(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0165484
(43) 공개일자 2024년11월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 16/46* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2809 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2024-7038036(분할)
(22) 출원일자(국제) 2018년04월11일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2019-7033354
원출원일자(국제) 2018년04월11일
심사청구일자 2021년04월09일
(85) 번역문제출일자 2024년11월14일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/027195
(87) 국제공개번호 WO 2018/191438
국제공개일자 2018년10월18일
(30) 우선권주장
62/484,217 2017년04월11일 미국(US)

(71) 출원인
인히브릭스 바이오사이언스, 인크.
미국 캘리포니아 92037 라 호야 엔. 토리 파인스 로드 11025 스위트 140
(72) 발명자
에클맨, 브렌단 피.
미국, 캘리포니아 92037, 라 졸라 스위트 200, 노스 토리 파인즈 로드 11025 인히브릭스, 인크. 내
캐플런, 마이클 디.
미국, 캘리포니아 92037, 라 졸라 스위트 200, 노스 토리 파인즈 로드 11025 인히브릭스, 인크. 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인이룸리온

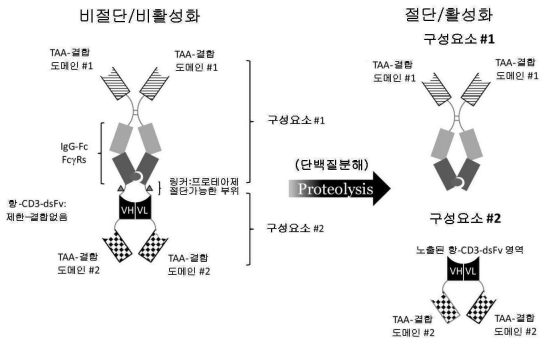
전체 청구항 수 : 총 34 항

(54) 발명의 명칭 **제한된 CD3 결합을 갖는 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트 및 이를 이용한 방법**

(57) 요 약

본 발명은 일반적으로 제한 CD3 결합을 갖는 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 다중특이적 폴립펩티드는, 절단될 때 이중 효과기 기능을 나타내는 절단가능한 링커를 함유한다. 이러한 다중특이적 폴리펩티드를 제조하고 다양한 치료, 진단 및 예방 적응증에 사용하는 방법 또한 제공된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C07K 16/2827 (2013.01)
C07K 16/2863 (2013.01)
C07K 16/2887 (2013.01)
C07K 16/468 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)
C07K 2317/569 (2013.01)
C07K 2317/624 (2013.01)
(72) 발명자
윌리스, 케이틀린 엠.
미국, 캘리포니아 92037, 라 졸라 스위트 200, 노스 토리 파인즈 로드 11025 인히브릭스, 인크. 내
데보르, 퀸
미국, 캘리포니아 92037, 라 졸라 스위트 200, 노스 토리 파인즈 로드 11025 인히브릭스, 인크. 내
팀머, 존 씨.
미국, 캘리포니아 92037, 라 졸라 스위트 200, 노스 토리 파인즈 로드 11025 인히브릭스, 인크. 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트로서,

상기 다중특이적 컨스트럭트는 N-말단부터 C-말단까지 순서대로:

종양-관련 항원 (TAA)에 결합하는 제1 항원 결합 도메인;

이종이량체 면역글로불린 Fc 영역;

링커; 및

CD3에 결합하는 CD3 결합 영역;

을 포함하고,

여기서:

상기 제1 항원 결합 도메인은 단일 도메인 항체(sdAb)이고;

상기 CD3 결합 영역은 가변 중쇄 영역(VH)과 가변 경쇄 영역(VL)을 포함하는 항-CD3 디설파이드 안정화 Fv 항체 단편(dsFv)이며, 상기 dsFv의 VH는 상기 이종이량체 Fc 영역의 한 폴리펩티드에 연결되고, 상기 dsFv의 VL은 상기 이종이량체 Fc 영역의 다른 폴리펩티드에 연결되며;

상기 CD3 결합 영역은, 상기 항원 결합 도메인이 이의 TAA에 결합되지 않는 한, 세포 표면 CD3에 결합 또는 관여할 수 없거나, 또는 실질적으로 결합 또는 관여할 수 없는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 링커는 폴리펩티드 링커인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 링커는 분리 가능한 링커인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 링커는 주로 글리신과 세린 아미노산으로 구성되어 있는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 링커는 GGS 또는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 절단 가능한 링커는 프로테아제의 기질로 기능하는 폴리펩티드인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 프로테아제는 매트립타아제(matriptase), 기질금속단백질분해효소(matrix metalloprotease, MMP), 그랜자임 B, 및 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택되는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 상기 제1 항원 결합 도메인과 상기 이종이량체 면역글로불린 Fc 영역 사이에 제1 연결 펩티드(LP1)를 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 LP1은 서열번호 10-13, 119, 135, 147 또는 149의 아미노산 서열을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 CD3 결합 영역에 카르복시 말단에 위치한 제2 항원 결합 도메인; 및

CD3 결합 도메인과 상기 제2 항원 결합 도메인 사이의 제2 연결 펩티드(LP2);

를 더 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 LP2는 서열번호 10-13, 119, 135, 147 또는 149의 아미노산 서열을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 CD3 결합 영역은 CD3(CD3ε)에 결합하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 항-CD3 dsFv는:

서열번호 44, 80 또는 81의 아미노산 서열, 또는 서열번호 44, 80 또는 81과 적어도 90%의 서열 동일성을 나타내는 서열을 갖는 VH; 및

서열번호 72의 아미노산 서열, 또는 서열번호 72와 적어도 90%의 서열 동일성을 나타내는 서열을 갖는 VL;

을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 Fc 영역은 인간 IgG1, 인간 IgG2, 인간 IgG3 또는 인간 IgG4의 Fc 영역이거나, 또는 이의 면역학적으로 활성인 단편인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

청구항 15

제1항에 있어서,

상기 Fc 영역은 서열번호 1-6 중 하나에 제시된 아미노산 서열, 또는 서열번호 1-6 중 하나에 대해 적어도 90%,

91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

청구항 16

제1항에 있어서,

상기 이종이량체 Fc 영역의 Fc 폴리펩티드 중 하나 또는 둘 모두는 동종이량체 Fc 영역의 폴리펩티드와 비교하여 이종 이량체화를 촉진하기 위해 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

청구항 17

제1항에 있어서,

상기 이종이량체 Fc 영역의 각 Fc 폴리펩티드는 폴리펩티드의 정전기적 상보성을 증가시키기 위해 노브-인투-홀(knob-into-hole) 변형을 포함하거나 전하 돌연변이를 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 이종이량체 Fc 영역의 Fc 폴리펩티드 중 하나는 T366W/S354C/H435R 변형을 포함하고 상기 이종이량체 Fc 영역의 다른 폴리펩티드는 T366S/L368A/Y407V/Y349C를 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

청구항 19

제1항에 있어서,

상기 Fc 영역은 FcRn 결합을 향상시키기 위해 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

청구항 20

제1항에 있어서,

상기 Fc 영역은 효과기 기능을 감소시키거나 Fc 감마 수용체 또는 C1q와의 결합을 감소시키는 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

청구항 21

제1항에 있어서,

상기 제1 항원 결합 도메인, 또는 제1 및 제2 항원 결합 도메인 각각은 독립적으로 1-92-LFA-3, 5T4, 알파-4 인테그린, 알파-V 인테그린, 알파4베타1 인테그린, 알파4베타7 인테그린, AGR2, 항-루이스-Y, 아펠린 J 수용체, APRIL, B7-H3, B7-H4, BAFF, BTLA, C5 보체, C-242, CA9, CA19-9, (루이스 a), 탄산무수화효소 9, CD2, CD3, CD6, CD9, CD11a, CD19, CD20, CD22, CD24, CD25, CD27, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD40L, CD41, CD44, CD44v6, CD47, CD51, CD52, CD56, CD64, CD70, CD71, CD74, CD80, CD81, CD86, CD95, CD117, CD123, CD125, CD132, (IL-2RG), CD133, CD137, CD138, CD166, CD172A, CD248, CDH6, CEACAM5 (CEA), CEACAM6 (NCA-90), CLAUDIN-3, CLAUDIN-4, cMet, 콜라겐, 크립토(Cripto), CSFR, CSFR-1, CTLA-4, CTGF, CXCL10, CXCL13, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CYR61, DL44, DLK1, DLL3, DLL4, DPP-4, DSG1, EDA, EDB, EGFR, EGFRviii, 엔도텔린 B 수용체 (ETBR), ENPP3, EpCAM, EPHA2, EPHB2, ERBB3, RSV의 F 단백질, FAP, FGF-2, FGF8, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT-3, 엽산 수용체 알파 (FRa), GAL3ST1, G-CSF, G-CSFR, GD2, GITR, GLUT1, GLUT4, GM-CSF, GM-CSFR, GP IIb/IIIa 수용체, Gp130, GPIIB/IIIA, GPNMB, GRP78, HER2/neu, HER3, HER4, HGF, hGH, HVEM, 히알루로니다아제, ICOS, IFN알파, IFN베타, IFN감마, IgE, IgE 수용체 (FceRI), IGF, IGF1R, IL1B, IL1R, IL2, IL11, IL12, IL12p40, IL-12R, IL-12Rbeta1, IL13, IL13R, IL15, IL17, IL18, IL21, IL23, IL23R, IL27/IL27R (wsx1), IL29, IL-31R, IL31/IL31R, IL2R, IL4, IL4R, IL6, IL6R, 인슐린 수용체, 재기드 리간드, 재기드 1, 재기드 2, KISS1-R, LAG-3, LIF-R, 루이스 X, LIGHT, LRP4, LRRC26, Ly6G6D, LyPD1, MCSP, 메소텔린, MRP4, MUC1, 뮤신-16 (MUC16, CA-125), Na/K ATPase, NGF, 니카스트린, 노치 (Notch) 수용체, 노치 1, 노치 2, 노치 3, 노치 4, NOV, OSM-R, OX-40, PAR2, PDGF-AA, PDGF-BB, PDGFR알파, PDGFR베타, PD-1, PD-L1, PD-L2, 포스파

티딜-세린, P1GF, PSCA, PSMA, PSGR, RAAG12, RAGE, SLC44A4, 스핑고신 1 포스페이트, STEAP1, STEAP2, TAG-72, TAPA1, TEM-8, TGF베타, TIGIT, TIM-3, TLR2, TLR4, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TMEM31, TNF알파, TNFR, TNFRS12A, TRAIL-R1, TRAIL-R2, 트랜스페린, 트랜스페린 수용체, TRK-A, TRK-B, uPAR, VAP1, VCAM-1, VEGF, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, VISTA, WISP-1, WISP-2, 및 WISP-3 중에서 선택된 종양 항원에 결합하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

청구항 22

제8항에 있어서,

상기 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 동일한 TAA에 결합하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

청구항 23

제8항에 있어서,

상기 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 상이한 TAA에 결합하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트를 암호화하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 25

폴리뉴클레오티드로서,

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 제1 폴리펩티드를 암호화하는 제1 핵산 서열 및 상기 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 제2 폴리펩티드를 암호화하는 제2 핵산 서열을 포함하고,

상기 제1 및 제2 핵산 서열은 내부 리보솜 도입 부위 (IRES), 또는 자가-절단가능한 펩티드 또는 리보솜 스킵핑 (skipping)을 초래하는 펩티드를 암호화하는 핵산에 의해 분리되는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 26

제24항의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드들을 포함하는, 벡터.

청구항 27

제24항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 세포.

청구항 28

다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트를 생성하는 방법으로서,

상기 방법은 제24항의 폴리뉴클레오티드를 세포에 도입하는 단계, 및 상기 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트를 생성하는 조건 하에서 상기 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트를 생성하는 방법.

청구항 29

제28항의 방법에 의해 생성된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

청구항 30

약학 조성물로서,

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하고,

상기 약학 조성물은 대상체에서 면역 반응을 자극 또는 유도하거나, 또는 대상체에서 질병 또는 병태를 치료하

기 위한 것인, 약학 조성물.

청구항 31

면역 반응을 자극 또는 유도하는 방법으로서,

상기 방법은 표적 세포와 T 세포를 제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트, 또는 제30항의 약학 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하고,

상기 표적 세포는 상기 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트에 의해 인식되는 종양 관련 항원을 발현하며,

상기 접촉은 생체 외(ex vivo) 또는 시험관 내(in vitro)에서 수행되는, 면역 반응을 자극 또는 유도하는 방법.

청구항 32

제30항에 있어서,

상기 약학 조성물은 대상체에서 면역 반응을 자극 또는 유도하기 위한 것인, 약학 조성물.

청구항 33

제30항에 있어서,

상기 약학 조성물은 대상체에서 질병 또는 병태를 치료하기 위한 것인, 약학 조성물.

청구항 34

제33항에 있어서,

상기 질병 또는 병태는 종양 또는 암인, 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 "이중 효과기 기능을 갖는 다중특이적 폴리펩티드 및 이를 이용한 방법"을 명칭으로 하는, 2017년 04월 11일에 출원된 미국 가출원번호 62/484,217호의 우선권을 주장하며, 상기 가출원의 내용은 그 전체가 본원에서 참고문헌으로 포함된다.

[0002] **서열목록 참조의 원용**

[0003] 본 출원은 전자형식의 서열목록과 함께 출원된다. 서열목록은 2018년 04월 11일에 생성된, 744952000140SeqList.TXT을 명칭으로 하는 파일로 제공되며, 크기는 174,179 바이트이다. 서열목록의 전자형식의 정보는 그 전체가 본원에 참고문헌으로 포함된다.

[0004] **발명의 분야**

[0005] 본 발명은 일반적으로 제한된 CD3 결합을 갖는 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드는, 절단될 때, 이중 효과기 기능을 나타내는 절단가능한 링커를 함유한다. 또한, 이러한 다중특이적 폴리펩티드를 제조하고 다양한 치료, 진단 및 예방 징후에 사용하는 방법이 제공된다.

배 경 기 술

[0006] 표적 세포 고갈을 야기하는 치료학적 항체는 일반적으로 Fc-감마-수용체 (FcγR) 및 보체 단백질과의 상호작용을 통해 매개되는 효과기 기능에 의존한다. FcγR을 발현하는 효과기 세포는 주로 선천성 면역계의 세포다. T 세포는 항체 매개 표적 세포 고갈에 관여하는 직접적인 효과기 세포가 아니다.

[0007] CD3 (분화 클러스터 3) T-세포 공동-수용체는 ε, γ, δ, 및 ζ 사슬로 지칭되는 4개의 별개의 폴리펩티드 사슬로 구성된 다합체 단백질이다. CD3 복합체는 T 세포 수용체 (TCR)의 항원-결합 a/b 사슬과 비공유적으로 결합하는 T 세포 수용체의 신호전달 모듈로서 작용한다.

[0008] CD3의 직접적인 관여 (engagement)는 T 세포 활성화를 초래하기 때문에, 이는 다양한 치료 및/또는 진단 징후에

대한 바람직한 표적이다. 이에 따라, CD3/TCR 경로를 표적하는 항체 및 치료제에 대한 요구가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 제한된 CD3 결합을 나타내는 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트를 제공한다. 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 제1 구성요소와 CD3-결합 영역을 포함하는 제2 구성요소로 구성되며, 여기서 상기 제1 및 제2 구성요소는 링커에 의해 결합되거나 작동가능하게 연결되며, 상기 Fc 영역은 CD3-결합 영역에 대해 N-말단에 위치하고; 제1 및 제2 구성요소 중 하나 또는 둘 다는 종양 관련 항원 (TAA)에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 비활성 상태의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 제1 구성요소와 제2 구성요소로 구성되며, 여기서 상기 제1 및 제2 구성요소는 작동가능하게 연결되고, 제1 및 제2 구성요소 각각은 종양 관련 항원 (TAA)에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하며, 제1 구성성분은 Fc 영역을 포함하고, 제2 구성성분은 CD3-결합 영역을 포함하며, 제1 및 제2 구성성분은 절단가능한 링커로 결합된다. 일부 구현예에서, CD3- 결합 영역은 CD3 (CD3ε)에 결합한다.

과제의 해결 수단

[0010] 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인은 Fc 영역에 대해 아미노-말단에 위치하고/하거나 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 CD3 결합 영역에 대해 카르복시-말단에 위치한다. 일부 구현예에서, 제1 구성요소는 제1 항원 결합 도메인을 포함하고 제2 구성요소는 제2 항원 결합 도메인을 포함하며, 여기서 각각의 항원 결합 도메인은 종양 관련 항원 (TAA)에 결합한다. 일부의 경우, 제1 항원 결합 도메인은 다중특이적 컨스트럭트의 아미노 말단에 위치하고 제2 항원 결합 도메인은 다중특이적 컨스트럭트의 카르복시 말단에 위치한다. 일부 구현예에서, 제1 항원 결합 도메인은 Fc 영역에 대해 아미노-말단에 위치하고/하거나 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 CD3 결합 영역에 대해 카르복시-말단에 위치한다.

[0011] 본원에서는 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트가 제공되며, 여기서 다중특이적 컨스트럭트는 순서대로 N-말단부터 C-말단까지: 종양-관련 항원 (TAA)에 결합하는 제1 항원 결합 도메인; 면역글로불린 Fc 영역; 링커; CD3 (CD3ε)에 결합하는 CD3 결합 영역; 및 종양-관련 항원 (TAA)에 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다. 또한, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트가 제공되며, 여기서 다중특이적 컨스트럭트는 순서대로 N-말단부터 C-말단까지: 면역글로불린 Fc 영역; 링커; CD3 (CD3ε)에 결합하는 CD3 결합 영역; 및 종양-관련 항원 (TAA)에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함한다. 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트가 제공되며, 여기서 다중특이적 컨스트럭트는 순서대로 N-말단부터 C-말단까지: 종양-관련 항원 (TAA)에 결합하는 항원-결합 도메인; 면역글로불린 Fc 영역; 링커; 및 CD3 (CD3ε)에 결합하는 CD3 결합 영역을 포함한다.

[0012] 본 발명의 구현예 중에는 적어도 CD3 및 제2 항원, 예컨대 종양 관련 항원 (TAA)에 결합하는 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트가 있다. 본원에 제공되는 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 적어도, 면역글로불린 Fc 영역에 연결된 항원에 결합하는 하원-결합 도메인의 하나 이상의 카피를 포함하는 제1 구성요소, CD3 (본원에서 상호교환적으로 사용되는, 항-CD3 결합 도메인 또는 CD3 결합 영역으로 지칭됨)에 결합하는 적어도 결합 도메인의 하나 이상의 카피를 포함하는 제2 구성요소, 및 링커, 예컨대 제1 구성요소와 제2 구성요소를 연결하는 절단가능한 링커를 포함한다.

[0013] CD3 결합 영역에 대한 N-말단 Fc 영역의 위치 설정은 CD3 결합 영역이 CD3에 결합하는 능력을 감소시키거나 방지한다. 일부 구현예에서, 비절단된/비활성 상태에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 제1 구성요소 (구성요소 #1) 및 제2 구성요소 (구성요소 #2)는 연결되고, 항원 결합 도메인(들)이 이의 동족 항원에 결합되지 않는 한, CD3에 대한 결합이 허용되지 않는다. 이는 T-세포에 대한 CD3 결합 영역의 침투성 결합을 방지하고 이를 항원 발현 부위에 초점을 맞추기 때문에 유리하다. 이는 말초 T-세포의 주요 결합 싱크 (sink)를 제거하여, 항원 발현 부위, 예를 들어, 종양 세포 또는 종양 미세환경에서 보다 유리한 분포 및 국소화를 가능하게 하므로, 유익하다. 일부의 경우, CD3의 결합 및/또는 관여는 구성요소 #1과 구성요소 #2를 연결하는 절단가능한 링커의 포함에 의해 증폭되거나 증가되며, 예컨대 단백질분해에 의해 절단가능한 링커의 절단 시, CD3 결합 영역에 의한 증가된 결합을 가능하게 한다.

[0014] 비활성, 즉, 비절단된 상태에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 구성요소 #1 및 구성요소 #2는 작동가능하게 연결되며, 항원 결합 도메인(들)이 이의 동족 항원에 결합되지 않는 한, CD3에 결합하거나 다르게는 이에 관여하지 않는다. 일부 구현예에서, 비절단된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 FcηR과 상호작용할 수

있고, 선천성 면역 효과기 기능, 예를 들어, 항체 의존 세포성 세포독성 (ADCC) 및 항체 의존 세포성 식균작용 (ADCP)을 매개할 수 있다. 일부 구현예에서, 비절단된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 보체 단백질, 즉 C1q와 상호작용할 수 있고, 보체 의존 세포독성을 매개할 수 있다.

[0015] 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 일반적으로 하나 이상의 항원-결합 도메인(들)을 갖는다. 제공된 측면에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 절단가능한 링커를 함유하고, 제1 및 제2 구성요소를 연결하는 링커가 예컨대 프로테아제에 의해 절단되면, 각 구성요소는 적어도 하나의 항원 결합 도메인을 유지한다. 제1 구성요소 (즉, 구성요소 #1)는 적어도 Fc 영역 및 항원 결합 도메인을 함유한다. 제2 구성요소 (즉, 구성요소 #2)는 적어도 항-CD3 결합 도메인 및 항원 결합 도메인을 함유한다.

[0016] 절단가능한 링커 내에서 예컨대 단백질분해에 의한 절단은 구성요소 #1과 구성요소 #2를 물리적으로 분리하며, 각 구성요소는 상이한 효과기 세포에 의존하지만, 치료학적 유용성을 갖는다. 구성요소 #1은 적어도 하나의 항원 결합 도메인 및 Fc 영역을 함유한다. 일부 구현예에서, 구성요소 #1은 선천성 면역 효과기 기능, 예를 들어, ADCC, 사이토카인 방출, 탈과립 및/또는 식균작용을 유도할 수 있다. 구성요소 #2는 적어도 도메인 CD3 결합 영역 및 항원 결합 도메인을 함유하고, 전자는 CD3에 결합할 수 있다 (구성요소 #1로부터 분리되는 경우). 구성요소 #2는 항원 발현 세포와 T-세포 사이에 면역 시냅스를 형성할 수 있다. 이 공동-관여는 항원 의존 T-세포 활성화, 세포독성, 사이토카인 방출, 탈과립 및 증식을 매개한다. 절단/활성화된 상태에서, 구성요소 #2는 구성요소 #1의 Fc-영역에 작동가능하게 연결되지 않고, 이에 의해 구성요소 #2는 FcRn과 상호작용하지 않으며, 항원 발현 세포 없는 부위에 국소화되는 경우, 혈청 클리어런스 (clearance)를 향상시킨다. 이는 활성화된 항-CD3 결합 도메인의 전신성 노출을 제한하고, 항원 발현 조직, 예를 들어, 종양 세포 또는 종양 미세환경에 직접 초점을 맞추기 때문에 유리하다.

[0017] 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드는 비활성 상태, 즉, 비절단된 상태이고, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트가 절단된 상태와 비교하여 비절단 상태일 때, CD3에 대한 CD3-결합 영역의 결합이 억제되거나 실질적으로 감소된다. 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드는 활성 상태이고, 제1 및 제2 구성요소는 작동가능하게 연결되지 않는다. 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드는 활성화된 상태, 즉, 절단된 상태이고, 제2 구성요소는 CD3의 엡실론 사슬 (CD3ε) 및 종양 관련 항원 (TAA)에 결합한다.

[0018] 일부 측면에서, 항원 결합 도메인, 또는 항원 결합 도메인 각각은 독립적으로 항체 또는 항원 결합 단편, 천연 동족 결합 파트너, 안티칼린 (조작된 리포칼린), 다르핀, 피노머, 센티린 (조작된 피브로네티신 (fibroneticin) III 도메인), 시스틴-노트 (knot) 도메인, 아필린, 아피바디, 또는 조작된 CH3 도메인으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 천연 동족 결합 파트너는 TAA의 천연 동족 결합 파트너의 세포외 도메인 또는 이의 결합 단편, 또는 TAA에 대한 결합 활성을 나타내는 이의 변이체를 포함한다.

[0019] 일부 측면에서, 항원 결합 도메인, 또는 항원 결합 도메인 각각은 독립적으로 TAA의 천연 동족 결합 파트너의 세포외 도메인 또는 이의 결합 단편, 또는 TAA에 대한 결합 활성을 나타내는 이의 변이체를 포함한다.

[0020] 일부 구현예에서, 제1 구성요소는 항원-결합 도메인의 하나 이상의 카피를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 구성요소는 2개의 항원 결합 도메인과 같은, 적어도 2개의 항원 결합 도메인을 함유한다. 일부 구현예에서, 제1 구성요소의 적어도 2개의 항원 결합 도메인은 동일한 TAA에 결합한다. 일부의 경우, 제1 구성요소의 적어도 2개의 항원 결합 도메인은 동일한 TAA의 상이한 에피토프에 결합한다. 일부의 경우, 제1 구성요소의 적어도 2개의 항원 결합 도메인은 동일한 TAA의 상이한 에피토프에 결합한다. 일부 구현예에서, 제1 구성요소의 적어도 2개의 항원 결합 도메인은 상이한 TAA에 결합한다.

[0021] 일부 구현예에서, 일부의 경우에, 제1 항원 결합 도메인인 제1 구성요소의 항원-결합 도메인은, 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 하나 이상의 카피를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 항원-결합 도메인과 같은 제1 구성요소의 항원 결합 도메인은 Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편, Fv 단편, scFv, scAb, dAb, 단일 도메인 중쇄 항체, 및 단일 도메인 경쇄 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 하나 이상의 카피를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 항원-결합 도메인은 하나 이상의 단일 도메인 항체 (sdAb) 단편, 예를 들어 V_HH, V_{NAR}, 조작된 V_H 또는 V_K 도메인의 하나 이상의 카피를 포함한다. V_HH는 낙타 중쇄 전용 항체로부터 제조될 수 있다. V_{NAR}은 연골 어류 중쇄 전용 항체로부터 제조될 수 있다. 인터페이스 공학 및 특정 생식계열 패밀리의 선택을 포함하는, 통상적으로 이종이량체 V_H 및 V_K 도메인으로부터 단량체 sdAb를 제조하기 위한 다양한 방법이 구현되었다.

[0022] 일부 구현예에서, 제1 항원 결합 도메인과 같은, 제1 구성요소의 항원 결합 도메인은 항원, 예컨대 종양 관련 항원 (TAA)에 결합한다. 일부 구현예에서, TAA는 1-92-LFA-3, 5T4, 알파-4 인테그린, 알파-V 인테그린, 알파4베타1 인테그린, 알파4베타7 인테그린, AGR2, 항-루이스-Y, 아펠린 J 수용체, APRIL, B7-H3, B7-H4, BAFF, BTLA, C5 보체, C-242, CA9, CA19-9, (루이스 a), 탄산무수화효소 9, CD2, CD3, CD6, CD9, CD11a, CD19, CD20, CD22, CD24, CD25, CD27, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD40L, CD41, CD44, CD44v6, CD47, CD51, CD52, CD56, CD64, CD70, CD71, CD74, CD80, CD81, CD86, CD95, CD117, CD123, CD125, CD132, (IL-2RG), CD133, CD137, CD138, CD166, CD172A, CD248, CDH6, CEACAM5 (CEA), CEACAM6 (NCA-90), CLAUDIN-3, CLAUDIN-4, cMet, 콜라겐, 크립토, CSFR, CSFR-1, CTLA-4, CTGF, CXCL10, CXCL13, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CYR61, DL44, DLK1, DLL3, DLL4, DPP-4, DSG1, EDA, EDB, EGFR, EGFRviii, 엔도텔린 B 수용체receptor (ETBR), ENPP3, EpCAM, EPHA2, EPHB2, ERBB3, RSV의 F 단백질, FAP, FGF-2, FGF8, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT-3, 엽산 수용체 알파 (FRα), GAL3ST1, G-CSF, G-CSFR, GD2, GITR, GLUT1, GLUT4, GM-CSF, GM-CSFR, GP IIb/IIIa 수용체, Gp130, GPIIB/IIIA, GPNMB, GRP78, HER2/neu, HER3, HER4, HGF, hGH, HVEM, 히알루로니다아제, ICOS, IFN알파, IFN베타, IFN감마, IgE, IgE 수용체 (FceRI), IGF, IGF1R, IL1B, IL1R, IL2, IL11, IL12, IL12p40, IL-12R, IL-12R베타1, IL13, IL13R, IL15, IL17, IL18, IL21, IL23, IL23R, IL27/IL27R (wsx1), IL29, IL-31R, IL31/IL31R, IL2R, IL4, IL4R, IL6, IL6R, 인슐린 수용체, 재기드 리간드, 재기드 1, 재기드 2, KISS1-R, LAG-3, LIF-R, 루이스 X, LIGHT, LRP4, LRRC26, Ly6G6D, LyPD1, MCSP, 메소텔린, MRP4, MUC1, 뮤신-16 (MUC16, CA-125), Na/K ATPase, NGF, 니카스트린, 노치 수용체, 노치 1, 노치 2, 노치 3, 노치 4, NOV, OSM-R, OX-40, PAR2, PDGF-AA, PDGF-BB, PDGFR알파, PDGFR베타, PD-1, PD-L1, PD-L2, 포스파티딜-세린, P1GF, PSCA, PSMA, PSGR, RAAG12, RAGE, SLC44A4, 스핑고신 1 포스페이트, STEAP1, STEAP2, TAG-72, TAPA1, TEM-8, TGF베타, TIGIT, TIM-3, TLR2, TLR4, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TMEM31, TNF알파, TNFR, TNFRS12A, TRAIL-R1, TRAIL-R2, 트랜스페린, 트랜스페린 수용체, TRK-A, TRK-B, uPAR, VAP1, VCAM-1, VEGF, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, VISTA, WISP-1, WISP-2, 및 WISP-3으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0023] 일부 구현예에서, Fc 영역은 동종이량체 Fc 영역이다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 이종이량체 Fc 영역이다.

