidest water, 10xPBS + 0.05 % Tween 20) 으로 3 회 세정한 후, 차단 완충액 (1xPBS, 2 % 젤라틴, 0.1 % Tween-20) 을 90 μ l /well 로 첨가하고, 실온에서 1 시간 동안 배양하였다. 90 μ l PBST-완충액으로 3 회 세정한 후, 25 μ l 의 각각의 교환 반응의 1:10 희석액을 각각의 웰에 첨가하였다. 실온에서 1 시간 동안 배양한 후, 플레이트를 90 μ l PBST-완충액으로 다시 3 회 세정하였다. 0.5% BSA, 0.025% Tween-20, 1xPBS 중의 25 μ l/well 비오틴-Cy5 컨주게이트를 0.1 μ g/ml 의 최종 농도로 첨가하고, 플레이트를 실온에서 1 시간 동안 배양하였다. 90 μ l PBST-완충액으로 6 회 세정한 후, 25 μ l 1xPBS 를 각각의 웰에 첨가하였다. Cy5 형광은 Tecan Safire 2 Reader 상에서 670 nm 의 방출 파장 (649 nm 에서 여기) 에서 측정하였다.

[1518] 도 5 는 2/3-IgG-교환에 의한 bsAb 의 생성에 대한 산화 환원 조건의 분석 결과를 보여준다. TCEP 는 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드 사이, 즉, 전체 길이 반-IgG 와 MHCFCrP 사이의 힌지-디설피드 결합을 (부분적으로) 환원시키기 위해서 적용된다. 사슬 교환은 2/3-IgG 입력, bsAb 출력 및 MHCFCrP 부산물을 차별화하는 SEC 에 의해 식별할 수 있다. 2/3-IgG 와 TCEP 사이의 비율에 따른 교환 반응의 수율이 도 5 에 도시되어 있다 (비교를 위해, 모든 반응은 동일한 반응 시간 후에 분석하였다).

[1519] 모든 2/3-IgG 출발 분자, 모든 원하지 않는 부산물, 뿐만 아니라, 교환 반응 동안에 우선적으로 생성된 모든 응집체는 친화성 태그 (His6 또는 His8) 를 가진다. 교환 반응에서 제조된 바람직한 bsAb 는 His-tag 를 갖지 않는 유일한 분자이다. 그러므로, 간단한 NiNTA 흡수 단계를 적용하여, 모든 원하지 않는 분자를 제거하였다 (도 6 및 7 참조). 남아있는 bsAb (NiNTA 흡수에 의해 고갈되지 않음) 는 스크리닝 절차 및 분석에 직접 적용하여, 바람직한 기능을 갖는 bsAb 를 확인하였다.

[1520] 실시예 4

[1521] 2/3-IgG-교환 반응에 의해 생성된 이중특이적 항체 (bsAb) 의 기능 평가

[1522] 2/3-IgG-교환 반응의 생성물로서 생성된 bsAb 의 이중특이적 기능은 브릿징-ELISA 분석에 의해 평가하였다. 도 8 은 본 발명에 따른 교환 반응에 의해 생성된 항-플루오레세인/바이오시티나미드 이중특이적 항체에 대한 결합 결과를 일례로서 보여준다. 반응에서, 출발 분자로서 바이오시티나미드 (bio)-결합 2/3-IgG 및 플루오레세인 (fluos)-결합 2/3-IgG 를 사용하였다. 항-fluos/bio 이중특이적 항체의 fluos-결합 arm 은 fluos-BSA 코팅된 ELISA 플레이트에 결합한다. 이후에, bio-Cy5 에의 노출은 bsAb 의 bio-결합 arm 을 통한 bio-Cy5 의 bsAb-매개된 포획시에만 신호를 생성한다. 브릿징-매개된 신호는 bsAb 에 의해서만 발생하며, 단일 특이적 형광 또는 생체 결합체에 의해서는 발생하지 않기 때문에, 분석에서 2/3-IgG 만을 사용하는 경우 신호가 관찰되지 않았다. 이 때문에, 및 교환 반응이 분자 응집을 강제하지 않기 때문에, 이러한 결합 ELISA 는 비-bsAb 분자의 사전 NiNTA-매개된 고갈을 요구하지 않으면서, 교환 반응 혼합물에서 직접 수행될 수 있다. 반응 혼합물을 적용할 때 관찰된 신호는 기능성 bsAb 의 성공적인 생성 및 존재를 나타냈다. 결합 ELISA 를 통한 신호 생성은 교환 반응에 사용된 입력 엔터티의 양에 의존하였다.

[1523] 실시예 5

[1524] 본원에서 보고되는 바와 같은 교환 반응은 출발 2/3-IgG 의 결합 특이성 또는 V-영역 조성과 무관하게 기능적이다

[1525] 2/3-IgG 제조 및 교환 반응이 이들의 결합 특이성 및 V-영역 조성과 무관하게, 상이한 항체에 대해, 뿐만 아니라, 상이한 항체 조합에 대해 작용하는 지를 평가하기 위해서, 다양한 2/3-IgG 를 제조하였다.

[1526] 그러므로, 바이오시티나미드 (bio), 디곡시게닌 (dig), 플루오레세인 (fluos), LeY-탄수화물 (LeY), VEGF 및 PDGF 에 대해 결합 특이성을 갖는 2/3-IgG 를 사용하였다. 이들은 상기에서 기술한 바와 같은 전체 길이 경쇄, 노브- 또는 홀-전체 길이 중쇄 및 돌연변이된 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드를 코딩하는 발현 플라스미드의 공동-형질 주입에 의해 제조되었다.

사슬	SEQ ID NO:
MHCFcRP	
홀-D356K-His8	35
홀-E357K-His8	36
노브-K370E-His8	37
노브-K439E-His8	38
항-bio 항체 전체 길이 경쇄	39
항-bio 항체 전체 길이 중쇄-노브-cys	40
항-bio 항체 전체 길이 중쇄-홀-cys	41
항-fluos 항체 전체 길이 경쇄	42
항-fluos 항체 전체 길이 중쇄-노브-cys	43
항-fluos 항체 전체 길이 중쇄-홀-cys	44
항-dig 항체 전체 길이 경쇄	45
항-LeY 항체 전체 길이 경쇄	46
항-PDGF 항체 전체 길이 경쇄	47
항-VEGF 항체 전체 길이 경쇄	48
항-dig 항체 VH-CH1 단편	49
항-LeY 항체 VH-CH1 단편	50
항-PDGF 항체 VH-CH1 단편	51
항-VEGF 항체 VH-CH1 단편	52

[1527]

[1528]

SEQ ID NO: 49-52 는 dig, VEGF, PDGF 및 LeY 에 대해 특이성을 갖는 2/3-IgG 의 VH-CH1 영역을 기술한다. 이들은 SEQ ID NO: 40 및 41 의 힌지-CH2-CH3 영역에 융합되어 (즉, bio VH-CH1 영역을 대체함), 원하는 특이성을 갖는 완전한 H-사슬을 생성하였다. 이들 분자를 생성하기 위해 적용된 MHCFcRP 는 SEQ ID NO: 35-38 로서 나열된다.

[1529]

이들 2/3-IgG 모두는 비슷한 조건하에서 표준 IgG 와 유사한 수율로 제조 및 정제될 수 있다 (실시예 2 참조). 상이한 결합 특이성을 갖는 이들 2/3-IgG 의 발현에 대한 예를 하기 표에 나타낸다.

	2/3-IgG = 1/2-IgG-홀-cys + MHCFcRP-노브-E357K				
	항-dig	항-VEGF	항-PDGF	항-LeY	항-fluos
단백질 A [mg/L]	76	76	96	81	94
SEC [% 수율]	40-60	>70	>90	>95	>50

[1530]

[1531]

상이한 특이성의 bsAb 를 생성하기 위해서 적용된 교환-매트릭스에 있어서, 하기 표에 나타난 바와 같은 모든 조합의 플루오레세인, 바이오시티나미드, VEGF, PDGF 및 디곡시게닌에 대해 결합 특이성을 갖는 2/3-IgG 의 조합을 사용하였다.

교환 반응		MHCFCRP-노브-E357K				
		bio	fluos	Dig	VEGF	PDGF
MHCFCRP-노브-K370E	bio	-	bio fluos	bio dig	bio VEGF	bio PDGF
	fluos	fluos bio	-	fluos dig	fluos VEGF	fluos PDGF
	dig	dig bio	dig fluos	-	dig VEGF	dig PDGF
	VEGF	VEGF bio	VEGF fluos	VEGF Dig	-	VEGF PDGF
	PDGF	PDGF bio	PDGF fluos	PDGF Dig	PDGF VEGF	-

[1532]

[1533]

출발 2/3-IgG 의 사슬 교환 및 원하는 특이성 조합을 갖는 bsAb 의 생성을 브릿징 ELISA 에 의해 모니터링하였으며 (실시예 4 참조), 여기에서 상이한 bsAb 특이성 조합과 일치하는 플레이트-코팅된 항원 및 신호-생성 항원-컨쥬게이트/복합체가 적용되었다.

[1534]

상이한 bsAb 조합의 기능성을 평가하기 위해서 적용된 브릿징 ELISA 의 결과를 하기 표에 나타낸다. 포획 또는 검출 항원으로서 존재하는 이들의 컨쥬게이트 항원 쌍을 인식하는 bsAb 만이 브릿징 ELISA 에서 신호를 생성한다. 매트릭스에서 생성되는 다른 bsAb 는 하나 이상의 특이성의 부재로 인해 음성이다.

[1535]

표: 브릿징 ELISA 는 생성된 bsAb 의 기능성을 확인한다. 입력 분자 농도 1.3 μ M 에서 하나의 분석 내에서의 상대적 신호 강도가 표시된다. 가장 높은 값은 기준으로서 100 % 로 설정된다. N.a. = 이용 불가.

분석		바이오시티나미드-플루오레세인				
포획		플루오레세인-알부민				
검출		바이오시티나미드-Cy5				
교환 반응		MHCFCRP-홀-K370E				
		bio	fluos	dig	VEGF	PDGF
MHCFCRP-노보-E357K	bio	-	100%	2.5%	2.5%	1.9%
	fluos	97.6%	-	2.5%	1.9%	n.a.
	dig	2.2%	2.5%	-	2.2%	2.2%
	VEGF	1.9%	2.2%	2.3%	-	2.3%
	PDGF	1.8%	n.a.	2.3%	1.9%	-

분석		디곡시게닌-플루오레세인				
포획		플루오레세인-알부민				
검출		디곡시게닌-Cy5				
교환 반응		MHCFCRP-홀-K370E				
		bio	fluos	dig	VEGF	PDGF
MHCFCRP-노보-E357K	bio	-	1.9%	1.6%	1.4%	1.3%
	fluos	2.4%	-	100%	2.8%	n.a.
	dig	2.0%	52.5%	-	2.0%	1.5%
	VEGF	1.5%	1.5%	1.5%	-	1.5%
	PDGF	1.5%	n.a.	1.8%	2.8%	-

[1536]

분석		VEGF-바이오시티나미드				
포획		VEGF				
검출		바이오시티나미드-Cy5				
교환 반응		MHCFCcRP-홀-K370E				
		bio	fluos	dig	VEGF	PDGF
MHCFCcRP-노보-E357K	bio	-	9.0%	9.3%	100%	10.1%
	fluos	10.2%	-	9.4%	9.9%	n.a.
	dig	9.0%	9.1%	-	8.7%	9.9%
	VEGF	78.3%	9.2%	9.3%	-	9.5%
	PDGF	10.5%	n.a.	9.2%	10.9%	-

분석		PDGF-바이오시티나미드				
포획		PDGF				
검출		바이오시티나미드-Cy5				
교환 반응		MHCFCcRP-홀-K370E				
		bio	fluos	dig	VEGF	PDGF
MHCFCcRP-노보-E357K	bio	-	3.0%	4.1%	4.4%	81.8%
	fluos	3.2%	-	3.1%	3.3%	n.a.
	dig	3.3%	3.2%	-	3.3%	3.4%
	VEGF	4.0%	3.1%	3.1%	-	3.2%
	PDGF	100%	n.a.	3.9%	3.2%	-

[1537]

분석		디곡시게닌-VEGF				
포획		VEGF				
검출		디곡시게닌-Cy5				
교환 반응		MHCFCRP-홀-K370E				
		bio	fluos	dig	VEGF	PDGF
MHCFCRP-노보-E357K	bio	-	7.2%	6.2%	6.4%	6.1%
	fluos	6.5%	-	6.3%	6.5%	n.a.
	dig	6.2%	6.7%	-	59.7%	7.0%
	VEGF	6.1%	6.6%	100%	-	7.0%
	PDGF	6.0%	n.a.	5.9%	6.5%	-

분석		디곡시게닌-PDGF				
포획		PDGF				
검출		디곡시게닌-Cy5				
교환 반응		MHCFCRP-홀-K370E				
		bio	fluos	dig	VEGF	PDGF
MHCFCRP-노보-E357K	bio	-	3.0%	2.9%	2.9%	3.0%
	fluos	3.7%	-	3.2%	2.8%	n.a.
	dig	2.9%	3.1%	-	3.5%	62.3%
	VEGF	3.1%	3.3%	3.0%	-	2.9%
	PDGF	3.7%	n.a.	100%	3.8%	-

[1538]

[1539] VEGF 함유 이중특이적 항체의 경우, 동일한 분석이 수행되었다. 이들은 또한 각각의 조합에 대한 상기 배경 레벨 이상의 신호 만을 나타냈다.

[1540] 본 발명에 따른 교환 반응은 일반적으로 적용 가능한 방법임을 알 수 있다: 교환 반응은 출발 분자의 결합 특이성 또는 V-영역 조성과 무관하게 기능적 bsAb 를 야기한다.

[1541] 실시예 6

[1542] 포맷 변이체의 설계, 조성 및 생성

[1543] 실시예 4 의 2/3-IgG-교환 반응을, 중쇄의 C-말단에 하나의 결합 부위, 또는 N-말단 뿐만 아니라 C-말단에 결합 부위를 갖는 중쇄 중 하나를 가지는 출발 분자로 확장하였다. 교환된 bsAb 의 생성을 위해, 교환 구동 원리 (결합이 있는 입력 이중이량체를 대응하는 출력-이중이량체로 전환) 는 변경되지 않았다. MHCFCRP 의 조성은 또한 상기에서 기술한 바와 같이 유지되었다.

[1544] 도 1 및 9 내지 10 은 상이한 bsAb 포맷을 생성하기 위해서 적용된 3 개의 2/3-IgG 포맷의 모듈 조성을 나타낸다. 2/3-IgG 중 하나는 N-말단 위치에 하나의 Fab arm 을 가진다. 2/3-IgG 중 또다른 하나는 유연한

링커를 통해 중쇄의 C-말단에 부착된 Fab arm 을 가진다 (즉, 이것은 힌지-영역을 갖는 N-말단에서 시작한다).
세번째의 2/3-IgG 는 C-말단 Fab arm 뿐만 아니라, N-말단 Fab arm 을 가진다.

[1545] 이들 2/3-IgG 변이체의 발현은 경쇄, 중쇄 (노브 또는 홀) 및 상응하는 MHCfCRP (홀 또는 노브) 를 코딩하는 플라스미드를 포유 동물 세포 (예를 들어, HEK293) 에 공동-형질 주입함으로써 달성하였다 (실시예 2 참조).

[1546] 상이한 bsAb 포맷의 생성에 사용된 변형된 전체 길이 중쇄의 서열은 다음과 같다:

사슬	SEQ ID NO:
MHCfCRP	
홀-D356K-His8	35
홀-E357K-His8	36
노브-K370E-His8	37
노브-K439E-His8	38
C-말단 융합을 갖는 항-bio 항체 전체 길이 중쇄-홀-cys	53
N- 및 C-말단 융합을 갖는 항-bio 항체 전체 길이 중쇄-홀-cys	54
C-말단 융합을 갖는 항-fluos 항체 전체 길이 중쇄-홀-cys	55
N- 및 C-말단 융합을 갖는 항-fluos 항체 전체 길이 중쇄-홀-cys	56

[1547]

[1548] 2/3-IgG 는 표준 IgG 와 같은 배양 상청액에 분비하고, 표준 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 정제하였다 (실시예 2 참조). 크기 배제 및 질량-분광 분석은 정제된 2/3-IgG 변이체의 정확한 조립, 뿐만 아니라, 원하지 않는 이량체 및 응집체의 부재를 밝혀냈다. 2/3-IgG 의 발현 수율은 동일한 발현 시스템에서 표준 IgG 로 관찰된 것과 유사하였다. 각각의 데이터를 하기 표에 나타낸다.

SEQ ID NO:	항-플루오레세인 항체-노브-cys + MHCfCRP-홀-E357K			항-바이오티나미드 항체 -홀-cys + MHCfCRP-노브-K370E		
	43 + 36 (N-Fc)	55 + 36 (C-Fc)	56 + 36 (NC-Fc)	41 + 37 (N-Fc)	53 + 37 (C-Fc)	54 + 37 (NC-Fc)
단백질 A [mg/L]	94	94	75	129	87	75
SEC [% 수율]	55	90	87	40-80	61	63

[1549]

[1550] **실시예 7**

[1551] **상이한 원자가, 화학양론 및 형태에서 조합된 결합 기능성을 갖는 bsAb 의 특성화**

[1552] 3 개의 상이한 출발 분자 (N-말단, C-말단, N- 및 C-말단 결합 부위를 갖는 2/3-IgG) 를 본 발명에 따른 방법에서 서로 조합하여 9 개의 상이한 bsAb 포맷을 야기할 수 있다. 이들은 개별 결합 부위의 원자가, 형태 및 위치가 상이하다. 이들 상이한 bsAb 를 생성하기 위한 교환 반응은 실시예 3 에서 기술한 바와 동일한 조건 하에서 수행하였다.

[1553] 모든 유형의 입력 포맷은, MHCfCRP 가 중쇄에 사슬간 디설피드를 형성하는데 필요한 추가의 CH3 시스테인이 결합되어 있으며, 이것은 반발 전하 돌연변이 (즉, 대응하는 전체 길이 중쇄 반대부분이 없는 전하) 를 함유하기 때문에, '결합' 이 있다. 이러한 "결합이 있는" 이중이량체를 구성하는 중쇄는 본 발명에 따른 방법에서 재배열되어 (전하 및 디설피드) 대응하는 이중이량체를 형성한다. 상이한 유형의 전체 길이 중쇄 (홀-cys 를 갖는 노브-cys) 는 대응하는 이중이량체를 형성한다. 대응하는 이중이량체는 또한 MHCfCRP (노브-전하를 갖는 홀-전하) 로부터 형성된다.

[1554] 이러한 이론에 구애되지 않고, 2 개의 상이한 2/3-IgG 의 결합이 있는 이중이량체의 일시적 분리에 기초한 교환 반응은 대응하는 전하를 갖는 우선적으로 완벽하게 대응하는 이중이량체 및, 존재하는 경우, 디설피드 결합의 형성을 위한 시스테인 잔기를 함유하는 생성물을 야기할 것으로 추정된다. 그러므로, 교환은 단일특이적 2/3-IgG 를 이중특이적 IgG (상이한 포맷) 뿐만 아니라, 상응하는 (가변 영역 없음, 즉, 비-표적 결합 적격) Fc-영역 이중이량체로 전환시킨다.

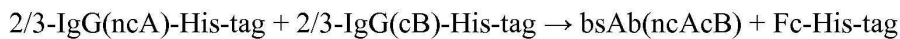
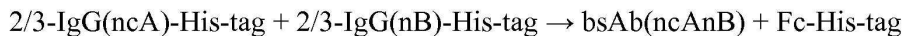
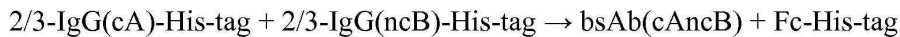
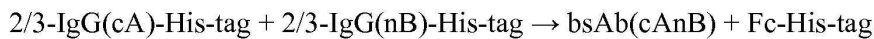
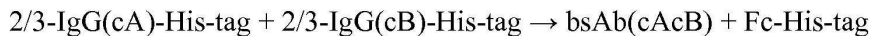
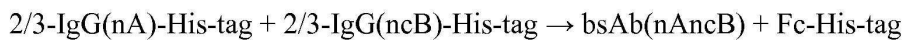
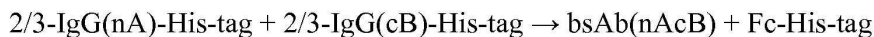
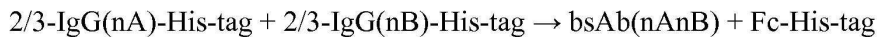
[1555] 교환 반응의 설명을 위해, 입력 분자는 다음과 같이 지칭된다:

[1556] - 전체 길이 중쇄 (H-사슬) 의 정상 N-말단에 Fab arm 을 갖는 분자의 경우, 'nA 또는 nB',

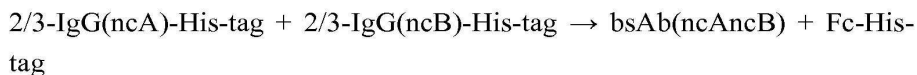
[1557] - H-사슬의 C-말단에 Fab arm 을 갖는 분자의 경우, 'cA 또는 cB',

[1558] - H-사슬의 N-말단 뿐만 아니라, C-말단에 Fab arm 을 갖는 분자의 경우, 'ncA 또는 ncB'.

[1559] 상이한 포맷-교환 반응은 다음과 같다:



[1560]



[1561]

[1562] 교환 반응은 사슬간 (힌지-영역) 디설피드 결합을 파괴하기 위해서 환원 단계에 의해 개시되고, 이후에 사슬 재 배열이 자발적으로 발생한다. 교환 반응 동안에 잠재적으로 형성될 수 있는 모든 입력 분자, 모든 부산물, 뿐만 아니라, 응집체는 친화성 태그 (예를 들어, His6- 또는 His8-tag) 를 보유한다. 그러나, 교환 반응의 bsAb 생성물은 친화성 태그를 갖지 않으며, 따라서 친화성 (예를 들어, NiNTA) 흡수 크로마토그래피를 통해 분리될 수 있다. bsAb (상이한 포맷) 는 최적의 기능성을 갖는 상이한 bsAb 포맷을 식별하고 순위를 지정하기 위해서 스크리닝 절차 및 분석에 직접 적용될 수 있다.

[1563] 이중특이적 포맷은 상기에서 기술한 입력 2/3-IgG 를 384 웰 MTP 포맷으로 교환한 후, ELISA 를 브릿징하여 기능적 조립을 평가함으로써 생성되었다. 그러므로, 교환 파트너 (홀-cys 돌연변이를 함유하는 전체 길이 중쇄 및 MHCFcRP-노브-K370E 로 이루어진 2/3-IgG 분자 1; 노브-cys 돌연변이를 함유하는 전체 길이 중쇄 및 MHCFcRP-홀-E357K 로 이루어진 2/3-IgG 분자 2) 를 총 부피 100 μ l 의 1xPBS + 0.05 % Tween 20 에서 동물량 (4 μ M) 으로 혼합하였다. 단백질 용액을 384-딥 웰 플레이트 (Greiner 384 masterblock®) 에서 11 회 1:2 로 희석시켰다. 희석 시리즈로부터의 20 μ l 의 각각의 샘플을 20 μ l 의 0.5 mM TCEP 용액과 384 웰 REMP® 플레이트 (Brooks, #1800030) 에서 최종 단백질 농도 200 - 0.2 μ g/ml 및 0.25 mM TCEP 로 혼합하였다. 원심 분리 후, 플레이트를 밀봉하고, 37 °C 에서 1 시간 동안 배양하였다.

