(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0041196
(43) 공개일자 2022년03월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2809 (2013.01)
A61P 31/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2022-7007087
(22) 출원일자(국제) 2020년07월31일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년03월02일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2020/071655
(87) 국제공개번호 WO 2021/023657
국제공개일자 2021년02월11일
(30) 우선권주장
10 2019 121 022.4 2019년08월02일 독일(DE)
62/882,364 2019년08월02일 미국(US)

(71) 출원인
이매틱스 바이오테크놀로지스 게엠베하
독일 72076 투빈겐 파울-울리흐-스트라쎄 15
(72) 발명자
프스졸라 가브리엘
독일 72076 튀빈겐 호이서스트라세 51
호프만 마르틴
독일 72076 튀빈겐 가이스베크 20
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인(유)

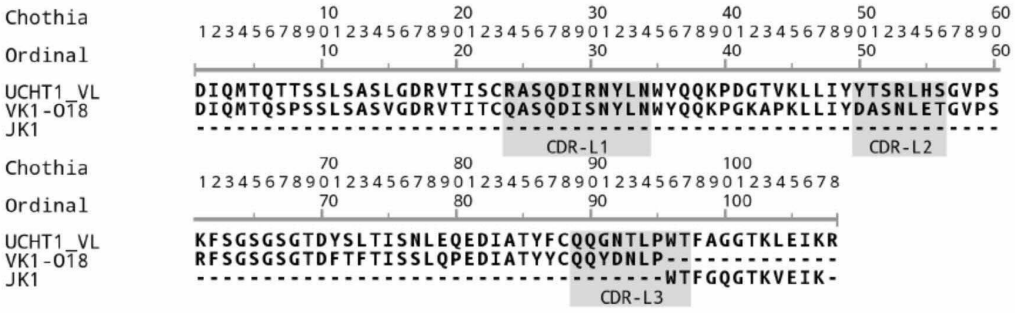
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 **변형된 이중특이성 항-CD3 항체**

(57) 요 약

본 발명은 주 조직적합 복합체(MHC)가 지시된 표적 항원(TA)에 대 이중특이성 항원 결합 단백질에 관한 것이다. 본 발명은 특히 적어도 2개의 항원 결합 부위(A 및 B)를 포함하는 이중특이성 항원 결합 단백질을 제공하며, 항원 결합 부위 A는 CD3에 결합하고 항원 결합 부위 B는 표적 항원성(TA) 펩티드/MHC 복합체에 결합한다. 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질은, 특히 감소된 친화도를 가진 신규 조작된 항-CD3 항체의 VL 및 VH 도메인의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 본 발명의 이중 특이성 항원 결합 단백질은 암성 질병을 발현하는 종양 관련 항원 (TAA)과 같은 TA 관련 질병의 진단, 치료 및 예방을 위한 사용에 관한 것이다. 본 발명의 항원 결합 단백질을 인코딩하는 핵산, 이 핵산을 포함하는 벡터, 항원 결합 단백질을 발현하는 재조합 세포 및 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질을 포함하는 약학적 조성물이 추가로 제공된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/32 (2013.01)
C07K 2317/626 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
(72) 발명자
운퍼도르벤 펠릭스
독일 70199 스투트가르트 뫼린거 스트라세 157
후트 마이케
독일 70565 스투트가르트 로러 회혜 58
모이러 도미니크
독일 72116 뫼신겐 플라이너베크 7
분크 세바스티안
독일 72074 튀빈겐 게르트루트-바오이머-스트라세 19/1

명 세 서

청구범위

청구항 1

적어도 2개의 항원 결합 부위(A 및 B)를 포함하는 이중특이성 항원 결합 단백질에 있어서, 항원 결합 부위 A가 CD3에 결합하며, 항원 결합 부위 B가 표적 항원성(TA) 펩티드/MHC 복합체에 결합하며, 항원 결합 부위 A가 중쇄 가변 도메인(V_H) 및 경쇄 가변 도메인(V_L)을 포함하며, 그리고

a) 상기 V_L은 3개의 상보성 결정 영역(CDR)인 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3을 포함하며,

- CDRL1은 서열 식별 번호 35를 포함하거나 이로써 구성되며, 1의 아미노산 서열 'RASQDIRNYLN'을 포함하거나 이로써 구성되며,

- CDRL2는 서열 식별 번호 2의 아미노산 서열 'YTSRLHS'를 포함하거나 이로써 구성되며, 그리고

- CDRL3은 서열 식별 번호 3의 아미노산 서열 'QQGQTLPWT'를 포함하거나 이로써 구성되며, 그리고

b) 상기 V_H는 3개의 상보성 결정 영역(CDR)인 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3을 포함하며,

- CDRH1은 서열 식별 번호 4의 아미노산 서열 'X_1YTMN'을 포함하거나 이로써 구성되며, X_1이 G 또는 E, 바람직하게는 G이며,

- CDRH2는 서열 식별 번호 5의 아미노산 서열 LINPX$_2$X$_3$GVX$_4$TYAQKX$_5$QX$_6$을 포함하거나 이로써 구성되며, X_2 가 Q, Y 또는 E, X_3이 R, K 또는 E, X_4 가 S 또는 T, X_5가 F 또는 V 그리고 X_6이 G 또는 D이며,

- CDRH3은 서열 식별 번호 6의 아미노산 서열 'SGYYGX$_7$SWYFDV'를 포함하거나 이로써 구성되며, X_7이 E 또는 D인, 이중특이성 항원 결합 단백질.

청구항 2

제1항에 따른 이중특이성 항원 결합 단백질에 있어서, 항원 결합 부위 A가 K_D(A)로 CD3에 결합하고 항원 결합 부위 B는 K_D(C)로 표적 항원성 펩티드 C (TA-C)/MHC 복합체에 결합하며, K_D(A)/K_D(C)의 비율은 1과 150 사이, 4와 140사이, 6과 100 사이, 8과 100 사이, 10과 100 사이, 바람직하게는 10과 100 사이와 같이, 1을 초과, 4를 초과, 6을 초과, 8을 초과, 10을 초과, 15를 초과, 20을 초과, 25를 초과, 30을 초과, 40을 초과, 50을 초과하는, 이중특이성 항원 결합 단백질.

청구항 3

제1항이나 제2항에 따른 이중특이성 항원 결합 단백질에 있어서, 표면 플라스몬 공명(SPR) 또는 생체층 간섭측정법(BLI), 바람직하게는 생체층 간섭측정법(BLI)을 사용하여 측정되는, 3 nM ~ 1000 nM, 3 nM ~ 600 nM, 5 nM ~ 600 nM, 10 nM ~ 600 nM, 12 nM ~ 600 nM, 14 nM ~ 600 nM, 16 nM ~ 600 nM, 18 nM ~ 600 nM, 20 nM ~ 600 nM와 같은 ≥ 3 nM, ≥ 5 nM, ≥8 nM, ≥10 nM, ≥12 nM, ≥14 nM, ≥16 nM, ≥18 nM, ≥20 nM, ≥25 nM, ≥30 nM, ≥35 nM, ≥40 nM, ≥45 nM 및 ≤1000 nM, ≤800 nM, ≤600 nM, ≤500 nM, ≤400 nM, 바람직하게는 5 nM 및 100 nM의 K_D(A)로 항원 결합 부위 A가 CD3에 결합하는, 이중특이성 항원 결합 단백질.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 이중특이성 항원 결합 단백질에 있어서, 표면 플라스몬 공명(SPR) 또는 생체층 간섭측정법(BLI), 바람직하게는 생체층 간섭측정법(BLI)을 사용하여 측정되는, ≤ 100 μM, ≤ 1 μM ≤ 100 nM, ≤ 50 nM, ≤ 10 nM, 예를 들어, 0.01 nM ~ 150 nM, 0.05 nM ~ 150 nM, 0.1 nM ~ 150 nM, 0.1 nM ~ 100 nM, 0.1 nM ~ 50 nM, 0.1 nM ~ 10 nM, 0.5 nM ~ 10 nM, 0.5 nM ~ 5 nM, 바람직하게는 0.5 nM ~ 5 nM인 K_D(C)로 항원 결합 부위 B가 표적 항원성 펩티드 C (TA-C)/MHC 복합체에 결합하는, 이중특이성 항원 결합 단백

질.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 이중특이성 항원 결합 단백질에 있어서, 상기 항원 결합 단백질의 EC_{50}이 정상 조직 세포에 대한 EC_{50}보다 ≥100, ≥ 500, ≥ 1000 더 낮은 TA-C/MHC 제시 세포에 대한 EC_{50}을 가지는 이중특이성 항원 결합 단백질.

청구항 6

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 이중특이성 항원 결합 단백질에 있어서, TA 항원성 펩티드 C가 바이러스성 펩티드, 세균성 펩티드 또는 종양 연관 항원(TAA) 펩티드, 바람직하게는 항원(TAA) 펩티드인, 이중특이성 항원 결합 단백질.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 이중특이성 항원 결합 단백질에 있어서, 상기 항원 결합 단백질의 TA-C/MHC 복합체 제시 세포에 대한 EC_{50}이 정상 조직 세포에 대한 EC_{50} 값보다 ≥5배, ≥10배, ≥20배, ≥50배, ≥ 100배, ≥ 500배, ≥ 1000배 더 낮은, 이중특이성 항원 결합 단백질.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 항에 따른 이중특이성 항원 결합 단백질에 있어서, TA 항원성 펩티드 C가 종양 연관 항원(TAA) 펩티드 C이며, 상기 TAA-C가 서열 식별 번호 9의 아미노산 서열 'SLLQHLIGL'을 포함하거나 이로써 구성되는 PRAME 항원성 펩티드 또는 서열 식별 번호 10의 아미노산 서열 'KVLEHVVRV'를 포함하거나 이로써 구성되는 MAGE-A 항원성 펩티드와 같은, 서열 식별 번호 52 ~ 65, 67 ~ 96, 98, 서열 식별 번호 172 ~ 182, 184 ~ 268, 서열 식별 번호 9 및 10을 포함하거나 이로써 구성되는 TAA 항원성 펩티드의 군으로부터 선택되며, MHC가 바람직하게는 HLA-A*02인, 이중특이성 항원 결합 단백질.

청구항 9

제8항에 따른 이중특이성 항원 결합 단백질에 있어서, TA 항원성 펩티드 C가 서열 식별 번호 10의 아미노산 서열 'KVLEHVVRV'를 포함하거나 이로써 구성되는 MAGE-A 항원성 펩티드이며, 유사한 펩티드가 RABGAP1L-001, AXIN1-001, ANO5-001, TPX2-001, SYNE3-001, MIA3-001, HERC4-001, PSME2-001, HEATR5A-001, CNOT1-003, TEP1-003, PITPNM3-001, ZFC-001 바람직하게는 HEATR5A-001, HERC4-001 및 CNOT1-003으로 구성되는 목록으로부터 선택되는, 이중특이성 항원 결합 단백질.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 이중특이성 항원 결합 단백질에 있어서, 이중특이성 항원 결합 단백질이 이중특이성 항체나 그 단편, 이중특이성 T세포 수용체(TCR)나 그 단편 또는 이중특이성 단일 사슬 TCR(scTCR) 또는 이중특이성 단일 사슬 항체인, 이중특이성 항원 결합 단백질.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 이중특이성 항원 결합 단백질에 있어서, 상기 VL 가변 도메인이 FR1-L, FR2-L, FR3-L 및 FR4-L로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 구조틀 영역을 포함하며,

- FR1-L 서열 식별 번호 11의 아미노산 서열 'DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC' 또는 서열 식별 번호 11에 대해 적어도 85%, 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며,

- FR2-L은 서열 식별 번호 12의 아미노산 서열 'WYQQKPGKAPKLLIY' 또는 서열 식별 번호 13의 'WYQQKPGKAVKLLIY', 바람직하게는 서열 식별 번호 12 또는 서열 식별 번호 12나 13에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며,

- FR3-L은 서열 식별 번호 14의 아미노산 서열 'GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYFC' 또는 서열 식별 번호 14에 대해 적어도 85%, 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며,

- FR4-L은 서열 식별 번호 15의 아미노산 서열인 'FGQGTKVEIKR' 또는 서열 식별 번호 15에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 그리고

VH는 FR1-H, FR2-H, FR3-H 및 FR4-H로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 구조틀 영역을 추가로 포함하며,

- FR1-H는 서열 식별 번호 16의 아미노산 서열 'EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT' 또는 서열 식별 번호 16에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며,

- FR2-H는 서열 식별 번호 17의 아미노산 서열인 'WVRQAPGQGLEWMG' 또는 서열 식별 번호 17에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며,

- FR3-H는 서열 식별 번호 18의 아미노산 서열 'RVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR' 또는 서열 식별 번호 18에 대해 적어도 85%, 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 또는

- FR4-H는 서열 식별 번호 19의 아미노산 서열인 'WGQGTLVTVSS' 또는 서열 식별 번호 19에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되는, 이중특이성 항원 결합 단백질.

청구항 12

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 이중특이성 항원 결합 단백질에 있어서, 항원 결합 부위 B가 항체나 그 단편 또는 알파 사슬 가변 도메인(V_α) 및 베타 사슬 가변 도메인(V_β) 또는 감마 사슬 가변 도메인(V_γ) 또는 델타 사슬 가변 도메인(V_δ), 바람직하게는 알파 사슬 가변 도메인(V_α) 및 베타 사슬 가변 도메인(V_β) 또는 감마 사슬 가변 도메인(V_γ) 및 델타 사슬 가변 도메인(V_δ), 바람직하게는 V_α 및 V_β를 포함하는, 이중특이성 항원 결합 단백질.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 이중특이성 항원 결합 단백질에 있어서,

i) V_α가

'EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGKGLQLLTYIYSSQDSKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP' 서열 식별 번호 20,
'EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGKGLQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP' 서열 식별 번호 21,
'EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTESSSTYLYWYKQEPGKGLQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP' 서열 식별 번호 22로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 20, 21 및 22로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 그리고 바람직하게는 서열 식별 번호 23의 CDRa1, 서열 식별 번호 24의 CDRa2 및 서열 식별 번호 25의 CDRa3을 포함하며, 그리고 바람직하게는 서열 식별 번호 21의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 서열 식별 번호 23의CDRa1, 서열 식별 번호 26의 CDRa2 및 서열 식별 번호 25의 CDRa3을 포함하며, 그리고 바람직하게는 서열 식별 번호 22의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 서열 식별 번호 27의 CDRa1, 서열 식별 번호 26의 CDRa2 및 서열 식별 번호 25의 CDRa3을 포함하며, 그리고 상기 제1 가변 도메인 사슬의 아미노산이 바람직하게는 아미노산 19V 및/또는 48K를 포함하며, 그리고

V_β가

'DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLELLFYFCYGTPCDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRADTGELFFGEGSRLTVL' 서열 식별 번호 30의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 30으로 구성되는 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 바람직하게는 서열 식별 번호 30의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 서열 식별 번호 31의 CDRb1, 서열 식별 번호 34의 CDRb2 및 서열 식별 번호 35의 CDRb3의 아미노산 서열을 각각 포함하며, 선택적으로 아미노산 54F 및/또는 66C를 포함하며, 또는

(ii) V_α 또는 V_γ는 서열 식별 번호 48의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 48에 대해 적어도 85% 동일한 아

미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 48의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 서열 식별 번호 49의 CDRa1, 서열 식별 번호 50의 CDRa2 및 서열 식별 번호 51의 CDRa3의 아미노산 서열을 포함하며, 그리고

v_{β}또는 v_{δ}는 서열 식별 번호 44의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 44에 대해 적어도85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 44의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열은 서열 식별 번호 45의 CDRb1, 서열 식별 번호 46의 CDRb2 및 서열 식별 번호 47의 CDRb3의 아미노산 서열을 포함하는, 이중특이성 항원 결합 단백질.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 항에 따른 이중특이성 항원 결합 단백질에 있어서, 다음에서 하나 이상을 추가로 포함하는 항원 결합 단백질:

(i) 진단 제제;

(ii) 치료 제제; 또는

(iii) 약동학(PK) 변형 모이어티.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 이중특이성 항원 결합 단백질을 인코딩하는 서열을 포함하는 분리된 핵산 또는 상기 핵산을 포함하는 핵산 벡터.

청구항 16

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 이중특이성 항원 결합 단백질을 포함하는 재조합 숙주 세포 또는 제15항에 따른 핵산이나 벡터에 있어서, 상기 숙주 세포가 바람직하게는 a) 줄기 세포, 바람직하게는 중간엽 줄기 세포 또는 b) 중국 햄스터 난소(CHO) 세포와 같은 재조합 발현을 위한 세포인, 재조합 숙주 세포 또는 핵산이나 벡터.

청구항 17

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 이중특이성 항원 결합 단백질, 제15항에 따른 핵산이나 벡터, 제16항에 따른 숙주 세포, 그리고 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제, 안정화제 및/또는 부형제를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에서 정의되는 이중특이성 항원 결합 단백질의 생산 방법에 있어서,

a) 적절한 숙주 세포의 제공,

b) 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 이중특이성 항원 결합 단백질을 인코딩하는 코딩 서열을 포함하는 유전자 구조체의 제공,

c) 상기 적절한 숙주 세포 안으로 상기 유전자 구조체의 도입 및

d) 상기 적절한 숙주 세포에 의한 상기 유전자 구조체의 발현을 포함하는 방법.

청구항 19

제18항에 따른 방법에 있어서, 적절한 숙주 세포로부터 이중특이성 항원 결합 단백질의 분리 및 정제를 추가로 포함하는 방법.

청구항 20

의학에서의 사용을 위한, 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 이중특이성 항원 결합 단백질, 제15항에 따른 핵산이나 벡터, 제16항에 따른 숙주 세포, 또는 제17항에 따른 약학적 조성물.

청구항 21

바이러스성이나 세균성 감염 또는 증식성 질병, 바람직하게는 암, 보다 바람직하게는 TAA/MHC 양성 암과 같은 질병의 진단, 예방 및/또는 치료에서의 사용을 위한 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 이중특이성 항원 결합 단백질, 제15항에 따른 핵산이나 벡터, 제16항에 따른 숙주 세포, 또는 제17항에 따른 약학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 주 조직적합 복합체(MHC)가 제시된 표적 항원(TA)에 대한 이중특이성 항원 결합 단백질에 관한 것이다. 본 발명은 특히 적어도 2개의 항원 결합 부위(A 및 B)를 포함하는 이중특이성 항원 결합 단백질을 제공하며, 항원 결합 부위 A는 CD3에 결합하고 항원 결합 부위 B는 표적 항원성(TA) 펩티드/MHC 복합체에 결합한다. 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질은, 특히 감소된 친화도를 갖는 조작된 신규 항-CD3 항체의 VL 및 VH 도메인의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 본 발명의 이중 특이성 항원 결합 단백질은 암성 질병을 발현하는 종양 관련 항원(TAA)과 같은 TA 관련 질병의 진단, 치료 및 예방을 위한 사용에 관한 것이다. 본 발명의 항원 결합 단백질을 인코딩하는 핵산, 이 핵산을 포함하는 벡터, 항원 결합 단백질을 발현하는 재조합 세포 및 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질을 포함하는 약학적 조성물이 추가로 제공된다.

배 경 기 술

[0002] T세포는 세포 표면에 제시된 질병 특이적 펩티드의 존재를 자체의 클론 특이적 T세포 수용체(TCR)와의 주 조직적합 복합체(MHC)에 의해 검출함으로써 (바이러스) 감염된 세포와 종양 세포를 인식한다. 그러므로 TCR 기반의 분자는질병이나 종양 특이적 면역 치료의 개발에서 높은 관심의 대상이다. 암 요법을 위한 분자 표적화 약물의 개발에서 진전이 있었지만, 정상 세포는 표적으로 하지 않고 암 세포에 대해 고도로 특이적인 분자를 특이적으로 표적화하는 새로운 항암 제제의 개발 요구가 여전히 업계에 존재한다. 비유하면, 정상 세포에는 아니지만 병변 세포에 대해 고도로 특이적인 표적 분자 또한 HIV와 같은 감염성 질병을 표적으로 하는 약물의 개발에 매우 중요하다.

[0003] 본 발명의 맥락에서, 표적 항원성(TA) 펩티드가 유래하는 단백질은 프로테아솜에 의해 짧은 펩티드로 분해되고, 세포질 그물 안으로 운반되어, 새로 합성된 MHC 분자의 홈에 포장된 다음 펩티드-MHC(pMHC) 복합체로서 세포막(TA 펩티드/MHC)으로 전달된다. TA에 의해 유도되는 인식 패턴은 면역계가 TAA 항원성 펩티드의 경우 형질전환된 신생물 세포와 같은 병변 세포를 주기의 정상 조직 세포로부터 구별할 수 있게 함으로써 그에 대한 면역 캐스케이드를 유발한다.

[0004] 그러한 TA 표적화 약물의 개발을 위해, TA를 특이적으로 표적화하는 TCR이 삭별되었으며, 새로운 TA 표적화 분자, 특히 TAA 표적화 분자의 조작에 V_α 및 v_β 도메인을 사용했다.

[0005] TAA 표적화 분자에 대하여, MHC 제시된 암 항원에 특이적으로 결합하는 자연 T세포 수용체(TCR)는 MHC 제시된 바이러스성 항원에 특이적으로 결합하는 TCR과 비교 시 흔히 친화도가 더 낮음(K_D = 1-300 μM)을 주목해야 한다. 이 현상에 대한 설명의 일부는 흉선에서 발달되는 T세포가 자가펩티드-MHC 리간드 상에서 부정적으로 선택되어(내성 유도) 그러한 자가펩티드-MHC에 대해 친화도가 너무 높은 그러한 T세포가 삭제되는 것으로 보인다. 이러한 낮은 친화도가 종양 면역 탈출에 대한 하나의 가능한 설명일 수 있다(Alek sic et al. 2012, Eur J Immunol. 2012 Dec;42(12):3174-9). 그러므로, 입양 세포 요법(ACT)에서 항원 인식 구조체로서 또는 용해성 접근 방식의 인식 모듈로서의 사용을 위해, 즉 이중특이성 분자의 사용을 위해 암 항원에 더 높은 친화도로 결합하는 TCR 변이체의 설계가 바람직하게 보인다(Hickman et al. 2016, J Biomol Screen. 2016 Sep;21(8):769-85).

[0006] 하지만 TCR의 단순한 친화도 증가는 부작용의 위험을 증가시킬 수도 있다. 위에 언급된 바와 같이, 자체 단백질인 종양 연관 항원에 대한 자연적 고친화도 TCR은 교차 반응성을 통해 정상 조직 상에 존재하는 자가 펩티드의 인식을 회피하기 위해 흉선 선택에 의해 차단된다. 따라서 그 표적 서열에 대한 TCR 친화도의 단순한 증가는 유사한 비(非)암 특이적 펩티드에 대한 친화도 또한 증가시킬 것이므로 정상 조직에 대한 교차 반응성의 위험과 원치않는 세포독성 영향을 증가시킬 것이다. 이것이 단순히 이론적 위험이 아님은 흑색종 연관 항원 A3(MAGE-A3)을 표적으로 하는 조작된 TCR에 대해 고통스럽게 밝혀졌다. 특히 이전에 발표된 결과에 의하면, 근육 단백질 티틴의 펩티드와 상호작용하는 MAGE-A3를 표적으로 하는 TCR을 발현하도록 조작된 T세포가 전임상 시험에서 어

떠한 상호반응성도 예측되지 않았지만 두 명의 환자에 주입했을 때 치사 독성을 나타냈다(Linette GP et al. Blood 2013;122:863-71, Cameron BJ, et al. Sci. Transl. Med. 2013; 5: 197-103). 이 환자들은 TCR 조작된 T세포가 중대하고 예측할 수 없는 표적 외 및 기관 특이적 독성을 가질 수 있음을 잘 보여주었다.

[0007] 그러므로, TCR 기술의 진전에도 불구하고, 추가의 요법, 특히 암 요법, 특히 병변 세포, 특히 암 세포를 효율적으로 사멸하면서 높은 안전성 프로파일을 유지하는 요법을 위한 필요가 여전히 있다.

[0008] 본 문서의 위에 명시한 바와 같이, 자연 TCR은 흔히 표적 TAA/MHC 복합체에 대해 낮은 친화도를 가지며, 이 낮은 친화도는 교차 반응성을 통해 정상 조직 상에 존재하는 자가 펩티드의 인식을 피한다. 하지만, 표적 TAA/MHC 복합체에 대한 친화도의 증가가 효율적인 항암 약물의 생성에 바람직하다.

발명의 내용

[0009] 이 문제의 해결을 위해, 본 발명의 발명자들은 한 분자에서, 관심 대상의 TA/MHC를 결합하는 친화도 성숙화된 TCR 가변 도메인과 CD3을 표적화하는 가변 경쇄 및 중쇄 도메인을 이전의 항-CD3 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 친화도보다 낮은 친화도로 조합했다. 이로써 초래되는 분자는, TAA와 같은 TA가 높은 안전성 프로파일이 유지되는 반면 소량으로만 세포 표면에 제시되는 경우에도 암 세포와 같은 병변 세포를 인식한다는 이점을 가진다. 특히, CD3 결합 도메인의 상당히 낮은 친화도 덕분에, 초래되는 분자가 자연 T세포/분자 (TCR)/TA 관계를 모방하며, 이는 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질의 경우, 낮은 친화도 결합이 TCR과 TA/MHC 복합체의 계면 대신에 T세포와 이중특이성 항원 결합 단백질의 CD3 결합 도메인의 계면에서 발생하며, 이는 TA/MHC에 결합하는 T세포를 발현하는 자연 TCR의 경우와 같다.

[0010] 그러므로 낮은 친화도의 CD3 결합 도메인의 사용에 따른 기술적으로 유리한 효과 가운데 하나는, 높은 친화도의 TCR 가변 도메인의 사용으로 인해 이중특이성 항원 결합 단백질이 관심 대상의 TA에 대해 특이적인 반면, 높은 안전성 프로파일, 즉 표적 외 펩티드를 발현하는 정상 조직의 세포와 같은 정상이나 건강한 조직의 세포를 사멸하기 위해서는 암 세포와 같은 TA 제시 세포의 치료에 사용하는 투여량의 1000배 이상이 필요할 것이라는 내용에 따르는 안전성 범위를 가진다는 것이다. 그러므로, 높은 친화도의 항원 결합 단백질과 낮은 친화도의 CD3 결합 도메인의 조합은 건강한 조직상의 표적 외 펩티드, 예를 들어 표적 외 펩티드에 대한 감소되거나 없는 교차 인식으로 표적 펩티드에 의한 특이적 결합을 유도함으로써 놀랍게 큰 안전성 범위를 제공한다.

[0011] 따라서, 낮은 친화도의 CD3 결합 도메인과 친화도 성숙화된 TA/MHC 결합 도메인을 조합시키는 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질은 건강한 세포가 아니라 병변 세포를 효율적으로 표적화하고 또한 유익한 안전성 프로파일이나 심지어 안전성 프로파일이 향상되는 이점을 가진다. 유리하게, 초래되는 이중특이성 항원 분자는 당업계에 이미 알려진 항-CD3 도메인을 사용하는 이중특이성 분자에 비해 증가된 안정성 및/또는 증가된 용해도를 가지므로 의학적 용도에 적합한 유망한 이중특이성 분자를 추가로 제공한다.

[0012] 요약하면, 본 발명의 CD3 결합 도메인을, 예를 들어 이중특이성 형식으로 TCR이나 그 MHC-펩티드 복합체 결합 단편이나 항원 결합 단백질과 함께 사용하면 당업계에 비해 *그 중에서도* 다음의 이점을 제공한다: (i) 주어진 TCR이나 항원 결합 단백질과 건강한 세포상의 유사한 펩티드와의 교차반응성의 감소 및 높은 종양 선택성 및/또는 특이성의 유지; (ii) TCR이나 그 MHC-펩티드 복합체 결합 단편 또는 항원 결합 단백질의 증가된 안전성 프로파일; (iii) TCR이나 그 MHC-펩티드 복합체 결합 단편 또는 항원 결합 단백질의 표적 외 및 종양 외 세포독성의 감소; 그리고 (iv) 향상된 특이적이고 선택적이며 안전한 TCR이나 그 MHC-펩티드 복합체 결합 단편 또는 항원 결합 단백질의 제공.

[0013] **정의**

[0014] 본 문서에서 "항원 결합 단백질"이란 용어는 적어도 하나의 항원에 결합할 수 있는 폴리펩티드나 결합 단백질을 지칭한다.

[0015] 본 문서에서 사용된 "항원"이란 용어는 적어도 하나의 항원 결합 부위에 의해 결합될 수 있는 한 분자나 분자의 부분 또는 복합체를 지칭하며, 상기 하나의 항원 결합 부위는, 예를 들어 기존의 항체, 기존의 TCR 및/또는 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질에 존재한다.

[0016] 본 발명의 "이중특이성 항원 결합 단백질"은 적어도 2개의 원자가 그리고 적어도 2개의 다른 항원에 대한 결합 특이성을 가지며, 항원 결합 부위 A는 CD3에 결합하고 항원 결합 부위 B는 표적 항원(TA) 펩티드/MHC 복합체에 결합한다.

[0017] 본 발명의 맥락에서, CD3에 대한 특이적인 항원 결합 부위 A는 마우스 단클론성 항체 UCHT1로부터, 보다 특히, 마우스 단클론성 항체 UCHT1의 향상된 인간화 버전으로부터 유래하며, 항원 결합 부위 B가 TCR로부터 유래하는 것이 바람직하다.

[0018] 이 문서에서 본 발명의 "이중 특이성 항원 결합 단백질"은 또한 "본 발병의 항원 결합 단백질"을 지칭하며, 본 발명의 맥락에서 정의된 대로 적어도 6개 CDR을 포함하며, 보다 바람직하게는 항원 결합 단백질은 V_L 및 V_H 도메인, 특히 향상된 인간화 UCHT1 항체로부터 유래하는 V_L 및 V_H 도메인을 포함한다. 본 발명의 맥락에서 항원 결합 부위 B는 표적 항원성(TA) 펩티드/MHC 복합체에, 특히 종양 연관 항원(TAA) 펩티드/MHC 복합체에 결합하며, 항체나 TCR로부터, 바람직하게는 TCR로부터 유래할 수 있다. 따라서, 바람직한 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 단백질은 표적 항원(TA) 펩티드/MHC 복합체에 결합하는 이중특이성 항원 결합 부위 B를 포함하며, 상기 항원 결합 부위 B는 바람직하게는 TCR로부터 유래하는 적어도 1개의 가변 알파 도메인(v_α) 및 적어도 1개의 가변 베타 도메인(v_β)을 포함한다.

[0019] 이중특이성 항원 결합 단백질은 본 문서에서 "이중특이성 분자"로도 지칭할 수 있다.

[0020] 본 발명의 맥락에서 사용되는 "표적 항원성(TA) 펩티드"는 폐결핵을 또는 엡스타인바 바이러스 감염이나 암을 앓는 개인으로부터 분리된 물질과 같은 감염된 또는 종양성 물질로부터 분리되고 확인된 펩티드를 지칭한다. TA 펩티드가 유래하는 단백질에는 MHC 세포에 의해 세포 표면에서 제시되는 감염된 세포나 종양 세포에서의 항원 처리를 하며, 따라서 그 세포, 특히 TA 펩티드/MHC 복합체가 T세포나 NKT 세포와 같은 숙주의 면역 작용기 세포에 의해 인식될 수 있다. 본 발명의 맥락에서 TA 펩티드는, 예를 들어 9 ~ 11개의 아미노산, 8 ~ 14개, 8 ~ 12개와 같은 10개, 12개 또는 14개를 포함하거나 이로써 구성된다. 본 발명의 맥락에서, 특이적 TA 펩티드를 지칭할 때, 이는 TA-C를 지칭하는 것이다. TA-C 펩티드와 같은 TA 항원성 펩티드의 예로는 바이러스성 항원 펩티드, 세균성 항원 펩티드나 종양 연관 항원(TAA) 항원성 펩티드, 바람직하게는 TAA 항원성 펩티드가 있다. 따라서, 한 구현예에서, TA 항원성 펩티드, 특히 TA-C는 바이러스성 항원 펩티드, 세균성 항원 펩티드나 종양 연관 항원(TAA) 항원성 펩티드, 바람직하게는 TAA 항원성 펩티드이다.

[0021] 본 발명의 맥락에서 "바이러스성 항원 펩티드"는 병변 세포의 표면에서 MHC 분자에 의해 제시되는 항원성 펩티드이며, 즉 전형적으로 상기 바이러스에 의해 감염되는 세포인 바이러스 기원이다. 그러한 바이러스 항원 펩티드가, 예를 들어 인간 면역 결핍 바이러스(HIV), 인간 거대세포바이러스(HCMV), 거대세포바이러스(CMV), 인간 유두종바이러스(HPV), B형 간염 바이러스(HBV), C형 간염 바이러스(HCV), 엡스타인바 바이러스(EBV), 인플루엔자 바이러스에서 발견되었다. 따라서, 본 발명의 맥락에서 바이러스 항원 펩티드는 HIV 항원 펩티드, HCMV 항원 펩티드, CMV 항원 펩티드, HPV 항원 펩티드, HBV 항원 펩티드; HCV 항원 펩티드; EBV 항원 펩티드, 인플루엔자 항원 펩티드, 바람직하게는 HIV, HBV, 인플루엔자 및 HCMV 항원 펩티드로 구성된 군으로부터 선택되는 항원성 펩티드일 수 있다.

[0022] 바이러스 항원 펩티드는 여기서 기술되는 방법과 구현예에서 사용될 수 있으며, 예를 들어 다음 표에 기술된 바이러스 항원성 펩티드를 포함한다. 한 양태에서, 여기에 기술되는 방법과 구현예에서 사용되는 바이러스 항원 펩티드는 여기서 다음 표 1에 묘사된 서열 식별 번호 146 ~ 서열 식별 번호 148의 아미노산 서열로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되는 적어도 하나의 바이러스 항원 펩티드를 포함한다.

[0023] **표 1:** 바이러스 항원 펩티드의 목록

서열 식별 번호	펩티드	바이러스	MHC
146	SLYNTVATL	HIV	HLA-A*02:01
147	GILGFVFTL	인플루엔자 A	HLA-A*02:01
148	NLVPMVATV	HCMV	HLA-A*02:01

[0024]

[0025] 본 발명의 맥락에서 "세균 항원성 펩티드"란 병변 세포의 표면에서 MHC 분자에 의해 제시되며 그 기원이 세균인, 즉 그 세포가 전형적으로 상기 세균에 의해 감염되는 항원성 펩티드이다. 이러한 세균 항원 펩티드는 감염의 맥락에서, 예를 들어 *결핵균*으로부터 발견되었다. 따라서, 본 발명의 맥락에서 세균 항원 펩티드는 *결핵균* 항원 펩티드일 수 있다.

[0026] 이 문서에서 "TAA 펩티드"로도 지칭되는 "종양 연관 항원(TAA) 펩티드"는 종양성 물질로부터 분리되고 식별되었

으며 또한 종양 세포에서 항원 처리가 이루어진 펩티드를 나타내므로 숙주의 면역 작용기 세포에 의해 인식될 수 있다. TAA 펩티드는, 예를 들어 9 ~ 11개의 아미노산 등 8 ~ 14개, 8 ~ 12개와 같은 10개, 12개 또는 14개를 포함하거나 이로써 구성된다. 본 발명의 맥락에서 TAA 펩티드는 예를 들어 암/고환(CT) 항원성 펩티드일 수 있다. 암/고환(CT) 항원성 펩티드의 예는 서열 식별 번호 10의 아미노산 서열의 MAGE-A 항원성 펩티드 그리고 서열 식별 번호 9의 아미노산 서열의 PRAME 항원성 펩티드이다. 본 발명의 맥락에서 TAA 펩티드는 T세포 에피톱을 포함하며, 일반적 맥락에서 TAA 펩티드로도 칭할 수 있고, 하나의 특이적 TAA 펩티드를 칭한 경우 본 발며의 맥락에서 TAA 펩티드 C로 칭할 수 있다.

[0027] 한 양태에서, 여기서 기술된 방법 및 구현예와 함께 사용할 수 있는 종양 연관 항원(TAA) 펩티드는 예를 들어, 미국 특허 공보 20160187351, 미국 특허 공보 20170165335, 미국 특허 공보 20170035807, 미국 특허 공보 20160280759, 미국 특허 공보 20160287687, 미국 특허 공보 20160346371, 미국 특허 공보 20160368965, 미국 특허 공보 20170022251, 미국 특허 공보 20170002055, 미국 특허 공보 20170029486, 미국 특허 공보 20170037089, 미국 특허 공보 20170136108, 미국 특허 공보 20170101473, 미국 특허 공보 20170096461, 미국 특허 공보 20170165337, 미국 특허 공보 20170189505, 미국 특허 공보 20170173132, 미국 특허 공보 20170296640, 미국 특허 공보 20170253633, 미국 특허 공보 20170260249, 미국 특허 공보 20180051080 및 미국 특허 공보 20180164315에 기술된 TAA 펩티드를 포함하며, 이러한 공보에 기술된 내용과 거기에 기술된 서열 목록의 전문이 참조문헌으로 여기에 포함된다.

[0028] 한 양태에서, 이 문서에서 기술된 이중 특이성 항원 결합 단백질, 특히 본 발명의 맥락에서 항원 결합 부위 B는 위에 기술된 특허와 특허 공보의 하나 이상의 TAA 펩티드를 제시하는 세포를 선택적으로 인식한다. 다른 양태에서, 여기에 기술되는 방법과 구현예에서 사용될 수 있는 TAA는 서열 식별 번호 52 ~ 65, 67 ~ 96, 98 ~ 110, 서열 식별 번호 172 ~ 182, 184 ~ 268, 서열 식별 번호 9 및 10, 바람직하게는 서열 식별 번호 9 및 10의 아미노산 서열로부터 선택되는 아미노산 서열로 구성되는 적어도 하나의 TAA를 포함한다. 한 양태에서, 이중 특이성 항원 결합 단백질, 특히 이중특이성 항원 결합 단백질의 항원 결합 부위 B는 TAA 펩티드/MHC 복합체를 제시하는 세포를 선택적으로 인식하며, 해당 TAA 펩티드는 서열 식별 번호 52 ~ 65, 67 ~ 96, 98, 서열 식별 번호 172 ~ 182, 184 ~ 268, 서열 식별 번호 9 및 10의 아미노산 서열 또는 이 문서에서 기술된 특허나 출원서에 기술된 일체의 아미노산 서열, 바람직하게는 서열 식별 번호 9 및 10을 포함하거나 이로써 구성된다.

[0029] **표 2:** TAA의 목록

서열 식별 번호	아미노산 서열	서열 식별 번호	아미노산 서열	서열 식별 번호	아미노산 서열
52	YLYDSETKNA	105	VLDGKVAVV	219	KMSELQTYV
53	HLMDQPLSV	106	GLLGKVTSV	220	ALLEQTGDMSL
54	GLLKKINSV	107	KMISAIPTL	221	VIIKGLEEITV
55	FLVDGSSAL	108	GLLETTGLLAT	222	KQFEGTVEI
56	FLFDGSANLV	109	TLNTLDINL	223	KLQEEIPVL
57	FLYKIIDEL	110	VIIKGLEEI	224	GLAEFQENV
58	FILDSAETTTL	172	YLEDGFAYV	225	NVAEIVIHI
59	SVDVSPPKV	173	KIWEELSVLEV	226	ALAGIVTNV
60	VADKIHSV	174	LLIPFTIFM	227	NLLIDDKGTIKL
61	IVDDLTINL	175	ISLDEVAVSL	228	VLMQDSRLYL
62	GLLEELVTV	176	KISDFGLATV	10	KVLEHVVRV
63	TLDGAAVNQV	177	KLIGNIHGNEV	229	LLWGNLPEI
64	SVLEKEIYSI	178	ILLSVLHQL	230	SLMEKNQSL
65	LLDPKTIFL	179	LDSEALLTL	231	KLLAVIHEL
67	YLMDDFSSL	180	VLQENSSDYQSNL	232	ALGDKFLLRV
68	KVWSDVTPL	181	HLLGEGAFAQV	233	FLMKNSDLYGA
69	LLWGHPRVALA	182	SLVENIHVL	234	KLIDHQGLYL
70	KIWEELSVLEV	184	SLSEKSPEV	235	GPGIFPPPPPQP
71	LLIPFTIFM	185	AMFPDTIPRV	236	ALNESLVEC

[0030]

72	FLIENLLAA	186	FLIENLLAA	237	GLAALAVHL
73	LLWGHPRVALA	187	FTAEFLEKV	238	LLLEAVWHL
74	FLLEREQLL	188	ALYGNVQQV	239	SIIEYLPTL
75	SLAETIFIV	189	LFQSRIAGV	240	TLHDQVHLL
76	TLLEGISRA	190	ILAEEPIYIRV	241	SLLMWITQC
77	ILQDGQFLV	191	FLLEREQLL	242	FLLDKPQDLSI
78	VIFEGEPMYL	192	LLLPLELSLA	243	YLLDMPLWYL
79	SLFESLEYL	193	SLAETIFIV	244	GLLDCPIFL
80	SLLNQPKAV	194	AILNVDEKNQV	245	VLIEYNFSI
81	GLAEFQENV	195	RLFEEVLGV	246	TLYNPERTITV
82	KLLAVIHEL	196	YLDEVAFML	247	AVPPPPSSV
83	TLHDQVHLL	197	KLIDEDEPLFL	248	KLQEELNKV
84	TLYNPERTITV	198	KLFEKSTGL	249	KLMDPGSLPPL
85	KLQEKIQEL	199	SLLEVNEASSV	250	ALIVSLPYL
86	SVLEKEIYSI	200	GVYDGREHTV	251	FLLDGSANV
87	RVIDDSLVVGV	201	GLYPVTLVGV	252	ALDPSGNQLI
88	VLFGELPAL	202	ALLSSVAEA	253	ILIKHLVKV
89	GLVDIMVHL	203	TLLEGISRA	254	VLLDTILQL
90	FLNAIETAL	204	SLIEESEEL	255	HLIAEIHTA
91	ALLQALMEL	205	ALYVQAPTV	256	SMNGGVFAV
92	ALSSSQAEV	206	KLIYKDLVSV	257	MLAEKLLQA
93	SLITGQDLLSV	207	ILQDGQFLV	258	YMLDIFHEV
94	QLIEKNWLL	208	SLLDYEVSI	259	ALWLPTDSATV
95	LLDPKTIFL	209	LLGDSSFFL	260	GLASRILDA
96	RLHDENILL	210	VIFEGEPMYL	261	ALSVLRLAL

[0031]

98	GLPSATTTV	211	ALSYILPYL	262	SYVKVLHHL
99	GLLPSAESIKL	212	FLFVDPELV	263	VYLPKIPSW
100	KTASINQNV	213	SEWGSPHAAVP	264	NYEDHFPLL
9	SLLQHLIGL	214	ALSELERVL	265	VYIAELEKI
101	YLMDDFSSL	215	SLFESLEYL	266	VHFEDTGKTLLF
102	LMYPYIYHV	216	KVLEYVIKV	267	VLSPFILTL
103	KVWSDVTPL	217	VLLNEILEQV	268	HLLEGSVGV
104	LLWGHPRVALA	218	SLLNQPKAV		

[0032]

[0033] 또한 본 발명의 맥락에서 TA 항원 펩티드란 MHC 클래스 I 분자 또는 MHC 클래스 II 분자, 바람직하게는 MHC 클래스 I 분자의 특정 리간드이다.

[0034] 본 발명의 맥락에서, TAA 항원성 펩티드 C는 바람직하게는 서열 식별 번호 52 ~ 65, 67 ~ 96, 98 ~ 110, 서열 식별 번호 172 ~ 182, 184 ~ 268, 서열 식별 번호 9 및 서열 식별 번호 10의 아미노산 서열로 구성되는 TAA 항원성 펩티드의 군으로부터 선택되며, 바람직하게는 서열 식별 번호 9의 아미노산 서열 'SLLQHLIGL'을 포함하거나 이로써 구성되는 PRAME 항원성 펩티드이거나 서열 식별 번호 10의 아미노산 서열 'KVLEHVVRV', 보다 바람직하게는 서열 식별 번호 10을 포함하거나 이로써 구성되는 MAGE-A 항원성 펩티드이며, MHC는 바람직하게는 HLA-A*02이다.

[0035] "PRAME" 또는 "흑색종에서 우선적으로 발현되는 항원"은 흑색종에서 과다 발현되는 항원으로 처음 식별되었다(Ikeda et al Immunity. 1997 Feb;6(2): 199-208). 이것은 CT130, MAPE, OIP-4로도 알려져 있으며 Uniprot 등록 번호가 P78395이다(2019년 1월 11일자로 제공). 이 단백질은 레티노산 수용체 신호전달의 억압인자로 기능한다(Epping et al., Cell. 2005 Sep 23; 122(6):835-47). PRAME는 암 고환 항원으로 알려진 배자계열 인코딩된 항원의 계열에 속한다. 암 고환 항원은 전형적으로 정상의 성인 조직에서 발현이 제한되거나 없으므로 면역치료 중재에 대한 매력적인 표적이다. PRAME는 다수의 고형암 그리고 백혈병 및 림프종에서 발현된다(Doolan et al Breast Cancer Res Treat. 2008 May; 109(2):359-65; Epping et al Cancer Res. 2006 Nov 15;66(22): 10639-42; Ercolak et al Breast Cancer Res Treat. 2008 May; 109(2):359-65; Matsushita et al Leuk Lymphoma. 2003 Mar;44(3):439-44; Mitsuhashi et al Int. J Hematol. 2014; 100(1):88-95; Proto-Sequeire et al Leuk Res. 2006 Nov;30(11): 1333-9; Szczepanski et al Oral Oncol. 2013 Feb;49(2): 144-51; Van Baren et al Br J Haematol. 1998 Sep; 102(5): 1376-9). 본 발명의 PRAME 표적화 요법은 특히 비소세포 폐암과 소세포 폐암과 같은 폐암, 간암, 두경부암, 피부암, 신세포암, 뇌암, 위암, 결장직장암, 간세포암, 췌장암, 전립선암, 백혈병, 유방암, 메르켈 세포 암종, 흑색종, 난소암, 방광암, 자궁암, 담낭 및 단관암, 그리고 식도암을 포함하되 이로써 제한되지 않는 암 치료에 적합할 수 있다.

[0036] 본 발명의 맥락에서 "PRAME 유래 펩티드"는 Uniprot 등록 번호 P78395 하에서 열람 가능한 서열 식별 번호 7인 아미노산 서열의 전장 PRAME 단백질의 아미노산 425-433에 상응하는 아미노산 서열 SLLQHLIGL(서열 식별 번 9)을 포함하거나 이로써 구성된다(2019년 1월 11일자 제공). 아미노산 서열 SLLQHLIGL(서열 식별 번호 9)을 포함하거나 이로써 구성되는 PRAME 유래 펩티드는 이 문서에서 PRAME-004로도 지칭한다. PRAME-004 펩티드는 종양 연관 있는 종양 특이적 단백질에서 유래하는 펩티드 에피톱이며 주 조직적합 복합체(MHC)의 분자에 의해 세포 표면에서 제시된다. 보다 특히, PRAME-004 유래 펩티드는 HLA-A*02와의 복합체에서 세포 표면 상에 제시된다(Med. 2001 Jan 1;193(1):73-88). 본 발명의 맥락에서, "PRAME 유래 펩티드" 또는 "PRAME-004"는 교환 가능하게 사용되므로 아미노산 서열 SLLQHLIGL(서열 식별 번호 9)을 포함하거나 이로써 구성되는 PRAME 유래 펩티드를 지칭한다.

[0037] "MAGE-A" 또는 "흑색종 연관 항원 A" 하위계열 단백질이 분자 수준에서 최초로 확인된 종양 연관 항원이었다(van der Bruggen P, et al. Science. 1991; 254:1643-47). MAGE-A는 X 염색체의 q28 영역에 위치하는 12개 유전자(MAGE-A1 ~ -A12)의 하위계열이다. MAGE-A 하위계열 단백질의 구성원은 정상적으로 고환이나 태반에서만 발현되며 이의 제한된 발현은 구성원이 생식 세포 발육에서 기능할 수 있음을 시사한다. MAGE-A 단백질이 중추 신

경계와 척수와 뇌간의 조기 발육에서도 검출되었으며 MAGE-A 단백질이 융종 발육에도 관여할 수 있음을 드러낸다. 이 계열의 구성원은 서로 50 ~ 80%의 서열 동일성으로 단백질을 인코딩하며 모든 MAGE 단백질은 약 170개의 아미노산으로 구성된 고도로 보존된 도메인인 공통 MAGE 상동 도메인(MHD)을 공유한다. 암에서 MAGE-A 단백질 발현의 생물학적 기능과 기저 조절 기전은 아직 완전히 이해되고 있지 않다.

[0038] "MAGE-A4" 또는 "흑색종 연관 항원 4" 단백질은 MAGE-A 유전자 계열의 구성원이며 서열 식별 번호 111의 Uniprot 등록 번호 P43358을 갖는다(2019년 7월 8일자 제공). MAGEA4 국소화는 세포질성으로 기술되었다. 하지만 MAGE-A4 염색은 핵에서도 검출되었으며 덜 분화된 암 대비 잘 분화된 암에서 핵과 세포질 사이의 차등 분배가 있었다(Sarcevic B et. al., 2003, Oncology 64, 443-449). MAGE-A4는 남성 생식 세포 표지자로 사용된다. 이것은 성세포에서는 발현되지 않지만 전-정조세포 및 성숙한 생식 세포에서 발현된다(Mitchell et al., 2014, Mod. Pathol. 27, 1255-1266). MAGE-A4 단백질 및 mRNA의 발현은 다양한 암의 발생과 예후와 연관되어 왔다.

[0039] "MAGE-A8" 또는 "흑색종 연관 항원 8" 단백질은 MAGE-A 상위계열의 구성원이며 서열 식별 번호 112의 Uniprot 등록 번호 P43361을 갖는다(2019년 7월 8일자 제공).

[0040] "MAGE-A4" 및 "MAGE-A8" 단백질은 BLASTP 2.9.0 알고리즘을 사용하는 단백질 서열 정렬에 의한 결정 시 72%의 서열 동일성을 갖는다(Stephen F. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402). 더욱이, "MAGE-A4" 및 "MAGE-A8" 모두 MAG-003 펩티드, 즉, KVLEHVVRV(서열 식별 번호 10)를 포함한다.