[0024] 일부 구현예에서, 제1 구성요소의 면역글로불린 Fc 영역은 IgG1 이소타입, IgG2 이소타입, IgG3 이소타입, 및 IgG4 서브클래스로 이루어진 군으로부터 선택된 IgG 이소타입이다. 일부 실시예에서, Fc 영역은 인간 IgG1, 인간 IgG2, 인간 IgG3, 또는 인간 IgG4의 Fc 영역이거나, 면역학적으로 활성인 이의 단편이다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열 또는 서열번호 1과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산의 서열을 포함한다. 일부의 경우, Fc 영역은 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열 또는 서열번호 2와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산의 서열을 포함한다. 이러한 임의의 일부 구현예에서, Fc 영역은 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열 또는 서열번호 4와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산의 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, Fc 영역은 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열 또는 서열번호 5와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산의 서열을 포함한다.

[0025] 일부 구현예에서, 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 1 내지 6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 1 내지 6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드이다.

[0026] 일부 구현예에서, 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 1 내지 6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 Fc 영역은 하나 이상의 변형을 포함하는 서열번호 1 내지 6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 Fc 영역은 글리코실화를 방지하고, Fc 수용체 상호작용을 변경하며, Fc 수용체 결합을 감소시키고, CD32A와의 상호작용을 향상시키며, 보체 단백질 C1q 결합을 감소시키고, 반감기를 연장하며, FcRn 결합을 개선하고, 항체-의존 세포성 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체 의존 세포독성 (CDC)을 변경하며, 이종이량체화를 유도하고, 이량체화를 방지하며, CH3:CH3 경계면에서 동종이량체화를 안정화시키고, 이들의 조합을 위한 하나 이상의 변형을 포함하는, 서열번호 1 내지 6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드이다.

[0027] 일부 구현예에서, Fc는 이종이량체 Fc이다. 일부의 경우, 이종이량체 Fc 영역의 하나 또는 둘 다의 Fc 폴리펩티드는 동종이량체 Fc 영역의 폴리펩티드와 비교하여, 선택적으로 서열번호 1에 기재된 Fc 폴리펩티드 또는 면역학적으로 활성인 이의 단편과 비교하여 이종이량체화를 유도하는 적어도 하나의 변형을 포함한다. 일부 구현예

에서, 이종이량체 Fc의 Fc 폴리펩티드 각각은 독립적으로 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함한다. 일부의 경우, 이종이량체 Fc의 Fc 폴리펩티드 각각은 노브-인투-홀 (knob-into-hole) 변형을 포함하거나, 상기 폴리펩티드의 정전기적 상보성을 증가시키기 위해 전하 돌연변이를 포함한다. 일부 실시예에서, 아미노산 변형은 노브-인투-홀 변형이다.

[0028] 일부 구현예에서, 이종이량체 Fc의 제1 Fc 폴리펩티드는 Thr366Ser, Leu368Ala, Tyr407Val, 및 이의 조합 중에서 선택되는 변형을 포함하고 이종이량체 Fc의 제2 Fc 폴리펩티드는 T366W 변형을 포함한다. 일부의 경우, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 추가로 비-시스테인 잔기가 시스테인 잔기로 변형되는 것을 포함하며, 여기서 제1 폴리펩티드의 변형은 Ser354 및 Y349 위치 중 하나이고 제2 Fc 폴리펩티드의 변형은 Ser354 및 Y349 위치 중 다른 하나이다.

[0029] 일부 실시예에서, 아미노산 변형은 폴리펩티드의 정전기적 상보성을 증가시키기 위한 전하 돌연변이이다. 일부 구현예에서, 제1 및/또는 제2 Fc 폴리펩티드는 상보적 위치에서 변형을 포함하며, 여기서 변형은 다른 폴리펩티드의 상보적 아미노산과 반대 전하를 갖는 아미노산으로 치환되는 것이다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 폴리펩티드는 상보적 위치에서 변형을 포함하며, 여기서 변형은 다른 폴리펩티드의 상보적 아미노산에 반대 전하를 갖는 아미노산으로 치환되는 것이다. 일부 구현예에서, 적어도 제1 또는 제2 Fc 폴리펩티드 각각은 상보적 위치에 변형을 포함하며, 여기서 변형은 다른 폴리펩티드의 상보적 아미노산에 반대 전하를 갖는 아미노산으로 치환되는 것이다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 각각 상보적 위치에 변형을 포함하며, 여기서 변형은 다른 폴리펩티드의 상보적 아미노산에 반대 전화를 갖는 아미노산으로 치환되는 것이다.

[0030] 일부 구현예에서, 이종이량체 Fc의 제1 또는 제2 Fc 폴리펩티드 중 하나는 Ile253 잔기에서 변형을 포함한다. 일부 경우에, 변형은 Ile253Arg이다. 일부 구현예애서, 이종이량체 Fc의 제1 또는 제2 Fc 폴리펩티드 중 하나는 추가로 His435 잔기의 변형을 포함한다. 일부 경우에, 변형은 His435Arg이다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 Lys447가 없는 폴리펩티드를 포함한다.

[0031] 일부 구현예에서, Fc 영역 내의 변형은 Fc-수용체-감마 수용체에 대한 결합을 감소시키는 반면, 신생아의 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 결합에 대해 최소한의 영향을 갖는다. 일부 구현예에서, 돌연변이된 또는 변형된 Fc 폴리펩티드는 다음의 돌연변이를 포함한다: 카밧 번호매김 시스템을 이용하여 Met252Tyr 및 Met428Leu 또는 Met252Tyr 및 Met428Val (M252Y, M428L, 또는 M252Y, M428V).

[0032] 일부 구현예에서, Fc 영역은 FcRn 결합을 개선시키기 위한 적어도 하나의 변형을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, 변형은 Met252, Ser254, Thr256, Met428, Asn434, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 위치에 있다. 일부의 경우, 변형은 Met252Y, Ser254T, Thr256E, Met428L, Met428V, Asn434S, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 위치에 있다. 일부 특정 구현예에서, 변형은 Met252 위치 및 Met428 위치에 있다. 일부의 경우, 변형은 Met252Y 및 Met428L이다. 일부의 경우, 변형은 Met252Y 및 Met428V이다.

[0033] 일부 구현예에서, 이종이량체 Fc의 제1 폴레펩티드는 서열번호 82, 86, 94 또는 96 중 어느 하나에 기재된 아미노산의 서열을 포함하고, 이종이량체 Fc의 제2 폴리펩티드는 서열번호 83, 87, 90, 92, 98 또는 100 중 어느 하나에 기재된 아미노산의 서열을 포함한다.

[0034] 일부 구현예에서, Fc 영역은 효과기 기능을 감소시키고/시키거나 Fc 감마 수용체 또는 C1q로부터 선택되는 효과기 분자에 대한 결합을 감소시키는 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 Glu233, Leu234 또는 Leu235 중 하나 이상의 결실이다. 일부 측면에서, 이종이량체 Fc의 제1 폴리펩티드는 서열번호 84, 88, 95 또는 97 중 어느 하나에 기재된 아미노산의 서열을 포함하고 이종이량체 Fc의 제2 폴리펩티드는 서열번호 85, 89, 91, 93, 99 또는 101 중 어느 하나에 기재된 아미노산의 서열을 포함한다.

[0035] 일부 구현예에서, Fc 영역은 FcγR 결합을 향상시키기 위한 적어도 하나의 변형을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 일부의 경우, 변형은 Ser239 또는 Ile332에서의 변형이다. 일부 구현예에서, Fc 영역의 글리코실화는 비변형 Fc 영역과 비교하여 FcγR 결합을 향상시키기 위해 변형된다. 일부 실시예에서, Fc 영역은 푸코오스 함량이 결여되어 있거나 푸코오스 함량을 감소시킨다.

[0036] 일부 구현예에서, CD3 결합 영역은 항-CD3 항체 또는 항원-결합 단편이다. 일부 구현예에서, 항-CD3 항체 또는 항원 결합 단편은 가변 중쇄 영역 (VH) 및 가변 경쇄 영역 (VL)을 포함한다. 이러한 임의의 일부 구현예에서, CD3 결합 영역은 1가 이다.

[0037] 일부 구현예에서, 항-CD3 항체 또는 항원 결합 단편은 단일 사슬 항체가 아니고, 선택적으로 단일 사슬 가변 단편 (scFv)이 아니다. 일부 구현예에서, Fc는 이종이량체 Fc이고 항-CD3 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 VH 및 VL은 이종이량체 Fc의 다른(opposite) 폴리펩티드들에 연결된다. 일부 구현예에서, CD3 결합 영역은, 적어도 하나의 항원 결합 도메인이 이의 TAA에 결합하지 않는 한, CD3에 결합할 수 없거나 관여 (engage)할 수 없고, 또는 실질적으로 CD3에 결합할 수 없거나 관여할 수 없다. 일부 측면에서, CD3 결합 영역은, 적어도 2개의 항원 결합 도메인이 이의 TAA에 결합하지 않는 한, CD3에 결합할 수 없거나 관여할 수 없고, 또는 실질적으로 CD3에 결합할 수 없거나 관여할 수 없다.

[0038] 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 폴리펩티드 링커인 링커를 함유한다. 일부 구현예에서, 링커는 최대 25개 아미노산 길이의 폴리펩티드이다. 일부의 경우, 링커는 2개 또는 약 2 내지 24개의 아미노산, 2개 내지 20개의 아미노산, 2개 내지 18개의 아미노산, 2개 내지 14개의 아미노산, 2개 내지 12개의 아미노산, 2개 내지 10개의 아미노산, 2개 내지 8개의 아미노산, 2개 내지 6개의 아미노산, 6개 내지 24개의 아미노산, 6개 내지 20개의 아미노산, 6개 내지 18개의 아미노산, 6개 내지 14개의 아미노산, 6개 내지 12개의 아미노산, 6개 내지 10개의 아미노산, 6개 내지 8개의 아미노산, 8개 내지 24개의 아미노산, 8개 내지 20개의 아미노산, 8개 내지 18개의 아미노산, 8개 내지 14개의 아미노산, 8개 내지 12개의 아미노산, 8개 내지 10개의 아미노산, 10개 내지 24개의 아미노산, 10개 내지 20개의 아미노산, 10개 내지 18개의 아미노산, 10개 내지 14개의 아미노산, 10개 내지 12개의 아미노산, 12개 내지 24개의 아미노산, 12개 내지 20개의 아미노산, 12개 내지 18개의 아미노산, 12개 내지 14개의 아미노산, 14개 내지 24개의 아미노산, 14개 내지 20개의 아미노산, 14개 내지 18개의 아미노산, 18개 내지 24개의 아미노산, 18개 내지 20개의 아미노산 또는 20개 내지 24개의 아미노산의 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 링커는 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 아미노산 길이의 폴리펩티드이다. 일부의 경우, 링커는 절단 가능한 링커이다.

[0039] 일부 구현예에서, 제1 항원 결합 도메인과 면역글로불린 Fc 폴리펩티드는 아미노산 링커를 통해 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 이들 구성요소 내 링커는 본원에서 GS-링커로 표시되는, 글리신 및 세린 아미노산으로 주로 구성된다. 본 발명의 융합 단백질의 GS-링커는 다양한 길이, 예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개의 아미노산 길이일 수 있다.

[0040] 일부 구현예에서, GS-링커는 GGSGGS, 즉, $(GGS)_2$ (서열번호 10); GGSGGSGGS, 즉, $(GGS)_3$ (서열번호 11); GGSGGSGGSGGS, 즉, $(GGS)_4$ (서열번호 12); 및 GGSGGSGGSGGSGGS, 즉, $(GGS)_5$ (서열번호 13)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0041] 일부 구현예에서, 제2 구성요소는 또한 항-CD3 결합 도메인의 하나 이상의 카피를 포함한다. 일부 구현예에서, 항-CD3 결합 도메인은 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 하나 이상의 카피를 포함한다. 일부 구현예에서, 항-CD3 결합 도메인은 항체 또는 Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편, Fv 단편, scFv, scAb, dAb, 단일 도메인 중쇄 항체, 및 단일 도메인 경쇄 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 이의 항원-결합 단편의 하나 이상의 카피를 포함한다. 일부 구현예에서, 항-CD3 결합 도메인은 CD3ε (본원에서 항-CD3ε Fv 단편으로 언급됨)에 결합하는 Fv 항체 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-CD3ε Fv 항체 단편은 서열번호 32-81의 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-CD3ε Fv 항체 단편은 서열번호 32-81로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-CD3ε Fv 항체 단편은 서열번호 32-62의 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 및 서열번호 63-81로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-CD3ε Fv 항체 단편은 서열번호 32-62로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 아미노산 서열 및 서열번호 63-81 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 아미노산 아미노산 서열의 조합을 포함한다.

[0042] 일부 구현예에서, 항-CD3ε Fv 항체 단편은 이황화 안정화 항-CD3 결합 Fv 단편 (dsFv)이다.

[0043] 일부 구현예에서, 제2 구성요소는 또한 항원-결합 도메인의 하나 이상의 카피를 포함한다. 특정 구현예에서, 제2 구성요소는 2개의 항원 결합 도메인과 같은, 적어도 2개의 항원 결합 도메인을 함유한다. 일부 구현예에서, 제2 구성요소의 적어도 2개의 항원 결합 도메인은 동일한 TAA에 결합한다. 일부의 경우, 제2 구성요소의 적어도 2개의 항원 결합 도메인은 동일한 TAA의 상이한 에피토프에 결합한다. 일부의 경우, 제2 구성요소의 적어도 2개의 항원 결합 도메인은 동일한 TAA의 상이한 에피토프에 결합한다. 일부 구현예에서, 제2 구성요소의 적어도 2

개의 항원 결합 도메인은 상이한 TAA에 결합한다.

[0044] 일부 구현예에서, 제1 구성요소는 제1 항원 결합 도메인을 함유하고 제2 구성요소의 항원 결합 도메인은 제2 항원 결합 도메인이다. 일부 구현예에서, 제2 구성요소의 제2 항원-결합 도메인은 제1 구성요소의 제1 항원-결합 도메인과 동일한 항원에 결합한다. 일부 구현예에서, 제2 구성요소의 제2 항원-결합 도메인은 제1 구성요소의 제1 항원-결합 도메인과 동일한 항원의 상이한 에피토프에 결합한다. 일부 구현예에서, 제2 구성요소의 제2 항원-결합 도메인은 제1 구성요소의 제1 항원-결합 도메인과 동일한 항원의 에피토프에 결합한다.

[0045] 일부 구현예에서, 제2 구성요소의 항원 결합 도메인, 예를 들어 제2 항원-결합 도메인은 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 하나 이상의 카피를 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 항원-결합 도메인은 Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편, Fv 단편, scFv, scAb, dAb, 단일 도메인 중쇄 항체, 및 단일 도메인 경쇄 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 하나 이상의 카피를 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 항원-결합 도메인은 하나 이상의 단일 도메인 항체 (sdAb) 단편, 예를 들어 V_HH, V_{NAR}, 조작된 V_H 또는 V_K 도메인의 하나 이상의 카피를 포함한다. V_HH는 낙타 중쇄 전용 항체로부터 제조될 수 있다. V_{NAR}은 연골 어류 중쇄 전용 항체로부터 생성될 수 있다. 인터페이스 공학 및 특정 생식계열 패밀리의 선택을 포함하는, 통상적으로 이종이량체 V_H 및 V_K 도메인으로부터 단량체 sdAb를 생성하기 위한 다양한 방법이 구현되었다.

[0046] 일부 구현예에서, 제2 구성요소의 항원 결합 도메인, 예를 들어 제2 항원-결합 도메인은, 항원, 예를 들어 종양 관련 항원 (TAA)에 결합한다. 일부 구현예에서, TAA는 1-92-LFA-3, 5T4, 알파-4 인테그린, 알파-V 인테그린, 알파4베타1 인테그린, 알파4베타7 인테그린, AGR2, 항-루이스-Y, 아펠린 J 수용체, APRIL, B7-H3, B7-H4, BAFF, BTLA, C5 보체, C-242, CA9, CA19-9, (루이스 a), 탄산무수화효소 9, CD2, CD3, CD6, CD9, CD11a, CD19, CD20, CD22, CD24, CD25, CD27, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD40L, CD41, CD44, CD44v6, CD47, CD51, CD52, CD56, CD64, CD70, CD71, CD74, CD80, CD81, CD86, CD95, CD117, CD123, CD125, CD132, (IL-2RG), CD133, CD137, CD138, CD166, CD172A, CD248, CDH6, CEACAM5 (CEA), CEACAM6 (NCA-90), CLAUDIN-3, CLAUDIN-4, cMet, 콜라겐, 크립토, CSFR, CSFR-1, CTLA-4, CTGF, CXCL10, CXCL13, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CYR61, DL44, DLK1, DLL3, DLL4, DPP-4, DSG1, EDA, EDB, EGFR, EGFRviii, 엔도텔린 B 수용체 (ETBR), ENPP3, EpCAM, EPHA2, EPHB2, ERBB3, RSV의 F 단백질, FAP, FGF-2, FGF8, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT-3, 엽산 수용체 알파 (FRα), GAL3ST1, G-CSF, G-CSFR, GD2, GITR, GLUT1, GLUT4, GM-CSF, GM-CSFR, GP IIb/IIIa 수용체, Gp130, GPIIB/IIIA, GPNMB, GRP78, HER2/neu, HER3, HER4, HGF, hGH, HVEM, 히알루로니다아제, ICOS, IFN알파, IFN베타, IFN감마, IgE, IgE 수용체 (FceRI), IGF, IGF1R, IL1B, IL1R, IL2, IL11, IL12, IL12p40, IL-12R, IL-12Rbeta1, IL13, IL13R, IL15, IL17, IL18, IL21, IL23, IL23R, IL27/IL27R (wsx1), IL29, IL-31R, IL31/IL31R, IL2R, IL4, IL4R, IL6, IL6R, 인슐린 수용체, 재기드 리간드, 재기드 1, 재기드 2, KISS1-R, LAG-3, LIF-R, 루이스 X, LIGHT, LRP4, LRRC26, Ly6G6D, LyPD1, MCSP, 메소텔린, MRP4, MUC1, 뮤신-16 (MUC16, CA-125), Na/K ATPase, NGF, 니카스트린, 노치 수용체, 노치 1, 노치 2, 노치 3, 노치 4, NOV, OSM-R, OX-40, PAR2, PDGF-AA, PDGF-BB, PDGFR알파, PDGFR베타, PD-1, PD-L1, PD-L2, 포스파티딜-세린, P1GF, PSCA, PSMA, PSGR, RAAG12, RAGE, SLC44A4, 스핑고신 1 포스페이트, STEAP1, STEAP2, TAG-72, TAPA1, TEM-8, TGFbeta, TIGIT, TIM-3, TLR2, TLR4, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TMEM31, TNF알파, TNFR, TNFRS12A, TRAIL-R1, TRAIL-R2, 트랜스페린, 트랜스페린 수용체, TRK-A, TRK-B, uPAR, VAP1, VCAM-1, VEGF, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, VISTA, WISP-1, WISP-2, 및 WISP-3으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0047] 일부 구현예에서, 제2 구성요소의 항원 결합 도메인, 예를 들어 제2 항원 결합 도메인과 항-CD3-결합 도메인은 아미노산 링커를 통해 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 이러한 구성요소 내 링커는 본원에서 GS-링커로 표시되는, 글리신 및 세린 아미노산으로 주로 구성된다. 본 발명의 융합 단백질의 GS-링커는 다양한 길이, 예를 들어, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개의 아미노산 길이일 수 있다.

[0048] 일부 구현예에서, GS-링커는 GGSGGS, 즉, $(GGS)_2$ (서열번호 10); GGSGGSGGS, 즉, $(GGS)_3$ (서열번호 11); GGSGGSGGSGGS, 즉, $(GGS)_4$ (서열번호 12); 및 GGSGGSGGSGGSGGS, 즉, $(GGS)_5$ (서열번호 13)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0049] 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트가 본원에 제공되며, 상기 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 이종이량체 Fc 영역을 포함하는 제1 구성요소 및 가변 중쇄 영역 (VH) 및 가변 경쇄 영역 (VL)을 포함하는 항-CD3 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 제2 구성요소를 포함하며, 여기서: 항-CD3 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 VH 및 VL은 이종이량체 Fc의 다른 폴리펩티드들에 연결되고; 제1 및 제2 구성요소는 절단가능한 링커에 의해 결

합되며, 이종이량체 Fc 영역은 항-CD3 항체에 대해 N-말단에 위치하고; 그리고 제1 및 제2 구성요소 중 하나 또는 둘 다는 종양 관련 항원 (TAA)에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0050] 일부 구현예에서, CD3에 대한 CD3-결합 영역의 결합은, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트가 절단된 상태에 비해 비절단된 상태일 때, 실질적으로 감소된다. 일부 구현예에서, 절단된 상태에서, 제1 및 제2 구성요소는 연결되지 않는다.

[0051] 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 프로테아제에 대한 기질인 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 프로테아제는 면역 효과기 세포, 종양, 또는 종양 미세환경에 존재하는 세포에 의해 생산된다. 일부 구현예에서, 프로테아제는 CD3ε를 발현하는 세포에 근접해 있는 종양에 의해 생성되고/되거나 조직에서 CD3ε를 발현하는 세포로 공동-국소화된 종양에 의해 생산되고, 여기서, 프로테아제는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트가 프로테아제에 노출될 때, 상기 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 절단가능한 링커를 절단한다. 일부 구현예에서, 프로테아제는 하나 이상의 종양 관련 항원 (TAA)을 발현하는 세포에 근접해 있는 종양에 의해 생성되고/되거나 조직에서 표적 TAA(들)를 발현하는 세포로 공동-국소화된 종양에 의해 생산되고, 여기서, 프로테아제는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트가 프로테아제에 노출될 때, 상기 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 절단가능한 링커를 절단한다. 일부 구현에에서, 프로테아제는 면역 효과기 세포에 의해 생산된다. 일부 구현예에서, 프로테아제는 TAA를 발현하는 세포에 근접해 있는 면역 효과기 세포에 의해 생산된다. 일부 실시예에서, 프로테아제는 면역 효과기 세포에 의해 생산되고 면역 효과기 세포는 활성화된 T 세포, 자연 살해 (NK) 세포, 또는 NK T 세포이다. 일부 구현에에서, 프로테아제는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트가 상기 프로테아제에 노출될 때, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 절단가능한 링커를 절단한다. 일부 구현예에서, 프로테아제는 TAA를 발현하는 세포에 근접해 있는 면역 효과기 세포에 의해 생산되고 여기서 프로테아제는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트가 상기 프로테아제에 노출될 때, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 절단가능한 링커를 절단한다.

[0052] 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 최대 50개의 아미노산 길이의 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 최대 25개의 아미노산 길이의 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 최대 15개의 아미노산 길이의 폴리펩티드이다.

[0053] 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 본원에 기재된 프로테아제로부터 선택되는 프로테아제에 대한 기질이다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 uPA, 레구메인, 매트립타아제 (본원에서 MT-SP1 또는 MTSP1로도 언급됨), ADAM17, BMP-1, TMPRSS3, TMPRSS4, MMP-9, MMP-12, MMP-13, MMP-14, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 프로테아제에 대한 기질이다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 uPA, 레구메인, 및 매트립타아제로 이루어진 군으로부터 선택되는 프로테아제에 대한 기질이다. 일부 구현예에서, 프로테아제는 매트립타아제, 기질금속단백질분해효소 (MMP), 그랜자임 B, 및 이들의 조합 중에서 선택된다.

[0054] 일부 구현예에서, 프로테아제는 그랜자임 B이다. 일부 실시예에서, 절단가능한 링커는 일반식 P4 P3 P2 P1↓ P1' (서열번호 150)의 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 P4는 I, L, Y, M, F, V, 또는 A 아미노산이고; P3은 A, G, S, V, E, D, Q, N, 또는 Y 아미노산이며; P2는 H, P, A, V, G, S, 또는 T 아미노산이고; P1은 D 또는 E 아미노산이며; 그리고 P1'는 I, L, Y, M, F, V, T, S, G 또는 A 아미노산이다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 일반식 P4 P3 P2 P1↓ P1' (서열번호 151)의 아미노산 서열을 포함하고, P4는 I 또는 L 아미노산이고; P3은 E 아미노산이며; P2는 P 또는 A 아미노산이고; P1은 D 아미노산이며; 그리고 P1'는 I, V, T, S, 또는 G 아미노산이다. 일부에서, 절단가능한 링커는 아미노산 서열 IEPDI (서열번호 136), LEPDG (서열번호 152), LEADT (서열번호 137), IEPDG (서열번호 138), IEPDV (서열번호 139), IEPDS (서열번호 140), IEPDT (서열번호 141) 또는 LEADG (서열번호 153)을 포함한다. 일부의 경우에, 절단가능한 링커는 서열번호 22, 105-112, 136-141, 148,150-153으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0055] 일부 구현예에서, 프로테아제는 매트립타아제이다. 일부의 경우, 절단가능한 링커는 서열 P1QAR↓(A/V) (서열번호 154)를 포함하고, 여기서 P1은 임의의 아미노산이고; 또는 절단가능한 링커는 서열 RQAR(A/V) (서열번호 155)를 포함한다. 일부 실시예에서, 절단가능한 링커는 서열 RQARV (서열번호 156)를 포함한다. 일부의 경우, 절단가능한 링커는 서열번호 23, 154-156으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0056] 일부 구현예에서, 프로테아제는 MMP이다. 일부 실시예에서, MMP는 MMP-2이다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 일반식 P3 P2 P1↓ P1' (서열번호 157)을 포함하고, 여기서 P3은 P, V 또는 A이고; P2는 Q 또는 D이며; P1은 A 또는 N이고; 그리고 P1'는 L, I 또는 M이다. 일부의 경우, 절단가능한 링커는 일반식 P3 P2 P1↓ P1' (서열번호 158)를 포함하고, 여기서 P3은 P이고; P2는 Q 또는 D이며; P1은 A 또는 N이고; 그리고 P1'는 L 또는

I이다. 일부에서, 절단가능한 링커는 서열 PAGL (서열번호 24)을 포함한다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 기질금속단백질분해효소 (MMP)에 대한 기질이다.

[0057] 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 적어도 (i) 이종이량체 Fc 영역의 제1 Fc 폴리펩티드, 링커 및 항-CD3 항체 또는 항원 결합 단편의 VH 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드; 및 (ii) 이종이량체 Fc 영역의 제2 Fc 폴리펩티드, 링커 및 항-CD3 항체 또는 항원 결합 단편의 VL 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 폴리펩티드 중 하나 또는 둘 다는 종양 관련 항원 (TAA)에 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함한다. 일부의 경우, 제1 또는 제2 폴리펩티드 중 단 하나만이 TAA에 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함한다.