[1564] 대조예로서, 한 쪽에 bio-결합 기능성 및 다른 쪽에 플루오레세인-결합 기능성을 함유하는 bsAb 를 사용하였다. 생성된 bsAb 의 기능성은 비오틴 - 플루오레세인 브릿징 ELISA 에 의해 평가하였다. 그러므로, 백색 Nunc® MaxiSorp™ 384 웰 플레이트를 1 μ g/ml 알부민-플루오레세인 이소티오시아네이트 컨쥬게이트 (Sigma, #A9771) 로 코팅하고, 4 °C 에서 밤새 배양하였다. 90 μ l PBST-완충액 (PBST, 이중 증류수, 10xPBS Roche #11666789001 + 0.05 % Tween 20) 으로 3 회 세정한 후, 90 μ l/well 차단 완충액 (1xPBS, 2 % BSA, 0.1 % Tween 20) 을 첨가하고, 실온에서 1 시간 동안 배양하였다. 90 μ l PBST-완충액으로 3 회 세정한 후, 25 μ l 의 각각의 교환 반응의 1:4 희석액을 각각의 웰에 첨가하였다. 실온에서 1 시간 동안 배양한 후, 플레이트를 90 μ l PBST-완충액으로 다시 3 회 세정하였다. 0.5% BSA, 0.025% Tween 20, 1xPBS 중의 25 μ l/well 비오틴-Cy5 컨쥬게이트를 0.1 μ g/ml 의 최종 농도로 첨가하고, 플레이트를 실온에서 1 시간 동안 배양하였다. 90 μ l PBST-완충액으로 6 회 세정한 후, 25 μ l 1xPBS 를 각각의 웰에 첨가하였다. Cy5 형광은 Tecan

Safire 2 Reader 상에서 670 nm 의 방출 파장 (649 nm 에서 여기) 에서 측정하였다.

[1565] 하나의 플루오레세인 결합 엔터티 및 하나의 바이오시티나미드 결합 엔터티를 사용하여, 상이한 포맷의 2/3-IgG 의 교환을 통한 상이한 bsAb 포맷을 생성하였다. 입력 분자 및 교환-유도된 출력 분자는 도 11 에 도시되어 있다.

[1566] 생성된 bsAb 의 기능성은 포획 항원으로서 fluos-BSA 및 bio-Cy5 를 사용해, 도 12 에 나타난 바와 같이 ELISA 를 브릿징하여 이중특이적 브릿징 결합 기능성을 검출함으로써 평가하였다. 모든 상이한 포맷은 브릿징 ELISA 신호를 야기한다.

[1567] 이들 결과는 강력하고 높은 처리량의 호환성 방식으로 사슬 교환 반응을 통해 본 발명에 따른 방법을 사용하여 상이한 포맷을 생성할 가능성을 보여준다.

[1568] 실시예 8

[1569] **2/3-IgG-교환에 의한 기능적 bsAb 의 생성 및 원하는 기능성을 갖는 bsAb 의 스크리닝/식별은 소형화 및 높은 처리량, 뿐만 아니라, 자동화 기술과 호환성이다**

[1570] 결합 부위 서열 및/또는 포맷이 다른 많은 수의 상이한 bsAb 를 취급하기 위해서, 높은 처리량 및 자동화 기술의 적용이 요구되며, 많은 경우에 있어서 필요하다. 그러므로, 본 발명에 따른 2/3-IgG 교환 방법을 통한 bsAb 생성, 뿐만 아니라, 이에 의해 생성된 이중특이적 항체의 기능성, 즉, 이중특이적 결합의 분석/스크리닝이 높은 처리량 및 자동화 기술과 호환성이 되도록 소형화될 수 있는 지를 분석하였다.

[1571] 그러므로, 2/3-IgG 교환 반응을 수행하였으며, 반응 생성물을 384 웰 플레이트에서 소형화된 규모로 분석하였다.

[1572] 매트릭스 스크린은 384 웰 MTP 포맷에서 다음과 같이 설정하였다: 교환 파트너 (홀-cys 돌연변이를 함유하는 전체 길이 중쇄 및 MHCFCRP-노브-K370E 로 이루어진 2/3-IgG 분자 1; 노브-cys 돌연변이를 함유하는 전체 길이 중쇄 및 MHCFCRP-홀-E357K 로 이루어진 2/3-IgG 분자 2) 를 총 부피 30 μ l 의 1xPBS + 0.05 % Tween 20 에서 동몰량 (4 μ M) 으로 혼합하였다. 단백질 용액을 384-딥 웰 플레이트 (Greiner 384 masterblock®) 에서 4 회 1:3 으로 희석시켰다. 희석 시리즈로부터의 20 μ l 의 각각의 샘플을 20 μ l 의 0.5 mM TCEP 용액과 384 웰 REMP® 플레이트 (Brooks, #1800030) 에서 최종 단백질 농도 2 μ M - 0.025 μ M 및 0.25 mM TCEP 로 혼합하였다. 원심 분리 후, 플레이트를 밀봉하고, 37 °C 에서 1 시간 동안 배양하였다.

[1573] 이어서, 이에 의해 생성된 bsAb 의 기능성을 소형화된 높은 처리량 포맷으로 브릿징 ELISA (상기 참조) 를 통해 평가하였다: 백색 Nunc® MaxiSorp™ 384 웰 플레이트를 1 μ g/ml 알부민-플루오레세인 이소티오시아네이트 컨주게이트 (Sigma, #A9771), 1 μ g/ml PDGF (CST, #8912) 또는 1 μ g/ml VEGF121 로 코팅하고, 4 °C 에서 밤새 배양하였다. 90 μ l PBST-완충액 (PBST, 이중 증류수, 10xPBS + 0.05 % Tween 20) 으로 3 회 세정한 후, 차단 완충액 (1xPBS, 2 % BSA, 0.1 % Tween 20) 을 90 μ l/well 로 첨가하고, 실온에서 1 시간 동안 배양하였다. 90 μ l PBST-완충액으로 3 회 세정한 후, 25 μ l 의 각각의 교환 반응의 1:4 희석액을 각각의 웰에 첨가하였다. 실온에서 1 시간 동안 배양한 후, 플레이트를 90 μ l PBST-완충액으로 다시 3 회 세정하였다. 0.5% BSA, 0.025% Tween 20, 1xPBS 중의 25 μ l/well 비오틴-Cy5 컨주게이트 또는 dig-Cy5 컨주게이트를 0.1 μ g/ml 의 최종 농도로 첨가하고, 플레이트를 실온에서 1 시간 동안 배양하였다. 90 μ l PBST-완충액으로 6 회 세정한 후, 25 μ l 1xPBS 를 각각의 웰에 첨가하였다. Cy5 형광은 Tecan Safire 2 Reader 상에서 670 nm 의 방출 파장 (649 nm 에서 여기) 에서 측정하였다. 교환 반응, 및 VEGF 또는 PDGF 또는 dig 또는 bio 또는 fluos 에 결합하는 2/3-IgG 모듈을 사용한 이들 분석의 브릿징 ELISA 의 세부 내용은 도 13 에 나타나 있다. 하나의 예시적인 이들 분석의 결과는 도 14 에 나타나 있으며, 2/3-IgG-교환 반응 및 후속하는 기능적 분석이 수행될 수 있고, 높은 처리량 및 자동화 기술과 호환성임을 증명한다.

[1574] 실시예 9

[1575] **하나의 결합 부위를 갖는 제 1 항원 및 2 개의 다른 결합 부위를 갖는 추가의 항원을 표적화하는 3 개의 결합 부위를 갖는 bsAb 의 생성**

[1576] 본 발명에 따른 방법은 T-세포 이중특이적 항체 (TCB) 의 생성에 사용될 수 있다. 이들은 상기에서 기술한 바와 같은 포맷을 가질 수 있다 (예를 들어, WO 2013/026831 참조). TCB-교환 접근법의 경우, 하나의 H-사슬 (상기에서 기술한 바와 같은 노브-cys 또는 홀-cys 를 가짐) 은 이의 힌지의 CD3-결합 CrossFab-유도된 엔터티 N-말단을 함유하며, 추가로 또다른 항체-유도된 표적화 엔터티에 의해 N-말단에서 확장된다. 교환 반응

은 상기에서 기술한 동일한 조건하에서 수행되며, CD3 결합 엔터티 및 2 개의 추가의 결합 엔터티를 보유하는 TCB 를 야기한다. 이들은 표적 세포 항원에 결합할 수 있다. 이들 분자는 T-세포 상의 CD3 및 표적 (예를 들어, 종양) 세포 상의 항원에 동시에 결합하여, 표적 세포의 사멸을 유도할 수 있다.

[1577] 실시예 10

[1578] Fc-영역 사슬간 디설피드 결합 (힌지 영역 및 CH3 도메인에서) 을 갖지 않는 2/3-IgG 의 설계 및 생성

[1579] 2/3-IgG 를 함유하는 Fc-영역 (힌지 영역) 디설피드와의 사슬 교환은 사슬 분리 및 원하는 bsAb 의 후속 조립을 가능하게 하기 위한 초기 단계로서 환원을 필요로 한다. 환원 단계 및 환원제를 제거하기 위한 관련된 필요성을 회피하기 위해서, 힌지 영역 디설피드 결합을 갖지 않는 2/3-IgG 가 생성되었다. 원리는 도 15 에 도시되어 있다. 힌지-디설피드 형성을 담당하는 힌지 영역에서의 시스테인 잔기는 세린으로의 돌연변이에 의해 제거되었다. 또한, KiH 관련된 디설피드 결합을 형성하는 위치 354 또는 349 의 CH3-시스테인은 생략되었다. 각각의 아미노산 서열은 다음과 같다:

사슬	SEQ ID NO:
힌지-영역 시스테인 잔기가 없는 항-bio 항체 전체 길이 중쇄-노브	57
힌지-시스테인 잔기가 없는 항-bio 항체 전체 길이 중쇄-홀	58
힌지-시스테인 잔기가 없는 항-fluos 항체 전체 길이 중쇄-노브	59
힌지-시스테인 잔기가 없는 항-fluos 항체 전체 길이 중쇄-홀	60
MHCFcRP	
힌지-시스테인 잔기가 없는 홀-D356K-His8	61
힌지-시스테인 잔기가 없는 홀-E357K-His8	62
힌지-시스테인 잔기가 없는 노브-K370E-His8	63
힌지-시스테인 잔기가 없는 노브-K439E-His8	64

[1580] 상기 2/3-IgG 의 발현은 경쇄, 전체 길이 중쇄 (노브 또는 홀) 및 상응하는 MHCFcRP (홀 또는 노브) 를 코딩하는 플라스미드를 포유 동물 세포 (예를 들어, HEK293) 에 공동-형질 주입함으로써 달성하였다 (실시예 2 참조).

[1581] 2/3-IgG 는 표준 IgG 와 같은 배양 상청액에 분비하고, 이어서 표준 단백질 A 친화성 및 크기 배제 크로마토그래피에 의해 정제하였다 (실시예 2 참조). 이어서, 크기 배제 크로마토그래피 및 SDS-PAGE 를 통해 원하는 100 kDa 2/3-IgG 발현 생성물을 분석하였다 (도 16). 이것은 2/3-IgG 의 정확한 조립, 뿐만 아니라, 원하지 않는 이량체 및 응집체의 부재를 입증한다. 이러한 분자는 Fc-영역 (힌지 영역 및 CH3 도메인) 사이의 디설피드에 의해 안정화되지 않기 때문에, 이것은 놀라운 일이다. Fc-영역 사슬간 디설피드 결합을 갖지 않는 항-fluos- 및 항-bio-2/3-IgG 의 정제 수율을 하기 표에 나타낸다.

	힌지 영역 시스테인 잔기가 없는 항-bio 항체 경쇄 (SEQ ID NO: 39) + 항-bio 항체 중쇄-노브 (SEQ ID NO: 57) + 힌지 영역 시스테인 잔기가 없는 MHCFCRP-홀-E357K (SEQ ID NO: 62)	힌지 영역 디설파이드 결합이 없는 항-fluos 항체 경쇄 (SEQ ID NO: 42) + 항-fluos 항체 전체 길이 중쇄-홀 (SEQ ID NO: 60) + 힌지 영역 시스테인 잔기가 없는 MHCFCRP-노브-K370E (SEQ ID NO: 63)
단백질 A [mg/L]	>100	>100
SEC 수율 [mg/L 100 kDa]	>50	>50

실시예 11

환원이 없는 2/3-IgG-교환 반응에 의한 기능적 bsAb 의 생성

Fc-영역 사슬간 디설파이드 결합을 함유하지 않는 2/3-IgG 를, 초기 환원 단계를 생략한 것을 제외하고는, 상기에 서 기술한 바와 같은 사슬 교환 반응 (실시예 3 참조) 에 적용시켰다. 2/3-IgG 는 전체 길이 중쇄와 MHCFCRP 사이에 사슬간 디설파이드 결합을 갖지 않는 fluos- 또는 bio-결합 부위 및 Fc-영역을 함유하였다. 이들 2/3-IgG 의 조성 및 제조는 실시예 10 에 기재되어 있다. 환원의 개시가 없는 교환 반응 후, 브릿징 ELISA 를 수행하여 bsAb 의 이중특이적 기능성을 입증하였다. 브릿징 ELISA 는 고정화된 fluos-BSA 에 교환 반응 생성물의 첨가, 이어서 세정 단계, 및 bsAb 의 제 2 결합 arm 의 존재를 조사하기 위한 bio-Cy5 의 후속 첨가를 포함하였다 (브릿징 ELISA 의 세부 사항에 대해서는 이전 실시예 참조). 정확히 조립된 기능성 bsAb 만이 이들의 fluos-결합 부위에 의해 분석 플레이트에 결합할 수 있고, 유지되며, bio-Cy5 를 포획 및 보유함으로써 신호를 생성한다. 이중특이성이 없는 분자는 플레이트에 결합할 수 없거나 (bio-전용 결합제), 또는 bio-Cy5 를 발생하는 신호를 포획할 수 없기 (fluos-전용 결합제) 때문에, 신호를 생성하지 않는다. 이들 분석의 결과 (이 실시예에서는, 양성 대조군으로서 정제된 bsAb 를 사용하여 2.5 μ M 농도의 입력 분자에서 교환 반응을 수행) 는 도 17 에 도시되어 있다. 결과는 Fc-영역 사슬간 디설파이드 결합을 갖지 않는 단일특이적 2/3-IgG 입력 분자와의 사슬 교환을 통한 성공적인 bsAb 생성을 입증한다. 생산적인 사슬 교환은 초기 환원의 필요없이 진행되었다. 따라서, Fc-영역간 폴리펩티드 디설파이드 결합의 제거는 초기 환원 단계의 필요성을 제거하였다. 생성된 bsAb 는 비-공유적 Fc-Fc 상호 작용에 의해 함께 유지된다. 따라서, Fc-Fc 사슬간 디설파이드의 제거는 환원의 필요없이 상응하는 Fc-영역 불일치 구동 교환 반응을 허용한다.

실시예 12

사슬 교환 반응은 부분적으로 불안정화된 전체 길이 중쇄 - MHCFCRP 계면에 의해 유도된다

2/3-IgG 를 bsAb 로 전환시키기 위한 원동력은 전체 길이 중쇄와 MHCFCRP 사이에 설계된 '결합이 있는' 계면이다. 이러한 인공 반발 계면은 MHCFCRP 의 노브- 또는 홀-CH3 도메인에 도입된 돌연변이의 결과이다. MHCFCRP 는 2/3 IgG 의 발현 동안에 상응하는 ("정상") 노브- 또는 홀-파트너와 여전히 연결되어 있다 (상기 실시예 참조). 이들 분자는 바람직하지 않은 응집 경향없이 충분히 거동하는 분자로서 2/3-IgG 를 제공하는데 충분한 안정성을 가진다.

이러한 이론에 구애되지 않고, 2 개의 상보적 2/3-IgG 가 근접하며, 전체 길이 항체 중쇄::MHCFCRP 쌍이 서로 옆으로 부분적으로 방출될 때, bsAb 로 이어지는 본 발명에 따른 교환 반응이 발생한다. 전체 길이 항체 중쇄 (CH3) 계면이 완벽하기 때문에, 이러한 조건하에서는 대응하는, 즉, 비-하전된, 비-반발된 노브-홀 전체 길이 중쇄의 재조립이 선호되어야 한다. 따라서, 형성된 bsAb 의 전체 길이 중쇄는 부분적으로 불완전한 (전하 불일치) 2/3-IgG 분자의 재형성보다 우선적으로 연결되어 있다. 따라서, 설계된 부분적으로 불안정화된 (전하 반발) CH3 계면은 성공적인 직접 사슬 교환 반응을 위한 핵심 매개변수이다.

[1590] Fc 계면, 특히 CH3-CH3 계면의 부분적인 불안정화는, 전체 길이 항체 중쇄 상에서 상호 작용 잔기를 유지하면서, MHCFCRP 의 CH3 잔기를 돌연변이시킴으로써 달성될 수 있다.

[1591] 전체 길이 항체 중쇄::MHCFCRP 계면에 영향을 미치는 MHCFCRP 의 CH3 도메인에 도입될 수 있는 예시적인 돌연변이가 하기 표에 제공된다.

위치 (EU 번호 부여)	교란 돌연변이
345E	R
347Q	K
349Y	W 또는 E
351L	F 또는 Y
354S	E 또는 V
356D	S 또는 A 또는 K
357E	S 또는 A 또는 L 또는 F 또는 K
360K	S 또는 E
362Q	E
364S	V 또는 L
366T	I
368L	F 또는 V
370K	E
390N	E
392K	E 또는 D
394T	I
397V	Y
399D	A 또는 K
400S	K
401D	R
405F	W
407Y	W 또는 L 또는 I
409K	D 또는 E 또는 I
439K	E
441L	Y

[1592]

[1593] 일부 돌연변이는 계면에 변경된 전하를 놓는 교환을 포함한다. 전하 돌연변이는 이미 존재하는 안정화 전하 쌍을 약화 또는 파괴하거나, 또는 반발 효과를 야기하거나, 또는 둘 다를 초래한다.

[1594] 유사하게, 상이한 크기의 측쇄를 갖는 아미노산이 도입되어 입체 반발 효과를 생성할 수 있다. 이러한 돌연변이는 존재하는 소수성 계면 상호 작용을 약화 또는 방해하거나, 또는 입체 장애를 발생시키거나, 또는 이들을 조합시킨다.

[1595] 전하 및/또는 입체 효과를 통해 부분적으로 불안정화되는 돌연변이는 또한 서로 조합될 수 있다.

[1596] 또한, MHCFCRP 에 도입되는 전하 및/또는 입체 변경을 함유하는 제 1 의 2/3-IgG 는, 제 1 의 2/3-IgG 로부터의 MHCFCRP 의 것에 대응하는 MHCFCRP 에 도입되는 상이한 전하 및/또는 입체 변경을 함유하는 제 2 의 2/3-IgG 와 조합될 수 있다.

[1597] 2/3-IgG 뿐만 아니라, 생성된 bsAb 는, 쌍을 이룬 CH3 도메인이 한 쪽에 노브-돌연변이 및 다른 쪽에 홀-돌연변이를 보유하는 방식으로 조립된다. 그러므로, MHCFCRP 의 상응하는 노브- 또는 홀-잔기의 야생형 구성에 대한 '역-돌연변이' 는 또한 계면 장애를 발생한다. 노브- 또는 홀-CH3-도메인과 야생형 도메인의 이러한 조합을 하기 표에 나타낸다.

CH3 홀	
위치 (EU 번호 부여)	교란 역돌연변이
349C*	Y
366S	T
368A	L
407V	Y
CH3 노브	
Fc 위치 (EU 번호 부여)	교란 역돌연변이
354C*	S
366W	T

[1598]

[1599] 이들 역 돌연변이는 CH3-CH3-계면을 부분적으로 불안정화시키기 위해서 적용될 수 있다.

[1600] 이들 역 돌연변이는 또한 상기 표에 기재된 것을 포함하는 다른 교란 돌연변이와 조합하여 적용될 수 있다.

[1601] 상기에서 기술한 바와 같은 모든 부분적으로 교란하는 개별 돌연변이 또는 돌연변이의 조합은 또한, 이들이 2/3-IgG 를 부분적으로 불안정화시키고, 교환 반응의 제 2 생성물로서의 노브-MHCFcRP::홀-MHCFcRP 이중이량체를 여전히 안정화시키며, 이로써 반응 평형을 생성물 측으로 추가로 이동시키는 방식으로 선택될 수 있다 (교환 반응).

[1602] **실시예 13**

[1603] **비-항체 부분 및 사슬-교환 반응에 의한 표적화를 가능하게 하는 2/3-IgG 의 설계**

[1604] 본 발명에 따른 교환 반응은 CH3 노브-및-홀 엔터티 사이의 계면 돌연변이를 이용하여 사슬 교환 반응을 유도한다. 도 18 은 다음의 원리를 입증한다: 2 개의 각각의 분자와 '완벽하지 않은' Fc-계면으로 구성된 H-사슬 이중이량체의 상호 작용은 이들의 H-사슬을 교환하여, '완벽한' H-H 사슬 계면을 각각 가지는 2 개의 새로운 엔터티를 형성한다. 이 원리는, 예를 들어 스크리닝 목적을 위해, 다양한 종류의 이중특이적 항체 및 포맷을 생성하는데 적용될 수 있다.

[1605] 스템-단위는, 예를 들어 비-항체 부분과 같은 임의의 결합제와 함께 사용될 수 있다. 2/3-IgG 에서의 통상적인 Fab 결합 단위를 대체하는, 비-항체 결합 단위인 HER2 를 표적화하는 에피타입을 함유하는 분자가 설계되었다 (문헌 [ZHER2:342; Orlova et al., Cancer Res. 66 (2006) 4339-4348]). 2 개의 폴리펩티드 사슬의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 83 및 84 이다. 본 발명에 따른 원리는 또한 이 경우에도 적용되며, 특히 도 19 에 도시한 이러한 교환 반응에 적용된다.

[1606] 분자는 실시예 2 에서 기술한 바와 같이 제조되었고, 교환 반응은 실시예 3 에서 기술한 바와 같이 수행되었다.

[1607] 보다 상세하게는, 발현을 위한 서열은 유전자 합성 또는 돌연변이 유발에 의해 생성되었으며, CMV 프로모터-기반 발현 플라스미드에 클로닝되었다. 구성물은, 본 발명에 따른 사슬 교환 반응에 적용되어야 하는 이들의 결합 엔터티 내에 Her2 에피타입 결합제를 보유하였다.

[1608] 일시적 발현은 제조사의 지시에 따라서 FreeStyle™ 293-F 세포 (Invitrogen) 에서 수행하였다. 간략하게, 무혈청 FreeStyle™ 293 발현 배지 (Invitrogen) 에서의 진탕 플라스크에서 현탁액 중에 성장하는 HEK293-F 세포 (Invitrogen) 에, 각각의 발현 플라스미드 및 293-fectin™ (Invitrogen) 을 형질 주입하였다. 2 L 진탕 플라스크 (Corning) 의 경우, HEK293-F 세포를 600 mL 에 1×10^6 세포/mL 의 밀도로 시딩하고, 120 rpm, 8 % CO₂ 에서 배양하였다. 다음날, 세포에, 600 µg 총 플라스미드 DNA (1 µg/mL) 를 갖는 20 mL Opti-MEM (Invitrogen) 및 20 ml Opti-MEM + 1.2 mL 293fectin (2 µl/mL) 의 약 42 mL 혼합물을 대략 1.5×10^6 세포/mL 의 세포 밀도로 형질 주입하였다. 제조사의 프로토콜에 따라서 발현 과정 동안에 볼루스 글루코오스 용액 및 공급 용액을 첨가하였다. 정확히 조립된 단백질을 배양 상청액에 분비하였다. 형질 주입 후 6 일 쯤에 상청액을 수확하였다.