[0041] 본 발명의 맥락에서 사용되는 용어"에피톱"은 "구조적 에피톱" 및 "기능성 에피톱"의 용어를 포함한다. "구조적 에피톱"은 항원에 결합 시 항원 결합 단백질에 의해 덮이는 항원, 예를 들어 펩티드-MHC 복합체의 아미노산이다. 전형적으로, 항원 결합 단백질의 일체의 아미노산 원자로부터 5 Å 이내에 있는 항원의 모든 아미노산은 덮여 있는 것으로 간주된다. 항원의 구조적 에피톱은 X선 결정학이나 NMR 분석 등 당업계의 알려진 방법에 의해 결정될 수 있다. 항체의 구조적 에피톱은 전형적으로 20 ~ 30개 아미노산을 포함한다. TCR의 구조적 에피톱은 전형적으로 20 ~ 30개 아미노산을 포함한다. "기능성 에피톱"은 구조적 에피톱을 형성하는 그러한 아미노산의 하위조합이며, H 결합, 염 가교, 방향족 스태킹 또는 소수성 상호작용과 같은 비공유 상호작용의 직접적 형성에 의하거나 또는 항원의 결합 입체형태를 간접적으로 안정화하여 본 발명의 항원 결합 단백질과의 계면 형성에 중요한 항원의 아미노산을 포함하고 또한 예를 들어 돌연변이 스캐닝에 의해 결정된다. 전형적으로, 항체로 결합된 항원의 기능성 에피톱은 4~6개의 아미노산을 포함한다. 전형적으로, 펩티드-MHC 복합체의 기능성 에피톱은 펩티드의 2 ~ 6개의 아미노산과 MHC 분자의 2 ~ 7개의 아미노산을 포함한다. MHC I 제시된 펩티드는 전형적으로 8 ~ 10개의 아미노산의 길이를 가지므로, 각각의 주어진 펩티드에서 아미노산의 하위조합만이 펩티드-MHC 복합체의 기능적 에피톱의 일부이다. 본 발명의 맥락에서, 에피톱, 특히 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질에 의해 결합된 기능성 에피톱은 결합 계면의 형성에 요구되는 항원의 아미노산을 포함하거나 이로써 구성되며, 따라서 기능성 에피톱은 서열 식별, 번호 10의 MAGE-A 항원성 펩티드에서 적어도 3개, 바람직하게는 적어도 4개의 아미노산을 포함한다.

[0042] 본 발명의 맥락에서 "CD3"은 다분자 T세포 수용체 복합체의 부분으로 T세포에서 발현되며 적어도 3개의 다른 사슬인 CD3ε, CD3δ 및 CD3γ로 구성되는 항원을 나타낸다. CD3δ 및 CD3γ는 인간 CD3ε에 대해 낮은 서열 동일성 및/또는 유사성을 가진다(유사성과 동일성이 20% 미만). "CD3ε/δ-복합체"란 CD3ε 및 CDR3δ에 의해 형성되는 복합체를 지칭한다. CD3ε는 소위 "CD3ε/γ-복합체"라고 하는 CDR3γ와도 복합체를 형성한다. (예: 부동화 항-CD3-항체에 의한) T세포 상의 CD3 클러스터링은 T세포 활성화를 유도한다. "CD3ε"은 세포 내 도메인, 막통과 도메인 및 세포의 도메인의 3개의 도메인을 포함한다.

[0043] 본 발명의 맥락에서 "UCHT1" 단클론성 항체는, 여기서 CD3ε/δ-복합체로 칭하며 CD3/T세포 항원 수용체 복합체의 36 kDa 아단위인 인간 CD3δ 사슬과 CD3ε 사슬의 복합체에 특이적으로 결합한다. 마우스 단클론성 항체 UCHT-1은 서열 식별 번호 36의 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되는 VL 도메인 그리고 서열 식별 번호 37의 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되는 VH 도메인을 포함한다. UCHT1의 인간화는, 예를 들어 Shalaby 등(J. Exp. Med. (1992); 175(1): 217-225)이 기술하였으며, 이는 더욱 변환되어 UCHT1, hUCHT1(V9)으로 칭하는 UCHT1의 변이체 9를 초래하는 내용은 Zhu 등(J Immunol, 1995, 155, 1903-1910)이 기술하였다. hUCHT1(V9)은 서열 식별 번호 38의 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되는 VL 도메인 그리고 서열 식별 번호 39의 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되는 VH 도메인을 포함한다. 하지만, 인간화 UCHT의 선행 기술 변이체는 낮은 용해도의 문제가 있으며 용해성 분자의 분자 맥락에서 사용하기 어렵다. 더욱이, 그러한 선행 기술의 변이체는 CD3에 대한 높은 친화도를 가지며, 이는 본 발명의 맥락에서 발견된 대로 불리할 수 있다.

[0044] 본 발명의 맥락에서 "BMA031"은 인간 알파/베타 TCR에 대해 특이적인 단클론성 항체(mAb) WT31을 나타낸다. 다

른 인간화 변이체들이 당업계에서 공개되었으며, 예를 들어, Shearman 등(J Immunol, 1991, 147, 4366-73)이 기술한 알파/베타 TCR 특이적 인간화 항체 BMA031이 있다. Shearman 등(J Immunol, 1991, 147, 4366-73)이 기술된 인간화 항체는 서열 식별 번호 40의 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되는 V_L 도메인 그리고 서열 식별 번호 41의 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되는 V_H 도메인을 포함한다.

[0045] "주 조직적합 복합체"(MHC)란 본 발명의 맥락에서 척추동물에서 후천 면역계가 외부 분자를 인식하여 조직적합성을 결정하는 데 필수적인 세포 표면 단백질의 조합이다. MHC 분자의 주요 기능은 병원체로부터 유래된 항원에 결합하고 적절한 T세포가 인식할 수 있도록 세포 표면에 이를 표시하는 것이다. 인간 MHC는 HLA(human leukocyte antigen, 인간 백혈구 항원) 복합체(흔히 HLA)라고도 부른다. MHC 유전자 계열은 3개의 하위군으로 나뉜다: 클래스 I, 클래스 II 및 클래스 III. 펩티드와 MHC 클래스 I 분자의 복합체는 적절한 T세포 수용체(TCR)를 갖는 CD8 양성 T세포에 의해 인식되는 반면, 펩티드와 MHC 클래스 II 분자의 복합체는 적절한 TCR을 갖는 CD4 양성 조력 T세포에 의해 인식된다. CD8 및 CD4에 의존하는 두 유형의 반응이 협동 및 상승 작용을 통해 항종양 효과에 기여하므로, 종양 연관 항원 및 상응하는 T세포 수용체의 식별 및 특성화는 종양 백신 및 세포 용법 등 암 면역 요법의 개발에 중요하다. HLA-A 유전자는 염색체 6번의 단완에 위치하며 HLA-A의 더 긴 α 사슬 성분을 인코딩한다. HLA-A α 사슬의 변동이 HLA 기능에 대한 열쇠이다. 이 변동은 인구에서 유전적 다양성을 촉진한다. HLA마다 특정 구조의 펩티드에 대한 친화도가 다르므로, HLA의 더 큰 다양성은 세포 표면 상에 '제시된' 항원의 더 큰 다양성을 의미한다. 개인마다 HLA-A의 최대 두 가지 유형을 발현할 수 있으며, 각각 그 부모로부터 유래한다. 일부 개인은 양쪽 부모로부터 동일한 HLA-A를 물려받아 자신의 개인적 HLA 다양성이 감소한다. 하지만 대부분의 개인들은 두 개의 다른 HLA-A 복제를 받게 된다. 모든 HLA 그룹에 대해 이러한 동일한 패턴이 적용된다. 다시 말해서, 모든 각 개인은 2432개의 알려진 HLA-A 대립유전자 중 하나 또는 두 개만 발현할 수 있다.

[0046] 본 발명의 맥락에서 MHC 클래스 I HLA 단백질은 HLA-A, HLA-B 또는 HLA-C 단백질, 바람직하게는 HLA-A 단백질, 보다 바람직하게는 HLA-A*02일 수 있다.

[0047] "HLA-A*02"는 특정한 HLA 대립유전자를 의미하며, 글자 A는 유전자를 의미하고 접미어 "*02"는 A2 혈청형을 나타낸다.

[0048] MHC 클래스 I 의존 면역 반응에서, 펩티드는 종양 세포에 의해 발현되는 특정 MHC 클래스 I 분자와 결합할 수 있어야 하며 또한 추후 특정한 T세포 수용체(TCR)를 갖는 T세포에 의해 인식될 수 있어야 한다.

[0049] 본 발명의 맥락에서 "TCR"은 면역글로불린 상위계열의 이종이합체 세포 표면 단백질이며, 이는 신호 전달의 매개에 관여하는 CD3 복합체의 불변 단백질과 관련이 있다. TCR은 αβ 및 γδ 형태로 존재하며, 이들은 구조적으로 유사하지만 해부학적 위치는 상당히 다르며 아마 기능도 다를 것이다. 자연 이종이량체 αβ TCR 및 γδ TCR의 세포외 부분은 각각 두 개의 폴리펩티드로 구성되며, 이들 각각은 막 근위의 불변 도메인과 막 원위의 가변 도메인을 갖는다. 불변 및 가변 도메인 각각은 사슬내 이황화 결합을 포함한다. 가변 도메인은 항체의 상보성 결정 영역(CDR)과 동족인 고도로 다형태적인 루프를 포함한다.

[0050] 여기서 "TCR"이란 용어는 TCR과 그 단편 그리고 단쇄 TCR과 그 단편, 특히 단일 도메인 TCR의 가변 알파 및 베타 도메인 그리고 키메라, 인간화, 이중특이성 또는 다중특이성 TCR을 나타낸다.

[0051] "TCR의 단편"은 무손상이나 자연 TCR의 부분, 특히 무손상이나 자연 TCR의 항원 결합 영역이나 가변 영역을 포함한다. TCR의 예에는 α, β, δ, γ 사슬의 단편($V_α$- $C_α$ 또는 $V_β$- $C_β$ 또는 그 부분)이 포함되며, 그러한 단편은 또한 TCR 단편으로부터 형성된 $V_α$, $V_β$, $V_δ$, $V_γ$, 단쇄 VαVβ 단편이나 이중특이성 및 다중특이성 TCR과 같은, 상응하는 힌지 영역이나 단쇄 가변 도메인을 추가로 포함할 수 있다. TCR의 단편은 자연적으로 발생하는 전장 TCR에 비해 동일한 기능을 가하며, 즉 단편이 자신의 표적 펩티드에 선택적으로 및 특이적으로 결합한다.

[0052] 여기서 "단쇄 TCR (scTCR)"은 $V_α$ 및 $V_β$ 또는 $V_δ$ 및 $V_γ$와 같은 TCR의 가변 도메인이 하나의 폴리펩티드에 위치하는 단백질을 나타낸다. 전형적으로 가변 도메인은 링커에 의해 분리되며, 상기 링커는 5 ~ 15개 아미노산과 같이 전형적으로 5 ~ 20개를 포함한다.

[0053] 예를 들어 "자연 TCR"이란 표현에서 사용되는 "자연"이란 야생형 TCR을 말한다. 자연 알파-베타 이종이량체 TCR은 하나의 알파 사슬 및 하나의 베타 사슬을 갖는다. 각 알파 사슬은 가변, 결합 및 불변 영역을 포함하며, 베타 사슬은 또한 대개 가변 및 결합 영역 사이에 짧은 다양성 영역을 포함하지만, 이 다양성 영역은 흔히 결합 영역의 일부로서 간주된다. TCR 알파 및 베타 사슬의 불변(또는 C) 영역을 각각 TRAC 및 TRBC로 칭한다

(Lefranc, (2001), Curr Protoc Immunol Appendix 1: Appendix 10). 여기서 알파 가변 도메인 및 베타 가변 도메인으로 칭하는 각 가변 영역은 구조틀 서열에 포함된 3개의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하며, 그 중 하나는 CDR3으로 명명되는 과가변 영역이다. 여기서 알파 가변 도메인 CDR은 CDRa1, CDRa2, CDRa3로 칭하며, 베타 가변 도메인 CDR은 CDRb1, CDRb2, CDRb3으로 칭한다. 여러 유형의 알파 사슬 가변(Valpha) 영역과 여러 유형의 베타 사슬 가변(Vbeta) 영역이 있는으며, 이들은 구조틀, CDR1 및 CDR2 서열에 의해 그리고 부분적으로 정의된 CDR3 서열에 의해 구별된다. Valpha 유형은 IMGT 명명법에서 고유한 TRAV 번호로 칭하고, Vbeta 유형은 IMGT 명명법에서 고유한 TRBV 번호로 칭한다(Folch and Lefranc, (2000), Exp Clin Immunogenet 17(1): 42-54; Scaviner and Lefranc, (2000), Exp Clin Immunogenet 17(2): 83-96; LeFranc and LeFranc, (2001), "T-cell Receptor Factsbook", Academic Press). 면역 글로불린 항체와 TCR 유전자에 관한 보다 상세한 정보는 다음을 참조한다: international ImMunoGeneTics information system®, Lefranc M-P et al (Nucleic Acids Res. 2015 Jan;43 (Database issue):D413-22; and http://www.imgt.org/). 그러므로 기존의 TCR 항원 결합 부위는 알파 및 베타 사슬 가변 영역의 각각으로부터 CDR 집합을 포함하는 6개의 CDR을 대개 포함하며, CDR1 및 CDR3 서열은 HLA 단백질에 결합된 펩티드 항원의 인식 및 결합과 관련이 있고 CDR2 서열은 HLA 단백질의 인식 및 결합과 관련이 있다.

[0054] 항체와 유사하게, "TCR 구조틀 영역"(FR) 은 CDR 사이에 중첩되는 아미노산 서열을 칭하며, 다시 말해서 하나의 종에서 상이한 TCR 중 어느 정도 보존되는 TCR 알파 및 베타 사슬 가변 영역의 그 부분을 포함한다. TCR의 알파 및 베타 사슬은 각각 4개의 FR을 가지며, 여기서 FR1-a, FR2-a, FR3-a, FR4-a 및 FR1-b, FR2-b, FR3-b, FR4-b로 각각 지정된다. 따라서, 알파 사슬 가변 도메인은 (FR1-a)-(CDRa1)-(FR2-a)-(CDRa2)-(FR3-a)-(CDRa3)-(FR4-a)로 지정될 수 있고, 베타 사슬 가변 도메인은 (FR1-b)-(CDRb1)-(FR2-b)-(CDRb2)-(FR3-b)-(CDRb3)-(FR4-b)로 지정될 수 있다.

[0055] 본 발명의 맥락에서, α나 β 사슬 또는 γ나 δ 사슬에서 CDR/FR 정의는 IMGT 정의에 기반하여 결정해야 한다(Lefranc et al. Dev. Comp. Immunol., 2003, 27(1):55-77; www.imgt.org). 따라서, CDR/FR 아미노산 위치는 TCR나 TCR 유래 도메인과 관련되는 경우 상기 IMGT 정의에 따라 표시된다. 한 예시에서, 제1 가변 도메인의 CDR/FR 아미노산 위치의 IMGT 위치는 TRAV5의 IMGT 번호매김에 유추하여 주어지며/거나 제2 가변 도메인의 CDR/FR 아미노산 위치의 IMGT 위치는 TRBV12-4의 IMGT 번호매김에 유추하여 주어진다. 이는 예를 들어 서열 식별 번호 10의 MAGE-A 항원성 펩티드에 대한 항원 결합 부위 B의 가변 도메인 경우에 해당한다.

[0056] 감마/델타 TCR에 관하여, 본 문서에서 사용된 용어 "TCR 감마 가변 도메인"은 선도 영역(L)이 없는 TCR 감마 V(TRGV), TCR 감마 J(TRGJ) 영역의 연계를 지칭하며, 또한 용어 TCR 감마 불변 도메인은 세포외 TRGC 영역이나 C-말단 절단된 TRGC 서열을 지칭한다. 마찬가지로 용어 "TCR 델타 가변 도메인"은 리더 영역(L)이 없는 TCR 델타 V(TRDV) 영역과 TCR 델타 D/J(TRDD/TRDJ) 영역의 연계를 지칭하며, 용어 TCR 델타 불변 도메인은 세포외 TRDC 영역이나 C-말단 절단된 TRDC 서열을 지칭한다.

[0057] "면역 글로불린"으로도 부르는 "항체"에서 두 개의 중쇄가 이황화 결합에 의해 서로 연계되며 각 중쇄는 이황화 결합에 의해 경쇄에 연계된다. 두 가지 유형의 경쇄, 람다(l) 및 카파(k)가 있다. 항체 분자의 기능적 활성을 결정하는 다섯 개의 주요 중쇄 클래스(또는 아이소형)가 있다:IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE. 각 도메인은 뚜렷한 서열 도메인을 포함한다. 경쇄는 두 개의 도메인이나 영역, 가변 도메인(V_L) 및 불변 도메인(C_L)을 포함한다. 중쇄는 네 개의 도메인, 가변 도메인(V_H)과 세 개의 불변 도메인(C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}, 통칭하여 C_H로 칭함)을 포함한다. 경쇄(V_L) 및 중쇄(V_H)의 가변 영역은 항체에 대한 결합 인식과 특이성을 결정한다. 경쇄(C_L) 및 중쇄(C_H)의 불변 영역 도메인은 항체 사슬 연관, 분비, 태반통과 운동성, 보안 결합 및 F_c 수용체(F_cR)에 대한 결합과 같은 중요한 생물학적 성질을 부여한다. Fv 단편은 면역글로불린에서 Fab 단편의 N-말단 부분이고 하나의 경쇄와 하나의 중쇄의 가변 부분들로 구성된다. 항체의 특이성은 항체 결합 부위(항체 결합 부와 동의어)와 항원성 결정인자 사이의 구조적 상보성에 있다. 항체 결합 부위는 일차적으로 과가변 혹은 상보성 결정 영역(CDR)의 잔기로 이루어진다. 때때로, 비과가변이나 구조틀 영역(FR)의 잔기가 전반적 도메인 구조에 따라서 조합 부위에 영향을 미친다. 상보성 결정 영역(Complementarity Determining Region), 즉 CDR이란 항체 자연 면역글로불린 결합 부위의 자연적 Fv 영역에 대한 결합 친화도 및 특이성을 함께 정의하는 아미노산 서열을 지칭한다. 각 면역글로불린의 경쇄 및 중쇄는 3개의 CDR을 가지며, CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L 그리고 CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H로 각각 지정된다. 그러므로 기존의 항체 항원 결합 부위는 중쇄 및 경쇄 V 영역 각각으로부터의 CDR 조합을 포함하는 여섯 개의 CDR을 포함한다.

[0058] 본 발명의 맥락에서, 항체나 면역글로불린은 IgM, IgD, IgG, IgA 또는 IgE이다.

[0059] "항체 구조틀 면역"(FR)은 CDR 사이에 삽입되는 아미노산 서열 즉, 단일 종의 여러 면역글로불린에서 상대적으로 보존되는 면역글로불린 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 부분을 지칭한다. 면역글로불린 경쇄 및 중쇄는 각각 4개의 FR을 가지며, FR1-L, FR2-L, FR3-L, FR4-L, 그리고 FR1-H, FR2-H, FR3-H, FR4-H로 각각 지정된다. 따라서 경쇄 가변 도메인은 그리하여 (FR1-L)-(CDR1-L)-(FR2-L)-(CDR2-L)-(FR3-L)-(CDR3-L)-(FR4-L)로 지정될 수 있고 중쇄 가변 도메인은 그리하여 (FR1-H)-(CDR1-H)-(FR2-H)-(CDR2-H)-(FR3-H)-(CDR3-H)-(FR4-H)로 지정될 수 있다.

[0060] 본 발명의 맥락에서, 면역글로불린 경쇄나 중쇄에서, 특히 본 발명의 맥락에서 항-CD3 항체 변이체의 면역글로불린 경쇄나 중쇄에서, CDR/FR 정의는 Kabat에 근거하여 결정해야 한다(Kabat EA, Te, Wu T, Foeller C, Perry HM, Gottesman KS. (1992) Sequences of Proteins of Immunological Interest.). 하지만, 면역 글로불린 경쇄나 중쇄의, 특히 본 발명의 맥락에서 UCHT1의 CDR/FR 아미노산의 위치 번호매김은 순서대로이다. 따라서, 예를 들어 Kabat에 따라 결정되는 CDRH1의 범위는 아미노산 위치 31 ~ 35, Kabat에 따라 결정되는 CDRH2의 범위는 아미노산 위치 50 ~ 66 그리고 Kabat에 따라 결정되는 CDRH3의 아미노산 위치는 99 ~ 111이다. 따라서, 예를 들어 Kabat에 따라 결정되는 CDRL1의 범위는 아미노산 위치 24 ~ 34, Kabat에 따라 결정되는 CDRL2의 범위는 아미노산 위치 50 ~ 56이다.

[0061] 여기서 사용되는 "인간 구조틀 영역"이란 자연적으로 발생하는 인간 항체나 인간 TCR과 같은 자연적으로 발생하는 항원 결합 단백질의 구조틀 영역에 대해 상당하게 동일한(약 85% 이상, 특히 90%, 95%, 97%, 99% 또는 100%) 구조틀 영역이다.

[0062] 용어 "항체"는 항체와 그 단편 그리고 단일 사슬 항체와 그 단편, 특히 단일 도메인 항체 및 키메라, 인간화, 이중특이성 또는 다중특이성 항체의 가변 중쇄를 나타낸다.

[0063] 본 문서에서 말하는 "기존의 항체"란 자연으로부터 분리되는 항체와 같은 도메인을 가진 항체이며 CDR 및 구조틀 영역으로부터 유래하는 항체를 포함한다. 비유하면, 여기서 말하는 "기존의 TCR"은 자연 TCR과 같은 도메인 그리고 TCR 유래 CDR 및 구조틀 영역을 포함한다.

[0064] 용어 "인간화 항체"는 인간에서 면역 반응의 회피나 최소화를 위해 완전하게 또는 부분적으로 비인간 기원이며 특정 아미노산 교체하도록 변형되는 항체, 특히 비인간 단클론성 항체에서 중쇄 및 경쇄의 구조틀 영역에서의 항체이다. 인간화 항체의 불변 도메인은 주로 인간 C_H 및 C_L 도메인이다.

[0065] 항체 서열의 인간화에 대한 다수의 방법이 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, Almagro & Fransson (2008) Front Biosci. 13: 1619-1633의 문헌 고찰을 참고한다. 한 가지 흔히 사용되는 방법은 CDR 접목 또는 항체 재형성(reshaping)이며, 이 방법에는 공여자 항체, 일반적으로 마우스 항체의 CDR 서열을 특이성이 다른 인간 항체의 구조틀 골격 안으로 접목하는 것이 포함된다. CDR 접목은 CDR 접목된 비인간 항체의 결합 특이성 및 친화도 및 이에 따른 생물학적 활성을 감소시킬 수 있으므로, 모 항체의 결합 특이성 및 친화도를 유지하기 위해 CDR 접목된 항체의 선택된 위치에 역돌연변이를 도입할 수 있다. 가능한 역돌연변이에 대한 위치 식별은 문헌과 항체 데이터베이스에서 이용 가능한 정보를 사용하여 수행할 수 있다. CDR 이식 및 역 돌연변이에 대한 대안 인간화 기법이 재부상 중이며, 여기서 비인간 출처의 비표면 노출된 잔기가 유지되는 반면 표면 잔기가 인간 잔기로 변경된다. 다른 대안 기법은 "인도 선택"으로 알려져 있으며(*Jespers et al.* (1994) Biotechnology 12, 899) 예를 들어 쥐과 항체로부터 완전한 인간 항체를 유도하여 모 항체의 에피톱과 결합 특성을 보전할 수 있다. 인간화의 추가 방법은 소위 4D 인간화이다. 4차원 인간화 프로토콜이, 예를 들어 특허 출원서 US20110027266 A1(WO2009032661A1)에 기술되어 있으며, 여기에 그 전문이 참조 문헌으로 포함된다. 본 발명의 맥락에서, 단클론성 마우스 항체 UCHT1은 이 문서의 실시예 1에서 상세히 기술된 대로 인간화되었다. 키메라 항체의 경우, 인간화에는 전형적으로 가변 영역 서열의 구조틀 영역에 대한 변형이 관여한다.

[0066] 본 발명의 맥락에서, "버니어 영역"은 CDR 루프의 입체형태 및 항체의 친화도에 영향을 주는 것을 보여준 구조틀 영역에서 쥐과 잔기를 지칭한다. 이러한 잔기는 "버니어 잔기"로도 불리며 CDR에 밀접하게 기저를 이루는 β 시트 구조틀 영역에 위치하고, 항원과의 직접 상호작용에 참여하지 않으며, 즉 이 잔기는 "인간화" 항체에 유지된다(Foote & Winter, 1992).

[0067] CDR의 부분인 아미노산 잔기는 인간화와 관련하여 전형적으로 변경되지 않지만, 특정 경우, 예를 들어 글리코실화 부위, 탈아미드화 부위, 이성질체화 부위 또는 원치 않는 시스테인 잔기의 제거를 위해 개별 CDR 아미노산 잔기를 변경할 수 있다. N-연계 글리코실화는 X가 Pro를 제외한 일체의 아미노산일 수 있는 삼펩티드 서열 Asn-

X-Ser 또는 Asn-X-Thr에서 올리고당 사슬의 아스파라긴 잔기에 대한 부착에 의해 발생한다. N-글리코실화 부위의 제거는 특히 보존적 치환의 방법에 의한 Asn 또는 Ser/Thr 잔기를 다른 잔기로 변이시켜 성취될 수 있다. 아스파라긴 및 글루타민 잔기의 탈아미드화는 pH와 표면 노출과 같은 요인에 따라 발생할 수 있다. 아스파라긴 잔기는 특히 탈아미드화에 대해 민감하며, 주로 서열 Asn-Gly에 존재 시 민감하고 Asn-Ala 등의 다른 디펩티드 서열에서 덜 민감하다. 그러므로 그러한 탈아미드화 부위, 특히 Asn-Gly가 CDR 서열에 존재할 때, 보통 관련 잔기 중 하나를 제거하는 보존적 치환에 의해 그 부위를 제거하는 것이 바람직할 수 있다. 관련 잔기 중 하나를 제거하기 위한 CDR 서열에서의 치환 또한 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

[0068] 본 발명의 맥락에서, "항체의 단편"은 온전한 항체의 한 부분, 특히 온전한 항체의 항원 결합 부위나 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예에는 항체 단편으로부터 형성된 Fv, Fab, F(ab')2, Fab', dsFv, (dsFv)2, scFv, sc(Fv)2, 디아바디, 이중특이성 및 다중특이성 항체가 포함된다. 항체의 단편은 중쇄 항체나 VHH와 같은 단일 도메인 항체일 수도 있다.

[0069] 용어 "Fab"는 약 50,000 달톤의 분자량과 항원 결합 활성을 가지며, 이는 IgG를 단백질 분해효소(예: 파파인)로 처리하여 얻어진 단편 가운데 H 사슬의 N 말단 쪽의 절반과 L 사슬 전체가 이황화 결합을 통해 함께 결합된다.

[0070] 본 발명의 맥락에서, 용어 "형식"이란 이중특이성 항원 결합 단백질과 그 공간 조직에 존재하는 특이적 수 및 유형의 도메인을 포함하는 상기의 이중 특이성 항원 결합 단백질을 지칭한다.

[0071] 이중특이성 형식과 같은 다수의 다른 형식은 전형적으로 항체의 맥락에서 당업계에서 기술되며, 그러한 형식은 전형적으로 디아바디, 교차--이중-가변-도메인(CODV) 및/또는 이중 가변 도메인(DVD) 단백질과 같은 비제한적인 예를 포함한다. 이러한 다른 이중특이성 항체와 이를 만드는 방식에 대한 개요가, 예를 들어 다음에서 공개되어 있다: Brinkmann U. and Kontermann R.E. MAbs. 2017 Feb-Mar; 9(2): 182-212. 특히, DVD 형식은, 예를 들어 다음의 과학 논문에 공개되어 있다(Wu C et al. Nat Biotechnol 2007; 25:1290-7; PMID:17934452; Wu C. et al. MAbs 2009; 1:339-47; Lacy SE et al. MAbs 2015; 7:605-19; PMID:25764208; Craig RB et al. PLoS One 2012; 7:e46778; PMID:23056448; Piccione EC et al. MAbs 2015). CODV는 예를 들어 다음에 공개되어 있다: Onuoha SC et al. Arthritis Rheumatol. 2015 Oct; 67(10):2661-72 또는 예를 들어 WO2012/135345, WO2016/116626에 공개되어 있다. 이중특이성 디아바디는 예를 들어 다음에서 기술되어 있다: Holliger P et al. Protein Eng 1996; 9:299-305; PMID:8736497; Atwell JL et al. Mol Immunol 1996; 33:1301-12; PMID:9171890; Kontermann RE, Nat Biotechnol 1997; 15:629-31; PMID:9219263; Kontermann RE et al. Immunotechnology 1997; 3:137-44; PMID:9237098; Cochlovius B et al. Cancer Res 2000; 60:4336-41; PMID:10969772; and DeNardo DG et al. Cancer Biother Radiopharm 2001; 16:525-35; PMID:11789029.

[0072] 항체의 맥락에서 사용되는 "디아바디"란 전형적으로 두 개의 사슬로 구성되는 이가 분자를 말하며, 각 사슬은 동일하거나 다른 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함한다. 이 두 개의 사슬은 전형적으로 구성 VHA-VLB 및 VHB-VLA (A 및 B는 두 개의 다른 특이성을 나타냄) 또는 VLA-VHB 및 VLB-VHA를 가진다.

[0073] 본 발명의 맥락에서, 여기서 "디아바디 (Db)" 또는 "디아바디 형식"은 각각 링커(L_{Db1} 및 L_{Db2})에 의해 연결되는 2개의 가변 도메인을 포함하는 2개의 폴리펩티드 사슬로 구성되는 2가 분자를 지칭하며, 2개의 도메인은 본 발명의 맥락에서 정의되는 제1 및 제2 도메인(V_1 및 V_2)이며 다른 두 개의 도메인은 TCR 유래 또는 항체 유래 가변 도메인(V_A,V_B)일 수 있다. V_1 및 V_2 도메인은 2개의 다른 폴리펩티드에 위치하며 V_A 및 V_B 도메인은 2개의 다른 폴리펩티드에 위치하고 도메인들은 두미 방향으로 이량체화 된다. 따라서, 그 방향은 V_1-L_{Db1}-V_A V_B-L_{Db2}-V_2, V_2-L_{Db1}-V_A, V_B-L_{Db2}-V_1, V_1-L_{Db1}-V_B , V_A-L_{Db2}-V_2 또는 V_2-L_{Db1}-V_B, V_A-L_{Db2}-V_1일 수 있다. 도메인에 의한 두미 링커의 이량체화를 허용하도록, 즉, L_{Db1} 및 L_{Db1}은 동일하거나 다를 수 있으며 짧은 링커이다. 짧은 링커는 전형적으로 길이가 아미노산 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개와 같은 2 ~ 12개, 3 ~ 13개, 예를 들어 아미노산 길이가 4, 5개 (Brinkmann U. and Kontermann E.E. MAbs. 2017 Feb-Mar; 9(2): 182-212) 또는 서열 식별 번호 114의 'GGGS', 서열 식별 번호 115의 'GGGGS' 또는 서열 식별 번호 118의 'GGGSGGGG'와 같이 길이가 8개이다.

[0074] "이중 가변 도메인 면역글로불린(DVD-Ig™)" 형식은 초기에 2007년에 Wu C. 등이 기술하였다(Nat Biotechnol. 2007 Nov; 25(11):1290-7). 이 형식에서, 전형적으로 둘째 단클론성(B)의 표적 결합 가변 도메인은 전형적으로 기존의 항체(A) (도메인 V_{LA} 및 V_{HA}를 포함)에 융합하며, 기존의 항체(A)의 경쇄는 따라서 추가의 경쇄 가변 도메인(V_{LB})을 포함하며 기존 항체(A)의 중쇄는 추가의 중쇄 가변 도메인(V_{HB})을 포함한다. 당업계에서 기술되는

DVD-Ig™은 따라서 전형적으로 두 개의 폴리펩티드 사슬, 즉 V_{HB}-L-V_{HA}-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}를 포함하는 하나의 중쇄 그리고 V_{LB}-L-V_{LA}-C_L을 포함하는 하나의 경쇄로 구성된다. 따라서 도메인 쌍인 V_{LA}/V_{HA} 및 V_{LA}/ V_{LA}는 평행으로 쌍을 이룬다.

[0075] 본 발명의 맥락에서 "이중-가변-도메인 Ig 형식"은 각각 링커(L_1, L_3)에 의해 연결된 2개의 가변 도메인을 포함하는 두 개의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 단백질을 말하는데, 도메인의 2개는 본 발명의 맥락에서 정의된 첫째 및 둘째 도메인(V_1 및 V_2)이며 다른 2개의 도메인은 항체 유래 중쇄 및 경쇄 가변 도메인(V_{HA} 및 V_{HB})이다. 본 발명의 맥락에서 DVD-Ig 형식에 대하여 폴리펩티드 사슬은, 예를 들어 조직 V_1-L_1-V_{HA}-L_2-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3} 및 V_2-L_3-V_{LA}-L_4-C_L 또는 V_2-L_1-V_{HA}-L_2-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3} 및 V_1-L_3-V_{LA}-L_4-C_L을 갖는다. 연결 링커 L_1 및 L_3은 바람직하게는 5 ~ 15개 아미노산의 잔기 길이, 예를 들어 5~20개의 아미노산 잔기이고/거나 연결 링커 L_2 및 L_4는 존재하거나 부재할 수 있다.

[0076] 항체의 맥락에서 당업계에서 기술되는 "크로스오버 이중-가변 도메인-Ig-유사 단백질"은 두 개의 V_H 및 두 개의 V_L 도메인들이 가변 V_H-V_L 도메인들의 크로스오버 짝짓기를 허용하는 방식으로 연계되는 형식을 대표하는데, 이 도메인들은 (N-말단에서 C-말단으로) V_{HA}-V_{HB} 및 V_{LB}-V_{LA}의 순서로 또는 V_{HB}-V_{HA} 및 V_{LA}-V_{LB}의 순서로 배열된다.

[0077] 본 발명의 맥락에서 "크로스오버 이중-가변 도메인 Ig 유사 단백질"은 각각 링커(L_1, L_2, L_3 및 L_4)에 의해 연결되는 2개의 가변 도메인을 포함하는 2개의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 단백질을 말하는데, 도메인들의 2개는 본 발명의 맥락에서 정의되는 첫째 및 둘째 도메인(V_1 및 V_2)이며 나머지 2개의 도메인은 항체 유래 중쇄 및 경쇄 가변 도메인(V_{HA}, V_{HB})이다. 본 발명의 맥락에서 CDVD-Ig 형식에 있어서 폴리펩티드 사슬은 예를 들어 조직 V_1-L_1-V_{HA}-L_2-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3} 및 V_{LA}-L_3-V_2-L_4-C_L, V_2-L_1-V_{HA}-L_2-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3} 및 V_{LA}-L_3-V_1-L_4-C_L, V_{HA}-L_1-V_1-L_2-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3} 및 V_2-L_3-V_{LA}-L_{DVD3}-C_L 또는 V_{HA}-L_1-V_2-L_2-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3} 및 V_1-L_3-V_{LA}-L_4-C_L을 갖는다. 이 CDVD 형식에서, 링커(L_1 ~ L_4)는 전부 글리신인 링커 및 다음에 나오는 링커 섹션에서 여기에 기술된 링커를 포함하여 대개 길이가 다르다. 예를 들어, L_1은 길이가 3 ~ 12개의 아미노산 잔기이며, L_2는 길이가 3 ~ 14개의 아미노산 잔기이며, L_3은 길이가 1 ~ 8개의 아미노산 잔기이며, L_4는 길이가 1 ~ 3개의 아미노산 잔기이며, 또는

[0078] L_1은 길이가 5 ~ 10개의 아미노산 잔기이며, L_2는 길이가 5 ~ 8개의 아미노산 잔기이며, L_3은 길이가 1 ~ 5개의 아미노산 잔기이며, L_4는 길이가 1 ~ 2개의 아미노산 잔기이며 또는 L_1은 길이가 7개의 아미노산 잔기이며, L_2는 길이가 5개의 아미노산 잔기이며, L_3은 길이가 1개의 아미노산 잔기이며, L_4는 길이가 2개의 아미노산 잔기이다.

[0079] 여기서 "적어도 하나"란 명시된 대상의 1, 2, 3, 4, 5 또는 6 이상과 같은 명시된 대상의 하나 이상을 말한다. 예를 들어, 여기서 적어도 하나의 결합 부위는 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 이상의 결합 부위를 말한다.

[0080] "참조 서열에 대해 적어도 85% 동일한" 서열이란 그 전체 길이에서 참조 서열의 전체 길이와 85% 이상, 특히 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열이다.

[0081] 본 출원의 맥락에서, "동일성 백분율"은 전역 쌍정렬(즉, 2개의 서열을 전체 길이에 걸쳐 비교함)을 사용하여 계산한다. 두 개 이상의 동일성을 비교하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 한 예로 두 개의 서열의 전체 길이를 고려하여 최적의 정렬(간극 포함)을 찾기 위해 Needleman-Wunsch 전역 정렬 알고리즘(Needleman and Wunsch, 1970 J. Mol. Biol. 48:443-453)을 사용하는 "니들" 프로그램이 사용될 수 있다. 예를 들어, 이 니들 프로그램은 월드와이드 웹 사이트에서 얻을 수 있으며 다음 출판물에서 추가로 기술된다(*EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite* (2000) Rice, P. Longden, I. and Bleasby, A. Trends in Genetics 16, (6) pp. 276-277). 두 개의 폴리펩티드 사이의 동일성 백분율을 본 발명에 따라 EMBOSS: 니들(전역) 프로그램을 사용하여 계산하는데, 여기서 "간극 열림" 매개변수는 10.0, "간극 연장" 매개변수는 0.5, 그리고 Blosum62 행렬이 사용된다.

[0082] 참조 서열에 대해 "적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한" 아미노산 서열로 구성되는 단백질은 참조 서열에 비해 결실, 삽입 및/또는 치환과 같은 아미노산 변이를 포함할 수 있다. 치환의 경우, 참조 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열로 구성되는 단백질은 참조 서열이 아닌 다른 종으로부터 유래하는 상동성 서열에 상응할 수 있다.

[0083] "아미노산 치환"은 보존적이거나 비보존적일 수 있다. 바람직하게는, 치환은 보존적 치환이며 여기서 한 아미노산이 유사한 구성적 및/또는 화학적 물성을 갖는 다른 아미노산으로 치환된다.

[0084] 한 구현예에서, 보수적 치환은 그 전체 내용이 참조문헌으로 포함되는 "The Atlas of Protein Sequence and Structure. Vol. 5", Natl. Biomedical Research에서 Dayhoff가 기술하는 치환들을 포함할 수 있다. 예를 들어, 한 양태에서, 다음 군의 하나에 속하는 아미노산들은 서로 교환될 수 있으므로 보존적 교환이 된다: 1군: 알라닌(A), 프롤린(P), 글리신(G), 아스파라긴(N), 세린(S), 트레오닌(T); 2군: 시스테인(C), 세린(S), 티로신(Y), 트레오닌(T); 3군: 발린(V), 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 알라닌(A), 페닐알라닌(F); 4군: 리신(K), 아르기닌(R), 히스티딘(H); 5군: 페닐알리닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W), 히스티딘(H) 및 6군: 아스파르트산(D), 글루탐산(E). 한 양태에서, 보존적 아미노산 치환은 다음으로부터 선택될 수 있다: T→A, G→A, A→I, T→V, A→M, T→I, A→V, T→G 및/또는 T→S.

[0085] 추가의 구현예에서, 보존적 아미노산 치환에는 한 아미노산이 동일한 클래스의 다른 아미노산에 의한 치환이 포함될 수 있다. 예를 들어, (1) 비극성: Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp; (2) 비전하 극성: Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln; (3) 산성: Asp, Glu; 및 (4) 염기성: Lys, Arg, His. 기타 보존적 아미노산 치환은 다음과 같이 이루어질 수 있다: (1) 방향성: Phe, Tyr, His; (2) 양성자 주개: Asn, Gln, Lys, Arg, His, Trp; 및 (3) 양성자 받개: Glu, Asp, Thr, Ser, Tyr, Asn, Gln (예를 들어 미국특허번호 10,106,805를 참고하며, 그 전문이 참조문헌으로 여기에 포함된다).

[0086] 다른 구현예에서, 보존적 치환은 표 3에 따라 이루어질 수 있다. 단백질 변형에 대한 내성의 예측 방법은 예를 들어, Guo et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 101(25):9205-9210 (2004)에서 찾을 수 있으며, 그 전문이 참조문헌으로 여기에 포함된다.

[0087] **표 3**: 보존적 아미노산 치환

보수적 아미노산 치환	
아미노산	치환(다른 치환은 당업계에 알려져 있음)
Ala	Ser, Gly, Cys
Arg	Lys, Gln, His
Asn	Gln, His, Glu, Asp
Asp	Glu, Asn, Gln
Cys	Ser, Met, Thr
Gln	Asn, Lys, Glu, Asp, Arg
Glu	Asp, Asn, Gln
Gly	Pro, Ala, Ser
His	Asn, Gln, Lys
Ile	Leu, Val, Met, Ala
Leu	Ile, Val, Met, Ala
Lys	Arg, Gln, His
Met	Leu, Ile, Val, Ala, Phe
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp, His
Ser	Thr, Cys, Ala
Thr	Ser, Val, Ala
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, His
Val	Ile, Leu, Met, Ala, Thr

[0088]

[0089] 다른 구현예에서, 보존적 치환은 표 3에서 "보존적 치환"이란 제목 하에 있는 것들일 수 있다. 그러한 치환이 생물학적 활성의 변경을 초래하는 경우, 표 4에서 "예시적 치환"으로 분류된 보다 실질적인 변경이 도입될 수 있으며 필요 시 그 생성물이 선별될 수 있다.

[0090] **표 4:** 아미노산 치환

아미노산 치환		
원래 잔기(자연발생적 아미노산)	보수적 치환	예시적 치환
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르류신
Leu (L)	Ile	노르류신; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신

[0091]

[0092] 일부 구현예에서, 이중특이성 항원 결합 단백질은 변이체 항원 결합 단백질을 포함할 수 있으며, 상기 변이체 이중특이성 항원 결합 단백질은 그 변이체가 유래하는 이중특이성 항원 결합 단백질에 비해 바람직하게는 제1 가변 도메인(V알파 도메인 등) 및 제2 가변 도메인(V베타 도메인 등)의 CDR 영역에서 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15개 이상까지의 아미노산 치환을 포함하는 제1 폴리펩티드 사슬 (α 사슬 등) 및 제2 폴리펩티드 사슬(β 사슬 등)을 포함한다. 이와 관련하여, 제1 및/또는 제2 가변 도메인에 있어서 이중특이성 항원 결합 단백질의 CDR 영역 각각에서 또는 CDR 영역의 모두에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15개 이상의 아미노산 치환이 있을 수 있다. 치환은 첫째 및/또는 둘째 가변 도메인에서 CDR에 있을 수 있다.

[0093] 한 구현예에서, 변이체는 기능성 변이체이다.

[0094] 여기서 사용되는 "기능성 변이체"란 용어는 보존적 아미노산 치환을 포함하는 항원 결합 단백질과 같은 모 이중특이성 항원 결합 단백질에 대해 실질적이거나 상당한 서열 동일성 혹은 유사성을 가진 이중특이성 항원 결합 단백질을 칭하며, 본 문서에서 상기 기능성 변이체는 모 이중특이성 항원 결합 단백질의 생물학적 활성을 보유한다. 한 양태에서, 기능성 변이체는, 예를 들어 모 이중특이성 항원 결합 단백질에 비해 유사한 정도, 동일한 정도 또는 더 높은 정도로 표적 세포를 인식하는 능력을 유지하는, 여기에 기술되는 이중특이성 항원 결합 단백질(본 문서에서 기술된 이중특이성 항원 결합 단백질은 그 자체로 모 이중특이성 항원 결합 단백질을 칭함)의 변이체를 모두 포함한다. 모 이중특이성 항원 결합 단백질과 관련하여 기능성 변이체는, 예를 들어 모 이중특이성 항원 결합 단백질에 대해 서열이 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0095] 기능성 변이체는, 예를 들어 적어도 하나의 보존적 아미노산 치환을 갖는 모 이중특이성 항원 결합 단백질의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 기능성 변이체는 적어도 하나의 비보존적 아미노산 치환을 갖는 모 이중특이성 항원 결합 단백질의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 이 경우, 비보존적 아미노산 치환이 기능성 변이체의 생물학적 활성을 방해하거나 억제하지 않는 것이 바람직하다. 바람직하게, 비보존적 아미노산 치환은 기능성 변이체의 생물학적 활성을 증가시켜, 기능성 변이체의 생물학적 활성이 모 이중특이성

항원 결합 단백질에 비해 증가된다.

[0096] 본 발명의 변형된 TCR, 폴리펩티드 및 항원 결합 단백질(기능성 부분, 단편 및 기능성 변이체 포함)은 임의의 길이일 수 있으며, 즉 임의의 수의 아미노산을 포함할 수 있으며, 단 변형된 TCR, 폴리펩티드 또는 단백질(또는 그 기능성 부분이나 기능성 변이체)은 자신의 생물학적 활성, 예를 들어 항원에 대한 특이적인 결합, 숙주에서 병변 세포의 검출, 또는 숙주에서 질병의 치료나 예방의 능력 등을 유지해야 한다.

[0097] 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질(기능성 부분, 단편 및 기능성 변이체 포함)은 하나 이상의 자연적으로 발생하는 아미노산 대신 합성 아미노산을 포함할 수 있다. 그러한 합성 아미노산은 당업계에서 알려져 있으며, 예를 들어 아미노시클로헥산 카르복실산, 노르류신, α-아미노 n-데카논산, 호모세린, S-아세틸아미노메틸-시스테인, 트랜스-3- 및 트랜스-4-히드록시프롤린, 4-아미노페닐알라닌, 4-니트로페닐알라닌, 4-클로로페닐알라닌, 4-카르복시페닐알라닌, β-페닐세린 β-히드록시페닐알라닌, 페닐글리신 α-나프틸알라닌, 시클로헥실알라닌, 시클로헥실글리신, 인돌린-2-카르복실산, 1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린-3-카르복실산, 아미노말론산, 아미노말론산 모노아미드, N′-벤질-N′-메틸-리신, N′,N′-디벤질-리신, 6-히드록시니신, 오르니틴, α-아미노시클로펜탄 카르복실산, α-아미노시클로헥산 카르복실산, α-아미노시클로헵탄 카르복실산, α-(2-아미노-2-노르보난)-카르복실산, α,γ-디아미노 부티르산, α,β-디아미노프리피온산, 호모페닐알라닌 및 α-t-부틸글리신을 포함할 수 있다.

[0098] 한 구현예에서, 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질(기능성 부분 및 기능성 변이체 포함)은 글리코실화, 아미드화, 카르복실화, 인산화, 에스테르화, N-아실화, 예를 들어 이황화 가교를 통한 고리화 또는 산 부가 염으로의 전환 및/또는 선택적으로 이량체화 또는 중합화 또는 접합화가 가능하다.

[0099] 본 개시의 이중특이성 항원 결합 단백질은 합성, 재조합, 분리 및/또는 정제가 가능하다.

[0100] 여기서 "공유 링크"는, 예를 들어 이황화 가교나 펩티드 링크 또는 링커나 폴리펩티드 링커 등의 링커 서열을 통한 공유 링크를 말한다.

[0101] 여기서 사용되는 "링커"란 용어는 2개의 도메인 사이에 삽입되어 도메인에 대한 이동성을 충분히 제공하는 하나 이상의 아미노산 잔기를 칭하며, 예를 들어 단일 사슬 구조체에서 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질의 제1 가변 도메인과 제2 가변 도메인 사이에 그리고 선택적으로 경쇄 및 중쇄 가변 도메인의 가변 도메인 사이에 삽입되어 올바르게 접힘으로써 항원 결합 부위를 형성하거나 또는 이중특이성 항원 결합 단백질의 경우에는 항원 결합 부위와 적어도 하나의 추가 항원 결합 부위를 형성하며, 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질의 교차 짝짓기(CODV 형식이나 일부 디아바디 형식) 또는 병렬 짝짓기 구성(예를 들어 DVD 형식)을 통해 이루어진다.

[0102] 일부 구현예에서, 링커는 0개의 아미노산으로 구성되며 이는 링크의 부재를 의미한다. 링커는 가변 도메인 사이 또는 가변 도메인과 불변 도메인 사이의 전이에 아미노산 서열 수준으로 삽입된다. 도메인 사이의 전이에 대한 파악이 가능한데 이는 면역글로불린 그리고 TCR 도메인의 대략적 크기가 잘 이해되기 때문이다. 당업자는 도메인 전이의 정밀한 위치는 실험 데이터가 잘 보여주는 베타 시트나 알파 시트와 같은 이차 구조 요소를 형성하지 않는 펩티드 스트레치의 위치를 파악하여 결정할 수 있거나 모델링이나 이차 구조 예측의 기법을 사용하여 확인하거나 추정할 수 있는 다른 내용을 알고 있다. 본 발명의 맥락에서 사용되는 링커란 용어는 L_1, L_2, L_3, L_4, L_5 및 L_6로 불리는 링커를 칭하지만 이로써 제한되지 않는다.

[0103] 해당 맥락에서 달리 명시되지 않는 한, L_1, L_2, L_3, L_4, L_5 및 L_6, 이라는 링커는 그 길이가 적어도 1개에서 30개의 아미노산일 수 있다. 일부 구현예에서, L_1, L_2, L_3, L_4, L_5 및 L_6 등의 링커는 길이가 2~25개, 2~20개 또는 3~18개의 아미노산일 수 있다. 일부 구현예에서, L_1, L_2, L_3, L_5 및 L_6 등의 링커는 그 길이가 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 또는 5개의 아미노산 이하인 펩티드일 수 있다. 다른 구현예에서, L_1, L_2, L_3, L_4, L_5 및 L_6 등의 링커는 그 길이가 5~25개, 5~15개, 4~11개, 10~20개 또는 20~30개의 아미노산일 수 있다. 다른 구현예에서 L_1, L_2, L_3, L_4, L_5 및 L_6 등의 링커는 그 길이가 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 아미노산일 수 있다. 특정한 구현예에서 L_1, L_2, L_3, L_4, L_5 및 L_6 등의 링커는 그 길이가 24개 미만, 20개 미만, 16개 미만, 12개 미만, 10개 미만, 예를 들어 5 ~ 24개, 10 ~ 24개 또는 5 ~10개의 아미노산 잔기일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 그 길이가 1개 초과, 2개 초과, 5개 초과, 10개 초과, 20개 초과, 또는 22개 초과하는 아미노산 잔기와 같은 그 길이가 1개 이상

의 아미노산 잔기이다. L_1, L_2, L_3, L_4, L_5 및 L_6 등의 예시적 링커는 아미노산 서열을 TVAAP(서열 식별 번호 113), GGGS(서열 식별 번호 114), GGSGG(서열 식별 번호 28), GGGGS(서열 식별 번호 115), TVLRT(서열 식별 번호 116), TVSSAS(서열 식별 번호 117), GGGSGGGG(서열 식별 번호 118), GGGGSGGGGS(서열 식별 번호 119), GGGGSAAA(서열 식별 번호 120), GGSGGGGSGG(서열 식별 번호 29), GGSGGGGSGGGGSGG(서열 식별 번호 32), GGGGSGGGGSGGGGS(서열 식별 번호 121) GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGS(서열 식별 번호 122), GGSGGGGSGGGGSGGGGSGG(서열 식별 번호 33), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(서열 식별 번호 123), GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG(서열 식별 번호 66), GSADDAKKDAAKKDGKS(서열 식별 번호 97), GGQGSGGTGSGGQGSGGTGSGGQGS(서열 식별 번호 143), TVLSSAS(서열 식별 번호 124), GGGGSGT(서열 식별 번호 183) 및 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(서열 식별 번호 125), 특히 GGGSGGGG(서열 식별 번호118), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(서열 식별 번호 125) 및 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(서열 식별 번호 123)로 구성되는 아미노산의 군으로부터 선택되는 아미노산을 포함하거나 이로써 구성된다.