[0058] 제공된 임의의 구현예 중 일부에서, 항원 결합 도메인(들)은 TAA에 대한 1가, 2가, 3가 또는 4가 결합을 나타낸다. 일부 구현예에서, TAA에 결합하는 하나이상의 항원 결합 도메인은 독립적으로 sdAb, scFv 또는 Fab로부터 선택된다. 일부 구현예에서, TAA에 결합하는 하나 이상의 항원 결합 도메인은 이고 TAA는 VH 및 VL을 함유하는 단일 사슬 항체 단편, 예를 들어, sdAb 또는 scFv와 같은 단일 사슬 분자이다. 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인 중 적어도 하나는 VH-CH1 (Fd)를 포함하는 제1 사슬 및 VL-CL을 포함하는 제2 사슬을 함유하는 Fab이다.

[0059] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 항원 결합 도메인은 Fc 영역에 대해 아미노-말단에 위치하고/하거나 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 제1 또는 제2 폴리펩티드 중 하나에서 CD3 결합 영역에 대해 카르복시-말단에 위치한다. 일부의 경우, 적어도 하나의 항원 결합 도메인은 다중특이적 컨스트럭트의 Fc 영역에 대해 아미노-말단에 위치하고 제2 항원 결합 도메인은 다중특이적 컨스트럭트의 CD3 결합 영역에 대해 카르복시-말단에 위치한다.

[0060] 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인(들) 중 적어도 하나는 Fab이다. 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는: (i) 이종이량체 Fc 영역의 제1 Fc 폴리펩티드, 링커 및 항-CD3 항체 또는 항원 결합 단편의 VH 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드; (ii) 이종이량체 Fc 영역의 제2 Fc 폴리펩티드, 링커 및 항-CD3 항체 또는 항원 결합 단편의 VL 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드 및 (iii) 종양-관련 항원에 결합하는 Fab 항체단편의 VH-CH1 (Fd) 또는 VL-CL을 포함하는 제3 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 제1 및/또는 제2 폴리펩티드는 Fab 항체 단편의 VH-CH1 (Fd) 또는 VL-CL 중 나머지 다른 하나를 더 포함한다. 일부의 경우, 제1 또는 제2 폴리펩티드의 단 하나만이 Fab 항체 단편의 VH-CH1 (Fd) 또는 VL-CL 중 나머지 다른 하나를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 또는 제2 폴리펩티드 둘 다는 Fab 항체 단편의 VH-CH1 (Fd) 또는 VL-CL 중 나머지 다른 하나를 포함한다. 일부의 경우, Fab 항체 단편의 VH-CH1 (Fd) 또는 VL-CL 중 나머지 다른 하나는 Fc 영역에 대해 아미노-말단에 위치하고/하거나 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 제1 또는 제2 폴리펩티드 중 하나에서 CD3 결합 영역에 대해 카르복시-말단에 위치한다. 일부 구현예에서, Fab 항체 단편의 VH-CH1 (Fd) 또는 VL-CL 중 다른 하나는 제1 폴리펩티드 또는 제2 폴리펩티드의 Fc 영역에 대해 아미노-말단에 위치하고 제1 또는 제2 폴리펩티드 중 나머지 다른 하나는 CD3 결합 영역에 대해 카르복시-말단에 위피한다.

[0061] 일부 실시예에서, 항원 결합 도메인, 또는 항원 결합 도메인들 중 각각은 독립적으로 1-92-LFA-3, 5T4, 알파-4 인테그린, 알파-V 인테그린, 알파4베타1 인테그린, 알파4베타7 인테그린, AGR2, 항-루이스-Y, 아펠린 J 수용체, APRIL, B7-H3, B7-H4, BAFF, BTLA, C5 보체, C-242, CA9, CA19-9, (루이스 a), 탄산무수화효소 9, CD2, CD3, CD6, CD9, CD11a, CD19, CD20, CD22, CD24, CD25, CD27, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD40L, CD41, CD44, CD44v6, CD47, CD51, CD52, CD56, CD64, CD70, CD71, CD74, CD80, CD81, CD86, CD95, CD117, CD123, CD125, CD132, (IL-2RG), CD133, CD137, CD138, CD166, CD172A, CD248, CDH6, CEACAM5 (CEA), CEACAM6 (NCA-90), CLAUDIN-3, CLAUDIN-4, cMet, 콜라겐, 크립토, CSFR, CSFR-1, CTLA-4, CTGF, CXCL10, CXCL13, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CYR61, DL44, DLK1, DLL3, DLL4, DPP-4, DSG1, EDA, EDB, EGFR, EGFRviii, 엔도텔린 B 수용체 (ETBR), ENPP3, EpCAM, EPHA2, EPHB2, ERBB3, RSV의 F 단백질, FAP, FGF-2, FGF8, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT-3, 엽산 수용체 알파 (FRα), GAL3ST1, G-CSF, G-CSFR, GD2, GITR, GLUT1, GLUT4, GM-CSF, GM-CSFR, GP IIb/IIIa 수용체, Gp130, GPIIB/IIIA, GPNMB, GRP78, HER2/neu, HER3, HER4, HGF, hGH, HVEM, 히알루로니다아제, ICOS, IFN알파, IFN베타, IFN감마, IgE, IgE 수용체 (FceRI), IGF, IGF1R, IL1B, IL1R, IL2, IL11, IL12, IL12p40, IL-12R, IL-12R베타1, IL13, IL13R, IL15, IL17, IL18, IL21, IL23, IL23R, IL27/IL27R (wsx1), IL29, IL-31R, IL31/IL31R, IL2R, IL4, IL4R, IL6, IL6R, 인슐린 수용체, 재기드 리간드, 재기드 1, 재기드 2, KISS1-R, LAG-3, LIF-R, 루이스 X, LIGHT, LRP4, LRRC26, Ly6G6D, LyPD1, MCSP, 메소텔린, MRP4, MUC1, 뮤신-16 (MUC16, CA-125), Na/K ATPase, NGF, 니카스트린, 노치 수용체, ㄴ노치 1, 노치 2, 노치 3, 노치 4, NOV, OSM-R, OX-40, PAR2, PDGF-AA, PDGF-BB, PDGFR알파, PDGFR베타, PD-1, PD-L1, PD-L2, 포스파티딜-세린, P1GF, PSCA, PSMA, PSGR, RAAG12, RAGE, SLC44A4, 스핑고신 1 포스페이트, STEAP1, STEAP2, TAG-72, TAPA1, TEM-8, TGF베타, TIGIT, TIM-3, TLR2, TLR4, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TMEM31, TNF알파, TNFR, TNFRS12A, TRAIL-R1,

TRAIL-R2, 트랜스페린, 트랜스페린 수용체, TRK-A, TRK-B, uPAR, VAP1, VCAM-1, VEGF, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, VISTA, WISP-1, WISP-2, 및 WISP-3 중에서 선택되는 종양 항원에 결합한다.

[0062] 일부 구현예에서, 다중특이적 항원 결합 도메인은 적어도 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인을 포함하고, 여기서 제1 항원 결합 도메인과 제2 항원 결합 도메인은 동일한 TAA에 결합한다. 일부 경우에, 제1 항원 결합 도메인과 제2 항원 결합 도메인은 동일한 TAA의 상이한 에피토프에 결합한다. 일부 경우에, 제1 항원 결합 도메인과 제2 항원 결합 도메인은 동일한 TAA의 동일한 에피토프에 결합한다. 일부 구현예에서, 다중특이적 항원 결합 도메인은 적어도 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인을 포함하고, 여기서 제1 항원 결합 도메인과 제2 항원 결합 도메인은 상이한 TAA에 결합한다.

[0063] 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 제1 항원 결합 도메인과 면역글로불린 Fc 폴리펩티드 영역 (Fc 영역) 사이에 제1 연결 펩티드 (LP1)를 포함한다. 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 항-CD3 결합 도메인 (CD3 결합 영역)과 제2 항원 결합 도메인 사이에 제2 연결 펩티드 (LP2)를 포함한다. 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 제1 항원 결합 도메인과 면역글로불린 Fc 폴리펩티드 영역 (Fc 영역) 사이에 제1 연결 펩티드 (LP1) 및 항-CD3 결합 도메인 (CD3 결합 영역)과 제2 항원 결합 도메인 사이에 제2 연결 펩티드 (LP2)를 포함한다.

[0064] 일부 구현예에서, 비절단된 상태의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 N-말단부터 C-말단까지 다음과 같은 구조적 배열을 갖는다: 제1 항원 결합 도메인 - LP1 - 면역글로불린 Fc 폴리펩티드 링커 영역 (Fc 영역) - 링커 (예를 들어 절단가능한 링커) - 항-CD3 결합 도메인 - LP2 - 제2 항원 결합 도메인. 일부 구현예에서, 비절단된 상태의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 N-말단부터 C-말단까지 다음과 같은 구조적 배열을 갖는다: 제2 항원 결합 도메인 - LP2 - 항-CD3 결합 도메인 (CD3 결합 영역) - 링커 (예를 들어 절단가능한 링커) - 면역글로불린 Fc 폴리펩티드 링커 영역 - LP1 - 제1 항원 결합 도메인. 일부 실시예에서, 링커는 절단가능한 링커이다. 일부 구현예에서, 2개의 연결 펩티드는 서로 동일하지 않다. 일부의 경우, LP1 또는 LP2는 독립적으로 약 1개 내지 20개의 아미노산 길이의 펩티드이다. 일부 실시예에서, LP1 또는 LP2는 독립적으로 서열번호 10-13, 119, 135, 147, 149에 기재된 바와 같은 임의의 Gly-Ser 링커이거나 이를 포함하는 펩티드를 포함한다.

[0065] 일부 구현예에서, 다중특이적 컨스트럭트는 도 1에 나타난 임의의 구조적 배열을 갖는 컨스트럭트이다. 일부 구현예에서, 다중특이적 컨스트럭트는 도 2에 나타난 구조적 배열을 갖는 이중특이적 컨스트럭트이다. 일부 구현예에서, 이중특이적 컨스트럭트는 N-말단부터 C-말단까지 다음과 같은 구조적 배열을 갖는다. 이중특이적 컨스트럭트의 N-말단 끝은 종양 관련 항원 (TAA)에 결합하는 제1 항원 결합 도메인을 포함한다. 제1 결합 도메인은 TAA 표적 상의 제1 에피토프에 결합한다. 제1 항원 결합 도메인에는 FcγR 상호작용 및/또는 FcRn 상호작용을 조절하는 중심 면역글로불린 Fc 폴리펩티드 영역이 결합된다. 일부 구현예에서, 중심 면역글로불린 Fc 폴리펩티드 영역은 이종이량체이다. 면역글로불린 Fc 폴리펩티드 영역은 면역글로불린 Fc 폴리펩티드 영역의 말단에 대한 위치 C-말단에 위치한 하나 이상의 단백질분해의 절단가능한 부위를 함유하는 절단가능한 링커에 결합된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 단백질분해의 절단가능한 부위는 매트립타아제, 기질금속단백질분해효소 (MMP), 또는 그랜자임 B에 대한 기질이다. 절단가능한 링커는 Fc 영역으로부터 C-말단에 위치한 항-CD3 결합 서열에 부착되고, 일부의 경우, 제2 구성요소의 원위 말단에 부착된다.

[0066] 일부 구현예에서, 항-CD3 항체 또는 항원 결합 단편은 Fv 항체 단편이다. 일부 구현예에서, Fv 항체 단편은 이황화 안정화 항-CD3 결합 Fv 단편 (dsFv)을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-CD3 결합 서열은 가변 중쇄 (VH)와 가변 경쇄 (VL) 영역 사이에 이황화 결합을 포함하도록 조작된 것을 갖는 Fv 항체 단편이고, 이에 의해 이황화 안정화 항-CD3 결합 Fv 단편 (dsFv)을 생성한다. 일부 구현예에서, 항-CD3 Fv를 포함하는 VH 및 VL 도메인은 이종이량체 Fc 영역의 다른 멤버들에 작동가능하게 연결된다. 이러한 구현예에서, 항-CD3 Fv는 1가 방식으로 CD3에 결합한다. 항-CD3 dsFv는, 절단가능한 링커가 온전한, 즉, 비절단되거나 비활성 상태일 때, CD3에 관여하지 않는다. 이중특이적 컨스트럭트의 C-말단은 TAA에 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 항원 결합 도메인은 제1 구성요소 내에 위치한 제1 항원 결합 도메인과 동일한 TAA에 결합한다. 일부 구현예에서, 제2 항원 결합 도메인은 TAA 상의 제2 에피토프에 결합하고, 여기서 제2 에피토프는 TAA 상의 제1 에피토프와 비-경쟁적이다. 일부 구현예에서, 제2 항원 결합 도메인은 제1 항원 결합 도메인과 상이한 TAA에 결합한다.

[0067] 일부 구현예에서, 이중특이적 컨스트럭트의 제1 항원 결합 도메인과 제2 항원 결합 도메인 각각은 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 하나 이상의 카피를 포함한다. 일부 구현예에서, 이중특이적 컨스트럭트의 제1 항원 결합

도메인과 제2 항원 결합 도메인 각각은 Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편, Fv 단편, scFv, scAb, dAb, 단일 도메인 중쇄 항체, 및 단일 도메인 경쇄 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 하나 이상의 카피를 포함한다. 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인, 또는 항원 결합 도메인들 중 각각은 독립적으로 Fab 단편, F(ab')2 단편, Fv 단편, scFv, scAb, dAb, 단일 도메인 중쇄 항체, 및 단일 도메인 경쇄 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 일부 구현예에서, 이중특이적 컨스트럭트의 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인 각각은 하나 이상의 단일 도메인 항체 (sdAb) 단편, 예를 들어, V_HH, V_{NAR}, 조작된 V_H 또는 V_K 도메인의 하나 이상의 카피를 포함한다. V_HH는 천연 낙타 중쇄 전용 항체, 중쇄 전용 항체를 생산하는 유전적으로 변형된 설치류, 또는 나이브(naive)/합성 낙타 또는 인간화 낙타 단일 도메인 항체 라이브러리로부터 제조될 수 있다. V_{NAR}은 연골 어류 중쇄 전용 항체로부터 제조될 수 있다. 인터페이스 공학 및 특정 생식계열 패밀리의 선택을 포함하는, 통상적으로 이종이량체 V_H 및 V_K 도메인으로부터 단량체 sdAb를 제조하기 위한 다양한 방법이 구현되었다.

[0068] 일부 구현예에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 sdAb이다. 일부 경우에, sdAb는 인간 또는 인간화 sdAb이다. 일부 측면에서, sdAb는 VHH, VNAR, 조작된 VH 도메인 또는 조작된 VK 도메인이다. 일부 실시예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 scFv이다. 일부의 경우, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 Fab이다.

[0069] 제공된 임의의 구현예 중 일부에서, 항-CD3 항체 또는 항원-결합 단편은 아미노산 서열 TYAMN (서열번호 16)을 포함하는 VH CDR1; 아미노산 서열 RIRSKYNNYATYYADSVKD (서열번호 17)를 포함하는 VH CDR2; 아미노산 서열 HGNFGNSYVSWFAY (서열번호 18)를 포함하는 VH CDR3, 아미노산 서열 RSSTGAVTTSNYAN (서열번호 19)을 포함하는 VL CDR1; 아미노산 서열 GTNKRAP (서열번호 20)를 포함하는 VL CDR2; 및 아미노산 서열 ALWYSNLWV (서열번호 21)를 포함하는 VL CDR3를 포함한다.

[0070] 일부 구현예에서, 항-CD3 dsFv는: 서열번호 14, 44, 및 32-62 중 임의의 아미노산 서열 또는 서열번호 14, 44, 및 32-62 중 임의의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 서열을 갖는 VH; 및 서열번호 15, 72, 및 63-81 중 임의의 아미노산 서열 또는 서열번호 14, 44, 및 32-62 중 임의의 아미노산과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 서열을 갖는 VL을 포함한다. 일부의 경우, 항-CD3 dsFv는 서열번호 14의 아미노산 서열 및 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함한다. 일부의 경우, 항-CD3 dsFv는 서열번호 44의 아미노산 서열 및 서열번호 72의 아미노산 서열을 포함한다.

[0071] 일부 구현예에서, 제1 구성요소의 면역글로불린 Fc 영역은 IgG1 이소타입, IgG2 이소타입, IgG3 이소타입, 및 IgG4 서브클래스로 이루어진 군으로부터 선택되는 IgG 이소타입이다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 1 내지 6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 1 내지 6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드이다.

[0072] 일부 구현예에서, 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 1 내지 6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 Fc 영역은 하나 이상의 변형을 포함하는 서열번호 1 내지 6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 Fc 영역은 글리코실화를 방지하고, Fc 수용체 상호작용을 변경하며, Fc 수용체 결합을 감소시키고, CD32A와의 상호작용을 향상시키며, 보체 단백질 C1q 결합을 감소시키고, 반감기를 연장하며, FcRn 결합을 향상시키고, 항체-의존 세포성 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체 의존 세포독성 (CDC)을 변경하며, 이종이량체화를 유도하고, 이량체화를 방지하며, CH3:CH3 경계면에서 동종이량체화를 안정화시키고, 그리고 이들의 조합을 위한 하나 이상의 변형을 포함하는, 서열번호 1 내지 6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, Fc 영역 내 변형은 Fc-수용체-감마 수용체에 대한 결합을 감소시키면서, 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 결합에 대해 최소한의 영향을 미친다. 일부 구현예에서, 돌연변이 또는 변형된 Fc 폴리펩티드는 다음의 돌연변이: 카밧 번호매김 시스템을 이용한 Met252Tyr 및 Met428Leu 또는 Met252Tyr 및 Met428Val (M252Y, M428L, 또는 M252Y, M428V)을 포함한다.

[0073] 일부 구현예에서, 제1 항원 결합 도메인과 면역글로불린 Fc 폴리펩티드는 아미노산 링커를 통해 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 이들 구성요소 내 링커는 본원에서 GS-링커로 표시되는, 글리신 및 세린 아미노산

으로 주로 구성된다. 본 발명의 융합 단백질의 GS-링커는 다양한 길이, 예를 들어, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개의 아미노산 길이일 수 있다.

[0074] 일부 구현예에서, GS-링커는 GGSGGS, 즉, $(GGS)_2$ (서열번호 10); GGSGGSGGS, 즉, $(GGS)_3$ (서열번호 11); GGSGGSGGSGGS, 즉, $(GGS)_4$ (서열번호 12); 및 GGSGGSGGSGGSGGS, 즉, $(GGS)_5$ (서열번호 13)로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0075] 일부 구현예에서, 항-CD3ε dsFv 항체 단편은 서열번호 32 내지 81로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-CD3ε dsFv 항체 단편은 서열번호 32 내지 81로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-CD3ε Fv 항체 단편은 서열번호 32 내지 62의 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 및 서열번호 63 내지 81로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-CD3ε Fv 항체 단편은 서열번호 32 내지 62로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 아미노산 서열 및 서열번호 63 내지 81 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 아미노산 서열의 조합을 포함한다.

[0076] 일부 구현예에서, 제2 항원 결합 도메인과 항-CD3-결합 도메인은 아미노산 링커를 통해 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 이들 구성요소 내 링커는 본원에서 GS-링커로 표시되는, 글리신 및 세린 아미노산으로 주로 구성된다. 본 발명의 융합 단백질의 GS-링커는 다양한 길이, 예를 들어, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개의 아미노산 길이일 수 있다.

[0077] 일부 구현예에서, GS-링커는 GGSGGS, 즉, $(GGS)_2$ (서열번호 10); GGSGGSGGS, 즉, $(GGS)_3$ (서열번호 11); GGSGGSGGSGGS, 즉, $(GGS)_4$ (서열번호 12); 및 GGSGGSGGSGGSGGS, 즉, $(GGS)_5$ (서열번호 13)로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0078] 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 프로테아제에 대한 기질인 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 프로테아제는 CD3ε를 발현하는 세포에 근접해 있는 종양에 의해 생산되고/되거나 조직에서 CD3ε를 발현하는 세포로 공동-국소화된 종양에 의해 생산되며, 여기서 프로테아제는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트가 상기 프로테아제에 노출될 때, 상기 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 절단가능한 링커를 절단한다. 일부 구현예에서, 프로테아제는 하나 이상의 종양 관련 항원 (TAA)을 발현하는 세포에 근접해 있는 종양에 의해 생산되고/되거나 조직에서 표적 TAA(들)을 발현하는 세포로 공동-국소화된 종양에 의해 생산되며, 여기서 프로테아제는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트가 상기 프로테아제에 노출될 때, 상기 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 절단가능한 링커를 절단한다.

[0079] 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 최대 50개의 아미노산 길이의 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 최대 25개의 아미노산 길이의 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 최대 15개의 아미노산 길이의 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 본원에 기재된 프로테아제로부터 선택되는 프로테아제에 대한 기질이다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 uPA, 레구메인, 매트립타아제 (본원에서 MT-SP1 또는 MTSP1로도 언급됨), ADAM17, BMP-1, TMPRSS3, TMPRSS4, MMP-9, MMP-12, MMP-13, MMP-14, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 프로테아제에 대한 기질이다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 uPA, 레구메인, 및 매트립타아제로 이루어진 군으로부터 선택되는 프로테아제에 대한 기질이다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 기질금속단백질분해효소 (MMP)에 대한 기질이다.

[0080] 일부 구현예에서, 다중특이적 컨스트럭트는 또한 다중특이적 컨스트럭트에 결합된 제제를 포함한다. 일부 구현예에서, 제제는 치료제이다. 일부 구현예에서, 제제는 검출가능한 성분이다. 일부 구현예에서, 검출가능한 성분은 진단제이다. 일부 구현예에서, 제제는 링커를 통해 다중특이적 컨스트럭트에 결합된다. 일부 구현예에서, 링커는 절단가능한 링커이다. 일부 구현예에서, 링커는 비-절단가능한 링커이다.

[0081] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 항 다중특이적 컨스트럭트는 하나 이상의 추가 제제 또는 추가 제제의 조합과 함께 투여된다. 적합한 추가 제제는 예를 들어, 암과 같은 의도된 적용을 위한 현재의 약학 및/또는 외과적 치료법을 포함한다. 예를 들어, 다중특이적 컨스트럭트는 추가의 화학요법제 또는 항-신생물제와 함께 사용될 수 있다.

[0082] 일부 구현예에서, 다중특이적 컨스트럭트와 추가 제제는 단일 치료 조성물로 제형화되고, 다중특이적 컨스트럭

트와 추가 제제는 동시에 투여된다. 일부 구현예에서, 다중특이적 컨스트럭트와 추가 제제는 서로 분리되어 있고, 예를 들어, 각각 개별적인 치료 조성물로 제형화되며, 그리고 다중특이적 컨스트럭트와 추가 제제는 동시에 투여되거나, 또는 다중특이적 컨스트럭트와 추가 제제는 치료요법 동안 상이한 시간에 투여된다. 예를 들어, 다중특이적 컨스트럭트는 추가 제제의 투여 전에 투여되거나, 다중특이적 컨스트럭트는 추가 제제의 투여 후에 투여되거나, 다중특이적 컨스트럭트와 추가 제제는 교대로 투여된다. 본원에 기재된 바와 같이, 다중특이적 컨스트럭트와 추가 제제는 단일 투여량 또는 다중 투여량으로 투여된다.

[0083] 일부 구현예에서, 다중특이적 컨스트럭트는 자연발생적으로 하나 이상의 이황화 결합을 함유한다. 일부 구현예에서, 다중특이적 컨스트럭트는 하나 이상의 이황화 결합을 포함하도록 조작될 수 있다.

[0084] 본 발명은 또한, 예를 들어, 적어도 다중특이적 컨스트럭트의 제1 구성요소의 적어도 일부를 코딩하는 제1 핵산 및 다중특이적 컨스트럭트의 제2 구성요소의 적어도 일부를 코딩하는 제2 핵산과 같은, 본원에 기재된 다중특이적 컨스트럭트의 적어도 일부를 코딩하는 분리된 핵산 분자 또는 폴리뉴클레오티드 및/또는 본원에 기재된 다중특이적 컨스트럭트를 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자, 및 이러한 분리된 핵산 서열을 포함하는 벡터를 제공한다.

[0085] 제공된 구현예 중에는 제공된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트 중 임의의 것을 코딩하는 폴리뉴클레오티드(들)이 있다. 제공된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트 중 임의의 것의 폴리펩티드 사슬을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 또한 제공된다. 제공된 다중특이적 컨스트럭트 중 임의의 것의 제1 폴리펩티드를 코딩하는 제1 핵산 서열 및 다중특이적 컨스트럭트의 제2 폴리펩티드를 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드이고, 여기서 제1 및 제2 핵산 서열은 내부 리보솜 진입 부위 (IRES), 또는 자가-절단 펩티드 또는 리보솜 스킵핑 (skipping)을 야기하는 펩티드를 코딩하는 핵산에 의해 분리된다. 일부의 경우, 제1 핵산 서열 및 제2 핵산 서열은 동일한 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 제3 폴리펩티드 사슬을 포함하고, 폴리뉴클레오티드는 추가로 다중특이적 컨스트럭트의 제3 폴리펩티드를 코딩하는 제3 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 제3 핵산은 내부 리보솜 진입 부위 (IRES), 또는 자가-절단 펩티드 또는 리보솜 스킵핑을 야기하는 펩티드를 코딩하는 핵산에 의해 제1 및/또는 제2 폴리펩티드로부터 분리되고/되거나 제3 핵산 서열은 제1 및/또는 제2 핵산 서열과 동일한 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, 자가-절단성 펩티드 또는 리보솜 스킵핑을 야기하는 펩티드를 코딩하는 핵산은 T2A, P2A, E2A 또는 F2A (서열번호 159 내지 164, 또는 서열번호 165에 기재된 서열에 의해 코딩됨)로부터 선택된다.

[0086] 임의의 제공된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 벡터는 발현 벡터이다. 일부 실시예에서, 벡터는 바이러스 벡터 또는 진핵생물 벡터이고, 선택적으로 진핵생물 벡터는 포유동물 벡터이다.

[0087] 임의의 제공된 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 포함하는 세포가 제공된다. 일부의 경우, 세포는 재조합 또는 분리된 것이다. 일부 실시예에서, 세포는 포유동물 세포이다. 일부 실시예에서, 세포는 HEK293 또는 CHO 세포이다.

[0088] 본 발명은 다중특이적 컨스트럭트의 발현을 야기하는 조건 하에서 세포를 배양하여 다중특이적 컨스트럭트를 생산하는 방법을 제공하며, 여기서 세포는 이러한 핵산 분자(들)을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 이러한 벡터를 포함한다.

[0089] 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트를 생산하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은 임의의 제공된 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 세포에 도입하는 단계 및 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트를 생산하기 위해 다중특이적 컨스트럭트의 발현을 야기하는 조건 하에서 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 또한, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트를 생산하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 임의의 제공된 세포를 다중특이적 폴리펩티드가 상기 세포에 의해 발현 또는 생산되는 조건 하에서 배양하는 단계를 포함한다. 일부의 경우, 세포는 포유동물 세포이다. 일부 실시예에서, 세포는 HEK293 또는 CHO 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 세포로부터 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트를 분리 또는 정제하는 단계를 더 포함한다. 일부의 경우, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 이종이량체이다.

[0090] 임의의 제공된 방법에 의해 생산되는 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트가 본원에 제공된다.

[0091] 면역 반응을 자극 또는 유도하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은 표적 세포와 T 세포를 임의의 제공된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트 또는 약학 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하고, 상기 표적 세포는 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트에 의해 인식되는 종양 관련 항원을 발현한다. 일부 구현예에서, 표적 세포는 종양 관

련 항원 (TAA)을 발현하는 종양 세포이다.

[0092] 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 프로테아제에 대한 기질로 기능하는 절단가능한 링커를 포함하고, 면역 반응을 유도 또는 자극하는 것은 프로테아제의 존재 시 증가된다. 일부 경우에, 프로테아제는 면역 효과기 세포, 종양, 종양 미세환경에 존재하는 세포에 의해 생산된다.