[1609] 에피타입-함유 단백질의 정제는 cOmplete™ His-Tag 정제 수지 (Roche, Switzerland), 이어서 Superdex 200 크

기 배제 (GE Healthcare, Sweden) 크로마토그래피를 사용한 친화성 크로마토그래피에 의해 수행하였다. 간략하게, 멸균 여과된 세포 배양 상청액을 50 mM Na₂HPO₄ 및 300 mM NaCl, pH 7.4 로 평형화된 cOmplete™ His-Tag 정제 수지 상에서 포획하고, 평형 완충액으로 세정하고, 50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl 및 250 mM 이미다졸, pH 7.4 로 용출시켰다. 용출된 단백질 분획을 모으고, Vivaspin 한외 여과 장치 (Sartorius Stedim Biotech S.A., France) 를 사용하여 2 ml 총 부피로 농축시키고, 20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl, pH 6.0 으로 평형화된 Superdex 200 16/60 GL (GE Healthcare, Sweden) 컬럼을 사용한 크기 배제 크로마토그래피에 의해 추가로 정제하였다. 단백질 함유 분획을 모으고, 필요한 농도로 농축시키고, -80 °C 에서 저장하였다.

[1610] 순도 및 정확한 조성은 도 20 (친화성 정제 후의 SEC 프로파일) 및 도 21 (정제된 물질의 SDS-PAGE) 에 도시되어 있다. 제조 수율은 다른 Fab-함유 2/3-IgG (5.8 mg/L 배양) 에 필적하였다.

[1611] 본 발명에 따른 교환 반응은 비-항체 애피타디 부분을 가지는 단백질로 수행하였다. 그러므로, 단백질을 20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl, pH 6.0 에서 총 부피 300 μ l 로 각각 2 μ M 의 LeY-표적화 프로드러그 분자 (교환 반응식에 대해서는 도 19 참조) 와 혼합한 후, 37 °C 에서 1 시간 동안 배양하였다.

[1612] 기능성 결합 분자로의 프로드러그 엔터티의 본 발명에 따른 성공적인 교환 반응은 ELISA 에 의해 입증되었다. ELISA 분석 원리는 도 22 에 도시되어 있다. 반응물은 His-tag 를 갖지만, 기능성 항원-결합, 즉, 비오틴-결합 엔터티는 아직 갖지 않는다. 사슬 교환시에만 비오틴-결합 부위 (VH/VL-쌍, 항-비오틴 Fv) 가 형성되며, 이는 기능성 결합 부위이고, Bio-Cy5 포획 및 형광 신호 검출을 가능하게 한다. ELISA 의 경우, 샘플을 1 % (w/v) 소 혈청 알부민을 갖는 1xPBS 에서 1 μ M 의 반응물 단백질 농도로 희석시키고, 100 μ l 로 Black Pierce© 니켈 코팅된 96-웰 플레이트 (Thermo Fisher Scientific, USA) 에 적용하고, 실온에서 1 시간 동안 배양하였다. 250 μ l PBST-완충액 (1xPBS + 0.05 % Tween 20) 으로 3 회 세정한 후, PBST 중의 100 μ l 의 100 ng/ml 비오틴-Cy5 컨쥬게이트를 첨가하였다. 그 후, 실온에서 1 시간 동안 배양을 수행하였다. 250 μ l PBST-완충액으로 4 회 세정한 후, 100 μ l PBST 를 각각의 웰에 첨가하였다. Cy5 형광은 Tecan Infinite M200 Pro Reader 상에서 675 nm 의 방출 파장 (647 nm 에서 여기) 에서 측정하였다. 도 23 은 ELISA 의 결과를 나타내며, 비활성 프로드러그 엔터티로부터 결합 Fv 의 성공적인 사슬 교환 및 활성화를 보여준다. 이것은, 비-항체 부분이 본 발명에 따른 교환 반응에 사용될 수 있으며, 이로써 프로드러그 활성화에 사용될 수 있다는 것을 입증한다.

[1613] 실시예 14

[1614] 니켈 친화성 크로마토그래피

[1615] 미반응 출발 물질 뿐만 아니라, 히스티딘-태그 보유 교환 생성물의 제거는 니켈 친화성 크로마토그래피를 사용하여 수행할 수 있다.

[1616] 니켈 친화성 크로마토그래피는 제조사의 지시에 따라서 0.2 ml HisPur™ Ni-NTA Spin Columns (ThermoScientific) 을 사용하여 수행하였다. 교환 반응의 미정제 반응 혼합물을 평형화된 컬럼에 적용하였다. 샘플과 아가로오스-기반 친화성 물질 사이의 증가된 접촉을 위해, 컬럼을 실온에서 1 시간 동안 배양하였다. 임의로, 컬럼은 배양 동안에 회전시킬 수 있다. 비-결합된 물질은 세정-완충액을 사용하여 통과액 방식으로 원심 분리하여 용출시켰다. 3 회 세정한 후, 결합된 물질을 제조사의 지시에 따라서 용출 완충액을 사용하여 용출시켰다.

[1617] 실시예 15

[1618] 본 발명에 따른 Fab-확장된-2/3-IgG 의 발현 및 정제

[1619] Fab-확장된-2/3-IgG 의 발현은 첨단 기술을 통해 Fab-확장된-경쇄, Fab-확장된-중쇄 (노브 또는 홀 돌연변이를 가짐) 및 대응하는 MHCfCRP (홀 또는 노브) 를 코딩하는 플라스미드를 포유 동물 세포 (예를 들어, HEK293) 에 공동-형질 주입함으로써 달성하였다.

[1620] 보다 상세하게는, 예를 들어, 일시적 형질 주입 (예를 들어, HEK293 세포에서) 에 의한 Fab-확장된-2/3-IgG 의 제조를 위해, CMV-Intron A 프로모터를 갖거나 갖지 않는 cDNA 조직 또는 CMV 프로모터를 갖는 게놈 조직에 기초한 발현 플라스미드를 적용하였다. 플라스미드는 Fab-확장된-중쇄에 대한 하나의 발현 카세트 및 각각 2 개의 경쇄에 대한 발현 카세트를 함유하였다.

[1621] 항체 발현 카세트 이외에, 플라스미드는 다음을 함유하였다:

- [1622] - 대장균에서 이러한 플라스미드의 복제를 허용하는 복제의 기점,
- [1623] - 대장균에서 암피실린 내성을 부여하는 β -락타마아제 유전자, 및
- [1624] - 진핵 세포에서 선택 가능한 마커로서 생쥐로부터의 디하이드로폴레이트 리덕타아제 유전자.
- [1625] 각각의 항체 유전자의 전사 단위는 하기의 요소로 구성되었다:
- [1626] - 5'-말단에 고유한 제한 부위,
- [1627] - 인간 시토크로마티노바이러스로부터의 즉각적인 초기 인핸서 및 프로모터,
- [1628] - 이어서, cDNA 조직의 경우에 Intron A 서열,
- [1629] - 인간 항체 유전자의 5'-비번역 영역,
- [1630] - 번역글로불린 중쇄 신호 서열,
- [1631] - cDNA 로서의 또는 게놈 조직에서의 각각의 항체 사슬 (번역글로불린 엑손-인트론 조직이 유지됨),
- [1632] - 폴리아데닐화 신호 서열을 갖는 3'-비번역 영역, 및
- [1633] - 3'-말단에 고유한 제한 부위.
- [1634] 융합 유전자는 PCR 및/또는 유전자 합성에 의해 생성하였으며, 공지의 재조합 방법 및 기술로 해당하는 핵산 서그먼트의 연결에 의해, 예를 들어 각각의 플라스미드에서 고유한 제한 부위를 사용하여 조립하였다. 서브클로닝된 핵산 서열은 DNA 서열 분석에 의해 확인하였다. 일시적 형질 주입을 위해, 형질 전환된 대장균 배양물 (Nucleobond AX, Macherey-Nagel) 로부터 플라스미드 제조에 의해 다량의 플라스미드를 제조하였다.
- [1635] 표준 세포 배양 기술은 문헌 [Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. and Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc.] 에 기재된 바와 같이 사용하였다.
- [1636] Fab-확장된-2/3-IgG 는 제조사의 지시에 따라서 HEK293-F 시스템 (Invitrogen) 을 사용하여 각각의 플라스미드로 일시적 형질 주입에 의해 생성하였다. 간략하게, 무혈청 FreeStyle™ 293 발현 배지 (Invitrogen) 에서의 진탕 플라스크에서 또는 교반 발효기에서 현탁액 중에 성장하는 HEK293-F 세포 (Invitrogen) 에, 각각의 발현 플라스미드 및 293fectin™ 또는 펙틴 (Invitrogen) 을 형질 주입하였다. 2 L 진탕 플라스크 (Corning) 의 경우, HEK293-F 세포를 600 mL 에 1×10^6 세포/mL 의 밀도로 시딩하고, 120 rpm, 8 % CO₂ 에서 배양하였다.
다음날, 세포에, A) 600 μ g 총 플라스미드 DNA (1 μ g/mL) 를 갖는 20 mL Opti-MEM (Invitrogen) 및 B) 20 mL Opti-MEM + 1.2 mL 293fectin 또는 펙틴 (2 μ g/mL) 의 약 42 mL 혼합물을 대략 1.5×10^6 세포/mL 의 세포 밀도로 형질 주입하였다. 글루코오스 소비에 따라서, 글루코오스 용액을 발효 과정 동안에 첨가하였다. 정확히 조립된 Fab-확장된-2/3-IgG 를 표준 IgG 와 같은 배양 상청액에 분비하였다. 분비된 Fab-확장된-2/3-IgG 를 함유하는 상청액을 5-10 일 후에 수확하고, Fab-확장된-2/3-IgG 를 상청액으로부터 직접 정제하거나, 또는 상청액을 냉동 및 저장하였다.
- [1637] Fab-확장된-2/3-IgG 는 Fc-영역을 함유하기 때문에, 이들은 표준 단백질 A 친화성 크로마토그래피를 적용하여 정제하였다.
- [1638] MabSelectSure-Sepharose™ (GE Healthcare, Sweden) 및 Superdex 200 크기 배제 (GE Healthcare, Sweden) 크로마토그래피를 사용한 친화성 크로마토그래피에 의해 세포 배양 상청액으로부터 항체를 정제하였다.
- [1639] 간략하게, 멸균 여과된 세포 배양 상청액을 PBS 완충액 (10 mM Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl 및 2.7 mM KCl, pH 7.4) 으로 평형화된 MabSelectSuRe 수지 상에서 포획하고, 평형 완충액으로 세정하고, pH 3.0 의 25 mM 나트륨 시트레이트로 용출시켰다. 용출된 Fab-확장된-2/3-IgG 분획을 모으고, 2 M Tris, pH 9.0 으로 중화시켰다. 20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl, pH 6.0 으로 평형화된 Superdex 200 26/60 GL (GE Healthcare, Sweden) 컬럼을 사용한 크기 배제 크로마토그래피로 항체 풀을 추가로 정제하였다. Fab-확장된-2/3-IgG 함유 분획을 모으고, Vivaspin 한외 여과 장치 (Sartorius Stedim Biotech S.A., France) 를 사용하여 필요한 농도로 농축시키고, -80 °C 에서 저장하였다.
- [1640] 순도 및 완전성은 미세 유체 Labchip 기술 (Caliper Life Science, USA) 을 사용한 CE-SDS 에 의한 각각의 정

제 후에 분석하였다. 제조사의 지침에 따라 HT Protein Express Reagent Kit 를 사용한 CE-SDS 분석을 위해 단백질 용액 (5 μ l) 을 제조하고, HT Protein Express Chip 을 사용한 LabChip GXII 시스템 상에서 분석하였다. LabChip GX 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하였다.

[1641] 하기의 예시적인 Fab-확장된-2/3-IgG 는 상응하는 L-사슬, H-사슬 및 MHCFcRP 코딩 플라스미드의 공동-발현에 의해 제조하였다: 항-플루오레세인-항-CD3-2/3-IgG-노브-cys + 항-비오틴-E357K-홀-MHCFcRP. 상응하는 SEC 크로마토그램은 도 27 에 도시되어 있다. SEC 에 따른 단량체 함량은 93.4 % 였다. CE-SDS 에 따른 단량체 함량은 100 % 였다. 질량은 MS 에 의해 확인하였다.

[1642] 실시예 16

[1643] **출발 물질로서 Fab-확장된-2/3-IgG 를 사용한 2/3-IgG-교환 반응에 의한 이중특이적 항체 (bsAb) 의 생성**

[1644] 2 개의 경쇄, 중쇄 및 MHCFcRP 를 함유하는 Fab-확장된-2/3-IgG 는 KiH 이중이량체로서 생성되었다: 전체 길이 중쇄-노브::MHCFcRP-홀. Fab-확장된-2/3-IgG 는, MHCFcRP 가 전체 길이 중쇄 반대 부분에 대응하는 전하가 없는 전하 돌연변이를 함유하기 때문에, 다소 '결함' 이 있다. 그러나, 이러한 결함이 있는 이중이량체를 구성하는 모듈은 대응하는 전하를 갖는 이중특이적 이중이량체에 재배열될 수 있다. Fab-확장된-2/3-IgG A 의 전체 길이 중쇄 (노브) 및 2/3-IgG B 로부터의 전체 길이 중쇄 (홀) 는 대응하는 이중이량체를 형성한다. 대응하는 이중이량체는 또한 MHCFcRP (홀-전하) 가 MHCFcRP (노브-전하) 와 상호 작용할 때 형성된다. 따라서, 2 개의 상이한 2/3-IgG 의 출발 이중이량체의 일시적 분리에 기초한 교환 반응은 우선적으로 (전하) 대응하는 이중이량체를 함유하는 생성물을 야기하였다. 그러므로, 교환 반응은 2 개의 단일특이적 2/3-IgG 를 하나의 이중특이적 IgG 및 하나의 MHCFcRP 이중이량체로 전환시켰다:

Fab- 확장된 -2/3-IgG-His6(8) + 2/3-IgG-His6(8) $\rightarrow$ bsAb(AB) + Fc-His6(8)

[1646] 교환 반응은 특히 힌지-영역 사슬간 디설피드 결합을 파괴하기 위해서 환원 단계 (예를 들어, 다양한 농도의 2-MEA 또는 TCEP 의 적용) 에 의해 개시되었다. 이후에, 사슬 재배열이 자발적으로 발생하였다.

[1647] 도 26 에 도시한 바와 같은 Fab-확장된 2/3-IgG 를 사용한 3 개의 교환 반응에 대한 절차는 다음과 같았다:

[1648] 1 mg 의 Fab-확장된-2/3-IgG (dA) 를 1 mg 의 각각의 2/3-IgG 포맷 (nB 또는 cB 또는 ncB) 과 총 부피 2 ml 로 1x PBS-완충액에서 혼합하였다. 1xPBS-완충액 중의 16x 물 당량의 TCEP 를 혼합물에 첨가하였다. 샘플을 37 $^{\circ}$ C 및 350 rpm 교반에서 1 시간 동안 배양하였다. 배양 시간 후, 샘플을 NiNTA 크로마토그래피 컬럼 (HisCompleteTM, Roche, Basel, Switzerland) 을 통해 정제하고, 조립된 이중특이적 항체를 통과액에서 수집하였다. 통과액을 실온에서 밤새 추가로 배양하였다. 이어서, 샘플을 분석용 SEC, CE-SDS 및 질량 분광법에 의해 분석하였다.

[1649] 교환 반응의 결과를 하기 표에 나타낸다:

이중특이적 항체 <FITC> = 항-FITC Fab <CD3> = 항-CD3 Fab <비오틴> = 항-비오틴 Fab HC = 중쇄	수율 [%]	SEC 단량체 [%]	CE-SDS (비-환원) 단량체 [%]	MS
<FITC><CD3>-노브-HC (dA) <비오틴>-홀-n-HC (nB)	6	96	44.7	확인
<FITC><CD3>-노브-HC (dA) <비오틴>-홀-nc-HC (ncB)	14	94	43.4	확인
<FITC><CD3>-노브-HC (dA) <비오틴>-홀-c-HC (cB)	17	93	48.5	확인

[1650] 비오틴 및 FITC 에 대한 결합은 BIAcore T200 기기 (GE Healthcare) 를 사용한 표면 플라스몬 공명에 의해 조사하였다. 모든 실험은 HBS-P (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 0.05 % Tween 20, pH 7.4) 를 실행 및 희석 한

층액으로서 사용하여 25 °C 에서 수행하였다. 항-인간 Fc 항체 (GE Healthcare #BR100839) 를 표준 아민 커플링 화학을 사용하여, Series S CM5 Sensor Chip (GE Healthcare #29104988) 상에 고정화시켰다. 이중 특이적 항체를 표면 상에서 포획한 후, 비오틴- 또는 FITC-표지된 단백질을 연속 주입하였다 (비오틴-표지를 먼저, FITC-표지를 두번째로, 및 FITC-표지를 먼저 주입하고, 비오틴-표지를 두번째로). 각각 10 µg/ml 의 농도에서 회합을 60 초 동안, 해리를 120 초 동안 모니터하였다. 3 M MgCl₂ 를 60 초 동안 주입함으로써 표면을 재생시켰다. 모의 표면으로부터 수득한 반응을 감산함으로써 벌크 굴절률 차이를 보정하였다. 블랭크 주입을 차감하였다 (이중 참조). 이중특이적 항체 <FITC><CD3>-노브-HC (dA)+<비오틴>-홀-nc-His (ncB) 에 대한 2 개의 예시적인 SPR 센서그램은 도 28 에 도시되어 있다 (2 개의 센서그램은 비오틴의 첫번째 첨가, FITC 의 두번째 첨가, 및 FITC 의 첫번째 첨가, 비오틴의 두번째 첨가를 나타낸다). 모든 조합에 대한 결과를 하기 표에 나타낸다:

이중특이적 항체	비오틴	FITC
<FITC><CD3>-노브-HC (dA) <비오틴>-홀-n-HC (nB)	결합	결합
<FITC><CD3>-노브-HC (dA) <비오틴>-홀-nc-HC (ncB)	결합	결합
<FITC><CD3>-노브-HC (dA) <비오틴>-홀-c-HC (cB)	결합	결합

[1652]

[1653]

모든 출발 분자, 모든 원하지 않는 부산물, 뿐만 아니라, 교환 반응 동안에 잠재적으로 생성된 모든 응집체는 친화성 태그 (His6 또는 His8) 를 가진다. 교환 반응에서 제조된 바람직한 이중특이적 항체는 His-tag 를 갖지 않는 유일한 분자이다. 그러므로, 간단한 NiNTA 흡수 단계를 적용하여, 모든 원하지 않는 분자를 제거할 수 있다. 통과액으로부터의 남아있는 이중특이적 항체는 스크리닝 절차 및 분석에 직접 적용하여, 바람직한 기능을 갖는 이중특이적 항체를 확인할 수 있다.

[1654]

실시예 17

[1655]

교환 반응 후의 정제를 위한 대안적인 태그

[1656]

이들 실험에서 폴리-히스티딘-태그 대신 EPEA C-tag (SEQ ID NO: 87) 를 사용하여, 교환 반응이 사용된 태그에 의해 영향을 받지 않음을 보여주었다.

[1657]

실시예 6 에서와 같은 2/3-IgG 는, 각각의 말단에 융합된 짧은 링커 (SEQ ID NO: 88) 를 갖는 C-tag 를 사용하여 발현 및 정제하였다. 이들 2/3-IgG 의 제조 및 정제의 결과를 하기 표에 나타낸다.

2/3-IgG	정제후 수율 [mg/L]*	SEC 단량체 피크 [%]	CE-SDS 단량체 [%]	질량 분석
Fluo-노브-n-HC + 홀-MHCFcRP(E357K)-C- Tag	64.3	96.9	95.1	확인
비오틴-홀-n-HC + 노브-MHCFcRP(K370E)-C- Tag	110.0	95.7	93.6	확인
Fluo-노브-c HC + 홀-MHCFcRP(E357K)-C- Tag	52.1	95.5	98.4	확인

[1658]

2/3-IgG	정제후 수율 [mg/L]*	SEC 단량체 피크 [%]	CE-SDS 단량체 [%]	질량 분석
Fluo-노브-nc HC + 홀-MHCFcRP(E357K)-C- Tag	23.4	96.1	95.6	확인
비오틴-홀-c HC + 노브-MHCFcRP(K370E)-C- Tag	83.5	88.5	89.0	확인
비오틴-홀-nc HC + 노브-MHCFcRP(K370E)-C- Tag	33.5	98.5	98.0	확인

[1659]

[1660]

교환 반응은 다음과 같이 수행하였다:

[1661]

각각 300 μ l 의 각각의 출발 2/3-IgG (c = 1 mg/ml; 총 600 μ l) 를 혼합하였다. TCEP 를 15x 몰 과량으로 첨가하였다. 샘플을 37 $^{\circ}$ C 및 400 rpm 에서 배양하였다. 360 μ l 의 샘플을 200 μ l C-tag 수지 (Thermo Scientific; 1xPBS pH 7.4 로 세정한 50 % 슬러리) 와 혼합하고, 스핀 컵 컬럼에서 60 min 동안 RT 및 800 rpm 교반에서 배양하였다. 배양 후, 스핀 컬럼을 5 min 동안 RT, 800 rpm 에서 원심 분리하고, 통과액을 수집하였다. 수지를 1xPBS pH 7.4 (100 μ l 및 후속 원심분리 단계) 로 수회 세정하였다. 세정 후, 샘플의 수지를 100 μ l HCl-완충액 pH 2.6 과 혼합하고, 30 min 동안 RT 및 800 rpm 교반에서 배양하였다. 5 min 동안 RT 및 800 rpm 에서 원심분리하여 용출액을 생성하였다.

[1662]

2/3-IgG A (Fluo-노브-n-HC + 홀-MHCFcRP(E357K)-C-Tag) 와 2/3-IgG B (비오틴-홀-n-HC + 노브-MHCFcRP(K370E)-C-Tag) 의 예시적인 교환 반응을 위한 비-환원된 CE-SDS 크로마토그램은 도 29 에 도시되어 있다. 이중특이적 항체가 형성되고, 통과액에 수집될 수 있음을 알 수 있다. C-태그된 MHCFcRP 는 교환 반응 후에 C-tag 수지에 결합되고, 이로부터 용출될 수 있다. 이로써, 분리 및 정제가 달성된다.

[1663]

실시예 18

[1664]

환원이 없는 2/3-IgG-교환 반응에 의한 이중특이적 항체의 제조

[1665]

2/3-IgG 를 함유하는 Fc-영역 디설피드와의 사슬 교환은, 사슬 분리를 가능하게 하는 초기 단계로서 환원, 및 원하는 이중특이적 항체를 형성하기 위한 후속 재조립을 필요로 한다. 2/3-IgG 가 또한 비-힌지-디설피드 결합 (디설피드 서플링) 을 함유함에 따라, 환원 단계 및 이와 관련된 부반응을 회피하기 위해서, H-사슬 Fc 와 MHCFcRP Fc 사이에 디설피드를 갖지 않는 2/3-IgG 를 생성하였다. 이것은 노브- 및 홀 반-항체에서의, 뿐만 아니라, 노브- 또는 홀 MHCFcRP 사슬의 힌지-디설피드 형성을 담당하는 시스테인을 돌연변이시킴으로써 달성되었다. 반-항체 사이에 KiH 관련된 사슬간 디설피드를 형성하는 CH3-시스테인이 또한 제거되었다.

[1666]

H-H 사슬간 디설피드를 형성하는 2 개의 시스테인을 제거하기 위해서, 힌지-사슬간 디설피드를 갖지 않는 IgG1-유도체는 이들의 H-사슬 힌지 영역에서 2 개의 시스테인을 세린으로 교환함으로써 생성되었다. 이로써, 야생형 IgG1 ...HTCPXCP... (SEQ ID NO: 31) 의 힌지 영역 서열은 ...HTSPXSP... (SEQ ID NO: 85) 를 코딩하도록 변경되었다.