[0104] 본 발명의 맥락에서 사용되는 "F_c 도메인"은 자연 Fc 도메인 그리고 여기서 다음에 추가로 정의되는 서열 F_c 도메인 F_c 도메인 변이체 및 서열을 모두 포함한다. F_c 변이체 및 자연 F_c 분자와 같이, 용어 "F_c 도메인"에는 전체 항체로부터 분해되거나 다른 수단에 의해 생성되는 단량체나 다량체 형태의 분자가 포함된다.

[0105] 여기서 사용되는 "자연 F_c"란 용어는 항체의 분해의 결과로 또는 단량체와 다량체 형태로 항체의 분해로부터 생성되거나 다른 수단에 의해 생성된 비항원 결합 단편의 서열을 포함하는 분자를 칭하며, 힌지 영역을 포함할 수 있다. 자연 F_c의 원래 면역글로불린 출처는 특히 인간 출처이며 일체의 면역글로불린, 바람직하게는 IgG1나 IgG2, 가장 바람직하게는 IgG1일 수 있다. 자연 Fc 분자는 공유(즉, 이황화 결합) 및 비공유 연관에 의해 이량체나 다량체 형태 안보로 연결될 수 있는 단량체 폴리펩티드로 이루어진다. 자연 F_c 분자의 단량체 하위단위 사이에 있는 분자간 이황화 결합의 수 범위는 클래스(예: IgG, IgA 및 IgE) 또는 아분류(예: IgG1, IgG2, IgG3, IgA1 및 IgGA2)에 따라 1 ~ 4이다. 자연 F_c의 한 예는 IgG의 파파인 분해로부터 초래되는 이황화 결합에 의한 이량체이다. 여기서 사용되는 "자연 F_c"란 용어는 단량체, 이량체 및 다량체 형태에 대한 포괄적인 용어이다. 자연 F_c 아미노산 서열의 한 예는 IGHG1*01의 자연 Fc 아미노산 서열인 서열 식별 번호 126의 아미노산 서열이다.

[0106] "힌지" 또는 "힌지 영역" 또는 "힌지 도메인"이란 C_{H1} 도메인과 C_{H2} 도메인 사이에 위치한 중쇄의 유연 부분을 지칭한다. 그 길이는 약 25개 아미노산이며 "상부 힌지", "중간 힌지" 또는 "핵심 인지" 그리고 "하부 힌지"로 나뉜다. "힌지 하위도메인"은 상부 힌지, 중간(또는 핵심) 힌지 또는 하부 힌지를 칭한다. IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 분자 힌지들의 아미노산 서열은 여기에서 다음과 같이 표시된다:

[0107] IgG1: E_{216}PKSCDKTHTCPPCPAPELLG(서열 식별 번호 127)

[0108] IgG2: E_{216}RKCCVECPPCPAPPVAGP(서열 식별 번호 128)

[0109] IgG3:ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPE$_{216}$PKSCDTPPPCPRCPAPELLG(서열 식별 번호 129)

[0110] IgG4: E_{216}SKYGPPCPSCPAPEFLG(서열 식별 번호 130).

[0111] 본 발명의 맥락에서 그것은 Fc 도메인에서 아미노산 위치로 칭해지며, 이러한 아미노산 위치나 잔기는, 예를 들어 다음에서 기술된 EU 번호매김 체계에 따라 표시된다: Edelman, G.M. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969).

[0112] 여기서 사용되는 "F_c 변이체"란 용어는 자연 F_c로부터 변형되지만 여전히 구제 수용체, F_cRn(신생 F_c 수용체)에 대한 결합 부위를 포함하는 분자나 서열을 말한다. 예시적 F_c 변이체 및 구제 수용체와의 그 상호작용은 당업계에서 알려져 있다. 그러므로 "$_{F}$c 변이체"란 용어는 비인간 자연 F_c로부터 인간화된 분자나 서열을 포함할 수 있다. 더욱이 자연 F_c는 제거 가능한 영역을 포함하는데, 이는 이 영역의 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질에 요구되지 않는 구조적 특징이나 생물학적 활성을 제공하기 때문이다. 그러므로 "F_c 변이체"란 용어는 하나 이상의 자연 F_c 부위나 잔기를 결여하거나 그 안에 하나 이상이 F_c 부위나 잔기가 변형된 분자나 서열을 포함하며, 그 부위나 잔기는 다음에 영향을 미치거나 관여한다: (1) 이황화 결합 형성, (2) 선택된 숙주 세포와의 비호환성, (3) 선택된 숙주 세포에서 발현 시 N-말단 이질성, (4) 글리코실화, (5) 보완과의 상호 작용, (6) 구제 수

용체 이외의 F_c 수용체에 대한 결합 또는 (7) 항체 의존 세포독성(ADCC).

[0113] 따라서 한 구현예에서 F_{c1} 및/또는 F_{c2}와 같은 Fc-도메인은 힌지 도메인을 포함한다.

[0114] 한 구현예에서, Fc 도메인은 인간 IgG Fc 도메인이며, 바람직하게는 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4, 바람직하게는 IgG1 또는 IgG2, 보다 바람직하게는 IgG1로부터 유래한다.

[0115] 일부 구현예에서, 특히 이중특이성 항원 결합 단백질이 즉, 여기에서 다음에 기술된 TCER® 형식의 2개의 Fc 도메인(F_{c1} 및 F_{c2} 등)을 포함할 때, 2개의 Fc 도메인이 동일한 면역글로불린 아이소형이나 아이소형 아분류의 것이거나 다른 면역글로불린 아이소형이나 아이소형 아분류의 것일 수 있으며 바람직하게는 동일하다. 따라서 일부 구현예에서 F_{c1} 및 F_{c2}가 IgG1 아분류 또는 IgG2 아분류 또는 IgG3 아분류 또는 IgG4 아분류의 것이며, 바람직하게는 IgG1 아분류나 IgG2 아분류이며 더욱 바람직하게는 IgG1 아분류의 것이다.

[0116] 일부 구현예에서, Fc 도메인은 변이체 Fc 도메인이므로 본 문서에서 다음에 기술되는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다.

[0117] 일부 구현예에서, F_c 도메인은 "RF" 및/또는 "놉-인투-홀"(Knob-into-hole) 변이, 바람직하게는 "놉-인투-홀"을 포함하거나 추가로 포함한다.

[0118] "RF 변이"는 일반적으로 Jendeberg, L. 등(1997, J. Immunological Meth., 201: 25-34)이 기술한 대로 C_{H3} 도메인에서 아미노산 치환 H435R 및 Y436F와 같은 F_c 도메인의 C_{H3} 도메인에서 아미노산 HY의 RF로의 치환을 칭하며, 단백질 A에 대한 결합을 폐지하므로 정제 목적을 위해 유리하게 기술된다. 항원 결합 단백질이 2개의 F_c 도메인을 포함하는 경우, RF 변이는 하나 또는 두 개 모두에서, 바람직하게는 하나의 Fc 도메인에서 있을 수 있다.

[0119] "놉-인투-홀"은 "놉-인투-홀" 기술이라고도 불리며 이종다량체 형성의 촉진을 위해 C_{H3}-C_{H3} 계면에서 T366S, L368A 및 Y407V(홀) 및 T366W(놉) 모두의 아미노산 치환을 지칭한다. 이러한 놉-인투-홀 변이는 추가의 시스테인 아미노산 치환 Y349C 및 S354C의 도입에 의해 더욱 안정화될 수 있다. "놉-인투-홀" 기술은 안정화 시스테인 아미노산 치환과 함께 US5731168 및 US8216805 특허에 기술되었다.

[0120] 본 발명의 맥락에서, 시스테인 아미노산 치환 S354C와의 "놉" 변이는, 예를 들어 서열 식별 번호 131의 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되는 Fc 도메인에 존재하며, 시스테인 아미노산 치환 Y349C와의 "홀" 변이는 서열 식별 번호 132의 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되는 Fc 도메인에 존재한다.

[0121] 일부 구현예에서, 한 폴리펩티드의 F_c 도메인, 예를 들어 F_{c1}은 C_{H3} 도메인에 아미노산 치환 T366W(놉)를 포함하며 다른 폴리 펩티드의 Fc 도메인, 예를 들어 F_{c2}는 C*H3* 도메인에 아미노산 치환 T366S, L368A 및 Y407V(홀)를 포함하거나, 그 반대로 포함한다.

[0122] 일부 구현예에서, 한 폴리펩티드의 F_c 도메인, 예를 들어 F_{c1}은 C_{H3} 도메인에 아미노산 치환 S354C를 포함하거나 추가로 포함하며 다른 폴리펩티드의 F_c 도메인, 예를 들어 F_{c2}는 C*H3* 도메인에 아미노산 치환 Y349C를 포함하거나 추가로 포함하며 또는 그 반대로 포함한다.

[0123] 따라서, 일부 구현예에서, 한 폴리펩티드의 F_c 도메인, 예를 들어 F_{c1}은 C_{H3} 도메인에 아미노산 치환 S354C 및 T366W(놉)를 포함하며 다른 폴리 펩티드의 Fc 도메인, 예를 들어 F_{c2}는 C*H3* 도메인에서 아미노산 치환 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V(홀)를 포함하며 또는 그 반대로 포함한다.

[0124] 이러한 아미노산 치환의 조합은 다음의 Wei 등이 기술한 대로 하나의 폴리펩티드에서 아미노산 치환 K409A 그리고 다른 폴리펩티드에서 F405K의 포함에 의해 더욱 연장된다 (Structural basis of a novel heterodimeric F_c for bispecific antibody production, *Oncotarget*. 2017). 따라서, 일부 구현예에서, 한 폴리펩티드의 Fc 도메인, 예를 들어 Fc1은 CH3 도메인에 아미노산 치환 K409A를 포함하거나 추가로 포함하며 다른 폴리펩티드의 Fc 도메인, 예를 들어 Fc2는 cH3 *도메인에서 아미노산 치환 F405K를 포함하거나 추가로 포함하거나 그 반대로 포함한다.*

[0125] 일부 경우에는 인공적으로 도입된 시스테인 가교가 최적으로 이중특이성 항원 결합 단백질의 결합 특성과의 방해 없이 이중특이성 항원 결합 단백질의 안정성을 향상시킬 수 있다. 그러한 시스테인 가교는 이종이량체화를

더욱 향상시킬 수 있다.

[0126] 전하된 쌍 치환과 같은 추가의 아미노산 치환은 당업계에서, 예를 들어 EP 2 970 484에서 초래되는 단백질의 이종이량체를 향상시키는 것으로 기술되었다.

[0127] 따라서, 한 구현예에서 한 폴리펩티드의 F_c 도메인, 예를 들어 F_{c1}은 전하 쌍 치환 E356K, E356R, D356R이나 D356K 그리고 D399K나 D399R을 포함하거나 추가로 포함하며, 다른 폴리펩티드의 F_c 도메인, 예를 들어 *Fc2*에서 전하 쌍 치환, R409D, R409E, K409E 또는 K409D 그리고 N392D, N392E, K392E 또는 K392D를 포함하거나 추가로 포함하거나 그 반대로 포함한다.

[0128] 추가의 구현예에서, 하나 또는 둘 모두의 F_c 도메인에서, 바람직하게는 두 개의 폴리펩티드 사슬은 F_c 감마 수용체(FcyR) 결합을 억제하는 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다. 그러한 변형은 L234A, L235A를 포함할 수 있다.

[0129] 힌지, C_{H2} 및 C_{H3} 도메인으로 구성된 Fc 부분 또는 그 일부를 항원 결합 단백질, 더욱 특히 이중특이성 항원 결합 단백질에 포함시키는 경우, Fc:Fc-감마 수용체(FcgR) 상호작용에 의해 유도되는 이 분자에 의한 비특이적 부동화 문제가 발생했다. FcgR은 IgG 분자의 Fc 부분에 의해 표시되는 에피톱과 다른 친화도로 결합하는 여러 세포 표면 분자(FcgRI, FcgRIIa, FcgRIIb, FcgRIII)로 구성된다. 그러한 비특이적(즉, 두 가지 이중특이성 분자의 두 결합 도메인 중 어느 하나에 의해 유도되지 않음) 부동화는 i) 분자의 약동학에 대한 영향 그리고 ii) 면역 작용기 세포의 표적을 벗어난 활성화로 인해 불리하며, FcgR 결합을 제거하는 다양한 Fc 변이체 및 돌연변이가 식별되었다. 이 맥락에서 Morgan 등은 Immunology(The N-terminal end of the C_{H2} domain of chimeric human IgG1 anti-HLA-DR is necessary for C1q, FcyRI and FcyRIII binding)(1995)에서는 인간 IgG1의 잔기 233-236 즉 위치 236에서 아미노산이 부재한 잔기 233P, 234V 및 235A를 인간 IgG2에서 유래된 상응하는 서열로 교환함으로써 폐지되는 FcgRI 결합 폐지, C1q 결합 폐지 및 FcgRIII 결합 감소가 초래됨을 공개한다. EP1075496에서는 Fc 영역(233P, 234V, 235A 중 하나 이상 그리고 위치 236에 잔기가 없거나 G가 없음 그리고 327G, 330S 및 331S)에 변이가 있는 항체와 기타 Fc 함유 분자를 공개하고 있으며, 여기서 재조합 항체는 유의한 보체 의존적 용해나 표적의 세포 매개 파괴를 유발하지 않고 표적 분자에 결합할 수 있다.

[0130] 따라서, 일부 구현예에서 Fc 영역은 233P, 234V, 235A, 236(잔기 없음) 또는 G, 327G, 330S, 331S로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산이나 소실을 포함하거나 추가로 포함하며, 바람직하게는 Fc 영역은 아미노산 233P, 234V, 235A, 236(잔기 없음) 또는 G 그리고 327G, 330S, 331S로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산을 포함하거나 추가로 포함하며, 가장 바람직하게는 Fc 영역은 아미노산 233P, 234V, 235A, 236(잔기 없음) 및 331S를 포함하거나 추가로 포함한다.

[0131] 하나의 추가 구현예에서, Fc 도메인은 아미노산 치환 N297Q, N297G 또는 N297A, 바람직하게는 N297Q를 포함하거나 추가로 포함한다.

[0132] 아미노산 치환 "N297Q", "N297G" 또는 "N297A"는 Fc 도메인 내에서 자연 N-글리코실화를 폐지시키는 위치 297에서의 아미노산 치환을 칭한다. 이 아미노산 치환은 또한, 예를 들어 Tao, MH 및 Morrison, SL(J Immunol. 1989 Oct 15;143(8):2595-601.)이 기술한 대로 당 잔기로 인해 Fc-감마 수용체 상호작용을 방지하고 최종 단백질 산물, 즉 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질의 변동성을 감소시킨다.

[0133] 하나의 추가 구현예에서, 특히 경쇄가 없는 경우 Fc 도메인은 아미노산 치환 C220S를 포함하거나 추가로 포함한다. 아미노산 치환 "C220S"는 C_{H1}-CL 이황화 가교를 형성하는 시스테인을 소실한다.

[0134] 일부 실시예에서, F_c 도메인은 적어도 2개의 추가 시스테인 잔기, 예를 들어 S354C 및 Y349C 또는 L242C 및 K334C를 포함하거나 추가로 포함하며, 예를 들어 S354C는, F_{c1}과 같은 한 폴리펩티드의 F_c 도메인에 있고, Y349C는 F_{c2}와 같은 다른 폴리펩티드의 F_c 도메인에 있어서 이종이량체를 형성하며/거나 L242C 및 K334C는 같은 Fc-도메인, 하나 또는 두 폴리펩티드의 Fc1이나 Fc2에 위치하여 도메인 내 C-C 가교를 형성한다.

[0135] "정제된" 및 "분리된"이라는 것은 폴리펩티드(즉, 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질) 혹은 뉴클레오티드 서열을 칭할 때, 동일한 유형의 다른 생물학적 거대분자의 실질적인 부재 시 표시된 분자가 존재한다는 의미이다. 여기서 사용되는 "정제된"이란 용어는 특히 동일한 유형의 생물학적 거대분자가 적어도 중량으로 75%, 85%, 95% 또는 98%로 존재함을 의미한다.

[0136] 특정한 폴리펩티드를 인코딩하는 "분리된" 핵산 분자란 대상체인 폴리펩티드를 인코딩하지 않는 다른 핵산 분자

가 실질적으로 없는 핵산 분자를 지칭한다. 하지만 이 분자는 해당 조성물의 기본적 특성에 해롭게 영향을 미치지 않는 일부 추가의 염기나 모이어티를 포함할 수 있다.

[0137] "도메인"이란 서열 상동성에 기반하여 일반적으로 정의되는 단백질의 일체의 영역이며 흔히 특이적인 구조적 또는 기능적 객체와 관련이 있다.

[0138] 용어 "재조합" 분자는 재조합 수단에 의해 준비, 발현, 생성 또는 분리된 것이다.

[0139] 용어 "유전자"는 하나 이상의 효소의 전부나 부분을 포함하는 아미노산들의 특정한 서열을 코딩하거나 이에 상응하며, 또한 예를 들어 해당 유전자가 발현되는 조건을 결정하는 프로모터 서열과 같은 조절 DNA 서열을 포함하거나 하지 않을 수 있는 DNA 서열을 의미한다. 구조적 유전자가 아닌 일부 유전자는 DNA에서 RNA로 전사될 수 있지만 아미노산 서열로 번역되지 않는다. 다른 유전자는 구조적 유전자의 조절 인자로서 또는 DNA 전사의 조절 인자로서 기능할 수 있다. 특히, 유전자란 용어는 단백질을 인코딩하는 게놈 서열 즉 조절인자, 프로모터, 인트론 및 엑손 서열을 포함하는 서열을 의도할 수 있다.

[0140] "친화도"는 이론적으로는 이중특이성 항원 결합 단백질과 항원 사이의 평형 결합에 의해 정의되고, 본 발명의 맥락에서는 이중특이성 항원 결합 단백질과 그 항원 TA/MHC 또는 TA-C/MHC 또는 CD3 사이의 평형 결합에 의해 정의된다. 친화도는 예를 들어 반수 최대 유효 농도(EC_{50}) (때때로 반수 최대 결합 농도(EC_{50})로도 칭함) 또는 평형 해리 상수(K_D)로 표현될 수 있다.

[0141] "K_D"는 이중특이성 항원 결합 단백질과 그 항원 사이의 평형 해리 상수, k_{off}/k_{on}의 비율이다. K_D와 친화도는 반비례한다. K_D 값은 이중특이성 항원 결합 단백질의 농도와 관련이 있으며, K_D 값이 낮을수록 이중특이성 항원 결합 단백질의 친화도가 높아진다. 친화도, 즉 $_KD$ 값은 본 문서에서 다음에 이중특이성 '항원 결합 단백질' 섹션에 상세히 기술된 표면 플라즈몬 공명(SPR) 또는 생체층 간섭측정법(BLI)에 의한 회합 및 해리 속도 측정과 같은 다양한 알려진 방법에 의해 실험적으로 평가가 가능하다.

[0142] "EC_{50}"으로도 부르는 "반수 최대 유효 농도"란 전형적으로 특정한 노출 시간 후 기준선과 최대치 사이의 중간 반응을 유도하는 분자의 농도를 말한다. EC_{50} 및 친화도는 반비례 관계가 있으며, EC_{50} 값이 낮을수록 분자의 친화도가 더 높아진다. 한 예시에서, "EC_{50}"은 특정한 노출 시간 후 기준선과 최대치 사이의 중간의 반응을 유도하는 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질의 농도를 말하며 보다 특히 특정한 노출 시간 후 기준선과 최대치 사이의 중간의 반응을 유도하는 항원 결합 단백질의 농도를 지칭한다. EC_{50} 값은 실험 섹션의 실시예 2 및 5에서 보다 상세하게 기술된 대로, 예를 들어 IFN-감마 방출 분석이나 LDH 방출 분석을 사용하는 다양한 알려진 방법으로 실험적으로 평가할 수 있다. 본 발명의 맥락에서 EC_{50} 값은 바람직하게는 LDH 방출 분석에 의해 결정되며 따라서 유도된 세포독성을 칭한다.

[0143] 여기서 "진단 제제"는 형광성 분자, 방사성 분자 또는 신호를 (직접적으로 혹은 간접적으로) 제공하는 당업계에서 알려진 다른 모든 표지와 같은 검출 가능한 분자나 물질을 지칭한다.

[0144] "형광성 분자"는 당업계에서 알려져 있으며 플루오레세인 이소티오시안산염(FITC), 피코에리트린(PE), 청색 레이저용 형광단(예: PerCP, PE-Cy7, PE-Cy5, FL3 및 APC 또는 Cy5, FL4), 적색 보라색 또는 UV 레이저용 형광단(예: 퍼시픽 블루, 퍼시픽 오렌지)을 포함한다.

[0145] "방사성 분자"는 I^{123}, I^{124}, In^{111}, Re^{186}, Re^{188}, Tc^{99}와 같은 섬광계수법 연구를 위한 방사성 원자를 포함하지만 이로써 제한되지는 않는다. 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질은 또한 요오드-123, 인듐-111, 불소-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망간 또는 철과 같은 핵자기 공명(NMR) 영상(또는 자기 공명 영상, MRI로도 알려짐) 등 스핀 표지를 포함할 수 있다.

[0146] 그러한 진단 제제는 항원 결합 단백질에 직접적으로 결합(즉, 물리적으로 연결)될 수 있거나 간접적으로 연결될 수 있다.

[0147] "치료 제제"는 여기서 치료 효과를 가진 제제를 칭한다. 한 구현 예에서, 그러한 치료 제제란 세포독성 제제나 방사성 동위원소와 같은 성장 억제제일 수 있다.

[0148] "성장 억제제" 또는 "항증식성 제제"는 차별없이 사용이 가능하며, 세포 특히 종양 세포의 *시험관 내* 또는 *생체*

내 성장을 억제하는 화합물이나 조성물을 지칭한다.

[0149] 여기서 사용되는 "세포 독성 제제"란 용어는 세포의 기능을 억제 또는 방지하며/거나 세포의 파괴를 야기하는 물질을 말한다. "세포 독성 제제"란 용어는 화학요법 제제, 효소, 항생제, 그리고 세균, 균류, 식물 또는 동물 기원의 소분자 독소나 효소적으로 활성적 독소(그 단편 및/또는 변이체 포함) 그리고 다음에 기술된 다양한 항종양 또는 항암 제제를 포함하도록 의도된다. 일부 구현예에서, 세포독성 제제는 변독소, 일일초, 탁산, 메이탄시노이드 또는 DM1이나 DM4와 같은 메이탄시노이드 유사체, 작은 약물, 토마이마이신 또는 피롤로벤조디아제핀 유도체, 크립토피신 유도체, 렙토마이신 유도체, 오리스타틴이나 돌라스타틴 유사체, 전구약물, 토포이소머라제 II 억제제, DNA 알킬화 제제, 항튜블린 제제, CC-1065 또는 CC-1065 유사체이다.

[0150] "방사선 동위원소"란 용어는 At^{211}, Bi^{212}, Er^{169}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, In^{111}, P^{32}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Sr^{89} 및 Lu의 방사성 동위원소를 포함하도록 의도된다. 그러한 동위원소는 일반적으로 주로 베타 방사선을 방출한다. 한 구현예에서 방사성 동위원소는 알파 방출제 동위원소, 보다 정확하게는 알파 방사선을 방출하는 토륨 227이다.

[0151] 이 문서에서 "PK 변형 모이어티"는 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질의 약동학(PK)을 변형시키는 모이어티를 말한다. 따라서, 이 모이어티는 특히 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질의 생체 내 반감기 및 분포를 변형시킨다. 바람직한 구현예에서, PK를 변경시키는 모이어티는 이중특이성 항원 결합 단백질의 반감기를 증가시킨다. PK 변경 모이어티의 예는 다음을 포함하지만 이로써 제한되지는 않는다: PEG(Dozier *et al.*, (2015) Int J Mol Sci. Oct 28;16(10):25831-64 and Jevsevar *et al.*, (2010) Biotechnol J.Jan;5(1):113-28), PASylation (Schlapschy *et al.*, (2013) Protein Eng Des Sel. Aug;26(8):489-501), 알부민(Dennis *et al.*, (2002) J Biol Chem. Sep 20;277(38):35035-43), 항체의 F_c 부분 및/또는 비구조적 폴리펩티드(Schellenberger *et al.*, (2009) Nat Biotechnol. Dec; 27(12):1186-90).

[0152] **이중특이성 항원 결합 단백질**

[0153] 본 발명의 발명자들은 실시예 1에서 공개된 대로 마우스 단클론성 항체 항-CD3 항체 UCHT1의 인간화에 의해 인간화된 단클론성 항체 UCHT1(V17)을 얻었다. 초래된 인간화 단클론성 항체 UCHT1(V17)은 당업계에서 이미 알려진 UCHT1(V9)에 비해 증가된 안정성 및/또는 증가된 용해성을 가진다.

[0154] 그 다음 본 발명자들은 원리 증명 실험으로 실시예 2에서, 성숙화된 TCR 가변 도메인과 조합하여 그 표적(BMA31 표적화 TCRαβ 등)에 대해 중간 정도의 친화도를 가진 T세포 모집 항체의 가변 도메인을 사용할 때, 초래되는 이중특이성 항원 결합 단백질은 동일한 TCR 가변 도메인과 관련하여 고친화도 항-CD3 항체(UCHT1(V17) 등)를 사용하는 항원 결합 단백질보다 훨씬 더 넓은 안전성 범위를 가짐을 잘 보여주었다.

[0155] 이러한 새로운 항원 결합 단백질, 특히 TCER® 분자의 형태의 항원 결합 단백질은 종양 세포에 대해 높은 세포독성을 보인다. 예를 들어, TCER® 분자 형태의 새로운 항원 결합 단백질에 있어서 NCI-H1755, Hs695T 세포 및 U2OS 최대 반수 유효 농도(EC_{50})는 1 pM ~ 100 pM의 범위에 있고 보다 특히 세포에 대해 1 pM ~20 pM에 있으며, 본 발명의 항원 결합 단백질의 병변 세포에 대한 EC_{50}은 따라서 종양 세포주 Hs695T 대 일차 세포와 같이 정상 조직 세포의 세포에 대해 얻어지는 EC_{50}에 비해 1000배 넘게 더 낮으므로, 높은 안전성을 입증한다.

[0156] 그러므로 본 발명자들은 고친화도 항-CD3 항체 UCHT1(V17)의 중간 친화도 변이체들(V20, V21, V23, V17opt, V20opt, V21opt 및 V23opt)을 생성했으며, 그리하여 유익한 안전성 범위를 갖는 이중특이성 항체를 얻기 위해 TCR 가변 도메인과 조합하여 사용하는 데 적합한 다양한 T세포 모집 가변 도메인을 생성했다.

[0157] 따라서, 본 발명은 적어도 2개의 항원 결합 부위(A 및 B)를 포함하는 이중특이성 항원 결합 단백질에 대한 것으로, 항원 결합 부위 A가 CD3, 바람직하게는 CD3ε/δ-복합체에 결합하며, 항원 결합 부위 B가 표적 항원성(TA) 펩티드/MHC 복합체, 바람직하게는 TAA 항원 펩티드/MHC에 결합하며, 항원 결합 부위 A가 중쇄 가변 도메인(V_H) 및 경쇄 가변 도메인(V_L)을 포함하며, 그리고

[0158] a) 상기 V_L은 3개의 상보성 결정 영역(CDR)인 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3을 포함하며,

[0159] - CDRb1은 서열 식별 번호 1의 아미노산 서열 'RASQDIRNYLN'을 포함하거나 이로써 구성되며,

[0160] - CDRb2는 서열 식별 번호 2의 아미노산 서열 'YTSRLHS'를 포함하거나 이로써 구성되며,

[0161] - CDRb3은 서열 식별 번호 3의 아미노산 서열 ''QQGQTLPWT'를 포함하거나 이로써 구성되며,

[0162] b) 상기 V_H는 3개의 상보성 결정 영역(CDR)인 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3을 포함하며,

[0163] - CDRH1은 서열 식별 번호 4의 아미노산 서열 'X_1YTMN'을 포함하거나 이로써 구성되며, X_1이 G 또는 E, 바람직하게는 G이며,

[0164] - CDRH2는 서열 식별 번호 5의 아미노산 서열 'LINPX$_2$X$_3$GVX$_4$TYAQKX$_5$QX$_6$'을 포함하거나 이로써 구성되며, X_2는 일체의 아미노산, 바람직하게는 Q, Y 또는 E, 보다 바람직하게는 Q와 같은 Q 또는 Y이며, 그리고 X_3은 일체의 아미노산, 바람직하게는 R, K 또는 E, 보다 바람직하게는 K와 같은 R 또는 K이며, 그리고 X_4 는 일체의 아미노산, 바람직하게는 S 또는 T, 보다 바람직하게는 S이며, 그리고 X_5는 F 또는 V, 보다 바람직하게는 F이며, 그리고 X_6은 일체의 아미노산, 바람직하게는 G 또는 D, 보다 바람직하게는 D이며, 그리고

[0165] - CDRH3은 서열 식별 번호 6인 아미노산 서열 'SGYYGX$_7$SWYFDV'를 포함하거나 이로써 구성되며, X_7은 일체의 아미노산, 바람직하게는 E 또는 D, 보다 바람직하게는 D이다.

[0166] 한 구현예에서, CDRH2가 서열 식별 번호 7의 아미노산 서열 'LINPYKGVSTYAQKFQD'를 포함하거나 이로써 구성되며, CDRH3이 서열 식별 번호 8의 아미노산 서열 'SGYYGDSDWYFDV'를 포함하거나 이로써 구성될 때, CDRH1의 X_1이 E이다.

[0167] 한 구현예에서, 상기 V_H는 CDRH1이 서열 식별 번호 133을 포함하거나 이로써 구성되지 않으며, CDRH2가 서열 식별 번호 7을 포함하거나 이로써 구성되지 않으며, CDRH3이 서열 식별 번호 8을 포함하거나 이로써 구성되지 않는다는 조건 하에 서열 식별 번호 4에 따른 CDRH1, 서열 식별 번호 5에 따른 CDRH2 및 서열 식별 번호 7에 따른 CDRH3을 포함한다.

[0168] 한 특별한 구현예에서, 본 발명은 적어도 2개의 항원 결합 부위(A 및 B)를 포함하는 이중특이성 항원 결합 단백질에 대한 것으로, 항원 결합 부위 A가 CD3, 바람직하게는 CD3ε/δ-복합체에 결합하며, 항원 결합 부위 B가 표적 항원성(TA) 펩티드/MHC 복합체, 바람직하게는 TAA 항원성 펩티드/MHC에 결합하며, 항원 결합 부위 A가 중쇄 가변 도메인(V_H) 및 경쇄 가변 도메인(V_L)을 포함하며, 그리고

[0169] a) 상기 V_L은 3개의 상보성 결정 영역(CDR)인 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3을 포함하며,

[0170] - CDRb1은 서열 식별 번호 1의 아미노산 서열 'RASQDIRNYLN'을 포함하거나 이로써 구성되며,

[0171] - CDRb2는 서열 식별 번호 2의 아미노산 서열 'YTSRLHS'를 포함하거나 이로써 구성되며,

[0172] - CDRb3은 서열 식별 번호 3의 아미노산 서열 ''QQGQTLPWT'를 포함하거나 이로써 구성되며,

[0173] b) 상기 V_H는 3개의 상보성 결정 영역(CDR)인 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3을 포함하며,

[0174] - CDRH1은 서열 식별 번호 133의 아미노산 서열 'GYTMN' 또는 서열 식별 번호 134의 'EYTMN' 바람직하게는 서열 식별 번호 133의 GYTMN 또는 선택적으로 서열 식별 번호 133이나 134와 적어도 1개의 아미노산 치환이, 바람직하게는 1개나 2개의 아미노산 치환이 또는 단 1개의 아미노산 치환이 다른 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 바람직하게는 서열 식별 번호 133이나 134와 다른 아미노산 서열이 31G 또는 31E를 포함하며,

[0175] - CDRH2는 서열 식별 번호 135 ~ 142의 아미노산 서열로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 선택적으로 서열 식별 번호 133이나 134 와 적어도 1개의 아미노산 치환이, 바람직하게는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환이, 바람직하게는 1개나 2개의 아미노산 치환이, 또는 단 1개의 아미노산 치환이 다른 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 바람직하게는 서열 식별 번호 133이나 134와 다른 아미노산 서열이 아미노산 61A 그리고 선택적으로 적어도 1개의 아미노산 54Q, 54E나 54Y, 55R이나 55E, 58S나 58T, 64F나 64V, 65Q, 66D나 66G, 바람직하게는 66D를 포함하며, 그리고

[0176] - CDRH3은 서열 식별 번호 8이나 144의 아미노산 서열 또는 선택적으로 서열 식별 번호 8이나 144와 적어도 1개의 아미노산 치환이, 바람직하게는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환이, 바람직하게는 1개나 2개의 아미노산 치환이, 또는 단 1개의 아미노산 치환이 다른 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 바람직하게는 서열 식별 번호 8이나 134와 다른 아미노산 서열이 아미노산 104E를 포함한다.

[0177] 본 발명은 또한 본 발명의 맥락에서 공개되는 CDR 아미노산 서열의 변이체, 전형적으로 CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 및/또는 CDRH3의 변이체를 포함하는 항원 결합 단백질에 관한 것으로, 그러한 변이체는 4개, 3개 2개 또는 1개와 같은 적어도 1개, 바람직하게는 1개, 2개 또는 3개의 아미노산 치환을 포함할 수 있으며, 바람직한 수의 아미노산 치환은 바람직하게는 해당 CDR의 길이에 의존한다.

[0178] 일부 구현예에서, CDRL1은 본 문서에서 공개된 CDRL1 아미노산 서열과 적어도 1개의 아미노산 치환, 바람직하게는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환, 바람직하게는 1개, 2개, 또는 3개의 아미노산 치환, 바람직하게는 1개의 아미노산 치환과 같은 1개 또는 2개의 아미노산 치환이 다른 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 상기 아미노산 치환은 바람직하게는 아미노산 위치 27, 28, 30 및 31에 있다.

[0179] 일부 구현예에서, CDRL2는 본 문서에서 공개된 CDRL2 아미노산 서열과 적어도 1개의 아미노산 치환, 바람직하게는 1개, 2개 또는 3개의 아미노산 치환, 바람직하게는 1개의 아미노산 치환과 같은 1개 또는 2개의 아미노산 치환이 다른 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 상기 아미노산 치환은 바람직하게는 위치 51, 52 및 53에 있다.

[0180] 일부 구현예에서, CDRL3은 본 문서에서 공개된 CDRL3 아미노산 서열과 적어도 1개의 아미노산 치환, 바람직하게는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환, 바람직하게는 1개의 아미노산 치환과 같은 1개 또는 2개의 아미노산 치환이 다른 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 상기 아미노산 치환은 바람직하게는 아미노산 위치 93, 94 및 95 중 어느 한 아미노산 위치에 있다.

[0181] 바람직한 구현예에서, 변이가 항원 결합 부위 A의 중쇄 가변 도메인의 CDR에서 발생할 수 있다.

[0182] 따라서, 일부 구현예에서, CDRH1은 본 문서에서 공개된 CDRH1 아미노산 서열과 적어도 1개의 아미노산 치환, 바람직하게는 1개, 2개 또는 3개의 아미노산 치환, 바람직하게는 1개의 아미노산 치환이 다른 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 상기 아미노산 치환은 바람직하게는 위치 31 ~ 35 중 어느 하나에 있다.

[0183] 일부 구현예에서, CDRH2는 본 문서에서 공개된 CDRH2 아미노산 서열과 적어도 1개의 아미노산 치환, 바람직하게는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환, 바람직하게는 1개, 2개, 또는 3개의 아미노산 치환, 바람직하게는 1개의 아미노산 치환과 같은 1개 또는 2개의 아미노산 치환이 다른 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 상기 아미노산 치환은 바람직하게는 아미노산 위치 54, 55 및 57 ~ 59 중 어느한 아미노산 위치에 있다.

[0184] 일부 구현예에서, CDRH3은 본 문서에서 공개된 CDRH3 아미노산 서열과 적어도 1개의 아미노산 치환, 바람직하게는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환, 바람직하게는 1개, 2개, 또는 3개의 아미노산 치환, 바람직하게는 1개의 아미노산 치환과 같은 1개 또는 2개의 아미노산 치환이 다른 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 상기 아미노산 치환은 바람직하게는 아미노산 위치 105, 107 및 110 중 어느 한 아미노산 위치에 있다.

[0185] 한 바람직한 구현예에서, 경쇄 가변 도메인 및 중쇄 가변 도메인은 경쇄 및 중쇄 구조틀 영역을 추가로 포함한다.

[0186] 한 구현예에서, 상기 경쇄 가변 도메인은 또한 하나 이상의 구조틀 영역, 바람직하게는 FR1-L, FR2-L, FR3-L 및 FR4-L로 구성되는 군으로부터 선택되는 FR1-L, FR2-L, FR3-L 및 FR4-L를 포함하며,

[0187] - FR1-L은 서열 식별 번호 11의 아미노산 서열 'DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC' 또는 서열 식별 번호 11에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 11에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 바람직하게는 아미노산 6Q 및/또는 23C를 포함하며,

[0188] - FR2-L은 서열 식별 번호 12의 아미노산 서열 'WYQQKPGKAPKLLIY' 또는 서열 식별 번호 13의 'WYQQKPGKAVKLLIY', 바람직하게는 서열 식별 번호 12 또는 서열 식별 번호 12나 13에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 12나 13에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 아미노산 35W, 36Y, 38Q, 44P, 46L 및/또는 49Y를 포함하며,

[0189] - FR3-L은 서열 식별 번호 14의 아미노산 서열 'GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYFC' 또는 서열 식별 번호 14에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 14에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 아미노산 57G, 59P, 62F, 64G, 66G, 71Y, 82D, 86Y, 87F, 88C를 포함하며,

[0190] - FR4-L은 서열 식별 번호 15의 아미노산 서열 'FGQGTKVEIKR' 또는 서열 식별 번호 15에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 15에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산은 바람직하

게는 아미노산 98F 및/또는 101G를 포함하며,

[0191] VH는 FR1-H, FR2-H, FR3-H 및 FR4-H로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 구조틀 영역을 추가로 포함하며,

[0192] - FR1-H는 서열 식별 번호 16의 'EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT'의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 16에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 16에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 아미노산 6Q, 14P, 22C, 24A, 26G, 27Y, 28S, 29F 및/또는 30T을 포함하며, 선택적으로 적어도 하나의 아미노산 치환 Q5V, P9A, L11V, V12K, M18V 및/또는 I20V를 포함하며,

[0193] - FR2-H는 서열 식별 번호 17의 'WVRQAPGQGLEWMG'의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 17에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 17에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 36W, 37V, 39Q, 45L, 46E 및/또는 47W를 포함하며, 선택적으로 적어도 하나의 아미노산 치환 K38R, S40A, H41P, K43Q, N44G를 포함하며,

[0194] - FR3-H는 서열 식별 번호 18의 'RVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR'의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 18에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 18에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 아미노산 70L, 72V, 79A, 90D, 94Y, 95Y, 96C, 97A 및/또는 98R을 포함하며, 선택적으로 적어도 하나의 아미노산 치환 K67R, A68V, K74T, S76T, L84S, T87R 및/또는 S91T를 포함하며, 그리고

[0195] - FR4-H는 서열 식별 번호 19의 'WGQGTLVTVSS'의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 19에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 19에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 112W, 113G, 115G을 포함하며, 선택적으로 아미노산 치환 A114Q 및/또는 T117L의 적어도 하나를 포함한다.

[0196] 다른 구현예에서, 상기 경쇄 가변 도메인은 또한 하나 이상의 구조틀 영역, 바람직하게는 FR1-L, FR2-L, FR3-L 및 FR4-L로 구성되는 군으로부터 선택되는 FR1-L, FR2-L, FR3-L 및 FR4-L을 포함하며,

[0197] - FR1-L은 서열 식별 번호 11의 아미노산 서열 'DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC' 또는 서열 식별 번호 11에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 11에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 바람직하게는 아미노산 6Q 및/또는 23C를 포함하며,

[0198] - FR2-L은 서열 식별 번호 12의 아미노산 서열 'WYQQKPGKAPKLLIY' 또는 서열 식별 번호 13의 'WYQQKPGKAVKLLIY', 바람직하게는 서열 식별 번호 12 또는 서열 식별 번호 12나 13에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 12나 13에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 아미노산 35W, 36Y, 38Q, 44P, 46L 및/또는 49Y를 포함하며,

[0199] - FR3-L은 서열 식별 번호 14의 아미노산 서열 'GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYFC' 또는 서열 식별 번호 14에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 14에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 아미노산 57G, 59P, 62F, 64G, 66G, 71Y, 82D, 86Y, 87F, 88C를 포함하며,

[0200] - FR4-L은 서열 식별 번호 285의 아미노산 서열 'FGQGTKVEIK' 또는 서열 식별 번호 15에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 15에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산은 바람직하게는 아미노산 98F 및/또는 101G를 포함하며,

[0201] VH는 FR1-H, FR2-H, FR3-H 및 FR4-H로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 구조틀 영역을 추가로 포함하며,

[0202] - FR1-H는 서열 식별 번호 16의 'EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT'의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 16에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 16에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 아미노산 6Q, 14P, 22C, 24A, 26G, 27Y, 28S, 29F 및/또는 30T을 포함하며, 선택적으로 적어도 하나의 아미노산 치환 Q5V, P9A, L11V, V12K, M18V 및/또는 I20V를 포함하며,

[0203] - FR2-H는 서열 식별 번호 17의 'WVRQAPGQGLEWMG'의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 17에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 17에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 36W, 37V, 39Q, 45L, 46E 및/또는 47W를 포함하며, 선택적으로 적어도 하나의 아미노산 치

환 K38R, S40A, H41P, K43Q, N44G를 포함하며,

[0204] - FR3-H는 서열 식별 번호 18의 'RVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR'의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 18에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 18에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 아미노산 70L, 72V, 79A, 90D, 94Y, 95Y, 96C, 97A 및/또는 98R을 포함하며, 선택적으로 적어도 하나의 아미노산 치환 K67R, A68V, K74T, S76T, L84S, T87R 및/또는 S91T를 포함하며, 그리고

[0205] - FR4-H는 서열 식별 번호 19의 'WGQGTLVTVSS'의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 19에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 19에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 112W, 113G, 115G을 포함하며, 선택적으로 아미노산 치환 A114Q 및/또는 T117L의 적어도 하나를 포함한다.

[0206] 다른 구현예에서, 상기 경쇄 가변 도메인은 또한 하나 이상의 구조틀 영역, 바람직하게는 FR1-L, FR2-L, FR3-L 및 FR4-L로 구성되는 군으로부터 선택되는 FR1-L, FR2-L, FR3-L 및 FR4-L을 포함하며,

[0207] - FR1-L은 서열 식별 번호 11의 아미노산 서열 'DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC' 또는 서열 식별 번호 11에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 11에 대해 적어도 90% 동일한 상기 아미노산 서열은 바람직하게는 아미노산 6Q 및/또는 23C를 포함하며,

[0208] - FR2-L은 서열 식별 번호 12의 아미노산 서열 'WYQQKPGKAPKLLIY' 또는 서열 식별 번호 13의 'WYQQKPGKAVKLLIY', 바람직하게는 서열 식별 번호 12 또는 서열 식별 번호 12나 13에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 12나 13에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 아미노산 35W, 36Y, 38Q, 44P, 46L 및/또는 49Y를 포함하며,

[0209] - FR3-L은 서열 식별 번호 14의 아미노산 서열 'GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYFC' 또는 서열 식별 번호 14에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 14에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 아미노산 57G, 59P, 62F, 64G, 66G, 71Y, 82D, 86Y, 87F, 88C를 포함하며,

[0210] - FR4-L은 서열 식별 번호 285의 아미노산 서열 'FGQGTKVEIK' 또는 서열 식별 번호 15에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 15에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산은 바람직하게는 아미노산 98F 및/또는 101G를 포함하며,

[0211] VH는 FR1-H, FR2-H, FR3-H 및 FR4-H로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 구조틀 영역을 추가로 포함하며,

[0212] - FR1-H는 서열 식별 번호 16의 'EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT'의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 16에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 16에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 아미노산 6Q, 14P, 22C, 24A, 26G, 27Y, 28S, 29F 및/또는 30T를 포함하며, 선택적으로 적어도 하나의 아미노산 치환 Q5V, P9A, L11V, V12K, M18V 및/또는 I20V를 포함하며,

[0213] - FR2-H는 서열 식별 번호 17의 아미노산 서열 'WVRQAPGQGLEWMG' 또는 서열 식별 번호 17에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 17에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 36W, 37V, 39Q, 45L, 46E 및/또는 47W를 포함하며, 선택적으로 아미노산 치환 K38R, S40A, H41P, K43Q, N44G의 적어도 하나를 포함하며,

[0214] - FR3-H는 서열 식별 번호 18의 'RVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR'의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 18에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 18에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 아미노산 70L, 72V, 79A, 90D, 94Y, 95Y, 96C, 97A 및/또는 98R을 포함하며, 선택적으로 적어도 하나의 아미노산 치환 K67R, A68V, K74T, S76T, L84S, T87R 및/또는 S91T를 포함하며, 그리고

[0215] - FR4-H는 서열 식별 번호 19의 'WGQGTLVTVSS'의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 19에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 19에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 112W, 113G, 115G를 포함하며, 선택적으로 아미노산 치환 A114Q 및/또는 T117L의 적어도 하나를 포함한다.

[0216] 다른 구현예에서, 상기 경쇄 가변 도메인은 또한 하나 이상의 구조틀 영역, 바람직하게는 FR1-L, FR2-L, FR3-L 및 FR4-L로 구성되는 군으로부터 선택되는 FR1-L, FR2-L, FR3-L 및 FR4-L을 포함하며,

[0217] - FR1-L은 서열 식별 번호 11의 아미노산 서열 'DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC' 또는 서열 식별 번호 11에 대해 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 11에 대해 적어도 95% 동일한 상기 아미노산 서열은 바람직하게는 아미노산 6Q 및/또는 23C를 포함하며,

[0218] - FR2-L은 서열 식별 번호 12의 아미노산 서열 'WYQQKPGKAPKLLIY' 또는 서열 식별 번호 13의 'WYQQKPGKAVKLLIY', 바람직하게는 서열 식별 번호 12 또는 서열 식별 번호 12나 13에 대해 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 12나 13에 대해 적어도 95% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 아미노산 35W, 36Y, 38Q, 44P, 46L 및/또는 49Y를 포함하며,

[0219] - FR3-L은 서열 식별 번호 14의 아미노산 서열 'GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYFC' 또는 서열 식별 번호 14에 대해 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 14에 대해 적어도 95% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 아미노산 57G, 59P, 62F, 64G, 66G, 71Y, 82D, 86Y, 87F, 88C를 포함하며,

[0220] - FR4-L은 서열 식별 번호 285의 아미노산 서열 'FGQGTKVEIK' 또는 서열 식별 번호 15에 대해 적어도 95% 동일한 아미노산을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 15에 대해 적어도 95% 동일한 아미노산이 바람직하게는 아미노산 98F 및/또는 101G를 포함하며,

[0221] VH는 FR1-H, FR2-H, FR3-H 및 FR4-H로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 구조틀 영역을 추가로 포함하며,

[0222] - FR1-H는 서열 식별 번호 16의 'EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT'의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 16에 대해 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 16에 대해 적어도 95% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 아미노산 6Q, 14P, 22C, 24A, 26G, 27Y, 28S, 29F 및/또는 30T를 포함하며, 선택적으로 적어도 하나의 아미노산 치환 Q5V, P9A, L11V, V12K, M18V 및/또는 I20V를 포함하며,

[0223] - FR2-H는 서열 식별 번호 17의 'WVRQAPGQGLEWMG'의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 17에 대해 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 17에 대해 적어도 95% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 36W, 37V, 39Q, 45L, 46E 및/또는 47W을 포함하며, 선택적으로 적어도 하나의 아미노산 치환 K38R, S40A, H41P, K43Q, N44G를 포함하며,

[0224] - FR3-H는 서열 식별 번호 18의 'RVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR'의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 18에 대해 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 18에 대해 적어도 95% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 아미노산 70L, 72V, 79A, 90D, 94Y, 95Y, 96C, 97A 및/또는 98R을 포함하며, 선택적으로 적어도 하나의 아미노산 치환 K67R, A68V, K74T, S76T, L84S, T87R 및/또는 S91T를 포함하며, 그리고

[0225] - FR4-H는 서열식별 번호 19의 'WGQGTLVTVSS'의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 19에 대해 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 19에 대해 적어도 95% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 112W, 113G, 115G를 포함하며, 선택적으로 아미노산 치환 A114Q 및/또는 T117L의 적어도 하나를 포함한다.

[0226] FR2-L의 아미노산 35W, 36Y, 46L 및 49Y 그리고 FR3-L의 아미노산 64G, 71Y이 본 발명자들에 의해 버니어 영역(Vernier Zone)에 위치하는 것으로 파악되었으며 바람직하게는 치환되어 있지 않다.

[0227] FR-1H의 아미노산 27Y, 28S, 29F 및 30T 그리고 FR2-H의 아미노산 47W, FR3-H의 아미노산 70L, 72V, 79A, 97A 및 98R 그리고 FR4-H 의 112W가 본 발명자들에 의해 버니어 영역에 위치하는 것으로 파악되었으며 바람직하게는 치환되어 있지 않다.