[0093] 일부 구현예에서, 프로테아제는 면역 효과기 세포에 의해 생산되고 면역 효과기 세포는 활성화된 T 세포, 자연 살해 (NK) 세포, 또는 NK T 세포이다. 일부의 경우, 면역 효과기 세포는 항원을 발현하는 세포에 근접해 있다, 일부 구현예에서, 프로테아제는 조직에서 TAA를 발현하는 세포에 근접해 있는 종양에 의해 생산되고/되거나 조직에서 TAA로 공동-국소화된 종양에 의해 생산되며, 여기서 프로테아제는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트가 상기 프로테아제에 노출될 때, 상기 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 절단가능한 링커를 절단한다. 일부 실시예에서, 프로테아제는 매트립타아제, 기질금속단백질분해효소 (MMP), 그랜자임 B, 및 이들의 조합 중에서 선택된다. 일부의 경우, 프로테아제는 그랜자임 B이다.

[0094] 일부 구현예에서, 접촉은 탈체 (ex vivo) 또는 생체 외 (in vitro)에서 수행된다. 일부 구현예에서, 접촉은 개체의 생체 내 (in vivo)에서 수행된다.

[0095] 치료학적으로 유효한 양의 임의의 제공된 다중특이적 접합체 또는 약학 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 포함하는, 개체의 면역반응을 자극 또는 유도하는 방법이 제공된다. 일부의 경우, 방법은 세포-매개 면역성을 증가시킨다. 일부 구현예에서, 방법은 T-세포 활성을 증가시킨다. 일부 구현예에서, 방법은 세포용해성 T-세포 (CTL) 활성을 증가시킨다. 일부 예에서, 면역반응은 종양 또는 암에 대해 증가된다. 일부 구현예에서, 방법은 개체의 질병 또는 질환을 치료한다.

[0096] 본 발명은 또한 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트를 치료 또는 예방이 요구되는 개체에 투여함으로써, 하나 이상의 병리의 진행을 치료 예방, 지연시키거나, 다르게는 이의 증상을 개선하거나, 이러한 병리와 관련된 증상을 완화시키는 방법을 제공한다. 치료학적으로 유효한 양의 임의의 제공된 다중특이적 접합체 또는 약학 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 포함하는, 개체의 질병 또는 질환을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 질병 또는 질환은 종양 또는 암이다.

[0097] 제공된 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 개체, 예컨대 치료될 개체는, 예를 들어 인간 또는 다른 포유동물이다. 제공된 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 개체는 인간이다. 일부 구현예에서, 개체는 비-인간 포유동물, 예컨대 비-인간 영장류, 반려동물 (예를 들어, 고양이, 개, 말), 농장동물, 업무동물 (work animal), 또는 동물원 동물이다. 일부 구현예에서, 개체는 설치류이다.

[0098] 이러한 방법 및 용도의 구현예 중 임의의 것에 사용되는 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 질환의 임의의 단계에서 투여될 수 있다. 예를 들어, 이러한 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 초기부터 전이까지 임의의 단계의 암을 앓고 있는 환자에게 투여될 수 있다. 용어 개체 및 환자는 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

[0099] 이러한 방법 및 용도의 구현예 중 임의의 것에 사용되는 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 신보강 치료법 (neoadjuvant therapy)을 포함하는 치료요법에 사용될 수 있다.

[0100] 이러한 방법 및 용도의 구현예 중 임의의 것에 사용되는 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 단독 또는 소분자 억제제, 다른 항체-기반 치료제, 폴리펩티드 또는 펩티드-기반 치료제, 핵산-기반 치료제 및/또는 다른 생물학적 제제를 포함하는, 하나 이상의 추가 제제와 조합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 비-제한적인 예로, 화학요법제, 예컨대 알킬화제, 항-대사산물, 항-미소관제 (anti-microtubule agent), 토포이소머라아제 억제제, 세포독성 항생제, 및 임의의 다른 핵산 손상제와 같은 하나 이상의 추가 제제와 조합하여 투여된다. 일부 구현예에서, 추가 제제는 탁산, 예컨대 파클리탁셀 (예를 들어, Abraxane®)이다. 일부 구현예에서, 추가 제제는 항-대사산물, 예컨대 젬시타빈이다. 일부 구현예에서, 추가 제제는 알킬화제, 예컨대 카보플라틴 또는 시스플라틴과 같은 백금-기반 화학요법이다. 일부 구현예에서, 추가 제제는 표적화 제제, 예컨대 키나아제 억제제, 예를 들어, 소라페닙 또는 엘로티닙이다. 일부 구현예에서, 추가 제제는 표적화 제제, 예컨대 또 다른 항체, 예를 들어, 단일클론 항체 (예를 들어, 베바시주맙), 이중특이적 항체, 또는 다중특이적 항체이다. 일부 구현예에서, 추가 제제는 프로테아좀 억제제, 예컨대 보르테조미브 또는 카르필조밉이다. 일부 구현예에서, 추가 제제는 면역 조절제, 예컨대 레날리도마이드 또는 IL-2이다. 일부 구현예에서, 추가 제제는 방사선이다. 일부 구현예에서, 추가 제제는 통상의 기술자에 의해 치료 표준으로 간주되는 제제이다. 일부 구현예에서, 추가 제제는 통상의 기술자에게 잘 알려진 화학요법제이다. 일부 구현예에서,

다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트와 추가 제제(들)는 단일 조성물로 제형화된다. 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트와 추가 제제(들)는 2개 또는 그 이상의 개별적인 조성물로 투여된다. 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트와 추가 제제(들)는 동시에 투여된다. 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트와 추가 제제(들)는 순차적으로 투여된다.

[0101] 일부 구현예에서, 추가 제제(들)는 화학요법제, 예컨대 도세탁셀, 파클리탁셀, 아브락산 (즉, 알부민-접합 파클리탁셀), 독소루비신, 옥살리플라틴, 카보플라틴, 시스플라틴, 이리노테칸, 및 젬시타빈으로 이루어진 군으로부터 선택되는 화학요법제이다.

[0102] 일부 구현예에서, 추가 제제(들)는 관문 억제제 (checkpoint inhibitor), 키나아제 억제제, 종양 미세환경에서 억제제를 표적하는 제제, 및/또는 T 세포 또는 NK 작용제이다. 일부 구현예에서, 추가 제제(들)는 단독, 또는 화학요법제 또는 항-신생물제와 같은 다른 추가 제제(들)와 조합된 방사선요법이다. 일부 구현예에서, 추가 제제(들)는 백신, 종양 바이러스, 및/또는 DC-활성화제, 예컨대 비-제한적인 예로, 톨-유사 수용체 (TLR) 작용체 및/또는 α-CD40이다. 일부 구현예에서, 추가 제제(들)는 ADCC를 통해 또는 독소에 대한 직접적인 접합 (예를 들어, 항체 약물 접합체 (ADC))을 통해 종양을 사멸시키도록 설계된 종양-표적화된 항체이다.

[0103] 일부 구현예에서, 관문 억제제는 CTLA-4, LAG-3, PD-1, PDL1, TIGIT, TIM-3, B7H3, B7H4, 및 비스타로 이루어진 군으로부터 선택되는 표적의 억제제이다. 일부 구현예에서, 키나아제 억제제는 B-RAFi, MEKi, 및 Btk 억제제, 예컨대 이브루티닙으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 키나아제 억제제는 크리조티닙이다. 일부 구현예에서, 종양 미세환경 억제제는 IDO 억제제, α-CSF1R 억제제, α-CCR4 억제제, TGF-베타, 골수-유래 억제자 세포, 또는 T-조절 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 작용제는 OX40, GITR, CD137, CD28, ICOS, CD27, 및 HVEM으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 관문 억제제는 CTLA-4, PD-1, 및/또는 PD-L1로부터 선택되는 표적에 결합하는 항체이다. 일부 구현예에서, 관문 억제제는 항-CTLA4 항체, 항-PD-1 항체, 및 항-PD-L1 항체, 및/또는 이의 조합이다. 일부 구현예에서, 관문 억제제는 예를 들어, Yervoy™와 같은 항-CTLA4 항체이다. 일부 구현예에서, 관문 억제제는, 예를 들어, Opdivo™ 및/또는 Keytruda™와 같은 항-PD-1 항체이다.

[0104] 일부 구현예에서, 억제제는 CTLA-4 억제제이다. 일부 구현예에서, 억제제는 LAG-3 억제제이다. 일부 구현예에서, 억제제는 PD-1 억제제이다. 일부 구현예에서, 억제제는 PDL1 억제제이다. 일부 구현예에서, 억제제는 TIGIT 억제제이다. 일부 구현예에서, 억제제는 TIM-3 억제제이다. 일부 구현예에서, 억제제는 B7H3 억제제이다. 일부 구현예에서, 억제제는 B7H4 억제제이다. 일부 구현예에서, 억제제는 비스타 억제제이다. 일부 구현예에서, 억제제는 B-RAFi 억제제이다. 일부 구현예에서, 억제제는 MEKi 억제제이다. 일부 구현예에서, 억제제는 Btk 억제제이다. 일부 구현예에서, 억제제는 이브루티닙이다. 일부 구현예에서, 억제제는 크리조티닙이다. 일부 구현예에서, 억제제는 IDO 억제제이다. 일부 구현예에서, 억제제는 α-CSF1R 억제제이다. 일부 구현예에서, 억제제는 α-CCR4 억제제이다. 일부 구현예에서, 억제제는 TGF-베타이다. 일부 구현예에서, 억제제는 골수-유래 억제자 세포이다. 일부 구현예에서, 억제제는 T-조절 세포이다.

[0105] 일부 구현예에서, 작용제는 OX40이다. 일부 구현예에서, 작용제는 GITR이다. 일부 구현예에서, 작용제는 CD137이다. 일부 구현예에서, 작용제는 CD28이다. 일부 구현예에서, 작용제는 ICOS이다. 일부 구현예에서, 작용제는 CD27이다. 일부 구현예에서, 작용제는 HVEM이다.

[0106] 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 예를 들어, 화학요법제, 항-염증제, 및/또는 면역억제제와 같은 하나 이상의 추가 제제와 조합하여 치료 동안 및/또는 후에 투여된다. 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트와 추가 제제는 단일 치료-조성물로 제형화되고, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트와 추가 제제는 동시에 투여된다. 다르게는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트와 추가 제제는 서로 분리되어 있고, 예를 들어, 각각은 개별적인 치료 조성물로 제형화되며, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트와 추가 제제는 동시에 투여되거나, 또는 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트와 추가 제제는 치료요법 동안 상이한 시간에 투여된다. 예를 들어, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 추가 제제의 투여 전에 투여되거나, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 추가 제제의 투여 후에 투여되거나, 또는 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트와 추가 제제는 교대로 투여된다. 본원에 기재된 바와 같이, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트와 추가 제제는 단일 투여량 또는 다중 투여량으로 투여된다.

[0107] 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트와 추가 제제(들)는 동시에 투여된다. 예를 들어, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트와 추가 제제(들)는 단일 조성물로 제형화될 수 있거나 2개 또는 그 이상의 개별적인 조성물로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트와 추가 제제(들)는 순차적으로

투여되거나, 또는 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트와 추가 제제는 치료요법 동안 상이한 시간에 투여된다.

[0108] 상기 기재된 요소 이외에, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는, 예를 들어, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 N- 또는 C-말단의 아미노산 서열과 같은 추가 요소를 함유할 수 있다. 예를 들어, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 관심있는 세포 또는 조직으로의 전달을 용이하게 하는 표적화 성분을 포함할 수 있다. 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 치료제, 검출가능한 성분 또는 진단제와 같은 제제에 접합될 수 있다. 제제의 예는 본원에 기재된다.

[0109] 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트과 함께 본원에 기재된 임의의 접합된 제제, 링커 및 다른 구성요소를 또한 포함할 수 있다.

[0110] 본 발명은 또한 독소 (예를 들어, 박테리아, 곰팡이, 식물, 또는 동물 기원의 효소학적 활성 독소, 또는 이의 단편), 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사성접합체)와 같은 세포독성제에 접합된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트를 포함하는 면역접합체와 관련이 있다. T 세포-유래 림프종에서와 같이 질병이 있는 T 세포를 표적화하는데 사용하기 위해 적합한 세포독성제는, 예를 들어, 돌라스타틴 및 이의 유도체 (예를 들어, 아우리스타틴 E, AFP, MMAD, MMAF, MMAE)를 포함한다. 일부 구현예에서, 제제는 돌라스타틴이다. 일부 구현예에서, 제제는 아우리스타틴 또는 이의 유도체이다. 일부 구현예에서, 제제는 메이탄시노이드 (maytansinoid) 또는 메이탄시노이드 유도체이다. 일부 구현예에서, 제제는 DM1 또는 DM4이다. 일부 구현예에서, 제제는 듀오카르마이신 또는 이의 유도체이다. 일부 구현예에서, 제제는 칼리키아미신 또는 이의 유도체이다. 일부 구현예에서, 제제는 피롤로벤조디아제핀이다.

[0111] 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트와 세포독성 제제 사이의 링커는 절단가능하다. 일부 구현예에서, 링커는 비-절단가능하다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 링커가 존재한다. 2개 이상의 링커는 모두 동일하며, 예를 들어, 절단가능 또는 비-절단가능하거나, 또는 2개 이상의 링커는 상이하고, 예를 들어, 적어도 하나는 절단가능하고 적어도 하나는 비-절단가능하다.

[0112] 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트 및 이의 접합체는 다양한 장애 및/또는 질병을 치료하기 위한 방법에 유용하다. 질병의 비-제한적인 예는: 모든 종류의 암 (유방, 폐, 대장, 전립선, 흑색종, 두경부, 췌장 등), 류마티스 관절염, 크론병, SLE, 심혈관 손상, 허혈 등을 포함한다. 예를 들어, 적응증은 T-세포 급성 림프모구백혈병 (T-ALL)을 포함하는 백혈병, 다발성 골수종을 포함하는 림프모구성 질병, 폐, 대장, 전립선, 췌장, 및 삼중음성유방암을 포함하는 유방을 포함하는 고형 종양을 포함한다. 예를 들어, 적응증은 원발성 종양 기원에 관계없이 암에서의 골 질병 또는 전이; 비-제한적인 예로, ER/PR+ 유방암, Her2+ 유방암, 삼중-음성유방암을 포함하는 유방암; 대장암; 자궁내막암; 위암; 교모세포종; 두경부암, 예컨대 식도암; 폐암, 예컨대 비-제한적인 예로, 비-소세포폐암; 다발성 골수종 난소암; 췌장암; 전립선암; 육종, 예컨대 골육종; 신장암, 예컨대 비제한적인 예로, 신장 세포 암종; 및/또는 피부암, 예컨대 비제한적인 예로, 편평세포암, 기저세포암종, 또는 흑색종을 포함한다. 일부 구현예에서, 암은 편평세포암종이다. 일부 구현예에서, 암은 피부 편평세포암종이다. 일부 구현예에서, 암은 식도 편평세포암종이다. 일부 구현예에서, 암은 두경부 편평세포암종이다. 일부 구현예에서, 암은 폐 편평세포암종이다.

[0113] 본원에 제공된 임의의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물이 또한 제공된다. 일부의 경우, 약학 조성물은 멸균성이다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트 및 담체를 포함할 수 있다. 이러한 약학 조성물은 키트, 예를 들어 진단 키트와 같은 키트에 포함될 수 있다.

[0114] 통상의 기술자는 본 발명의 항체가 다양한 용도를 갖는다는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, 본 발명의 단백질은 다양한 장애에 대한 치료제로 사용된다. 본 발명의 항체는 또한 진단 키트에서 시약으로서 또는 진단 도구로서 사용되거나, 또는 이들 항체는 치료 시약을 제조하기 위한 경쟁 어세이에 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0115] **도 1**은 제한된 CD3 결합을 갖는 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 기본 구성요소의 개략도이다. 항원 결합 도메인(들)은 아미노 및/또는 카르복시 말단에 위치한다. 이종이량체 Fc 영역과 같은 Fc 영역은 CD 결합 영역에 대해 N-말단에 위치한다. CD 결합 영역에 근접해 있는 Fc의 이러한 위치 설정은 CD3 결합을 방해한다.

도 2는 절단가능한 링커를 함유하고 이중 효과기 기능을 갖는 본 발명의 다중특이적 분자의 예시적인 구조를 도

시한 실례로, 여기서 절단가능한 링커의 단백질분해성 절단은 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 활성화를 야기하여 각각 생물학적 활성을 갖는 2개의 구성요소를 생성한다.

도 3은 2개의 폴리펩티드, 사슬 1 및 사슬 2로 구성된 다양한 FRα-표적화 제한 CD3 컨스트럭트의 개략도이다. 상측 구획은 프로테아제 기질 인식 부위 또는 부위들, 예를 들어, 하나 이상의 MTSP1, MMP 및/또는 그랜자임 B를 함유하는 절단가능한 링커를 갖는 절단가능한 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 예시적인 기술을 제공한다. 사슬 1은 제2 FRα sdAb에 연결된, 프로테아제 절단가능한 링커 (cx1547: 그랜자임 B 단독, cx309: MTSP1, MMP 및 그랜자임 B)를 통해 항-CD3 VL 도메인에 연결된, 이종이량체 Fc "홀"에 연결된 FRα sdAb를 함유한다. 사슬 2는 제2 FRα sdAb에 연결된, 상기와 동일한 프로테아제 링커를 통해 항-CD3 VH 도메인에 연결된, 상보적 (complementary) 이종이량체 Fc "노브 (knob)"에 연결된 FRα sdAb를 함유한다. **도 3**의 하측 구획은 링커가 비-절단가능한 링커 (cx1356에서 3개의 아미노산 내지 cx681에서 18개의 아미노산의 범위)인 것을 제외하고 상측 구획과 유사한 구성을 도시한다. 공동-발현될 때, CD3 결합 도메인은 각각 홀 및 노브 상의 VL:VH의 연결을 통해 적절하게 조립된다.

도 4a 내지 4c는 제작된 컨스트럭트에서 CD3 결합을 제한하기 위한 링커의 효과를 비교하기 위해 제작된 컨스트럭트를 도시한다. **도 4a**는 이종이량체 Fc의 각 Fc 폴리펩티드를 CD3 결합 영역의 도메인에 결합시키기 위해 각 폴리펩티드 사슬에서 동일한 절단가능한 링커를 함유하는 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 예시를 도시한다 (예시적인 컨스트럭트 cx1762를 나타냈다). **도 4a**에 나타낸 형태에서, 컨스트럭트는 이의 비절단된 상태로 도시된다. 단일 절단가능한 링커만이 Fc 영역을 CD 결합 도메인에 연결시키기 위해 적용되는 다른 버전의 컨스트럭트가 **도 4b**에 나타나 있으며, 절반의 절단된 것으로 표시되었다 (예시적인 컨스트럭트 cx3238을 나타냈다). **도 4c**는 완전히 절단되는 경우, 도 4A 및 도 4B의 컨스트럭트의 형태의 C-말단 부분을 나타내는 구조를 도시한다 (예시적인 컨스트럭트 cx2190를 나타냈다). 단백질분해성 절단 생성물을 나타내는 컨스트럭트는 도시된 다양한 사슬을 공동-발현하여 재조합적으로 생산될 수 있다. FRα-표적 sdAb는 각 컨스트럭트에서 C-말단 위치에 위치한다.

도 5a 내지 5e는 대표적인 EGFR-표적 및 EGFR/cMET-이중 표적 제한된 CD3 인게이저 (engager)를 도시한다. **도 5a**에서, cx2513은 이종이량체의 각 사슬의 C-말단에 위치하는 EGFR-표적 sdAb를 가지며, 이에 의해 EGFR에 2가 결합을 나타낸다. **도 5b**에서, cx3030은 이종이량체의 각 사슬의 N 및 C-말단 둘 다에 위치하는 EGFR-표적 sdAb를 가지며, 이에 의해 EGFR에 3가 결합을 나타낸다. **도 5c**에서, cx2973은 이종이량체의 각 사슬의 C-말단에 위치하는 EGFR-표적 sdAb 및 N-말단에 위치하는 cMET-표적 sdAb를 가지며, 이에 의해 각 cMET 및 EGFR에 2가 결합을 나타낸다. **도 5d**에서, cx2979는 이종이량체의 하나의 사슬의 N-말단에 위치하는 cMET-표적 sdAb 및 이종이량체의 각 사슬의 C-말단에 위치하는 EGFR-표적 sdAb를 가지며, 이에 의해 cMET에 대해 1가 결합 그리고 EGFR에 대해 2가 결합을 나타낸다. **도 5e**에서, cx2977은 이종이량체의 하나 또는 나머지 다른 하나의 사슬의 C-말단에 위치하는 EGFR-표적 sdAb 및 N-말단에 위치하는 cMET-표적 sdAb를 가지며, 이에 의해 각 cMET 및 EGFR에 대해 1가 결합을 나타낸다.

도 6a 및 6b는 예시적인 B7H3-표적화된 제한 CD3 인게이저를 조립하기 위한 구성요소 사슬의 개략도이다. 이들 대표적인 컨스트럭트에 사용된 B7H3-결합 도메인은 sdAb, scFv 또는 FAB를 포함하였다. 일반적으로, 컨스트럭트를 함유하는 sdAb 및 scFv는 2개의 이종이량체 사슬로 구성되는 반면, 컨스트럭트를 함유하는 FAB는 같은 종류의 경쇄 (VL-CL)에 대한 제3 사슬을 포함하였다.

도 7은 5T4-표적화 제한 CD3 인게이저를 도시한다. 분자의 중심은 이종이량체 Fc에 이어서 절단가능한 링커와 이황화 안정화 항-CD3 Fv를 함유하도록 제작되었다. 이들 분자의 TAA 결합 부분을 양쪽의 이종이량체 Fc 사슬의 N- 또는 C-말단 상에 놓았다. 상측 열에서, TAA 결합 단위는 노브 폴리펩티드의 N-말단, 및 홀 펩티드의 C-말단 상에 Fd (VH-CH1)로 구성된 Fab이다. 결합 단위인 Fab의 경우, 제3 사슬 (경쇄 - VL-CL)이 Fd와 결합되도록 발현되었다. 중간 열과 하측 열에서, TAA 결합 단위는 N- 및 C-말단에서의 노브 폴리펩티드 상에 둘 다 위치하는 단일 도메인 항체이다. 중간 열에서, 제작된 컨스트럭트의 TAA 결합 sdAb는 동일하며, 하측 열에서, 제작된 컨스트럭트의 TAA 결합 sdAb는 상이한 에피토프를 갖는 상이한 서열이다.

도 8은 대표적인 CD20-표적화된 제한 CD3 인게이징 (engaging) 컨스트럭트인 cx3309의 개략도로, CD20 결합 도메인은 CD20 항체 GA101로부터 유래된 scFv이다.

도 9는 대표적인 DLL3-표적화된 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트인 cx3308의 개략도로, DLL3 결합 도메인은 scFv이다. 이러한 예시적인 컨스트럭트는 각각이 CD3 결합 도메인 및 DLL3 결합 scFv 중 하나의 구성요소에 연결된 이종이량체 Fc의 상보적인 구성요소를 갖는 2개의 사슬로 구성된다. 조립된 형태에서, 컨스트럭트는 DLL3에 대

해 2가이고, Fc 이종이량체에 대해 C-말단에 위치한 CD3 결합 도메인을 갖는다.

도 10a는 대표적인 FRα-표적화 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트인 cx1547의 SDS-PAGE 이미지로, 환원 (R) 및 비-환원 (NR) 조건을 나타낸다. 예상 분자량은 135kDa이다. **도 10b** 및 **10c**는 cx1547의 크기-배제 분석의 크로마토그램 그래프로, 이는 결정된 분자량이 137.9kDa을 갖는 단일 종임을 입증한다. **도 10c**는 **도 10b**에 나타낸 주요 피크 주변에서 확대한 확대도이다.

도 11a 및 11b는 본원에서 cx309로 지칭되는 본 발명의 예시적인 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트가 비절단 또는 단백질분해된 절단 상태에서 인간 T-세포에 대해 결합하는 결합 능력을 입증하는 그래프 쌍이다. 매트립타아제와 MMP-2는 각각 **도 11a 및 도 11b**의 cx309를 절단하는데 사용되었다.

도 12a 내지 12d는 대표적인 FRα-표적화 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트인 cx1356, cx681 및 cx1547에 의한 세포성 결합을 도시한다. **도 12a** 및 **도 12c**는 Ovcar5 세포에 대한 결합을 보여준다 (FRα 양성 난소암 세포주). **도 12b** 및 **도 12d**는 T-세포에 대한 결여된 결합을 도시한다. **도 12a** 및 **도 12b**는 각 컨스트럭트의 100nM에서의 정규화된 세포 수 대 형광의 히스토그램을 나타낸다. 다양한 세포 종류에 대한 각 컨스트럭트의 완전한 적정은 **도 12c** 및 **도 12d**에 나타내었다. **도 12a 및 12b**에 2차 항-인간 APC 항체 단독 대조군은 채워진 검정 트레이스로 나타내었고, 양성 대조군인 항-CD3 결합은 비어 있는 트레이스로 나타내었으며, cx1356, cx681 및 cx1547은 회색 음영 트레이스로 나타내었다.

도 13a 내지 13b는 대표적인 EGFR-표적화 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트인 cx3030에 의한 세포성 결합을 도시한다. **도 13a**는 100nM에서 EGFR 양성 세포주인 Colo-205에 대한 결합을 보여준다. **도 13b**는 100nM에서 T-세포에 대한 결합의 결여를 입증한다. 결합은 정규화된 세포 수 대 형광의 히스토그램으로 표시된다. 2차 항-인간 APC 항체 단독 대조군은 채워진 검정 트레이스로 나타내었고, 양성 대조군인 항-CD3 결합은 비어 있는 트레이스로 나타내었으며, cx3030은 회색 음영 트레이스로 나타내었다.

도 14a 내지 14d는 B7H3-표적화 제한 CD3 인게이저에 의한 B7H3 양성 A375에 대한 결합 (**도 14a** 및 **14b**) 및 T-세포 상의 CD3에 대한 결합의 결여 (**도 14c** 및 **14d**)를 도시한다. 다른 형태의 DART-Fc 표적화 B7H3 및 CD3는 T-세포 상의 B7H3 및 CD3 둘 다에 대해 강력한 결합을 나타냈다. cx3095 sdAb, cx3313 FAB, 및 cx3314 scFv를 비롯한 다양한 B7H3 항원 결합 도메인이 본원에서 사용되었다. scFv 및 FAB는 DART-Fc 형태에 사용된 동일한 항-B7H3 VH 및 VL 서열을 함유한다. **도 14a** 및 **14c**는 각 컨스트럭트에 대해 100nM 농도의 비교 히스토그램을 보여준다. 2차 항-인간 APC 항체 단독 대조군은 채워진 검정 트레이스로 나타내었고, 다양한 B7H3-표적화된 CD3 인게이징 컨스트럭트는 흰 비음영 트레이스로 나타내었다. **도 14b** 및 **14c**는 각각 BH73 및 CD3에 대한 다양한 컨스트럭트에 의한 결합의 적정을 보여준다.

도 15a 내지 15b는 대표적인 5T4-표적화 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트인 cx3262 및 cx3315에 의한 세포성 결합을 도시한다. **도 15a**는 400nM에서 5T4 양성 세포주인 Ovcar-5에 대한 결합을 보여준다. **도 15b**는 400nM에서 T-세포에 대한 결합의 결여를 입증한다. 결합은 정규화된 세포 수 대 형광의 히스토그램으로 표시된다. 2차 항-인간 APC 항체 단독 대조군은 채워진 검정 트레이스로 나타내었고, 양성 대조군인 항-CD3 결합은 비어 있는 트레이스로 나타내었으며, cx3262 및 cx3315는 회색 음영 트레이스로 나타내었다.