[1667]

힌지-사슬간 디설피드를 갖지 않는 또다른 엔터티는 사슬간 디설피드 형성에 기여하는 힌지 영역의 전체 서열 스트레치를 결실시킴으로써 생성되었다. 그러므로, 정상 IgG1 의 힌지 영역의 CPPC 서열을 결실시켜, 서열 ...HTPAPE... (SEQ ID NO: 86) 를 갖는 보다 짧은 힌지를 생성하였다.

[1668]

도 25 는 시스테인의 세린으로의 대체가 - 달리 제한적인 힌지-디설피드의 방출로 인해 - 확장된 스페닝 거리를 갖는 항체를 생성한다는 것을 보여준다.

[1669]

HC-HC-사슬간 디설피드 결합을 갖지 않는 2/3 IgG 의 발현은, 디설피드-함유 엔터티에 대해 상기에서 기술한 바와 동일한 방식으로, 포유 동물 CMV-프로모터 구동 발현 플라스미드에 공동-형질 주입함으로써 달성되었다.

발현 플라스미드의 HEK293 세포에의 일시적 형질 주입은, 개별 2/3-IgG 의 CMV-프로모터 구동 공동-발현, 분비 구획에서의 조립, 및 배양 상청액에의 후속 분비를 야기한다.

[1670] HC-HC 사슬간 디설파이드를 갖지 않는 2/3 IgG 는 세포 배양 상청액에 분비하였으며, Fc-영역, 뿐만 아니라, 카파 L-사슬을 보유하였다. 그러므로, 이들은 제 1 단계에서 단백질 A 또는 KappaSelect 수지에 의해 포획함으로써 정제하였다. 후속 단계는 크기 배제 크로마토그래피 (SEC) 에 의해 크기에 따라 분리하였다. 이러한 2-단계 프로토콜은 강력하고 효과적인 방식으로, 표준 항체로 관찰된 것과 유사한 수율로 세포 배양 상청액으로부터 2/3 IgG 유도체의 효율적인 회수를 가능하게 하였다.

[1671] **실시예 19**

[1672] **환원이 없는 2/3-IgG-교환 반응에 의한 이중특이적 항체의 생성**

[1673] 경쇄, 중쇄 및 상보적 Fc-영역을 함유하는 2/3-IgG 는 다음의 2 가지 유형의 KiH 이중이량체에서 생성되었다: 중쇄-노브::상응하는 Fc-영역-홀 및 중쇄-홀::상응하는 Fc-영역-노브. 두 유형의 2/3 IgG 는, 상보적 Fc-영역이 대응하는 H-사슬 반대 부분이 없는 전하 돌연변이를 함유하기 때문에, '결합' 이 있다. 그러나, 이러한 결합이 있는 이중이량체를 구성하는 모듈은 완벽한 이중이량체에 재배열될 수 있다: 2/3-IgG A 의 중쇄 (노브) 및 2/3-IgG B 로부터의 중쇄 (홀) 은 완벽한 이중이량체를 형성한다. 완벽한 이중이량체는 또한 상보적 Fc-영역 (홀-전하) 이 상보적 Fc-영역 (노브-전하) 과 상호 작용할 때 형성된다. 따라서, 2 개의 상이한 2/3-IgG 유형의 출발 이중이량체의 일시적 분리에 기초한 교환 반응은 우선적으로 완벽한 이중이량체를 함유하는 생성물을 야기하였다. 그러므로, 교환 반응은 2 개의 단일특이적 2/3-IgG 를 하나의 이중특이적 IgG 및 하나의 상보적 Fc-영역 이중이량체로 전환시켰다.

[1674] CH3 노브-홀 및/또는 힌지-사슬간 디설파이드를 함유하는 원래의 2/3-IgG 의 교환 반응은 상기 실시예에서 나타내는 바와 같이 환원 단계에 의해 개시되어야 한다. TCEP 와 같은 환원제가 디설파이드를 파괴하기 위해서 첨가되며, 이후에 사슬 재배열이 발생한다. 대조적으로, 사슬간 HC-HC 디설파이드 결합을 갖지 않는 2/3-IgG 유도체는, 이들의 H-사슬이 디설파이드 결합에 의해 상호 연결되지 않기 때문에, 사슬 교환을 개시하기 위한 환원 단계를 필요로 하지 않는다.

[1675] 2/3-IgG 의 bsAb 로의 전환이 초기 환원에 의존하는지 여부와 어느 정도 전환하는지를 분석하기 위해서, 2/3-IgG (사슬간 디설파이드를 갖거나 갖지 않음) 의 교환 반응을 환원의 존재 및 부재하에서 수행하였다. Bio 또는 Fluos (상기에서 기술함) 에 결합하는 1 가 단일특이적 2/3-IgG 를 입력 분자로서 사용하였다. 결과적으로, 교환 반응은 Bio 뿐만 아니라, Fluos 에 결합하는 2 가 이중특이적 bsAb 를 생성한다. 생성된 bsAb 의 형성 및 이중특이적 기능성은 상기에서 기술한 바와 같은 브릿징 ELISA 에 의해 평가하였다. 브릿징 ELISA 는 고정화된 Fluos-BSA 에 교환 반응 혼합물의 첨가, 이어서 세정 단계, 및 이중특이적 항체의 제 2 결합 arm 의 존재를 조사하기 위한 Bio-Cy5 의 후속 첨가로 이루어졌다. 정확히 조립된 기능성 이중특이적 항체 만이 이들의 Fluos-결합 arm 에 의해 분석 플레이트 상에서 유지되고, bio-Cy5 를 포획 및 유지함으로써 신호를 생성하며, 이로써 분석 신호를 생성한다. 이중특이성이 없는 단일특이적 입력 분자 또는 '폴스' 분자는 플레이트에 결합하지 않거나 (Bio-결합제 단독), 또는 Bio-Cy5 를 발생하는 신호를 포획할 수 없기 (Fluos-결합제 단독) 때문에, 신호를 생성하지 않는다.

[1676] 도 24 는 초기 환원 단계의 유,무 하에서의 부모 (사슬간 디설파이드 함유) 및 H-H 사슬간 디설파이드-결여 2/3-IgG 교환 반응의 이들 브릿징 ELISA 분석의 결과를 보여준다. 분석 플레이트 상의 Fluos-결합 arm 은 Bio-Cy5 를 포획 및 유지함으로써 신호를 생성하며, 이로써 분석 신호를 생성한다. 이중특이성이 없는 단일특이적 입력 분자 또는 '폴스' 분자는 플레이트에 결합하지 않거나 (Bio-결합제 단독), 또는 Bio-Cy5 를 발생하는 신호를 포획할 수 없기 (Fluos-결합제 단독) 때문에, 신호를 생성하지 않는다. 도 24 는 초기 환원 단계의 유,무 하에서의 부모 (사슬간 디설파이드 함유) 및 H-H 사슬간 디설파이드-결여 2/3-IgG 교환 반응의 이들 브릿징 ELISA 분석의 결과를 보여준다. 초기 환원은 힌지-디설파이드를 함유하는 2/3-IgG 에 대한 사슬 교환을 가능하게 하는데 필수적이었음을 관찰하였다. 힌지-디설파이드를 갖는 이들 2/3-IgG 는 교환이 환원에 의해 개시될 때, 이중특이적 항체로만 전환되었다. 대조적으로, 효과적인 이중특이적 항체 생성은 힌지 (및 CH3) 사슬간 디설파이드를 갖지 않는 2/3-IgG 를 적용함으로써 달성되었다. 이들 분자의 사슬 교환은 힌지-연결된 진입 분자에 대해 상기에서 기술한 바와 동일한 방식으로, 환원 조건하에서 이중특이적 항체를 생성한다. 그러나, 생산적인 사슬 교환은 또한 초기 환원없이, 즉, 환원제의 부재하에서 발생하기 때문에, 초기 환원은 이들 분자의 생산적인 사슬 교환에 필수적이지 않았다. 따라서, Fc-Fc 사슬간 디설파이드의 제거는 초기 환원 단계의 필요성을 제거하였다. 생성된 이중특이적 항체는 힌지 영역 사슬간 디설파이드 결합없이 함께 유지된다.

따라서, 이중특이적 항체의 효과적인 형성은 이들 힌지-디설피드 비-함유 2/3-IgG 를 자발적인 방식으로 조합할 때 발생하며, HC-HC-사슬 디설피드 결합을 갖지 않는 2/3-IgG 를 사용할 때 교환 반응의 개시를 위한 환원 단계는 생략될 수 있다.

[1677] 실시예 20

[1678] 사슬 교환 반응은 농도 의존적이다

[1679] 2/3-IgG 를 이중특이적 항체로 전환시키기 위한 원동력은 Fc-영역 사이에 설계된 '부분적으로 결합이 있는' 계면이다. 이러한 특별한 계면은 MHCFcRP Fc 분자의 노브- 또는 홀 CH3 도메인에 도입된 돌연변이의 결과이다. 돌연변이된 CH3 도메인은 2/3-IgG 의 발현 동안에 상응하는 정상 노브- 또는 홀- 파트너와 여전히 연결되어 있다. 이들 분자는 또한 바람직하지 않은 응집 경향없이 충분히 거동하는 분자로서 2/3-IgG 를 제공하는데 충분한 안정성을 가진다. 이중특이적 항체로 이어지는 생산적인 사슬 교환 반응은, 2 개의 상보적 2/3-IgG 가 근접하며, H-사슬::MHCFcRP 쌍이 서로 옆으로 부분적으로 방출될 때 발생한다. 이들 H-사슬(CH3) 계면이 보다 양호하게 대응하기 때문에, 이러한 조건하에서는 불안정화 돌연변이를 갖지 않는 이중특이적 항체를 형성하기 위한 노브-홀 H-사슬의 재조립이 선호된다. 따라서, 이중특이적 항체 생성물의 사슬은 부분적으로 완벽하지 않은 2/3-IgG 입력 분자의 재형성보다 우선적으로 연결되어 있다. 이 때문에, 설계된 부분적으로 불안정화된 CH3 계면은 성공적인 직접 사슬 교환 반응을 위한 핵심 매개변수이다. Fc 계면의 부분적인 불안정화는 상기 본원에서 기술한 바와 같이 MHCFcRP 사슬의 CH3 잔기를 돌연변이시킴으로써 달성될 수 있다.

[1680] 교환 반응이 발생하기 위한 하나의 다른 필수 요건 (부분적으로 불안정화된 계면 이외에) 은, 2 개의 상보적 2/3-IgG 가 사슬 교환을 가능하게 하도록 근접해야 한다는 것이다. 엔터티가 근접하게 되는 가능성은 또한 교환 반응에서의 이들의 농도에 의존해야 한다.

[1681] 교환 반응은 HC-HC 사슬간 디설피드 결합을 갖지 않는 Bio- 및 Fluos-결합 2/3-IgG 를 상이한 농도로 적용함으로써 비-환원 조건하에서 설정하였다. 교환 반응의 완료 후, 모든 반응 혼합물은 높은 추출물 농도를 갖는 교환 완충액 샘플을 최저 실험 샘플의 추출물 농도로 희석시켜 '동일한 추출물 농도' 가 되게 하였다. 이어서, 브릿징 ELISA 를 적용하여 각각의 실험 샘플에서 기능성 bsAb 의 상대적인 양을 결정하였다. 희석-정렬된 샘플에는 동일한 양의 추출물이 존재하기 때문에, 농도-의존성은 모든 샘플에서 동일한/유사한 ELISA 값을 야기할 것이다. 반대로, 반응에서 보다 높은 추출물 농도를 갖는 연속적으로 증가된 신호는 농도 의존적 사슬 교환을 나타낼 것이다. 이들 분석의 결과는, 2 μ M 초과 추출물 농도를 함유한 반응에서 ELISA 신호가 안정기에 도달하는 것으로 나타났다. 따라서, 이들 농도 이상에서, 추출물 농도는 교환 반응의 효능에 대해 제한된 효과 만을 가진다. 보다 낮은 추출물 농도는 투여량 의존 방식으로 감소되는 ELISA 신호를 생성하였다. 따라서, 특정한 임계 값 미만에서, 교환에 의한 bsAb 의 생성은 발생하는 추출물 상호 작용의 가능성이 감소하기 때문에, 추출물 농도에 의해 유의하게 영향을 받는다. 결과는 도 30 에 도시되어 있다.

농도 [μ M]			
2/3-IgG A	2/3-IgG B	교환 반응	ELISA
9.2	9.2	4.6	0.05
6.4	6.4	3.2	0.05
3.2	3.2	1.6	0.05
1.6	1.6	0.8	0.05
0.8	0.8	0.4	0.05
0.4	0.4	0.2	0.05
0.2	0.2	0.1	0.05
0.1	0.1	0.05	0.05

[1682] 실시예 21

[1684] 출발 물질로서 제약된-2/3-IgG 를 사용한 2/3-IgG-교환 반응에 의한 이중특이적 항체 (bsAb) 의 생성

[1685] 원형이며 결합 부위인 제약된-2/3-IgG 는 Fc-영역에 대한 제 1 부분 N-말단 및 Fc-영역에 대한 제 2 부분 C-말단에 의해 형성되며, 여기에서 상기 제 1 및 제 2 부분은 서로 연결되어 결합 부위를 형성하고, MHCFcRP 는 KiH 이중이량체로서 생성되었다: 전체 길이 원형 중쇄-노브::MHCFcRP-홀. 제약된-2/3-IgG 는, MHCFcRP 가 중쇄

에 대해 사슬간 디설피드를 형성하는데 필요한 추가의 CH₃ 시스테인이 결여되어 있으며, MHCfCRP 가 전체 길이 중쇄 반대 부분에 대응하는 전하가 없는 전하 돌연변이를 함유하기 때문에, 다소 '결함' 이 있다. 그러나, 이러한 결함이 있는 이중이량체를 구성하는 모듈은 대응하는 전하를 갖는 이중특이적 이중이량체에 재배열될 수 있다. 2/3-IgG A 의 전체 길이 또는 전체 길이 제약된 중쇄 (노브-cys) 및 2/3-IgG B 로부터의 전체 길이 또는 제약된 중쇄 (홀-cys) 는 대응하는 이중이량체를 형성한다. 대응하는 이중이량체는 또한 MHCfCRP (홀-전하) 가 MHCfCRP (노브-전하) 와 상호 작용할 때 형성된다. 따라서, 2 개의 상이한 2/3-IgG 의 출발 이중이량체의 일시적 분리에 기초한 교환 반응은 우선적으로 (전하) 대응하는 이중이량체를 함유하는 생성물을 야기 하였다. 그러므로, 교환 반응은 2 개의 단일특이적 2/3-IgG 를 하나의 이중특이적 IgG 및 하나의 MHCfCRP 이중이량체로 전환시켰다:



교환 반응은 특히 힌지-영역 사슬간 디설피드 결함을 파괴하기 위해서 환원 단계에 의해 개시되었다. 이후에, 사슬 재배열이 자발적으로 발생하였다.

도 31 에 도시된 바와 같은 교환 반응에 대한 절차는 다음과 같았다:

1 mg 의 "입력 포맷 A" 를 1 mg 의 "입력 포맷 B" 와 총 부피 2 ml 로 1x PBS-완충액에서 혼합하였다. 1xPBS-완충액 중의 16x 몰 당량의 TCEP 를 혼합물에 첨가하였다. 샘플을 37 °C 및 350 rpm 교환에서 1 시간 동안 배양하였다. 배양 시간 후, 샘플을 NiNTA 크로마토그래피 컬럼 (HisComplete™, Roche, Switzerland) 을 통해 정제하고, 조립된 이중특이적 항체를 통과액에서 수집하였다. 통과액을 실온에서 밤새 추가로 배양 하였다. 이어서, 샘플을 분석용 SEC, CE-SDS 및 질량 분광법에 의해 분석하였다.

교환 반응의 결과를 하기 표에 나타낸다:

이중특이적 항체 <cMET> = 항-cMET Fab <비오틴> = 항-비오틴 Fab < FITC> = 항-FITC Fab HC = 중쇄	수율 [%]	SEC 단량체 [%]	CE-SDS 단량체 비- 환원 [%]	MS
<cMET>-노브-con-HC <비오틴>- 홀-n-HC	50.5	95.4	30.6	확인
<cMET>-노브-con-HC <비오틴>- 홀-nc-HC	40	96.8	50	확인
<cMET>-노브-con-HC <비오틴>- 홀-c-HC	36	92.9	25.4	확인
<cMET>-홀-con-HC <FITC>- 노브-n-HC	11	76.7	46.3	확인
<cMET>-홀-con-HC <FITC>-노브-nc-HC	10.4	77.7	40 ?	확인
<cMET>-홀-con-HC <FITC>-노브-c-HC	20	64	17	확인
<cMET>-노브-con-HC <cMET>-홀-con-HC	41	70	89	확인

c-MET, 비오틴 및 FITC 에 대한 결합은 BIAcore T200 기기 (GE Healthcare) 를 사용한 표면 플라즈몬 공명에 의해 조사하였다. 모든 실험은 HBS-P (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 0.05 % Tween 20 pH 7.4) 를 실행 및 희석 완충액으로서 사용하여 25 °C 에서 수행하였다. 항-인간 His-tag 항체 (GE Healthcare #28995056) 를 표준 아민 커플링 화학을 사용하여 Series S CM5 Sensor Chip (GE Healthcare #29104988) 상에 고정화시켰다. C-MET-Fc (R&D Systems #358-MT) 를 표면 상에서 주입한 후, 비오틴-, 또는 FITC-표지된 단백질을 각각 10

$\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 주입하였다. 연결 및 해리 상을 각각의 결합 이벤트에 대해 2 분 동안 모니터링하였다.

10 mM 글리신 pH 1.5 를 60 초 동안 주입함으로써 표면을 재생시켰다. 모의 표면으로부터 수득한 반응을 감산함으로써 벌크 굴절률 차이를 보정하였다. 블랭크 주입을 차감하였다 (이중 참조).

[1693]

제 2 설정에서, c-MET 뿐만 아니라, 항-인간 Fc 항체 (GE Healthcare #BR100839) 를 Series S CM5 Sensor Chip 상에 고정화시켰다. 윤곽체를 두 흐름 세포에 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 30 초 동안 주입하였다. 3 M MgCl_2 를 60 초 동안 주입함으로써 표면을 재생시켰다. 모의 표면으로부터 수득한 반응을 감산함으로써 벌크 굴절률 차이를 보정하였다. 블랭크 주입을 차감하였다 (이중 참조). 평가를 위해, 생성된 c-MET 결합 반응을 항-인간 Fc 항체 결합으로부터 유도된 반응으로 정규화시켰으며, 이중특이적 항체 <cMET>-홀-con-HC (conA)+<Fluo>-노브-c-His (cB) 에 대한 예시적인 SPR 센서그램은 도 33 에 도시되어 있다. 모든 조합에 대한 결과를 하기 표에 나타낸다:

이중특이적 항체	cMET	비오틴	FITC
<cMET>-노브-con-HC <비오틴>-홀-n-HC	결합	결합	n/a
<cMET>-노브-con-HC <비오틴>-홀-nc-HC	결합	결합	n/a
<cMET>-노브-con-HC <비오틴>-홀-c-HC	결합	결합	n/a
<cMET>-홀-con-HC <Fluo>-노브-n-HC	결합	n/a	결합
<cMET>-홀-con-HC <Fluo>-노브-nc-HC	결합	n/a	결합
<cMET>-홀-con-HC <Fluo>-노브-c-HC	결합	n/a	결합
<cMET>-노브-con-HC <cMET>-홀-con-HC	결합	n/a	n/a
<cMET>-노브-con-HC	결합	n/a	n/a
<cMET>-홀-con-HC	결합	n/a	n/a

[1694]

n/a 는 각각의 결합 부위가 이중특이적 항체에 존재하지 않으며, 이로써 결합이 예상될 수 없음을 나타낸다.

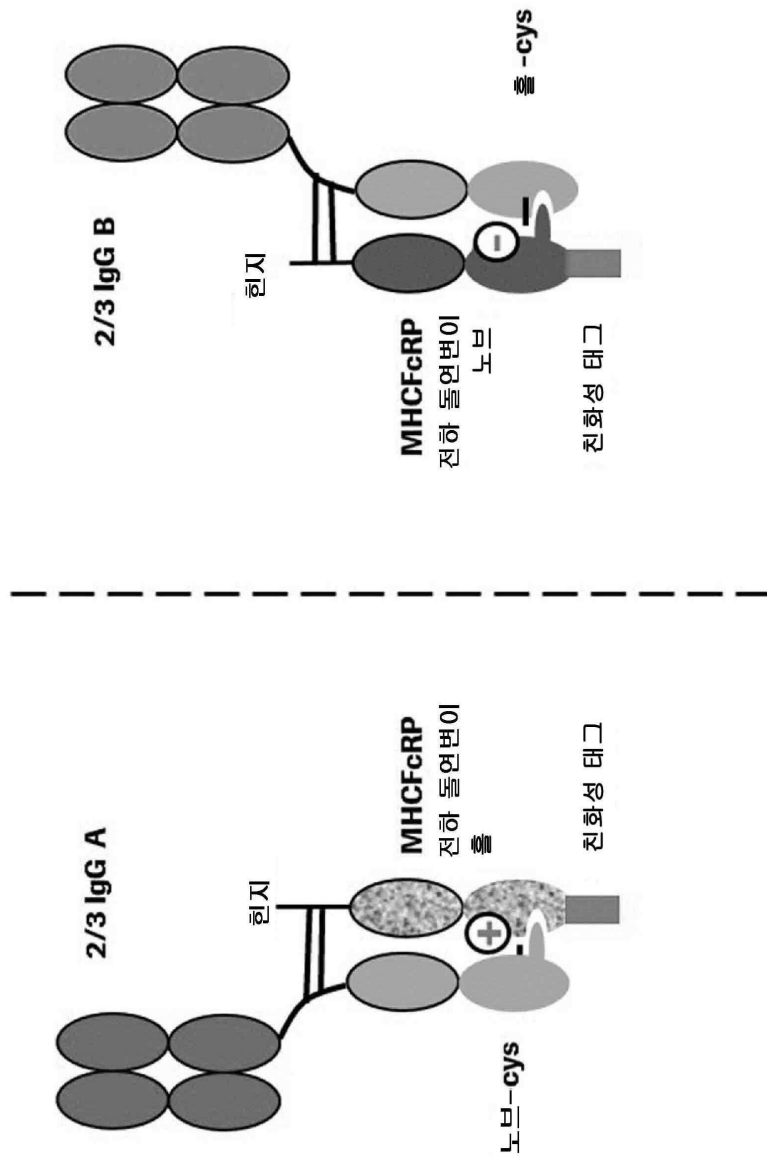
[1695]

모든 출발 분자, 모든 원하지 않는 부산물, 뿐만 아니라, 교환 반응 동안에 잠재적으로 생성된 모든 응집체는 친화성 태그 (His6 또는 His8) 를 가진다. 교환 반응에서 제조된 바람직한 이중특이적 항체는 His-tag 를 갖지 않는 유일한 분자이다. 그러므로, 간단한 NiNTA 흡수 단계를 적용하여, 모든 원하지 않는 분자를 제거할 수 있다. 통과액으로부터의 남아있는 이중특이적 항체는 스크리닝 절차 및 분석에 직접 적용하여, 바람직한 기능을 갖는 이중특이적 항체를 확인할 수 있다.