[0228] 본 문서에서 기술된 항원 결합 단백질의 변이체는 본 문서에서 위의 정의 섹션에서 정의된 참조 서열에 대해 "적어도 85% 동일한"이라는 문구를 사용하여 고려되고 명시적으로 지칭한다. 예를 들어, 서열 FR1-L, FR2-L, FR3-L 및 FR4-L 그리고 FR1-H, FR2-H, FR3-H 및 FR4-H는 참조 서열인 서열 식별 번호 11 ~ 서열 식별 번호 19의 적절한 대로 적어도 1개의 아미노산 치환, 특히 적어도 하나의 보존적 아미노산 치환 및/또는 정규 잔기의 치환이 다를 수 있다. 특히, 경쇄 및 중쇄 가변 도메인의 서열 FR1-L, FR2-L, FR3-L 및 FR4-L 그리고 FR1-H, FR2-H, FR3-H 및 FR4-H는 참조 서열인 서열 식별 번호 11 ~ 서열 식별 번호 19의 참조 서열과 보존적 아미노산

치환만이 다를 수 있다.

[0229] 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질의 아미노산 서열에 대한 그리고 상응하는 DNA 서열에 대한 변형 및 변경이 이루어질 수 있으며, 여전히 바람직한 특성을 가진 기능성 항원 결합 단백질이나 폴리펩티드를 초래할 수 있다. 변형은 항원 결합 부위 A의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인에서 또는 항원 결합 부위 B의 알파 및 베타 또는 감마 및 델타 가변 도메인에서, 특히 항원 결합 부위 A의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인에 구성된 구조틀 영역이나 또는 각 CDR이나 모든 CDR에서 또는 알파 및 베타 또는 감마 및 델타 가변 도메인에 구성된 구조틀 영역이나 또는 각 CDR에서 또는 모든 CDR에서 이루어질 수 있다.

[0230] 이중특이성 항원 결합 단백질은 FR2-L을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있으며, 이 FR2-L의 아미노산 서열은 서열 식별 번호 12나 13에 대해 적어도 85% 동일하며 아미노산 44P를 포함한다. 이 아미노산 44P(인간 배자계열 서열 Vk1-018에서 발견됨)는 인간화된 가변 도메인에 대한 탈면역화의 이점을 가지는 데, 10개의 가장 유사한 인간 배자계열에서 이 위치에 프롤린이 흔하기 때문이다.

[0231] 이 문서에서 "탈면역화"란 면역원성, 즉 시험체에서 면역 반응을 유도하는 능력의 감소를 지칭한다. 이것은 인간 배자계열에서 가장 흔한 아미노산에 의한 아미노산의 치환에 의해 수행되므로 면역계에 의해 외부로 인식되지 않는다.

[0232] 따라서, 한 구현예에서, 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질의 맥락에서 항원 결합 부위 A는 중쇄 가변 도메인(V_H) 및 중쇄 가변 도메인(V_L)을 포함하며,

[0233] 상기 V_L은 서열 식별 번호 145의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 145에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 145의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 바람직하게는 서열 식별 번호 1의 CDRL1, 서열 식별 번호 2의 CDRL2 및 서열 식별 번호 3의 CDRL3을 포함하며, 그리고

[0234] 상기 V_H는 서열 식별 번호 149 ~ 서열 식별 번호 160의 아미노산 서열로부터 선택되는 아미노산 서열의 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 149 ~ 서열 식별 번호 160의 아미노산 서열로 구성되는 아미노산 서열이 군으로부터 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 그리고 바람직하게는 서열 식별 번호 149의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산은 서열 식별 번호 133의 CDRH1, 서열 식별 번호 138의 CDRH2 및 서열 식별 번호 8의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함하며, 그리고

[0235] 바람직하게는, 서열 식별 번호 150의 아미노산에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 서열 식별 번호 133의 CDRH1, 서열 식별 번호 139의 CDRH2 및 서열 식별 번호 8의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함하며, 그리고

[0236] 바람직하게는, 서열 식별 번호 151의 아미노산에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 서열 식별 번호 134의 CDRH1, 서열 식별 번호 138의 CDRH2 및 서열 식별 번호 8의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함하며, 그리고

[0237] 바람직하게는, 서열 식별 번호 152의 아미노산에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 서열 식별 번호 133의 CDRH1, 서열 식별 번호 140의 CDRH2 및 서열 식별 번호 8의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함하며, 그리고

[0238] 바람직하게는, 서열 식별 번호 153의 아미노산에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 서열 식별 번호 133의 CDRH1, 서열 식별 번호 141의 CDRH2 및 서열 식별 번호 8의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함하며, 그리고

[0239] 바람직하게는, 서열 식별 번호 154의 아미노산에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 서열 식별 번호 133의 CDRH1, 서열 식별 번호 142의 CDRH2 및 서열 식별 번호 8의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함하며, 그리고

[0240] 바람직하게는, 서열 식별 번호 155의 아미노산에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 서열 식별 번호 134의 CDRH1, 서열 식별 번호 142의 CDRH2 및 서열 식별 번호 8의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함하며, 그리고

[0241] 바람직하게는, 서열 식별 번호 156의 아미노산에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 서열 식별 번호 133의 CDRH1, 서열 식별 번호 7의 CDRH2 및 서열 식별 번호 144의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함하며, 그리고

[0242] 바람직하게는, 서열 식별 번호 157의 아미노산에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 서열 식별 번호 133의 CDRH1, 서열 식별 번호 138의 CDRH2 및 서열 식별 번호 144의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함하며, 그리고

[0243] 바람직하게는, 서열 식별 번호 158의 아미노산에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 서열 식별 번호

134의 CDRH1, 서열 식별 번호 7의 CDRH2 및 서열 식별 번호 8의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함하며, 그리고

[0244] 바람직하게는, 서열 식별 번호 159의 아미노산에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 서열 식별 번호 134의 CDRH1, 서열 식별 번호 7의 CDRH2 및 서열 식별 번호 144의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함하며, 그리고

[0245] 바람직하게는, 서열 식별 번호 160의 아미노산에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 서열 식별 번호 134의 CDRH1, 서열 식별 번호 138의 CDRH2 및 서열 식별 번호 144의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함한다.

[0246] 따라서, 한 구현예에서, 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질의 맥락에서 항원 결합 부위 A는 중쇄 가변 도메인(V_H) 및 중쇄 가변 도메인(V_L)을 포함하며,

[0247] 상기 V_L은 서열 식별 번호 286의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 286에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 286의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 바람직하게는 서열 식별 번호 1의 CDRL1, 서열 식별 번호 2의 CDRL2 및 서열 식별 번호 3의 CDRL3을 포함하며, 그리고

[0248] 상기 V_H는 서열 식별 번호 149 ~ 서열 식별 번호 160의 아미노산 서열로부터 선택되는 아미노산 서열의 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 149 ~ 서열 식별 번호 160의 아미노산 서열로 구성되는 아미노산 서열의 군으로부터 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 그리고 바람직하게는 서열 식별 번호 149의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산은 서열 식별 번호 133의 CDRH1, 서열 식별 번호 138의 CDRH2 및 서열 식별 번호 8의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함하며, 그리고

[0249] 바람직하게는, 서열 식별 번호 150의 아미노산에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 서열 식별 번호 133의 CDRH1, 서열 식별 번호 139의 CDRH2 및 서열 식별 번호 8의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함하며, 그리고

[0250] 바람직하게는, 서열 식별 번호 151의 아미노산에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 서열 식별 번호 134의 CDRH1, 서열 식별 번호 138의 CDRH2 및 서열 식별 번호 8의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함하며, 그리고

[0251] 바람직하게는, 서열 식별 번호 152의 아미노산에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 서열 식별 번호 133의 CDRH1, 서열 식별 번호 140의 CDRH2 및 서열 식별 번호 8의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함하며, 그리고

[0252] 바람직하게는, 서열 식별 번호 153의 아미노산에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 서열 식별 번호 133의 CDRH1, 서열 식별 번호 141의 CDRH2 및 서열 식별 번호 8의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함하며, 그리고

[0253] 바람직하게는, 서열 식별 번호 154의 아미노산에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 서열 식별 번호 133의 CDRH1, 서열 식별 번호 142의 CDRH2 및 서열 식별 번호 8의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함하며, 그리고

[0254] 바람직하게는, 서열 식별 번호 155의 아미노산에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 서열 식별 번호 134의 CDRH1, 서열 식별 번호 142의 CDRH2 및 서열 식별 번호 8의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함하며, 그리고

[0255] 바람직하게는, 서열 식별 번호 156의 아미노산에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 서열 식별 번호 133의 CDRH1, 서열 식별 번호 7의 CDRH2 및 서열 식별 번호 144의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함하며, 그리고

[0256] 바람직하게는, 서열 식별 번호 157의 아미노산에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 서열 식별 번호 133의 CDRH1, 서열 식별 번호 138의 CDRH2 및 서열 식별 번호 144의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함하며, 그리고

[0257] 바람직하게는, 서열 식별 번호 158의 아미노산에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 서열 식별 번호 134의 CDRH1, 서열 식별 번호 7의 CDRH2 및 서열 식별 번호 8의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함하며, 그리고

[0258] 바람직하게는, 서열 식별 번호 159의 아미노산에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 서열 식별 번호 134의 CDRH1, 서열 식별 번호 7의 CDRH2 및 서열 식별 번호 144의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함하며, 그리고

[0259] 바람직하게는, 서열 식별 번호 160의 아미노산에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 서열 식별 번호 134의 CDRH1, 서열 식별 번호 138의 CDRH2 및 서열 식별 번호 144의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함한다.

[0260] 한 바람직한 구현예에서, 상기 V_L은 서열 식별 번호 286의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 286에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 286의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 바람직하게는 서열 식별 번호 1의 CDRL1, 서열 식별 번호 2의 CDRL2 및 서

열 식별 번호 3의 CDRL3의 아미노산을 포함하며, 그리고

[0261] 상기 V_H는 서열 식별 번호 156의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 156에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 156의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 서열 식별 번호 133의 CDRH1, 서열 식별 번호 7의 CDRH2 및 서열 식별 번호 144의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함하며, 또는

[0262] 상기 V_H은 서열 식별 번호 149의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 149에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 149의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 서열 식별 번호 133의 CDRH1, 서열 식별 번호 138의 CDRH2 및 서열 식별 번호 8의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함하며, 또는

[0263] 상기 V_H은 서열 식별 번호 151의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 151에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 151의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 서열 식별 번호 134의 CDRH1, 서열 식별 번호 138의 CDRH2 및 서열 식별 번호 8의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함한다.

[0264] 한 바람직한 구현예에서, 상기 V_L은 서열 식별 번호 286의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 286에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 286의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일한 상기 아미노산 서열은 바람직하게는 서열 식별 번호 1의 CDRL1, 서열 식별 번호 2의 CDRL2 및 서열 식별 번호 3의 CDRL3의 아미노산을 포함하며, 그리고

[0265] 상기 V_H는 서열 식별 번호 156의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 156에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 156의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일한 상기 아미노산 서열은 서열 식별 번호 133의 CDRH1, 서열 식별 번호 7의 CDRH2 및 서열 식별 번호 144의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함하며, 또는

[0266] 상기 V_H은 서열 식별 번호 149의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 149에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 149의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일한 상기 아미노산 서열은 서열 식별 번호 133의 CDRH1, 서열 식별 번호 138의 CDRH2 및 서열 식별 번호 8의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함하며, 또는

[0267] 상기 V_H은 서열 식별 번호 151의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 151에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 151의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일한 상기 아미노산 서열은 서열 식별 번호 134의 CDRH1, 서열 식별 번호 138의 CDRH2 및 서열 식별 번호 8의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함한다.

[0268] 한 바람직한 구현예에서, 상기 V_L은 서열 식별 번호 286의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 286에 대해 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 286의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 바람직하게는 서열 식별 번호 1의 CDRL1, 서열 식별 번호 2의 CDRL2 및 서열 식별 번호 3의 CDRL3의 아미노산을 포함하며, 그리고

[0269] 상기 V_H는 서열 식별 번호 156의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 156에 대해 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 156의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일한 상기 아미노산 서열은 서열 식별 번호 133의 CDRH1, 서열 식별 번호 7의 CDRH2 및 서열 식별 번호 144의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함하며, 또는

[0270] 상기 V_H는 서열 식별 번호 149의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 149에 대해 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 149의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일한 상기 아미노산 서열은 서열 식별 번호 133의 CDRH1, 서열 식별 번호 138의 CDRH2 및 서열 식별 번호 8의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함하며, 또는

[0271] 상기 V_H는 서열 식별 번호 151의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 151에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 151의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일한 상기 아미

노산 서열은 서열 식별 번호 134의 CDRH1, 서열 식별 번호 138의 CDRH2 및 서열 식별 번호 8의 CDRH3의 아미노산 서열을 포함하며, 또는

[0272] 일부 구현예에서, 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질의 항원 결합 부위 B는 항체나 그 단편, 또는 알파 사슬 가변 도메인(v_α) 및 베타 사슬 가변 도메인(v_β) 또는 감마 사슬 가변 도메인(v_γ) 또는 델타 사슬 가변 도메인(v_δ)을 포함하거나 이로써 구성된다. 항체 및 단편은 이 문서에서 위의 "정의" 섹션에서 정의된 바와 같다.

[0273] 일부 구현예에서, 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질의 항원 결합 부위 B는 알파 사슬 가변 도메인(v_α) 및 베타 사슬 가변 도메인(v_β) 또는 감마 사슬 가변 도메인(v_γ) 또는 델타 사슬 가변 도메인(v_δ), 바람직하게는 v_α 및 v_β 도메인을 포함한다. 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있는 특정 TA에 결합하는 것의 맥락에서, 알파 사슬 가변 도메인(v_α) 및 베타 사슬 가변 도메인(v_β) 또는 감마 사슬 가변 도메인(v_γ) 또는 델타 사슬 가변 도메인(v_δ)은 예를 들어 다음에 서 상세히 기술된다: WO2018172533, WO2018033291, WO2017158103, WO2018104438, WO2018104478, WO2019002444, WO2017158116.

[0274] 따라서, 한 구현예에서, v_α 및 v_β 또는 v_γ 및 v_δ는 WO2018172533, WO2018033291, WO2017158103, WO2018104438, WO2018104478, WO2019002444, WO2017158116에서 공개된 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 인정된 선행 기술에서 기술된 v_α 및 v_β 또는 v_γ 및 v_δ는 TA 펩티드, 특히 인용된 동일한 특허 출원서에 공개되어 있는 TAA 펩티드에 결합한다.

[0275] 한 구현예에서, 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질은 v_α 및 v_β 도메인 또는 v_γ 및 v_δ 도메인을 포함하며,

[0276] i) v_α 또는 v_γ는 'EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGKGLQLLTYIYSSQDSKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP' 서열 식별 번호 20, 'EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGKGLQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP' 서열 식별 번호 21, 'EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTESSSTYLYWYKQEPGKGLQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP' 서열 식별 번호 22로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 20, 21 및 22로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 그리고 바람직하게는 서열 식별 번호 23의 CDRa1, 서열 식별 번호 24의 CDRa2 및 서열 식별 번호 25의 CDRa3을 포함하며, 그리고 바람직하게는 서열 식별 번호 21의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 서열 식별 번호 23의CDRa1, 서열 식별 번호 26의 CDRa2 및 서열 식별 번호 25의 CDRa3을 포함하며, 그리고 바람직하게는 서열 식별 번호 22의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 서열 식별 번호 27의 CDRa1, 서열 식별 번호 26의 CDRa2 및 서열 식별 번호 25의 CDRa3을 포함하며, 그리고 상기 제1 가변 도메인 사슬의 아미노산은 바람직하게는 아미노산 19V 및/또는 48K를 포함하며, 그리고

[0277] v_β 또는 v_δ는 'DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLELLFYFCYGTPCDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRADTGELFFGEGSRLTVL' 서열 식별 번호 30의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 30으로 구성되는 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 바람직하게는 서열 식별 번호 30의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 서열 식별 번호 31의 CDRb1, 서열 식별 번호 34의 CDRb2 및 서열 식별 번호 35의 CDRb3의 아미노산 서열을 각각 포함하며, 선택적으로 아미노산 54F 및/또는 66C를 포함하며, 또는

[0278] (ii) v_α 또는 v_γ는 서열 식별 번호 48의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 48에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 48의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 서열 식별 번호 49의 CDRa1, 서열 식별 번호 50의 CDRa2 및 서열 식별 번호 51의 CDRa3의 아미노산 서열을 포함하며, 그리고

[0279] v_β또는 v_δ는 서열 식별 번호 44의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호 44에 대해 적어도85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되며, 서열 식별 번호 44의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일한 아미노산 서

열은 서열 식별 번호 45의 CDRb1, 서열 식별 번호 46의 CDRb2 및 서열 식별 번호 47의 CDRb3의 아미노산 서열을 포함하는 이중특이성 항원 결합 단백질.

[0280] 한 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 단백질의 맥락에서 여기서 정의된 제1 가변 도메인 및 제2 가변 도메인은 IMGT 번호매김에 따른 위치 44에서의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 짝짓기의 향상을 위해 상기 위치 44의 아미노산이 다른 적합한 아미노산으로 치환된다. 바람직하게는 상기 항원 결합 단백질이 TCR인 특정한 구현예에서, 상기 아미노산 치환이 예를 들어 사슬의 짝짓기(즉, α 및 β 사슬 또는 γ 및 δ의 짝짓기)를 향상시킨다. 바람직한 구현예에서, 제1 가변 도메인($v_1$44)에서 위치 44에 존재하는 아미노산 및 제2 가변 도메인($v_2$44)에서 위치 44에 존재하는 아미노산의 하나 또는 모두가 $v_1$44D/$v_2$44R, $_{v1}$44R/$v_2$44D, $_{v1}$44E/$v_2$44K, $v_1$44K/$v_2$44E, $v_1$44D/$v_2$44K, $v_1$44K/$v_2$44D, $v_1$44R/$v_2$44E; $v_1$44E/$v_2$44R, $v_1$44L/$v_2$44W, $v_1$44W/$v_2$44L, $v_1$44V/$v_2$44W, $v_1$44W/$v_2$44V로 구성되는 아미노산 짝의 군으로부터 선택되는 아미노산 짝인 $v_1$44/$v_2$44로 치환된다.

[0281] 따라서 추가의 구현예에서, 항원 결합 단백질은 또한 v_1Q44D/v_2Q44R; v_1Q44R/v_2Q44D; v_1Q44E/v_2Q44K; v_1Q44K/v_2Q44E; v_1Q44D/v_2Q44K; v_1Q44K/v_2Q44D; v_1Q44E/v_2Q44R; v_1Q44R/v_2Q44E; v_1Q44L/v_2Q44W; v_1Q44W/v_2Q44L; v_1Q44V/v_2Q44W; 및 v_1Q44W/v_2Q44V; v_1W44D/v_2Q44R; v_1W44R/v_2Q44D; v_1W44E/v_2Q44K; v_1W44K/v_2Q44E; v_1W44D/v_2Q44K; v_1W44K/v_2Q44D; v_1W44E/v_2Q44R; v_1W44R/v_2Q44E; v_1W44L/v_2Q44W; v_1W44/v_2Q44L; v_1W44V/v_2Q44W; 및 v_1W44/v_2Q44V; v_1H44D/v_2Q44R; v_1H44R/v_2Q44D; v_1H44E/v_2Q44K; v_1H44K/v_2Q44E; v_1H44D/v_2Q44K; v_1H44K/v_2Q44D; v_1H44E/v_2Q44R; v_1H44R/v_2Q44E; v_1H44L/v_2Q44W; v_1H44W/v_2Q44L; v_1H44V/v_2Q44W; 및 v_1H44W/v_2Q44V; v_1K44D/v_2Q44R; v_1K44R/v_2Q44D; v_1K44E/v_2Q44K; v_1K44/v_2Q44E; v_1K44D/v_2Q44K; v_1K44/v_2Q44D; v_1K44E/v_2Q44R; v_1K44R/v_2Q44E; v_1K44L/v_2Q44W; v_1K44W/v_2Q44L; v_1K44V/v_2Q44W; 및 v_1K44W/v_2Q44V; v_1E44D/v_2Q44R; v_1E44R/v_2Q44D; v_1E44/v_2Q44K; v_1E44K/v_2Q44E; v_1E44D/v_2Q44K; v_1E44K/v_2Q44D; v_1E44/v_2Q44R; v_1E44R/v_2Q44E; v_1E44L/v_2Q44W; v_1E44W/v_2Q44L; v_1E44V/v_2Q44W; 및 v_1E44W/v_2Q44V; v_1Q44D/v_2R44; v_1Q44R/v_2R44D; v_1Q44E/v_2R44K; v_1Q44K/v_2R44E; v_1Q44D/v_2R44K; v_1Q44K/v_2R44D; v_1Q44E/v_2R44; v_1Q44R/v_2R44E; v_1Q44L/v_2R44W; v_1Q44W/v_2R44L; v_1Q44V/v_2R44W; 및 v_1Q44W/v_2R44V; v_1W44D/v_2R44; v_1W44R/v_2R44D; v_1W44E/v_2R44K; v_1W44K/v_2R44E; v_1W44D/v_2R44K; v_1W44K/v_2R44D; v_1W44E/v_2R44; v_1W44R/v_2R44E; v_1W44L/v_2R44W; v_1W44/v_2R44L; v_1W44V/v_2R44W; 및 v_1W44/v_2R44V; v_1H44D/v_2R44; v_1H44R/v_2R44D; v1H44E/v_2R44K; v_1H44K/v_2R44E; v_1H44D/v_2R44K; v_1H44K/v_2R44D; v_1H44E/v_2R44; v_1H44R/v_2R44E; v_1H44L/v_2R44W; v_1H44W/v_2R44L; v_1H44V/v_2R44W; 및 v_1H44W/v_2R44V; v_1K44D/v_2R44; v_1K44R/v_2R44D; v_1K44E/v_2R44K; v_1K44/v_2R44E; v_1K44D/v_2R44K; v1K44/v_2R44D; v_1K44E/v_2R44; v_1K44R/v_2R44E; v_1K44L/v_2R44W; v_1K44W/v_2R44L; v1K44V/v2R44W; 및 v_1K44W/v_2R44V; v_1E44D/v_2R44; v_1E44R/v_2R44D; v_1E44/v_2R44K; v_1E44K/v_2R44E; v_1E44D/v_2R44K; v_1E44K/v_2R44D; v_1E44R/v_2R44E; v_1E44L/v_2R44W; v_1E44W/v_2R44L; v_1E44V/v_2R44W; 및 v_1E44W/v_2R44V; v_1Q44D/v_2K44R; v_1Q44R/v_2K44D; v_1Q44E/$v_2$44K; v_1Q44K/v_2K44E; v_1Q44D/$v_2$44K; v_1Q44K/v_2K44D; v_1Q44E/v_2K44R; v_1Q44R/v_2K44E; v_1Q44L/v_2K44W; v_1Q44W/v_2K44L; v_1Q44V/v_2K44W; 및 v_1Q44W/v_2K44V; v_1W44D/v_2K44R; v_1W44R/v_2K44D; v_1W44E/$v_2$44K; v_1W44K/v_2K44E; v_1W44D/$v_2$44K; v_1W44K/v_2K44D; v_1W44E/v_2K44R; v_1W44R/v_2K44E; v_1W44L/v_2K44W; v_1W44/v_2K44L; v_1W44V/v_2K44W; 및 v_1W44/v_2K44V; v_1H44D/v_2K44R; v_1H44R/v_2K44D; v_1H44E/$v_2$44K; v_1H44K/v_2K44E; v_1H44D/$v_2$44K; v_1H44K/v_2K44D; v_1H44E/v_2K44R; v_1H44R/v_2K44E; v_1H44L/v_2K44W; v_1H44W/v_2K44L; v_1H44V/v_2K44W; 및 v_1H44W/v_2K44V; v_1K44D/v_2K44R; v_1K44R/v_2K44D; v_1K44E/$v_2$44K; v_1K44/v_2K44E; v_1K44D/$v_2$44K; v_1K44/v_2K44D; v_1K44E/v_2K44R; v_1K44R/v_2K44E; v_1K44L/v_2K44W; v_1K44W/v_2K44L; v_1K44V/v_2K44W; 및v_1K44W/v_2K44V; v_1E44D/v_2K44R; v_1E44R/v_2K44D; v_1E44/$v_2$44K; v_1E44K/v_2K44E; v_1E44D/$v_2$44K; v_1E44K/v_2K44D; v_1E44/v_2K44R; v_1E44R/v_2K44E; v_1E44L/v_2K44W; v_1E44W/v_2K44L; v_1E44V/v_2K44W 및 v_1E44W/v_2Q44V로 구성되는 군으로부터 선택되는 바람직한 치환 쌍 중 하나($v_1$44/$v_2$44)를 추가로 포함할 수 있다.

[0282] 위에서, 예를 들어 "v_1Q44R/v_2Q44D"는 제2 가변 도메인 Q44에서 제1 가변 도메인에서 Q44가 R에 의해 치환되는 반면, 제2 가변 도메인에서 Q44가 D에 의해 치환되는 것을 의미한다. 추가의 치환 및 기술은 미국 특허 출원 번호 2018-0162922에서 찾을 수 있다.

[0283] 한 구현예에서, 이중특이성 항원 결합 단백질은 이중특이성 항체나 그 단편, 이중특이성 T세포 수용체(TCR)나 근 단편 또는 이중특이성 단일 사슬 TCR(scTCR) 또는 이중특이성 단일 사슬 항체이다.

[0284] 이 이중특이성 항체 및 TCR 그리고 해당 단편들은 이 문서에서 위의 "정의" 섹션에서 정의된 바와 같다.

[0285] 한 구현예에서, 항원 결합 단백질은 인간 기원이며, 이는 인간 항원 유전자 자리에서 생성되는 것으로 이해되며, 그러므로 인간 서열, 특히 인간 TCR이나 항체 서열을 포함한다.

[0286] 한 구현예에서, 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인이 함께 연결되며/거나 v_α 및 v_β 또는 v_γ 및 v_δ 도메인이 함께, 바람직하게는 공유 링크를 통해 연결된다.

[0287] 한 구현예에서, 이중특이성 항원 결합 단백질이 적어도 2개의 폴리펩티드를 포함한다.

[0288] 관련된 구현예에서, 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인이 같거나 다른 폴리펩티드, 바람직하게는 다른 폴리펩티드에 위치한다.

[0289] 같은 구현예에서, 알파 사슬 가변 도메인(v_α) 및 베타 사슬 가변 도메인(v_β) 또는 감마 사슬 도메인(v_γ) 및 델타 사슬 가변 도메인(v_δ), 바람직하게는 v_α 및 v_β가 같거나 다른 폴리펩티드에 위치한다.

[0290] 한 구현예에서, 항원 결합 단백질은 용해성 단백질이다.

[0291] "공유 링크", "링커 서열" 또는 "폴리펩티드 링커"는 본 문서에서 위의 "정의" 섹션에서 정의된 바와 같다.

[0292] 한 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 단백질은 또한 다음의 하나 이상을 포함한다:

[0293] (i) 진단 제제;

[0294] (ii) 치료 제제; 또는

[0295] (iii) PK 변형 모이어티.

[0296] "진단 제제", "치료 제제" 및 "PK 변형 모이어티"는 여기서 위의 정의 섹션에서 정의된다.

[0297] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 단백질은 적어도 하나의 성장 억제제에 직접적으로 또는 절단 가능하거나 절단 불가능한 링커를 통해 공유적으로 부착된다. 그러한 적어도 하나의 성장 억제제가 부착되는 항원 결합 단백질은 접합체라고도 칭할 수 있다.

[0298] 그러한 접합은 예를 들어 면역접합의 합성은 출원서 WO2004/091668 또는 Hudecz, F., Methods Mol. Biol. 298: 209-223 (2005) 및 Kirin et al., Inorg Chem. 44(15): 5405-5415 (2005)에 기술되어 있으며, 당업자에 의해 그러한 적어도 하나의 성장 억제인자가 부착되는 본 발명의 항원 결합 단백질의 제조로 이전될 수 있다.

[0299] "링커"란 적어도 하나의 성장 억제제의 부착이란 맥락에서, 폴리펩티드를 약물 모이어티에 공유적으로 결합시키는 공유 결합이나 원자들의 사슬을 포함하는 화학적 모이어티를 의미한다.

[0300] 접합은 *시험관 내* 방법에 의해 제조할 수 있다. 약물이나 전구체 약물을 항체와 연결시키기 위해, 연결 기가 사용된다. 적합한 연결 기는 당업계에 잘 알려져 있으며 이황화기, 티로에테르기, 산불안정기, 광불안정기, 펩티다제불안정기 및 에스터라제 불안정기가 포함된다. 본 발명의 항원 결합 단백질과 세포독성제제나 성장 억제자와의 접합은 다양한 이중기능성 단백질 결합제를 사용하여 이룰 수 있으며, N-숙신이미딜 피리딜디티오부티레이트(SPDB), 부타논산 4-[[(5-니트로-2-피리디닐)디티오]-2,5-디옥소-1-피롤리디닐 에스테르(니트로-SPDB), 4-(피리딘-2-일디술파닐)-2-술포-부티르살(술포-SPDB), N-숙신이미딜(2-피리딜디티오) 프로피오네이트(SPDP), 숙신이미딜 (N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트(SMCC), 이미노티올레인(IT), 이미도에스테르의 이중기능성 유도체(디메틸 아디피미데이트 HCL 등), 활성 에스테르(디숙신이미딜 수버레이트), 알데히드(글루타르알데히드 등), 비스-아지도 화합물(비스(p-아지도벤조일)-헥산디아민 등), 비스-디아조늄 유도체(비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민 등), 디이소시아네이트(톨루엔 2,6-디이소시아네이트 등) 및 비스-활성 불소 화합물(1,5-디플루오로-2,4-디니티로벤젠 등)이 포함되지만 이로써 제한되지 않는다. 예를 들어, 리신 면역독소는 Vitetta 등 (1987)이 기술한 내용에 의해 제조가 가능하다. 탄소 동위원소 표지된 1-이소티오시아나토벤질메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산(MX-DTPA)이 항체에 대한 방사성핵종의 접합을 위한 예시적 킬레이트 제제이다(WO 94/11026).

[0301] 이 링커는 세포에서 세포독성 제제나 성장 억제제의 방출을 원활히 하는 "전달가능한 링커"일 수 있다. 예를 들

어, 산불안정 링커, 펩티드 분해효소 민감 링커, 에스테르 분해효소 불안정 링커, 광불안정 링커 또는 이황화 함유 링커(예를 들어, 미국 특허 번호 5,208,020 참고)를 사용할 수 있다. 링커는 또한 경우에 따라 더 나은 내성을 초래할 수 있는 "절단 불가능한 링커"(예: SMCC 링커)일 수 있다.

[0302] 대안적으로, 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질 및 세포독성이나 성장 억제 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질은 재조합 기법이나 펩티드 합성에 의해 만들 수 있다. DNA의 길이는 접합체의 원하는 성질을 파괴시키지 않는 링커 펩티드를 인코딩하는 영역에 의해 분리되거나 서로 옆에 있는 접합체의 두 부분을 인코딩하는 각각의 영역을 포함할 수 있다.

[0303] 본 발명의 항원 결합 단백질은 접근약물(예: 펩티딜 화학요법 제제, WO 81/01145 참고)을 활성 항암 약물(예를 들어, WO 88/07378 및 미국 특허 번호 4,975,278을 참고)로 변환시키는 경구약물 활성화 효소에 폴리펩티드를 접합시킴으로써 의존 효소 매개 전구 약물 요법에서도 사용될 수 있다.

[0304] 한 구현예에서 본 발명의 항원 결합 단백질은 또한 다음에서 하나 이상을 포함한다: 효소, 시토카인(인간 IL-2, IL-7 또는 IL-15), 나노운반체, 또는 핵산.

[0305] 여러 이중특이성 형식은 당업계에서 기술되며 본 문서에서 위의 "형식" 아래의 "정의" 섹션에서 기술된다. 여러 형식의 단백질을 생산하는 기법 또한 상응하는 섹션에서 인용되는 당업계에서 기술되며, 따라서 당업자는 본 발명의 맥락에서 정의된 대로 CDR 또는 본 문서에서 공개된 형식으로 가변 도메인을 쉽게 사용할 수 있다. TCER® 과 같은 항원 결합 단백질 특히 용해성 이중특이성 결합 단백질의 생산 또한 본 문서의 실시예 섹션에서 공개된다. 당업자들은 항원 결합 단백질이 두 개의 폴리펩티드를 포함하는 경우, 경쇄 및 중쇄 가변 도메인이, 예를 들어 평행 방향일 수 있거나 알파 및 베타 가변 도메인이 DVD 형식에서의 경우와 같이 평행 방향일 수 있거나, 경쇄 및 중쇄 가변 도메인이, 예를 들어 교차 방향일 수 있고 알파 및 베타 가변 도메인이CODV 형식에서의 경우와 같이 교차 방향일 수 있음을 이해할 것이다.

[0306] 따라서, 본 발명은 또한 2개의 항원 결합 부위(A 및 B)를 형성하는 2개의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 항원 결합 단백질에 대한 것으로, 제1 폴리펩티드 사슬은 다음의 식으로 대표되는 구조를 가지며:

[0307] V_3 -L_1-V_4-L_2-C_L [I]

[0308] 여기서 V_3은 제3 가변 도메인; V_4 는 제4 가변 도메인; L_1 및 L_2는 링커; L_2는 존재하거나 부재할 수 있으며; C_L 은 경쇄 불변 도메인이나 그 부분이 존재하거나 부재할 수 있으며;

[0309] 또한 제2 폴리펩티드 사슬은 다음 공식에 의해 대표되는 구조를 가지며:

[0310] V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1} [II]

[0311] 여기서 V_5는 제5 가변 도메인; V_6 는 제6 가변 도메인; L_3 및 L_4는 링커; L_4는 존재하거나 부재할 수 있으며; C_{H1} 은 중쇄 불변 도메인 1이나 그 부분이 존재하거나 부재하며; 그리고

[0312] V_3은 본 문서에서 위에 정의된 대로 Vα나 Vɣ 가변 도메인이며 V_5는 Vβ나 Vδ 가변 도메인이며, V_4는 경쇄 가변 도메인이며 V_6은 중쇄 가변 도메인이거나 V_4는 중쇄 가변 도메인이며 V_6은 경쇄 가변 도메인이며 또는,

[0313] V_3은 본 문서에서 위에 정의된 대로 Vβ나 Vδ 가변 도메인이며 V_5는 Vβ나 Vδ 가변 도메인이며, V_4는 경쇄 가변 도메인이며 V_6은 중쇄 가변 도메인이거나 V_4는 중쇄 가변 도메인이며 V_6은 경쇄 가변 도메인이며 또는,

[0314] V_3은 본 문서에서 위에 정의된 대로 Vα나 Vɣ 가변 도메인이며 V_6은 Vβ나 Vδ 가변 도메인이며, V_4는 경쇄 가변 도메인이며 V_5는 중쇄 가변 도메인이거나 V_4는 중쇄 가변 도메인이며 V_5은 경쇄 가변 도메인이며 또는,

[0315] V_3은 본 문서에서 위에 정의된 대로 Vβ나 Vδ 가변 도메인이며 V_6은 Vα나 Vɣ 가변 도메인이며, V_4는 경쇄 가변 도메인이며 V_5는 중쇄 가변 도메인이거나 V_4는 중쇄 가변 도메인이며 V_5은 경쇄 가변 도메인이며,

[0316] V_4는 본 문서에서 위에 정의된 대로 Vα나 Vɣ 가변 도메인이며 V_5는 Vβ나 Vδ 가변 도메인이며, V_3은 경쇄 가변 도메인이며 V_6은 중쇄 가변 도메인이거나 V_3은 중쇄 가변 도메인이며 V_6은 경쇄 가변 도메인이며 또는,

[0317] V_4는 본 문서에서 위에 정의된 대로 Vβ나 Vδ 가변 도메인이며 V_5는 Vα나 Vɣ 가변 도메인이며, V_3은 경쇄 가

변 도메인이며 V_6은 중쇄 가변 도메인이거나 V_3은 중쇄 가변 도메인이며 V_6은 경쇄 가변 도메인이며,

[0318] 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인이 함께 항원 결합 부위 A를 형성하며, V_α 및 V_β 또는 V_γ 및 Vδ 가변 도메인이 항원 결합 부위 B를 형성하며, V_α나 V_γ 가변 도메인은 바람직하게는 V_α이며, V_δ V_β나 V_δ는 바람직하게는 V_β이다. 링커 L_1, L_2, L_3, L_4는 이 문서에서 위치 "정의" 섹션에서 정의된다. 하지만, 일부 구현예에서 일부 링커 길이가 특정 형식에 대해 바람직할 수 있다. 하지만, 링커 길이 및 그 아미노산 서열에 관한 지식은 당업계의 일반 지식에 속하며, 링커들 그리고 여러 형식에 대한 및 링커 아미노산 서열은 기술 수준의 일부이며 본 문서에서 위에 인용된 공개 내용에서 공개된다.

[0319] 한 바람직한 구현예에서, V_3은 이 문서에서 위에 정의된 대로 V_α이며, V_6는 이 문서에서 위에 정의된 대로 V_β이며, V_4는 본 발명의 맥락에서 정의된 대로 경쇄 가변 도메인이고 V_5는 본 발명의 맥락에서 정의된 대로 중쇄 가변 도메인이거나,

[0320] V_3은 여기서 위에 정의된 대로 V_α이며, V_6은 여기서 위에 정의된 대로 V_β이며, V_4는 본 발명의 맥락에서 정의된 대로 중쇄 가변 도메인이고 V_5는 본 발명의 맥락에서 정의된 대로 경쇄 가변 도메인이다.

[0321] 한 구현예에서, 식 [I]의 폴리펩티드는 또한 식 [I]의 폴리펩티드의 C-말단에서 링커(L_5) 및 F_c 도메인이나 그 부분을 포함하며/거나, 식 [II]의 폴리펩티드는 또한 식 [II]의 C-말단에서 링커(L_6) 및 F_c 도메인 또는 그 부분을 포함한다.

[0322] F_c-도메인은 여기서 위의 섹션 '정의'에 정의된 바와 같다.

[0323] 한 구현예에서, 항원 결합 단백질은 2개의 항원 결합 부위(A 및 B)를 형성하는 2개의 폴리펩티드 사슬을 포함하며,

[0324] 1개의 폴리펩티드 사슬은 공식 [III]에 의해 대표되는 구조를 가지며:

[0325] V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{c1}[III]

[0326] 그리고 1개의 폴리펩티드 사슬은 식 [IV]에 의해 대표되는 구조를 가지며:

[0327] V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{c2}[IV]

[0328] V_3, L_1, V_4, L_2, C_L, V_5, L_3, V_6, L_4, C_{H1}은 본 문서에서 위에 정의된 바와 같으며, L_5 및 L_6은 존재하거나 부재하는 링커이며 F_{c1} 및 F_{c2}는 F_c 도메인이고 F_{c1} 및 F_{c2}는 같거나 다르며, 바람직하게는 다르다. $_F$c-도메인은 여기서 위의 '정의' 섹션에서 정의된 바와 같다.

[0329] 한 구현예에서, F_{c1}은 아미노산 서열인 서열 식별 번호 132(홀)를 포함하거나 이로써 구성되며 F_{c2}는 아미노산 서열인 서열 식별 번호 131(놉)을 포함하거나 이로써 구성되거나 그 반대로 포함하거나 구성되며,

[0330] 보다 바람직하게는 V_4 나 V_3이 중쇄 가변 도메인일 때 F_{c1}은 아미노산 서열인 서열 식별 번호 132를 포함하거나 이로써 구성되며, 따라서 V_5나 V_6이 경쇄 가변 도메인일 때 F_{c2}가 아미노산 서열인 서열 식별 번호 131을 포함하거나 이로써 구성되거나

[0331] V_4 나 V_3이 경쇄 가변 도메인일 때 F_{c1}은 아미노산 서열인 서열 식별 번호 131을 포함하거나 이로써 구성되며, 따라서 V_5나 V_6이 중쇄 가변 도메인일 때 F_{c2}가 아미노산 서열인 서열 식별 번호 132를 포함하거나 이로써 구성된다.

[0332] 실시예에서 볼 수 있는 바와 같이, 본 발명의 발명자는 TCER® 형식의 성숙화된 TCR 가변 도메인과 병행하여 저친화도 모집인자(항원 결합 부위 A)의 사용을 원리 증명으로 잘 보여주었다(실시예 2).

[0333] 따라서, 하나의 바람직한 구현예에서, 항원 결합 단백질은 2개의 항원 결합 부위(A 및 B)를 형성하는 2개의 폴리펩티드 사슬을 포함하며, 1개의 폴리펩티드 사슬은 식 [III]에 의해 대표되는 구조를 가지며:

[0334] V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{c1}[III]

[0335] 그리고 1개의 폴리펩티드 사슬은 식 [IV]에 의해 대표되는 구조를 가지며:

[0336] V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{c2}[IV]

[0337] 여기서 L_2, C_L, L_5 및 L_4, C_{H1}, L_6이 부재하며,

[0338] 여기서 V_3, L_1, V_4, V_5, L_3, V_6은 본 문서에서 위에 정의된 바와 같으며,

[0339] 바람직하게는 본 발명의 맥락에서 정의된 대로 V_3은 V_α나 V_γ 도메인이며 V_6는 V_β나 V_δ도메인이고, 본 발명의 맥락에서 정의된 대로 V_4는 경쇄 가변 도메인이며 V_5는 중쇄 가변 도메인이거나,

[0340] 바람직하게는, 본 발명의 맥락에서 정의된 바와 같이, V_3은 V_α나 V_γ 가변 도메인이며, V_6은 V_β나 V_δ 가변 도메인이며, 본 발명의 맥락에서 정의된 바와 같이, V_4는 중쇄 가변 도메인이며 V_5는 경쇄 가변 도메인이며, 그리고

[0341] 바람직하게는 L_1 및 L_3은 아미노산 서열 식별 번호 118의 아미노산 서열 'GGGSGGGG'를 포함하거나 이로써 구성되며, 그리고

[0342] 바람직하게는 F_{c1}은 아미노산 서열인 서열 식별 번호 132를 포함하거나 이로써 구성되며 F_{c2}는 아미노산 서열인 서열 식별 번호 131을 포함하거나 이로써 구성되거나, 그 반대로 포함하거나 구성되며,

[0343] 보다 바람직하게는 F_{c1}은 V_4가 중쇄 가변 도메인일 때 아미노산 서열인 서열 식별 번호 132를 포함하거나 이로써 구성되며, 따라서 F_{c2}는 V_5가 경쇄 가변 도메인일 때 아미노산 서열인 서열 식별 번호 131을 포함하거나 이로써 구성되며, 또는

[0344] 보다 바람직하게는 F_{c1}은 V_4 가 경쇄 가변 도메인일 때 아미노산 서열인 서열 식별 번호 131을 포함하거나 이로써 구성되며, 따라서 F_{c2}는 V_5가 중쇄 가변 도메인일 때 아미노산 서열인 서열 식별 번호 132를 포함하거나 이로써 구성되며, 그리고

[0345] 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인이 함께 CD3에 결합하는 하나의 항원 결합 부위 A 를 형성하며,

[0346] V_α 및 V_β 또는 V_γ 및 V_δ 가변 도메인은, 본 발명의 맥락에서 정의된 대로 TA 항원성 펩티드/MHC 복합체, 바람직하게는 TAA 항원성 펩티드/MHC 복합체에 특이적으로 결합하는 하나의 항원 결합 부위 B를 형성한다.

[0347] 이 구현예의 항원 결합 단백질은 또한 TCER®로 지칭할 수 있다.

[0348] "TCER®"은 이중특이성 T세포 수용체(TCR)이며, 용해성 항원 결합 단백질로, 본 발명의 맥락에서 정의된 CD3에 결합하는 중쇄 및 경쇄 가변 도메인과 본 변경의 맥락에서 정의된 V_α 및 V_β 또는 V_γ 및 V_δ 도메인 등 두 개의 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0349] 한 구현예에서 본 발명은 서열 식별 번호 165 ~ 167의 아미노산을 포함하거나 이로써 구성되는 식 V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{c1} [III]의 제1 폴리펩티드 및 서열 식별 번호 163 또는 164의 아미노산을 포함하거나 이로써 구성된 식 V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{c2} [IV]의 제2 폴리펩티드를 포함하는 항원 결합 단백질에 관한 것이다,

[0350] 예를 들면, 항원 결합 단백질의 항원 의존 세포 매개 세포독성(ADCC) 및/또는 보체 의존 세포독성(CDC)의 강화나 강도를 위해, 본 발명의 항원 결합 단백질을 작용기 기능에 대해 변경시키는 것이 바람직할 수도 있다. 이것은 본 발명의 항원 결합 단백질과의 맥락에서 여기에서 F_c 변이체로도 부르는 항원 결합 단백질의 F_c 영역에서 하나 이상의 아미노산 치환을 도입하여 성취할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 시스테인 잔기(들)을 F_c 영역에 도입할 수 있으며, 이로써 이 영역에서 사슬간 이황화 결합의 형성을 허용한다. 이에 따라 생성되는 이종이량체 항원 결합 단백질은 내부화 능력을 향상 또는 감소시켰을 수 있으며/거나 보체 매개 세포 사멸 및/또는 항체 의존 세포의 세포독성(ADCC)을 증가시켰을 수 있다(Caron PC. et al. 1992; and Shopes B. 1992).

[0351] 본 발명의 항원 결합 단백질에 대한 다른 아미노산 변형의 유형은 항원 결합 단백질의 원래 글리코실화 패턴의 변경에 유용할 수 있으며, 즉 항원 결합 단백질에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 모이어티의 소실 및/또는 항원 결합 단백질에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위의 추가에 의한다. 트리펩티드 서열인 아스파라

긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌에서 X는 프롤린을 제외한 일체의 아미노산이며, 어느 하나의 존재는 잠재적 글리코실화 부위를 생성한다. 항원 결합 단백질에 대한 글리코실화 부위의 추가나 소실은 아미노산 서열이 (N-연계 글리코실화 부위에 대하여) 뒤에 기술된 트리펩티드 서열을 하나 이상 포함하도록 아미노산 서열을 변경시켜 편리하게 성취된다.

[0352] 다른 유형의 변형에는 가상(in silico) 환경에서나 실험적으로 확인된 서열의 제거가 관여하며, 이는 항원 결합 단백질 제조에서 분해 생성물이나 이질성을 초래할 가능성이 있다. 예를 들면, pH와 표면 노출과 같은 요인에 따라 아스파라긴과 글루타민 잔기의 탈아미드화가 발생할 수 있다. 아스파라긴 잔기는 특히 탈아미드화에 대해 민감하며, 주로 서열 Asn-Gly에 존재 시 민감하고 Asn-Ala 등의 다른 디펩티드 서열에서 덜 민감하다. 그러한 탈아미드화 부위, 특히 Asn-Gly가 본 발명의 항원 결합 단백질에 존재할 때, 그러므로 연루된 잔기의 하나를 제거하기 위해 보통 보존적 치환으로 그 부위를 제거하는 것이 바람직할 수 있다. 서열에서 하나 이상의 연루된 잔기를 제거하는 그러한 치환은 본 발명에 의해 망라되는 것 또한 의도한다.

[0353] 공유 변형의 다른 유형에는 항원 결합 단백질에 대한 글리코시드의 화학적이나 효소적인 결합이 관여한다. 이 절차들은 N-연계 또는 O-연계 글리코실화에 대한 글리코실화 능력을 가진 숙주 세포에서 항원 결합 단백질의 생산을 요구하지 않는다는 점에서 유리하다. 사용되는 결합 방식에 따라, 당이 (a) 아르기닌 및 히스티딘, (b) 유리 카르복시기, (c) 시스테인의 술프히드릴기와 같은 유리 술프히드릴기, (d) 세린, 트레오닌 또는 히드록시프롤린의 히드록시기와 같은 유리 히드록시기, (e) 페닐알라닌, 티로신 또는 트립토판의 방향성 잔기와 같은 방향성 잔기 또는 (f) 글루타민의 아미드기에 부착할 수 있다. 예를 들어, 그러한 방법들은 WO 87/05330에 기술되어 있다.

[0354] 항원 결합 단백질 상에 존재하는 어떠한 탄수화물 모이어티의 제거는 화학적으로 또는 효소적으로 성취할 수 있다. 화학적 탈글리코실화는 화합물 삼불소메탄술폰산이나 동등한 화합물에 대한 항원 결합 단백질의 노출을 요구한다. 이러한 처리는 연계시키는 당을 제외한 대부분이나 모든 당의 분할을 초래하는(N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸 갈락토사민) 반면 항원 결합 단백질을 온전하게 유지한다. 화학적 탈글리코실화는 다음에서 기술된다: Sojahr H. et al. (1987) and by Edge, AS. et al. (1981). 항체 상에서 탄수화물 모이어티의 효소적 분할은 다음에 기술된 다양한 엔도-글리코시다아제 및 엑소-글리코시다아제의 사용에 의해 성취 가능하다: Thotakura, NR. et al. (1987).

[0355] 항원 결합 단백질의 공유 변형에 대한 다른 유형은 다양한 비단백질성 중합체(예: 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 또는 폴리옥시알킬렌, 미국 특허번호 4,640, 835; 4,496, 689; 4,301, 144; 4,670, 417; 4,791, 192 또는 4,179,337에서 명시된 방식 사용) 중 하나에 대한 항원 결합 단백질의 연결을 포함한다.

[0356] 또한, 본 발명은 본 발명의 항원 결합 단백질을 나타내는 입자 및 입자의 라이브러리 내 상기 입자의 포함을 포함한다. 그러한 입자는 파지, 효모 리보솜 또는 포유동물 세포를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 그러한 입자 및 라이브러리를 생성하는 방법은 당업계에 알려져 있다(예를 들어, WO2004/044004; WO01/48145, Chervin et al. (2008) J. Immuno. Methods 339.2: 175-184 참조).

[0357] 본원에 개시된 바와 같이, 본 발명의 항원 결합 단백질은 항원 결합 부위 A를 사용하여 CD3에 결합하고 항원 결합 부위 B를 사용하여 표적 항원(TA) 펩티드/MHC 복합체에 결합한다. 상기 CD3 분자는 전형적으로 CD3 제시 세포, 예컨대 작용기 세포, 바람직하게는 T세포의 표면 상에서 존재한다. 상기 표적 항원(TA) 펩티드/MHC 복합체는 전형적으로 표적 항원(TA) 펩티드/MHC 복합체 제시 세포, 예컨대 병변 세포, 예컨대 암 세포의 표면 상에 존재한다. CD3 및 상기 표적 항원(TA) 펩티드/MHC 복합체에 대한 항원 결합 단백질의 결합은 상기 작용기 세포 및 상기 표적 세포를 서로 근접하게 하고 따라서 상기 이중특이성 항원 결합 단백질의 결합은 결합 후 면역 반응을 유발할 수 있다. 따라서, 본 발명의 항원 결합 단백질은 작용기 세포에서 면역 반응을 유도한다.

[0358] 따라서, 한 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 단백질은 상기 CD3 제시 세포, 예컨대 상기 작용기 세포, 예컨대 상기 T세포 또는 상기 NK 세포에서 면역 반응을 유도하고, 바람직하게는, 상기 면역 반응은 인터페론(IFN) γ 수준의 증가를 특징으로 한다. 따라서, 한 구현예에서, 상기 면역 반응을 바람직하게는 IFN-감마 방출 분석으로 측정한 EC_{50} 값을 특징으로 할 수 있다.