도 16a 내지 16d은 대표적인 CD20-표적화 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트인 cx3309에 의한 세포성 결합을 도시한다. **도 16a** 및 **도 16c**는 Ramos 세포 (CD20 양성 세포주)에 대한 결합을 보여준다. **도 16b** 및 **도 16d**는 T-세포에 대한 결여된 결합을 입증한다. **도 16a 내지 16b**는 각 컨스트럭트의 100nM에서 정규화된 세포 수 대 형광의 히스토그램을 나타낸다. 다양한 세포 종류에 대한 각 컨스트럭트의 완전 적정은 **도 16c 내지 16d**에 나타내었다. 2차 항-인간 APC 항체 단독 대조군은 채워진 검정 트레이스로 나타내었고, 양성 대조군인 항-CD3 결합은 비어 있는 트레이스로 나타내었으며, cx3309는 회색 음영 트레이스로 나타내었다.

도 17은 FRα 발현 세포인 Ovcar5의 존재 또는 부재 시 CD3 NFAT 리포터 Jurkat 세포주 (Promega, 미국)를 활성화시키는 절단 또는 비절단된 cx309의 능력을 입증하는 그래프이다.

도 18은 cx1547에 의한 항원 의존적 T-세포 활성화를 도시한다. FRα 양성 (T47D, IGROV1, NCI-H2342, Ovcar-5, Skov-3, 및 A2780) 또는 음성 (NCI-H460)인 다양한 세포주를 Jurkat CD3 NFAT-GFP 리포터 세포주와 함께 공동-배양하였고 형광은 6시간째에 측정하였다. 이는 항원 방식으로 T-세포를 활성화시키는 제한된 CD3 컨스트럭트의 능력을 입증한다.

도 19a 내지 19d는 단백질분해가 Fc 도메인과 CD3 결합 도메인 사이의 링커 내에서 발생하는 경우, 제한된 CD3 인게이저의 T-세포 활성화 능력의 향상을 도시한다. 여기에는 FRα 양성 Ovcar-5 세포 (**도 19a**) 또는 FRα 음성

CCRF-CEM 세포 (**도 19b**)의 존재 시 20nM의 cx1762, cx3238 또는 cx2190에 의해 매개되는 T-세포 활성화의 동역학을 나타내었다. 또한 여기에는 FRα 양성 Ovcar-5 세포 (**도 19c**) 또는 FRα 음성 CCRF-CEM 세포 (**도 19d**)의 존재 시 cx1762, cx3238 또는 cx2190에 의해 매개되는 T-세포 활성화의 효능을 나타내었다. Jurkat CD3 NFAT-GFP 리포터는 Incucyte ZOOM 영상장치를 이용하여 24시간의 기간동안 CD3 신호전달을 모니터링하는데 사용하였다. 특히 T-세포 활성화는 표적 세포주에 대한 항원 발현에 의존적이며 CD3 결합 VH:VL 도메인의 한쪽 또는 양쪽에서 CD3 결합 도메인에 대한 Fc 도메인 N-말단의 제거에 의해 크게 향상된다.

도 20a 내지 20d는 다양한 EGFR 및 EGFR/cMET-표적화된 제한 CD3 인게이저의 항원-의존적 T-세포 활성화 능력을 입증하는 일련의 그래프이다. 특히, T-세포 활성화 능력은 증가된 결합가 또는 추가의 표적 항원 결합 특이성으로 향상된다. 항원 양성 A431 세포에 대해 다양한 컨스트럭트에 의해 매개되는 T-세포 활성화 동역학은 **도 20a**에 도시되거나 항원 음성 CCRF-CEM 세포는 **도 20c**에 도시된다. 항원 양성 A431 세포에 대해 다양한 컨스트럭트에 의한 T-세포 활성화의 효능이 **도 20b**에 도시되거나 항원 음성 CCRF-CEM 세포는 **도 20d**에 도시된다. 본원에서는 Jurkat CD3 NFAT-GFP 리포터 세포주가 사용되었다.

도 21a 내지 21b는 대표적인 B7H3-표적화된 CD3 인게이징 컨스트럭트인 cx3095와 B7H3 및 CD3을 표적하는 다른 대안적인 DART-Fc 형태에 의한 항원 특이적 T-세포 활성화를 매개하는 능력을 도시한다. Jurkat CD3 NFAT-GFP 리포터 세포를 사용하여 B7H3 양성 세포주인 A375 (**도 21a**) 및 B7H3, 음성 세포주인 Raji (**도 21b**)의 존재 시 T-세포 활성화를 평가하였다.

도 22a 내지 22f는 대표적인 B7H3-표적화된 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트, 및 B7H3 및 CD3을 표적하는 다른 대안적인 DART-Fc 형태에 의한 표적 항원 특이적 T-세포 활성화를 매개하는 능력을 도시한다. 특히 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트는 B7H3-표적화된 sdAb, scFv, 또는 FAB 중 하나를 사용한다. Jurkat CD3 NFAT-GFP 리포터 세포를 사용하여 B7H3 양성 세포주인 A375 (**도 22a, 22c, 22e**) 및 B7H3 음성 세포주인 CCRF (**도 22b, 22d, 22f**)의 존재 시 T-세포 활성화를 평가하였다. 50nM (**도 22a** 및 **22b**) 또는 2nM (**도 22c** 또는 **22d**)의 각 컨스트럭트에 의해 매개되는 T-세포 활성화의 동역학을 나타내었다. 또한, 항원 양성 (**도 22e**) 및 음성 (**도 22f**) 세포주에 대해 각 컨스트럭트에 의해 매개되는 T-세포 활성화의 효능을 나타내었다.

도 23a 내지 23b은 5T4-표적화된 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트의 T 세포 활성화 능력을 보여주는 일련의 그래프이다. 이 예는 2가 이중에피토프의(biepitopic) TAA 표적화가 TAA 양성 세포 (OVCAR5) 상의 2가 단일에피토프 단백질보다 제한된 CD3 인게이저의 활성을 어떻게 증가시킬 수 있는지 보여준다. 어떤 컨스트럭트도 TAA 음성 세포 (CCRF)의 존재 시 T 세포 활성화를 유도하지 않았다.

도 24는 대표적인 5T4-표적화된 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트인 cx3315에 의해 항원 의존적 T-세포 활성화를 유도하는 능력을 보여주는 그래프이다. Jurkat CD3 NFAT-GFP 리포터 세포주를 사용하여 5T4 양성 세포주 (OVCAR5), 및 5T4 음성 세포주 (CCRF-CEM)의 존재 시 cx3315에 의한 T-세포 활성화를 모니터링하였다.

도 25는 대표적인 CD20-표적화된 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트인 cx3309에 의해 항원 의존적 T-세포 활성화를 유도하는 능력을 도시한다. Jurkat CD3 NFAT-GFP 리포터 세포주를 사용하여 CD20 양성 세포주: Ramos 및 세포 CD20 음성 세포주: CCRF-CEM의 존재 시 cx3309에 의한 T-세포 활성화를 모니터링하였다.

도 26은 대표적인 DLL3-표적화된 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트인 cx3308에 의해 T-세포 활성화를 유도하는 능력을 보여주는 그래프이다. Jurkat CD3 NFAT-GFP 리포터 세포주를 사용하여 DLL3 양성인 SHP-77 세포 존재 시 cx3309에 의한 T-세포 활성화를 모니터링하였다. 이는 scFv 일부분이 제한 CD3 형태에서 TAA를 표적하는데 사용될 수 있고 같은 종류의 TAA 양성 세포주에 결합하였을 때 T-세포를 효과적으로 활성화하는데 사용될 수 있다는 것을 입증한다.

도 27a 내지 27f는 FRα 양성 세포 - IGROV1 (**도 27a, 27c, 27e**), 또는 FRα 음성 NCI-H460 (**도 27b, 27d, 27f**)의 존재 시 T-세포를 활성화하는 능력에 대한 링커 길이의 영향을 도시한다. **도 27a 내지 27b**는 각각 항원 양성 및 음성 세포에 대해 2nM의 다양한 컨스트럭트에 의한 T-세포 활성화의 동역학을 보여준다. **도 27c 내지 27d**는 각각 항원 양성 및 음성 세포에 대해 2nM의 다양한 컨스트럭트에 의한 T-세포 활성화 능력의 크기를 보여준다. **도 27e 내지 27f**는 각각 항원 양성 및 음성 세포에 대해 상이한 링커 길이를 갖는 다양한 컨스트럭트의 T-세포 활성화 능력의 효능을 보여준다. Jurkat CD3 NFAT-GFP 리포터 세포주를 사용하여 T-세포 활성화를 평가하였다. 제한 CD3 단백질만이 표적 세포 상의 제2 항원에 결합하였을 때 T 세포 상의 CD3에 효과적으로 관여하고 (engage) 밀집시킨다.

도 28a 내지 28c는 cx1547에 의한 FRα-의존적 T-세포 매개 세포독성을 도시한다. **도 28a**는 cx1547이 항원-음

성 세포주 (NCI-H460)의 T-세포 매개 세포독성을 유도하지 않는다는 것을 입증한다. **도 28b**는 cx1547이 항원-양성 세포주 (Ovcar5)의 T-세포 매개 세포독성을 유도한다는 것을 입증한다. **도 28c**는 3nM의 cx1547에 의해 유도된 OVCAR5 세포에 대한 T-세포 매개 세포독성의 동역학을 보여준다. cx1547은 항원 양성 세포주에서만 T-세포 매개 세포독성을 유도하였다. 세포독성은 Incucyte ZOOM 영상장치에서 차별적으로 표지된 표적세포의 카스파아제-3/7 형광발생 기질을 사용하여 모니터링하였다. 효과기 대 표적세포 비율은 (E:T) 이 어세이에서 20:1 및 10:1로 평가되었다.

도 29a 내지 29f는 대표적인 B7H3-표적화된 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트 및 B7H3과 CD3을 표적하는 다른 대안적인 DART-Fc 형태에 의해 유도되는 T-세포-매개 세포독성의 동역학을 도시한다. B7H3 양성 A375 세포주에 대한 CD3 인게이징 컨스트럭트의 50nM to 80pM의 적정 범위는 **도 29a 내지 29e**에 나타내었다. **도 29f**는 B7H3 발현이 넉다운된 A549 세포에 대한 각 컨스트럭트의 50nM의 측정을 도시한다. 특히 모든 컨스트럭트는 B7H3-의존적 T-세포 매개 세포독성을 나타낸다.

도 30은 항원 양성 (A375) 및 음성 (A549-B7H3 넉-다운) 세포주에 대해 2.5nM의 B7H3-표적화된 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트 및 DART-Fc B7H3 x CD3 형태에 의해 유도된 T-세포 매개 세포독성의 크기를 도시한다.

도 31A 내지 31F는 FRα 양성 Ovcar-5 세포 (**도 31A 내지 31E**) 및 FRα 음성 NCI-H60 세포 (**도 31F**)에 대한 매개 T-세포 세포독성 유도에서 2가지 형태의 FRα-표적화 CD3 인게이저의 비교 효능을 도시한다. cx2190은 cx1762의 그랜자임 B 단백질분해 처리로부터 유래되는 대표적인 C-말단 생성물이다. 특히 cx2190은 cx1792와 비교하여 우수한 효능을 나타내며, Fc 및 CD3 결합 도메인 사이의 링커 영역 내의 단백질분해에 의해 매개되는 CD3 결합에서의 실질적인 향상을 입증한다.

20nM, 32pM 및 6pM에서 FRα 양성 세포에 대한 T-세포 매개 세포독성의 동역학이 **도 31a, 31b,** 및 **31c**에 각각 도시된다. **도 31d** 및 **도 31e**는 각각 24 및 40 시간에서 2가지 형태의 FRα CD3 인게이저의 효능을 보여준다. 그래프 F는 표적 세포 상에서 FRα 발현의 부재 시 실질적인 세포독성이 임의의 컨스트럭트에 의해 매개되지 않는다는 것을 입증한다.

도 32는 대표적인 5T4-표적화된 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트인 cx3315에 의해 매개되는 T-세포-매개 세포독성을 도시한다. cx3315는 5t4 발현 세포주인 Ovcar-5에 대해 특이적인 T-세포 세포독성을 유도하였으나, 5T4 음성 세포주인 CCRF-CEM에 대해서는 그렇지 않았다. 20nM cx3315가 이 어세이에 사용되었다.

도 33은 절단 또는 비절단된 cx309의 존재 시 T-세포 및 Ovcar5 세포의 20시간 공동-배양 후 T-세포의 활성화를 입증하는 그래프이다. 절단된 cx309만이 CD3 결합을 통해 FRα-의존적 T-세포 활성화를 매개할 수 있었다. CD4 및 CD8 집단의 CD25%의 유세포 분석으로 T-세포 활성화를 모니터링하였다.

도 34a 내지 34h는 대표적인 B7H3-표적화된 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트 및 B7H3과 CD3을 표적하는 다른 대안의 DART-Fc 형태에 의한 표적-의존 방식으로 활성 CD4 (**도 34a** 및 **34e**) 및 CD8 (**도 34c** 및 **34g**) T-세포에 대한 능력을 도시한다. T-세포를 B7H3 양성 세포주 A375 (**도 34a, 34c, 34e, 34g**) 또는 B7H3 넉-다운 A549 세포주 (**도 34b, 34d, 34f, 34h**)와 함께 배양하였고 활성화 마커 CD25와 CD71을 유세포 분석으로 평가하였다. 이들 데이터는 사용된 컨스트럭트의 B7H3-의존적 T-세포 활성화 능력을 입증한다.

도 35는 항원-의존적 INFγ 생산을 매개하는 B7H3-표적화된 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트인 cx3095의 능력을 도시한다. 사이토카인 생산은 INFγ ELISA를 이용하여 정량화되었다. A375는 B7H3 양성 세포주로 사용된 반면, B7H3 넉-다운 A549 세포주는 음성 세포주로 사용하였다.

도 36a 내지 36b는 인간 PBMC로부터 FRα-의존적 IFNγ (**도 36a**) 및 IL-2 (**도 36b**)를 유도하는 대표적인 FRα-표적화 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트인 cx1547의 능력을 도시한다. 사이토카인 생성은 플루오로스팟 (FluoroSpot) 사이토카인 포획 어세이를 이용하여 측정하였다. IGROV-1 및 NCI-H460을 각각 FRα 양성 및 음성 세포주로 사용하였다.

도 37은 항원-의존적 INFγ 생성을 매개하는 B7H3-표적화된 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트인 cx3095의 능력을 도시한다. 사이토카인 생성은 플루오로스팟 어세이를 이용하여 모니터링하였다. A375 및 CCRF-CEM을 각각 B7H3 양성 및 음성 세포주로 사용하였다.

도 38a 내지 38d는 분리된 1차 인간 난소 종양 샘플에 존재하는 T-세포를 활성화하고 세포독성을 유도하는 FRα-표적화 제한 CD3 컨스트럭트인 cx1547의 능력을 도시한다. **도 38a**는 분리된 난소 종양 샘플에서 종양세포 (EpCAM+) 및 침윤성 림프구 (CD45+)의 상대적 이환율 (prevalence)의 유동 플롯을 도시한다. **도 38b**는 6일 배

양 후 통상적인 FRα 항체 또는 cx1547로 처리한 다음 부착성 종양 세포의 생존(CellTiterGlo)을 보여준다. **도 38c**는 6일 배양 후 FRα 항체 또는 cx1547로 처리한 다음 INFγ 생성을 보여준다. **도 38d**는 항체 부재 (좌), 통상적인 FRα 항체 (중간) 또는 cx1547 (우)로 6일 처리한 후 남아있는 부착성 종양 세포의 대표적인 이미지를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0116] **상세한 설명**

[0117] 본 발명은 적어도 CD3 및 제2 항원에 결합하는 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 형태로 제한된 T-세포 인게이징 융합 단백질을 제공한다. 본원에 제공된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 면역글로불린 Fc 영역에 작동가능하게 연결된 항원에 결합하는 항원-결합 도메인의 하나 이상의 카피를 포함하는 적어도 제1 구성요소, CD3 (본원에서 항-CD3 결합 도메인 또는 CD3 결합 영역으로 지칭되며, 이는 본원에서 상호교환적으로 사용되는 용어임)에 결합하는 적어도 결합 도메인의 하나 이상의 카피를 포함하는 제2 구성요소, 및 링커, 예컨대 제1 구성요소와 제2 구성요소를 연결하는 폴리펩티드 링커를 포함한다. 일부 구현예에서, 항원은 종양 관련 항원(TAA)이다. 일부 구현예에서, 링커는 절단가능한 링커이다.

[0118] 제공된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 Fc 영역을 함유하는 제1 구성요소가 CD3 결합 영역을 함유하는 제2 구성요소에 대해 N-말단인 배열을 포함한다. 이러한 구현예에서, 제1 및 제2 구성요소는 Fc 영역의 말단에 대해 C-말단인 링커를 통해 연결된다. 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인(들)은 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 아미노-말단 (N-말단) 영역에 위치한다. 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인(들)은 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 카르복시-말단 (C-말단) 영역에 위치한다. 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인(들)은 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 N- 및 C-말단 영역 둘 다에 위치한다. 본원에 제공된 바와 같은 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 다양한 배열이 **도 1**에 제시된다.

[0119] 제공된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는, 일단 항원이 항원-결합 도메인을 통해 결합되면, 이러한 컨스트럭트는 CD3에만 실질적으로 결합하기 때문에, 제한된 T-세포 인게이징 활성을 나타낸다. 이는 본원에 제공된 실시예 및 도면에 예시되며, T 세포의 결합은 거의 또는 전혀 갖지 않으면서, 제한된 CD3 인게이징 단백질이 TAA 양성 세포에 효율적으로 결합하는 능력을 입증한다. 이러한 독특한 특성은 제한된 CD3 인게이징 단백질이 주변 T 세포에 결합하지 않고 TAA가 존재하는 부위에 분포되도록 한다. 이 형식은 구성적 CD3 결합이 허용되지 않거나 제거되어, 주변 T-세포 결합을 피하고 항원 결합 도메인에 의해 인식되는 바와 같이 존재하는 부위(들)에 우세한 분포를 허용함으로써, 상당한 이익을 제공한다는 점에서, 다른 CD3 인게이징 다중특이적 컨스트럭트와 구별된다. 예를 들어, 실시예에 도시된 바와 같이, 제한된 CD3 인게이징 형태는 DART-Fc 형식 (예를 들어, 공개된 PCT 출원번호 WO2017/030926호)과 유사한 효능을 가능하게 하지만, 주변 T-세포에 대한 결합은 현저하게 약화된다. 추가로, 다른 CD3 인게이징 컨스트럭트는 항원-의존적 T-세포 활성화를 매개하지만, 본원에 제공된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 항원-의존적 T-세포 결합 및 활성화 둘 다를 매개한다.

[0120] 제공된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 제한된 T-세포 인게이징 활성은, 일부 측면에서, CD3-결합 영역에 대한 N-말단의 Fc 영역의 위치 설정에 기인한다. 일부 구현예에서, 이러한 위치 설정은 CD3 결합 영역에 의한 CD3 결합을 감소, 감쇠, 약화 및/또는 방지한다. 항원 결합 도메인에 의한 하원 결합의 부재 시, 본원에 제공된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 감소되거나 제거된 CD3 결합 및 T 세포 활성화 능력을 입증한다. 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 항원 결합 도메인(들)에 의해 매개되는 항원 결합 사건의 존재 시, CD3 결합 영역에 의해 CD3에 결합하는 능력이 크게 향상된다. 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 항원 결합 도메인(들)에 의해 매개되는 항원 결합 이벤트의 존재 시, T 세포를 활성화하는 능력이 크게 향상된다. 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트 내에서 항원 결합 도메인(들)에 의한 이의 동족 항원의 관여는 후속 T-세포 관여를 초래하고, 세포독성, 사이토카인 방출, 탈과립 및 증식과 같은 항원-의존적 T-세포 활성화를 매개한다. 일부 구현예에서, 제공된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 예컨대 세포용해성 (또는 세포독성) T-세포 활성을 포함하는, T-세포 활성을 향상시키기 위해, 면역반응을 증가시키는데 사용될 수 있다. 면역반응의 조절은, 일부 측면에서, 개체의 질병 또는 질환을 치료할 수 있다.

[0121] 일부 구현예에서, 하나 이상의 항원 결합 도메인은 종양 세포 또는 종양 미세환경의 세포 상의 항원에 결합한다. 일부 측면에서, 제공된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 T-세포 활성과 같은 면역반응, 예를 들어 종양 또는 암에 대한 세포독성 활성을 증가시키는데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 제공된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 개체에서 종양 또는 암을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0122] 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 말초 혈액에서 CD3을 통한 T-세포의 결합이 없을 것을 보장하는데, 이들 컨스트럭트의 CD3 결합 영역이 Fc 영역의 존재에 의해 제한되거나 다르게는 차단 및/또는 억제되기 때문이다. 따라서, 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 다수의 이점을 제공한다. 일부 측면에서, 이러한 컨스트럭트는 모든 T 세포에 결합함으로써 야기되는 싱크 효과 (sink effect)를 제한한다. 일부 측면에서, 이러한 컨스트럭트는 전신성 독성을 감소시킨다.

[0123] 일부 구현예에서, 본 발명의 제공된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는, 예를 들어, 종양-관련 항원 (TAA) 발현의 부위와 같이 개체에서 원하는 부위에 대한 제어된 생체분포를 허용한다. TAA 발현 부위는, 예를 들어, 종양 및 주변 종양 미세환경을 포함한다.

[0124] 일부 구현예에서, 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 CD3 및 하나 이상의 다른 항원에 대해 특이성을 나타낸다. 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 하나 이상의 TAA, 예컨대 2, 3 또는 4개의 항원 결합 도메인에 결합할 수 있는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 도 1을 참고한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 항원 결합 도메인은 동일한 항원에 결합한다. 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 동일한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 하나 이상의 상이한 항원에 결합하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 동일한 항원의 상이한 에피토프에 결합하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하고, 하나 이상의 상이한 항원에 결합하는 추가의 항원 결합 도메인을 포함한다. 일부 측면에서, 제공된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 이중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트이고, 이는 이들이 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 항원-결합 도메인의 결합을 통해, CD3 및 다른 항원, 예컨대 TAA에 결합할 수 있도록 한다. 일부 예에서, 제공된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 제1 항원-결합 도메인 및 제2 항원-결합 도멘의 사용을 통해 하나 이상의 TAA의 4가 관여를 제공하는 이중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 이중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 도 1 및 2에 나타난 제1 항원-결합 단일 도메인 항체 (sdAb) 및 제2 항원-결합 sdAb를 포함한다.

[0125] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 CD3에 결합하고 이어서 T-세포를 활성화시키는 능력의 관점에서 2가지 상태로 존재한다: (1) "비활성" 상태, 즉, 비절단된 상태는 임의의 또는 모든 항원 결합 도메인(들)의 결합이 없을 때 발생하여, CD3 결합이 제한되고 T-세포 상호작용이 제거되고, (2) "활성" 상태는 임의의 또는 모든 항원 결합 도메인(들)에 의한 항원 결합 시 발생하여, CD3 결합 영역이 CD3에 결합할 수 있고 T-세포 상호작용이 허용된다.

[0126] 일부 구현예에서, Fc 영역은 링커 또는 링커들을 통해 CD3 결합 도메인에 연결된다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 비-절단가능한 링커 또는 링커들을 통해 CD3 결합 영역에 연결된다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 절단가능한 링커 또는 다르게는 불안정한 링커 또는 링커들을 통해 CD3 결합 영역에 연결된다.

[0127] 일부 구현예에서, Fc 영역과 CD3 결합 영역은 절단가능한 링커에 의해 연결된다. 일부 측면에서, 향상된 CD3 결합은 절단가능한 링커의 절단 후에 발생한다. 일부 이러한 측면에서, "활성" 상태는 CD3 결합 영역과 Fc 영역을 연결하는 링커의 절단을 통한 것을 포함하여 여러가지 메카니즘을 통해 추가로 증폭될 수 있다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 프로테아제에 대한 기질 인식 부위를 포함하는 링커이다. 일부 구현예에서, Fc 영역 및 CD3 결합 영역은 절단가능한 링커에 의해 연결되고, 향상된 CD3 결합은 링커(들) 내에서 절단 후에 발생할 수 있다.

[0128] 일부 측면에서, 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 단백질분해의 부재 시 치료학적 효능을 허용한다.

[0129] 일부 구현예에서, Fc 영역은 동종이량체 Fc 영역이다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 이종이량체 Fc 영역이다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 단량체 Fc 영역이다. 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 Fc 영역은 FcɣR과 상호작용하고, 선천성 면역 효과기 기능, 예를 들어, 항체 의존 세포성 세포독성 (ADCC) 및 항체 의존 세포성 식균작용 (ADCP)을 매개할 수 있다. 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 Fc 영역은 보체 단백질, 즉 C1q와 상호작용할 수 있고, 보체 의존 세포독성을 매개할 수 있다. 따라서, 일부 측면에서, 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 선천성 면역 효과기 및 T-세포를 포함하는 다중 면역 효과기 메카니즘을 허용한다.

[0130] 일부 구현예에서, Fc 영역과 CD3 결합 영역이 절단가능한 링커에 의해 작동가능하게 연결되어 있는 경우, Fc 영역과 CD3 결합 영역 사이의 링커(들)의 절단은 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트를 제1 및 제2 구성요소로 분

리할 수 있다. 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 조성에 따라, 제1 및 제2 구성요소는 별개의 기능성을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 ADCC, CDC 또는 ADCP 기능과 같은 하나 이상의 효과기 기능을 나타내는 영역이다. 이러한 예에서, 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 자가-증폭 시스템을 생성하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 다중특이적 컨스트럭트는 다음과 같이 사용될 수 있다: TAA 표적화 및 Fc 영역의 CD16 결합 후 NK 세포에 의해 매개된 ADCC는 세포 외 단백질분해 및 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 제1 및 제2 구성요소 사이에 링커의 절단이 가능한 방출 그랜자임 B를 나타낸다.

[0131] 일부 구현예에서, 링커는 절단가능한 링커이다. 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 이중 효과기 기능을 갖는 투-인-원 (two-in-one) 치료학적 성분을 제공하며, 여기서 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 단백질분해 활성화는 각각 생물학적 활성을 갖는 2개의 구성요소를 생성한다. 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는, 예를 들어, ADCC (예를 들어, NK 세포에 의한 그랜자임 B의 방출), ADCP, 및/또는 CDC와 같은 Fc-매개 효과기 기능을 제공할 수 있다.

[0132] 제한적 CD3 인게이징 컨스트럭트는 임의의 TAA-결합 도메인과 함께 사용하기에 쉬우며, 주변 T-세포와의 상호작용을 피하고 강력한 TAA-의존 세포독성을 매개함으로써, 종양 또는 종양-미세환경 내에서 더 나은 치료학적 노출을 가능하게 하는 것이 고려된다. Fc와 CD3 결합 도메인의 구성요소 사이에 프로테아제 절단가능한 링커의 혼합은 CD3 결합 도메인의 완전한 노출을 허용함으로써 T-세포 활성화 능력의 증폭을 가능하게 한다. 포함된 특이적 링커에 따라, 증폭 단계는 종양 관련 프로테아제 또는 항원 의존-T-세포 활성화 후 방출된 그랜자임에 의해 매개될 수 있다. 종양 프로테아제 절단가능한 링커가 포함되는 경우, 증폭은 종양 또는 종양-미세환경에 의해 매개된다. 반면, 그랜자임 B 절단가능한 링커가 포함되는 경우, 증폭이 항원-의존 활성화 후 T-세포에 의해 자가-매개될 수 있다. 추가로, 효과기 가능 Fc가 컨스트럭트에 포함되는 경우, 증폭은 ADCC 메카니즘을 통해 발생하는 NK 세포로부터 방출된 그랜자임에 의해 매개될 수 있다.

[0133] 일부 구현예에서, 프로테아제는 종양 미세환경에서 및/또는 항원 결합 도메인(들)의 TAA에 대한 결합을 통해 종양 미세환경에서 CD3에 대한 CD3 결합 영역의 초기 결합에 의해 유도되는 T 세포 활성화 시 생산되는 프로테아제이다. 일부 구현예에서, 프로테아제는 그랜자임 B이다. 일부 측면에서, 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 종양 미세환경 내의 프로테아제 및/또는 Fc 면역글로불린 폴리펩티드 아래 위치의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트 내 링커를 절단하는 그랜자임 B의 능력에 영향을 주어, 일부의 경우에, 별개의 효과기 세포 관여를 갖는 2개의 치료학적 활성 단백질을 제조한다. 일부 측면에서, 절단가능한 링커의 절단 시, 절단된 제1 부분 또는 구성요소는 Fc-효과기 기능 및 제1 항원-결합 도메인을 통한, 예를 들어, TAA와 같은 제1 항원의 2가 표적화를 보유하고, 제2 부분 또는 구성요소는 Fc 영역으로부터 CD3 결합 영역의 분리가 CD3 결합을 허용하기 때문에, T-세포 관여에 대한 능력을 보유한다. 절단된 제2 부분 또는 구성요소는 또한, 일부의 경우에, 제2 항원-결합 도메인을 통한 2가 결합일 수 있는, TAA에 대한 결합 능력을 보유한다.