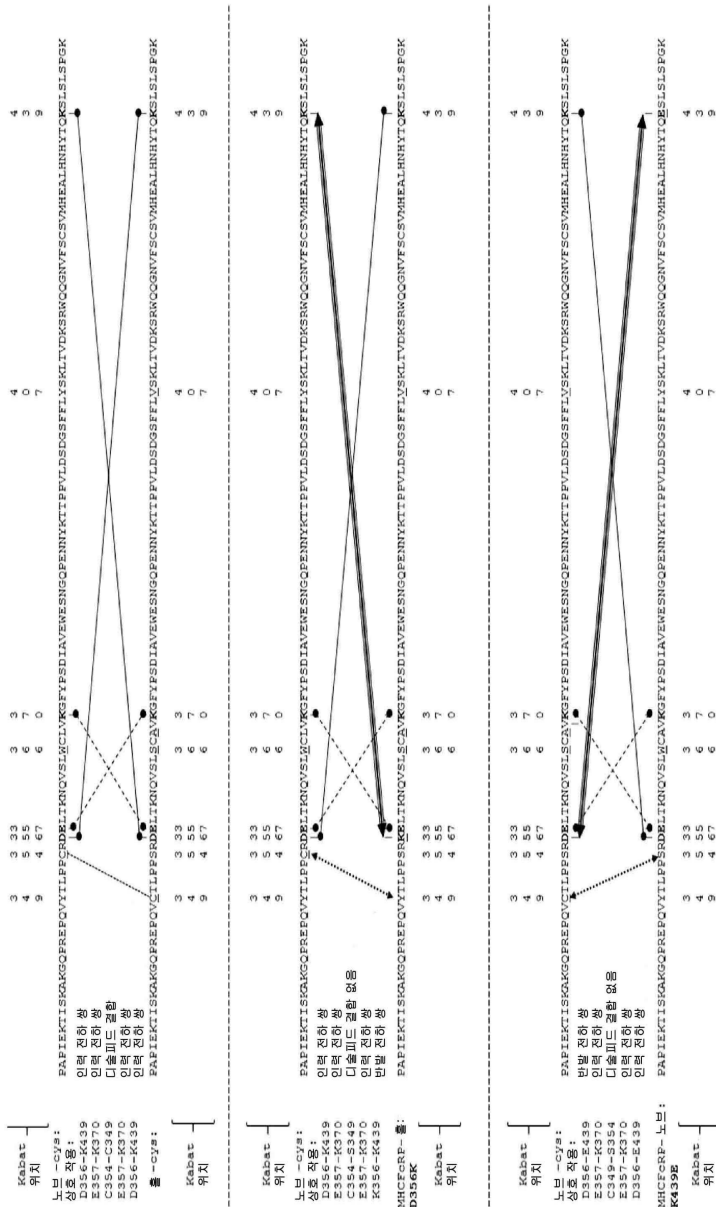
[1696]