[0359] 본 발명의 맥락에서, 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질은 K_D(A)로 CD3에 결합하고 상기 항원 결합 부위 B는 K_D(C)로 상기 TA 항원 펩티드 C(TA-C)/MHC 복합, 바람직하게는 TAA 항원 펩티드 C(TAA-C)/MHC 복합체에 결합하고 K_D(A)/K_D(C)의 비율은 1을 초과, 4를 초과, 6을 초과, 8을 초과, 10을 초과, 15를 초과, 20을 초과, 25를

초과, 30을 초과, 40을 초과, 50을 초과, 예컨대 1 ~ 150, 4 ~ 140, 6 ~ 100, 8 ~ 100, 10 ~ 100, 바람직하게는 10 ~ 100이다.

[0360] 용어 "친화도" 및 "K_D"는 "정의" 섹션에서 상기 정의된 바와 같다. 친화도, 예컨대 K_D를 측정하는 방법은 당업자에게 알려져 있으며 예를 들어, 표면 플라즈몬 공명 및 생체층 간섭측정법을 포함한다. 당업자에게 알려진 바와 같이, 해당 실험을 위해 사용된 실험 조건, 예컨대 사용된 완충제, 단백질의 농도 또는 온도는 결과에 영향을 줄 수 있다.

[0361] 따라서, 한 예시에서, 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질이, 예를 들어, 상기 본원에 설명된 용해성 TCER®로서, 발현되고 복합체 HLA-A*02/MAG-003 단량체에 대한 그의 결합 친화도가 분석된다. 전형적으로, 측정은 예를 들어 전형적으로 제조업체에 의해 권장되는 설정을 사용한 Octet RED384 시스템 상에서 수행된다. 요약하자면, 결합 반응속도가 30℃ 및, 예를 들어, 완충제로서 PBS, 0.05% Tween-20, 0.1% BSA를 사용하여, 1000 rpm의 진탕 속도에서, 전형적으로, 측정된다. 펩티드-HLA-A:02 복합체가 상기 항원 결합 단백질, 특히, 상기 TCER® 분석 전에 바이오센서, 예컨대 HIS1K 상으로 로딩된다. 그 후, 동일한 항원 결합 단백질은 전형적으로 그의 CD3에 대한 결합 친화도에 대해 추가로 분석된다. 따라서, 상기 측정은 CD3 결합에 대해 상기 본원에 설명된 바와 같이 수행된다.

[0362] 일부 구현예에서, 상기 항원 결합 부위 A는 바람직하게는, **표면 플라즈몬 공명**(SPR) 또는 생체층 간섭측정법(BLI), 바람직하게는 생체층 간섭측정법(BLI)을 사용하여 측정되는, 3 nM 이상, 5 nM 이상, 8 nM 이상, 10 nM 이상, 12 nM 이상, 14 nM 이상, 16 nM 이상, 18 nM 이상, 20 nM 이상, 25 nM 이상, 30 nM 이상, 35 nM 이상, 40 nM 이상, 45 nM 이상, 및 1000 nM 이하, 800 nM 이하, 600 nM 이하, 500 nM 이하, 400 nM 이하, 예컨대 3 nM 내지 1000 nM, 3 nM 내지 600 nM, 5 nM 내지 600 nM, 10 nM 내지 600 nM, 12 nM 내지 600 nM, 14 nM 내지 600 nM, 16 nM 내지 600 nM, 18 nM 내지 600 nM, 20 nM 내지 60 0 nM, 바람직하게는 5 nM 내지 100 nM의 K_D(A)로 CD3에 결합한다.

[0363] 일부 구현예에서, 상기 항원 결합 부위 B는 **표면 플라즈몬 공명**(SPR) 또는 생체층 간섭측정법(BLI), 바람직하게는 생체층 간섭측정법(BLI)을 사용하여 측정되는 100 μM 이하, 1 μM 이하, 100 nM 이하, 50 nM 이하, 10 nM 이하, 예를 들어 0.01 nM 내지 150 nM, 0.05 nM 내지 150 nM, 0.1 nM 내지 150 nM, 0.1 nM 내지 100 nM, 0.1 nM 내지 50 nM, 0.1 nM 내지 10 nM, 0.5 nM 내지 10 nM, 0.5 nM 내지 5 nM, 0.1 nM 내지 5 nM, 바람직하게는 0.5 nM 내지 5 nM의 K_D(C)로 상기 TA 항원 펩티드 C(TA-C)/MHC 복합체, 바람직하게는 TAA 항원 펩티드 C(TAA-C)/MHC 복합체에 결합한다.

[0364] 한 예시에서, 상기 항원 결합 단백질은 서열 식별 번호: 10의 아미노산 서열 'KVLEHVVRV'를, 바람직하게는 HLA-A*02를, 포함하거나 이로써 구성되거나, 또는**표면 플라즈몬 공명**(SPR) 또는 생체층 간섭측정법(BLI), 바람직하게는 생체층 간섭측정법(BLI)을 사용하여 측정되는 100 nM 이하, 50 nM 이하, 10 nM 이하, 1 nM 이하, 1 nM 이하, 예를 들어 10 pM 내지 100 nM, 10 pM 내지 50 nM, 10 pM 내지 10 nM, 특히 50 pM 내지 100 nM, 100 pM 내지 50 nM, 100 pM 내지 10 nM, 500 pM 내지 10 nM, 바람직하게는 500 pM 내지 10 nM의 K_D로 상기 MAGE-A 항원 펩티드에 결합한다.

[0365] 한 예시에서, 상기 항원 결합 단백질은 서열 식별 번호: 9 /MHC 복합체의 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되고 바람직하게는, **표면 플라즈몬 공명**(SPR) 또는 생체층 간섭측정법(BLI), 바람직하게는 생체층 간섭측정법(BLI)을 사용하여 측정되는, 100 nM 이하, 50 nM 이하, 10 nM 이하, 1 nM 이하, 1 nM 이하, 예를 들어 10 pM 내지 100 nM, 10 pM 내지 150 nM, 10 pM 내지 100 nM, 특히 50 pM 내지 100 nM, 100 pM 내지 100 nM, 100 pM 내지 50 nM K_D로 상기 PRAME 펩티드에 결합한다.

[0366] 한 구현예에서, 상기 이중특이성 항원 결합 단백질은 정상 조직 세포에 대한 EC_{50}에 비해 5배 이상, 10배 이상, 20배 이상, 50배 이상, 100배 이상, 500배 이상, 1000배 이상 낮은 TA-C/MHC 제시 세포, 바람직하게는 TAA-C/MHC 제시 세포에 대한 EC_{50}을 가지고, 여기서 상기 EC_{50}는 바람직하게는 유도 세포독성에 관하여 측정된다.

[0367] 본원에서 "TA-C/MHC 제시 세포" 또는 "TA 제시 세포"는 MHC 단백질을 갖는 복합체에서 상기 TA 항원 펩티드, 예컨대 상기 특정 TA-C 항원 펩티드의 표면 상에서 존재하는 세포이며, 여기서 상기 세포 표면 상에서 존재하는 상기 TA 펩티드/MHC 복합체의 복제 수는 당업자에게 알려진 방법을 사용하여 전형적으로 결정된다. 한 구현예에서, 상기 TA/MHC 제시 세포는 TA-C/MHC 제시 세포이며, 바람직하게는 TAA/MHC 제시 세포이다. 일부 예시에서, 상기 TA 항원 펩티드는 바이러스 또는 세균 펩티드이며, 그러한 예시에서, 상기 TA/MHC 제시 세포는 전형적으로

병변 세포 또는 감염 세포이며, 여기서 상기 병변 세포는 상기 각각의 바이러스 또는 세균에 감염된다. 일부 예시에서, 상기 TA 항원 펩티드는 TAA 항원 펩티드이며, 상기 예시에서, 상기 TAA/MHC 제시 세포는 전형적으로 암 세포이다.

[0368] 한 구현예에서, 상기 TA/MHC 제시 세포, 바람직하게는 상기 TAA/MHC 제시 세포, 예컨대 TAA/MHC 제시 암 세포는, 각각, 50 초과, 100 초과, 150 초과, 200 초과, 300 초과, 600 초과, 800 초과, 1000 초과, 1500 초과, 2000 초과의 TA/MHC 복제 수 또는 TAA/MHC 복제 수, 바람직하게는 50 내지 5000의 TAA/MHC 복제 수를 가진다.

[0369] 본원에서 "복제 수"는 세포, 예컨대 TA/MHC 제시 세포, 예를 들어, TAA/MHC 제시 세포, 예컨대 암 세포 또는 정상 건강 세포의 세포 표면 상에 존재하는 TA 항체 펩티드/MHC 복합체의 수를 지칭한다.

[0370] 그러한 복제 수는 예를 들어, 상기 특이적 TA 및 상기 세포 유형에 따르며 당업자에게 알려진 방법, 예컨대 FACS 분석, 질량 분석법(MS) 및 RNA 염기서열분석, 바람직하게는 질량 분석법(MS) 및 RNA 염기서열분석을 사용하여 검출될 수 있다.

[0371] "건강 세포"는 "정상 세포"로도 지칭될 수 있고 본원에서 암 세포가 아닌 세포를 지칭하며, 바람직하게는 건강 세포는 본원에서 상기 TA 제시 세포를 둘러싸는 조직의 세포를 지칭한다. 바람직하게는, 상기 TA가 바이러스 또는 세균 항원성 펩티드인 경우, 상기 건강 세포는 바람직하게는 질환에 걸리지 않았고, 즉 상기 각각의 바이러스 또는 세균의 세균 또는 바이러스 감염이 없다. 그러나, 일부 경우, 또한, 건강 세포는 그의 표면에서 상기 TA 펩티드/MHC 복합체, 예를 들어, 상기 TAA 펩티드/MHC 복합체, 예컨대 TAA-C/MHC 복합체를 발현 및 제시한다. 전형적으로, 본 발명의 맥락의 건강 세포에서, 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 상기 TA 펩티드/MHC 복합체는 TA 제시 세포, 예컨대 암 세포에 비해 소량(복제 수)으로 제시된다.

[0372] 따라서, 한 구현예에서, 상기 건강 세포는 5000 미만, 1000 미만, 500 미만, 100 미만, 50 미만, 20 미만, 10 미만의 TA/MHC 복제 수, 바람직하게는 TAA/MHC 복제 수, 예컨대 TAA-C/MHC 복제 수, 바람직하게는 10 미만의 TAA/MHC 복제 수, 바람직하게는 0 내지 10의, 예컨대 0 내지 5의 TAA/MHC 복제 수를 가진다.

[0373] 건강 세포는 바람직하게는 성상 세포, GABA 뉴런, 심근세포, 심장 미세혈관 내피 세포, 연골 세포, 관상 동맥 내피 세포, 진피 미세혈관 내피 세포, 중간엽 줄기 세포, 비점막 상피 세포, 말초 혈액 단핵 세포, 폐동맥 평활근 세포, 바람직하게는 GABA 뉴런, 심근세포, 심근 미세혈관 내피 세포, 연골 세포, 관상 동맥 내피 세포, 비점막 상피 세포, 말초 혈액 단핵 세포, 폐동맥 평활근 세포로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0374] 한 구현예에서, 상기 항원 결합 단백질은 TA/MHC 복합체 제시 세포, 예컨대 TA-C/MHC 복합체 제시 세포, 예를 들어, MAGE-A/MHC 복합체 제시 세포에 대한 EC_{50}이 건강 세포, 바람직하게는 성상 세포, GABA 뉴런, 심근 세포, 심장 미세혈관 내피 세포, 연골 세포, 관상 동맥 내피 세포, 진피 미세혈관 내피 세포, 중간엽 줄기 세포, 비점막 상피 세포, 말초 혈액 단핵 세포, 폐동맥 평활근 세포, 바람직하게는 GABA 뉴런, 심근세포, 심근 미세혈관 내피 세포, 연골 세포, 관상 동맥 내피 세포, 비점막 상피 세포, 말초 혈액 단핵 세포, 폐동맥 평활근 세포로 구성되는 군으로부터 선택되는 건강 세포에 대한 EC_{50} 값보다 1000배 이상, 15000배 이상, 9000배 이상 낮다.

[0375] 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질은 높은 안정성 프로파일을 갖는다.

[0376] 본원에서 "안전성 프로파일"은 정상 건강 조직 세포로부터 또는 유사한 펩티드 제시 세포로부터 종양 세포를 구분하는 능력을 지칭한다. 당업계에서, 상기 안전성 프로파일은 안전성 범위를 사용하여 설명된다.

[0377] 본원에서 "안전성 범위" 또는 "치료적 범위"는 종양 세포주에서 100% 세포독성 유도에 필요한 화합물의 반수 최대 농도를 100% 세포독성 정상 조직 세포 유도에 필요한 화합물의 반수 최대 농도와 비교하는 인자를 지칭한다. 관심 항원 결합 단백질에 대하여, 종양 세포주의 결정된 EC_{50}이 1 pM이고 예를 들어, 일차 세포의 결정된 EC_{50} 값이 1000 pM인 경우, 상기 종양 세포주의 EC_{50} 값은 상기 일차 세포의 EC_{50}보다 1000배 작기 때문에 상기 안전성 범위는 1000이다.

[0378] 본 발명의 이중특이성 항원 결합 세포는 정상 조직 세포에 대한 EC_{50} 값보다 100배 이상, 500배 이상, 1000배 이상, 2000배 이상, 3000배 이상, 4000배 이상, 5000배 이상, 6000배 이상 낮은 TA/MHC 복합체 제시 세포, 바람직하게는 TAA/MHC 복합체 제시 세포, 예컨대 TAA-C/MHC 세포에 대한 EC_{50}, 예컨대 정상 조직 세포에 대한 EC_{50} 값보다 500 내지 12000배, 바람직하게는 1000 내지 10000배 낮은 TA/MHC 복합체 제시 세포, 바람직하게는

TAA/MHC 복합체 제시 세포, 예컨대 TAA-C/MHC 복합체 제시 세포에 대한 EC_{50}을 갖는다.

[0379] EC_{50}이 계산될 수 없는 경우, 상기 안전성 범위는 또한 각각 표적 세포 및 정상 조직의 세포 상에서 TCER®-분자의 "최저 관찰 효과 수준"(LOEL)의 비율을 계산하여 결정될 수 있다.

[0380] 본원에서 "LOEL"은 컷오프 값 상에서 반응을 갖는 제1 TCER® 농도로 정의된다. 상기 컷오프는 모든 분석 웰 내에서 상기 분석 배경(추가 TCER 분자를 갖지 않는 건강 조직 세포 및 PMBC의 공동 배양) 및 표준 편차 3배의 합으로 정의된다.

[0381] 한 구현예에서, 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질은 정상 세포에 대한 LOEL보다 100배 이상, 500배 이상, 1000배 이상, 2000배 이상, 3000배 이상, 4000배 이상, 5000배 이상, 6000배 이상 낮은 TA/MHC 복합체 제시 세포, 바람직하게는 TAA/MHC 복합체 제시 세포, 예컨대 TAA-C/MHC 세포에 대한 LOEL, 예컨대 정상 세포에 대한 LOEL보다 500 내지 12,000배, 바람직하게는 1,000 내지 10,000배 낮은 TA/MHC 복합체 제시 세포, 바람직하게는 TAA/MHC 복합체 제시 세포, 예컨대 TAA-C/MHC 복합체 존재 세포에 대한 LOEL을 갖는다.

[0382] 한 구현예에서, 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질은 유사한 펩티드/MHC 제시 세포에 대한 EC_{50} 값보다 5배 이상, 10배 이상, 20배 이상, 50배 이상, 100배 이상, 500배 이상, 1000배 이상, 2,000배 이상, 3,000배 이상, 4,000배 이상, 5000배 이상, 6,000배 이상 낮은 TAA-C/MHC 복합체 제시 세포, 바람직하게는 TAA/MHC 복합체 제시 세포, TAA-C/MHC 복합체 제시 세포에 대한 EC_{50}을 갖고, 여기서 EC_{50}는 바람직하게는 유도 세포 독성, 예컨대 유사한 펩티드/MHC 제시 세포에 대한 EC_{50} 값보다 500 내지 12,000배, 바람직하게는 1,000 내지 12000인 TA/MHC 복합체 제시 세포, 바람직하게는 TAA/MHC 복합체 제시 세포에 대한 EC_{50}에 관하여 결정된다.

[0383] 또한, 본 발명의 맥락에서 "유사한 펩티드"는 "표적 외"로 지칭되고 전형적으로 길이가 8개 내지 16개의 아미노산을 포함하는 펩티드와 관련된다. 본 발명의 맥락에서 상기 유사한 펩티드는 전형적으로 MHC 제시된다. 또한, 본 발명의 맥락에서 유사한 펩티드는 상기 TA 항원 펩티드의 아미노산 서열과 유사한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되고, 본 발명의 맥락에서 하나의 바람직한 예시에서, 펩티드는, 상기 TA 항원 펩티드의 에피톱과 비교하여, 에피톱을 포함하고, 여기서 상기 TA 항원 펩티드의 에피톱과 비교하여 상기 에피톱의 적어도 하나, 예컨대 적어도 1, 2 또는 3개, 바람직하게는 1, 2, 또는 3개, 더 바람직하게는 1개의 아미노산이 치환된다. 상기 서열 유사성 때문에, 유사한 펩티드는 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질에 의해 결합될 수 있으며, 상기 시나리오에서, 예를 들어, 상기 유사한 펩티드가 MHC 단백질에 의해 제시되고 따라서 이중특이성 항원 결합 단백질에 의해 결합되는 경우, 주어진 이중특이성 항원 결합 단백질의 유사한 펩티드에 결합하는 능력은 바람직한 작용기 세포 반응을 야기하는 것이 아니라 유해 반응을 야기할 수 있다. 그러한 유해 반응은 "종양 외" 부작용, 예컨대 문헌[Lowdell *et al.*, Cytotherapy, published on December 4, 2018, page 7]에서 검토된 바와 같은 정상 조직의 펩티드와 교차반응된 특이적 TCR의 교차반응성일 수 있다. 본 발명의 맥락에서 유사한 펩티드는 예를 들어, 상기 TA 항원 펩티드, 예컨대 MAG-003에 대한 높은 서열 유사성(유사성 BLAST 검색)을 기반으로 하여, 예를 들어, 정상 조직-제시 HLA-클래스 1 결합 펩티드(XPRESIDENT 데이터베이스), 예컨대 MAGE-A의 경우에서 HLA-A*02 결합 펩티드의 데이터베이스에서 선택될 수 있다. 상기 유해 반응 때문에, 따라서, 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질은 유사한 펩티드를 제시하는 정상 조직 세포에 대한 세포독성을 방지하기 위해 조작된다.

[0384] 본원에서 "유사한 펩티드/MHC 제시 세포"는 그의 세포 표면 유사한 펩티드/MHC 복합체 상에서 제시하는 세포를 의미한다.

[0385] 한 구현예에서, 상기 유사한 펩티드/MHC 제시 세포는 50 초과, 100 초과, 150 초과, 200 초과, 300 초과, 600 초과, 800 초과, 1000 초과, 1500 초과, 2000 초과의 유사한 펩티드/MHC 복제 수, 바람직하게는 50 내지 5000의 TAA/MHC 복제 수를 갖는다.

[0386] 한 구현예에서, 상기 유사한 펩티드/MHC 제시 세포는 MAGE-A/MHC 복합체 제시 세포이며, 50 초과, 80 초과, 100 초과, 120 초과, 150 초과, 300 초과, 400 초과, 600 초과, 800 초과, 1000 초과, 1500 초과, 2000 초과의 MAGE-A/MHC 복합체 복제 수, 바람직하게는 50 내지 2000, 예컨대 80 내지 2000, 예컨대 100 내지 2000, 예를 들어, 120 내지 2000의 MAGE-A/MHC 복제 수를 갖는다.

[0387] 한 구현예에서, 상기 TA 항원 펩티드는 상기 Mage-A 항원 펩티드이고 상기 유사한 펩티드는 서열 식별 번호: 269의 아미노산 서열로 구성되는 RABGAP1L-001, 서열 식별 번호: 270의 아미노산 서열로 구성되는 AXIN1-001,

서열 식별 번호: 271의 아미노산 서열로 구성되는 ANO5-001, 서열 식별 번호: 272의 아미노산 서열로 구성되는 TPX2-001, 서열 식별 번호: 273의 아미노산 서열로 구성되는 SYNE3-001, 서열 식별 번호: 274의 아미노산 서열로 구성되는 MIA3-001, 서열 식별 번호: 275의 아미노산 서열로 구성되는 HERC4-001, 서열 식별 번호: 276의 아미노산 서열로 구성되는 PSME2-001, 서열 식별 번호: 277의 아미노산 서열로 구성되는 HEATR5A-001, 서열 식별 번호: 278의 아미노산 서열로 구성되는 CNOT1-003, 서열 식별 번호: 279의 아미노산 서열로 구성되는 TEP1-003, 서열 식별 번호: 281의 아미노산 서열로 구성되는 ZFC-001 및 서열 식별 번호: 280의 아미노산 서열로 구성되는 PITPNM3-001 펩티드로 구성되는 목록에서 선택된다.

[0388] 따라서, 한 구현예에서, 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질은 상기 유사한 펩티드가 MHC 단백질을 가진 복합체에 있는, 바람직하게는 HLA-A*02를 가진 복합체에 있는 경우 RABGAP1L-001, AXIN1-001, ANO5-001, TPX2-001, SYNE3-001, MIA3-001, HERC4-001, PSME2-001, HEATR5A-001, CNOT1-003, TEP1-003, PITPNM3-001, ZFC-001 바람직하게는 HEATR5A-001, HERC4-001 및 ZFC-001으로 구성된 펩티드의 군으로부터 선택된 적어도 하나의 유사한 펩티드, 예컨대 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 예컨대 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 바람직하게는 적어도 3개 또는 3개 또는 모든 유사한 펩티드에 결합하지 않거나 또는 유의하게 결합하지 않는다.

[0389] 본원의 유사한 펩티드의 맥락에서 및 이중특이성 항원 결합 단백질의 맥락에서 "유의하게 결합하지 않음"은 더 낮은 결합 신호 및/또는 더 높은 K_D 값을 특징으로 한다. 예를 들어, 본 발명의 맥락에서, 상기 이중특이성 항원 결합 단백질은 동일한 실험 설정 및 동일한 이중특이성 항원 결합 단백질 농도에서 동일한 이중특이성 항원 결합 단백질의 MAGE-A 항원 펩티드/MHC 복합체에 대한 결합 반응의 50% 미만, 45% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 20% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 3 % 미만인 적어도 하나의 유사한 펩티드/MHC 복합체에 대한 결합 반응을 가지고 및/또는, 예를 들어, 본 발명의 맥락에서, 상기 이중특이성 항원 결합 단백질은 본원에서 설명된 바와 같이 상기 특이적 항원, 즉 상기 MAGE-A 항원 펩티드/MHC 복합체에 대한 친화도와 비교하여 감소된 친화도로 적어도 하나의 유사한 펩티드/MHC 복합체에 결합하고 여기서 상기 각각의 유사한 펩티드에 대한 각각의 K_D는 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100배, 바람직하게는 20 내지 100배, 더 바람직하게는 30 내지 100배, 예컨대 40 내지 100배, 전형적으로 40 내지 50배 증가된다. 예를 들어, 상기 이중특이성 항원 결합 단백질이 1 nM의 K_D로 상기 복합체 MAG-003/MHC에 결합하고 상기 이중특이성 항원 결합 단백질이 예를 들어, 100 nM의 K_D로 RABGAP1L-001/MHC의 복합체에 결합하는 경우. 그 후, 상기 이중특이성 항원 결합 단백질은 100배 증가되는 K_D를 갖고 따라서 100배 감소되는 친화도로 RABGAP1L-001/MHC에 결합한다. 상기 예시에서, 결합 반응, 해리 상수 및 결합 친화성은 바람직하게는, 예를 들어, 예시 4 또는 예시 5에서 설명된, 생체층 간섭측정법을 사용하여 측정된다.

[0390] 상기 예시에서 더 볼 수 있는 바와 같이, 특히 예시 1 및 도 8에서, 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질은 용해성일 뿐만 아니라 10 mg/L 초과(세포 배양), 20 mg/L 초과 또는 심지어 40 mg/L의 양으로 일시적 발현에서 CHO 세포에서 발현될 수 있다. 따라서, 한 구현예에서, 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질은 높은 수율로 숙주 세포에서 발현될 수 있으며, 여기서 바람직하게는 상기 숙주 세포는 CHO 세포이고 여기서 바람직하게는 상기 수율은 10 초과, 15, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 35, 40, 45 mg/L(세포 배양) 초과, 예컨대 5 내지 50, 5, 내지 45, 5 내지 40, 5 내지 35, 10 내지 35, 10 내지 30, 10 내지 25, 10 내지 20 mg/L이다. 한 예시에서, 상기 항원 결합 단백질은 일시적 형질주입 CHO-S 세포에서 발현되고 여기서 상기 세포는 총 부피 320 mL의 GE Healthcare™의 배지에서 37℃에서 $4x10^6$/mL의 밀도로 T=0에서 배양된다. 1일 공급 용액(CellBoost 7a 및 b)이 첨가된 후, 온도를 32℃까지 낮췄다. 12일의 총 배양 시간 및 총 3회 공급 후에 상기 세포 및 따라서 상기 항원 결합 단백질을 수확하였다.

[0391] 예시에서 더 볼 수 있는 바와 같이, 본 발명자들은 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질이 참조 단백질에 비해, 예를 들어, 서열 식별 번호: 39의 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되는 VH 도메인 및 서열 식별 번호: 38의 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되는 VL 도메인 또는 서열 식별 번호: 137의 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되는 VH 도메인 및 서열 식별 번호: 145의 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되는 VL 도메인, 바람직하게는 서열 식별 번호: 137의 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되는 VH 도메인 및 서열 식별 번호: 145의 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되는 VL 도메인을 포함하는 항원 결합 단백질과 비교하여 유사한 또는 심지어 개선된 안정성을 갖는다.

[0392] 따라서, 한 구현예에서, 본원의 항원 결합 단백질은, 선택적으로, 참조 단백질과 비교하여, 비슷한 또는 개선된 안정성을 갖는다. 본 발명의 맥락에서, 비슷한 또는 개선된 안정성은 예를 들어 열 응력에 노출된 경우 비슷한

또는 증가된 물리적 안정성을 지칭한다. 본원의 신규 개발 항원 결합 단백질은 참조 항원 결합 단백질에 비해 응력 조건, 특히 열 응력에 비슷하게 또는 더 견딜 수 있고, 여기서 상기 항원 결합 단백질은 바람직하게는 동일한 형식이다.

[0393] 본 발명의 맥락에서 용어 "안정성"은 물리적 안정성을 지칭하고 당업계에 설명되고 예를 들어, Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) 및 Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993)에서 검토된 다양한 분석 기법을 사용하여 정량적으로 및/또는 정성적으로 평가될 수 있다. 본 발명의 맥락에서, 상기 방법은 (예를 들어, 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여, 탁도 측정에 의해 및/또는 외관 검사에 의해) 특히 응집체 형성의 평가를 지칭한다. 안정성을 측정하기 위해, 본원의 항원 결합 단백질을 포함하는 샘플은 안정성 연구에서 테스트될 수 있으며, 여기서 샘플은 선택된 기간 동안 응력 조건에 노출된 후 적절한 분석 기법을 사용한 화학적 및 물리적 안정성의 정량적 및 선택적으로 정성적 분석이 수행된다.

[0394] 한 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 단백질은 예컨대, 특정 시간 기간 동안 응력 조건에 노출될 경우, 예컨대, 14일 동안 40℃의 온도에 노출될 경우 물리적으로 안정하다.

[0395] "물리적 안정성"은, 본 발명의 맥락에서, 어떠한 응집, 침전 및/또는 변성의 징후가 없는 항원 결합 단백질을 지칭한다.

[0396] 상기 물리적 안정성에 접근하는 방법은 예를 들어, 크기 배제 크로마토그래피(SEC), 동적 광 산란(DLS), 차광법(LO) 및 색상 및 투명도이다.

[0397] "응집의 징후 없음"은 예를 들어, 완충액, 예컨대 PBS에서 응력 조건, 예컨대 14일 동안 40℃의 온도에 노출된 후, 상기 항원 결합 단백질을 포함하는 샘플이 완충제, 예컨대 PBS에서 SEC, 예컨대 SEC-HPLC로 측정되는 경우 80% 초과, 86% 초과, 88% 초과, 90% 초과, 92% 초과, 94% 초과, 96% 초과, 97% 초과, 98% 초과, 99% 초과의 단량체 함량, 예컨대 94% 내지 99%, 95% 내지 99%, 96% 내지 99%, 97% 내지 99% 단량체 함량을 가지는 것을 의미한다.

[0398] 따라서, 한 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 단백질은, 예를 들어, 참조 단백질과 비교하여, 동일한 또는 감소된 응집을 가진다.

[0399] 크기 배제 크로마토그래피(SEC)의 경우, 단량체 함량의 1%, 2%, 3%, 4%, 바람직하게는 1 또는 2%, 더 바람직하게는 2%의 차이는 상기 사용된 컬럼, 작동 압력, 및 상기 완충제의 속도에 따라 상기 테스트된 조건하에서 본 발명의 맥락에서 유효하게 다르다고 고려된다.

[0400] 이는 상기 참조 항원 결합 단백질이 96%의 단량체 함량을 갖고 본 발명의 항원 결합 단백질이 98%의 단량체 함량을 갖는 경우, 본 발명의 항원 결합 단백질의 단량체 함량은 유의하게 상이하며 따라서 동일한 조건에서 측정되는 경우 상기 참조 항원 단백질과 비교하여 유의하게 증가한다는 것을 의미한다.

[0401] **핵산, 벡터 및 재조합 숙주 세포**

[0402] 본 발명의 추가 목적은 상기 본원에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질을 인코딩하는 서열을 포함하거나 이로써 구성되는 단리된 핵산 서열과 관련이 있다.

[0403] 전형적으로, 상기 핵산은 DNA 또는 RNA 분자이며, 이는 임의의 적합한 벡터, 예컨대 플라스미드, 코스미드, 에피솜, 인공 염색체, 파지 또는 바이러스 벡터에 포함된다.

[0404] 용어 "벡터", "복제 벡터" 및 "발현 벡터"는 DNA 또는 RNA 서열(예를 들어, 외래 유전자)이 숙주 세포로 도입될 수 있도록 하여 상기 숙주를 형질전환하고 상기 도입 서열의 발현(예를 들어, 전사 및 번역)을 촉진하는 운반체를 의미한다.

[0405] 따라서, 본 발명의 추가 목적은 본 발명의 핵산을 포함하는 벡터와 관련이 있다.

[0406] 그러한 벡터는 조절 요소, 예컨대 프로모터, 인핸서, 터미네이터 등을 포함하여 대상체에 대한 투여 시 상기 폴리펩티드의 발현을 야기 또는 지시할 수 있다. 동물에 대한 상기 발현 벡터에서 사용된 프로모터 및 인핸서의 예시는 SV40의 초기 프로모터 및 인핸서(Mizukami T. et al. 1987), 몰로니 마우스 백혈병 바이러스의 LTR 프로모터 및 인핸서(Kuwana Y et al. 1987), 면역글로불린 H 사슬의 프로모터(Mason JO et al. 1985) 및 인핸서(Gillies SD et al. 1983) 등을 포함한다.

[0407] 상기 인간 항체 C 영역을 인코딩하는 유전자가 삽입 및 발현될 수 있는 한, 동물 세포에 대한 임의의 발현 벡터가 사용될 수 있다. 적합한 벡터의 예시는 pAGE107(Miyaji H et al. 1990), pAGE103(Mizukami T et al. 1987), pHSG274(Brady G et al. 1984), pKCR(O'Hare K et al. 1981), pSG1 beta d2-4-(Miyaji H et al. 1990) 등을 포함한다. 플라스미드의 다른 예시는 복제의 원본을 포함하는 복제 플라스미드 또는 편입형 플라스미드, 예컨대, pUC, pcDNA, pBR 등을 포함한다.

[0408] 바이러스 벡터의 다른 예시는 아데노바이러스, 레트로바이러스, 헤르페스 바이러스 및 AAV 벡터를 포함한다. 그러한 재조합 바이러스는 같이 당업계에 알려진 기법에 의해, 예컨대 포장 세포의 형질주입에 의해 또는 도움 플라스미드 도는 바이러스를 사용한 일시적 형질주입에 의해, 생성될 수 있다. 바이러스 포장 세포의 전형적인 예시는 PA317 세포, PsiCRIP 세포, GPenv+ 세포, 293 세포 등을 포함한다. 그러한 복제-결함 재조합 바이러스를 생성하는 상세한 프로토콜은 예를 들어, WO 95/14785, WO 96/22378, US 5,882,877, US 6,013,516, US 4,861,719, US 5,278,056 및 WO 94/19478에서 발견할 수 있다.

[0409] 용어 "바이러스 벡터"는 적어도 하나의 바이러스 기원 요소를 포함하고 바이러스 벡터 입자로 포장되는 능력을 가지며, 적어도 하나의 외인성 핵산을 인코딩하는 핵산 벡터 구조체를 지칭한다. 상기 벡터 및/또는 입자는 임의의 핵산을 시험관내(in vitro) 또는 생체내(in vivo)의 세포로 전이시키기 위한 목적을 위해 이용될 수 있다. 다수의 바이러스 벡터 형태는 당업계에 알려져 있다. 용어 '비리온'은 단일 감염성 바이러스 입자를 지칭하기 위해 사용된다. 또한, "바이러스 벡터, "바이러스 벡터 입자" 및 "바이러스 입자"는 DNA 또는 RNA 코어와 상기 세포 외부에 존재하는 바와 같은 단백질 외피를 가지는 완전한 바이러스 입자를 지칭한다. 예를 들어, 바이러스 벡터는 아데노바이러스, 폭스바이러스, 알파바이러스, 아레나바이러스, 플라바이러스, 랍도바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 헤르페스바이러스, 파라믹소바이러스 또는 피코르나바이러스로부터 선택될 수 있다.

[0410] 바이러스는 천연 발생 바이러스뿐만 아니라 인공 바이러스도 지칭할 수 있다. 본 발명의 일부 구현예에 따른 바이러스는 각각 외피 또는 비외피 바이러스일 수 있다. 파보바이러스(예를 들어, AAV)는 비외피 바이러스의 예이다. 바람직한 구현예에서, 상기 바이러스는 외피 바이러스일 수 있다. 바람직한 구현예에서, 상기 바이러스는 레트로바이러스 및 특히 렌티바이러스일 수 있다. 진핵 세포의 바이러스 감염을 촉진하는 바이러스 외피 단백질은 수포성 구내염 바이러스(VSV-G)에서 유래한 외피 당단백질(GP)을 사용하여 슈도 유형(pseudotyping)화된 HIV-1 유래 렌티바이러스 벡터(LV), 변형 고양이 내인성 레트로바이러스(RD114TR) 및 변형 긴팔 원숭이 백혈병 바이러스(GALVTR)를 포함할 수 있다. 상기 외피 단백질은, 아데노 연관 바이러스(AAV)를 포함한, 파보바이러스와 같은, 다른 바이러스의 유입을 효율적으로 촉진할 수 있으며, 이로 인해 그의 광범위한 효율성을 보여준다. 예를 들어, 다른 바이러스 외피 단백질은 몰로니(Moloney) 쥐 백혈병 바이러스(MLV) 4070 env(Merten et al., *J. Virol*. 79:834-840, 2005에서 설명된 바와 같음; 이의 내용은 참조로서 본원에 포함됨), RD114 env, 키메라 외피 단백질 RD114프로 또는 RD프로(이는 RD114의 R 펩티드 절단 서열을 HIV-1 매트릭스/캡시드(MA/CA) 절단 서열로 대체하여 구성된 RD114-HIV 키메라임, Bell et al. *Experimental Biology and Medicine* 2010; 235: 1269-1276에서 설명된 바와 같음; 이의 내용은 참조로서 본원에 포함됨), 바큘로바이러스 GP64 env(Wang et al. *J. Virol*. 81:10869-10878, 2007에서 설명된 바와 같음; 이의 내용은 참조로서 본원에 포함됨) 또는 GALV env(Merten et al., *J. Virol*. 79:834-840, 2005에서 설명된 바와 같음; 이의 내용은 참조로서 본원에 포함됨), 또는 그의 유도체를 포함하여 사용될 수 있다.

[0411] 본 발명의 추가 목적은 핵산 및/또는 본원에 따른 벡터를 사용한 형질전환, 형질도입 또는 형질주입되는 숙주 세포와 관련이 있다.

[0412] 용어 "형질전환"은 본래 세포막을 통한 세포에 의한 상기 유전 물질, 예컨대, 핵산, 예를 들어, DNA 또는 RNA의 흡수를 수반하는 숙주 세포에 대한 자연적으로 발생하는 유전자 전이의 과정을 지칭하며, 이는 상기 숙주 세포가 상기 도입된 세포 또는 서열을 발현하여 바람직한 물질, 전형적으로 상기 도입된 세포 또는 서열에 의해 코딩된 단백질 또는 효소를 생성하도록 한다. 자연 형질전환 및 인공 또는 유도 형질전환으로 불리는 2가지 유형이 있다. 형질전환의 인공 또는 유도 방법은 실험실 조건하에서 수행된다.

[0413] 형질전환의 과정에 의해 외래 핵산, 예컨대 DNA 또는 RNA를 수용 및 발현하는 숙주 세포는 "형질전환"된 것이다.

[0414] 용어 "형질주입"은 상기 숙주 세포가 상기 외래 유전 물질을 수용 가능하도록 하는 상기 숙주 세포의 세포 표면상의 기공의 생성을 수반하는 유전자 전이의 방식을 지칭한다. 전형적으로, 형질주입은 진핵 세포, 예컨대 곤충 또는 포유동물 세포의 형질전환을 지칭한다. 화학적 매개 형질주입은 예를 들어, 인산칼슘 또는 양이온성 중합체 또는 리포솜의 사용을 수반한다. 비화학적 매개 형질주입 방법은 전형적으로 전기천공, 초음파 천공, 임페일

펙션(impalefection), 광학 형질주입 또는 유체역학적 전달이다. 입자 기반 형질주입은 나노입자가 상기 핵산을 숙주 세포로 전이시키기 위해 사용되는 유전자 총(gene gun) 기법 또는 마그네토펙션(magnetofection)이라고 지칭되는 다른 방법을 사용한다. 뉴클레오펙션 및 열 충격 사용은 성공적인 형질주입을 위한 다른 발전된 방법이다. 형질주입 방법을 통해 외래 핵산을 수용하는 숙주 세포는 "형질주입"된 것이다.

[0415] 용어 "형질도입"은 일반적으로 바이러스 또는 바이러스 벡터에 의해 외래 핵산, 예컨대 DNA 또는 RNA를 세포로 전이시키는 것와 관련이 있는 것으로 이해된다. 바이러스 또는 바이러스 벡터에 의해 외래 핵산, 예컨대 DNA 또는 RNA를 수용 또는 발현하는 숙주 세포는 "형질도입"된 것이다.

[0416] 일부 구현예에서, 세포는 US20190216852에서 설명된 방법을 사용하여 형질도입되고, 이의 내용은 그 전체가 참조로서 본원에 포함된다.

[0417] 본 발명의 핵산은 적합한 발현 시스템에서 본 발명의 재조합 항원 결합 단백질을 생성하기 위해 사용될 수 있다.

[0418] 용어 "발현 시스템"은, 예를 들어, 상기 벡터에 의해 전달되고 상기 숙주 세포에 도입된 외래 DNA에 의해 코딩된 단백질의 발현을 위한 적합한 조건하의 숙주 세포 또는 호환 가능한 벡터를 의미한다.

[0419] 통상적인 발현 시스템은 *E. coli* 숙주 세포 및 플라스미드 벡터, 곤충 숙주 세포 및 바큘로바이러스 벡터 및 포유동물 숙주 세포 및 벡터를 포함한다. 숙주 세포의 다른 예시는 원핵 세포(예컨대, 세균) 및 진핵세포(예컨대, 효모 세포, 포유동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포 등)를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 특이적 예시는 *E. coli, 클루이베로마이세스(Kluyveromyces)* 또는 *사카로미세스(Saccharomyces)* 효모, 포유동물 세포주(예를 들어, 베로(Vero) 세포, CHO 세포, 3T3 세포, COS 세포 등)뿐만 아니라 1차 또는 확립된 포유동물 세포주(예를 들어, 림프모세포, 섬유모세포, 배아 세포, 상피 세포, 신경 세포, 지방세포 등으로부터 생성됨)를 포함한다. 또한, 예시는 마우스 SP2/0-Ag14 세포(ATCC CRL1581), 마우스 P3X63-Ag8.653 세포(ATCC CRL1580), 이수소엽산 환원효소 유전자(이하 "DHFR 유전자"로 지칭됨)에 결함이 있는 CHO 세포(Urlaub G et al; 1980), 래트 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 세포(ATCC CRL1662, 이하 "YB2/0 세포"로 지칭됨) 등을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 YB2/0 세포가 바람직할 수 있고, 이는 키메라 또는 인간화 항체의 ADCC 활성이 상기 세포가 발현될 경우 향상되기 때문이다.

[0420] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 이중특이성 항원 인식 구조체를 포함하는 숙주 세포와 관련이 있다. 특이적으로, 본 발명의 숙주 세포는 상기 본원에 설명된 바와 같이 핵산 또는 벡터를 포함한다. 상기 숙주 세포는 진핵 세포, 예를 들어, 식물, 동물, 진균 또는 조류 세포일 수 있으며, 또는 원핵 세포, 예를 들어, 세균 또는 원생동물일 수 있다. 상기 숙주 세포는 배양 세포 또는 일차 세포, 즉, 유기체, 예를 들어, 인간으로부터 직접 단리된 세포이다. 상기 숙주 세포는 부착 세포 또는 현탁 세포, 즉 현탁액에서 성장한 세포이다. 이중특이성 항원 결합 단백질, 예컨대 이중특이성 TCR, 폴리펩티드 또는 단백질 생성의 목적을 위해, 상기 숙주 세포는 바람직하게는 포유동물 세포이다.

[0421] 하나의 특정 구현예에서, 상기 숙주 세포는 줄기 세포, 바람직하게는 중간엽 줄기 세포이다.

[0422] 상기에 따라, 한 구현예에서, 본 발명은 상기 본원에서 정의된 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질, 또는 본 발명의 핵산 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포에 대한 것이며, 여기서 상기 숙주 세포는 바람직하게는 a) 중간엽 줄기 세포 또는 b) 재조합 발현을 위한 세포, 예컨대 중국 햄스터 난소(CHO) 세포이다.

[0423] 특히, 본 발명의 일부 이중특이성 항원 결합 단백질의 발현에 대해, 상기 발현 벡터는 상기 제1 폴리펩티드, 예컨대 항체 중쇄 또는 알파 사슬을 인코딩하는 유전자 및 제2 폴리펩티드, 예컨대 항체 경쇄 또는 베타 사슬을 인코딩하는 유전자가 별개의 벡터 상에 존재하는 유형 또는 두 유전자 모두 동일한 벡터 상에 존재하는 유형일 수 있다(종렬형). 단백질 발현 벡터에 결합하는 이중특이성 항원의 구성의 용이함, 동물 세포로의 도입의 용이함 및 동물 세포에서 항체 H 및 L 사슬의 발현 수준의 균형에 관하여, 상기 종렬 구조의 인간화 항체 발현 벡터는 바람직할 수 있다(Shitara K et al. J Immunol Methods. 1994 Jan. 3;167(1-2):271-8). 종렬형 인간화 항체 발현 벡터의 예는 pKANTEX93(WO 97/10354), pEE18 등을 포함한다.

[0424] 한 구현예에서, 그러한 재조합 숙주 세포는 본 발명의 적어도 하나의 항원 결합 단백질의 생성을 위해 사용될 수 있다.

[0425] **본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질을 생성하는 방법**

[0426] 또한, 본 발명은 상기 본원에서 정의된 바와 같은 항원 결합 단백질을 생성하는 방법과 관련이 있으며, 이는

[0427] a. 적합한 숙주 세포를 제공하는 단계,

[0428] b. 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질을 인코딩하는 코딩 서열을 포함하는 유전자 구조체를 제공하는 단계,

[0429] c. 상기 유전자 구조체를 상기 적합한 숙주 세포로, 바람직하게는 시험관내(*in vitro*) 또는 체외(*ex vivo*)에서, 도입하는 단계,

[0430] d. 상기 적합한 숙주 세포에 의해 상기 유전자 구조체를 발현하는 단계, 및 선택적으로

[0431] e. 상기 항체를 발현 및/또는 분비하는 상기 세포를 선택하는 단계를 포함한다.

[0432] 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질은 해당하는 섹션에서 상기 본원에 정의된 바와 같다.

[0433] 본원의 "유전자 구조체"는 숙주에서 코딩 영역을 발현하게 하는 핵산을 의미하고, 따라서 상기 본원에서 설명된 또는 RNA인 핵산, 예컨대 벡터를 지칭한다.

[0434] 하나의 특정 구현예에서, 상기 방법은 상기 적합한 숙주 세포 상에서 상기 이중특이성 항원 인식 구조체의 세포 표면을 나타내는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0435] 다른 바람직한 구현예에서, b)의 상기 유전자 구조체는 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함한다. 그러한 핵산은 '핵산, 벡터 및 재조합 숙주 세포' 섹션에서 상기 본원에서 정의된 바와 같다.

[0436] 관련 구현예에서, 상기 유전자 구조체는 상기 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터 서열을 포함하는 발현 구조체이다.

[0437] 관련 구현예에서, 상기 유전자 구조체는 형질전환, 형질도입, 또는 형질주입을 사용하여 상기 적합한 숙주로 도입된다. 형질전환, 형질도입, 또는 형질주입은 상기 본원의 섹션에서 정의된 바와 같다.

[0438] 바람직하게는, 상기 유전자 구조체를 상기 적합한 숙주 세포로 도입하기 위한 형질도입 시스템은 핵산, 벡터 및 재조합 숙주 세포 섹션에서 상기 본원에서 설명된 바와 같은 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터 시스템이다. 그러한 시스템은 당업자에게 널리 알려져 있다.

[0439] 한 구현예에서, 상기 방법은 상기 이중특이성 항원 결합 단백질의 상기 숙주 세포로부터의 단리 및 정제 및, 선택적으로, T세포에서의 상기 이중특이성 항원 결합 단백질의 재구성을 포함한다.

[0440] 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질은 당업계에 알려진 임의의 기법, 예컨대, 제한없이, 단독 또는 조합으로, 임의의 화학적, 생물학적, 유전학적 또는 효소학적 기법에 의해 생성될 수 있다.

[0441] 폴리펩티드 예컨대, 항체 또는 그의 단편 및 TCR 또는 그의 단편의 생성을 위한 표준 기법은 당업계에 알려져 있으며 상기 기법은 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질을 생성하기 위해 당업자가 사용할 수 있다. 예를 들어, 이는 널리 알려진 고체상 방법을 사용하여, 특히 상업적으로 이용 가능한 펩티드 합성 장치(예컨대, Applied Biosystems(Foster City, California) 제조)를 사용하고 제조업체의 지침을 따라 합성할 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질, 예컨대 항체 또는 그의 단편 및 TCR 또는 그의 단편은 당업계에 널리 알려진 바와 같은 재조합 DNA 기법에 의해 합성할 수 있다. 예를 들어, 단편은 상기 바람직한 (폴리)펩티드를 인코딩하는 DNA 서열의 상기 발현 벡터로의 편입 및 그러한 벡터의 상기 바람직한 폴리펩티드를 발현하는 적합한 진핵 또는 원핵 숙주로의 도입 후 DNA 발현 생성물로서 수득될 수 있으며, 이로부터 그들은 추후 널리 알려진 기법을 사용하여 분리될 수 있다.

[0442] 한 예시에서, 즉 TCER® 이중특이성 분자의 경우에서, V_H 및 V_L 및 가변 알파(Valpha) 및 가변 베타(Vbeta)의 다양한 조합에 대한 DNA 서열 코딩뿐만 아니라 링커에 대한 DNA 서열 코딩은 예를 들어, 유전자 합성에 의해 수득될 수 있다. 초래된 DNA 서열은 예를 들어, 인간 IgG4[등록 번호: K01316] 및 IgG1[등록 번호: P01857]에서 유래된 힌지 영역, C_{H2} 및 C_{H3} 도메인에 대한 발현 벡터 코딩에 대한 프레임에서 더 조작될 수 있다. 조작은 추가 쇄간 이황화물 결합 안정화를 수반하거나 수반하지 않는 놉-인투-홀(knob-into-hole) 변이를 C_{H3}-도메인으로 편입하기 위해; C_{H2}(예를 들어, N297Q 돌연변이)에서 N-글리코실화 부위를 제거하기 위해; F_c-침묵 변이를 유도하기 위해 또는 V_L 및 V_H로 추가적인 이황화 결합 안정화를 유도하기 위해 각각 수행될 수 있으며, 이는 Reiter et

al. (Stabilization of the F_v Fragments in Recombinant Immunotoxins by Disulfide Bonds Engineered into Conserved Framework Regions. Biochemistry, 1994, 33, 5451 - 5459)에 의해 설명된 방법에 따른다.

[0443] 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질은 면역글로불린 정제 절차, 예컨대, 예를 들어, 단백질 A-세파로스, 수산회인회석 크로마토그래피, 겔 전기영동법, 투석 또는 친화도 크로마토그래피로 상기 배양 배지에서 적절하게 분리될 수 있다.

[0444] 한 구현예에서, 본원의 상기 발현 이중특이성 항원 결합 단백질 및 폴리펩티드의 회수는 단백질 A 크로마토그래피, 카파 선택 크로마토그래피 및/또는 크기 배제 크로마토그래피, 바람직하게는 단백질 A 크로마토그래피 및/또는 크기 배제 크로마토그래피, 더 바람직하게는 단백질 A 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토그래피의 수행을 지칭한다.

[0445] 재조합 DNA 및 유전자 형질주입 기법을 수반하는 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질을 생성하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있다(Morrison SL. et al. (1984) 및 특허 문서 US5,202,238; 및 US5,204, 244 참조).

[0446] 또한, 통상적인 재조합 DNA 및 유전자 형질주입 기법에 기반한 인간화 항체 생성을 위한 방법은 당업계에 널리 알려져 있고(예를 들어, Riechmann L. et al. 1988; Neuberger MS. et al. 1985 참조) 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질의 생성에 용이하게 적용될 수 있다.