[0134] 일부 구현예에서, 제2 부분 또는 구성요소는 CD3에 1가인 CD3 결합 영역을 함유하여, TAA가 존재하지 않으면, T-세포의 활성화가 없을 것이다. 일부 측면에서, 다가 폴리펩티드 컨스트럭트가 절단가능한 링커를 함유하는 경우, 절단된 제2 부분 또는 구성요소는 TAA-의존, T-세포-매개 세포독성을 허용한다. 일부의 경우, 절단된 제2 부분 또는 구성요소는 FcRn 상호작용이 없을 것을 보장한다. 추가로, 절단된 제2 부분 또는 구성요소는, 예를 들어, ~50kDa에 불과한 크기로 충분히 작을 것이며, 이는 어떠한 이유로든, 절단된 제2 부분 또는 구성요소가 절단 후 종양 부위 외부에 분포하고/하거나 종양 부위의 외부에서 비정상적으로 절단된 경우, 신속한 제거를 보장할 것이다.

[0135] 일부 구현예에서, 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 T-세포 및 NK 세포 매개 세포독성이 동시에 발생하도록 한다. 일부의 경우, 이러한 활성은 주어진 TAA에서 별개의 및/또는 비-경쟁적 에피토프를 표적할 수 있는 제1 항원 결합 도메인, 예를 들어, 제1 항-TAA 항원 결합 도메인, 및 제2 항원 결합 도메인, 예를 들어, 제2 항-TAA 항원 결합 도메인이 함유된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트에서 발생할 수 있다.

[0136] 일부 측면에서, 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 현재 이중특이적 치료제에 비해 많은 이점을 제공한다. 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 통상적인 치료 항체, 예를 들어, 150kDa 대 125kDa보다 작으며, 이는 더 나은 표적, 예를 들어, 종양, 침투를 허용할 것이다. 먼저, 전체 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 크기는 비절단된 컨스트럭트에 대해 긴 반감기를 제공하고, 컨스트럭트의 절단 시, 절단된 제2 부분 또는 구성요소는 짧은 반감기를 보장하기에 충분히 작을 것이다. 일부 측면에서, 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는, CD3 결합 영역에 의한 CD3 결합이 CD3 관여가 발생하기 전에 TAA 관여에 의존하기 때문에, 감소된 전신 독성 또는 종양 및/또는 종양 미세환경 외부의 임의의 영역의 독성을 나타낸다. 일부의 경우, 종양

미세환경의 프로테아제에 대한 특이적인 절단가능한 링커의 혼합은 단백질분해 활성 및 TAA 관여까지 다중특이적 컨스트럭트에 의한 CD3 결합을 감소시켜, CD3 관여를 증폭 또는 향상시킨다.

[0137] 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 절단가느안 링커를 절단하는 프로테아제가 종양-편향될 필요가 없도록 (예를 들어, 종양 부위에서 및/또는 종양 미세환경에서만 차별적으로 발현될 필요가 없음) 설계된다. 오히려, 이들 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 프로테아제가 TAA와 동일한 위치에 존재하는 것만 필요로 한다. 이들 컨스트럭트의 결합가는 종양 및/또는 종양 미세환경 내에서 생물분포 및 보유를 유도할 것이다.

[0138] 본원에 인용된 모든 간행물 및 특허 문헌은 이러한 간행물 또는 문헌 각각이 본원에 참고로 포함되는 것으로 구체적으로 그리고 개별적으로 나타낸 것과 같이, 본원에서 참고로 포함된다. 간행물 및 특허 문헌의 인용은 임의의 것이 관련 선행기술이라는 것을 인정하는 의도가 아니며, 내용이나 날짜에 대한 어떠한 인정으로 여겨지지 않는다. 본 발명은 서면으로 설명되었지만, 통상의 기술자는 본 발명이 다양한 구현예에서 실시될 수 있으며, 전술한 설명 및 하기 예는 예시적인 목적일뿐, 다음의 청구범위를 제한하는 것이 아님을 인식할 것이다.

[0139] **I. 정의**

[0140] 달리 정의되지 않는 한, 본 발명과 관련하여 사용된 과학 및 기술 용어는 통상의 기술자에게 통상적으로 이해되는 의미를 가질 것이다. 용어 독립체 (entity) "하나 (a)" 또는 "하나 (an)"는 그 독립체의 하나 이상을 지칭한다. 예를 들어, 화합물은 하나 이상의 화합물을 지칭한다. 이와 같이, 용어 "하나 (a)", "하나 (an)", "하나 이상의" 및 "적어도 하나"는 상호교환적으로 사용될 수 있다. 또한, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수 용어는 복수를 포함하고 복수 용어는 단수를 포함할 것이다. 일반적으로, 본원에 기재된 세포 및 조직 배양, 분자 생물학, 및 단백질 및 올리고- 또는 폴리뉴클레오티드 화학 및 혼성화와 관련하여, 이의 기술에서 사용된 명명법은 당해 기술분야에 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다. 재조합 DNA, 올리고뉴클레오티드 합성, 및 조직 배양 및 형질전환 (예를 들어, 전기천공, 리포펙션)에 대해 표준 기술이 사용된다. 효소 반응 및 정제 기술은 제조업체의 사양에 따라 또는 당해 기술분야에 통상적으로 이루어지거나 본원에 기재된 바와 같이 수행된다. 전술한 기술 및 절차는 일반적으로 당해 기술분야에 널리 알려진 통상적인 방법에 따라 그리고 본 명세서 전반에 걸쳐 인용되고 논의된 다양하고 일반적인 그리고 보다 구체적인 참고문헌에 기재된 바와 같이 수행된다. 예를 들어, Sambrook 등의 Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))을 참고한다. 본원에 기재된 분석화학, 합성 유기화학, 및 의약 및 제약 화학과 관련하여, 이의 실험실 절차 및 기술에 사용된 명명법은 당해 기술분야에 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다. 화학 합성, 화학 분석, 약학 제제, 제형, 및 전달, 및 환자의 치료에 대해 표준 기술이 사용된다.

[0141] 본 발명에 따라 사용되는 바와 같이, 다음의 용어는, 달리 나타내지 않는 한, 다음의 의미를 갖는 것으로 이해될 것이다:

[0142] 본원에 사용된, 용어 "항체"는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 (Ig) 분자의 항원-결합 부분, 즉, 항원에 특이적으로 결합하는 (항원과 면역반응하는) 항원 결합 부위를 함유하는 분자를 지칭한다. "특이적으로 결합한다" 또는 "와 면역반응하는" 또는 "면역특이적으로 결합한다"는 항체가 원하는 항원의 하나 이상의 항원 결정기와 반응하고 다른 폴리펩티드와 반응하지 않거나 훨씬 낮은 친화도 ($K_d > 10^{-6}$)로 결합하는 것을 의미한다. 항체는 폴리클로날, 모노클로날, 키메릭, 완전 인간, 도메인 항체, 단일 사슬, Fab, 및 $F(ab')_2$ 단편, Fvs, scFvs, 및 Fab 발현 라이브러리를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0143] 기본 항체 구조 단위는 4량체 (tetramer)를 포함하는 것으로 알려져 있다. 각 4량체는 2개의 동일한 쌍의 폴리펩티드 사슬로 구성되며, 각 쌍은 하나의 "경쇄" (약 25 kDa) 및 "중쇄" (약 50-70 kDa)을 갖는다. 각 사슬의 아미노-말단 부분은 주로 항원 인식에 역할을 하는 약 100 내지 110개 또는 그 이상의 아미노산의 가변 영역을 포함한다. 각 사슬의 카르복시-말단 부분은 주로 효과기 기능에 역할을 하는 불변 영역을 정의한다. 일반적으로, 인간으로부터 수득되는 항체 분자는 분자에 존재하는 중쇄의 성질에 의해 서로 상이한, 클래스 IgG, IgM, IgA, IgE 및 IgD 중 임의의 것에 관한 것이다. 특정 클래스는 또한 IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4 등과 같은 서브클래스를 갖는다. 추가로, 인간에서 경쇄는 카파 사슬 또는 람다 사슬일 수 있다.

[0144] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체" (mAb) 또는 "모노클로날 항체 조성"은 특유의 경쇄 유전자 산물 및 특유의 중쇄 유전자 산물로 이루어진 항체 분자의 단 하나의 분자 종을 함유하는 항체 분자의 집단을 지칭한다. 특히, 모노클로날 항체의 상보성 결정 영역 (CDR)은 집단의 모든 분자에서 동일하다. MAb는 고유한 결합 친화성을

특징으로 하는 항원의 특정 에피토프와 면역반응을 할 수 있는 항원 결합 부위를 함유한다.

[0145] 용어 "항원-결합 부위" 또는 "결합 부분"은 항원 결합에 참여하는 면역글로불린 분자의 일부를 지칭한다. 항원 결합 부위는 중쇄 ("H") 및 경쇄 ("L")의 N-말단 가변 ("V") 영역의 아미노산 잔기에 의해 형성된다. "초가변 영역"으로 지칭되는, 중쇄 및 경쇄의 V 영역 내의 3개의 고도로 다른 범위 (highly divergent stretch)는 "프레임워크 영역", 또는 "FR"로 알려진 보다 보존된 플랭킹 (flanking) 범위 사이에 삽입된다. 따라서, 용어 "FR"은 면역글로불린의 초가변 영역 사이에서, 그리고 이에 인접하여 자연적으로 발견되는 아미노산 서열을 지칭한다. 항체 분자에서, 경쇄의 3개의 초가변 영역과 중쇄의 3개의 초가변 영역은 3차원 공간에서 서로에 대해 배치되어 항원-결합 표면을 형성한다. 항원-결합 표면은 결합된 항원의 3차원 표면에 대해 상보적이고, 중쇄 및 경쇄 각각의 3개의 초가변 영역은 "상보성-결정 영역", 또는 "CDRs"로 지칭된다. 각 도메인에 대한 아미노산의 배치는 면역학적 관심 단백질의 카밧 서열의 정의에 따른다 (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 및 1991)), 또는 Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), Chothia 등의 Nature 342:878-883 (1989).

[0146] 본원에 사용된, 용어 "에피토프"는 항체, 항체 단편 또는 다른 결합 도메인에 의해 표적화된 항원의 임의의 특정 부분을 포함한다. 용어 "에피토프"는 특이적 결합이 지시되는 임의의 단백질 영역을 포함한다. 용어 "에피토프"는 면역글로불린 또는 T-세포 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 단백질 결정인자를 포함한다. 에피토프 결정인자는 보통 아미노산 또는 당 측면 사슬과 같은 분자의 화학적 활성 표면 그룹으로 이루어지며 보통 특이적인 3차원 구조적 특성뿐만 아니라, 특정 전하 특성을 갖는다. 예를 들어, 항체는 폴리펩티드의 N-말단, 중심, 또는 C-말단에 대해 형성될 수 있다. 추가로, 항체는 폴리펩티드의 선형 또는 불연속 에피토프에 대해 형성될 수 있다. 해리 상수가 ≤ 1 μM 일 때; 예를 들어, 일부 구현예에서 ≤ 100 nM 그리고 일부 구현예에서, ≤ 10 nM 일 때, 그리고 밀접하게 관련되거나 구별되는 다른 단백질에 대한 결합을 나타내지 않을 때, 항체는 항원에 특이적으로 결합한다고 말한다.

[0147] 본원에 사용된, 용어 "특이적 결합", "면역학적 결합", 및 "면역학적 결합 특성"은 면역글로불린 분자와 면역글로불린이 특이적인 항원 사이에 발생하는 종류의 비-공유 상호작용을 지칭한다. 면역학적 결합 상호작용의 강도, 또는 친화도는 상호작용의 해리 상수 (K_d)와 관련하여 표현될 수 있으며, 더 작은 K_d는 더 큰 친화도를 나타낸다. 선택된 폴리펩티드의 면역학적 결합 특성은 당해 기술분야에 잘 알려진 방법을 이용하여 정량화될 수 있다. 하나의 이러한 방법은 항원-결합 부위/항원 복합체 형성 및 해리의 속도를 측정하는 것을 수반하며, 여기서 이러한 속도는 복합체 파트너의 농도, 상호작용의 친화도, 및 양 방향으로의 속도에 동일하게 영향을 미치는 기하학적 파라미터에 의존한다. 따라서, "결합 속도 상수" (K_{on})와 "해리 속도 상수" (K_{off})는 모두 농도 및 실제 결합 및 해리 속도를 계산하여 결정될 수 있다 (Nature 361:186-87 (1993)을 참고한다). K_{off}/K_{on}의 비율은 친화성과 관련이 없는 모든 파라미터를 취소할 수 있으며 해리 상수 K_d와 동일하다 (일반적으로, Davies 등의 (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473을 참고한다). 본 발명의 항체는, 결합 상수 (K_d)가 방사성리간드 어세이 또는 통상의 기술자에게 공지된 유사한 어세이와 같은 어세이에 의해 측정된 바와 같이, ≤ 1 μM 일 때, 예를 들어, 일부 구현예에서 ≤ 100 nM, 일부 구현예에서 ≤ 10 nM, 일부 구현예에서 ≤ 100 pM 내지 약 1 pM 일 때, EGFR에 특이적으로 결합한다고 말한다.

[0148] 본원에 사용된 용어 "분리된 폴리뉴클레오티드"는 게놈, cDNA, 또는 합성 기원 또는 이의 일부 조합의 폴리뉴클레오티드를 의미할 것이며, 그 기원에 의해 "분리된 폴리뉴클레오티드"는 (1) "분리된 폴리뉴클레오티드"가 자연에서 발견되는 폴리뉴클레오티드의 전부 또는 일부와 관련이 없거나, (2) 자연에서 연결되지 않은 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결되거나, 또는 (3) 더 큰 서열의 일부로 자연에서 발생하지 않는다. 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드는 본원에서 나타낸 중쇄 면역글로불린 분자를 코딩하는 핵산 분자, 및 본원에 나타낸 경쇄 면역글로불린 분자를 코딩하는 핵산 분자를 포함한다.

[0149] 본원에서 언급된 용어 "분리된 단백질"은 cDNA, 재조합 RNA, 또는 합성 기원 또는 이의 일부 조합의 단백질을 의미하며, 그 기원에 의해, 또는 유래의 공급원에 의해, "분리된 단백질"은 (1) 자연에서 발견되는 단백질과 관련이 없거나, (2) 동일한 공급원으로부터의 다른 단백질이 없거나, 예를 들어,뮤린 단백질이 없거나, (3) 다른 종으로부터 세포에 의해 발현되거나, 또는 (4) 자연에서 발생하지 않는다.

[0150] 용어 "폴리펩티드"는 본원에서 폴리펩티드 서열의 천연 단백질, 단편, 또는 유사체를 언급하는 일반적인 용어로 사용된다. 따라서, 천연 단백질 단편, 및 유사체는 폴리펩티드 속 (genus)의 종(species)이다. 본 발명에 따른 폴리펩티드는 본원에 제시된 중쇄 면역글로불린 분자, 및 본원에 제시된 경쇄 면역글로불린 분자, 및 중쇄 면역글로불린 분자 및 카파 경쇄 면역글로불린 분자와 같은 경쇄 면역글로불린 분자를 포함하는 조합으로 형성된 항

체 분자, 및 그 반대, 뿐만 아니라 이의 단편 및 유사체를 포함한다.

[0151] 대상에 적용되는 본원에 사용된 용어 "자연-발생"은 대상이 자연에서 발견될 수 있다는 사실을 지칭한다. 예를 들어, 자연에서 공급원으로부터 분리될 수 있는 유기체 (바이러스 포함) 및 실험실에서 사람에 의해 의도적으로 변형되지 않았거나 또는 다르게는 자연-발생한 것에 존재하는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다.

[0152] 본원에 사용된 용어 "작동가능하게 연결된"은 설명된 구성요소의 위치가 그들이 의도된 방식으로 기능할 수 있게 허용하는 관계에 있는 것을 지칭한다. 코딩 서열에 대해 "작동가능하게 연결된" 제어 서열은 제어 서열과 양립할 수 있는 조건 하에서 코딩 서열의 발현이 달성되는 방식으로 묶인다.

[0153] 본원에 사용된 용어 "제어 서열"은 이들이 묶인 코딩 서열의 발현 및 처리에 영향을 미치는데 필요한 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 이러한 제어 서열의 성질은 원핵생물에서 숙주 유기체에 따라 다르며, 이러한 제어 서열은 일반적으로 프로모터, 리보솜 결합 부위, 및 진핵생물에서의 전사 종결 서열을 포함하고, 일반적으로, 이러한 제어 서열은 프로모터 및 전사 종결 서열을 포함한다. 용어 "제어 서열"은 존재가 발현 및 처리에 필수적인 모든 구성요소를 최소한 포함하도록 의도되며, 존재가 유리한 추가의 구성요소, 예를 들어, 리더 서열 및 융합 파트너 서열 또한 포함할 수 있다. 본원에 언급된 용어 "폴리뉴클레오티드"는 적어도 10개의 염기의 길이의 뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드 또는 데옥시뉴클레오티드 중 하나 또는 변형된 형태의 뉴클레오티드의 각각의 유형을 의미한다. 이 용어는 DNA의 단일 및 이중 가닥 형태를 포함한다.

[0154] 본원에서 언급된 용어 올리고뉴클레오티드는 자연 발생, 및 비-자연 발생 올리고뉴클레오티드 연결에 의해 함께 연결된 자연 발생, 및 변형된 뉴클레오티드를 포함한다 올리고뉴클레오티드는 일반적으로 200개 또는 그 이하의 염기의 길이를 포함하는 폴리뉴클레오티드 서브세트이다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 10개 내지 60개 염기의 길이이고, 예를 들어, 일부 구현예에서, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 내지 40개 염기의 길이이다. 올리고뉴클레오티드는 통상적으로 단일가닥, 예를 들어, 프로브용이지만, 올리고뉴클레오티드는, 예를 들어 유전자 돌연변이체의 구축에 사용하기 위해 이중가닥일 수 있다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 센스 또는 안테센스 올리고뉴클레오티드 중 하나이다.

[0155] 본원에 언급된 용어 "자연 발생 뉴클레오티드"는 데옥시리보뉴클레오티드 및 리보뉴클레오티드를 포함한다. 본원에 언급된 용어 "변형된 뉴클레오티드"는 변형되거나 치환된 당 그룹 등을 갖는 뉴클레오티드를 포함한다. 본원에 언급된 용어 "올리고뉴클레오티드 연결"은 포스포로티오에이트 (phosphorothioate), 포스포로디티오에이트 (phosphorodithioate), 포스포로셀레노에이트 (phosphoroselerloate), 포스포로디셀레노에이트 (phosphorodiselenoate), 포스포로아닐로티오에이트 (phosphoroanilothioate), 포스포라닐라데이트 (phoshoraniladate), 및 포스포로아미데이트 (phosphoronmidate) 등과 같은 올리고뉴클레오티드 연결을 포함한다. 예를 들어, LaPlanche 등의 Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec 등의 J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984), Stein 등의 Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988), Zon 등의 Anti Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon 등의 Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec 등의 미국특허번호 5,151,510호; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990)을 참고한다. 올리고뉴클레오티드는, 원한다면, 검출용 표지를 포함할 수 있다.

[0156] 본원에 사용된 바와 같이, 20개의 통상적인 아미노산 및 이의 약어는 통상적인 사용을 따른다. Immunology - A Synthesis (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland7 Mass. (1991))을 참고한다. 20개의 통상적인 아미노산의 입체이성질체 (예를 들어, D-아미노산), 비천연 아미노산, 예컨대 α-, α-2기 치환의 아미노산, N-알킬 아미노산, 락트산, 및 다른 비통상적인 아미노산은 또한 본 발명의 폴리펩티드에 적합한 구성요소일 수 있다. 비통상적인 아미노산의 예는: 4 하이드록시프롤린, γ-카르복시글루탐산, ε-N,N,N-트리메틸리신, ε-N-아세틸리신, O-포스포세린, N-아세틸세린, N-포르밀메테오닌, 3-메틸히스티딘, 5-하이드록시리신, σ-N-메틸아르기닌, 및 다른 유사한 아미노산 및 이미노산 (예를 들어, 4-하이드록시프롤린)을 포함한다. 본원에 사용된 폴리펩티드 표기법에서, 표준 사용법 및 관례에 따라, 좌측 방향은 아미노 말단 방향이고, 우측 방향은 카르복시-말단 방향이다.

[0157] 유사하게, 달리 명시하지 않는 한, 단일-가닥 폴리뉴클레오티드 서열의 좌측 말단은 5' 말단이고, 이중-가닥 폴리뉴클레오티드 서열의 좌측 방향은 5' 방향으로 지칭된다. 초기 RNA 전사체의 5' 내지 3' 첨가의 방향은 RNA와 동일한 서열을 갖는 DNA 가닥 상의 전사 방향 서열 영역으로 지칭되고 RNA 전사체의 5' 내지 5' 말단인 것은 RNA와 동일한 서열을 갖는 DNA 가닥 상의 서열 영역인 "업스트림 서열 (upstream sequences)"로 지칭되며 RNA 전사체의 3' 내지 3' 말단인 것은 "다운 스트림 서열(downstream sequences)"로 지칭된다.

[0158] 폴리펩티드에 적용되는 바와 같이, 용어 "실질적 동일성"은, 2개의 펩티드 서열이, 예컨대 디폴트 갭 중량을 이용한 프로그램 GAP 또는 BESTFIT에 의해 최적으로 정렬될 때, 예를 들어, 일부 구현예에서, 적어도 90 퍼센트 서열 동일성, 일부 구현예에서, 적어도 95 퍼센트 서열 동일성, 및 일부 구현예에서, 적어도 99 퍼센트 서열 동일성을 공유하는 것을 의미한다.

[0159] 일부 구현예에서, 동일하지 않은 잔기 위치는 보존적 아미노산 치환에 의해 다르다.

[0160] 본원에서 논의된 바와 같이, 항체 또는 면역글로불린 분자의 아미노산 서열에서 작은 변이는 본 발명에 포함되는 것으로 고려되며, 예를 들어, 아미노산에서의 변이는 적어도 75%, 예를 들어, 일부 구현예에서, 적어도 80%, 90%, 95%, 및 일부 구현예에서 99%를 유지하는 것을 제공한다. 특히, 보존적 아미노산 대체가 고려된다. 보존적 대체는 측면 사슬과 관련된 아미노산 패밀리 내에서 발생하는 것이다. 유전자 코딩된 아미노산은 일반적으로 패밀리로 나누어진다: (1) 산성 아미노산은 아스파르트산, 글루탐산이고; (2) 염기성 아미노산은 리신, 아르기닌, 히스티딘이며; (3) 비-극성 아미노산은 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판이고, 그리고 (4) 비하전 극성 아미노산은 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 세린, 트레오닌, 티로신이다. 친수성 아미노산은 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루타민, 글루탐산, 히스티딘, 리신, 세린, 및 트레오닌을 포함한다. 소수성 아미노산은 알라닌, 시스테인, 이소류신, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 트립토판, 티로신 및 발린이다. 아미노산의 다른 패밀리는 (i) 지방족-하이드록시 패밀리인 세린 및 트레오닌; (ii) 아미드 함유 패밀리인 아스파라긴 및 글루타민; (iii) 지방족 패밀리인 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신; 및 (iv) 방향족 패밀리인 페닐알라닌, 트립토판, 및 티로신을 포함한다. 예를 들어, 류신을 이소류신 또는 발린으로, 아스파르트산을 글루탐산으로, 트레오닌을 세린으로의 분리된 대체, 또는 아미노산을 구조적으로 관련된 아미노산의 유사한 대체, 특히 대체가 프레임워크 부위 내에 아미노산을 포함하지 않는 경우, 결과적으로 생성된 분자의 결합 또는 특성에 주요 영향을 미치지 않을 것으로 예상하는 것이 합리적이다. 아미노산 변화가 기능적 펩티드를 초래하는지 여부는 폴리펩티드 유도체의 특이적 활성화를 분석함으로써 용이하게 결정될 수 있다. 어세이는 본원에 상세하게 기재된다. 항체 또는 면역글로불린 분자의 단편 또는 유사체는 통상의 기술자에 의해 용이하게 제조될 수 있다. 일부 구현예에서, 단편 또는 유사체의 아미노- 및 카르복시-말단 기능적 도메인의 경계 부근에서 발생한다. 구조적 및 기능적 도메인은 공개된 뉴클레오티드 및/또는 아미노산 서열 데이터 또는 독점 서열 데이터베이스의 비교로 확인될 수 있다. 공지된 구조 및/또는 기능의 다른 단백질에서 발생하는 서열 모티프 또는 예상된 단백질 형태 도메인을 확인하기 위해 컴퓨터화된 비교 방법이 사용된다. 공지된 3-차원 구조로 접히는 단백질 서열을 확인하는 방법이 공지되어 있다. Bowie 등의 Science 253:164 (1991). 따라서, 전술한 예는 통상의 기술자가 본 발명에 따라 구조적 및 기능적 도메인을 정의하는데 사용될 수 있는 서열 모티프 및 구조적 형태를 인식할 수 있다는 것을 입증한다.

[0161] 일부 구현예에서, 아미노산 치환은: (1) 단백질분해에 대한 감수성을 감소시키고, (2) 산화에 대한 감수성을 감소시키며, (3) 단백질 복합체를 형성하기 위한 결합 친화도를 변경하고, (4) 결합 친화도를 변경하며, 그리고 (4) 이러한 유사체의 다른 물리화학적 또는 기능적 특성을 부여하거나 변경하는 것이다. 유사체는 자연-발생 펩티드 서열 이외의 서열의 다양한 뮤테인을 포함할 수 있다. 예를 들어, 단일 또는 다중 아미노산 치환 (예를 들어, 보존적 아미노산 치환)은 자연-발생 서열에서 (예를 들어, 분자간 접촉을 형성하는 도메인(들) 외부의 폴리펩티드의 부분에서) 이루어질 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 부모 서열의 구조적 특성을 실질적으로 변화시키지 않아야 한다 (예를 들어, 대체 아미노산은 부모 서열에서 발생하는 나선을 파괴하지 않거나 부모 서열을 특징짓는 2차 구조의 다른 종류를 방해하지 않아야 한다). 당해 기술분야에 인식된 폴리펩티드 2차 및 3차 구조의 예는 Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); 및 Thornton 등의 Nature 354:105 (1991)에 기재되어 있다.

[0162] 본원에 사용된 용어 "폴리펩티드 단편"은 아미노 말단 및/또는 카르복시-말단 결실 및/또는 하나 이상의 내부 결실(들)을 갖는 폴리펩티드를 지칭하지만, 나머지 아미노산 서열이, 예를 들어 전장 cDNA 서열로부터 추론된 자연-발생 서열에서 상응하는 위치와 동일하다. 단편은 전형적으로 적어도 5, 6, 8 또는 10개의 아미노산 길이이고, 예를 들어, 일부 구현예에서, 적어도 14개의 아미노산 길이이며, 일부 구현예에서, 적어도 20개의 아미노산 길이이며, 통상적으로 적어도 50개의 아미노산 길이이고, 그리고 일부 구현예에서, 적어도 70개의 아미노산 길이이다. 본원에 사용된 용어 "유사체"는 추론된 아미노산 서열의 일부와 실질적 동일성을 가지고 적절한 결합 조건 하에서, EGFR에 대한 특이적 결합을 갖는, 적어도 25개의 아미노산의 분절로 구성되는 폴리펩티드를 지칭한다. 전형적으로, 폴리펩티드 유사체는 자연-발생 서열과 관련하여 보존적 아미노산 치환 (또는 첨가 또는 결실)을 포함한다. 유사체는 전형적으로 적어도 20개의 아미노산 길이이고, 예를 들어, 일부 구현예에서, 적어도

50개의 아마노산 길이 또는 그 이상이고, 종종 전장의 자연-발생 폴리펩티드만큼 길 수 있다.