도면

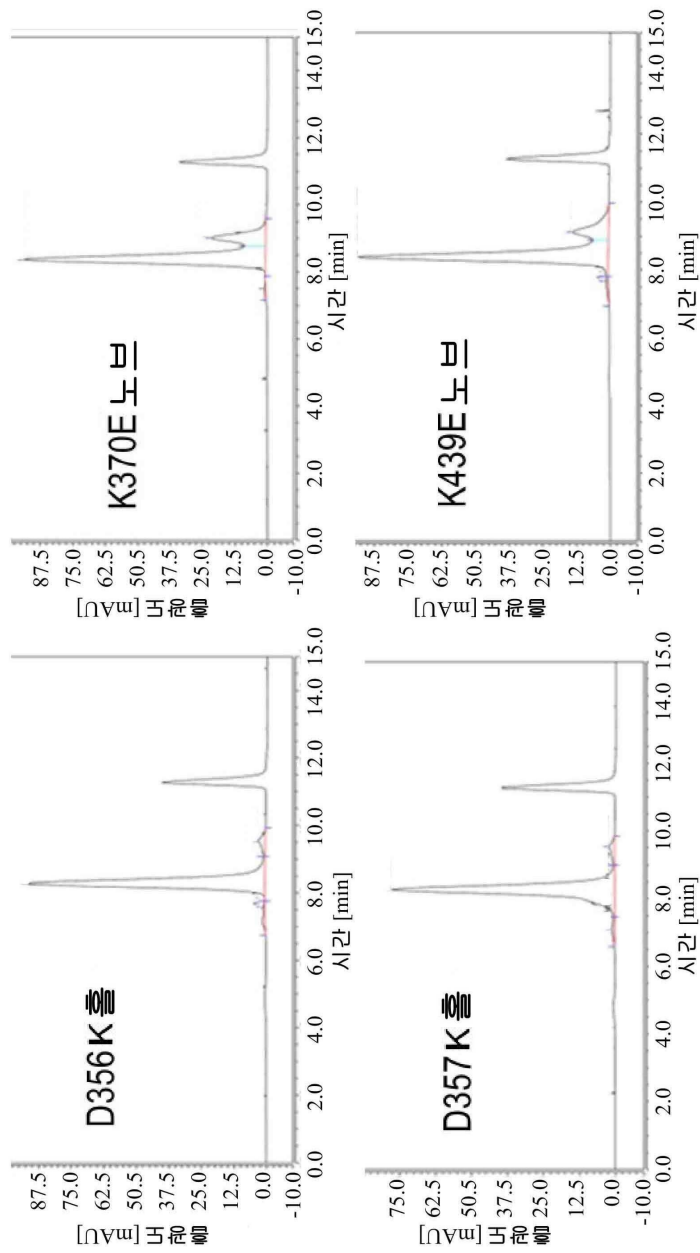
도면1



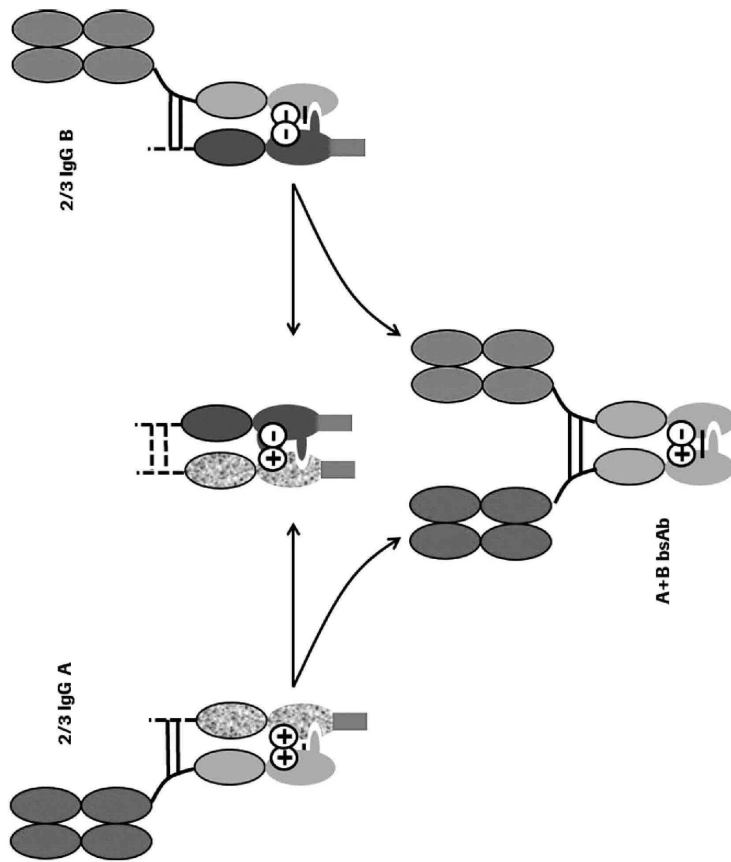
도면2



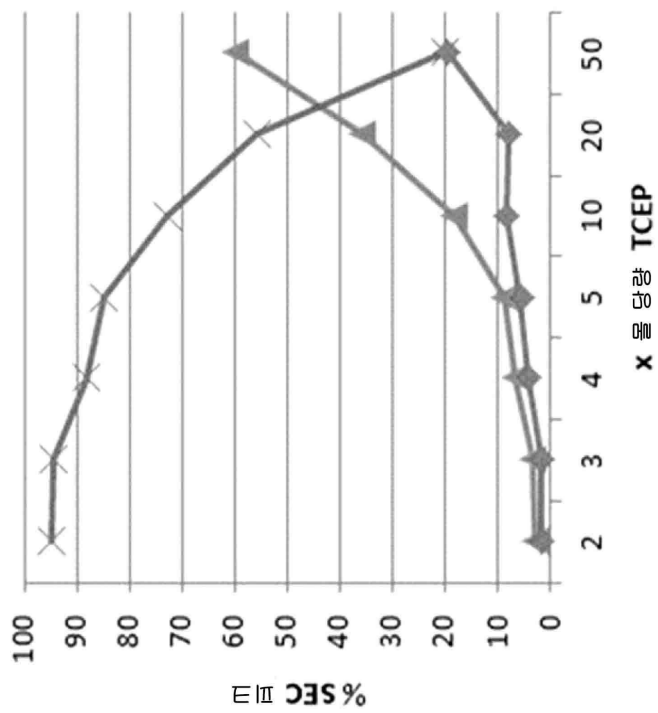
도면3



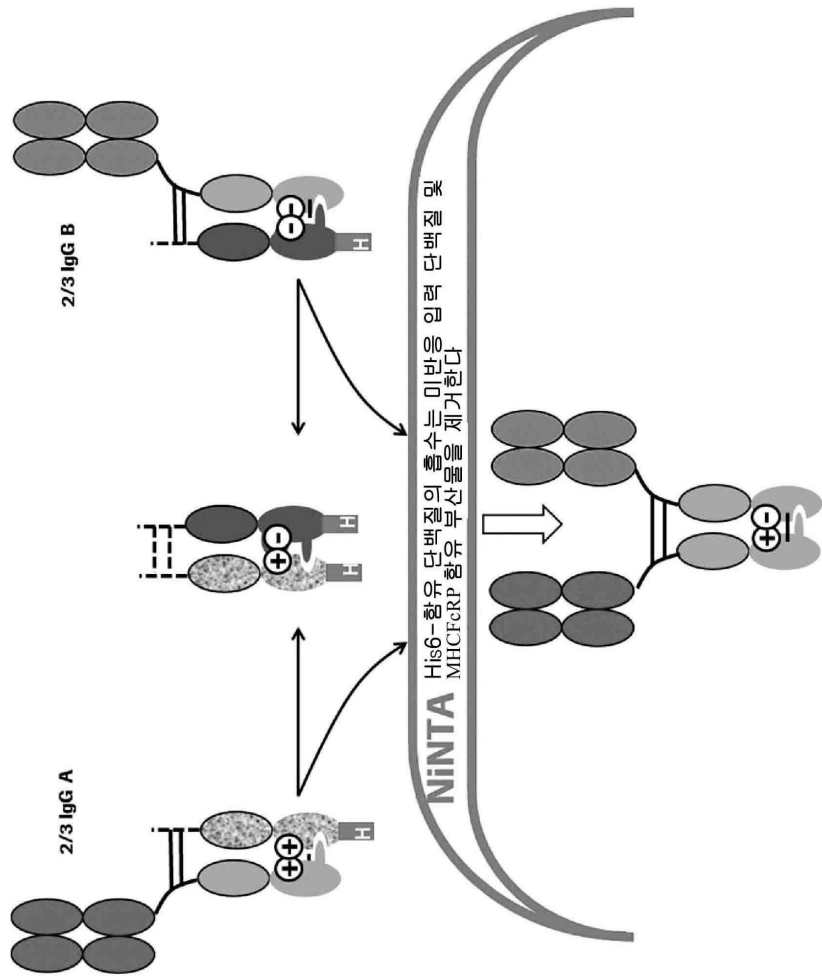
도면4



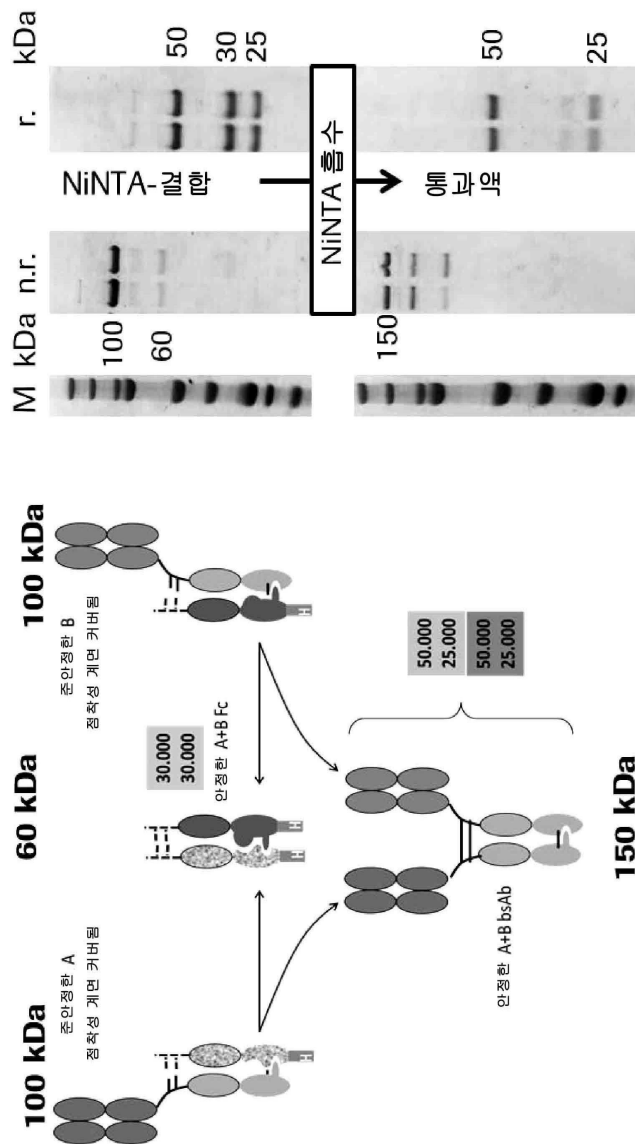
도면5



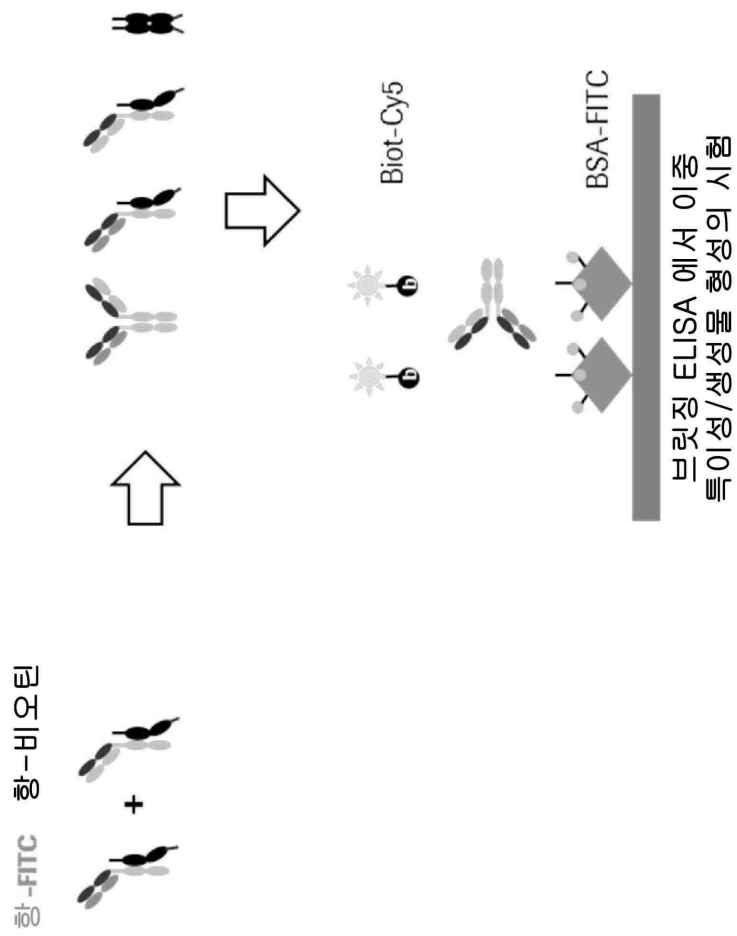
도면6



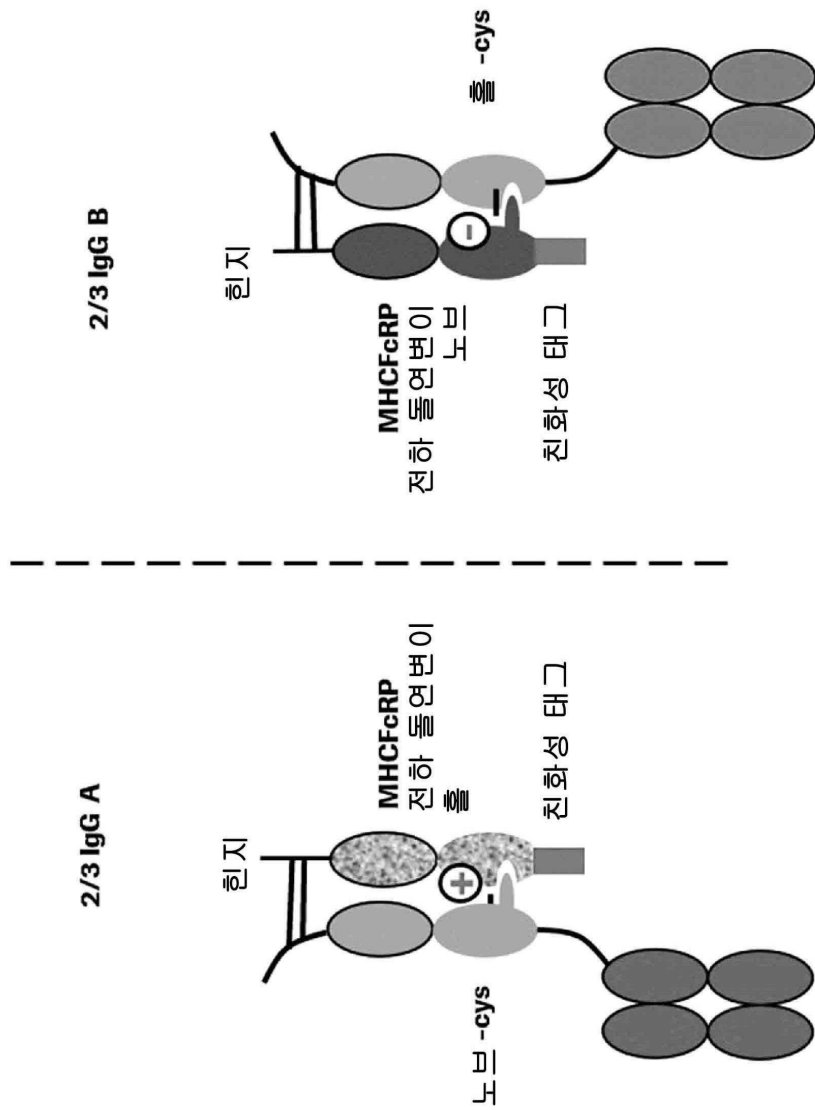
도면7



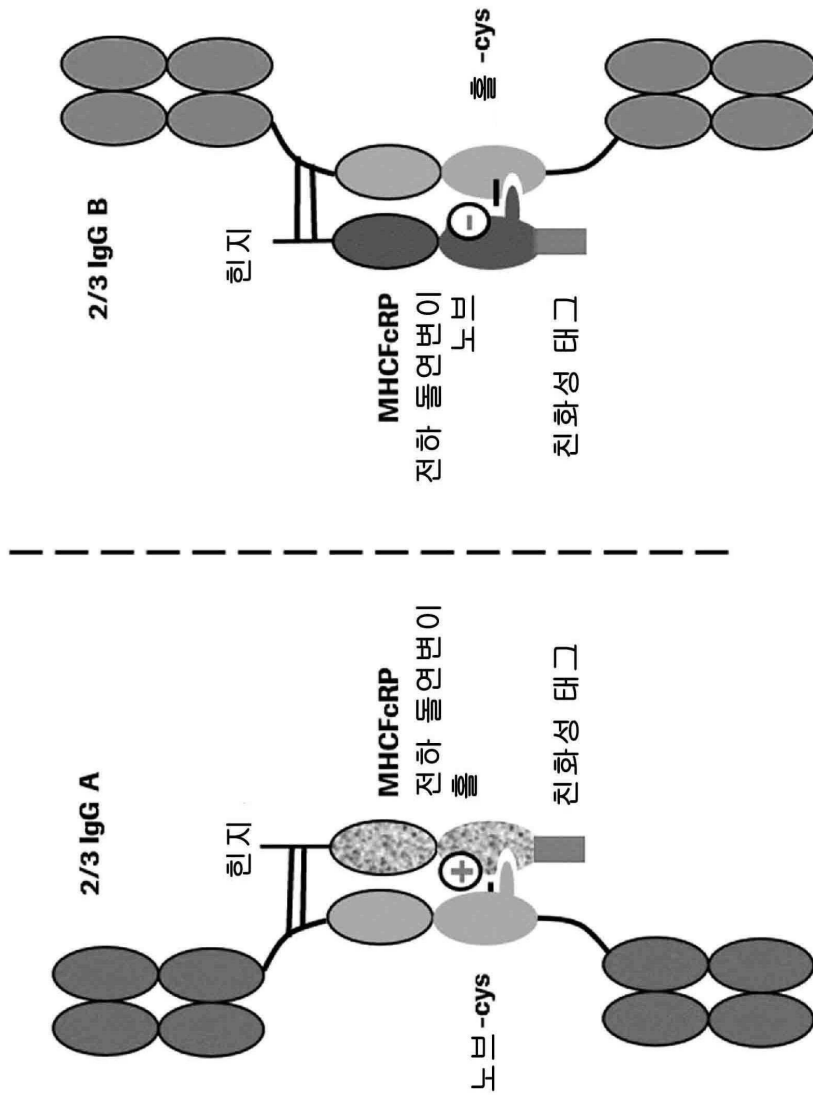
도면8



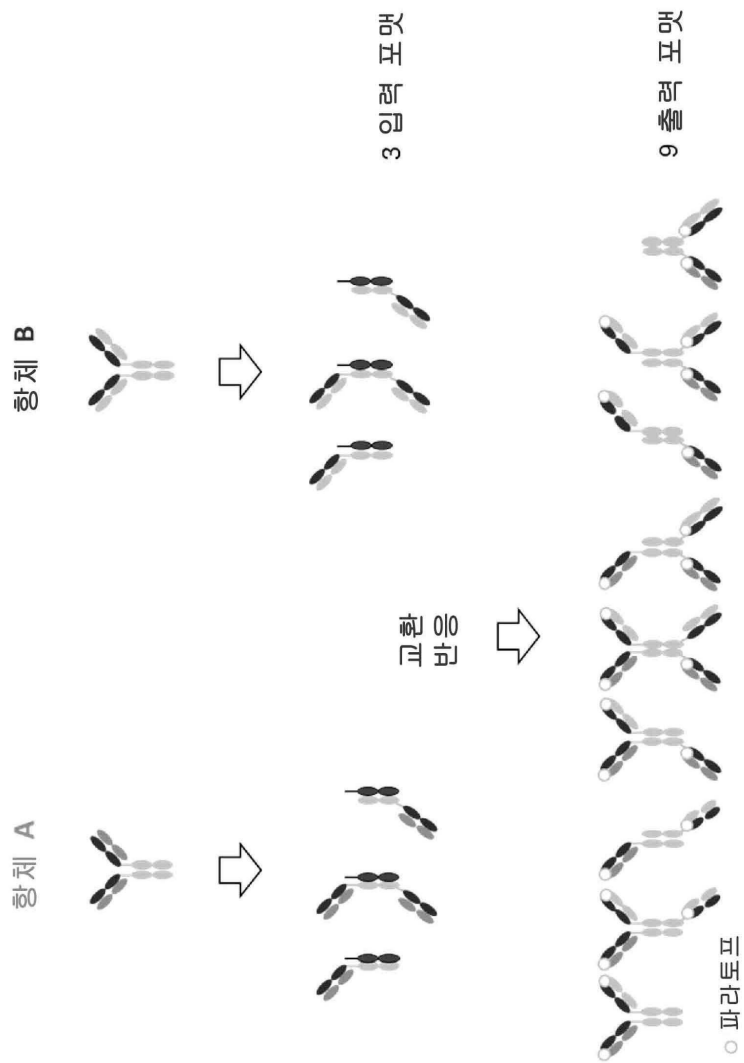
도면9



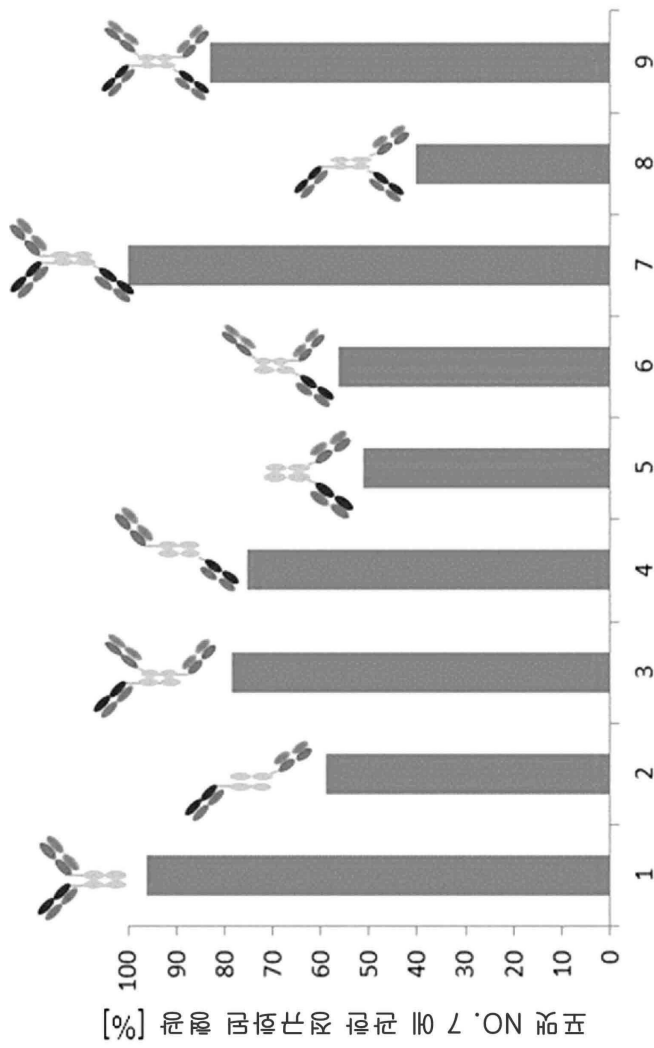
도면10



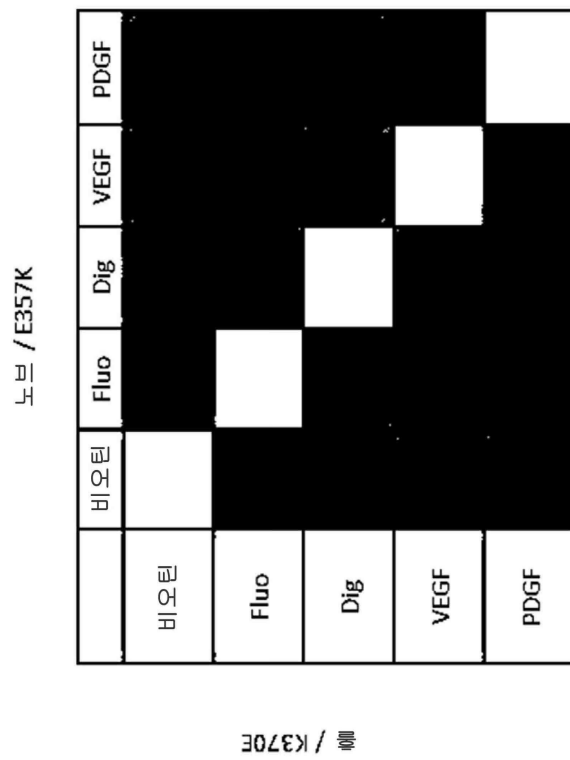
도면11



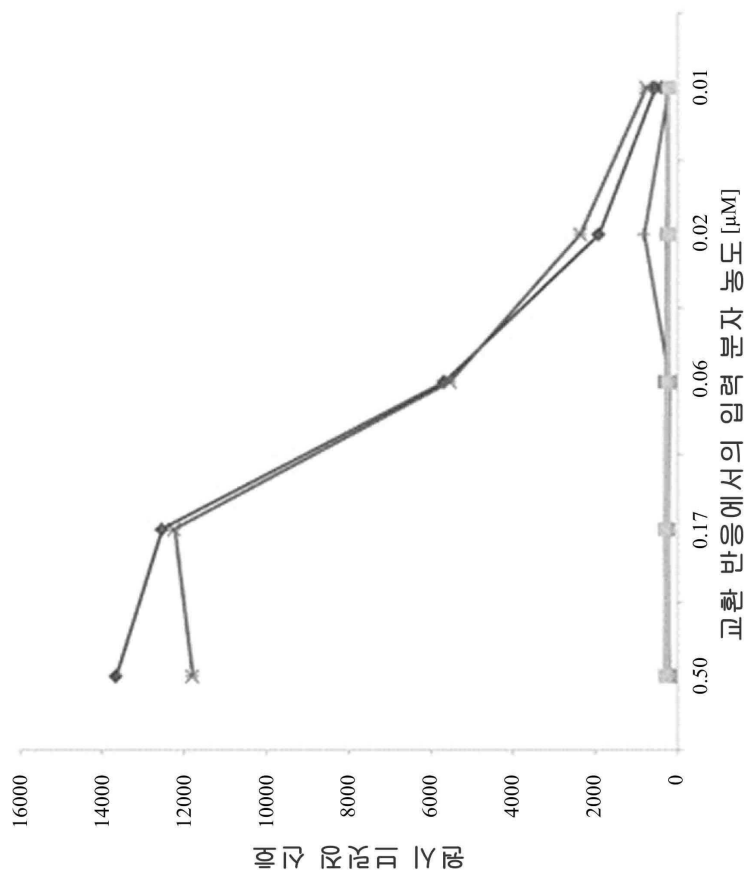
도면12



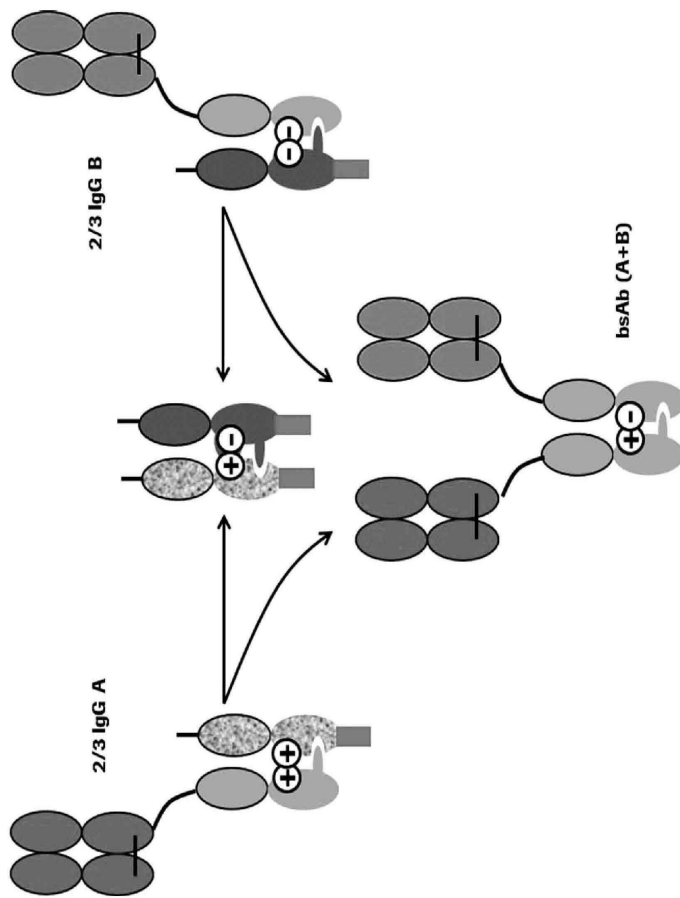
도면13



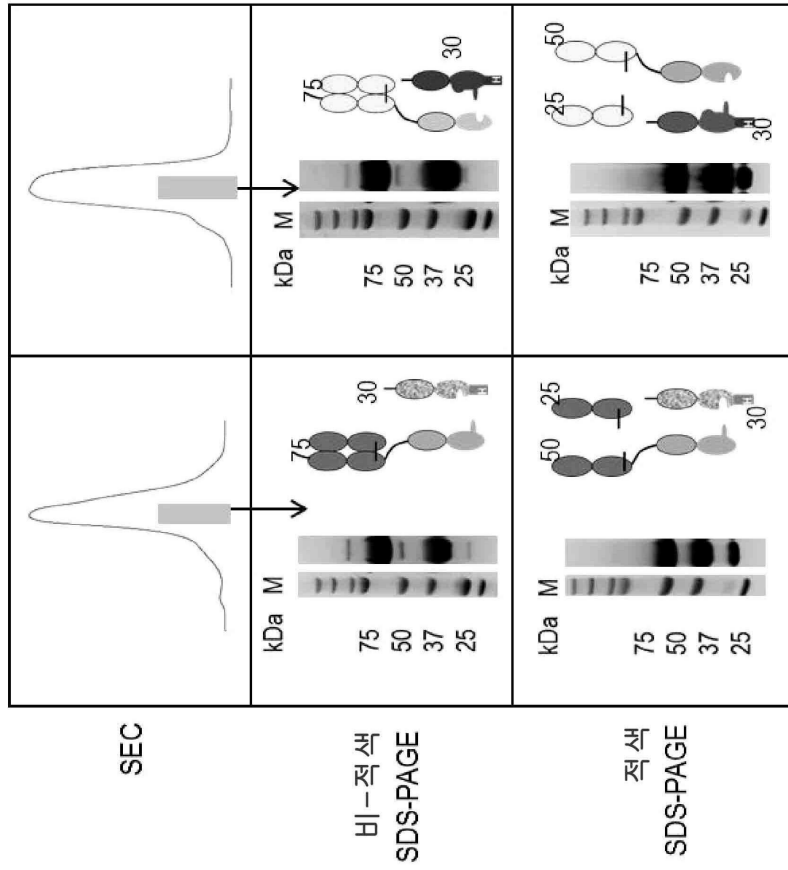
도면14



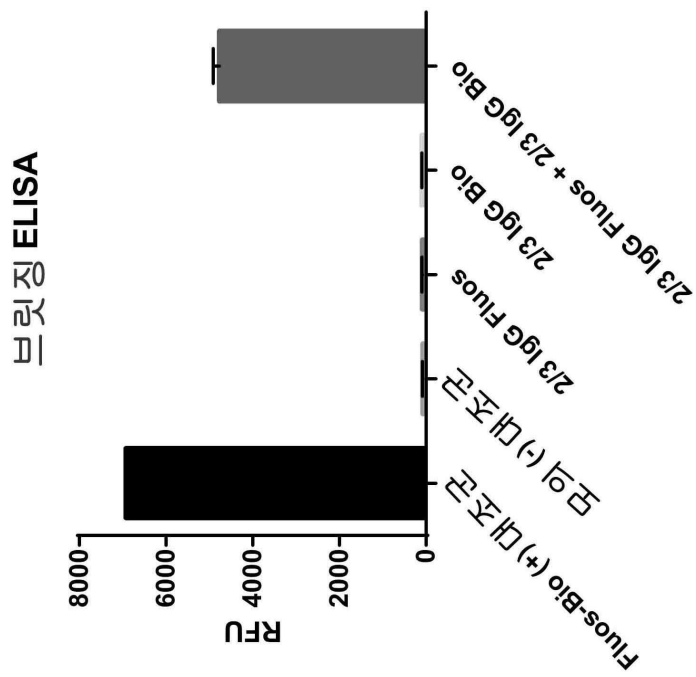
도면15



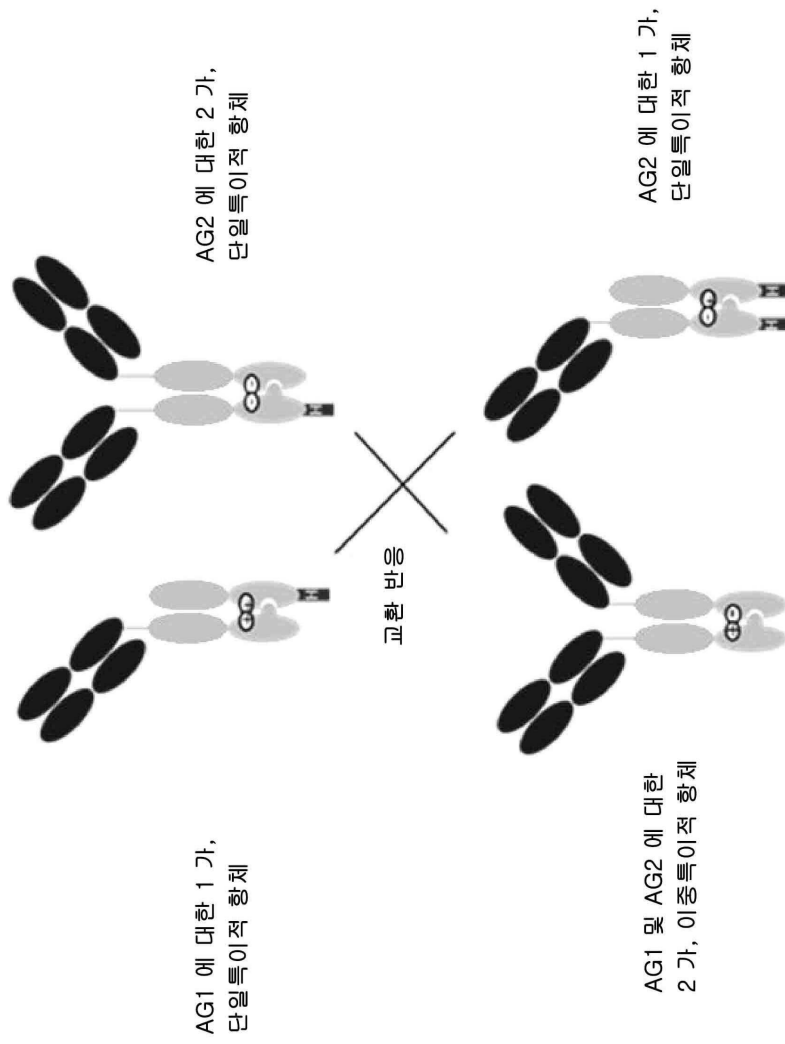
도면16



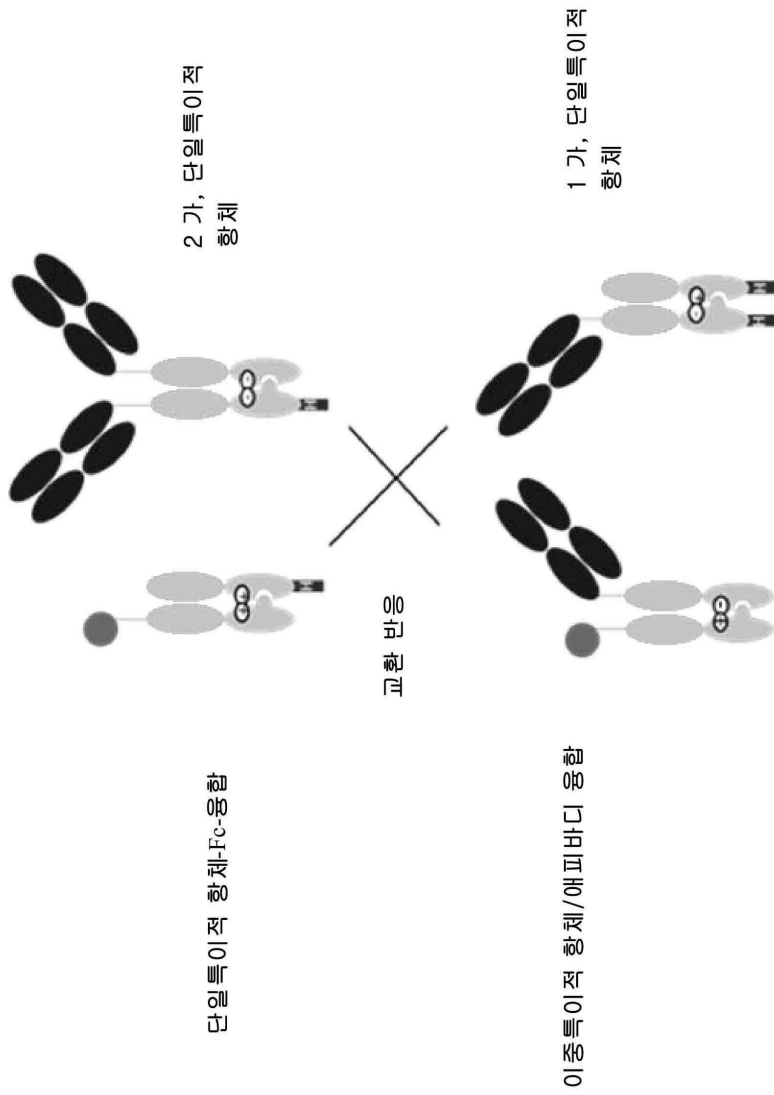
도면17



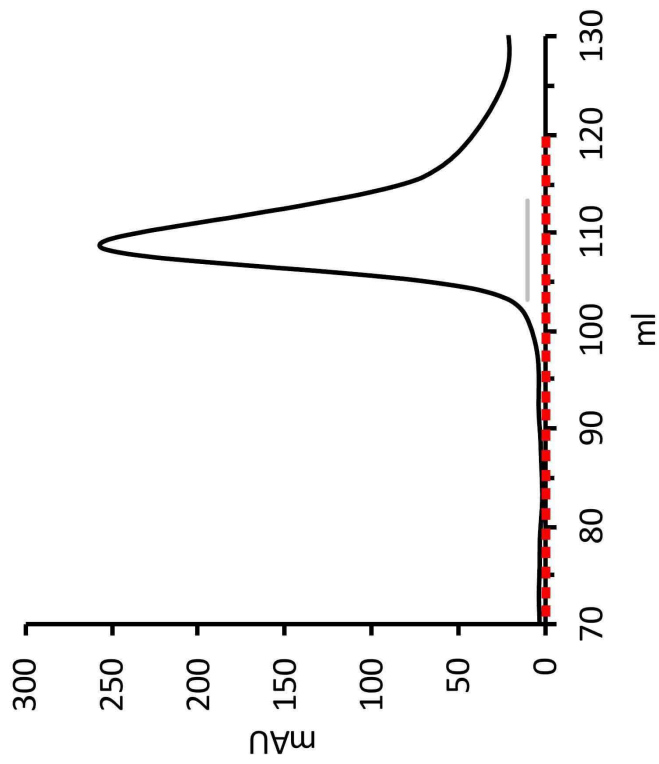
도면18



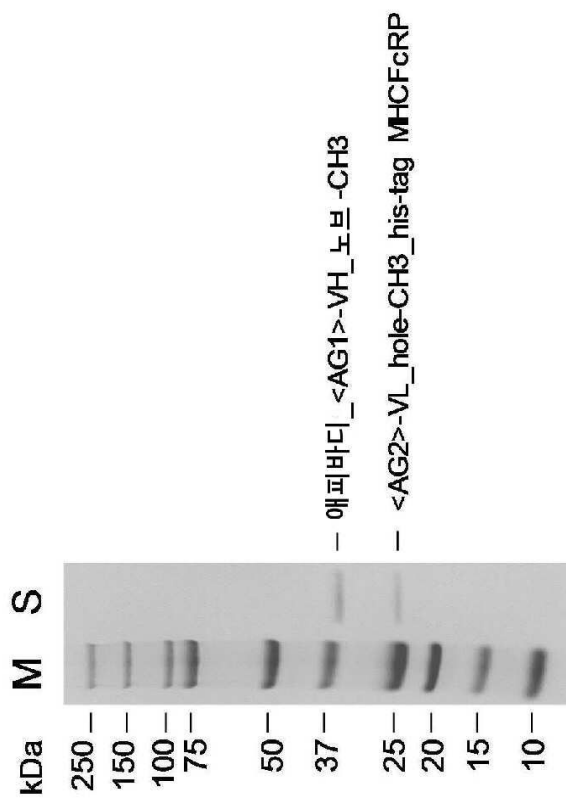