[0447] 한 예시에서, 본 발명의 재조합 항원 결합 단백질의 발현을 위한 벡터는 모노시스트로닉, 예를 들어, HCMV 유래 프로모터 요소에 의해 제어되는, pUC19-유도체로서 설계될 수 있다. 플라스미드 DNA는 예를 들어, 표준 배양 방법에 따른 E.coli에서 증폭되었고 그 후 시판되는 키트(Macherey & Nagel)를 사용하여 정제되었다. 정제 플라스미드 DNA는 예를 들어, 제조업체의 지침(ExpiCHO™ 시스템; Thermo Fisher Scientific)에 따르거나 전기천공법 시스템(MaxCyte STX)을 사용한 CHO-S세포의 일시적 형질주입을 위해 사용되었다. 형질주입 CHO 세포는 예를 들어, 6 ~ 14일 동안 예를 들어, 32℃ ~ 37℃에서 배양되었고 ExpiCHO™ Feed 또는 Cellboost 7a 및 7b(GE Healthcare™) 용액을 1회 ~ 2회 공급받았다.

[0448] 조건화된 세포 상층액을 예를 들어, Sartoclear Dynamics® Lab Filter Aid(Sartorius)를 이용하여 예를 들어, 여과(0.22 μm)로 정제되었다. 이중특이성 항원 결합 단백질은 예를 들어, 친화도 및 크기 배제 크로마토그래피를 연이어 수행하도록 구비된 Akta Pure 25 L FPLC 시스템(GE Lifesciences)을 사용하여 정제되었다. 친화도 크로마토그래피는 예를 들어, 표준 친화도 크로마토그래피 프로토콜에 따라 단백질 A 또는 L 컬럼(GE Lifesciences) 상에서 수행되었다. 예를 들어, 크기 배제 크로마토그래피는, 예를 들어, Superdex 200pg 16/600 컬럼(GE Lifesciences)을 사용하여 표준 프로토콜에 따라 고순도 단량체 단백질을 수득하기 위해 친화성 컬럼으로부터 용리(pH 2.8) 후 바로 수행될 수 있다. 단백질 농도는 예를 들어, 예상되는 단백질 서열에 따른 계산된 흡광 계수를 사용하여 NanoDrop 시스템(Thermo Scientific) 상에서 결정되었다. 필요한 경우, 농도는 비바스핀(Vivaspin) 장치(싸토리우스(Sartorius))에 의해 조정되었다. 최종적으로, 정제된 분자는 예를 들어, 2 ~ 8℃의 온도에서 약 1 mg/mL 농도로 인산염-완충 식염수에서 보관되었다.

[0449] 정제 이중특이성 항원 결합 단백질의 질은 예를 들어, 뱅퀴시(Vanquish) uHPLC-시스템 내에서 300 mM의 NaCl을 함유한 50 mM 인산염 pH 6.8에서 실행하는, 예를 들어, MabPac SEC-1 컬럼(5 μm, 4x300 mm) 상의 HPLC-SEC로 결정된다.

[0450] **약학적 조성물**

[0451] 본 발명은 추가로 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질, 본 발명의 핵산, 본 발명의 벡터 또는 본 발명의 숙주 세포를 포함하는 약학적 조성물 또는 약학적으로 허용 가능한 담체에 관한 것이다.

[0452] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른, 이중특이성 항원 결합 단백질의 약제로서의 사용에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 본 발명의 약학적 조성물의 약제로서의 사용에 관한 것이다.

[0453] 또한, 본 발명은 약제의 제조에 있어 본 발명에 따른 이중특이성 항원 결합 단백질의 사용 및/또는 본 발명의 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0454] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "약학적 조성물" 또는 "치료적 조성물"은 대상체에 적절하게 투여되는 경우 바람직한 치료 효과를 도입할 수 있는 화합물 또는 조성물을 지칭한다.

[0455] 일부 구현예에서, 또한, 상기 대상체는 환자로 지칭될 수 있다.

[0456] 그러한 치료적 또는 약학적 조성물은 투여 방식과의 적합성을 위해 선택된 약학적으로 또는 생리학적으로 허용

가능한 제형화제와 혼합한, 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질의 치료적 유효량을 포함하거나 치료 제제를 추가로 포함한다.

[0457] 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질은 보통 무균 약학적 조성물의 일부로서 공급되며, 이는 일반적으로 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다.

[0458] "약학적으로" 또는 "약학적으로 허용 가능한"은 적절하게 포유류, 특히 인간에게 투여될 경우 유해 반응, 알레르기 반응 또는 다른 바람직하지 않은 반응을 일으키지 않는 분자 개체 또는 조성물을 지칭한다. 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제는 임의의 유형의 무독성 고체, 반고체 또는 액체 충전물, 희석제, 캡슐화 물질 또는 제형화 보조물질을 지칭한다.

[0459] 또한, "약학적으로 허용 가능한 담체"는 "약학적으로 허용 가능한 희석제" 또는 "약학적으로 허용 가능한 운반체"로 지칭될 수 있고 용매, 증량제, 안정화제, 분산매, 코팅, 항균제 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제 및 기타 생리학적으로 호환 가능한 것을 포함할 수 있다. 따라서, 한 구현예에서, 상기 담체는 수성 담체이다.

[0460] 다른 양태에서, 상기 수성 담체는 본원에 설명된 이중특이성 항원 결합 단백질과 조합될 경우 개선된 성질, 예를 들어, 개선된 용해도, 효능 및/또는 개선된 면역요법을 부여할 수 있다.

[0461] 상기 약학적 조성물의 형태, 투여 경로, 투여량 및 용법은 치료될 병태, 질병의 중증도, 환자의 연령, 체중 및 성별, 치료의 바람직한 지속 기간 등에 따라 달라진다. 상기 약학적 조성물은 (이를 환자에게 투여하는 바람직한 방법에 따른) 임의의 적합한 형태일 수 있다. 이는 단위 투여 형태로 제공될 수 있고, 일반적으로 밀봉 용기에서 제공되며 키트의 일부로서 제공될 수 있다. 그러한 키트는 (필수적인 것은 아니나) 일반적으로 사용 지침을 포함한다. 이는 복수의 상기 단위 투여량 형태를 포함할 수 있다.

[0462] 경험적 고려사항, 예컨대 생물학적 반감기는 상기 투여량의 결정에 기여한다. 투여의 빈도는 요법의 과정에 걸쳐 결정되고 조정될 수 있으며 암 세포 수의 감소, 암 세포 감소의 유지, 암 세포 증식의 감소 또는 상기 암 세포의 사멸에 기반한다. 대안적으로, 상기 이중특이성 항원 결합 단백질의 지속 연속 방출 제제가 적절할 수 있다. 지속 방출을 달성하기 위한 다양한 제형 및 장치는 당업계에 알려져 있다.

[0463] 한 구현예에서, 상기 항원 결합 단백질에 대한 투여량은 1회 이상의 투여를 받은 개체에서 경험적으로 결정된다. 개체에게는 상기 항원 결합 단백질의 증분 투여량이 투여된다. 상기 항원 결합 단백질의 효능을 평가하기 위해, 상기 암 세포 상태의 표지자를 추적할 수 있다. 이는 FACS, 다른 영상화 기법에에 의한 암 세포 증식 및 세포 사멸의 직접 측정; 그러한 측정에 의해 평가되는 바와 같은 건강상의 개선, 또는 허용 가능한 검사에 의해 측정되는 바와 같은 삶의 질 향상 또는 생존 기간 연장을 포함한다. 상기 투여량이 상기 개인, 상기 질환의 단계 및 사용되는 이전 또는 병행 치료에 따라 달라진다는 것이 당업자에게는 명백할 것이다.

[0464] 특히, 상기 약학적 조성물은 운반체를 함유하며, 이는 주사될 수 있는 제형에 대해 약학적으로 허용 가능하다. 이는 등장성, 무균 식염수(모노나트륨 또는 디나트륨 포스페이트, 염화 나트륨, 칼륨, 칼슘 또는 마그네슘 등 및 그러한 염의 혼합물), 또는 건조, 특히 동결 건조 조성물일 수 있으며, 이는 경우에 따라 멸균수 또는 생리식염수 첨가 시 주사 용액을 구성한다.

[0465] 약학적 조성물을 제조하기 위해서, 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질의 유효량이 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 수성 배지에서 용해되거나 확산될 수 있다.

[0466] 주사용으로 적절한 약학적 형태는 무균 수용액 또는 분산제; 참깨 기름, 땅콩 기름 또는 수성 프로필렌 글리콜을 포함하는 제형; 및 무균 주사 용액 또는 분산제의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 모든 경우에서, 상기 형태는 무균 상태여야 하고 용이한 주사 가능성이 존재하는 정도로 유동적이어야 한다. 이는 제조 및 보관 조건하에서 안정해야 하고 미생물, 예컨대 세균 및 진균의 오염 활동을 막도록 보존되어야 한다.

[0467] 유리 염기 또는 약물학적으로 허용 가능한 염으로서의 상기 활성 분자의 용액은 계면활성제, 예컨대 히드록시프로필 셀룰로오스와 적합하게 혼합된 용수에서 제조될 수 있다. 분산제는 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜, 및 그의 혼합물 및 오일에서 제조될 수 있다. 일반적인 보관 및 사용 조건하에서, 상기 제조용 물질은 방부제를 함유하여 미생물의 성장을 억제한다.

[0468] 본 발명의 항원 결합 단백질은 약학적으로 허용 가능한 염을 사용하여 중성 또는 염 형태의 조성물로 제형화될 수 있다.

[0469] 무균 주사 용액은, 상기 열거된 다양한 다른 성분을 갖는 적절한 용매에서 필요량으로 상기 활성 화합물을 혼합

하여 제조된 다음, 필요한 경우 여과 멸균화를 거친다. 일반적으로, 분산제는 상기 다양한 멸균 활성 성분을 상기 열거된 것의 기본 분산매 및 다른 필요 성분을 함유하는 무균 운반체를 혼합하여 제조된다. 무균 주사 용액의 제조를 위한 무균 분말의 경우, 제조의 바람직한 방법은 이전에 멸균 여과한 용액으로부터 상기 활성 성분 및 임의의 추가 바람직한 성분의 분말을 수득하는 진공 건조 및 동결 건조 기법이다.

[0470] 또한, 직접 주사를 위한 더 많은 또는 더 높은 농축 용액의 제조가 고려될 수 있으며, 여기서 매우 빠른 침투를 초래하도록 하는 용매로서 DMSO의 사용이 고려되고, 이는 고농도의 상기 활성 제제를 작은 종양 부위로 전달한다.

[0471] 제형화 한 다음, 용액은 상기 투여 제형과 호환 가능한 방식으로 또는 치료적으로 유효한 양으로 투여된다. 제형은 다양한 투여 형태, 예컨대 상기 설명된 주사 용액의 유형으로 용이하게 투여되나, 약물 방출 캡슐 등 또한 사용될 수 있다.

[0472] **치료적 방법 및 용도**

[0473] 본 발명자들은 모집인자로서, 특히 상기 TCER® 형식에서, 각 BMA031(V36) 또는 UCHT1(V17)과 조합된 항원 결합 단백질을 표적으로 하는 시험관내(*in vitro*) MAG-003에 대한 실험 섹션의 예시 2에서 상이한 MAG-003 양성 암 세포주에 대한 이들 분자의 세포독성 활성을 나타냈다 본 발명자들은 HLA-A*02를 발현하는 세포주에서는 이중특이성 항원 결합 단백질에 의해 미미한 용해만이 유도되었고TAA 펩티드, 예컨대 MAG-003을 제시하는 세포주에서는 유도되지 않았기 때문에, 상기 세포독성 활성은 매우 특이적이며 상기 TAA 양성 세포, 예컨대 MAG-003-양성 세포에 제한된다는 것을 더 입증했다. 따라서, 상기 예는 본 발명의 맥락에서 개시된 CD3에 대한 저 친화도 결합 도메인과 고 친화도 TCR 가변 도메인의 결합의 기술적 이점을 나타낸다. 상기 예에서, 그러한 TCR 가변 도메인은 상기 TAA MAGE-A에 특이적으로 결합하나, 또한, 당업자는 표적으로서 TAA의 맥락에서 예시된 이중특이성 항원 결합 단백질에 대해 관찰된 이점이 TAA 대신에, 다른 TA, 예컨대 바이러스 항원 펩티드 또는 세균 항원 펩티드를 표적으로 하는 이중특이성 항원 결합 단백질로 전이 가능하다는 것을 이해할 것이다. 다양한 구현예에서, 상기 항원 결합 단백질은, 일단 상기 대상체에 투여되면, 상기 표적 세포, 예컨대 TA/MHC 복합체 제시 세포에 결합하고 내인성 작용기 세포를 모집하며, 그들을 CD3를 통해 결합하고, 그들을 활성화하고 따라서 표적 세포, 특히 상기 표적 암 세포와 근접하게 해당 작용기 세포를 근접하게 국부화하여 상기 표적세포의 사멸, 특히 항암 활성을 달성한다.

[0474] 한 양태에서, 상기 항원 결합 단백질의 표적 세포에 대한 또는 작용기 세포의 CD3에 대한 결합은 면역 반응을 유발하며, 그러한 반응은, 시험관내(in vitro)에서 또는 생체내(in vivo)에서, 작용기 기능의 증식 및 활성을 지칭한다. MHC 클래스 I 제한 세포독성 T세포의 경우, 예를 들어, 작용기 기능은 펩티드 펄스, 펩티드 전구체 펄스 또는 자연 펩티드 제시 표적 세포의 용해, 시토카인, 바람직하게는 인터페론 감마, TNF-알파, 또는 펩티드에 의해 유도되는 IL-2의 분비, 또는 작용기 분자, 예를 들어, 그랜자임(granzyme) 또는 퍼포린(perforin)의 분비, 또는 탈과립일 수 있다.

[0475] 따라서, 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질은, 특히 TCER® 분자는, 예를 들어, 다양한 형태의 암 및/또는 감염 병태를 포함한, 광범위한 병태를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질은 인간 및/또는 비인간 포유동물, 특히 인간에서 치료적 목적을 위해 사용될 수 있다.

[0476] 한 구현예에서, 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질은 병변 세포에 결합할 수 있으며 세포 표면의 상기 TA 펩티드/MHC 복합체를 제시하는 상기 병변 세포의 성장을 감소 및/또는 사멸시킬 수 있다. 하나의 바람직한 구현예에서, 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질은 종양 세포에 결합할 수 있으며 세포 표면의 상기 TAA 펩티드/MHC 복합체를 제시하는 상기 종양 세포의 성장을 감소 및/또는 사멸시킬 수 있다. 상기 이중특이성 항원 결합 단백질이 생리학적(예를 들어, 생체내(in vivo)) 조건에서 결합을 촉진하는 농도로 투여될 수 있다는 것으로 이해된다.

[0477] 따라서, 한 구현예에서, 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질은 상이한 조직, 예컨대 결장, 폐, 유방, 전립선, 난소, 췌장, 신장 등의 종양 세포에 대한 면역요법을 위해 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 단백질은 종양 세포에 결합할 수 있고 성장을 감소 및/또는 사멸시킬 수 있다.

[0478] 따라서, 본 발명은 "이중특이성 항원 결합 단백질", "핵산" 또는 "약학적 조성물" 섹션에서 상기 본원에서 정의된 바와 같은 본원에 따른 이중특이성 항원 결합 단백질, 핵산 또는 벡터, 숙주 세포 또는 약학적 조성물의 치료적 유효량을 그를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 증식성 질환 또는 장애를 치료하거나 예방하는 방법과 관련이 있다.

[0479] 특정 구현예에서, 본 발명은 질환을 가진 대상체를 치료하는 방법으로서 상기 대상체에 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질을 투여하는 단계를 포함하는 방법과 관련이 있다.

[0480] 추가 구현예에서, 본 발명은 질환을 가지는 대상체에서 면역 반응을 유발하는 방법에 관한 것이고, 이는 상기 대상체에 숙주 세포에서 선택적으로 발현되는 본 발명의 항원 인식 구조체를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0481] 한 구현예에서, 본 발명은 대상체에서 질환을 치료 또는 예방하기 위한 본 발명에 따른 상기 이중특이성 항원 결합 단백질, 상기 핵산 또는 벡터, 상기 숙주 세포 또는 상기 약학적 조성물의 사용에 관한 것이다.

[0482] 한 구현예에서, 상기 방법에서 지칭된 면역 반응은 세포독성 T세포 반응이다. 상기 세포독성 T세포 반응은 항원 결합 단백질의 작용기 상에 존재하는 CD3에 대한 결합에 의해 및 상기 TA 항원 펩티드/MHC 복합체에 대한 결합에 의해 및 따라서 상기 작용기 세포 및 상기 표적 세포를 근접하게 하여 유도된다.

[0483] 본 발명은 추가로 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질, 본 발명의 핵산 또는 본 발명의 벡터, 본 발명의 숙주 세포 또는 본 발명의 약학적 조성물의 질환의 진단, 방지 및/또는 치료에서의 사용에 관한 것이다.

[0484] 본 발명은 추가로 질환의 진단, 방지 및/또는 치료를 위한 약제의 제조를 위한 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질, 본 발명의 핵산 또는 본 발명의 벡터, 본 발명의 숙주 세포의 용도 또는 본 발명의 약학적 조성물의 사용에 관한 것이다.

[0485] 용어 "대상체" 또는 "개체"는 혼용하여 사용할 수 있고 예를 들어, 인간 또는 비인간 포유동물, 바람직하게는 인간일 수 있다.

[0486] 본 발명의 맥락에서, 용어 "치료하기" 또는 "치료"는 (즉, 주어진 질환을 가진 대상체에서) 치료적 사용을 지칭하며 그러한 장애 또는 병태의 하나 이상의 증상의 진행의 역전, 완화, 억제를 의미한다. 따라서, 치료는 상기 질환의 완전한 치유를 야기하는 치료뿐만 아니라 상기 질환의 진행을 늦추는 및/또는 상기 대상체의 생존을 연장시키는 치료를 지칭한다.

[0487] "예방하기"는 예방적 (즉, 주어진 질환이 발생하기 쉬운 대상체에서) 사용을 의미한다.

[0488] 용어 "치료를 필요로 하는"은 상기 장애를 이미 가진 대상체 뿐만 아니라 상기 장애가 예방될 대상체를 지칭한다. 따라서, 한 구현예에서, 상기 대상체는 환자이다.

[0489] 한 구현예에서, "질환" 또는 "장애"는 본 발명의 항원 결합 단백질을 사용한 치료로부터 유익을 얻을 수 있는 임의의 병태이다. 한 구현예에서, 이는 해당 상기 대상체가 상기 장애에 취약하게 하는 병리학적 상태를 포함하는 만성 및 급성 장애 또는 질환을 포함한다. 특히, 본 발명의 맥락에서 지칭된 상기 질환은 증식성 질환 또는 바이러스 또는 세균에 의해 야기되는 질환일 수 있다. 또한, 바이러스 또는 세균에 의해 야기된 질환은 바이러스 또는 세균 감염으로 지칭될 수 있다. 본 발명의 맥락에서, 상기 질환을 야기하는 상기 바이러스는 예를 들어, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 인간 거대세포바이러스(HCMV), 거대세포바이러스(CMV), 인간 유두종바이러스(HPV), B형 간염 바이러스(HBV), C형 간염 바이러스(HCV), 엡스타인-바(Epstein-Barr) 바이러스(EBV), 인플루엔자 바이러스, 바람직하게는 인간 면역결핍 바이러스(HIV)로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다. 본 발명의 맥락에서, 상기 질환을 야기하는 상기 세균은 예컨대 결핵균(Mycobacterium tuberculosis)이다. 상기 이중특이성 항원 결합 단백질이, 예를 들어, HIV의, 바이러스 항원 펩티드를 표적으로 하는 경우, 상기 이중특이성 항원 결합 단백질은 HIV의 치료에 사용하기 위한 것임을 당업자는 이해할 것이다. 따라서, 상기 바이러스 또는 세균 항원 펩티드 TA-C를 표적으로 하는 이중특이성 항원 결합 단백질은 상기 항원 바이러스 또는 세균 항원 펩티드가 유래된 바이러스 또는 세균의 치료에 사용하기 위한 것이다.

[0490] "증식성 질환", 예컨대 암은, 조절되지 않은 및/또는 부적절한 세포의 증식을 수반한다.

[0491] 한 구현예에서, 상기 증식 장애 또는 질환은 예를 들어, 암 또는 상기 종양 질환의 종양 세포에서, 상기 TA, 특히 상기 TAA의 발현을 특징으로 하는 종양 질환이다.

[0492] 따라서, 특히 바람직한 암은 TA 양성 암, 특히 TAA 양성 암이다.

[0493] 추가 구현예에서, 상기 증식성 장애 또는 질환은 예를 들어, 암 또는 상기 종양 질환의 종양 세포에서, MAGEA4 및/또는 MAGEA8의 발현을 특징으로 하는 종양 질환이다.

[0494] 따라서, 특히 바람직한 암은 MAGEA4 및/또는 MAGEA8 양성 암이다.

[0495] 추가 구현예에서, 상기 증식성 장애 또는 질환은 예를 들어, 암 또는 상기 종양 질환의 종양 세포에서, PRAME의 발현을 특징으로 하는 종양 질환이다.

[0496] 따라서, 특히 바람직한 암은 PRAME 양성 암이다.

[0497] 본 발명의 맥락에서, 암은 상기 NCI에 의한 지침에 따라 상기 관련 TAA 펩티드, 예컨대 상기 "정의" 섹션에서 상기 정의된 바와 같은 TAA 펩티드 중 하나, 예를 들어, 상기 MAG-003 펩티드 또는 PRAME-004가 98% 초과의 모든 암에서 제시되는 경우, "TAA 양성", 예컨대 "MAGEA4 및/또는 MAGEA8 양성" 또는 "PRAME 양성"으로 간주된다. 본원에 명명된 모든 다른 적응증에서, 생검이 상기 암의 치료에서 표준으로서 수행될 수 있고 상기 펩티드는 XPRESIDENT® 및 관련 방법(WO 03/100432; WO 2005/076009; WO 2011/128448; WO 2016/107740, US 7,811,828, US 9,791,444, 및 US 2016/0187351에 따름, 각 내용은 그 전체가 참조로서 본원에 원용됨)에 따라 식별될 수 있다. 한 구현예에서, 상기 암은 예를 들어, 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질 사용에 의해 용이하게 분석(즉, 진단)된다. 항원 결합 단백질을 사용한 항원 발현 암을 식별하기 위한 방법은 당업자에게 알려져 있다.

[0498] 일부 구현예에서, 상기 암은 폐암, 예컨대 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 간암, 두경부암, 피부암, 신세포암, 뇌암, 위암, 결장직장암, 간세포암, 췌장암, 전립선암, 백혈병, 유방암, 메르켈 세포 암종, 흑색종, 난소암, 방광암, 자궁암, 담낭 및 담도암, 골육종 및 식도암으로 구성되는 목록으로부터 선택된다.

[0499] 암 요법에 대한 지침을 제공하는 자료 중에는 Cancer, Principles and Practice of Oncology, 4th Edition, DeVita et al, Eds. J. B. Lippincott Co., Philadelphia, Pa. (1993)이 있다. 적절한 치료적 접근법은, 적절한 분야에서 인식된 바와 같이, 암의 특정 유형 및 다른 요소, 예컨대 상기 환자의 전반적인 상태에 따라 선택된다. 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질은 그 자체로 사용될 수 있으며 또는 암 환자 치료에서 전형적으로 사용되는 다른 항암제를 사용한 치료 요법에 추가될 수 있다.

[0500] 따라서, 일부 구현예에서, 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질은 암 치료에서 널리 사용되는 다양한 약물 또는 치료법, 예컨대, 예를 들어, 화학요법제, 비화학요법제, 항신생물제 및/또는 방사선, 바람직하게는 화학요법제와 동시에, 그 전에, 또는 그 후에 투여될 수 있다.

[0501] 추가 구현예에서, 또한, 상기 이중특이성 항원 결합 단백질은 감염성 질환, 예컨대 감염성 바이러스 또는 세균 질환을 치료하기 위해 사용될 수 있으며, 여기서 상기 바이러스 질환은 예를 들어, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 인간 거대세포바이러스(HCMV), 거대세포바이러스(CMV), 인간 유두종바이러스(HPV), B형 간염 바이러스(HBV), C형 간염 바이러스(HCV), 인간 유두종바이러스 감염(HPV), 엡스타인-바(Epstein-Barr) 바이러스(EBV), 인플루엔자 바이러스, 바람직하게는 특히 HIV, HBV, 인플루엔자 및 HCMV로 구성되는 군으로부터 선택되며 여기서 상기 세균성 질환은 예를 들어, 결핵이다.

[0502] 본 발명의 항원 결합 단백질 또는 그의 약학적 조성물은 그 자체로 투여될 수 있으며, 또는 그러한 감염성 질환을 치료하기 위해 사용되는 다른 치료제의 투여와 동시에, 그 전에, 또는 그 후에 투여될 수 있다.

[0503] 본원에서 "진단"은 의료적 진단을 지칭하며 어떠한 질환 또는 병태가 개인의 증상 또는 징후를 설명하는지 결정하는 것을 지칭한다.

[0504] 상기 이중특이성 항원 결합 단백질 또는 그의 약학적 조성물의 "치료적 유효량"은, 임의의 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 유익/위험 비율의, 상기 증식 질환을 치료하기 위한 상기 이중특이성 항원 결합 단백질의 충분한 양을 의미한다. 그러나, 본 발명의 항원 결합 단백질, 핵산 또는 벡터, 숙주 세포 또는 약학적 조성물의 전체 일별 또는 월별 사용은 양호한 의학적 판단의 범위 내에서 담당의사에 의해 결정될 것이라는 점을 이해할 것이다. 임의의 특정 환자를 위한 특정 치료적 유효량 수준은 치료될 장애 또는 질환 및 장애의 중증도; 사용되는 상기 특정 이중특이성 항원 결합 단백질의 활성; 사용되는 상기 특정 조성물과 환자의 연령, 체중, 일반 건강, 성별 및 식단; 투여 시간, 투여 경로 및 사용될 특정 폴리펩티드의 배출 속도; 치료 기간; 사용될 특정 폴리 펩티드와 조합하여 또는 동시에 사용될 약물; 및 의료계에서 널리 알려진 기타 요인을 포함하는 다양한 요인에 따른다. 예를 들어, 상기 바람직한 치료적 효과를 달성하고 상기 원하는 효과가 달성되기까지 상기 투여량을 점진적으로 증가시키기 위해 필요한 것보다 낮은 수준에서 상기 화합물의 용량을 시작하는 것은 당업계 내에서 널리 알려져 있다.

[0505] 한 구현예에서, 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질을 사용한 치료의 효능은 생체내(*in vivo*), 예를 들어 암의 마우스 모델에서 예를 들어, 치료군과 대조군 사이의 종양 용적의 변화 측정에 의해 분석된다.

[0506] 본 발명의 약학적 조성물, 벡터, 핵산 및 세포가 주로 정제 형태로 제공될 수 있으며, 예를 들어, 여기서 동일

한 유형의 이중특이성 항원 결합 단백질의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 중량으로 제시된다.

[0507] 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질, 본 발명의 핵산 또는 본 발명의 벡터, 본 발명의 숙주 세포 또는 본 발명의 약학적 조성물은 임의의 실현 가능한 방법에 의해 투여될 수 있다.

[0508] 또한, 본 발명은 환자 내에서 표적 세포를 사멸시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 환자에 항원 결합 단백질을 투여하는 단계를 포함한다. 상기 방법의 맥락에서, 상기 항원 결합 단백질은, 일단 상기 대상체에 투여되면, 상기 표적 세포 및 CD3 발현 작용기에 결합하고 바람직하게는 면역 반응을 유발한다.

[0509] 하나의 특정 접근법에서, 상기 숙주 세포는 줄기 세포, 예컨대 중간엽 줄기 세포일 수 있으며 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질을 발현하기 위해 조작된다. 본 예시에서, 상기 이중특이성 항원 결합 단백질은 본원에서 설명된 바와 같은 TCER®이다.

[0510] 따라서, 본 발명의 숙주 세포는, 바람직하게는 상기 정의된 바와 같은 줄기 세포는, 치료적 조성물의 유효 성분으로 사용될 수 있다. 따라서, 또한, 본 발명은 환자 내에서 표적세포를 사멸시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 환자에게 상기 정의된 바와 같은 숙주 세포, 바람직하게는 중간엽 줄기 세포의 유효 수를 투여하는 단계를 포함한다.

[0511] 본 발명 방법의 목적을 위하여, 여기서 숙주 세포 또는 세포의 개체가 상기 대상체에 투여되며, 상기 숙주 세포는 상기 대상체에 대하여 (다른 대상체에서 유래된) 동종이계성(allogeneic) 또는 자가성(autologous)인 세포일 수 있다. 바람직하게는, 상기 세포는 상기 대상체에 대해 자가성이다.

[0512] 상기 숙주 세포가 동종이계이며 따라서 다른 대상체로부터 유래된 경우, 상기 다른 대상체는 건강하다.

[0513] "건강"은 상기 대상체가 일반적으로 건강 상태가 좋은, 바람직하게는 충분한 항체 시스템을 가진, 더 바람직하게는 용이하게 검사되고 감지될 수 있는 임의의 질환을 앓지 않는 것을 의미한다.

[0514] 따라서, 상기 숙주 세포는 '핵산, 벡터 및 재조합 숙주 세포' 섹션에서 상기 본원에 설명된 바와 같이 본 발명에 따른 핵산 및/또는 벡터를 사용하여 형질전환, 형질도입 또는 형질주입된다.

[0515] 상기 숙주 세포가 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질에 형질전환, 형질도입 또는 형질주입되는 경우, 바람직하게는 상기 세포는 상기 항원 결합 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터를 포함한다. 일단 상기 숙주 세포가 본 발명의 이중특이성 항원 결합 단백질을 발현하면, 그 후, 상기 숙주 세포는 활성화 숙주 세포로 지칭될 수 있다.

[0516] 양태에서, 상기 TCR-유발 면역 반응 또는 T세포 반응은, 시험관내(in vitro)에서 또는 생체내(in vivo)에서, 상기 T세포에 그리고 상기 TA 항원 펩티드/MHC 복합체, 예컨대 상기 TA-C/MHC 복합체에 결합한 상기 이중특이성 항원의 결합에 의해 유도되는 작용기 기능의 증식 및 활성화를 지칭할 수 있다. MHC 클래스 I 제한 세포독성 T 세포의 경우, 예를 들어, 작용기 기능은 펩티드 펄스, 펩티드 전구체 펄스 또는 자연 펩티드 제시 표적 세포의 용해, 시토카인, 바람직하게는 인터페론 감마, TNF-알파, 또는 펩티드에 의해 유도되는 IL-2의 분비, 또는 작용기 분자, 예를 들어, 그랜자임(granzyme) 또는 퍼포린(perforin)의 분비, 또는 탈과립일 수 있다.

[0517] 따라서 본 발명의 추가 양태는 본 발명의 상기 방법에 의해 수득 가능한 활성화 숙주 세포를 제공한다.

[0518] 상기 방법에 의해 생성되는 활성화 숙주 세포는 표적 세포를 선별적으로 인식할 수 있다.

[0519] 본원에서 "표적 세포"는 "이중특이성 항원 결합 단백질" 섹션에서 상기 본원에서 정의된 바와 같은 TA-C/MHC 제시 세포 또는 TA 제시 세포를 지칭한다.

[0520] 하나의 바람직한 구현예에서, 즉 상기 TA/MHC 복합체가 TAA/MHC 복합체인 경우, 상기 표적 세포는 암 세포이며, 여기서 상기 암은 상기 본원에서 정의된 바와 같다.

[0521] 생체내(*In vivo*)에서, 본 발명에 따른 CD3 양성 작용기에 대한 표적 세포는 종양 세포(이는 때때로 MHC 클래스 II를 발현함) 및/또는 상기 종양(종양 세포)(또한, 이는 때때로 MHC 클래스 II를 발현함)를 둘러싸는 기질 세포일 수 있다(Dengjel, J. et al., Clin Cancer Res 12 (2006): 4163-4170).

[0522] **키트**

[0523] 최종적으로, 또한, 본 발명은 본 발명의 적어도 하나의 이중특이성 항원 결합 단백질을 포함하는 키트를 제공한

다.

[0524] 한 구현예에서, 상기 키트는

[0525] a) "이중특이성 항원 결합 단백질" 섹션에서 상기 본원에서 정의된 바와 같은 본원의 적어도 하나의 이중특이성 항원 결합 단백질,

[0526] b) 선택적으로 포장재, 및

[0527] c) 선택적으로 상기 이중특이성 항원 결합 단백질이 질환, 바람직하게는 암에 대해 유효하다는 점 또는 질환, 바람직하게는 암을 위한 용도에 대한 것이라는 점을 나타내는 상기 포장재 내에 함유된 라벨 또는 첨부 설명서를 포함한다.

[0528] 관련 구현예에서, 본 발명의 적어도 하나의 항원 결합 단백질은 단일 및/또는 다중 챔버 사전 충전 주사기(예를 들어, 액체 주사기 및 동결건조 주사기)에 들어 있다.

[0529] 한 구현예에서, 본 발명은 단일 투여량 투여 단위를 생성하기 위한 키트를 포함한다.

[0530] 따라서, 한 구현예에서, 본 발명의 키트의 a)에서 언급한 대로 본 발명의 적어도 하나의 이중특이성 단백질은 제1 용기에 들어 있는 본원의 건조된 이중특이성 항원 결합 단백질이다. 상기 키트는 수성 제제를 가지는 제2 용기를 더 포함한다.

[0531] 따라서, 한 구현예에서, 상기 키트는

[0532] a) "항원 결합 단백질" 섹션에서 상기 본원에 정의된 바와 같은 본원의 적어도 하나의 건조된 이중특이성 항원 결합 단백질을 포함하는 제1 용기,

[0533] b) 수성 제제를 포함하는 제2 용기;

[0534] c) 선택적으로 포장재, 및

[0535] d) 선택적으로 상기 이중특이성 항원 결합 단백질이 질환, 바람직하게는 암에 대해 유효하다는 점 또는 질환, 바람직하게는 암의 치료를 위한 용도라는 점을 나타내는 상기 포장재 내에 함유된 라벨 또는 첨부 설명서를 포함한다.

[0536] 상기 수성 제제는 전형적으로 "약학적 조성물" 섹션에서 상기 본원에서 정의된 바와 같은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 수용액이다.

[0537] 관련 구현예에서, "제1 용기" 및 "제2 용기"는 다중 챔버 사전 충전 주사기(예를 들어, 동결건조 주사기)의 챔버를 지칭한다.

[0538] 상기 암은 본원의 맥락에서 상기 본원의 정의된 바와 같다.

[0539] 본 발명은 본원의 하기 인용된 품목 및 양태와 더 관련이 있다.

[0540] 추가 양태에서, 본 발명은 적어도 2개의 항원 결합 부위(D 및 B)를 포함하는 이중특이성 항원 결합 단백질과 관련이 있으며, 여기서 상기 항원 결합 부위 D는 TCRα/β에 결합하고 상기 항원 결합 부위 B는 표적 항원(TA) 펩티드/MHC 복합체에 결합하며, 여기서 상기 항원 결합 부위 D는 중쇄 가변 도메인(V_H) 및 경쇄 가변 도메인(V_L)을 포함하며, 여기서 상기 V_L은 서열 식별 번호: 42의 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되고 상기 V_H는 서열 식별 번호: 43의 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성된다.

[0541] 상기 양태의 한 관련 품목에 있어서, 상기 양태의 이중특이성 항원 결합 단백질의 항원 결합 부위 D는 K_D(D)로 TCRα/β에 결합하고 상기 항원 결합 부위 B는 K_D(C)로 상기 표적 항원 펩티드 C(TA-C)/MHC 복합체에 결합하며 여기서 K_D(D)/K_D(C)의 비율은 1 이상, 4 이상, 6 이상, 8 이상, 10 이상, 15 이상, 20 이상, 25 이상, 30 이상, 40 이상, 50 이상, 예컨대 1 내지 150, 4 내지 140, 6 내지 100, 8 내지 100, 10 내지 100, 바람직하게는 10 내지 100이다.

[0542] 상기 양태의 하나의 추가 관련 품목에서, 상기 항원 결합 부위 D는 **표면 플라즈몬 공명**(SPR) 또는 생체층 간섭측정법(BLI), 바람직하게는 생체층 간섭측정법(BLI)을 사용하여 측정되는, 3 nM 이상, 5 nM 이상, 8 nM 이상, 10 nM 이상, 12 nM 이상, 14 nM 이상, 16 nM 이상, 18 nM 이상, 20 nM 이상, 25 nM 이상, 30 nM 이상, 35 nM

이상, 40 nM 이상, 45 nM 이상, 및 바람직하게는 1000 nM 이하, 800 nM 이하, 600 nM 이하, 500 nM 이하, 400 nM 이하, 예컨대 3 nM ~ 1000 nM, 3 nM ~ 600 nM, 5 nM ~ 600 nM, 10 nM ~ 600 nM, 12 nM ~ 600 nM, 14 nM ~ 600 nM, 16 nM ~ 600 nM, 18 nM ~ 600 nM, 20 nM ~ 600 nM, 바람직하게는 5 nM ~ 100 nM의 K_D(D)로 TCR α/β에 결합한다.

[0543] 상기 양태의 하나의 추가 관련 품목에서, 상기 항원 결합 부위 B는 **표면 플라즈몬 공명**(SPR) 또는 생체층 간섭측정법(BLI), 바람직하게는 생체층 간섭측정법(BLI)을 사용하여 측정되는, 100 μM 이하, 1 μM 이하, 100 nM 이하, 50 nM, 이하 10 nM 이하, 예를 들어 0.01 nM 내지 150 nM, 0.05 nM 내지 150 nM, 0.1 nM 내지 150 nM, 0.1 nM 내지 100 nM, 0.1 nM 내지 50 nM, 0.1 nM 내지 10 nM, 0.5 nM 내지 10 nM, 0.5 nM 내지 5 nM, 바람직하게는 0.5 nM 내지 5 nM의 K_D(C)로 상기 표적 항원 펩티드 C(TA-C)/MHC 복합체에 결합한다.

[0544] 상기 양태의 하나의 추가 관련 항목에서, 상기 항원 결합 단백질은 정상 조직의 세포에 대한 EC_{50} 값보다 100 이상, 500 이상, 1000 이상 더 낮은 TA-C/MHC 제시 세포에 대한 EC_{50}을 가진다.

[0545] 상기 양태의 하나의 추가 관련 항목에서, 상기 TA 항원 펩티드 C는 바이러스 펩티드, 세균 펩티드 또는 종양 연관 항원(TAA) 펩티드, 바람직하게는 종양 연관 항원(TAA) 펩티드이다.

[0546] 상기 양태의 하나의 추가 관련 품목에서, 상기 항원 결합 단백질은 정상 조직의 세포에 대한 EC_{50} 값보다 5배 이상, 10배 이상, 20배 이상, 50배 이상, 100배 이상, 500배 이상, 1000배 이상 낮은 TA-C/MHC 복합체 제시 세포에 대한 EC_{50}을 가진다.

[0547] 상기 양태의 하나의 추가 관련 항목에서, 상기 TA 항원 펩티드 C는 종양 연관 항원(TAA) 펩티드 C이고, 여기서 상기 TAA-C는 서열 식별 번호: 162 내지 317의 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되는 TAA 항원성 펩티드, 서열 식별 번호: 9 내지 10의 아미노산 서열, 예컨대 서열 식별 번호: 9의 아미노산 서열 'SLLQHLIGL'을 포함하거나 이로써 구성되는 상기 PRAME 항원 펩티드 또는 서열 식별 번호: 10의 아미노산 서열 'KVLEHVVRV'를 상기 MAGE-A 항원 펩티드의 군에서 선택되고, 여기서 상기 MHC는 바람직하게는 HLA-A*02이다.

[0548] 상기 양태의 하나의 추가 관련 항목에서, 상기 TA 항원 펩티드 C는 서열 식별 번호: 10의 아미노산 서열 'KVLEHVVRV'를 포함하거나 이로써 구성되는 상기 MAGE-A 항원 펩티드이고 여기서 상기 유사한 펩티드는 RABGAP1L-001, AXIN1-001, ANO5-001, TPX2-001, SYNE3-001, MIA3-001, HERC4-001, PSME2-001, HEATR5A-001, CNOT1-003, TEP1-003, PITPNM3-001, ZFC-001 바람직하게는 HEATR5A-001, HERC4-001 및 CNOT1-003으로 구성되는 목록에서 선택된다.

[0549] 상기 양태의 하나의 추가 관련 품목에서, 상기 이중특이성 항원 결합 단백질은 이중특이성 항원 또는 그의 단편, 이중특이성 T세포 수용체(TCR) 또는 그의 단편 또는 이중특이성 단쇄 TCR(scTCR) 또는 이중특이성 단쇄 항체이다.

[0550] 상기 양태의 하나의 추가 관련 품목에서, 상기 항원 결합 위치 B는 항체 또는 그의 단편 또는 알파 사슬 가변 도메인(v_α) 및 베타 사슬 가변 도메인(v_β) 또는 감마 사슬 가변 도메인(v_γ) 또는 델타 사슬 가변 도메인(v_δ), 바람직하게는 알파 사슬 가변 도메인(v_α) 및 베타 사슬 가변 도메인(v_β) 또는 감마 사슬 가변 도메인(v_γ) 및 델타 사슬 가변 도메인(v_δ), 바람직하게는 v_α 및 v_β이다.

[0551] 상기 양태의 하나의 추가 관련 품목에서,

[0552] i) 상기 v_α는 'EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGKGLQLLTYIYSSQDSKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP' 서열 식별 번호: 20, 'EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGKGLQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP' 서열 식별 번호: 21, 'EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTESSSTYLYWYKQEPGKGLQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP' 서열 식별 번호: 22로 구성되는 군에서 선택된 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호: 20, 21 및 22로 구성되는 군에서 선택된 아미노산과 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되고 여기서 바람직하게는 서열 식별 번호: 20의 아미노산 서열과 적어도 85% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 서열 식별 번호: 23의 CDRa1, 서열 식별 번호: 24의 CDRa2 및 서열 식별 번호: 25의 CDRa3의 아미노산 서열을 포함하고,

여기서 바람직하게는 서열 식별 번호: 21의 아미노산 서열과 적어도 85% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 서열 식별 번호: 23의 CDRa1, 서열 식별 번호: 26의 CDRa2 및 서열 식별 번호: 25의 CDRa3의 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 바람직하게는 서열 식별 번호: 22의 아미노산 서열과 적어도 85% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는 서열 식별 번호: 27의 CDRa1, 서열 식별 번호: 26의 CDRa2 및 서열 식별 번호: 25의 CDRa3의 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 상기 제1 가변 도메인의 아미노산은 상기 아미노산 19V 및/또는 48K를 포함하고,

[0553] 상기 v_β는 아미노산 서열 'DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLELLFYFCYGTPCDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRADTGELFFGEGSRLTVL' 서열 식별 번호: 30 또는 서열 식별 번호: 30으로 구성되는 아미노산 서열과 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되고, 여기서 바람직하게는 서열 식별 번호: 30의 아미노산 서열과 적어도 85% 동일한 아미노산 서열은 바람직하게는, 각각, 서열 식별 번호: 31의 CDRb1, 서열 식별 번호: 34의 CDRb2 및 서열 식별 번호: 35의 CDRb3의 아미노산 서열을 포함하고, 아미노산 54F 및/또는 66C를 선택적으로 포함하고, 또는

[0554] (ii) 상기 v_α 또는 v_γ는 서열 식별 번호: 48의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호: 48의 아미노산 서열과 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되고, 여기서 바람직하게는 서열 식별 번호: 48의 아미노산 서열과 적어도 85% 동일한 아미노산 서열은 서열 식별 번호: 49의 CDRa1, 서열 식별 번호: 50의 CDRa2 및 서열 식별 번호: 51의 CDRa3의 아미노산 서열을 포함하고

[0555] 상기 v_β 또는 v_δ는 서열 식별 번호: 44의 아미노산 서열 또는 서열 식별 번호: 44와 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되고 여기서 바람직하게는 서열 식별 번호: 44의 아미노산과 적어도 85% 동일한 상기 아미노산 서열은 서열 식별 번호: 45의 CDRb1, 서열 식별 번호: 46의 CDRb2 및 서열 식별 번호: 47의 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성된다.

[0556] 상기 양태의 한 품목에서, 상기 항원 결합 단백질은 서열 식별 번호: 282 또는 284의 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되는 식 V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{c1} [III]의 제1 폴리펩티드 및 서열 식별 번호: 283의 아미노산 서열을 포함하거나 이로써 구성되는 식 V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{c2} [IV]의 제2 폴리펩티드로 구성된다.

[0557] 상기 양태의 하나의 추가 관련 품목에 있어서, 상기 이중특이성 항원 결합 단백질은 하나 이상의

[0558] (i) 진단 제제;

[0559] (ii) 치료 제제; 또는

[0560] (iii) 약동학(PK) 변형 모이어티;를 더 포함한다.

[0561] 상기 양태의 하나의 추가 관련 품목에 있어서, 단리된 핵산은 상기 양태 및 품목에서 정의된 바와 같은 이중특이성 항원 결합 단백질에 대해 인코딩하는 서열을 포함하고, 또는 핵산 벡터는 상기 핵산을 포함한다.

[0562] 상기 양태의 하나의 추가 관련 품목에 있어서, 재조합 숙주 세포는 상기 양태 및 품목에서 정의된 바와 같은 이중특이성 항원 결합 단백질 또는 상기 품목에서 정의된 바와 같은 핵산 또는 벡터를 포함하고, 여기서 상기 숙주 세포는 바람직하게는 a) 줄기 세포, 바람직하게는 중간엽 줄기 세포 또는 b) 재조합 발현에 대한 세포, 예컨대 중국 햄스터 난소(CHO) 세포이다.

[0563] 상기 양태의 하나의 추가 관련 품목은 상기 언급된 양태 및 품목에서 정의된 바와 같은 약학적 조성물, 상기 언급된 양태 및 품목에서 정의된 바와 같은 핵산 또는 벡터, 상기 언급된 양태 및 품목에서 정의된 바와 같은 숙주 세포 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제, 안정화제 및/또는 부형제를 지칭한다.

[0564] 상기 양태의 하나의 추가 관련 품목은 상기 양태 및 품목에서 정의된 바와 같은 상기 이중특이성 항원 결합 단백질을 생성하는 방법을 지칭하며, 이는

[0565] a. 적합한 숙주 세포를 제공하는 단계,

[0566] b. 상기 양태 및 품목에서 정의된 바와 같은 상기 이중특이성 항원 결합 단백질을 인코딩하는 코딩 서열을 포함하는 유전자 구조체를 제공하는 단계,

[0567] c. 상기 유전자 구조체를 상기 적합한 숙주 세포로 도입하는 단계, 및

[0568] d. 상기 적합한 숙주 세포에 의해 상기 유전자 구조체를 발현하는 단계를 포함한다.

[0569] 하나의 추가 관련 품목에서, 상기 양태 및 품목에서 정의된 바와 같은 방법은 상기 적합한 숙주 세포로부터의 상기 이중특이성 항원 결합 단백질의 단리 및 정제를 더 포함한다.

[0570] 상기 양태의 하나의 추가 관련 품목은 상기 양태 및 품목에서 정의된 바와 같은 이중특이성 항원 결합 단백질, 상기 양태 및 품목에서 정의된 바와 같은 핵산 또는 벡터, 상기 양태 및 품목에서 정의된 바와 같은 숙주 세포 또는 상기 양태 및 품목에서 정의된 바와 같은 약학적 조성물의 의학에서의 사용과 관련이 있다.

[0571] 하나의 추가 관련 품목에서, 상기 양태 및 품목에서 정의된 바와 같은 이중특이성 항체 결합은 상기 양태 및 품목에서 정의된 바와 같은 핵산 또는 벡터, 상기 양태 및 품목에서 정의된 바와 같은 숙주 세포 또는 상기 양태 및 품목에서 정의된 바와 같은 약학적 조성물의 질환, 예컨대, 바이러스 또는 세균 감염 또는 증식성 질환, 바람직하게는 암, 더 바람직하게는 TAA/MHC 양성 암의 진단, 예방 및/또는 치료에서의 사용과 관련이 있다.

[0572] 본 특허 출원에서 사용된 정의 또는 구현예는 본원의 상기 양태 또는 품목에 필요한 변경을 가하여 적용한다.

[0573] 즉각적인 적용을 통해, 용어 "및/또는"은 이와 연결된 하나 이상의 경우가 발생할 수 있는 것을 포함하는 바와 같이 해석되어야 하는 문법적 접속사이다. 예를 들어, "그러한 천연 서열 단백질은 표준 재조합 및/또는 합성 방법을 사용하여 제조될 수 있다"는 어구는 천연 서열 단백질이 표준 재조합 및 합성 방법을 사용하여 제조될 수 있거나, 또는 천연 서열 단백질이 표준 재조합 방법을 사용하여 제조될 수 있거나 또는 천연 서열 단백질이 합성 방법을 사용하여 제조될 수 있음을 나타낸다.

[0574] 따라서, 즉각적인 적용에서, 용어 "포함"은 모든 구체적으로 언급된 특징뿐만 아니라 선택적, 추가적, 및 비특정적인 특징을 포함하는 것으로 해석되야 한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "포함"의 사용은 구체적으로 언급된 특징 이외에 어떠한 특징도 제시되지 않는 구현예(즉, "구성") 또한 개시한다.

[0575] 또한, 단수형은 복수형을 배제하지 않는다. 특정 측정치가 서로 상이한 종속항에 인용된 사실만으로는 상기 측정치의 조합이 유리하게 사용될 수 없다는 것을 나타내지는 않는다.

[0576] 이제, 본 발명이 하기 도면 및 예시를 참조하여 더 자세히 설명된다. 본원에 인용된 모든 문헌 및 특허 문서는 그 전체가 참조로서 본원에 의해 원용된다. 본 발명이 상기 설명에서 상세하게 예시되고 설명되었지만, 상기 예시는 예시적인 또는 모범적인 것이며 제한하는 것으로 고려되어서는 안 된다.

도면의 간단한 설명

[0577] 도 1은 식별된 인간 수용체 구조틀에 대한 UCHT1 VL 도메인의 정렬을 나타낸다. 도면에서 식별된 바와 같은 CDR은 코시아(Cothia) 정의에 따라 식별된다.

도 2는 식별된 인간 수용체 구조틀에 대한 UCHT1 VH 도메인의 정렬을 나타낸다. 도면에서 식별된 바와 같은 CDR은 코시아(Cothia) 정의에 따라 식별된다.

도 3은 유세포분석에 의해 측정된 PRAME-004-특이적 TCER®-분자의 저캇(Jurkat) 세포에 대한 농도의존적 결합을 나타낸다.

도 4는 건강한 HLA-A*02-양성 공여자의 PBMC를 사용한 대표적인 LDH-방출 분석의 결과를 나타낸다. UCHT1(V17) 또는 BMA031(V36)을 사용한 MAG-003-특이적 TCER®-분자를 MAG-003-양성 및 MAG-003-음성 그리고 표적 외 양성 종양 세포주에서 시험하였다. 시험한 세포주(좌에서 우로): H695T, A375, T98G, BV173. 오차 막대는 3회 측정값 내의 표준 편차를 나타낸다.