[0163] 용어 "제제"는 화학적 화합물, 화학적 화합물의 혼합물, 생물학적 거대분자, 또는 생물학적 물질로 제조된 추출물을 나타내기 위해 사용된다.

[0164] 본원에 사용된, 용어 "표지" 또는 "표지된"은, 예를 들어, 방사성표지된 아미노산의 도입 또는 표시된 아비딘(예를 들어, 광학적 또는 열량측정법에 의해 검출될 수 있는 형광 마터 또는 효소 활성을 함유하는 스트렙타비딘)에 의해 검출될 수 있는 비오티닐 성분의 폴리펩티드에 부착에 의해 검출가능한 마커의 도입을 지칭한다. 특정 상황에서, 표지 또는 마커는 또한 치료제일 수 있다. 폴리펩티드 및 당단백질을 표지하는 다양한 방법이 당해 기술분야에 공지되어 있으며 이를 사용할 수 있다. 폴리펩티드에 대한 표지의 예는 다음을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다: 방사성 동위원소 또는 방사성 핵종 (예를 들어, ^{3}H, ^{14}C, ^{15}N, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I), 형광 표지 (예를 들어, 형광단, 로다민, 란탄족 인광체), 효소 표지 (예를 들어, 서양고추냉이 퍼옥시다아제, p-갈락토시다아제, 루시페라아제, 알칼린 포스파타아제), 화학발광, 비오티닐 그룹, 2차 리포터에 의해 인식되는 예정된 폴리펩티드 에피토프 (예를 들어, 류신 지퍼 쌍 서열, 2차 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그). 일부 구현예에서, 표지는 잠재적 입체 장애를 감소시키기 위해 다양한 길의 스페이서 암 (spacer arm)에 의해 부착된다. 본원에 사용된 용어 "약학 제제 또는 약물"은 환자에게 적절하게 투여될 때 원하는 치료 효과를 유도할 수 있는 화학적 화합물 또는 조성물을 지칭한다.

[0165] 본원에 사용된 "실질적으로 순수한"은 대상 종 (species)이 존재하는 우세한 종 (즉, 몰 기준으로, 조성물에서 임의의 다른 개별 종보다 몰비가 풍부함)이라는 것을 의미하고, 실질적으로 정제된 분획은 대상 종이 존재하는 모든 거대분자 종의 적어도 약 50 퍼센트 (몰 기준)를 포함하는 조성물이다.

[0166] 일반적으로, 실질적으로 순수한 조성물은 조성물에 존재하는 모든 거대분자 종의 약 80 퍼센트 이상, 예를 들어, 일부 구현예에서, 약 85%, 90%, 95%, 및 99% 이상을 포함할 것이다. 일부 구현예에서, 대상 종은 본질적인 균질성 (오염물 종은 통상적인 검출방법으로 조성물에서 검출될 수 없음)으로 정제되고, 여기서 조성물은 단일 거대분자 종으로 필수적으로 이루어진다.

[0167] 용어 환자는 인간 및 동물 대상을 포함한다.

[0168] 본원의 다른 화학 용어는 The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985))에 의해 예시된 바와 같이, 당해 기술분야에서 통상적인 사용에 따라 사용된다.

[0169] **II. 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트**

[0170] 면역글로불린 Fc 영역을 함유하는 제1 구성요소 및 CD3-결합 영역을 포함하는 제2 구성요소를 함유하는 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트가 본원에 제공되며, 여기서 제1 및 제2 구성요소는 링커에 의해 결합되고, Fc 영역은 CD3-결합 영역에 대해 N-말단에 위치하며; 그리고 제1 및 제2 구성요소 중 하나 또는 둘 다는 종양 관련 항원 (TAA)에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0171] 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 N-말단부터 C-말단까지 순서대로: 면역글로불린 Fc 영역; 링커; CD3 (CD3ε)에 결합하는 CD3 결합 영역; 및 종양-관련 항원 (TAA)에 결합하는 항원 결합 도메인을 함유한다. 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 N-말단부터 C-말단까지 순서대로: 종양-관련 항원 (TAA)에 결합하는 항원 결합 도메인; 면역글로불린 Fc 영역; 링커; 및 CD3 (CD3ε)에 결합하는 CD3 결합 영역을 함유한다. 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 적어도 TAA에 결합하는 적어도 제1 항원 결합 도메인 및 TAA에 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 함유한다. 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는, N-말단부터 C-말단까지 순서대로: 종양-관련 항원 (TAA)에 결합하는 제1 항원 결합 도메인; 면역글로불린 Fc 영역; 링커; CD3 (CD3ε)에 결합하는 CD3 결합 영역; 및 종양-관련 항원 (TAA)에 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 함유한다.

[0172] 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 구성요소 각각은 하기에 보다 상세하게 기재된다.

[0173] ***1. 항-CD3 결합 도메인:***

[0174] 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 항-CD3 결합 도메인의 하나 이상의 카피를 포함한다. 본 발명의 항-CD3 결합 도메인은 T 세포 상의 CD3ε의 관여를 통해 T 세포를 활성화시킨다. 본 발명의 항-CD3 결합 도메인은 CD3-매개 T 세포 활성화를 작용 (agonize), 자극, 활성화 및/또는 다르게는 증강 (argument)시킨다. CD3의 생물학적 활성은, 예를 들어, CD3와 T 세포 수용체 (TCR)의 항원-결합 서브유닛 사이의 상호작용을 통한 T 세포

활성화 및 다른 신호전달을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 항-CD3 결합 도메인은 예를 들어, CD3-매개 T 세포 활성화를 작용, 자극, 활성화 또는 다르게는 증강과 같이 부분적으로 또는 완전히 조절함으로써, T 세포 상의 CD3ε 관여를 통해 T 세포를 완전히 또는 부분적으로 활성화시킨다.

[0175] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 항-CD3 결합 도메인은 CD3ε으로도 알려진, CD3의 입실론 사슬에 특이적으로 결합한다. 본 발명의 항-CD3ε 결합 도메인은 T 세포 상에서 CD3ε의 관여를 통해 T 세포를 활성화시킨다. 본 발명의 항-CD3ε 결합 도메인은, 예를 들어, 포유동물 단일클론 항체, 영장류 단일클론 항체, 완전 인간 단일클론 항체, 및 인간화 단일클론 항체 및 키메릭 항체, 및 이의 항원-결합 단편과 같은 단일클론 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, 항-CD3ε 결합 도메인은 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 하나 이상의 카피를 포함한다.

[0176] 일부 구현예에서, 항-CD3ε 결합 도메인은 Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편, Fv 단편, scFv, scAb, dAb, 단일 도메인 중쇄 항체, 및 단일 도메인 경쇄 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 하나 이상의 카피를 포함한다. 일부 구현예에서, 항-CD3 결합 도메인은 CD3ε (본원에서 항-CD3ε Fv 단편으로 지칭됨)에 결합하는 Fv 항체 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-CD3ε Fv 항체 단편은 이황화 안정화 항-CD3 결합 Fv 단편 (dsFv)이다. 일부 구현예에서, 항-CD3 결합 도메인은 CD3 결합에 대해 1가이다.

[0177] 일부 구현예에서, 이의 항-CD3ε 결합 도메인은 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 (Hv)를 포함한다. 일부 구현예에서, 항-CD3ε 결합 도메인은 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 (Lv)를 포함한다. 일부 구현예에서, 이의 항-CD3ε 결합 도메인은 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 (Hv) 및 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 (Lv)를 포함한다. 일부 구현예에서, 이의 항-CD3ε 결합 도메인은 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 (Hv)를 포함한다. 일부 구현예에서, 항-CD3ε 결합 도메인은 서열번호 72의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 (Lv)를 포함한다. 일부 구현예에서, 이의 항-CD3ε 결합 도메인은 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 (Hv) 및 서열번호 72의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 (Lv)를 포함한다. 일부 구현예에서, 이의 항-CD3ε 결합 도메인은 서열번호 32 내지 81의 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 이의 항-CD3ε 결합 도메인은 서열번호 32 내지 62의 군으로부터 선택되는 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 및 서열번호 63 내지 81의 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 아미노산 서열의 조합을 포함한다.

[0178] 일부 구현예에서, 이의 항-CD3ε 결합 도메인은 서열번호 14의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 (Hv)를 포함한다. 일부 구현예에서, 항-CD3ε 결합 도메인은 서열번호 15의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 (Lv)를 포함한다. 일부 구현예에서, 이의 항-CD3ε 결합 도메인은 서열번호 14의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 (Hv) 및 서열번호 15의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 (Lv)를 포함한다.

[0179] 일부 구현예에서, 이의 항-CD3ε 결합 도메인은 서열번호 44의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 (Hv)를 포함한다. 일부 구현예에서, 항-CD3ε 결합 도메인은 서열번호 72의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 (Lv)를 포함한다. 일부 구현예에서, 이의 항-CD3ε 결합 도메인은 서열번호 44의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 (Hv) 및 서열번호 72의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 (Lv)를 포함한다.

[0180] 일부 구현예에서, 항-CD3ε Fv 항체 단편은 서열번호 32 내지 81의 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-CD3ε Fv 항체 단편은 서열번호 32 내지 81로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-CD3ε Fv 항체 단편은 서열번호 32 내지 62의 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 및 서열번호 63 내지 81로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-CD3ε Fv 항체 단편은 서열번호 32 내지 62로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 아미노산 서열 및 서열번호 63 내지

81 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 아미노산 서열의 조합을 포함한다.

[0181] 일부 구현예에서, 항-CD3ε 결합 도메인은 VH CDR1 서열, VH CDR2 서열, 및 VH CDR3 서열의 조합을 포함하고, 여기서 VH CDR1 서열, VH CDR2 서열, 및 VH CDR3 서열 중 적어도 하나는 적어도 아미노산 서열 TYAMN (서열번호 16)을 포함하는 VH CDR1 서열; 적어도 아미노산 서열 RIRSKYNNYATYYADSVKD (서열번호 17)를 포함하는 VH CD2 서열; 및 적어도 아미노산 서열 HGNFGNSYVSWFAY (서열번호 18)을 포함하는 VH CDR3 서열로부터 선택된다.

[0182] 일부 구현예에서, 항-CD3ε 결합 도메인은 VL CDR1 서열, VL CDR2 서열, 및 VL CDR3 서열의 조합을 포함하고, 여기서 VL CDR1 서열, VL CDR2 서열, 및 VL CDR3 서열 중 적어도 하나는 적어도 아미노산 서열 RSSTGAVTTSNYAN (서열번호 19)을 포함하는 VL CDR1 서열; 적어도 아미노산 서열 GTNKRAP (서열번호 20)를 포함하는 VL CDR2 서열; 및 적어도 아미노산 서열 ALWYSNLWV (서열번호 21)를 포함하는 VL CDR3 서열로부터 선택된다.

[0183] 일부 구현예에서 항-CD3ε 결합 도메인은 적어도 아미노산 서열 TYAMN (서열번호 16)을 포함하는 VH CDR1 서열; 적어도 아미노산 서열 RIRSKYNNYATYYADSVKD (서열번호 17)를 포함하는 VH CD2 서열; 적어도 아미노산 서열 HGNFGNSYVSWFAY (서열번호 18)를 포함하는 VH CDR3 서열; 적어도 아미노산 서열 RSSTGAVTTSNYAN (서열번호 19)을 포함하는 VL CDR1 서열; 적어도 아미노산 서열 GTNKRAP (서열번호 20)를 포함하는 VL CDR2 서열; 및 적어도 아미노산 서열 ALWYSNLWV (서열번호 21)를 포함하는 CDR3 서열을 포함한다.

[0184] 일부 구현예에서, 항-CD3ε 결합 도메인은 VH CDR1 서열, VH CDR2 서열, 및 VH CDR3 서열의 조합을 포함하고, 여기서 VH CDR1 서열, VH CDR2 서열, 및 VH CDR3 서열 중 적어도 하나는 아미노산 서열 TYAMN (서열번호 16)과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 서열을 포함하는 VH CDR1 서열; 아미노산 서열 RIRSKYNNYATYYADSVKD (서열번호 17)와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 서열을 포함하는 VH CD2 서열; 및 아미노산 서열 HGNFGNSYVSWFAY (서열번호 18)와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 서열을 포함하는 VH CDR3 서열로부터 선택된다.

[0185] 일부 구현예에서, 항-CD3ε 결합 도메인은 VL CDR1 서열, VL CDR2 서열, 및 VL CDR3 서열의 조합을 포함하고, 여기서 VL CDR1 서열, VL CDR2 서열, 및 VL CDR3 서열 중 적어도 하나는 아미노산 서열 RSSTGAVTTSNYAN (서열번호 19)과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 서열을 포함하는 VL CDR1 서열; 아미노산 서열 GTNKRAP (서열번호 20)와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 서열을 포함하는 VL CDR2 서열; 및 아미노산 서열 ALWYSNLWV (서열번호 21)과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 서열을 포함하는 VL CDR3 서열로부터 선택된다.

[0186] 일부 구현예에서, 항-CD3ε 결합 도메인은 아미노산 서열 TYAMN (서열번호 16)과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 VH CDR1 서열; 아미노산 서열 RIRSKYNNYATYYADSVKD (서열번호 17)과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 VH CD2 서열; 아미노산 서열 HGNFGNSYVSWFAY (서열번호 18)와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 VH CDR3 서열, 아미노산 서열 RSSTGAVTTSNYAN (서열번호 19)과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 VL CDR1 서열; 아미노산 서열 GTNKRAP (서열번호 20)와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 VL CDR2 서열; 및 아미노산 서열 ALWYSNLWV (서열번호 21)과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 VL CDR3 서열을 포함한다.

[0187] 일부 구현예에서, 이의 항-CD3ε 결합 도메인은 중쇄 가변 아미노산 서열과 경쇄 가변 아미노산 서열의 조합을 포함하는 Fv 단편이다. 일부 구현예에서, 이의 항-CD3ε 결합 도메인은 서열번호 32 내지 81로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 아미노산 서열 및 경쇄 가변 아미노산 서열의 조합을 포함하는 Fv 단편이다. 일부 구현예에서, 이의 항-CD3ε 결합 도메인은 아미노산 서열 32 내지 81로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 아미노산 서열 및 경쇄 가변 아미노산 서열의 조합을 포함하는 Fv 단편이다. 일부 구현예에서, 이의 항-CD3ε 결합 도메인은 서열번호 32 내지 62의 군으로부터 선택되는 중쇄 가변 아미노산 서열과 서열번호 63 내지 81로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열의 조합을 포함하는 Fv 단편이다. 일부 구현예에서, 이의 항-CD3ε 결합 도메인은 서열번호 32 내지 62로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 중쇄 가변

아미노산 서열 및 서열번호 63 내지 81 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 아미노산 서열의 조합을 포함하는 Fv 단편이다.

[0188] ***2. 면역글로불린 Fc 폴리펩티드:***

[0189] 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 제1 구성요소는 면역글로불린 Fc 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 Fc 영역은 IgG1 이소타입, IgG2 이소타입, IgG3 이소타입, 및 IgG4 서브클래스로 이루어진 군으로부터 선택되는 IgG 이소타입이다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 인간 Fc이다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 1 내지 6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 1 내지 6 중 임의의 것의 면역학적으로 활성인 단편인 Fc 사슬을 함유한다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 1 내지 6 중 임의의 아미노산 서열 또는 면역학적으로 활성인 이의 단편과 적어도 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 Fc 폴리펩티드 사슬을 함유한다. 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 각각 Fc를 함유하는 폴리펩티드들에 의해 형성된 이량체이다. 일부 구현예에서, 동일하거나 실질적으로 동일한 폴리펩티드는 동종이량체를 생성하기 위해 이량체화될 것이다. 일부 구현예에서, 이량체는 다중특이적 폴리펩티드의 2개의 폴리펩티드가 동일한 동종이량체이다. 다른 경우, Fc 영역은 상이한 폴리펩티드가 이종이량체를 생성하기 위해 이량체화될 수 있는 이종이량체화를 촉진하기 위해 돌연변이 또는 변형된 Fc 도메인에 의해 형성된다. 따라서, 일부 구현예에서, 이량체는 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 2개의 폴리펩티드 사슬이 상이한 이종이량체이다. 이종이량체화를 촉진하기 위한 예시적인 변형은 공지되어 있으며, 하기 기재된 바와 같은 임의의 것을 포함한다.

[0190] 일반적으로, Fc 영역은 면역글로불린의 주요 기능인, 항원-결합 능력 이외에 보체-의존적 세포독성 (CDC) 및 항체-의존적 세포의 세포독성 (ADCC)과 같은 효과기 기능을 담당한다. 추가로, Fc 영역에 존재하는 FcRn 서열은 생체 내 (*in vivo*) FcRn 수용체와의 결합에 의해 생체 내 (*in vivo*) 반감기를 증가시킴으로써 혈청에서 IgG 수준을 조절하는 역할을 한다. 일부 구현예에서, 이러한 기능은 제공된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트와 함께 사용하기 위해 Fc 영역에서 감소 또는 향상과 같이 변경될 수 있다.

[0191] 일부 구현예에서, 제공된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 Fc 영역은 하나 이상의 효과기 기능을 나타낸다. 일부 경우에, Fc 영역은, 예를 들어, ADCC (예를 들어, NK 세포에 의한 그랜자임 B의 방출), ADCP, 및/또는 CDC와 같은 Fc-매개 효과기 기능을 제공할 수 있다. 따라서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트가 절단가능한 링커를 함유하는 일부 구현예에서, 링커의 절단은 각각 생물학적 활성을 갖는 2개의 구성요소를 생성할 수 있다: T 세포 상의 CD3에 결합 및 관여(engage)할 수 있는 CD3-결합 영역 및 표적-특이적 효과기 기능을 나타낼 수 있는 TAA-항원 결합 도메인에 연결된 Fc 영역.

[0192] 일부 구현예에서, Fc 영역은 하나 이상의 효과기 기능을 변경하기 위해 돌연변이 또는 변형된 Fc 폴리펩티드를 포함한다. 효과기 기능을 감소시키는 것과 같은 변경을 위한 Fc 폴리펩티드에 대한 돌연변이의 다양한 예는 공지되어 있으며, 하기 기재된 바와 같은 임의의 것을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 영역에서의 아미노산 치환에 대한 언급은, 특정 서열번호에 대한 언급과 함께 기재되지 않는 한, 카밧 (Kabat)에 의한 EU 번호매김에 의한 것이다. EU 번호매김은 공지되어 있으며, 가장 최근에 업데이트된 IMGT 과학 차트 (IMGT®, international ImMunoGeneTics information system®, http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html (생성: 2001년 05월 17일, 마지막 업데이트: 2013년 01월 10일) 및 Kabat E.A. 등의 Sequences of Proteins of Immunological interest. 5th ed. US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242 (1991)에 보고된 바와 같은 EU 지표에 따른다.

[0193] 일부 구현예에서, 감소된 효과기 기능을 나타내는 Fc 영역을 함유하는 제공된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 제한된 CD3 결합이 요구되는 적용에 대해 바람직한 후보일 수 있으나, 특정 효과기 기능 (CDC 및 ADCC와 같은)은 불필요하거나 유해하다..생체 외 (*in vitro*) 및/또는 생체 내 (*in vivo*) 세포독성 어세이는 CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인하기 위해 수행될 수 있다. 예를 들어, Fc 수용체 (FcR) 결합 어세이는 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트 및/또는 절단된 이의 구성요소가 FcγR 결합이 결여되지만 (따라서, ADCC 활성이 결여될 수 있음), FcRn 결합 능력은 유지하도록 하기 위해 수행될 수 있다. ADCC, NK 세포를 매개하기 위한 1차 세포는 FcγRIII만을 발현하지만, 단핵구는 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII를 발현한다. 관심있는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 생체 외 (*in vitro*) 어세이의 비-제한적인 예는 미국특허번호 제5,500,362호 (예를 들어 Hellstrom, I. 등의 *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)을 참고한다) 및 Hellstrom, I 등의

Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); 미국특허번호 제5,821,337호 (Bruggemann, M. 등의 *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)을 참고한다)에 기재되어 있다. 다르게는, 비-방사성 어세이 방법이 적용될 수 있다 (예를 들어, 유세포 분석을 위한 ACTI™ 비-방사성 세포독성 어세이 (CellTechnology, Inc. 캘리포니아, 마운틴뷰; 및 CytoTox 96™ 비-방사성 세포독성 어세이 (Promega, 위스콘신, 매디슨)을 참고한다). 이러한 어세이에 유용한 효과기 세포는 말초혈액단핵세포 (PBMC) 및 자연 살해 (NK) 세포를 포함한다. 다르게는, 또는 추가적으로, 관심있는 분자의 ADCC 활성은 생체 내 (*in vivo*), 예를 들어, Clynes 등의 *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998)에 기재된 바와 같은 동물모델에서 평가될 수 있다. C1q 결합 어세이 또한 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트 또는 절단된 이의 구성요소가 C1q에 결합할 수 없고 이에 따라 CDC 활성이 결여되어 있다는 것을 확인하기 위해 수행될 수 있다. 예를 들어, WO 2006/029879호 및 WO 2005/100402의 C1q 및 C3c 결합 ELISA를 참고한다. 보체 활성을 평가하기 위해, CDC 어세이가 수행될 수 있다 (예를 들어, Gazzano-Santoro 등의 *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M. S. 등의 *Blood* 101:1045-1052 (2003); 및 Cragg, M. S. 및 M. J. Glennie의 *Blood* 103:2738-2743 (2004)을 참고한다). FcRn 결합 및 생체 내 (*in vivo*) 클리어런스/반감기 결정은 또한 당해 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 수행될 수 있다 (예를 들어, Petkova, S. B. 등의 *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)을 참고한다).

[0194] 일부 구현예에서, 면역글로불린 Fc 영역 또는 면역학적으로 활성인 이의 단편은 IgG 이소타입이다. 예를 들어, 융합 단백질의 면역글로불린 Fc 영역은 인간 IgG1 이소타입이며, 다음의 아미노산 서열을 갖는다:

PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV

DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP

APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV

EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH

[0195] EALHNHYTQK SLSLSPGK **(서열번호 1)**

[0196] 일부 구현예에서, 면역글로불린 Fc 영역 또는 면역학적으로 활성인 이의 단편은 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 인간 IgG1 폴리펩티드 서열을 포함한다.

[0197] 일부 구현예에서, 인간 IgG1 Fc 영역은 항체-의존 세포의 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체-의존 세포독성 (CDC), 예를 들어, Natsume 등의 2008 Cancer Res, 68(10): 3863-72; Idusogie 등의 2001 J Immunol, 166(4): 2571-5; Moore 등의 2010 mAbs, 2(2): 181-189; Lazar 등의 2006 PNAS, 103(11): 4005-4010, Shields 등의 2001 JBC, 276(9): 6591-6604; Stavenhagen 등의 2007 Cancer Res, 67(18): 8882-8890; Stavenhagen 등의 2008 Advan. Enzyme Regul., 48: 152-164; Alegre 등의 1992 J Immunol, 148: 3461-3468; Reviewed in Kaneko 및 Niwa, 2011 Biodrugs, 25(1):1-11에 기재된 아미노산 변형을 변경하기 위해 변형되며, 이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

[0198] 일부 구현예에서, 인간 IgG1 Fc 영역과 같은 Fc 영역은 ADCC 활성 또는 CDC 활성을 향상시키기 위해 변형된다. ADCC를 향상시키는 돌연변이의 예는, 예를 들어, Ser239Asp 및 Ile332Glu (S239D, I332E)인, Ser239 및 Ile332에서의 변형을 포함한다. CDC를 향상시키는 돌연변이의 예는, Lys326 및 Glu333에서의 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 이들 위치 중 하나 또는 둘 다에서, 예를 들어, 카밧 번호매김 시스템을 이용한 Lys326Ala 및/또는 Glu333Ala (K326A 및 E333A)으로 변형된다.

[0199] 일부 구현예에서, 본 발명의 인간 IgG1 Fc 영역 융합 단백질은 N297에서의 N-연결 글리칸-사슬에 결합된 푸코오스가 결여되어 있거나 이를 감소시킨다. FUT8 결핍 세포주에서의 생산; 포유동물 세포 배양 배지에 대한 부가 억제제, 예를 들어, 카스타노스페르민; 및 생산 세포주의 대사를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 푸코실화를 방지하는 수많은 방법이 있다. 일부 구현예에서, 인간 IgG1 Fc 영역은 융합 단백질의 글리코실화를 방지하기 위해, 예를 들어, Asn297Ala (N297A) 또는 Asn297Asp (N297D)와 같이 아미노산 Asn297에서 변형된다.

[0200] 일부 구현예에서, 융합 단백질의 Fc 영역은 Fc 수용체 결합을 감소시키기 위해 다음의 위치 중 하나 이상에서 변경된다: Leu 234 (L234), Leu235 (L235), Asp265 (D265), Asp270 (D270), Ser298 (S298), Asn297 (N297), Asn325 (N325) orAla327 (A327). 예를 들어, Leu 234Ala (L234A), Leu235Ala (L235A), Asp265Asn (D265N), Asp270Asn (D270N), Ser298Asn (S298N), Asn297Ala (N297A), Asn325Glu (N325E) orAla327Ser (A327S). 일부 구현예에서, 융합 단백질의 Fc 영역은 Fc 수용체 상호작용을 변경하기 위해, 예를 들어 Leu235Glu (L235E) 또는

Leu235Ala (L235A)과 같이, 아미노산 Leu235 (상기 서열번호 1에서 박스표시 됨, 카밧 번호매김)에서 변형된다. 일부 구현예에서, 융합 단백질의 Fc 영역은 Fc 수용체 상호작용을 변경하기 위해 아미노산 Leu234 (상기 서열번호 1에서 박스표시 됨, 카밧 번호매김)에서, 예를 들어, Leu234Ala (L234A)와 같이 변형된다. 일부 구현예에서, 융합 단백질의 Fc 영역은 아미노산 234 및 235 둘 다에서, 예를 들어, Leu234Ala 및 Leu235Ala (L234A/L235A) 또는 Leu234Val 및 Leu235Ala (L234V/L235A)과 같이 변경된다. 바람직한 구현예에서, Fc 영역 내 변형은 Fc-수용체-감마 수용체에 대한 결함을 감소시키면서 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 결합에 최소한의 영향을 미친다.

[0201] 일부 구현예에서, 인간 IgG Fc 영역은 FcRn 결합을 향상시키기 위해 변형된다. FcRn에 대한 결합을 향상시키는 Fc 돌연변이의 예는 Met252Tyr, Ser254Thr, Thr256Glu (각각 M252Y, S254T, T256E) (카밧 번호매김, Dall'Acqua 등의 2006, *J. Biol Chem* Vol. 281(33) 23514-23524), Met428Leu 및 Asn434Ser (M428L, N434S) (Zalevsky 등의 2010 *Nature Biotech*, Vol. 28(2) 157-159) (EU index of *Kabat* 등의 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*의 EU 지수). 일부 구현예에서, 돌연변이 또는 변형된 Fc 폴리펩티드는 다음의 돌연변이를 포함한다: 카밧 번호매김 시스템을 사용한 Met252Tyr 및 Met428Leu 또는 Met252Tyr 및 Met428Val (M252Y, M428L, 또는 M252Y, M428V).

[0202] 일부 구현예에서, 융합 단백질의 Fc 영역은 Fc 수용체 결합을 감소시키기 위해 다음의 위치 중 하나 이상에서 아미노산이 결여되어 있다: Glu233 (E233), Leu234 (L234), 또는 Leu235 (L235). 이들 구현예에서, 이러한 3개의 아미노산의 Fc 결실은 보체 단백질 C1q 결합을 감소시킨다.

PAPGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV
EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI
EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE
SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL
HNHYTQKSLS LSPGK **(서열번호 2)**

[0203]

[0204] 일부 구현예에서, 융합 단백질의 Fc 영역은 Fc 수용체 결합을 감소시키기 위해 Gly236 (상기 서열번호 1에서 박스표시 됨)에서 변형된다. 예를 들어, Gly236은 융합 단백딜로부터 결실된다. 일부 구현예에서, 인간 IgG1 Fc 영역은 CD32A와의 상호작용을 향상시키기 위해 아미노산 Gly236에서, 예를 들어, Gly236Ala (G236A)와 같이 변형된다.