도면19



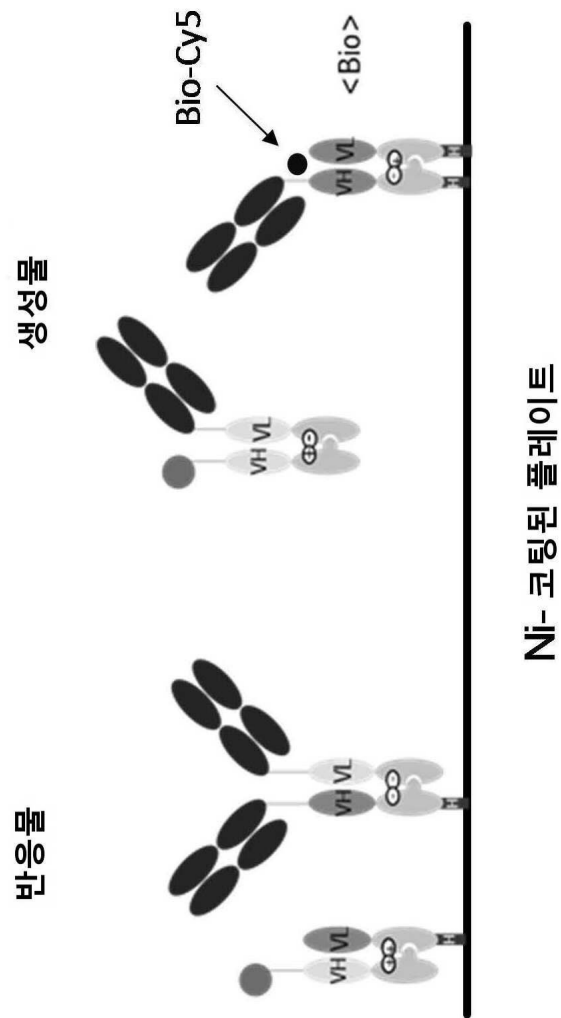
도면20



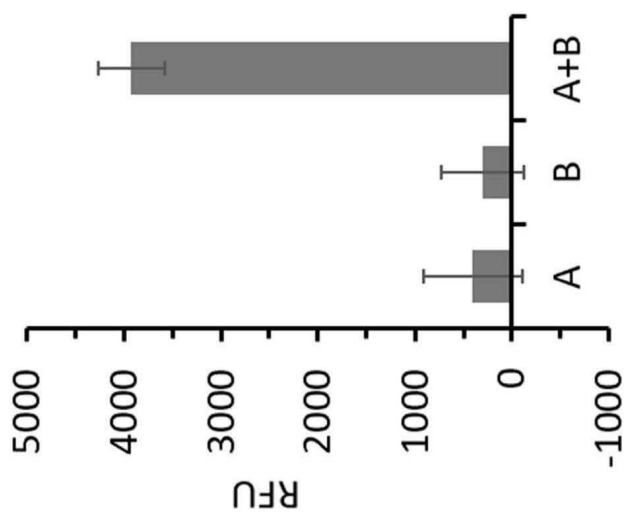
도면21



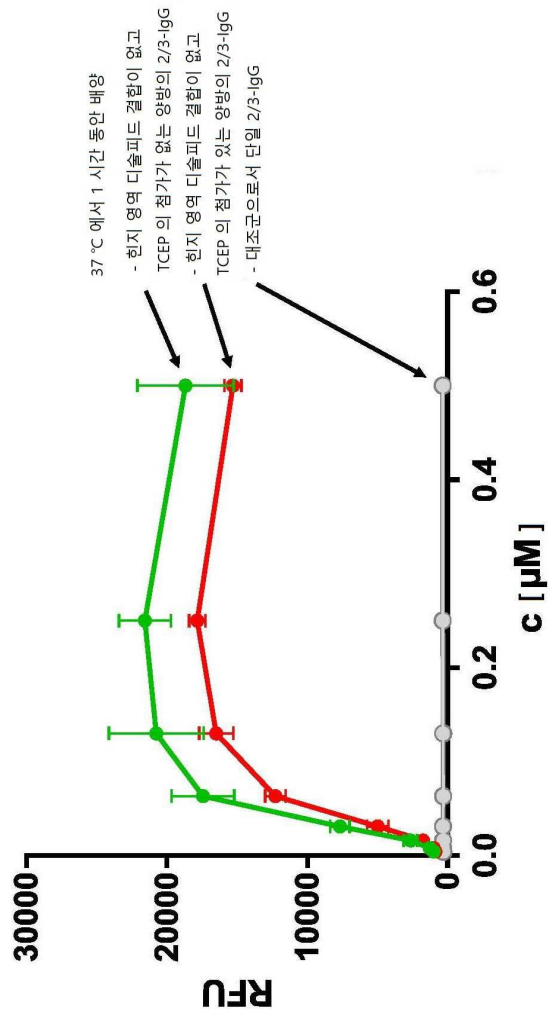
도면22



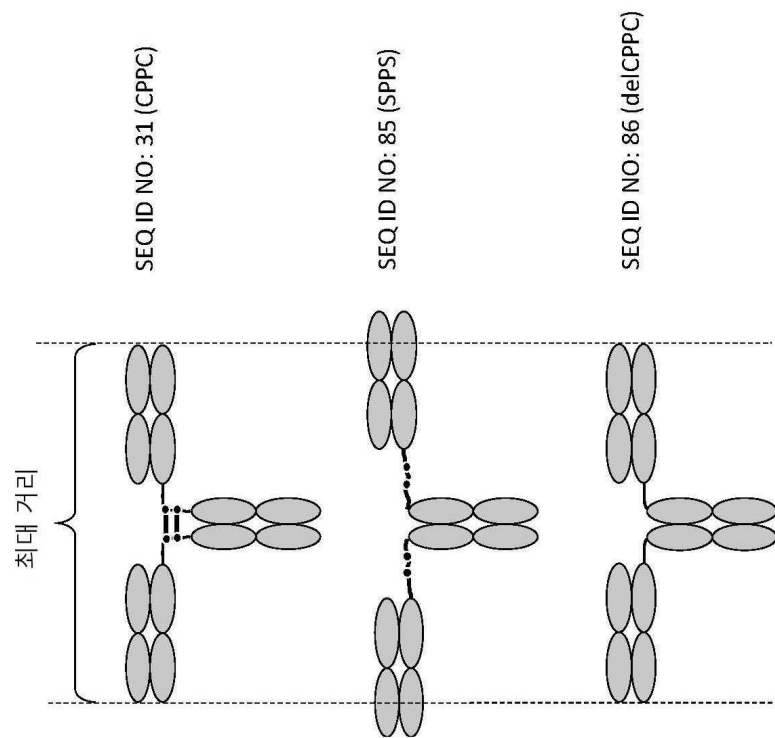
도면23



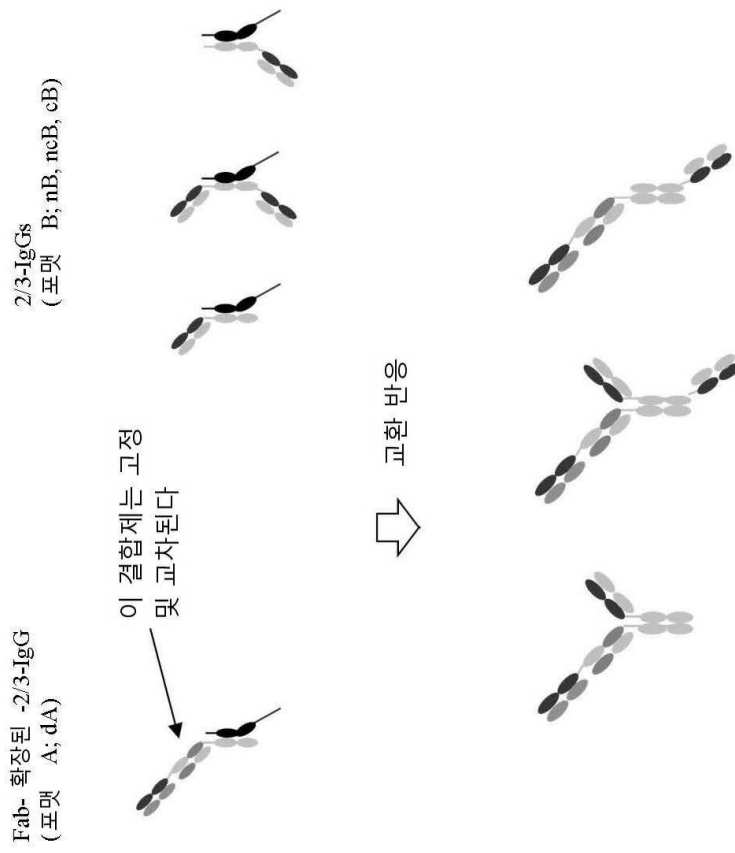
도면24



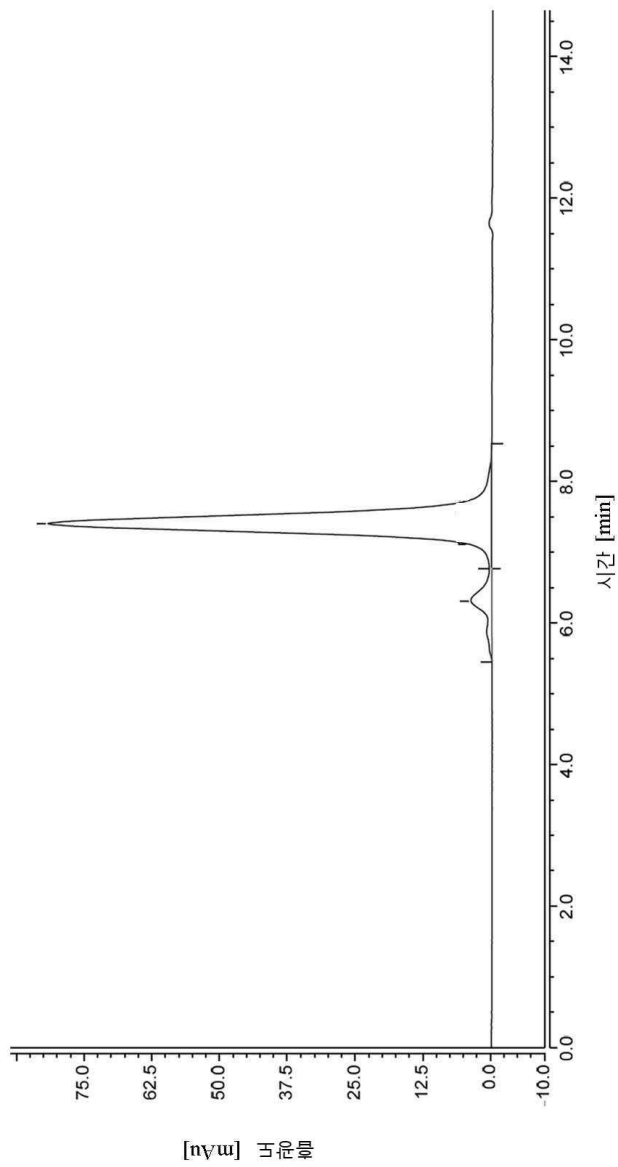
도면25



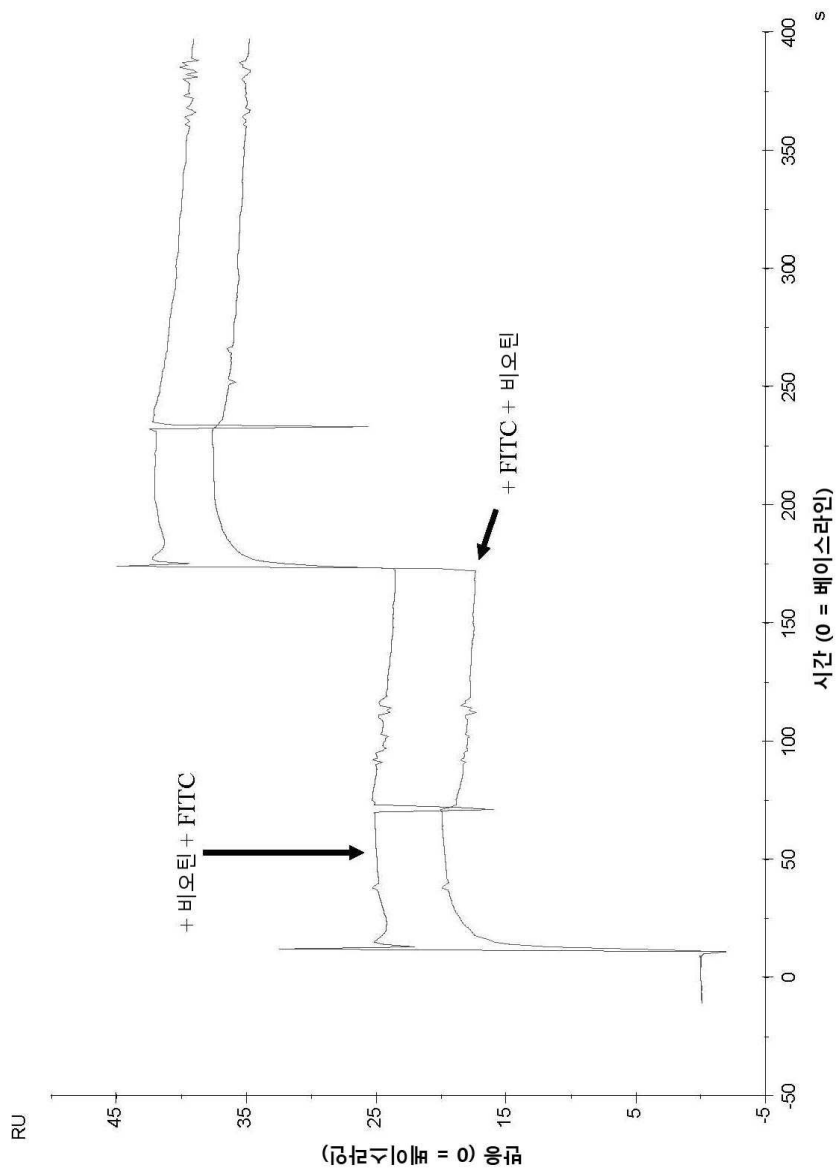
도면26



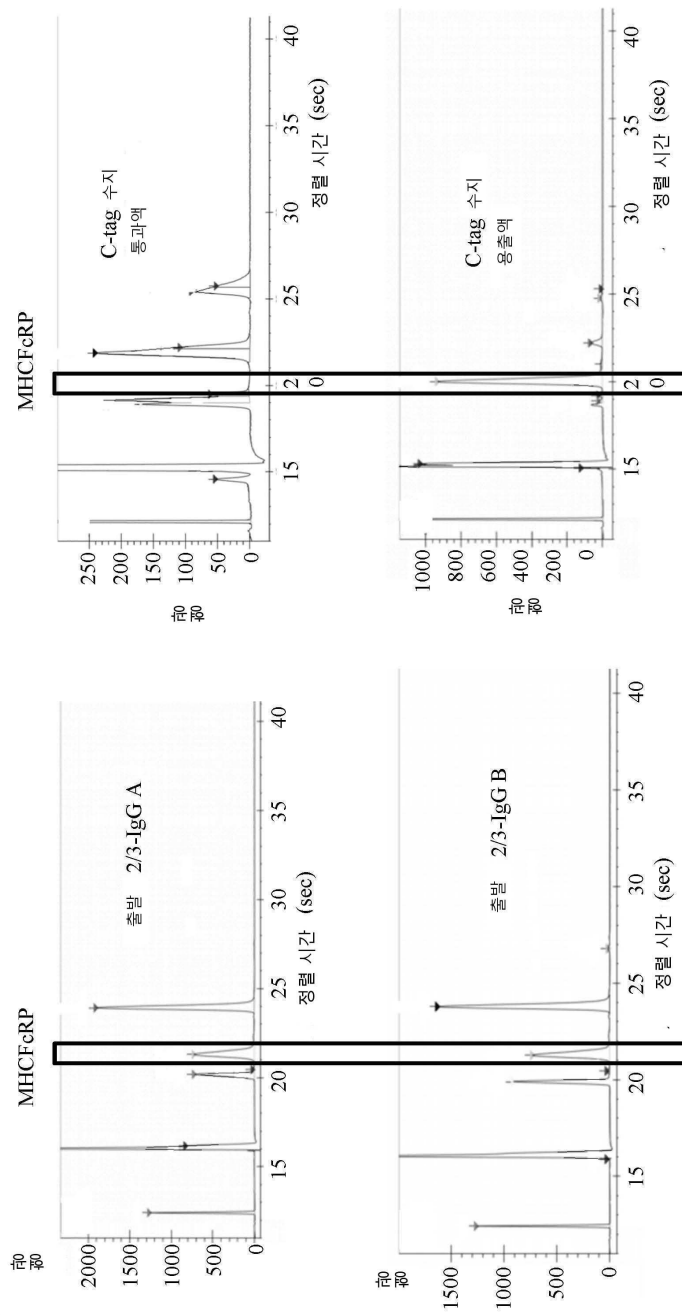
도면27



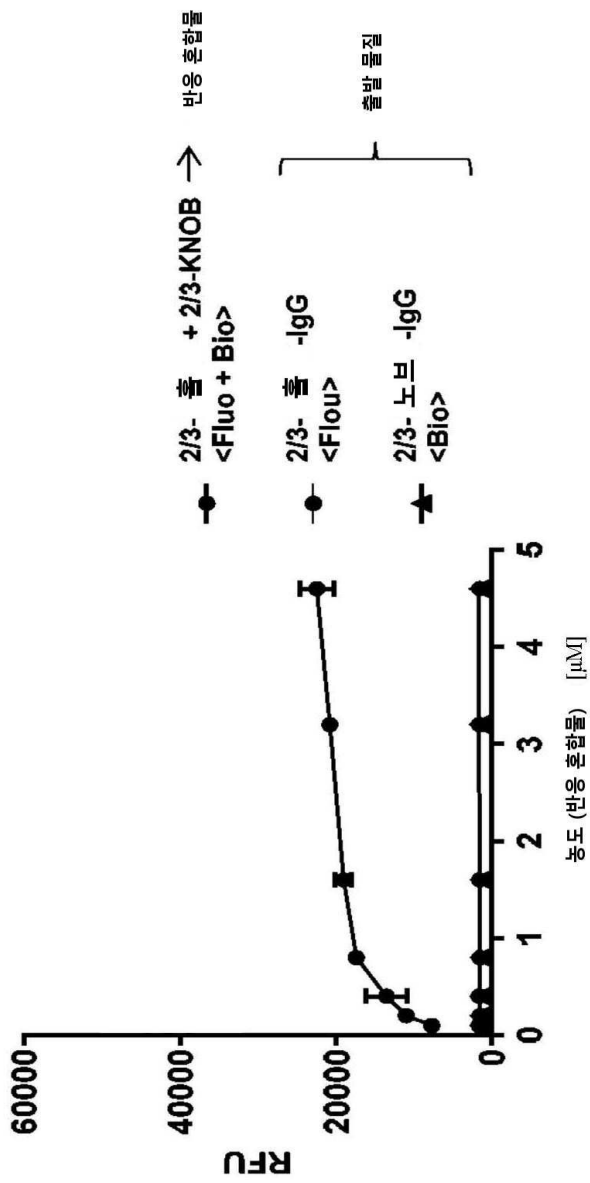
도면28



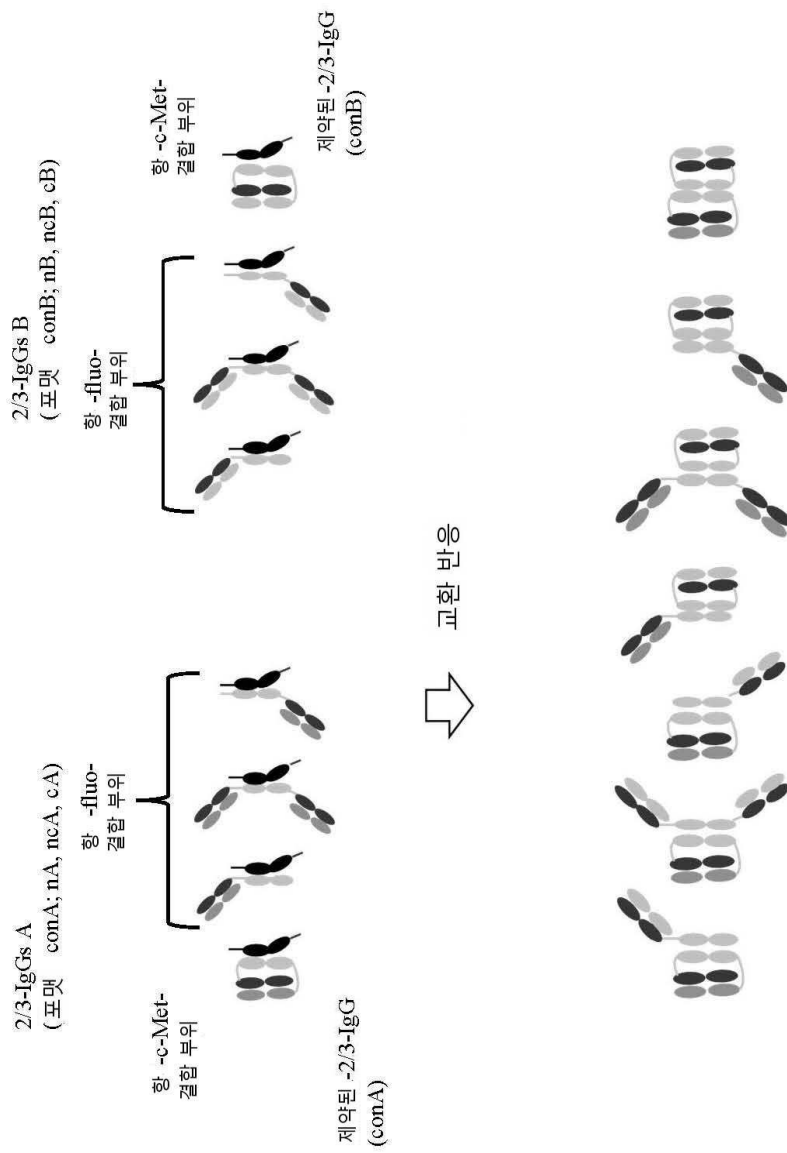
도면29



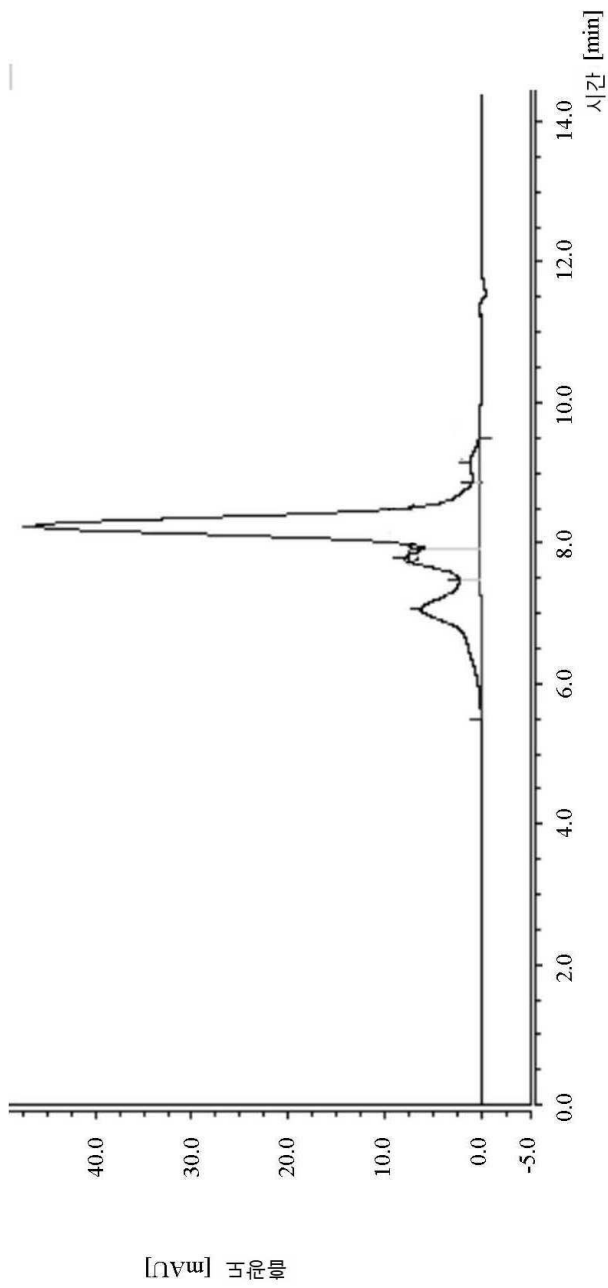
도면30



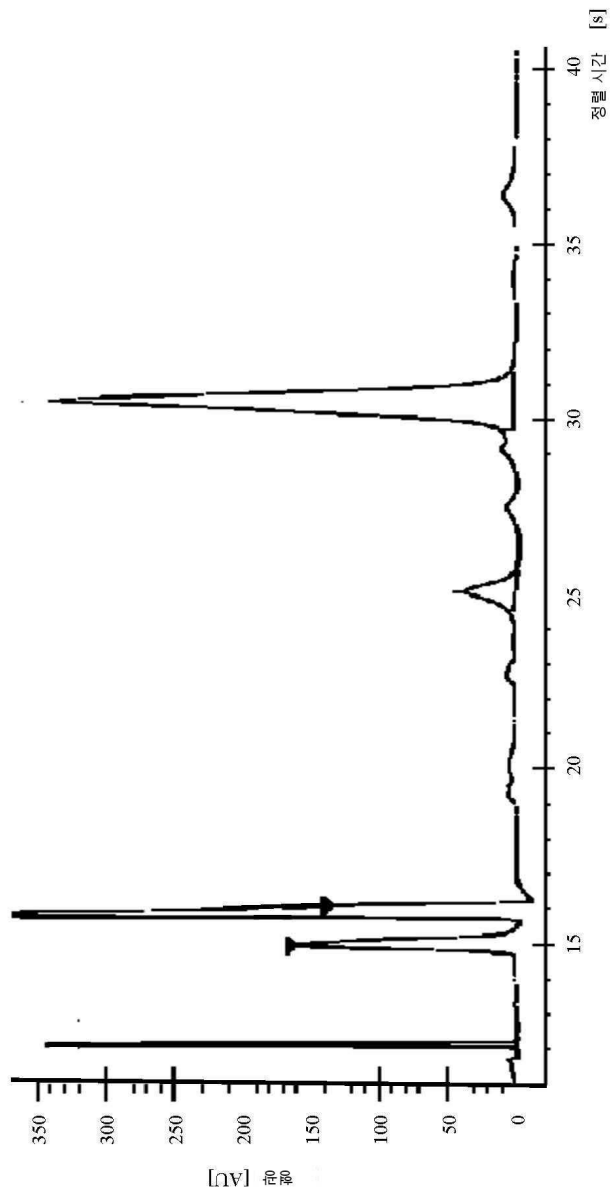
도면31



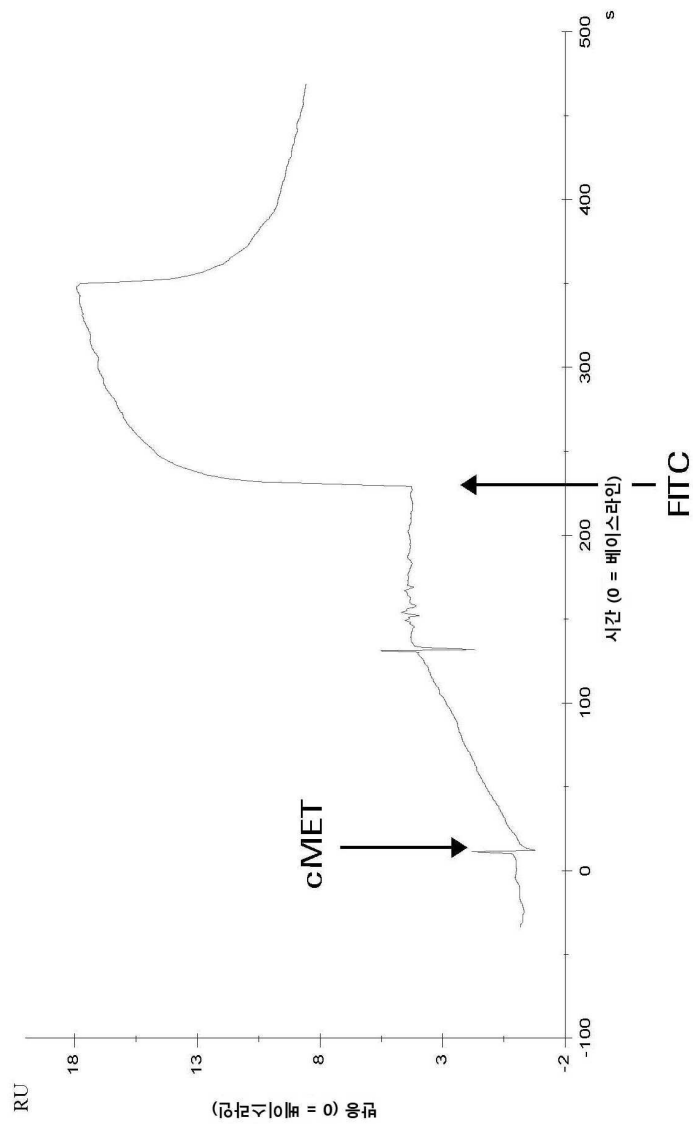
도면32



도면33



도면34



서열 목록

- <110> F. Hoffmann-La Roche AG
- <120> Method for generating multispecific antibodies from monospecific antibodies
- <130> P34497-W0
- <150> EP17197616.0
- <151> 2017-10-20
- <160> 91
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 225