도 5는 UCHT1(V17)에 기반한 MAG-003-특이적 TCER®을 사용하여 배양된 건강 세포에 대한 LDH-방출 분석의 결과를 나타낸다. 각 세포독성 플롯은 PBMC를 사용한 공동배양 및 상기 TCER 분자의 농도 증가 후 동일한 배지 조합에서 상기 대조군 종양 세포주 Hs695T(채워진 원)와 비교하여 1차 건강 세포 유형(빈 원)의 LDH-방출을 나타낸다. 또한, EC_{50} 값에 기반하여 계산된 안전성 범위가 도시된다.

도 6은 BMA031(V36)에 기반한 MAG-003-특이적 TCER®을 사용하여 배양된 건강 세포에 대한 LDH-방출 분석의 결과를 나타낸다. 각 세포독성 플롯은 PBMC를 사용한 공동배양 및 상기 TCER 분자의 농도 증가 후 동일한 배지 조합에서 상기 대조군 종양 세포주 Hs695T(채워진 원)와 비교하여 1차 건강 세포 유형(빈 원)의 LDH-방출을 나타낸다. 또한, 각 EC_{50} 값에 기반하여 또는 LOEL에 기반하여 계산된 안전성 범위가 도시된다.

도 7은 도입된 점 돌연변이를 가시화한 것이다. 구획 A는 상기 UCHT1 중쇄의 위치 31 새로 도입된 Asp 측쇄 및 이의 공간적으로 근접하게 위치된 CD3ε의 음전하 측쇄를 나타낸다. 구획 B는 각각 상기 UCHT1 중쇄의 위치 54에서 상기 wt Tyr 및 상기 대체 Gln을 나타낸다. 더 작은 극성 아미노산을 사용한 상기 방향족 측쇄의 대체는 CD3ε의 위치 48에서 Asp의 무극성 줄기를 사용하여 소수성 상호작용을 제거한다. 구획 C는 Glu에 의한 UCHT1의 중쇄의 동일한 위치 54의 Tyr의 대체와 UCHT1 상에 새로 도입된 Glu의 정전기적 반발력을 야기할 수 있는 공간적으로 근접하게 위치된 CD3ε(48D, 49E, 50D, 51D) 상의 음전하 측쇄를 나타낸다. 구획 D는 CD3ε의 위치 56(좌측)에서 Ser의 백본과 함께 수소 결합(실선)을 형성하는 UCHT1 중쇄 위치 55에서 wt Lys을 나타낸다. Arg에 의한 상기 Lys의 대체는 상기 극성 상호작용을 제거하고 더 부피가 크고 강력한 상기 Arg 측쇄를 변형 회전이성질체(우측)에 도입한다. 구획 E는 UCHT1의 중쇄의 위치 55에서 동일한 Lys 및 Glu에 의한 이의 대체를 나타내고; 또한, 상기 돌연변이는 CD3ε의 위치 56에서 Lys 및 Ser 사이에서 형성된 상기 H 결합을 제거한다. 추가적으로, 이는 Asp 48, Glu 49, Asp 50, 및 Asp 51에 의해 형성된 CD3ε의 표면 상에서 음전하 패치와 공간적으로 근접한 음전하 측쇄를 도입한다.

도 8은 인간화 UCHT1-변이체에 기반한 TCER® 분자의 생성 수율 및 안정성 특징의 요약을 나타낸다. (na)해당 없음, (nd)수행되지 않음.

도 9a 및 9b는 생체층 간섭측정법으로 측정된 대로 HLA-A*02와의 복합체에서 MAG-003에 대한 상이한 UCHT1 변이체를 포함하는 TCER® 항원 결합 단백질의 결합 곡선을 나타낸다. 용액 내 TCER® 분자의 증가하는 농도가 적용되며 nM으로 나타낸다.

도 9c 및 9d는 생체층 간섭측정법으로 측정된 대로 CD3δε-Fc에 대한 상이한 UCHT1 변이체를 포함하는 TCER® 항원 결합 단백질의 결합 곡선을 나타낸다. 용액 내 TCER® 분자의 증가하는 농도가 적용되며 nM으로 나타낸다.

도 10은 2명의 건강한 HLA-A*02-양성 공여자(HBC-982 및 HBC-720)의 PBMC를 사용한 2개의 독립적 LDH-방출 분석의 결과를 나타낸다. 다양한 친화도를 가진 UCHT1-변이체를 사용한 MAG-003 특이적 TCER® 분자를 MAG-003 양성 종양 세포주에서 시험하였다. 오차 막대는 3회 측정값 내의 표준 편차를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0578] **예시**

[0579] **예시 1: 마우스 단클론 Ab UCHT1의 인간화**

[0580] 마우스 단클론 Ab UCHT1의 인간화는 알려진 방법에 따른 CDR-접목에 의해 수행된다. 따라서 VH 및 VL의 CDR은 코시아(Cothia) 정의에 따라 식별된다. UCHT1 가변 도메인을 상기 인간 생식세포계열과 비교하는 서열 정렬이 생성되었다. 서열 동일성, 일치하는 계면 위치 및 유사하게 분류된 CDR 표준 위치에 기반하여, 생식계열이 가장 유망한 수용체 구조틀로서, 경쇄 및 중쇄 각각에 대해, 경쇄에는 VK1-O18 및 중쇄에는 VH-1-46으로 식별되었다. 상기 J 구획 유전자는 FR4에 대해 모 서열과 비교되었고 J 구획 JK1 및 JH4가 각각 상기 경쇄 및 중쇄에 대해 선택되었다.

[0581] 상기 모 서열 및 수용체 구조틀 간의 잔기 차이를 가진 모든 상기 위치의 목록이 생성되었다. 모든 위치는 분석되었고 단리에서 또는 다른 잠재적인 치환의 맥락에서 모두 고려되었다. 각 위치는 중립(Neutral), 중요(Critical) 또는 기여(Contributing)로 분류하였고, 인간화 변이체에서 치환하고 평가하기 위한 잔기에 대한 제안이 이루어졌다. 잠재적인 인간화 변이체 서열은 Epibase™(Lonza)를 사용하여 스크리닝되었다. 각 에피톱 또는 에피톱의 군집은 상기 에피톱을 제거하거나 예상된 면역원성을 더 감소시키는 치환을 위해 분석되었다. 추가로 상기 CDR 내의 전사 후 변형의 잠재적 위치에서, 상기 CDR이 식별되었고 각 개선 방법이 제시되었다. 전체적으로, 이는 4개의 상이한 VH-도메인 및 5개의 상이한 VL- 도메인의 생성을 초래하였다. 따라서, 17개의 UCHT1 인간화 변이체가 생성되었다. 모든 변이체가 CHO 세포에서 Fab 분자로서 발현되었다. 발현 단백질은 발현 역가, 응집체 수준 및 저캇(Jurkat) 세포에 대한 결합의 EC_{50} 값에 따라 정제되고 순위가 매겨졌다. 상기 결과에 기반하여, 상기 인간화 UCHT1(V17)은, 서열 식별 번호: 137 및 서열 식별 번호: 145에 의해 정의되었고, 본 발명자들의 TCER® 분자의 확립을 위해 선택되었다.

[0582] PRAME-004(서열 식별 번호: 9) 표적 TCER®-분자는 서열 식별 번호: 171 및 서열 식별 번호: 170을 함유하는 분자를 초래하는 인간화 UCHT1(V17) 또는 서열 식별 번호: 168 및 서열 식별 번호: 169를 초래하는 인간화 BMA031(V10)의 각 모집 도메인을 사용하여 구성되었다. 재조합 단백질의 발현을 위한 벡터가 HCMV 유래 프로모

터 요소인 pUC19 유도체로 조절되는 모노시스트로닉으로 설계되었다. 플라스미드 DNA는 표준 배양 방법을 따라 E.coli에서 증폭되었고 이어서 시판되는 키트(Macherey & Nagel)를 사용하여 정제되었다. 정제 플라스미드 DNA는 제조업체(ExpiCHO™ 시스템; Thermo Fisher Scientific)의 지침에 따라 CHO-S 세포의 일시적 형질주입을 위해 사용되었다. 형질주입 CHO 세포는 32℃ 내지 37℃에서 6 내지 14일 동안 배양되었고 ExpiCHO™ Feed 용액을 1회 내지 2회 공급받았다.

[0583] 조건화된 세포 상층액이 원심 분리(4000 *x g*; 30분)로 수확되었고 여과(0.22 μm)로 정제되었다. 이중특이성 분자는 주(line)에서 친화도 및 크기 배제 크로마토그래피를 연이어 수행하도록 구비된 Akta Pure 25 L FPLC 시스템(GE Lifesciences)을 사용하여 정제되었다. 친화도 크로마토그래피는 표준 친화도 크로마토그래피 프로토콜에 따라 단백질 A 컬럼(GE Lifesciences)에서 수행되었다. 크기 배제 크로마토그래피는 Superdex 200pg 16/600 컬럼(GE Lifesciences)을 사용하여 표준 프로토콜에 따라 고순도 단량체 단백질을 수득하기 위해 친화성 컬럼으로부터 용리(pH 2.8) 후 바로 수행되었다. 단백질 농도는 예상되는 단백질 서열에 따른 계산된 흡광 계수를 사용하여 NanoDrop 시스템(Thermo Scientific)에서 결정되었다. 필요한 경우, 농도 및 완충제 교환은 비바스핀(Vivaspin) 장치(싸토리우스(Sartorius))에 의해 조정되었다. 최종적으로, 정제된 분자는 2 내지 8℃의 온도에서 약 1 mg/ML 농도의 인산염 완충 식염수에서 보관되었다.

[0584] 작용기 세포에 대한 상기 TCER® 분자의 결합 친화성은 유세포분석법을 사용하여 평가되었다. 따라서, 저캇(Jurkat) 세포(CD3+ 및 TCRab+)는 증가된 TCER® 농도를 사용하여 배양되었다. 세척 후, TCER® 분자에 결합된 상기 세포는 PE 표지 2차 시약(#709-116-098, Jackson ImmunoResearch)을 사용하여 염색되었다. 세포는 Intellicyt® iQue Cell Screener에서 최종적으로 분석되었다. 4개의 독립적인 실험 중 하나의 결과가 도 3에 나와 있으며 이는 PRAME-004 특이적 TCER®-분자의 저캇(Jurkat) 세포에 대한 농도 의존적 결합을 입증한다. 상기 UCHT1-기반 TCER®세포는 저캇(Jurkat) 세포에 대해 약 2 내지 3 nM의 결합의 EC_{50}을 나타낸 반면, BMA031 기반 TCER® 분자는 적어도 50 내지 100배 약한 결합을 나타냄이 명백다다

[0585] **예시 2: 상이한 친화도를 가지는 모집인자를 사용한 세포독성 원리 증명**

[0586] 펩티드 MAG-003(서열 식별 번호: 10)을 표적으로 하는 항원 결합 단백질이 T세포 수용체(서열 식별 번호: 20 및 서열 식별 번호: 30)의 조작된 가변 도메인에 의해 각 UCHT1(V17)(서열 식별 번호: 137 및 서열 식별 번호: 145) 또는 BMA031(V36)(서열 식별 번호: 42 및 SEQ 서열 식별 번호: 43)을 사용하여 상기 TCER® 구조체 내에서 생성되었다.

[0587] 상기 각각의 TCER®-분자의 발현에 대한 벡터는 HCMV 유래 프로모터 요소인 pUC19 유도체로 조절되는 모노시스트로닉으로 설계되었다. 플라스미드 DNA는 표준 배양 방법을 따라 E.coli에서 증폭되었고 이어서 시판되는 키트(Macherey & Nagel)를 사용하여 정제되었다. 정제 플라스미드 DNA는 전기천공법 시스템(MaxCyte STX)을 이용한 CHO-S 세포의 일시적 형질주입을 위해 사용되었다. 형질주입 CHO 세포는 32℃ 내지 37℃에서 10 내지 12일 동안 배양되었고 Cellboost 7a 및 7b(GE Healthcare™) 용액을 1회 내지 3회 공급받았다.

[0588] 조건화된 세포 상층액은 Sartoclear Dynamics® Lab Filter Aid(Sartorius)를 이용하여 여과(0.22 μm)로 정제되었다. 이중특이성 항원 결합 단백질은 친화도 및 크기 배제 크로마토그래피를 연이어 수행하도록 구비된 Akta Pure 25 L FPLC 시스템(GE Lifesciences)을 사용하여 정제되었다. 친화도 크로마토그래피는 표준 친화도 크로마토그래피 프로토콜에 따라 MAbSelect SuRE 또는 단백질 L 컬럼(GE Lifesciences) 상에서 수행된다. 크기 배제 크로마토그래피는 Superdex 200pg 16/600 컬럼(GE Lifesciences)을 사용하여 표준 프로토콜에 따라 고순도 단량체 단백질을 수득하기 위해 친화성 컬럼으로부터 용리(pH 2.8) 후 바로 수행되었다. 단백질 농도는 예상되는 단백질 서열에 따른 계산된 흡광 계수를 사용하여 NanoDrop 시스템(Thermo Scientific)에서 결정되었다. 필요한 경우, 농도는 비바스핀(Vivaspin) 장치(싸토리우스(Sartorius))에 의해 조정되었다. 최종적으로, 정제된 분자는 2 내지 8℃의 온도에서 약 1 mg/ML 농도의 인산염 완충 식염수에서 보관되었다.

[0589] MAG 양성 및 MAG 음성 종양 세포주에 대한 상기 이중특이성 분자의 세포독성 활성은 각각 LDH-방출 분석으로 분석되었다. 따라서, 상기 세포 표면 상의 HLA-A*02/MAG-003의 가변량을 나타내는 종양 세포주는 TCER® 분자의 증가하는 존재하에 건강 공여자(HLA-A*02+)에서 분리된 PBMC와 공동배양되었다. 48시간 후, 표적 세포주의 용해는 CytoTox 96 비방사성 세포독성 분석 키트(PROMEGA)를 활용하여 측정되었다.

[0590] 그러한 분석의 예시적인 결과는 도면에 나타나 있다(예시 2). 상기 결과 EC_{50}-값이 표 5에 요약되어 있다.

[0591] **표 5:** 상이한 모집 항체와 비교한 사멸 분석의 EC_{50}-값의 요약

모집인자	고표적 EC_{50}	저표적 EC_{50}	표적 외 양성 EC_{50}	음성 EC_{50}
UCHT1(V17)	3 pM	4 pM	146 pM	11559 pM
BMA031(V36)	69 pM	383 pM	21555 pM	해당 없음

[0592]

[0593] 상기 결과는 상기 UCHT1(V17)-기반 분자와 비교된 BMA031(V36) 기반 TCER® 분자의 감소된 역가를 나타낸다(각각, 고발현 세포주에서 23배 및 저발현 세포주에서 96배). 상기 EC_{50}-값에 기반하여, 상기 안정성 범위는 상기 정의 섹션에서 상기 설명된 바와 같이 계산되었다. 요약하자면, 안전성 범위는 표적 외 발현 세포의 사멸의 EC_{50}과 표적 (TAA) 발현 세포 사멸의 EC50 비율로 정의된다. 이는 상기 UCHT1(V17) 기반 TCER®는 약 49배의 안전성 범위를 나타내는 반면, 상기 BMA031(V36) 기반 TCER®은 약 312배의 증가된 안전성 범위를 나타냄(표적(TAA) 고발현 종양 세포주와 표적 외 발현 종양 세포주의 비교)을 암시한다.

[0594] 상기 관찰 결과는 일반적으로 저친화도 모집 도메인의 이용이 표적 및 표적 외 간의 구별을 개선하여 그로 인해 안정성 범위를 증가시킬 수 있음을 시사했다. 상기 가정의 추가 검증을 위해, 1차 건강 조직 세포(HLA-A*02+)에 대한 MAG-003-특이적 TCER® 분자의 세포독성 활성이 평가되었다. 이를 위해, LDH가 10:1의 E:T 비율 및 TCER®의 증가하는 농도에서 건강한 HLA-A*02+ 공여자의 PBMC 작용기 세포와 11개의 상이한 1차 건강 조직 세포(HLA-A*02+)의 공동배양에서 결정되었다. 세포는 1차 조직 세포 특이적 배지 및 최적 T세포 배지의 50% 혼합물에서 공동배양되었다. 안정성 범위를 결정하기 위해, 상기 TCER® 분자가 상기 일차 세포의 각 배지 조합 그리고 100% 최적 T세포 배지에서 MAG-003 양성 종양 세포주 Hs695T와 함께 동일한 설정에서 공동배양하여 다른 배지에 의해 초래되는 편향을 배제하였다. 48시간의 공동 배양 후, 상층액을 수확하였고 LDH-Glo™ 키트(Promega)를 사용하여 LDH 방출 측정으로 세포 용해를 분석하였다.

[0595] 도 5 및 도6에서, 각 세포독성 플롯은 PBMC를 사용한 공동 배양 및 상기 TCER 분자의 농도 증가 후에 동일한 배지 조합에서 상기 대조 종양 세포주 Hs695T(채워진 원)와 비교하여 1차 건강 세포 유형(빈 원) LDH 방출을 나타낸다. 도5는 UCHT1(V17) 기반 MAG-003 특이적 TCER® 분자의 결과를 요약한다. 모든 시험한 세포 유형에 대하여, 비점막 상피 세포 및 PBMC를 제외하고, 강한 반응성이 감지되었고 각 EC_{50}-값이 결정될 수 있었다. EC_{50}-값에 기반하여, 안전성 범위는 정의 섹션 내에서 상기 설명된 바와 같이 계산되었다. x배의 안전성 범위가 도면 내에 표시되어 있다. UCHT1(V17) 기반 TCER®의 경우. 가장 중요한 안전성 범위가 성상 세포(48배), 진피 미세혈관 내피 세포(94배) 및 중간엽 줄기 세포(170배)에 대해 결정되었다.

[0596] 상기 BMA031(V36) 기반 TCER® 분자의 경우, 건강한 일차 세포에 대한 모든 반응은 EC_{50}를 계산하기에 너무 낮았다. 대신, 컷오프 값에서 반응을 보이는 제1 TCER® 농도로서 결정된 최저 관찰 효과 수준(LOEL)에 기반하여 안전성 범위를 결정하였다. 상기 컷오프는

[0597] ([모든 3회 반복 측정치의 표준 편차 x 3] + [TCER 대조물질 없음])

[0598] (TCER 대조물질 없음은 각 세포독성 플롯에서 점선으로 표시됨)으로 정의되고, 임계점으로 사용되어 건강 조직 세포와 종양 제어 세포주 간의 상기 LOEL 및 안전성 범위를 결정한다. BMA031(V36)-기반 TCER®의 모든 결정된 안전성 범위는 1000배 초과였다.

[0599] 상기 MAG-003 특이적 TCER®-분자의 맥락 내에서 저친화도 모집인자 BMA031(V36)의 사용이 상당한 확장 안전성 범위를 야기한다는 것이 도 5및 도6의 비교로부터 명백하다.

[0600] **예시 3: 친화성 생성은 인간화 UCHT1 변이체를 감소시킴**

[0601] 상기 CD3 특이적 인간화 항체 UCHT1(V17)의 저친화성 변이체를 수득하기 위하여, 변이체의 구조 가이드된 설계가 수행되었다. 표적 CD3δ/ε(PDB ID:1xiw)과의 복합체에서 UCHT1의 밝혀진 구조에 기반하여, 점 돌연변이가 단백질 그 자체의 불안정화 없이 친화성을 낮추는 것으로 추정되는 상기 항체에 도입되었다.

[0602] 상기 목적을 달성하기 위해, 위치는 주로 상기 CDR 내에서 선택되었고; 상기 밝혀진 구조에서 추론 가능한 바와 같이, 상기 2개의 단백질 간의 계면은 주로 CD3 ε과 상기 항체 중쇄 간에서 형성되고, 따라서 상기 중쇄 내의

위치만이 돌연변이를 위해 고려된다.

[0603] 명확하게 하기 위해, CD3ε 상의 위치는 사슬 식별자: A ID 1xiw를 사용한 PDB 유입에서와 같이 순차적으로 넘버링되었다, .

[0604] G31E는 CD3ε48D, CD3ε49E, CD3ε50D 및 CD3ε51D에 의해 형성되는 음전하 표면 패치를 향하는 상기 항체의 표면 상에 음전하를 도입하며, 이는 아마도 정전기 반발을 야기하고 따라서 친화도를 낮출 것이다.

[0605] Y54Q는 상기 결합 표면의 형상 상보성을 변경하고 Y54의 방향족 고리와 CD3ε48D의 무극성 줄기 간의 소수성 상호작용을 제거한다.

[0606] Y54E는 상기 결합 표면의 형상 상보성을 변경하고 Y54의 방향족 고리와 CD3ε48D의 무극성 줄기 간의 소수성 상호작용을 제거하며 추가적으로 CD3ε48D, CD3ε49E, CD3ε50D 및 CD3ε51D에 의해 형성되는 상기 음전하 패치를 향하는 음전하를 도입한다.

[0607] K55R은 유사한 물리화학적 성질을 가진 더 큰 측쇄를 도입하고, 이는 55K의 Nζ와 CD3ε56S의 백본 사이에서 형성된 H 결합을 제거한다. 또한, 상기 측쇄의 증가된 크기는 결합 형태의 다소 변화를 야기한다.

[0608] K55E는 양전하를 음전하로 대체하며, 이는 55K의 Nζ와 CD3ε36S의 백본 사이에서 형성된 H 결합을 제거한다. 또한 상기 음전하의 도입은 D3ε57D, CD3ε58E, 및 CD3ε59D에 의해 형성된 음전하 패치로부터 정전기적 반발을 야기한다.

[0609] 상기 발견에 기반하여, UCHT1(V20)을 UCHT1(V27)에 대해 코딩하는 서열이 표 6에서 요약된 바와 같이 생성되었다.

[0610] 상기 인간화 UCHT1-서열을 최적화하기 위한 추가 시도에서, CDR-H3 내의 잠재적인 전사 후 변형 위치(Asp-Isomerization, 106D107S)는 106E의 도입으로 인해 제거되었다. 상기 변형은 UCHT1(V17), UCHT1(20), UCHT1(V21) 및 UCHT1(V23)에서 도입되며, 이는 각각 변이체 UCHT1(V17opt), UCHT1(V20opt), UCHT1(V21opt) 및 UCHT1(V23opt)을 초래한다.

[0611] **표 6:** 인간화 UCHT1-변이체를 초래하는 서열의 조합

UCHT-변이체	서열 식별 번호 [VH]	서열 식별 번호 [VL]
V20	158	145
V21	149	145
V22	150	145
V23	151	145
V24	152	145
V25	153	145
V26	154	145
V27	155	145
V17opt	156	145
V20opt	159	145
V21opt	157	145
V23opt	160	145

[0612]

[0613] 표 6에서 설명된 인간화 UCHT1-변이체 PRAME-004 특이적(Vα: 서열 식별 번호: 48, Vβ: 서열 식별 번호: 44) 및 MAG-003 특이적(Vα: 서열 식별 번호: 21, Vβ: 서열 식별 번호: 30)을 사용하여, TCER® 분자가 상기 설명된 바와 같이 발생, 생성 및 정제되었다.

[0614] **예시 4: 설계된 UCHT1-변이체의 친화도 측정**

[0615] 생체층 간섭측정법을 사용한 친화도 측정을 위해, 상기 분자 CD3δε-Fc가 생성되었다. 따라서, 인간 CD3δ 및 CD3ε의 세포외 도메인은 (놉-인투-홀(knob-into-hole) 변이 및 추가 C-말단 His 태그를 함유하는) TCER® 구조

체 내에서 사용된 바와 같이 Fc-도메인의 N-말단에 융합되며 각각 서열 식별 번호: 161 및 서열 식별 번호: 162를 초래한다.

[0616] CD3δε-Fc 분자는 ExpiCHO 세포에서 발현되었고 상기 설명된 바와 같이 단백질 A 친화도 크로마토그래피에 이은 크기 배제 크로마토그래피로 정제되었다.

[0617] 생체층 간섭측정법을 사용하여, (도 6에서 나타낸 바와 같은) 상이한 UCHT1 변이체를 포함하는 이중특이성 TCER® 항원 결합 단백질은 HLA-A*02(도 9a 및 9b, 표 7) 및 CD3δε-Fc(도 9c 및 9d, 표 7)와의 복합체에서 MAGE-A 항원 펩티드(서열 식별 번호: 10)에 대한 그의 결합 친화도를 특징으로 하였다. 측정은 제조업체에 의해 권장되는 설정을 사용한 Octet RED384 시스템에서 수행되었다. 요약하자면, 결합 반응속도가 PBS, 0.05% Tween-20, 0.1% BSA를 완충제로 사용하여 30℃ 및 1000 rpm의 진탕 속도에서 측정되었다. 펩티드-HLA-A*02 복합체 또는 CD3δε-Fc는 상기 이중특이성 TCER® 분자의 연속 희석물을 분석하기 전에 바이오센서(HIS1K)에 로딩되었다. 모든 TCER® 분자는 ~2 nM의 K_D 값을 갖는 HLA-A*02/MAG-003에 대한 유사한 결합을 나타내었다. CD3δε 친화도는 3 내지 750 nM 범위의 K_D 값을 갖는 200배 이상의 범위를 포함한다.

[0618] **표 7**: 표 6에 따른 상이한 UCHT1 변이체를 포함하는 TCER® 분자의 친화도 분석 K_D 값은 생체층 간섭측정법으로 측정되었다.

UCHT-변이체	K_D HLA-A*02/MAG-003 [nM]	K_D CD3δε-Fc [nM]
V17	1.9	3.4
V20	2.0	17.8
V21	2.3	7.9
V23	2.1	46.1
V17opt	2.0	22.6
V20opt	1.7	373.0
V21opt	2.1	106.4
V23opt	2.4	747.1

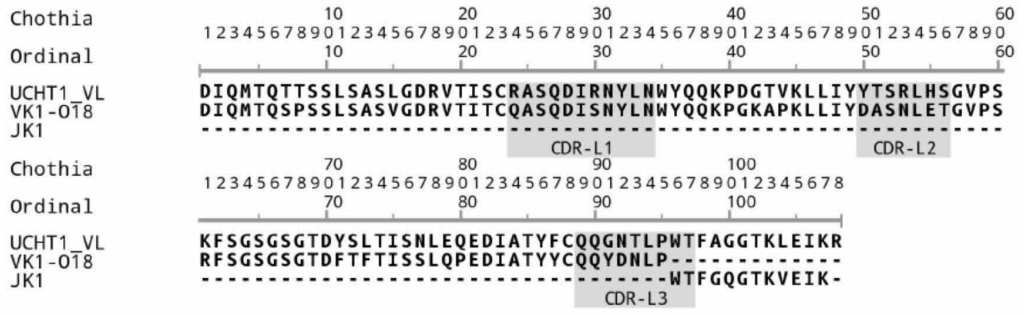
[0619]

[0620] **예시 5: 저친화도 인간화 UCHT1 변이체의 감소된 역가**

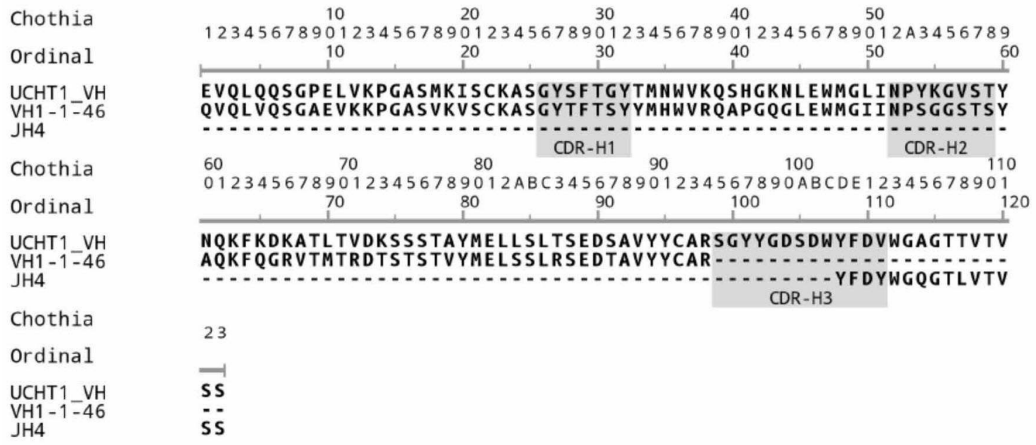
[0621] MAG-003 특이적 TCER® 분자의 세포 독성에 관한 역가가 예시 2 내에서 상기 설명된 바와 같이 LDH-방출 분석에서 평가되었다. 대표적인 분석의 결과가 도 10에 나와 있다. 예상한 바와 같이, 새로 설계된 변이체(UCHT1(V17opt), UCHT1(V20), UCHT1(V21), UCHT1(V23))는 UCHT1(V17)의 고친화도 모집 도메인을 함유한 TCER®과 비교하여 감소된 역가를 나타냈다. 또한, 역가에 따른 상기 TCER® 분자의 순위는 상기 각 모집인자 변이체의 친화도를 밀접하게 반영한다(가장 높은 효능: UCHT1(V17) < UCHT1(V21) < UCHT1(V20) < UCHT1(V17opt) < UCHT1V23). 효능에 대한 상기 효과는 HLA-A*02와의 복합체인 MAG-003에 대한 상기 TCR-도메인의 친화도가 비슷하기 때문에 상기 모집 도메인에 단독으로 기인한다(도 9).

도면

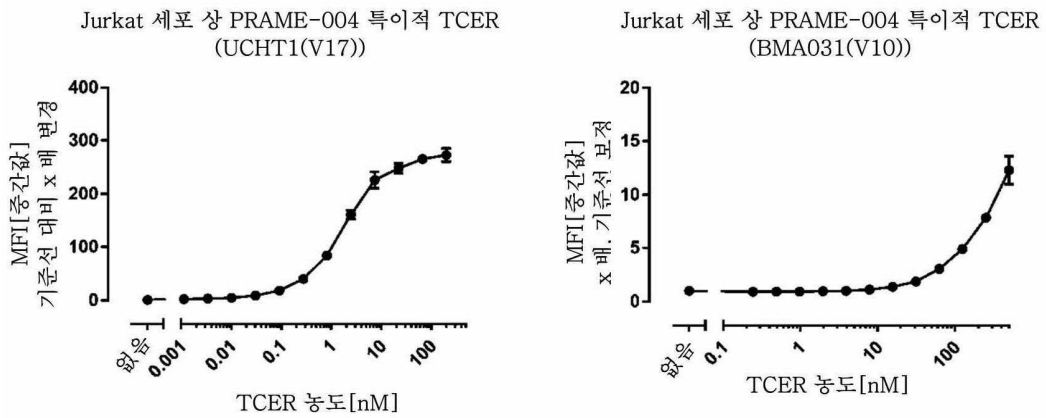
도면1



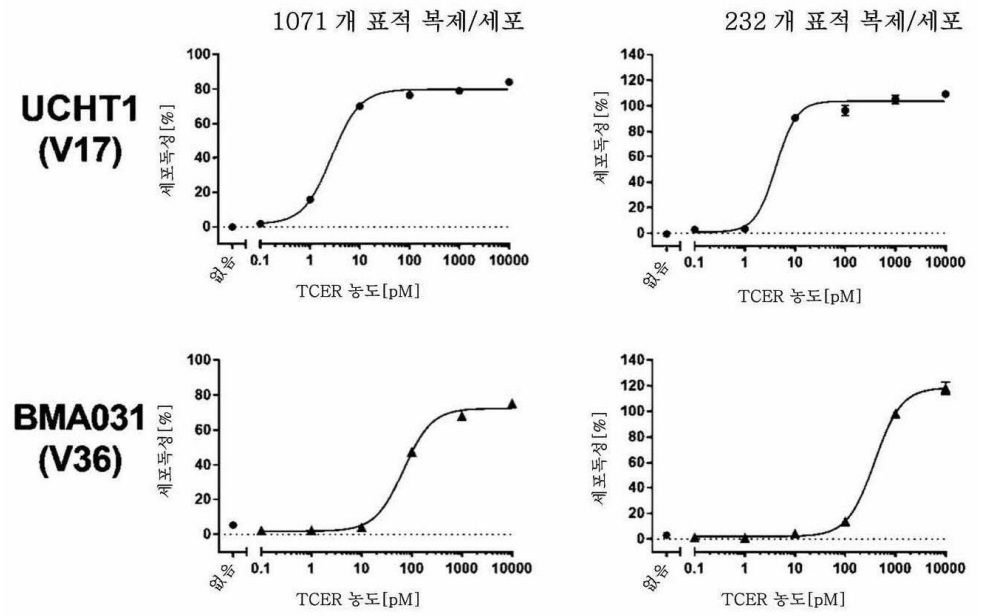
도면2



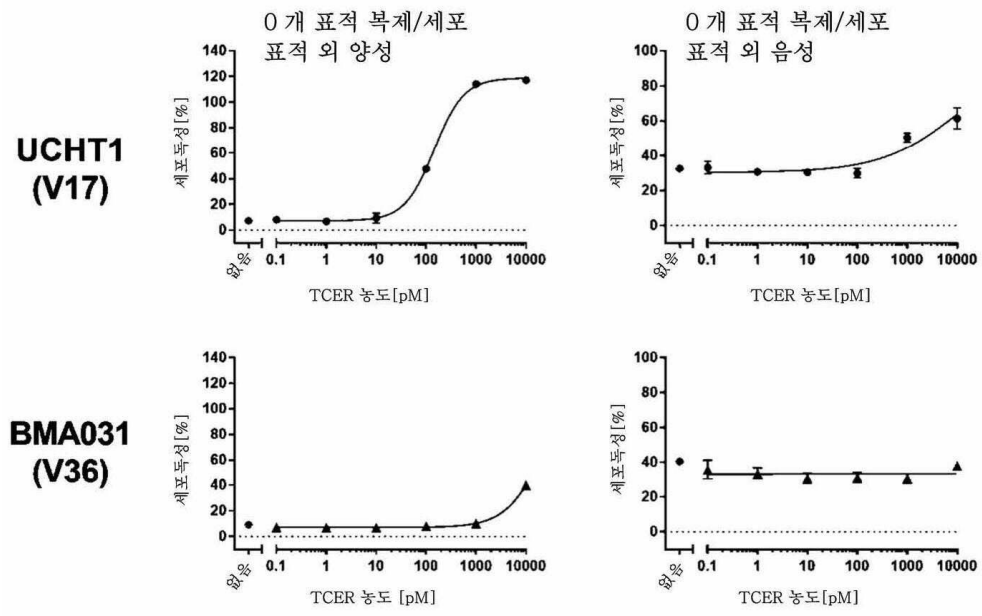
도면3



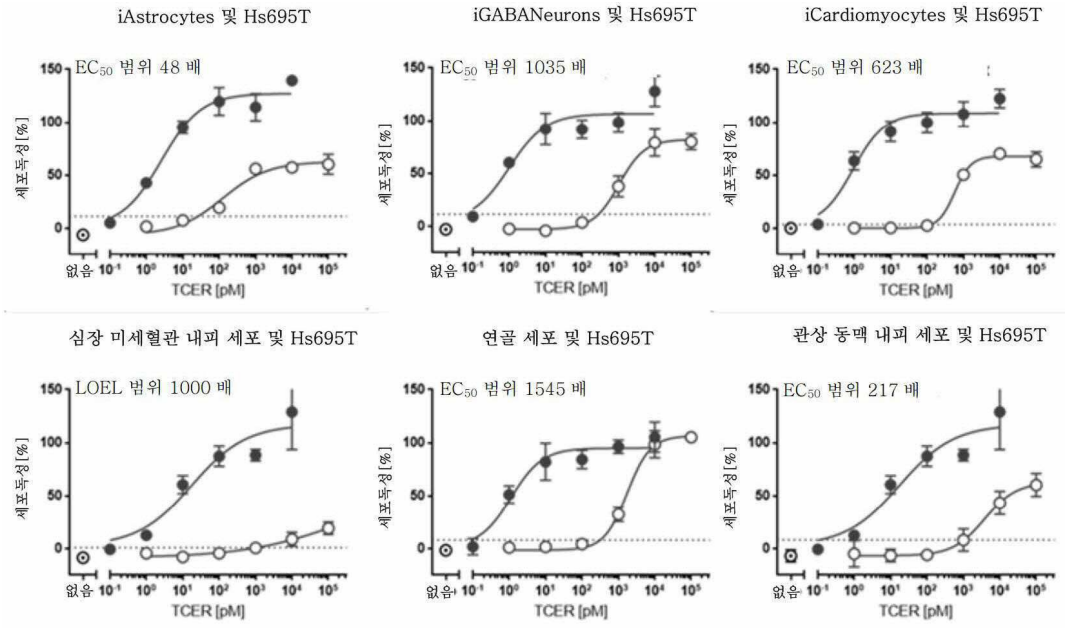
도면4a


1071 개 표적 복제/세포
232 개 표적 복제/세포
UCHT1
(V17)
BMA031
(V36)
세포독성[%]
TCER 농도[pM]
없음
0.1
1
10
100
1000
10000

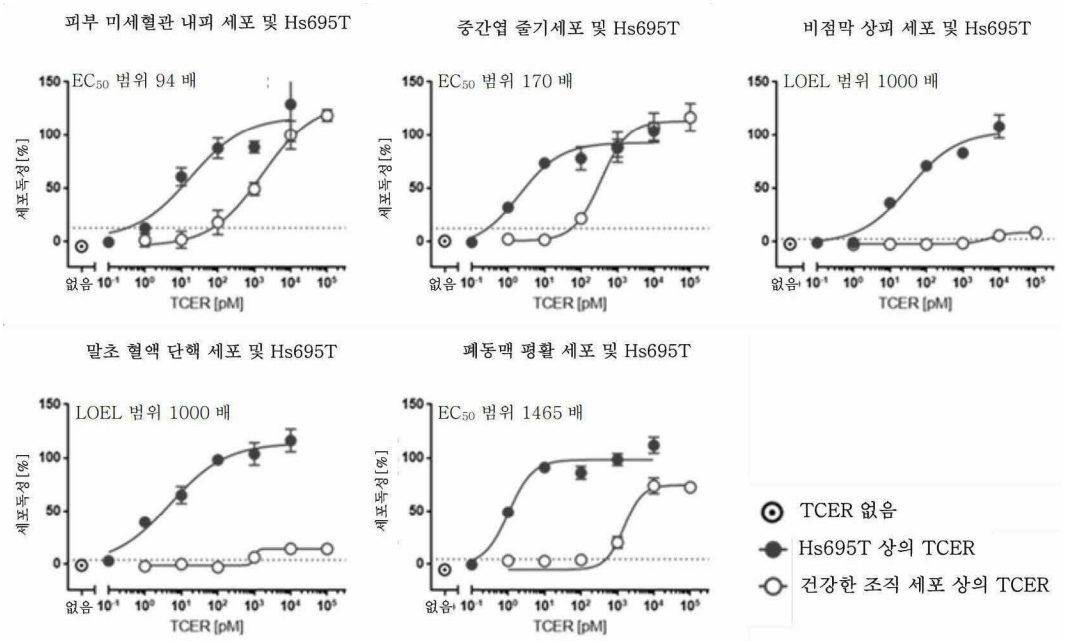
도면4b


0 개 표적 복제/세포
표적 외 양성
0 개 표적 복제/세포
표적 외 음성
UCHT1
(V17)
BMA031
(V36)
세포독성[%]
TCER 농도[pM]
TCER 농도 [pM]
없음
0.1
1
10
100
1000
10000

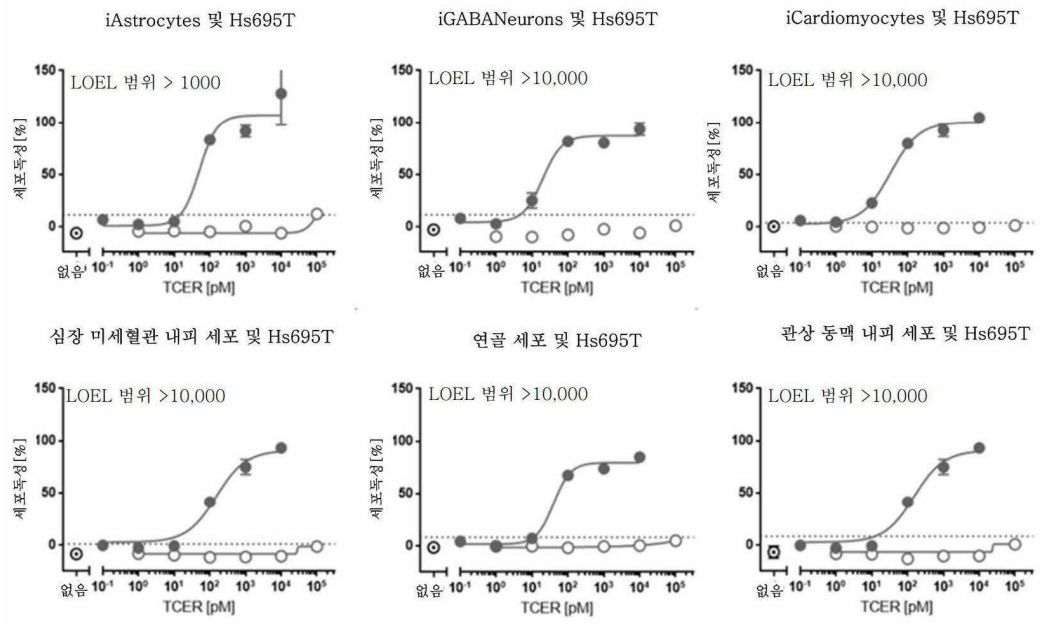
도면5a


iAstrocytes 및 Hs695T
EC50 범위 48 배
iGABANeurons 및 Hs695T
EC50 범위 1035 배
iCardiomyocytes 및 Hs695T
EC50 범위 623 배
심장 미세혈관 내피 세포 및 Hs695T
LOEL 범위 1000 배
연골 세포 및 Hs695T
EC50 범위 1545 배
관상 동맥 내피 세포 및 Hs695T
EC50 범위 217 배
세포독성[%]
TCER [pM]
없음

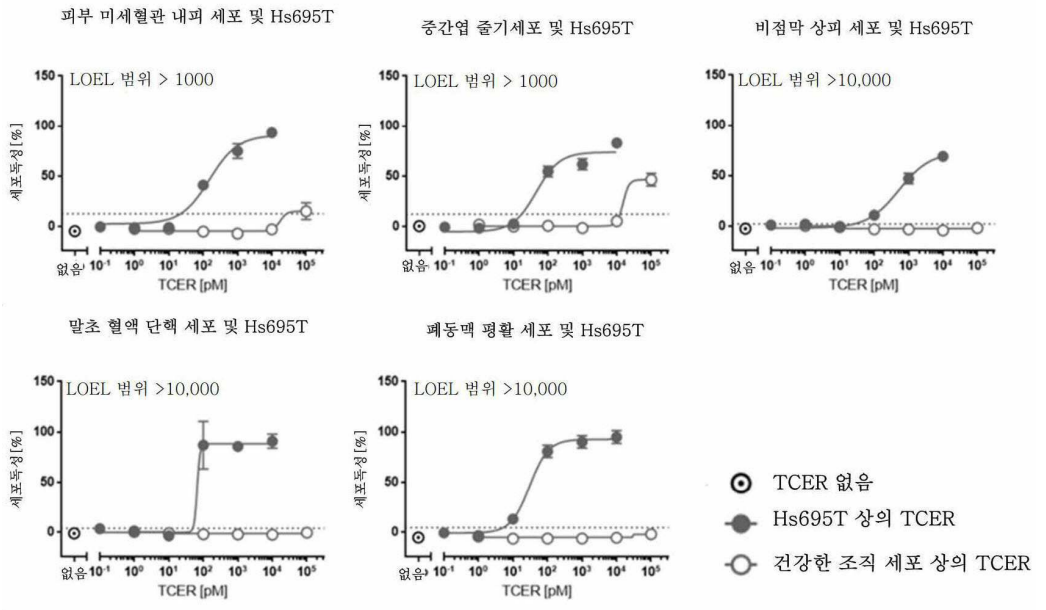
도면5b


피부 미세혈관 내피 세포 및 Hs695T
EC50 범위 94 배
중간엽 줄기세포 및 Hs695T
EC50 범위 170 배
비점막 상피 세포 및 Hs695T
LOEL 범위 1000 배
말초 혈액 단핵 세포 및 Hs695T
LOEL 범위 1000 배
폐동맥 평활 세포 및 Hs695T
EC50 범위 1465 배
세포독성[%]
TCER [pM]
없음
TCER 없음
Hs695T 상의 TCER
건강한 조직 세포 상의 TCER

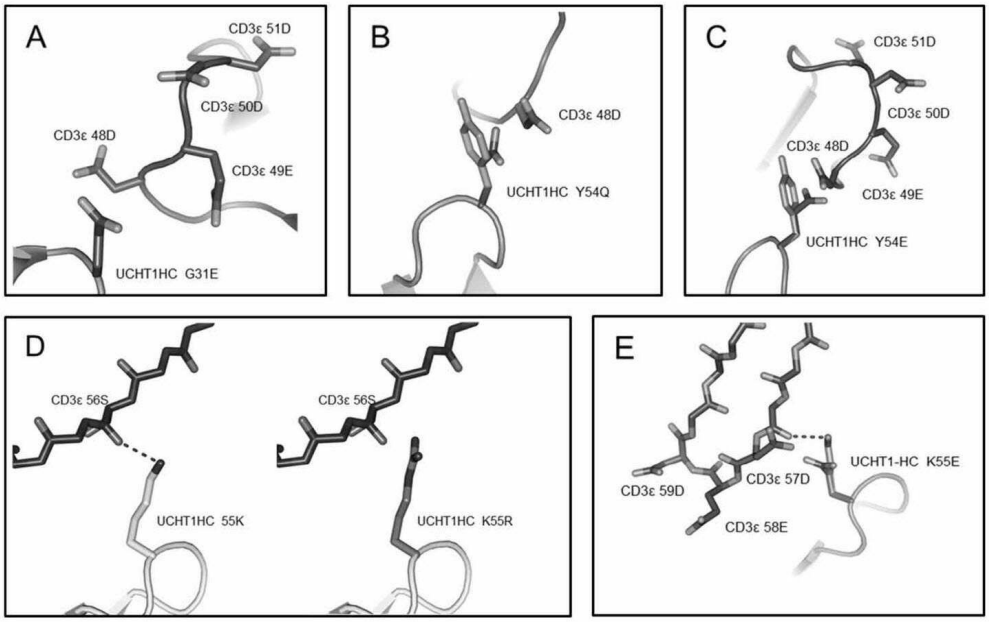
도면6a


iAstrocytes 및 Hs695T
LOEL 범위 > 1000
iGABANeurons 및 Hs695T
LOEL 범위 >10,000
iCardiomyocytes 및 Hs695T
LOEL 범위 >10,000
심장 미세혈관 내피 세포 및 Hs695T
LOEL 범위 >10,000
연골 세포 및 Hs695T
LOEL 범위 >10,000
관상 동맥 내피 세포 및 Hs695T
LOEL 범위 >10,000
세포독성 [%]
TCER [pM]
없음

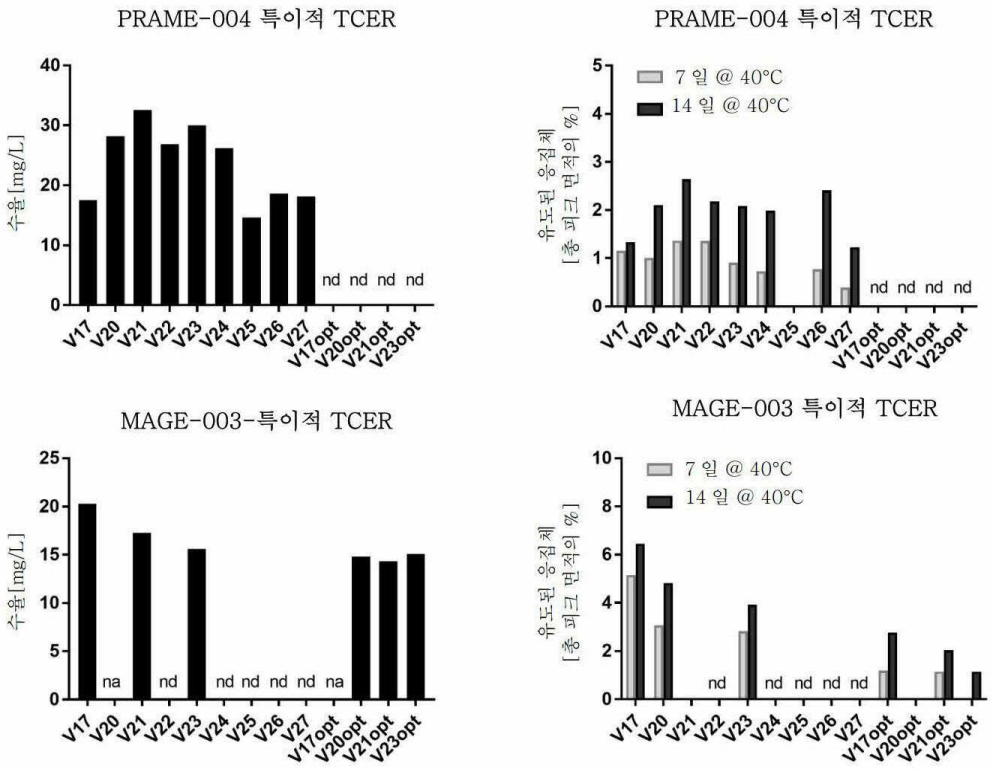
도면6b


피부 미세혈관 내피 세포 및 Hs695T
LOEL 범위 > 1000
중간엽 줄기세포 및 Hs695T
LOEL 범위 > 1000
비점막 상피 세포 및 Hs695T
LOEL 범위 >10,000
말초 혈액 단핵 세포 및 Hs695T
LOEL 범위 >10,000
폐동맥 평활 세포 및 Hs695T
LOEL 범위 >10,000
세포독성 [%]
TCER [pM]
없음
TCER 없음
Hs695T 상의 TCER
건강한 조직 세포 상의 TCER