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

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

115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro

225

<210> 2

<211> 324

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn

165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp

180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro

195 200 205

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

210 215 220
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255
Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270
Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320
Ser Leu Ser Pro

<210> 3
<211> 375
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
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 Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85	90	95	
Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro			
100	105	110	
Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg			
115	120	125	
Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys			
130	135	140	
Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro			
145	150	155	160
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys			
165	170	175	
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val			
180	185	190	
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr			
195	200	205	
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu			
210	215	220	
Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His			
225	230	235	240
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys			
245	250	255	
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln			
260	265	270	
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met			
275	280	285	
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro			
290	295	300	
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn			
305	310	315	320
Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu			
325	330	335	

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
 340 345 350
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
 355 360 365
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 370 375
 <210> 4
 <211
 > 227
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 1 5 10 15
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 20 25 30
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 35 40 45
 Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 50 55 60
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 65 70 75 80
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 85 90 95
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 100 105 110
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 115 120 125
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 130 135 140
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 145 150 155 160
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

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

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220
Leu Ser Leu

225

<210> 5

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human IgG1 Fc-region derived Fc-region polypeptide with the
mutations L234A, L235A

<400> 5

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
1 5 10 15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

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

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165 170 175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro

225

<210> 6

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> human IgG1 Fc-region derived Fc-region polypeptide with Y349C,
T366S, L368A and Y407V mutations

<400> 6

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro

225

<210> 7

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human IgG1 Fc-region derived Fc-region polypeptide with S354C,
T366W mutations

<400> 7

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

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

20 25 30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165 170 175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro

225

<210> 8

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> human IgG1 Fc-region derived Fc-region polypeptide with L234A,
L235A mutations and Y349C, T366S, L368A, Y407V mutations

<400> 8

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

1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

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

 115 120 125
 Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro
 225
 <210> 9
 <211> 225
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human IgG1 Fc-region derived Fc-region polypeptide with a L234A, L235A and S354C, T366W mutations

<400> 9

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

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

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

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

210	215	220
Pro		
225		
<210>	10	
<211>	225	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	human IgG1 Fc-region derived Fc-region polypeptide with a P329G mutation	
<400>	10	
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly		
1	5	10 15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
	20	25 30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
	35	40 45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
50	55	60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
65	70	75 80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
	85	90 95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile		
100	105	110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
115	120	125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		
130	135	140
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
145	150	155 160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
	165	170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro

225

<210> 11

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human IgG1 Fc-region derived Fc-region polypeptide with L234A,

L235A mutations and P329G mutation

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile

100 105 110

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

115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

 210 215 220
 Pro
 225
 <210> 12
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> human IgG1 Fc-region derived Fc-region polypeptide with a P239G
 mutation and Y349C, T366S, L368A, Y407V mutations
 <400> 12
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

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

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile

100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

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

Pro

225

<210> 13

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human IgG1 Fc-region derived Fc-region polypeptide with a P329G

mutation and S354C, T366W mutation

<400> 13

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

50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

 130 135 140
 Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205

 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro
 225
 <210> 14
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> human IgG1 Fc-region derived Fc-region polypeptide with L234A,
 L235A, P329G and Y349C, T366S, L368A, Y407V mutations
 <400> 14
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile

100 105 110

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

115 120 125

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro

225

<210> 15

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> human IgG1 Fc-region derived Fc-region polypeptide with L234A,
L235A, P329G mutations and S354C, T366W mutations

<400> 15

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile

100 105 110

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

115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro

225

<210> 16

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human IgG4 Fc-region derived Fc-region polypeptide with S228P and
L235E mutations

<400> 16

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser

65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser

100 105 110

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

115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln

130 135 140

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

145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu

180 185 190
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220
 Leu Ser Leu
 225

<210> 17

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human IgG4 Fc-region derived Fc-region polypeptide with S228P,
 L235E mutations and P329G mutation

<400> 17

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

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

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 115 120 125
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 145 150 155 160
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 165 170 175
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu

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

225

<210> 18

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human IgG4 Fc-region derived Fc-region polypeptide with S354C,
 T366W mutations

<400> 18

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

65 70 75 80
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 85 90 95
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser

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

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

 210 215 220
 Leu Ser Leu
 225
 <210> 19
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> human IgG4 Fc-region derived Fc-region polypeptide with Y349C,
 T366S, L368A, Y407V mutations
 <400> 19
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 1 5 10 15
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 20 25 30

 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 35 40 45
 Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 50 55 60

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

100 105 110
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 115 120 125
 Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 130 135 140
 Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 145 150 155 160
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 165 170 175

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

225

<210> 20

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human IgG4 Fc-region derived Fc-region polypeptide with a S228P,

L235E and S354C, T366W mutations

<400> 20

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

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

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 65 70 75 80
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 85 90 95
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 100 105 110
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 115 120 125
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln

130 135 140
 Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 145 150 155 160
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 165 170 175
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 180 185 190
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220

Leu Ser Leu

225

<210> 21

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human IgG4 Fc-region derived Fc-region polypeptide with a S228P,

L235E and Y349C, T366S, L368A, Y407V mutations

<400> 21

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser

65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser

100 105 110

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

115 120 125

Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln

130 135 140

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

145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu

180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

210 215 220

Leu Ser Leu

225

<210> 22
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> human IgG4 Fc-region derived Fc-region polypeptide with a P329G mutation

<400> 22

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser

65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Gly Ser

100 105 110

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

115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln

130 135 140

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

145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu

180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

195

200

205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

210

215

220

Leu Ser Leu

225

<210> 23

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human IgG4 Fc-region derived Fc-region polypeptide with a P239G

and Y349C, T366S, L368A, Y407V mutations

<400> 23

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

50

55

60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser

65

70

75

80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

85

90

95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Gly Ser

100

105

110

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

115

120

125

Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln

130

135

140

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

145											150											155											160
Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr																		
										165											170											175	
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Arg	Leu																		
										180											185											190	
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser																		
										195											200											205	
Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser																		
										210											215											220	
Leu	Ser	Leu																															
225																																	

<210>	24
<211>	227
<212>	PRT
<213>	Artificial Sequence
<220><223>	human IgG4 Fc-region derived Fc-region polypeptide with a P329G and S354C, T366W mutations
<400>	24

Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe
1				5					10					15	
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
			20					25					30		
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
		35						40				45			
Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
	50						55				60				
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser
65					70					75					80
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu
			85						90					95	
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Gly	Ser

100 105 110

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

115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln

130 135 140

Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu

180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

210 215 220

Leu Ser Leu

225

<210> 25

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human IgG4 Fc-region derived Fc-region polypeptide with a S228P,
L235E, P329G and Y349C, T366S, L368A, Y407V mutations

<400> 25

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser

65 70 75 80
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 85 90 95
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Gly Ser
 100 105 110
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 115 120 125
 Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 130 135 140

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

210 215 220
 Leu Ser Leu

225

<210> 26

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human IgG4 Fc-region derived Fc-region polypeptide with a S228P,
 L235E, P329G and S354C, T366W mutations

<400> 26

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 1 5 10 15

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

	20					25					30						
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val		
35						40						45					
Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val		
50						55						60					
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser		
65						70						75			80		
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu		
			85						90						95		
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Gly	Ser		
			100						105						110		
Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro		
115						120						125					
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln		
130						135						140					
Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala		
145						150						155			160		
Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr		
			165						170						175		
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu		
			180						185						190		
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser		
195						200						205					
Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser		
210						215						220					
Leu Ser Leu																	
225																	
<210>		27															
<211>		103															
<212>		PRT															
<213>		Homo sapiens															
<400>		27															

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

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

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
100

<210> 28

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

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> 29

<211> 105

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

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> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)

<223> X=S or P

<400> 30

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Xaa Cys Pro

1 5 10

<210> 31

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (5)
 <223> X=S or P
 <400> 31

His Thr Cys Pro Xaa Cys Pro

1 5

<210> 32

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> X=S or P

<400> 32

Cys Pro Xaa Cys Pro

1 5

<210> 33

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

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>	34
<211>	105
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<400>	34

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> 35

<211>	240
<212>	PRT
<213>	Artificial Sequence
<220><223>	MHCFcRP-hole-D356K-His8

<400> 35
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

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

20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Lys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser His His His His His His His
 225 230 235 240
 <210> 36
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> MHCfRP-hole-E357K-His8

<400> 36

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

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

115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Lys Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser His His His His His His His His

225 230 235 240

<210> 37

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHCFcRP-knob-K370E-His8

<400> 37

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140
Leu Trp Cys Leu Val Glu Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser His His His His His His His His

225 230 235 240

<210> 38
<211> 240
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> MHCFcRP-knob-K439E-His8
<400> 38

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220
Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser His His His His His His His

225 230 235 240

<210> 39

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-bio antibody full length light chain

<400> 39

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Lys Thr Leu Ala Asp 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ser Ile Tyr

85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 40

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-bio antibody full length heavy chain-knob-cys

<400> 40

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 Ser Ser Gly Phe Asn Asn Lys Asp Thr

20 25 30

Phe Phe Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Phe Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr 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 Trp Asp Thr Tyr Gly Ala Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180

185

190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195

200

205

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

210

215

220

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

225

230

235

240

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

245

250

255

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

260

265

270

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

275

280

285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290

295

300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305

310

315

320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

325

330

335

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

340

345

350

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

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

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

Gly Lys

450

<210> 41

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-bio antibody full length heavy chain-hole-cys

<400> 41

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

100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

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

355 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
 450
 <210> 42
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> anti-fluos antibody full length light chain
 <400> 42
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Arg Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Val Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln 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
 210 215
 <210> 43
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> anti-fluos antibody full length heavy chain-knob-cys
 <400> 43
 Gly Val Lys Leu Asp Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Thr Gly Ile Tyr

85 90 95

Tyr Cys Thr Gly Ala Ser Tyr Gly Met Glu Tyr Leu Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

290 295 300

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

305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 44
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> anti-fluos antibody full length heavy chain-hole-cys
 <400> 44

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

Ala Gln Phe Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Thr Gly Ile Tyr

85	90	95	
Tyr Cys Thr Gly Ala Ser Tyr Gly Met Glu Tyr Leu Gly Gln Gly Thr			
100	105	110	
Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro			
115	120	125	
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly			
130	135	140	
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn			
145	150	155	160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln			
165	170	175	
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser			
180	185	190	
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser			
195	200	205	
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr			
210	215	220	
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser			
225	230	235	240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg			
245	250	255	
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro			
260	265	270	
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala			
275	280	285	
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val			
290	295	300	
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr			
305	310	315	320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr			
325	330	335	

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

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

<210> 45
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> anti-dig antibody full length light chain
 <400> 45

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

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

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

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

145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 46
 <211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-LeY antibody full length light chain

<400> 46

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
210 215

<210> 47

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-PDGF antibody full length light chain

<400> 47

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

Asp Arg Val Ala Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
85 90 95

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

100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 48

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-VEGF antibody full length light chain

<400> 48

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 49
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> anti-dig antibody VH-CH1 fragment
 <400> 49
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Pro Lys Ser Cys
225

<210> 50
<211> 222
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> anti-LeY antibody VH-CH1 fragment
<400> 50

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
 210 215 220
 <210> 51
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> anti-PDGF antibody VH-CH1 fragment

<400> 51

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Thr Ile Ser Asp Gly Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

85 90 95
Ala Glu Ser Gly Gly Tyr Thr Asp Trp Leu Phe Gly 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
210 215 220

<210> 52

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-VEGF antibody VH-CH1 fragment

<400> 52

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 Tyr Asp Phe Thr His Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe

50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser 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

Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val

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
 225
 <210> 53
 <211> 460
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> anti-bio antibody full length heavy chain-hole-cys with
 C-terminal fusion
 <400> 53
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165	170	175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val		
180	185	190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
195	200	205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
210	215	220
Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln		
225	230	235
		240
Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys		
245	250	255
Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Phe Asn Asn Lys Asp Thr Phe Phe Gln		
260	265	270
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile		
275	280	285
Asp Pro Ala Asn Gly Phe Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg		
290	295	300
Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu		
305	310	315
Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp		
325	330	335
Asp Thr Tyr Gly Ala Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu		
340	345	350
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu		
355	360	365
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys		
370	375	380
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser		
385	390	395
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser		
405	410	415
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser		

420 425 430
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 435 440 445
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

450 455 460
 <210> 54
 <211> 683
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> anti-bio antibody full length heavy chain-hole-cys with N- and
 C-terminal fusion

<400> 54
 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 Ser Ser Gly Phe Asn Asn Lys Asp Thr
 20 25 30
 Phe Phe Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Phe Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr 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 Trp Asp Thr Tyr Gly Ala Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

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

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

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

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

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

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

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

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

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

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

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val 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 Gln Val Gln Leu
 450 455 460
 Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val

 465 470 475 480
 Ser Cys Lys Ser Ser Gly Phe Asn Asn Lys Asp Thr Phe Phe Gln Trp
 485 490 495
 Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp
 500 505 510
 Pro Ala Asn Gly Phe Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val
 515 520 525
 Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser
 530 535 540

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

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

660 665 670
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 675 680

 <210> 55
 <211> 458
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> anti-fluos antibody full length heavy chain-hole-cys with
 C-terminal fusion
 <400> 55
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

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

 115 120 125
 Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Val Lys
225 230 235 240

Leu Asp Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ala Met Lys
245 250 255

Leu Ser Cys Val Thr Ser Gly Phe Thr Phe Gly His Tyr Trp Met Asn
260 265 270

Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Gln Phe
275 280 285

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

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu
305 310 315 320

Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr
325 330 335

Gly Ala Ser Tyr Gly Met Glu Tyr Leu Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
340 345 350

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
355 360 365

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
370 375 380

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
385 390 395 400

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
405 410 415

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly

420 425 430
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 435 440 445
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 450 455
 <210> 56
 <211> 679
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> anti-fluos antibody full length heavy chain-hole-cys with N- and

C-terminal fusion
 <400> 56
 Gly Val Lys Leu Asp Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ala Met Lys Leu Ser Cys Val Thr Ser Gly Phe Thr Phe Gly His Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gln Phe Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Gly Ala Ser Tyr Gly Met Glu Tyr Leu Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

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

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

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

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
340 345 350

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

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

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

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Val Lys Leu Asp Glu

450 455 460

Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ala Met Lys Leu Ser Cys

465 470 475 480

Val Thr Ser Gly Phe Thr Phe Gly His Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg

485 490 495

Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Gln Phe Arg Asn Lys

500 505 510

Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe

515 520 525

Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn

530 535 540

Asn Leu Arg Val Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Gly Ala Ser

545 550 555 560

Tyr Gly Met Glu Tyr Leu Gly Gln Gly Thr Ser 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> 57

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-bio antibody full length heavy chain-knob without
 hinge-region cysteine residues

<400> 57

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 Ser Ser Gly Phe Asn Asn Lys Asp Thr

20 25 30

Phe Phe Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Phe Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr 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 Trp Asp Thr Tyr Gly Ala Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

[illegible]

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

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

210 215 220

Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

325 330 335

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

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg 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
 450
 <210> 59
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> anti-fluos antibody full length heavy chain-knob without
 hinge-cysteine residues
 <400> 59
 Gly Val Lys Leu Asp Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ala Met Lys Leu Ser Cys Val Thr Ser Gly Phe Thr Phe Gly His Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gln Phe Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Gly Ala Ser Tyr Gly Met Glu Tyr Leu Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

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

 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

385	390	395	400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser			
405	410	415	
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala			
420	425	430	
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
435	440	445	
<210>	60		
<211>	448		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	anti-fluos antibody full length heavy chain-hole without		
	hinge-cysteine residues		
<400>	60		
Gly Val Lys Leu Asp Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ala Met Lys Leu Ser Cys Val Thr Ser Gly Phe Thr Phe Gly His Tyr			
20	25	30	
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Ala Gln Phe Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp			
50	55	60	
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser			
65	70	75	80
Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Thr Gly Ile Tyr			
85	90	95	
Tyr Cys Thr Gly Ala Ser Tyr Gly Met Glu Tyr Leu Gly Gln Gly Thr			
100	105	110	
Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro			
115	120	125	
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly			

130	135	140	
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn			
145	150	155	160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln			
	165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser			
	180	185	190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser			
195	200	205	
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr			
210	215	220	
His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser			
225	230	235	240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg			
	245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro			
260	265	270	
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala			
275	280	285	
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val			
290	295	300	
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr			
305	310	315	320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr			
	325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu			
340	345	350	
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys			
355	360	365	
Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser			
370	375	380	
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp			

385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 61
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MHCfRP-hole-D356K-His8 without hinge-cysteine residues
 <400> 61
 Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

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

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

145 150 155 160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

 165 170 175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val

 180 185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

 195 200 205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

 210 215 220
Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser His His His His His His His His

225 230 235 240

<210> 62

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHCfCRP-hole-E357K-His8 without hinge-cysteine residues

<400> 62

Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

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

115 120 125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Lys Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140
Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser His His His His His His His His
225 230 235 240

<210> 63

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHCFCRP-knob-K370E-His8 without hinge-cysteine residues

<400> 63

Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65						70						75						80
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly			
					85						90						95	
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile			
					100						105						110	
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val			
					115						120						125	
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser			
					130						135						140	
Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Glu	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu			
					150						155						160	
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro			
					165						170						175	
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val			
					180						185						190	
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met			
					195						200						205	
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser			
					210						215						220	
Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	His	His	His	His	His	His	His	His			
					225						230						235	240
<210>	64																	
<211>	240																	
<212>	PRT																	
<213>	Artificial Sequence																	
<220><223>	MHCFcRP-knob-K439E-His8 without hinge-cysteine residues																	
<400>	64																	
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly			
					5						10						15	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met			
					20						25						30	
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His			

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

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

 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser His His His His His His His His
 225 230 235 240

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

1

5

<210> 66
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cys-free hinge region
 <400> 66

Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser
 1 5

<210> 67
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hexa-histidine tag
 <400> 67

His His His His His His
 1 5

<210> 68
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> octa-histidine tag
 <400> 68

His His His His His His His His
 1 5

<210> 69
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptidic linker
 <400> 69

Gly Gly Gly Ser
 1

<210> 70
 <211> 5

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptidic linker
 <400> 70

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210>

71

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptidic linker

<400> 71

Gln Gln Gln Ser

1

<210> 72

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptidic linker

<400> 72

Gln Gln Gln Gln Ser

1 5

<210> 73

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptidic linker

<400> 73

Ser Ser Ser Gly

1

<210> 74

<211> 5

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> peptidic linker

<400> 74

Ser Ser Ser Ser Gly

1 5

<210> 75

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptidic linker

<400> 75

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 76

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptidic linker

<400> 76

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

1 5 10

<210> 77

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptidic linker

<400> 77

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

1 5 10 15

<210> 78

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptidic linker

<400> 78

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> 79

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptidic linker

<400> 79

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 80

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptidic linker

<400> 80

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

1 5 10 15

<210> 81

<211> 20

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> peptidic linker

<400> 81

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> 82

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptidic linker

<400> 82

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

1 5 10 15

Gly

<210> 83

<211

> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> affibody-MHCFcRP

<400> 83

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Ala Lys Thr Leu Ala Asp 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ser Ile Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gln Pro Arg Glu

100 105 110

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Lys Leu Thr Lys Asn

115 120 125

Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

130 135 140

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

195 200 205
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser His His His His His
 210 215 220
 His His His

225

<210> 84

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> affibody-VH

<400> 84

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Arg Asn Ala Tyr Trp Glu Ile
 1 5 10 15
 Ala Leu Leu Pro Asn Leu Asn Asn Gln Gln Lys Arg Ala Phe Ile Arg
 20 25 30

Ser Leu Tyr Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Gly Thr Gly Gly Gly Gly
 50 55 60

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 65 70 75 80

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

130 135 140

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

145 150 155 160

Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

165 170 175

Ala Arg Asp Ser Tyr Ser Asn Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

180 185 190

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

195 200 205

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

210 215 220

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

225 230 235 240

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

245 250 255

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

260 265 270

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

275 280 285

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

290 295 300

Gly Lys

305

<210> 85

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hinge region

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)

<223> X=S or P

<400> 85

His Thr Ser Pro Xaa Ser Pro

1 5

<210> 86

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hinge region#

<400> 86

His Thr Pro Ala Pro Glu

1 5

<210> 87

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-tag

<400> 87

Glu Pro Glu Ala

1

<210> 88

<211> 9

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-tag with linker

<400> 88

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Pro Glu Ala

1 5

<210> 89

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> X = S or P

<400> 89

Cys Pro Xaa Cys

1

<210> 90

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu

1

5

10

<

210> 91

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

Asp Lys Thr His Thr

1

5