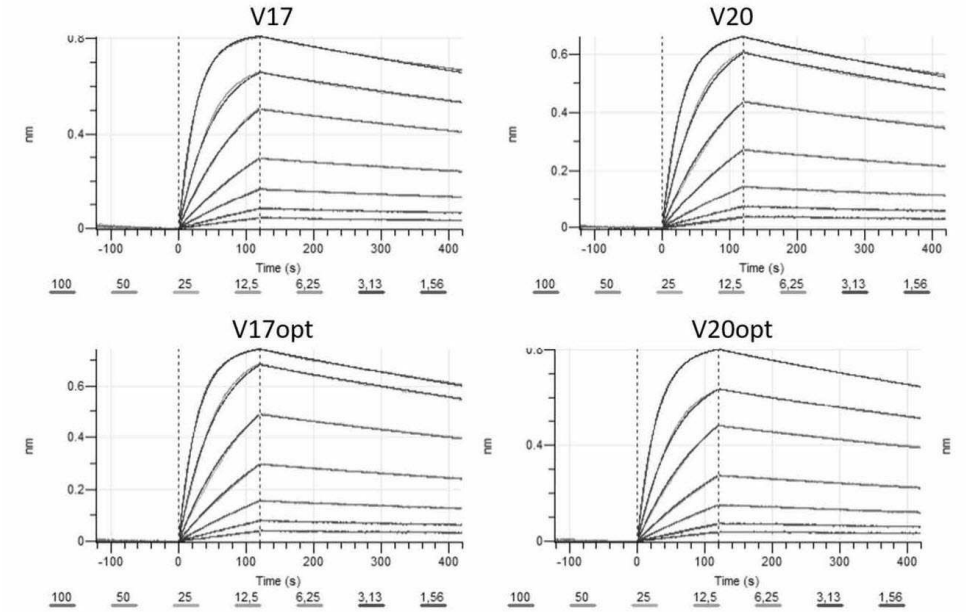
도면7


A
CD3ε 51D
CD3ε 50D
CD3ε 48D
CD3ε 49E
UCHT1HC G31E
B
CD3ε 48D
UCHT1HC Y54Q
C
CD3ε 51D
CD3ε 50D
CD3ε 48D
CD3ε 49E
UCHT1HC Y54E
D
CD3ε 56S
UCHT1HC 55K
CD3ε 56S
UCHT1HC K55R
E
UCHT1-HC K55E
CD3ε 59D
CD3ε 57D
CD3ε 58E

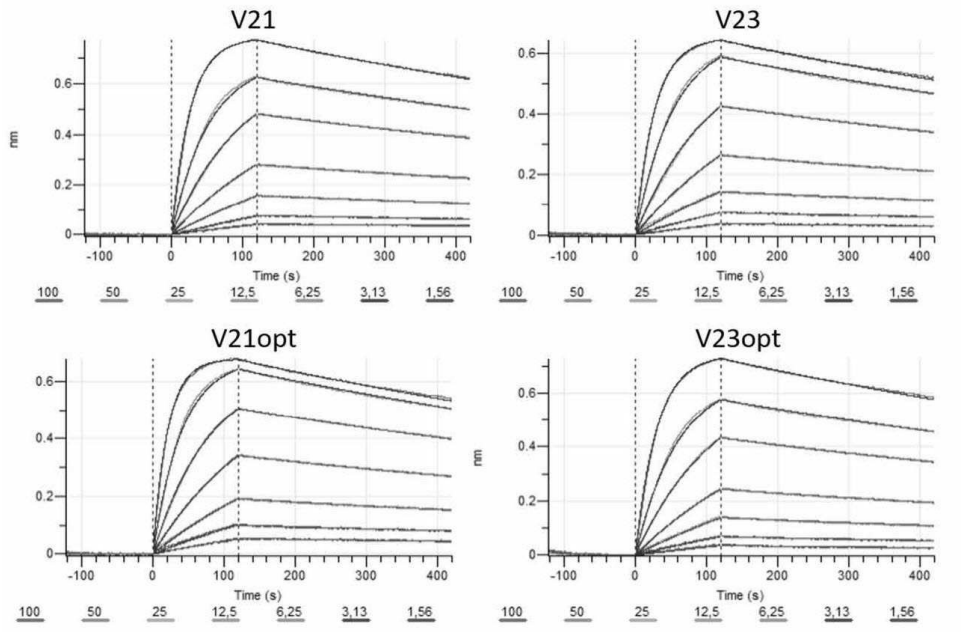
도면8


PRAME-004 특이적 TCER
수율[mg/L]
nd nd nd nd
V17 V20 V21 V22 V23 V24 V25 V26 V27 V17opt V20opt V21opt V23opt
PRAME-004 특이적 TCER
7 일 @ 40°C
14 일 @ 40°C
유도된 응집체 [총 피크 면적의 %]
nd nd nd nd
MAGE-003-특이적 TCER
수율[mg/L]
na nd nd nd nd nd na
MAGE-003 특이적 TCER
7 일 @ 40°C
14 일 @ 40°C
유도된 응집체 [총 피크 면적의 %]
nd nd nd nd nd

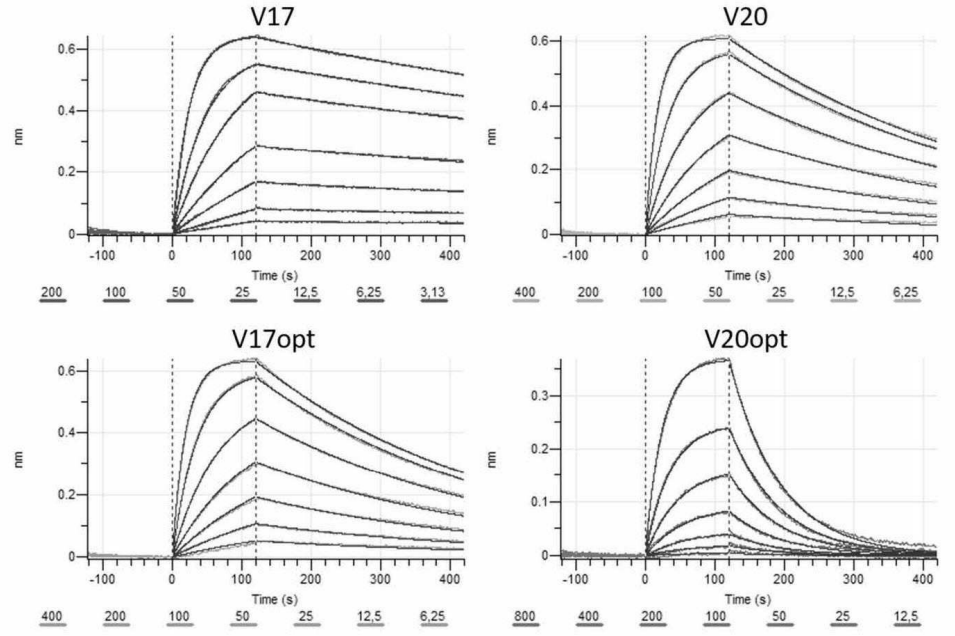
도면9a


V17
V20
V17opt
V20opt
nm
Time (s)
100
50
25
12,5
6,25
3,13
1,56

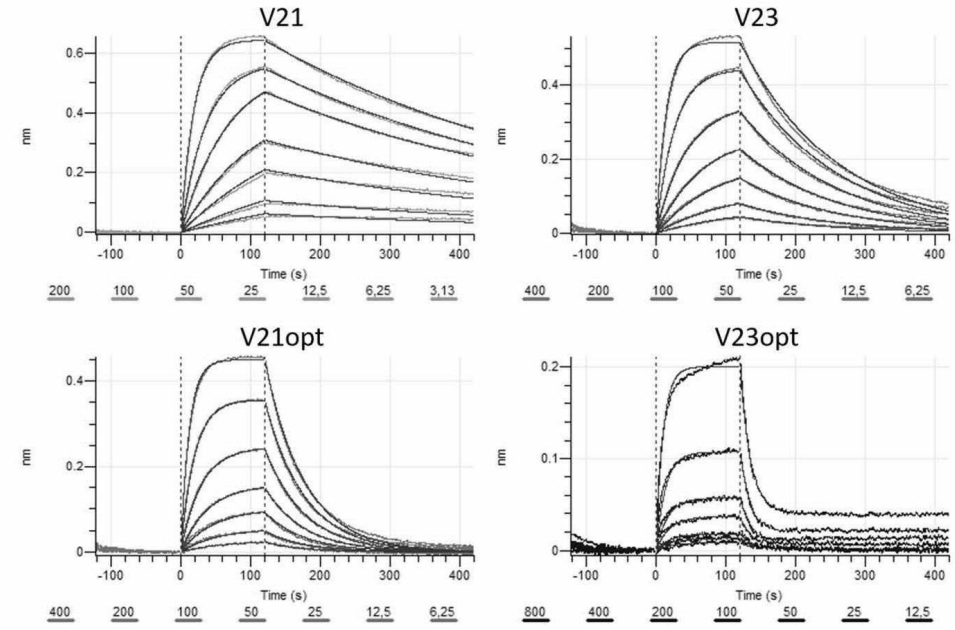
도면9b


V21
V23
V21opt
V23opt
nm
Time (s)
100
50
25
12,5
6,25
3,13
1,56

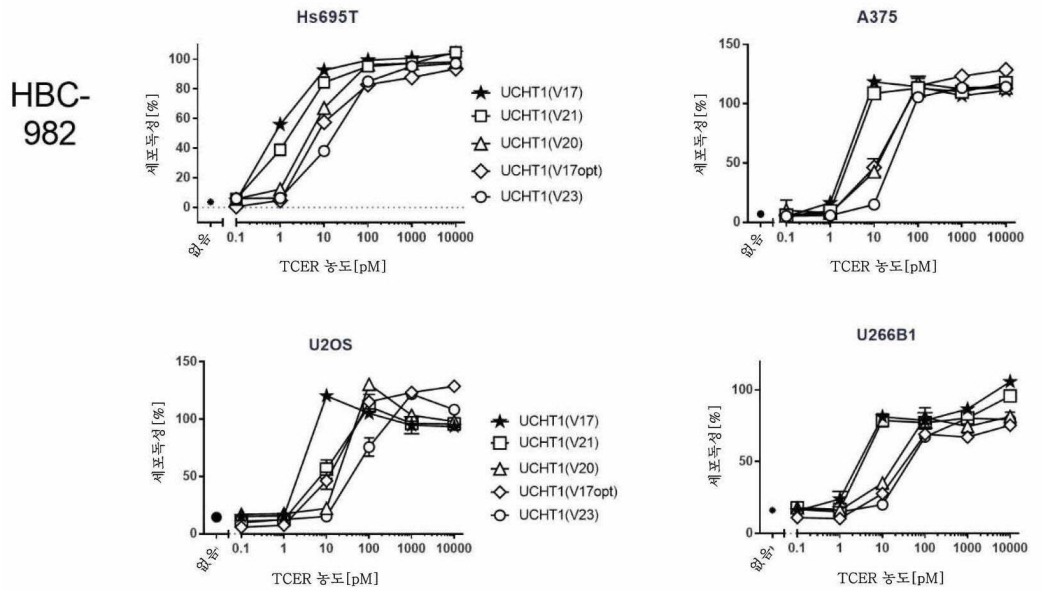
도면9c


V17
V20
V17opt
V20opt
nm
Time (s)
200 100 50 25 12,5 6,25 3,13
400 200 100 50 25 12,5 6,25
400 200 100 50 25 12,5 6,25
800 400 200 100 50 25 12,5

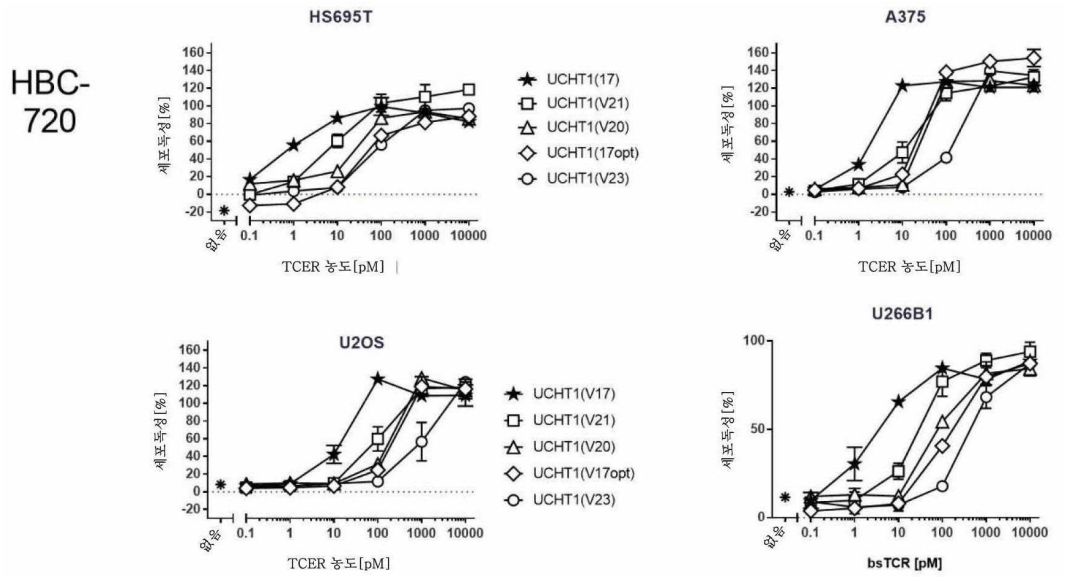
도면9d


V21
V23
V21opt
V23opt
nm
Time (s)
200 100 50 25 12,5 6,25 3,13
400 200 100 50 25 12,5 6,25
400 200 100 50 25 12,5 6,25
800 400 200 100 50 25 12,5

도면10a



도면10b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Immatics Biotechnologies GmbH

<120> MODIFIED BI SPECIFIC ANTI CD3 ANTIBODIES

<130> 1017-23 PCT

<140> PCT/EP2020/071655

<141> 2020-07-31

<150> DE 10 2019 121 022.4

<151> 2019-08-02

<150> US 62/882,364

<151> 2019-08-02

<160> 286

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL5_CDRL1

<400> 1

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<

210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL5_CDR_L2

<400> 2

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL5_CDRL3

<400> 3

Gln Gln Gly Gln Thr Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRH1_consensus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> wherein Xaa is any amino acid, preferably G or E, more preferably

G

<400> 4

Xaa Tyr Thr Met Asn

1 5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRH2_consensus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> wherein Xaa is any amino acid, preferably Q,Y or E, more preferably Q

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> wherein Xaa is any amino acid, preferably R, K or E, more preferably R or K, such as K

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> wherein Xaa is any amino acid, preferably S or T, more preferably S

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> wherein Xaa is any amino acid, preferably F or V, more preferably F

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> wherein Xaa is any amino acid, prefreably G or D, more preferably D

<400> 5

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

1 5 10 15

Xaa

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> CDRH3_consensus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> wherein Xaa is any amino acid, preferably D or E, more preferably D

<400> 6

Ser Gly Tyr Tyr Gly Xaa Ser Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDRH2_ VH2,8,16,19,20

<400> 7

Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Asp

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDRH3_VH2-15,19,21

<400> 8

Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PRAME-004

<400> 9

Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly Leu

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> MAG-003

<400> 10

Lys Val Leu Glu His Val Val Arg Val

1 5

<210> 11

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-a (L)

<400> 11

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

20

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR2-a (L)

<400> 12

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

1 5 10 15

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR2-a (L)

<400> 13

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

1 5 10 15

<210> 14

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR3-a (L)

<400> 14

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR4-a (L)

<400> 15

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

1 5 10

<210> 16

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-b (H)

<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 17

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR2-b (H)

<400> 17

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly

1 5 10

<210> 18

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR3-b (H)

<400> 18

Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR3-b (H)

<400> 19

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 20

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Va_114_iso0

<400> 20

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser
1 5 10 15

Val Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr
20 25 30

Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Lys Gly Leu Gln Leu Leu Thr Tyr Ile
35 40 45

Tyr Ser Ser Gln Asp Ser Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu Leu
50 55 60

Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr
65 70 75 80

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

Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro
100 105

<210> 21

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Va_114_iso1

<400> 21

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser
1 5 10 15

Val Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr
20 25 30

Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Lys Gly Leu Gln Leu Leu Thr Tyr Ile
35 40 45

Tyr Ser Ser Gln Asp Gln Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu Leu
50 55 60

Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr

65 70 75 80

Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu Ser Lys

85 90 95

Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro

100 105

<210> 22

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Va_114_iso2

<400> 22

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser

1 5 10 15

Val Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Glu Ser Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr

20 25 30

Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Lys Gly Leu Gln Leu Leu Thr Tyr Ile

35 40 45

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

50 55 60

Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr

65 70 75 80

Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu Ser Lys

85 90 95

Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro

100 105

<210> 23

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Va_114_iso0/1_CDRa1

<400> 23

Asp Ser Ser Ser Thr Tyr

1 5

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Va_114_iso0_CDRa2

<400> 24

Ile Tyr Ser Ser Gln Asp Ser

1 5

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220

><223> Va_114_CDRa3

<400> 25

Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu Ser Lys Ile Ile Phe

1 5 10

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Va_114_iso1/2_CDRa2

<400> 26

Ile Tyr Ser Ser Gln Asp Gln

1 5

<210> 27

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Va_114_iso2_CDRa1

<400> 27

Glu Ser Ser Ser Thr Tyr

1 5

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 28

Gly Gly Ser Gly Gly

1 5

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 29

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

1 5 10

<210> 30

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Vb_114

<400> 30

Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr Glu Met Gly

1 5 10 15

Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Pro Gly His Asp Tyr Leu

20 25 30

Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu Leu Phe Tyr

35 40 45

Phe Cys Tyr Gly Thr Pro Cys Asp Asp Ser Gly Met Pro Glu Asp Arg

50 55 60

Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu Lys Ile Gln

65 70 75 80

Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Ala

85 90 95

Asp Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 31

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Vb_114_CDRb1 (rather PGHDY)

<400> 31

Gly His Asp Tyr

1

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 32

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

1 5 10 15

<210> 33

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 33

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

1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly

20

<210> 34

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Vb_114_CDRb2

<400> 34

Phe Cys Tyr Gly Thr Pro

1 5

<210> 35

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Vb_114_CDRb3

<400> 35

Cys Ala Ser Arg Ala Asp Thr Gly Glu Leu Phe Phe

1 5 10

<210> 36

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> VL mUCHT1

<400> 36

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp

85 90 95

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

100 105

<210> 37

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> VH_mUCHT1

<400> 37

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

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

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

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

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 38

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> VL_V9_Shalaby

<400> 38

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 Arg Asn Tyr
20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp

85 90 95

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

100 105

<210> 39

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> VH_V9_Shalaby

<400> 39

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 Ser Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 40

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> VL_BMA_Shearman

<400> 40

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

Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ile Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 41

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> VH_BMA_Shearman

<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 Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val His Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 42

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> VL_BMA(36)

<400> 42

Gln 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 Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 43

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> VH_BMA(36)

<400> 43

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Ala Glu Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ser 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 His Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Glu Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 44

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HiAff1_Vb

<400> 44

Lys Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Ile Lys Thr Arg Gly
1 5 10 15

Gln Gln Val Thr Leu Ser Cys Ser Pro Ile Pro Gly His Arg Ala Val
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Gln Phe Leu Phe Glu
35 40 45

Tyr Val His Gly Glu Glu Arg Asn Lys Gly Asn Phe Pro Gly Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Arg Gln Phe Ser Asn Ser Ser Ser Glu Met Asn Ile Ser Asn

65 70 75 80

Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Pro Trp

85 90 95

Asp Ser Pro Asn Val Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val

100 105 110

Thr Glu Asp Leu Lys Asn

115

<210> 45

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HiAff1_CDRb1

<400> 45

Pro Gly His Arg Ala

1 5

<210> 46

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HiAff1_CDRb2

<400> 46

Tyr Val His Gly Glu Glu

1 5

<210> 47

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HiAff1_CDRb3

<400> 47

Cys Ala Ser Ser Pro Trp Asp Ser Pro Asn Val Gln Tyr Phe

1 5 10

<210> 48

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HiAff1_Va

<400> 48

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

Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln Ser
20 25 30

Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met
35 40 45

Ser Ile Tyr Gln Glu Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln

50 55 60

Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln
65 70 75 80

Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Ala Val Ile Asp Asn Asp
85 90 95

Gln Gly Gly Ile Leu Thr Phe Gly Thr Gly Thr Arg Leu Thr Ile Ile
100 105 110

Pro Asn Ile Gln Asn
115

<210

> 49

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HiAff1_CDRa1

<400> 49

Asp Arg Gly Ser Gln Ser
1 5

<210> 50

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HiAff1_CDRa2

<400> 50

Ile Tyr Gln Glu Gly Asp

1 5

<210> 51

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HiAff1_CDRa3

<400> 51

Cys Ala Ala Val Ile Asp Asn Asp Gln Gly Gly Ile Leu Thr Phe

1 5 10 15

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 52

Tyr Leu Tyr Asp Ser Glu Thr Lys Asn Ala

1 5 10

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 53

His Leu Met Asp Gln Pro Leu Ser Val

1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 54

Gly Leu Leu Lys Lys Ile Asn Ser Val

1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 55

Phe Leu Val Asp Gly Ser Ser Ala Leu

1 5

<210> 56

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 56

Phe Leu Phe Asp Gly Ser Ala Asn Leu Val

1 5 10

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 57

Phe Leu Tyr Lys Ile Ile Asp Glu Leu

1 5

<210> 58

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 58

Phe Ile Leu Asp Ser Ala Glu Thr Thr Thr Leu

1 5 10

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 59

Ser Val Asp Val Ser Pro Pro Lys Val

1 5

<210> 60

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 60

Val Ala Asp Lys Ile His Ser Val

1 5

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 61

Ile Val Asp Asp Leu Thr Ile Asn Leu

1 5

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 62

Gly Leu Leu Glu Glu Leu Val Thr Val

1 5

<210> 63

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 63

Thr Leu Asp Gly Ala Ala Val Asn Gln Val

1 5 10

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 64

Ser Val Leu Glu Lys Glu Ile Tyr Ser Ile

1 5 10

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 65

Leu Leu Asp Pro Lys Thr Ile Phe Leu

1 5

<210> 66

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 66

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

1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

20 25

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 67

Tyr Leu Met Asp Asp Phe Ser Ser Leu

1 5

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 68

Lys Val Trp Ser Asp Val Thr Pro Leu

1 5

<210> 69

<211> 11

<

212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 69

Leu Leu Trp Gly His Pro Arg Val Ala Leu Ala

1 5 10

<210> 70

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 70

Lys Ile Trp Glu Glu Leu Ser Val Leu Glu Val

1 5 10

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 71

Leu Leu Ile Pro Phe Thr Ile Phe Met

1 5

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 72

Phe Leu Ile Glu Asn Leu Leu Ala Ala

1 5

<210> 73

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 73

Leu Leu Trp Gly His Pro Arg Val Ala Leu Ala

1 5 10

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 74

Phe Leu Leu Glu Arg Glu Gln Leu Leu

1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 75

Ser Leu Ala Glu Thr Ile Phe Ile Val

1 5

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 76

Thr Leu Leu Glu Gly Ile Ser Arg Ala

1 5

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 77

Ile Leu Gln Asp Gly Gln Phe Leu Val

1 5

<210> 78

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 78

Val Ile Phe Glu Gly Glu Pro Met Tyr Leu

1 5 10

<210> 79

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 79

Ser Leu Phe Glu Ser Leu Glu Tyr Leu

1 5

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 80

Ser Leu Leu Asn Gln Pro Lys Ala Val

1 5

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 81

Gly Leu Ala Glu Phe Gln Glu Asn Val

1 5

<210> 82

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 82

Lys Leu Leu Ala Val Ile His Glu Leu

1 5

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 83

Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu

1 5

<210> 84

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 84

Thr Leu Tyr Asn Pro Glu Arg Thr Ile Thr Val

1 5 10

<210> 85

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 85

Lys Leu Gln Glu Lys Ile Gln Glu Leu

1 5

<210> 86

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 86

Ser Val Leu Glu Lys Glu Ile Tyr Ser Ile

1 5 10

<210> 87

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 87

Arg Val Ile Asp Asp Ser Leu Val Val Gly Val

1 5 10

<210> 88

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 88

Val Leu Phe Gly Glu Leu Pro Ala Leu

1 5

<210> 89

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 89

Gly Leu Val Asp Ile Met Val His Leu

1 5

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 90

Phe Leu Asn Ala Ile Glu Thr Ala Leu

1 5

<210> 91

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 91

Ala Leu Leu Gln Ala Leu Met Glu Leu

1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 92

Ala Leu Ser Ser Ser Gln Ala Glu Val

1 5

<210> 93

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 93

Ser Leu Ile Thr Gly Gln Asp Leu Leu Ser Val

1 5 10

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 94

Gln Leu Ile Glu Lys Asn Trp Leu Leu

1 5

<210> 95

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 95

Leu Leu Asp Pro Lys Thr Ile Phe Leu

1 5

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 96

Arg Leu His Asp Glu Asn Ile Leu Leu

1 5

<210> 97

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 97

Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Gly Lys

1 5 10 15

Ser

<210> 98

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 98

Gly Leu Pro Ser Ala Thr Thr Thr Val

1 5

<210> 99

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 99

Gly Leu Leu Pro Ser Ala Glu Ser Ile Lys Leu

1 5 10

<210> 100

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 100

Lys Thr Ala Ser Ile Asn Gln Asn Val

1 5

<210> 101

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 101

Tyr Leu Met Asp Asp Phe Ser Ser Leu

1 5

<210> 102

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 102

Leu Met Tyr Pro Tyr Ile Tyr His Val

1 5

<210> 103

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 103

Lys Val Trp Ser Asp Val Thr Pro Leu

1 5

<210> 104

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 104

Leu Leu Trp Gly His Pro Arg Val Ala Leu Ala

1 5 10

<210> 105

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 105

Val Leu Asp Gly Lys Val Ala Val Val

1 5

<210> 106

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 106

Gly Leu Leu Gly Lys Val Thr Ser Val

1 5

<210> 107

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 107

Lys Met Ile Ser Ala Ile Pro Thr Leu

1 5

<210> 108

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 108

Gly Leu Leu Glu Thr Thr Gly Leu Leu Ala Thr

1 5 10

<210> 109

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 109

Thr Leu Asn Thr Leu Asp Ile Asn Leu

1 5

<210> 110

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 110

Val Ile Ile Lys Gly Leu Glu Glu Ile

1 5

<210> 111

<211> 317

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> MAGE-A4_P43358

<400> 111

Met Ser Ser Glu Gln Lys Ser Gln His Cys Lys Pro Glu Glu Gly Val

1 5 10 15

Glu Ala Gln Glu Glu Ala Leu Gly Leu Val Gly Ala Gln Ala Pro Thr

20 25 30

Thr Glu Glu Gln Glu Ala Ala Val Ser Ser Ser Ser Pro Leu Val Pro

35 40 45

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

50 55 60

Ser Pro Gln Gly Ala Ser Ala Leu Pro Thr Thr Ile Ser Phe Thr Cys
65 70 75 80
Trp Arg Gln Pro Asn Glu Gly Ser Ser Ser Gln Glu Glu Glu Gly Pro
85 90 95
Ser Thr Ser Pro Asp Ala Glu Ser Leu Phe Arg Glu Ala Leu Ser Asn
100 105 110

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

Tyr Thr Leu Val Thr Cys Leu Gly Leu Ser Tyr Asp Gly Leu Leu Gly
180 185 190
Asn Asn Gln Ile Phe Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Ile Val Leu Gly
195 200 205
Thr Ile Ala Met Glu Gly Asp Ser Ala Ser Glu Glu Glu Ile Trp Glu
210 215 220
Glu Leu Gly Val Met Gly Val Tyr Asp Gly Arg Glu His Thr Val Tyr
225 230 235 240

Gly Glu Pro Arg Lys Leu Leu Thr Gln Asp Trp Val Gln Glu Asn Tyr
245 250 255
Leu Glu Tyr Arg Gln Val Pro Gly Ser Asn Pro Ala Arg Tyr Glu Phe
260 265 270
Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Ala Glu Thr Ser Tyr Val Lys Val Leu
275 280 285
Glu His Val Val Arg Val Asn Ala Arg Val Arg Ile Ala Tyr Pro Ser
290 295 300

Leu Arg Glu Ala Ala Leu Leu Glu Glu Glu Glu Gly Val

305 310 315

<210> 112

<211> 318

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> MAGE-A8_P43361

<400> 112

Met Leu Leu Gly Gln Lys Ser Gln Arg Tyr Lys Ala Glu Glu Gly Leu
1 5 10 15
Gln Ala Gln Gly Glu Ala Pro Gly Leu Met Asp Val Gln Ile Pro Thr
20 25 30
Ala Glu Glu Gln Lys Ala Ala Ser Ser Ser Ser Thr Leu Ile Met Gly

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

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

165 170 175
His Ser Tyr Ile Leu Val Thr Cys Leu Gly Leu Ser Tyr Asp Gly Leu
180 185 190
Leu Gly Asp Asp Gln Ser Thr Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Ile Val

195 200 205

Leu Gly Met Ile Leu Met Glu Gly Ser Arg Ala Pro Glu Glu Ala Ile

210 215 220

Trp Glu Ala Leu Ser Val Met Gly Leu Tyr Asp Gly Arg Glu His Ser

225 230 235 240

Val Tyr Trp Lys Leu Arg Lys Leu Leu Thr Gln Glu Trp Val Gln Glu

245 250 255

Asn Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Ser Asp Pro Val Arg Tyr

260 265 270

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

275 280 285

Val Leu Glu His Val Val Arg Val Asn Ala Arg Val Arg Ile Ser Tyr

290 295 300

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

305 310 315

<210> 113

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 113

Thr Val Ala Ala Pro

1 5

<210> 114

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 114

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 115

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 115

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 116

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 116

Thr Val Leu Arg Thr

1 5

<210> 117

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 117

Thr Val Ser Ser Ala Ser

1 5

<210> 118

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 118

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 119

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 119

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 120

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 120

Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ala

1 5

<210> 121

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 121

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

1 5 10 15

<210> 122

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 122

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser

20 25

<210> 123

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 123

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20 25

<210> 124

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 124

Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser

1 5

<210> 125

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 125

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> 126

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Fc_IGHG1*01

<400> 126

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

1 5 10 15

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

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

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

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230
<210> 127
<211> 21
<212> PRT

<213> Artificial sequence IgG1_Hinge

<220><223> TAA

<400> 127

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

Pro Glu Leu Leu Gly
20

<210> 128

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG2_Hinge

<400> 128

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
1 5 10 15

Ala Gly Pro

<210> 129

<211> 53

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG3_Hinge

<400> 129

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

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
20 25 30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala
35 40 45

Pro Glu Leu Leu Gly
50

<210

> 130

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> IgG4_Hinge

<400> 130

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1 5 10 15

Leu Gly

<210> 131

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Fc_knob

<400> 131

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

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

20 25 30

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

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

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

Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

85 90 95

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
100 105 110

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

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

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

145 150 155 160

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Leu Ser Leu Ser Pro

225

<210> 132

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Fc_hole

<400> 132

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

85 90 95

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

100 105 110

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

115 120 125

Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys

130 135 140

Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

145 150 155 160

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Leu Ser Leu Ser Pro

225

<210

> 133

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDRH1_VH2,6,7,9,10,12,13,14,16,18

<400> 133

Gly Tyr Thr Met Asn

1 5

<210> 134

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDRH1_VH8,11,15,19,20,21,22

<400> 134

Glu Tyr Thr Met Asn

1 5

<210> 135

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDRH2_VH6

<400> 135

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

1 5 10 15

Gly

<210> 136

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDRH2_VH7

<400> 136

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

1 5 10 15

Gly

<210> 137

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> VH2

<400> 137

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 138

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDRH2_VH9,11,18,21,22

<400> 138

Leu Ile Asn Pro Gln Lys Gly Val Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Asp

<210> 139

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDRH2_VH10

<400> 139

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

1 5 10 15

Asp

<210> 140

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDRH2_VH12

<400> 140

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

1 5 10 15

Asp

<210> 141

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDRH2_VH13

<400> 141

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

1 5 10 15

Asp

<210> 142

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDRH2_VH14, VH15

<400> 142

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

1 5 10 15

Asp

<210>

143

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker

<400> 143

Gly Gly Gln Gly Ser Gly Gly Thr Gly Ser Gly Gly Gln Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Thr Gly Ser Gly Gly Gln Gly Ser

20 25

<210> 144

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDRH3_VH16, VH18, VH20, VH22

<400> 144

Ser Gly Tyr Tyr Gly Glu Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 145

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> VL5

<400> 145

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 Arg Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Gln Thr Leu Pro Trp

85 90 95

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

100 105

<210> 146

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HIV-005

<400> 146

Ser Leu Tyr Asn Thr Val Ala Thr Leu

1 5

<210> 147

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Influenza A MP

<400> 147

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu

1 5

<210> 148

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HCMV pp65

<400> 148

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val

1 5

<210> 149

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> VH9 = VH17

<400> 149

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Gln Lys Gly Val Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 150

<211> 122

<212

> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> VH10

<400> 150

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 151

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> VH11 = VH21

<400> 151

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Gln Lys Gly Val Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 152

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> VH12

<400> 152

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 153

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> VH13

<400> 153

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 154

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> VH14

<400> 154

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 155

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> VH15

<400> 155

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 156

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> VH16

<400> 156

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Glu Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 157

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> VH18

<400> 157

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Gln Lys Gly Val Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Glu Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 158

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> VH8 = VH19

<400> 158

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

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

<210> 159

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> VH20

<400> 159

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

50 55 60
Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Glu Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 160

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> VH22

<400> 160

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Gln Lys Gly Val Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Glu Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 161

<211> 315

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CD3delta-FcKO

<400> 161

Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg Val Phe Val Asn Cys
1 5 10 15

Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val Gly Thr Leu Leu Ser
20 25 30

Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile Leu Asp Pro Arg Gly
35 40 45

Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys Asp Lys Glu Ser Thr

50 55 60

Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys Val Glu Leu Asp Pro
65 70 75 80

Ala Thr Val Ala Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
85 90 95

Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
100 105 110

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

115 120 125

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
130 135 140

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
145 150 155 160

Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
165 170 175

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

180 185 190

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
195 200 205

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

275 280 285

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

290 295 300

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

305 310 315

<210> 162

<211> 341

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CD3epsilon-FcKO

<400> 162

Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys Val

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys Asn Ile Gly Gly Asp Glu

35 40 45

Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp His Leu Ser Leu Lys Glu

50 55 60

Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr

100 105 110

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

165 170 175

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys His

325 330 335

His His His His His

340

<210> 163

<211> 453

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 114-iso1-UCHT1(VL)-Knob

<400> 163

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser
1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Lys Gly Leu Gln Leu Leu Thr Tyr Ile
35 40 45

Tyr Ser Ser Gln Asp Gln Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu Leu
50 55 60

Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr
65 70 75 80

Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu Ser Lys

85 90 95

Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Gly Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
115 120 125

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
130 135 140

Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala

145 150 155 160

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
165 170 175

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
180 185 190

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
195 200 205

Gln Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

325 330 335

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

340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys

355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro

450

<210> 164

<211> 453

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 114-iso2-UCHT1(VL)-Knob

<400> 164

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser

1 5 10 15

Val Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Glu Ser Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr

20 25 30

Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Lys Gly Leu Gln Leu Leu Thr Tyr Ile

35 40 45

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

50 55 60

Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr

65 70 75 80

Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu Ser Lys

85 90 95

Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Gly Gly Gly

100 105 110

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

115 120 125

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln

130 135 140

Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala

145 150 155 160

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro

165 170 175

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile

180 185 190

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

195 200 205

Gln Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

325 330 335

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

340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys

355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro

450

<210

> 165

<211> 471

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 114-isoX-UCHT1(17opt)-Hole

<400> 165

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Glu Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr Glu

130 135 140

Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Pro Gly His Asp

145 150 155 160

Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu Leu

165 170 175

Phe Tyr Phe Cys Tyr Gly Thr Pro Cys Asp Asp Ser Gly Met Pro Glu
180 185 190

Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu Lys
195 200 205

Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser
210 215 220

Arg Ala Asp Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr
225 230 235 240

Val Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
245 250 255

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
260 265 270

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
275 280 285

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
290 295 300

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
305 310 315 320

Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
325 330 335

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
340 345 350

Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
355 360 365

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

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
385 390 395 400

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
405 410 415

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

420 425 430

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

<210> 166
<211> 471
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> 114-isoX-UCHT1(23)-Hole
<400> 166

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

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

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

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

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

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

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

385 390 395 400

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
465 470

<210> 167
<211> 471
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> 114-isoX-UCHT1(21)-Hole
<400> 167
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr Glu
130 135 140

Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Pro Gly His Asp
145 150 155 160

Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu Leu
165 170 175

Phe Tyr Phe Cys Tyr Gly Thr Pro Cys Asp Asp Ser Gly Met Pro Glu
180 185 190

Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu Lys
195 200 205

Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser
210 215 220

Arg Ala Asp Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr
225 230 235 240

Val Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
245 250 255

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
260 265 270

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
275 280 285

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
290 295 300

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
305 310 315 320

Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
325 330 335

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
340 345 350

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

355 360 365

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

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

<210> 168
<211> 461
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> PRAME-BMA031(VL3B)-Knob
<400> 168
Gln 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 Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

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

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

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

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

325 330 335

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

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

<210>
169

<211> 474
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> PRAME-BMA031(VH2)-Hole
<400> 169

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

50 55 60

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

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

180 185 190
Val Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu
195 200 205
Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val His Tyr Cys Ala Arg Gly
210 215 220
Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
225 230 235 240
Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys

245 250 255
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
260 265 270
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
275 280 285
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
290 295 300
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro

305 310 315 320

Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr

325 330 335

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

340 345 350

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala

355 360 365

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg

370 375 380

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

385 390 395 400

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro

405 410 415

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

465 470

<210> 170

<211> 479

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PRAME-UCHT1(V17)-Hole

<400> 170

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

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

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

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

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

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
        275                 280                 285
```

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

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

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

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470 475

<210> 171
<211> 463
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> PRAME-UCHT1(V17)-Knob
<400> 171
Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly
1 5 10 15

Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln Ser
20 25 30
Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met

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

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

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

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

260 265 270

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

275 280 285

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

450 455 460

<210> 172

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 172

Tyr Leu Glu Asp Gly Phe Ala Tyr Val

1 5

<210> 173

<

211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 173

Lys Ile Trp Glu Glu Leu Ser Val Leu Glu Val

1 5 10

<210> 174

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 174

Leu Leu Ile Pro Phe Thr Ile Phe Met

1 5

<210> 175

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 175

Ile Ser Leu Asp Glu Val Ala Val Ser Leu

1 5 10

<210> 176

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 176

Lys Ile Ser Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val

1 5 10

<210> 177

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 177

Lys Leu Ile Gly Asn Ile His Gly Asn Glu Val

1 5 10

<210> 178

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 178

Ile Leu Leu Ser Val Leu His Gln Leu

1 5

<210> 179

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 179

Leu Asp Ser Glu Ala Leu Leu Thr Leu

1 5

<210> 180

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 180

Val Leu Gln Glu Asn Ser Ser Asp Tyr Gln Ser Asn Leu

1 5 10

<210> 181

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 181

His Leu Leu Gly Glu Gly Ala Phe Ala Gln Val

1 5 10

<210> 182

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 182

Ser Leu Val Glu Asn Ile His Val Leu

1 5

<210> 183

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 183

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Thr

1 5

<210> 184

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 184

Ser Leu Ser Glu Lys Ser Pro Glu Val

1 5

<210> 185

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 185

Ala Met Phe Pro Asp Thr Ile Pro Arg Val

1 5 10

<210> 186

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 186

Phe Leu Ile Glu Asn Leu Leu Ala Ala

1 5

<210> 187

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 187

Phe Thr Ala Glu Phe Leu Glu Lys Val

1 5

<210> 188

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 188

Ala Leu Tyr Gly Asn Val Gln Gln Val

1 5

<210> 189

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 189

Leu Phe Gln Ser Arg Ile Ala Gly Val

1 5

<210> 190

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 190

Ile Leu Ala Glu Glu Pro Ile Tyr Ile Arg Val

1 5 10

<210> 191

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 191

Phe Leu Leu Glu Arg Glu Gln Leu Leu

1 5

<210> 192

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 192

Leu Leu Leu Pro Leu Glu Leu Ser Leu Ala

1 5 10

<210> 193

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 193

Ser Leu Ala Glu Thr Ile Phe Ile Val

1 5

<210> 194

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 194

Ala Ile Leu Asn Val Asp Glu Lys Asn Gln Val

1 5 10

<210> 195

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 195

Arg Leu Phe Glu Glu Val Leu Gly Val

1 5

<210> 196

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 196

Tyr Leu Asp Glu Val Ala Phe Met Leu

1 5

<210> 197

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 197

Lys Leu Ile Asp Glu Asp Glu Pro Leu Phe Leu

1 5 10

<210> 198

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 198

Lys Leu Phe Glu Lys Ser Thr Gly Leu

1 5

<210> 199

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 199

Ser Leu Leu Glu Val Asn Glu Ala Ser Ser Val

1 5 10

<210> 200

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 200

Gly Val Tyr Asp Gly Arg Glu His Thr Val

1 5 10

<210> 201

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 201

Gly Leu Tyr Pro Val Thr Leu Val Gly Val

1 5 10

<210> 202

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 202

Ala Leu Leu Ser Ser Val Ala Glu Ala

1 5

<210> 203

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 203

Thr Leu Leu Glu Gly Ile Ser Arg Ala

1 5

<210> 204

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 204

Ser Leu Ile Glu Glu Ser Glu Glu Leu

1 5

<210> 205

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 205

Ala Leu Tyr Val Gln Ala Pro Thr Val

1 5

<210> 206

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 206

Lys Leu Ile Tyr Lys Asp Leu Val Ser Val

1 5 10

<210> 207

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 207

Ile Leu Gln Asp Gly Gln Phe Leu Val

1 5

<210> 208

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 208

Ser Leu Leu Asp Tyr Glu Val Ser Ile

1 5

<210> 209

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 209

Leu Leu Gly Asp Ser Ser Phe Phe Leu

1 5

<210> 210

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 210

Val Ile Phe Glu Gly Glu Pro Met Tyr Leu

1 5 10

<210> 211

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 211

Ala Leu Ser Tyr Ile Leu Pro Tyr Leu

1 5

<210> 212

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 212

Phe Leu Phe Val Asp Pro Glu Leu Val

1 5

<210> 213

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 213

Ser Glu Trp Gly Ser Pro His Ala Ala Val Pro

1 5 10

<210> 214

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 214

Ala Leu Ser Glu Leu Glu Arg Val Leu

1 5

<210> 215

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 215

Ser Leu Phe Glu Ser Leu Glu Tyr Leu

1 5

<210> 216

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 216

Lys Val Leu Glu Tyr Val Ile Lys Val

1 5

<210> 217

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 217

Val Leu Leu Asn Glu Ile Leu Glu Gln Val

1 5 10

<210> 218

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 218

Ser Leu Leu Asn Gln Pro Lys Ala Val

1 5

<210> 219

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 219

Lys Met Ser Glu Leu Gln Thr Tyr Val

1 5

<210> 220

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 220

Ala Leu Leu Glu Gln Thr Gly Asp Met Ser Leu

1 5 10

<210> 221

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 221

Val Ile Ile Lys Gly Leu Glu Glu Ile Thr Val

1 5 10

<210> 222

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 222

Lys Gln Phe Glu Gly Thr Val Glu Ile

1 5

<210> 223

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 223

Lys Leu Gln Glu Glu Ile Pro Val Leu

1 5

<210> 224

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 224

Gly Leu Ala Glu Phe Gln Glu Asn Val

1 5

<210> 225

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 225

Asn Val Ala Glu Ile Val Ile His Ile

1 5

<210> 226

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 226

Ala Leu Ala Gly Ile Val Thr Asn Val

1 5

<210> 227

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 227

Asn Leu Leu Ile Asp Asp Lys Gly Thr Ile Lys Leu

1 5 10

<210> 228

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 228

Val Leu Met Gln Asp Ser Arg Leu Tyr Leu

1 5 10

<210> 229

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 229

Leu Leu Trp Gly Asn Leu Pro Glu Ile

1 5

<210> 230

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 230

Ser Leu Met Glu Lys Asn Gln Ser Leu

1 5

<210> 231

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 231

Lys Leu Leu Ala Val Ile His Glu Leu

1 5

<210> 232

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400

> 232

Ala Leu Gly Asp Lys Phe Leu Leu Arg Val

1 5 10

<210> 233

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 233

Phe Leu Met Lys Asn Ser Asp Leu Tyr Gly Ala

1 5 10

<210> 234

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 234

Lys Leu Ile Asp His Gln Gly Leu Tyr Leu

1 5 10

<210> 235

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 235

Gly Pro Gly Ile Phe Pro Pro Pro Pro Pro Gln Pro

1 5 10

<210> 236

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 236

Ala Leu Asn Glu Ser Leu Val Glu Cys

1 5

<210> 237

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 237

Gly Leu Ala Ala Leu Ala Val His Leu

1 5

<210> 238

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 238

Leu Leu Leu Glu Ala Val Trp His Leu

1 5

<210> 239

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 239

Ser Ile Ile Glu Tyr Leu Pro Thr Leu

1 5

<210> 240

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 240

Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu

1 5

<210> 241

<211> 9

<212

> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 241

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys

1 5

<210> 242

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 242

Phe Leu Leu Asp Lys Pro Gln Asp Leu Ser Ile

1 5 10

<210> 243

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 243

Tyr Leu Leu Asp Met Pro Leu Trp Tyr Leu

1 5 10

<210> 244

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 244

Gly Leu Leu Asp Cys Pro Ile Phe Leu

1 5

<210> 245

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 245

Val Leu Ile Glu Tyr Asn Phe Ser Ile

1 5

<210> 246

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 246

Thr Leu Tyr Asn Pro Glu Arg Thr Ile Thr Val

1 5 10

<210> 247

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 247

Ala Val Pro Pro Pro Pro Ser Ser Val

1 5

<210> 248

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 248

Lys Leu Gln Glu Glu Leu Asn Lys Val

1 5

<210> 249

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 249

Lys Leu Met Asp Pro Gly Ser Leu Pro Pro Leu

1 5 10

<210> 250

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 250

Ala Leu Ile Val Ser Leu Pro Tyr Leu

1 5

<210> 251

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 251

Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ala Asn Val

1 5

<210> 252

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 252

Ala Leu Asp Pro Ser Gly Asn Gln Leu Ile

1 5 10

<210> 253

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 253

Ile Leu Ile Lys His Leu Val Lys Val

1 5

<210> 254

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 254

Val Leu Leu Asp Thr Ile Leu Gln Leu

1 5

<210> 255

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 255

His Leu Ile Ala Glu Ile His Thr Ala

1 5

<210> 256

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 256

Ser Met Asn Gly Gly Val Phe Ala Val

1 5

<210> 257

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 257

Met Leu Ala Glu Lys Leu Leu Gln Ala

1 5

<210> 258

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 258

Tyr Met Leu Asp Ile Phe His Glu Val

1 5

<210> 259

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 259

Ala Leu Trp Leu Pro Thr Asp Ser Ala Thr Val

1 5 10

<210> 260

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 260

Gly Leu Ala Ser Arg Ile Leu Asp Ala

1 5

<210> 261

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 261

Ala Leu Ser Val Leu Arg Leu Ala Leu

1 5

<210> 262

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 262

Ser Tyr Val Lys Val Leu His His Leu

1 5

<210> 263

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 263

Val Tyr Leu Pro Lys Ile Pro Ser Trp

1 5

<210> 264

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 264

Asn Tyr Glu Asp His Phe Pro Leu Leu

1 5

<210> 265

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 265

Val Tyr Ile Ala Glu Leu Glu Lys Ile

1 5

<210> 266

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 266

Val His Phe Glu Asp Thr Gly Lys Thr Leu Leu Phe

1 5 10

<210> 267

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 267

Val Leu Ser Pro Phe Ile Leu Thr Leu

1 5

<210> 268

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> TAA

<400> 268

His Leu Leu Glu Gly Ser Val Gly Val

1 5

<210> 269

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RABGAP1L-001

<400> 269

Phe Leu Leu Glu Thr Val Val Arg Val

1 5

<210> 270

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AXIN1-001

<400> 270

Ile Leu Asp Glu His Val Gln Arg Val

1 5

<210> 271

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANO5-001

<400> 271

Ile Val Met Glu His Val Val Phe Leu

1 5

<210> 272

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TPX2-001

<400> 272

Lys Ile Leu Glu Asp Val Val Gly Val

1 5

<210> 273

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNE3-001

<400> 273

Lys Leu Leu Asp Leu Gln Val Arg Val

1 5

<210> 274

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MIA3-001

<400> 274

Lys Val Leu Asp Lys Val Phe Arg Ala

1 5

<210> 275

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HERC4-001

<400> 275

Lys Val Leu Glu Ile Leu His Arg Val

1 5

<210> 276

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PSME2-001

<400> 276

Lys Val Leu Glu Arg Val Asn Ala Val

1 5

<210> 277

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HEATR5A-001

<400> 277

Lys Val Leu Glu Thr Leu Val Thr Val

1 5

<210> 278

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CNOT1-003

<400> 278

Lys Val Leu Gly Ile Val Val Gly Val

1 5

<210> 279

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CNOT1-003

<400> 279

Ala Val Glu Glu His Val Val Ser Val

1 5

<210> 280

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PITPNM3-001

<400> 280

Ser Val Leu Glu Lys Val Thr Arg Ala

1 5

<210> 281

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZFC-001

<400> 281

Lys Leu Gln Glu Gln Ile His Arg Val

1 5

<210> 282

<211> 466

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 100(D)-NB(V36)-R7P1D5#114-iso0-dsFcKO-GK (alpha-VH)

<400> 282

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Lys Gly Leu Gln Leu Leu Thr Tyr Ile

35 40 45

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

50 55 60

Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr

65 70 75 80

Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu Ser Lys

85 90 95

Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Gly Gly Gly

100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val

115 120 125

Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr

130 135 140

Lys Phe Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln

145 150 155 160

Gly Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys

165 170 175

Tyr Ala Glu Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ser

180 185 190

Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr

195 200 205

Ala Val His Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Glu Gly Phe

210 215 220

Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

Ser Pro

465

<210> 283

<211> 455

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 100(D)-NB(V36)-R7P1D5#114-dsFcKO-GK (VL-beta)

<400> 283

Gln 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 Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly

100 105 110

Gly Gly Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr Glu

115 120 125

Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Pro Gly His Asp

130 135 140

Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu Leu

145 150 155 160

Phe Tyr Phe Cys Tyr Gly Thr Pro Cys Asp Asp Ser Gly Met Pro Glu

165 170 175

Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu Lys

180 185 190

Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

305 310 315 320

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

325 330 335

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

340 345 350

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu

355 360 365

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

370 375 380

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

385 390 395 400

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

405 410 415

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

420 425 430

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

435 440 445

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

450 455

<210> 284

<211> 466

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 100(D)-NB(V36)-R7P1D5#114-iso2-dsFcKO-GK (alpha-VH)

<400> 284

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser

1 5 10 15

Val Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Glu Ser Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr

20 25 30

Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Lys Gly Leu Gln Leu Leu Thr Tyr Ile

35 40 45

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

50 55 60

Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr

65 70 75 80

Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu Ser Lys

85 90 95

Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Gly Gly Gly

100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val

115 120 125

Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr

130 135 140

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

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

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

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

385 390 395 400

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

Ser Pro
465

<210> 285
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> FR-4-L
<400> 285
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 286
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> VL
<400> 286
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 Arg Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Gln Thr Leu Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105