[0205] 일부 구현예에서, 인간 IgG1 Fc 영역은 Lys447 (*Kabat* 등의 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*의 EU 지수)이 결여되어 있다.

[0206] 일부 구현예에서, 융합 또는 면역학적으로 활성인 이의 단편은 서열번호 2의 아미노산 서열과 적어도 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 인간 IgG2 폴리펩티드 서열을 포함한다.

[0207] 일부 구현예에서, 융합 단백질의 면역글로불린 Fc 영역 또는 면역학적으로 활성인 단편은 다음의 아미노산 서열을 갖는, 인간 IgG2 이소타입이다:

PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE
WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPGK **(서열번호 3)**

[0208]

[0209] 일부 구현예에서, 융합 또는 면역학적으로 활성인 이의 단편은 서열번호 3의 아미노산 서열과 적어도 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 인간 IgG2 폴리펩티드 서열을 포함한다.

[0210] 일부 구현예에서, 인간 IgG2 Fc 영역은 항체의 글리코실화를 방지하기 위해, 예를 들어, Asn297Ala (N297A) 또

는 Asn297Asp (N297D)와 같이 아미노산 Asn297 (박스표시됨)에서 변현된다. 일부 구현예에서, 인간 IgG2 Fc 영역은 Lys447 (*Kabat* 등의 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*의 EU 지수)이 결여되어 있다.

[0211] 일부 구현예에서, 융합 단백질의 면역글로불린 Fc 영역 또는 면역학적으로 활성인 단편은 다음의 아미노산 서열을 갖는 인간 IgG3 이소타입이다:

PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFKWYV
DGVEVHNAKT KPREEQYNST FRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
APIEKTISKT KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
EWESSGQPEN NYNTTPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNIFSCSVMH

[0212] EALHNRFTQK SLSLSPGK (서열번호 4)

[0213] 일부 구현예에서, 항체 또는 면역학적으로 활성인 이의 단편은 서열번호 4의 아미노산 서열과 적어도 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 인간 IgG3 폴리펩티드 서열을 포함한다.

[0214] 일부 구현예에서, 인간 IgG3 Fc 영역은 항체의 글리코실화를 방지하기 위해 아미노산 Asn297 (박스표시 됨, 카밧 번호매김)에서, 예를 들어 Asn297Ala (N297A) 또는 Asn297Asp (N297D)와 같이 변형된다. 일부 구현예에서, 인간 IgG3 Fc 영역은 반감기를 연장하기 위해 아미노산 435에서, 예를 들어 Arg435His (R435H)와 같이 변형된다. 일부 구현예에서, 인간 IgG3 Fc 영역은 Lys447 (*Kabat* 등의 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*의 EU 지수)이 결여되어 있다.

[0215] 일부 구현예에서, 융합 단백질의 면역글로불린 Fc 영역 또는 면역학적으로 활성인 단편은 다음의 아미노산 서열을 갖는 인간 IgG4 이소타입이다:

PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV
DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP
SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH

[0216] EALHNHYTQK SLSLSLGK (서열번호 5)

[0217] 일부 구현예에서, 항체 또는 면역학적으로 활성인 이의 단편은 서열번호 5의 아미노산 서열과 적어도 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 인간 IgG4 폴리펩티드 서열을 포함한다.

[0218] 일부 구현예에서, 융합 단백질의 면역글로불린 Fc 영역 또는 면역학적으로 활성인 단편은 다음의 아미노산 서열을 갖는 인간 IgG4 이소타입이다:

PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV
DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP
SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH

EALHNHYTQK SLSLSLGK (서열번호 6)

[0219]

[0220] 일부 구현예에서, 항체 또는 면역학적으로 활성인 이의 단편은 서열번호 6의 아미노산 서열과 적어도 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 인간 IgG4 폴리펩티드 서열을 포함한다.

[0221] 다른 구현예에서, 인간 IgG4 Fc 영역은 Fc 수용체 상호작용을 변경하기 위해 아미노산 235에서, 예를 들어 Leu235Glu (L235E)와 같이 변형된다. 일부 구현예에서, 인간 IgG4 Fc 영역은 항체의 글리코실화를 방지하기 위해 아미노산 Asn297 (박스표시 됨, 카밧 번호매김)에서, 예를 들어 Asn297Ala (N297A) 또는 Asn297Asp (N297

D)와 같이 변형된다. 일부 구현예에서, 인간 IgG4 Fc 영역은 Lys447 (*Kabat* 등의 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*의 EU 지수)이 결여되어 있다.

[0222] 일부 구현예에서, 인간 IgG Fc 영역은 CH3:CH3 경계면 (interface)에서 동종이량체화를 안정화시키기 위해 Ser354에서 Cys (S354C) 및 Tyr349에서 Cys (Y349C)로의 변형 (S354C/Y349C)에 의해 2개의 이황화 결합을 도입함으로써 변형된다.

[0223] 일부 구현예에서, 인간 IgG Fc 영역은 이종이량체화를 유도하기 위해 변형된다. 다양한 방법이 상보적인 Fc 폴리펩티드의 이종이량체화를 촉진하기 위해 공지되어 있으며, 예를 들어 Ridgway 등의, Protein Eng. 9:617-621 (1996); Merchant 등의 Nat. Biotechnol. 16(7): 677-81 (1998); Moore 등의 (2011) MAbs, 3:546-57; Von Kreudenstein 등의 MAbs, (2013) 5:646-54; Gunasekaran 등의 (2010) J. Biol. Chem., 285:19637-46; Leaver-Fay 등의 (2016) Structure, 24:641-51; Ha 등의 (2016) Frontiers in Immunology, 7:1; Davis 등의 (2010) Protein Eng Des Sel, 23:195-202; 공개된 국제 PCT 출원번호 WO 1998/050431호, WO 2009/089004호, WO2011143545호, WO 2014/067011호, WO 2012/058768호, WO2018027025호; 공개된 미국 특허출원번호 US20140363426호, US20150307628호, US20180016354호, US20150239991호; 및 미국특허번호 US5731168호, US7183076호, US9701759호, US9605084호, 및 US9650446호를 참고한다. Fc 사슬의 이종이량체화를 촉진하는 방법은, "노브-인투-홀 (knob-into-hole)" 돌연변이의 세트를 포함하거나 또는 Fc의 정전기적 스티어링 (steering)을 초래하여 상이한 폴리펩티드 사슬 사이의 매력적인 상호작용을 촉진하는 돌연변이를 포함하는 것과 같은, Fc 영역의 돌연변이 유발을 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 이종이량체의 Fc 폴리펩티드는 Fc 이량체 경계면에 걸쳐 전하 극성을 변경하는 돌연변이를 포함하여, 정전기적으로 매치된 Fc 사슬의 공동발현이 적합하고 매력적인 상호작용을 지원함으로써 바람직한 Fc 이종이량체 형성을 촉진하는 반면, 적합하지 않은 밀어내는 전하 상호작용은 원치않는 Fc 동종이량체 형성을 억제한다 (Guneskaran 등의 (2010) JBC, 285: 19637-19646). 세포에서 공동-발현될 때, 사슬 사이의 결합이 가능하지만, 사슬은 전하의 반발로 실질적으로 자가-결합하지 않는다. 이종이량체 Fc를 제작하기 위한 다른 전략은 인간 IgG 및 IgA CH3 도메인 분절을 혼합하여, 상보적인 CH3 이종이량체를 생성하는 것을 포함하며, 이를 SEED Fc로 지칭한다.

[0224] 일부 구현예에서, 이종이량체화를 촉진하기 위해 Fc 이종이량체의 폴리펩티드 둘 다는 쌍을 이루거나 상보적인 아미노산 변형을 함유한다. Fc 융합의 폴리펩티드의 예시적인 쌍의 아미노산 변형은 **표 1**에 기재되어 있다.

표 1

[0225]

이종이량체 Fc의 쌍을 이루는 아미노산	
제1 Fc 폴리펩티드	**제2 Fc 폴리펩티드**
T366W	T366S/L368W/Y407V
T366W/S354C	T366S/L368A/Y407V/Y349C
S364H/F405A	Y349T/Y349F
T350V/L351Y/F405A/Y407V	T350V/T366L/K392L/T394W
K360D/D399M/Y407A	E345R/Q347R/T366V/K409V
K409D/K392D	D399K/E356K
K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
L360E/K409W/Y349C	Q347R/399V/F405T/S354C
K370E/K409W	E357N/D399V/F405T

[0226] 일부 구현예에서, 변형은 제1 및 제2 Fc-함유 폴리펩티드의 복합체화를 촉진하기 위해 돌출부 (protuberance)가 공동 (cavity)에 위치할 수 있도록 돌출부 (노브)를 제1 Fc 폴리펩티드로 도입하고 공동 (홀)을 제2 Fc 폴리펩티드로 도입하는 것을 포함한다. 폴리펩티드에서 돌기 또는 공동을 생성하기 위한 대체 및/또는 변형을 표적하는 아미노산은 전형적으로 제2 폴리펩티드의 경계면에서 하나 이상의 아미노산과 상호작용을 하거나 접촉하는 접점 (interface) 아미노산이다.

[0227] 일부 구현예에서, 돌출부 (홀) 아미노산을 함유하도록 변형된 제1 Fc 폴리펩티드는 천연 또는 본래의 아미노산을 제1 Fc 폴리펩티드의 경계면으로부터 돌출한 적어도 하나의 측면 사슬을 가지는 아미노산으로 대체하는 것을 포함하고, 따라서 제2 폴리펩티드의 인접한 경계면에서 보상 공동 (홀)에 위치할 수 있다. 대부분의 경우, 대체 아미노산은 본래의 아미노산 잔기보다 더 큰 측면 사슬 부피를 갖는 것이다. 통상의 기술자는 돌출부를 생성하기 위한 이상적인 대체 아미노산인지 확인하기 위해 아미노산 잔기의 특성을 결정 및/또는 평가하는 방법을 알고 있다. 일부 구현예에서, 돌출부의 형성을 위한 대체 잔기는 자연 발생한 아미노산 잔기이고, 예를 들어, 아

르기는 (R), 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y), 또는 트립토판 (W)을 포함한다. 일부 예에서, 대체를 위해 확인된 본래의 잔기는 예를 들어, 알라닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 글리신, 세린, 트레오닌, 또는 발린과 같은 작은 측면 사슬을 갖는 아미노산 잔기이다.

[0228] 일부 구현예에서, 공동 (홀)을 함유하도록 변형된 제2 Fc 폴리펩티드는 천연 또는 본래의 아미노산을 제2 폴리펩티드의 경계면으로부터 오목하게 들어간 적어도 하나의 측면 사슬을 갖는 아미노산으로 대체하는 것을 포함하는 것이고, 따라서 제1 폴리펩티드의 경계면으로부터 상응하는 돌출부를 수용할 수 있다. 대부분의 경우, 대체 아미노산은 본래 아미노산 잔기보다 더 작은 측면 사슬 부피를 갖는 것이다. 통상의 기술자는 공동 생성하기 위한 이상적인 대체 아미노산인지 확인하기 위해 아미노산 잔기의 특성을 결정 및/또는 평가하는 방법을 알고 있다. 일반적으로, 공동의 형성을 위한 대체 잔기는 자연 발생한 아미노산이고, 예를 들어 알라닌 (A), 세린 (S), 트레오닌 (T) 및 발린 (V)을 포함한다. 일부 예에서, 대체를 위해 확인된 본래의 아미노산은, 예를 들어, 티로신, 아르기닌, 페닐알라닌, 또는 트립토판과 같은 큰 측면 사슬을 갖는 아미노산이다.

[0229] 인간 IgG1의 CH3 경계면은, 예를 들어, 각각의 표면으로부터 1090 Å2를 매장하는 4개의 역-평행 β-가닥에 위치한 각 도메인 상의 16개의 잔기를 포함한다 (예를 들어, Deisenhofer 등의 (1981) Biochemistry, 20:2361-2370; Miller 등의 (1990) J Mol. Biol., 216, 965-973; Ridgway 등의 (1996) Prot. Engin., 9: 617-621; 미국특허번호 5,731,168호를 참고한다). 돌출부 또는 공동을 생성하기 위한 CH3 도메인의 변형은, 예를 들어, 미국특허번호 5,731,168호; 국제특허출원 WO98/50431호 및 WO 2005/063816호; 및 Ridgway 등의 (1996) Prot. Engin., 9: 617-621에 기재되어 있다. 일부 예에서, 돌기 또는 공동을 생성하기 위한 CH3 도메인의 변형은 전형적으로 2개의 중심 역-평행 β-가닥에 위치한 잔기를 표적으로 한다. 목표는 생성된 돌기가 파트너 CH3 도메인의 보상 공동에 의해 수용되지 않고 주변 용매로 돌출함으로써 수용될 수 있는 위험을 최소화하는 것이다.

[0230] 예를 들어, 일부 구현예에서 이종이량체 Fc는 Thr366에서 CH3 도메인 내 아미노산 변형을 갖는 폴리펩티드를 포함하며, 이는 보다 부피가 큰 아미노산, 예를 들어, Try (T366W)로 대체되었을 때, 위치 Thr366, Leu368, 및 Tyr407에서 부피가 덜 큰 아미노산, 예를 들어, 각각 Ser, Ala 및 Val (T366S/L368A/Y407V)으로의 아미노산 변형을 갖는 제2 CH3 도메인과 우선적으로 쌍을 이룰 수 있다. CH3 변형을 통한 이종이량체화는 이황화결합의 도입, 예를 들어 다른(opposite) CH3 도메인들에서 Ser354에서 Cys (S354C) 및 Tyr349에서 Cys (Y349C)로 변경함으로써 추가로 안정화될 수 있다 (Reviewed in Carter, 2001 Journal of Immunological Methods, 248: 7-15).

[0231] 그 결과 생성된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는, 예를 들어, 단백질 A 또는 단백질 G 컬럼에서 친화성 크로마토그래피와 같은 임의의 적절한 방법으로 정제될 수 있다. 상이한 폴리펩티드를 코딩하는 2개의 핵산분자가 세포로 형질전환되는 경우, 동종- 및 이종이량체의 형성이 발생할 것이다. 이종이량체 형성이 동종이량체 형성보다 유리하도록 발현을 위한 조건을 조정할 수 있다.

[0232] 친화성 시약에 대한 이종이량체의 차별적 친화도를 바탕으로 동종이량체로부터 이종이량체를 회수하는 기술이 공지되어 있다. 일부 측면에서, 이러한 기술은 Fc 폴리펩티드 사슬 중 하나가 친화성 시약 단백질 A에 결합하지 않도록 이종이량체를 설계하는 것을 포함한다. 일부의 경우, 폴리펩티드 사슬 중 하나는 Fc 이종이량체의 폴리펩티드 중 하나에서 단백질 A 시약에 대한 친화성을 제거하거나 감소시키기 위한 하나 이상의 아미노산 치환을 함유할 수 있으며, 예를 들어, WO2017134440호, WO2010151792호, Jendeberg 등의 문헌(Jendeberg 등의 (1997) J. Immunol. Methods, 201(1): 25-34)을 참고한다. 이들 구현예 중 일부에서, Fc 영역은 단백질-A 결합을 방지할 수 있도록 이종이량체의 하나의 멤버의 단백질-A 결합 부위에서 변형되어 이종이량체 융합 단백질의 보다 효율적인 정제를 가능하게 한다. 이 결합 부위 내의 예시적인 변형은, Ile253, 예를 들어 Ile253Arg (I253R)이다. 일부 구현예에서, 변형은 H435R 또는 H435R/Y436F일 수 있다. 일부 구현예에서, Fc 이종이량체의 Fc 폴리펩티드는 단백질 G (pA+/pG-)가 아닌, 단백질 A와 결합할 수 있도록 하는 변형을 함유한다. 예시적인 pA+/pG- 아미노산 변형은 인간 IgG1과 관련하여 428 위치의 세린, 434 위치의 세린, 선택적으로 436 위치의 히스티딘을 함유하거나, 또는 인간 IgG 2, 3, 또는 4에서 상응하는 위치에 이러한 잔기를 포함하는 Fc를 포함한다. 일부 측면에서, 428, 434 위치 및 선택적으로 436 위치에서 하나의 IgG Fc 폴리펩티드에서의 이러한 아미노산 변형은 단백질 G의 결합을 감소 또는 방지하여 단백질의 정제를 향상시킨다.

[0233] 일부 구현예에서, 친화성 시약에 대한 차별적 친화성을 부여하기 위한 임의의 이러한 변형은 전술한 임의의 하나 이상의 다른 아미노산 변형과 조합될 수 있다. 예를 들어, I253R 변형은 T366S/L368A/Y407V 변형 또는 T366W 변형 중 하나와 조합될 수도 있다. T366S/L368A/Y407V 변형 Fc는 T336W 변형 Fc의 경우에서와 같이 이량체화 경계면의 입체적 폐쇄가 없기 때문에 동종이량체를 형성할 수 있다.

[0234] 따라서, 일부 구현예에서, I253R 변형은 T366S/L368A/Y407V 변형 Fc와 조합되어 형성될 수 있는 임의의 동종이

량체 Fc의 정제를 허용하지 않는다. 유사한 변형이 T366S/L368A/Y407V 및 H453R를 조합하여 적용될 수 있다.

[0235] 일부 구현예에서, 이종이량체 분자의 Fc 영역은 전술한 바와 같은 하나 이상의 다른 Fc 돌연변이를 추가적으로 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 이종이량체 분자는 효과기 기능을 감소시키는 돌연변이를 갖는 Fc 영역을 함유한다.

[0236] 일부 구현예에서, 이종이량체 Fc의 하나의 Fc 폴리펩티드는 서열번호 82, 86, 94 또는 96에 기재된 아미노산의 서열을 포함하고, 이종이량체 Fc의 다른 하나의 Fc 폴리펩티드는 서열번호 83, 87, 90, 92, 98 또는 100에 기재된 아미노산의 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 이종이량체 Fc의 하나의 Fc 폴리펩티드는 서열번호 84, 88, 95 또는 97 중 임의의 것에 기재된 아미노산의 서열을 포함하고, 이종이량체 Fc의 다른 하나의 Fc 폴리펩티드는 서열번호 85, 89, 91, 93, 99 또는 101 중 임의의 것에 기재된 아미노산의 서열을 포함한다.

[0237] 일부 구현예에서, 인간 IgG Fc 영역은 이량체화를 방지하기 위해 변형된다. 이들 구현예에서, 본 발명의 융합 단백질은 단량체이다. 예를 들어, Thr366 잔기에서 하전된 잔기로의 변형, 예를 들어, Thr366Lys, Thr366Arg, Thr366Asp, 또는 Thr366Glu (각각 T366K, T366R, T366D, 또는 T366E)는 CH3-CH3 이량체화를 방지한다.

[0238] 일부 구현예에서, 융합 단백질의 Fc 영역은 다음의 위치 중 하나 이상에서 Fc 수용체 결합을 감소시키기 위해 변경된다: Leu 234 (L234), Leu235 (L235), Asp265 (D265), Asp270 (D270), Ser298 (S298), Asn297 (N297), Asn325 (N325) orAla327 (A327). 예를 들어, Leu 234Ala (L234A), Leu235Ala (L235A), Asp265Asn (D265N), Asp270Asn (D270N), Ser298Asn (S298N), Asn297Ala (N297A), Asn325Glu (N325E) 또는 Ala327Ser (A327S). 바람직한 구현예에서, Fc 영역 내 변형은 Fc-수용체-감마 수용체에 대한 결합을 감소시키면서 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 결합에 최소한의 영향을 미친다.

[0239] 일부 구현예에서, 융합 단백질은 면역글로불린 힌지 영역으로부터 유래된 폴리펩티드를 함유한다. 힌지 영역은 임의의 인간 IgG 서브클래스로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 융합 단백질은 EPKSSDKTHTCPPC (서열번호 7)의 서열을 갖는 변형된 IgG1 힌지를 함유할 수 있고, 이때 경쇄의 C-말단 시스테인과 이황화를 형성하는 Cys220에서 세린, 예를 들어, Cys220Ser (C220S)으로 돌연변이된다. 다른 구현예에서, 융합 단백질은 서열 DKTHTCPPC (서열번호 8)를 갖는 절단된 힌지를 함유한다.

[0240] 일부 구현예에서, 융합 단백질은 IgG4로부터의 변형된 힌지를 가지며, 이는 가닥 교환을 방지하거나 감소시키기 위해, 예를 들어, 서열 ESKYGPPCPPC (서열번호 9)를 갖는, Ser228Pro (S228P)와 같이 변형된다. 일부 구현예에서, 융합 단백질은 링커 폴리펩티드를 함유한다. 다른 구현예에서, 융합 단백질은 링커 및 힌지 폴리펩티드를 함유한다.

[0241] ***3. 링커***

[0242] 제공된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 면역글로불린 Fc 영역을 함유하는 제1 구성요소 및 CD3 결합 영역을 함유하는 제2 구성요소를 연결 또는 결합하는 링커를 함유한다. 일부 구현예에서, 링커는 Fc 영역이 CD3 결합 영역에 대한 N-말단이되도록 Fc 영역의 C-말단 영역의 끝에 위치한다. 제공된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 이량체와 같은 다량체이기 때문에, 제공된 컨스트럭트는 제1 Fc 폴리펩티드와 제1 폴리펩티드의 CD3 결합 영역의 제1 도메인 (예를 들어, VH) 및 제2 Fc 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드의 CD3 결합 영역의 제2 도메인 (예를 들어, VL)을 연결하는 링커를 함유한다. 전형적으로, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 제1 및 제2 폴리펩티드에 존재하는 링커는 동일하다. 따라서, 일부 구현예에서, CD3 결합 도메인의 각 도메인은 동일한 링커와 같은 링커를 통해 Fc의 다른 폴리펩티드들, 예컨대 이종이량체 Fc에 연결된다.

[0243] 융합 단백질에 사용하기 위한 다양한 폴리펩티드 링커가 공지되어 있다 (예를 들어, Chen 등의 (2013) Adv. Drug. Deliv. 65:1357-1369; 및 국제 PCT 공개번호 WO 2014/099997호, WO2000/24884호; 미국특허번호 5,258,498호; 미국특허번호 5,525,491호; 미국특허번호 5,525,491호, 미국특허번호 6,132,992호를 참고한다).

[0244] 일부 구현예에서, CD3 결합 영역이 다중특이적 폴리펩티드 접합체의 Fc 영역에 연결될 때, 세포와 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 접촉 시, CD3 결합 영역은 제한되고, 세포, 예를 들어 T 세포의 표면 상의 CD3에 결합 또는 관여할 수 없거나, 실질적으로 결합 또는 관여할 수 없도록, 링커가 선택된다. T 세포 결합, 리포터 시스템을 이용한 NFAT 활성화, 세포용해성 T 세포 활성, 사이토카인 생성 및/또는 T 세포 활성화 마커의 발현을 평가하기 위한 어세이를 포함하는, 다양한 어세이가 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트에 의한 CD3의 결합 또는 관여를 평가하는데 적용될 수 있다. 예시적인 어세이가 제공된 실시예에 제시된다. 전형적으로, 링커는 또한 폴리펩티드 컨스트럭트의 정확한 폴딩을 보장하는 것이고, 연결된 폴리펩티드의 활성 또는 기능과 일치하지 않는 전하를 나타내지 않거나 또는 연결된 폴리펩티드의 활성을 방해하거나 변경하는 하나 이상의 도메인의 아미노산

잔기와 결합 또는 다른 상호작용을 형성하지 않는다. 일부 구현예에서, 링커는 폴리펩티드 링커이다. 폴리펩티드 링커는 유연한 (flexible) 링커 또는 단단한 링커 또는 이 둘의 조합일 수 있다. 일부 측면에서, 링커는 짧거나, 중간 또는 긴 링커이다. 일부 구현예에서, 링커는 최대 40개의 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, 링커는 최대 25개의 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, 링커는 적어도 또는 적어도 약 2개의 아미노산 길이이다. 일부 측면에서, 적합한 길이는, 예를 들어, 적어도 하나 그리고 전형적으로 약 40개의 아미노산 잔기 미만, 예컨대 2-25개의 아미노산 잔기, 5-20개의 아미노산 잔기, 5-15개의 아미노산 잔기, 8-12개의 아미노산이다. 일부 구현예에서, 링커는 2개 또는 약 2개 내지 24개의 아미노산, 2개 내지 20개의 아미노산, 2개 내지 18개의 아미노산, 2개 내지 14개의 아미노산, 2개 내지 12개의 아미노산, 2개 내지 10개의 아미노산, 2개 내지 8개의 아미노산, 2개 내지 6개의 아미노산, 6개 내지 24개의 아미노산, 6개 내지 20개의 아미노산, 6개 내지 18개의 아미노산, 6개 내지 14개의 아미노산, 6개 내지 12개의 아미노산, 6개 내지 10개의 아미노산, 6개 내지 8개의 아미노산, 8개 내지 24개의 아미노산, 8개 내지 20개의 아미노산, 8개 내지 18개의 아미노산, 8개 내지 14개의 아미노산, 8개 내지 12개의 아미노산, 8개 내지 10개의 아미노산, 10개 내지 24개의 아미노산, 10개 내지 20개의 아미노산, 10개 내지 18개의 아미노산, 10개 내지 14개의 아미노산, 10개 내지 12개의 아미노산, 12개 내지 24개의 아미노산, 12개 내지 20개의 아미노산, 12개 내지 18개의 아미노산, 12개 내지 14개의 아미노산, 14개 내지 24개의 아미노산, 14개 내지 20개의 아미노산, 14개 내지 18개의 아미노산, 18개 내지 24개의 아미노산, 18개 내지 20개의 아미노산 또는 20개 내지 24개의 아미노산이다. 일부 구현예에서, 링커는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 아미노산 길이이다.

[0245] 특정 측면에서, 다중특이적 폴리펩티드 접합체가 이의 항원, 예를 들어, TAA에 결합될 때, 링커의 길이가 길어질수록 CD3 결합이 더 커진다. 따라서, 일부 측면에서, 링커는 13, 14, 15, 16, 17 또는 18개 초과의 아미노산 길이와 같이, 12개 초과의 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, 링커는 길이가 12개 내지 40개의 아미노산, 12개 내지 30개의 아미노산, 12개 내지 24개의 아미노산, 12개 내지 18개의 아미노산, 12개 내지 15개의 아미노산, 15개 내지 40개의 아미노산, 15개 내지 30개의 아미노산, 15개 내지 24개의 아미노산, 15개 내지 18개의 아미노산, 18개 내지 40개의 아미노산, 18개 내지 30개의 아미노산, 18개 내지 24개의 아미노산, 24개 내지 40개의 아미노산, 24개 내지 30개의 아미노산 또는 30개 내지 40개의 아미노산이다.

[0246] 링커는 자연-발생, 합성 또는 이 둘의 조합일 수 있다. 특히 적합한 링커 폴리펩티드는 주로 글리신 (Gly), 세린 (Ser), 알라닌 (Ala), 및 트레오닌 (Thr)으로부터 선택되는 아미노산 잔기를 포함한다. 예를 들어, 링커는 적어도 Gly, Ser, Ala, 및 Thr으로부터부터 선택되는 아미노산 잔기의 적어도 80%, 적어도 85%, 또는 적어도 90%와 같이, 적어도 75% (펩티드 링커에 존재하는 총 잔기의 수에 기초하여 계산됨) 함유할 수 있다. 링커는 또한 Gly, Ser, Ala 및/또는 Thr 잔기만으로 이루어질 수 있다. 일부 구현예에서, 링커는 1-25개의 글리신 잔기, 5-20개의 글리신 잔기, 5-15개의 글리신 잔기, 또는 8-12개의 글리신 잔기를 함유한다. 일부 측면에서, 적합한 펩티드 링커는 전형적으로 적어도 75% 글리신 잔기와 같이, 적어도 50% 글리신 잔기를 함유한다. 일부 구현예에서, 펩티드 링커는 글리신 잔기만을 포함한다. 일부 구현예에서, 펩티드 링커는 글리신 및 세린 잔기만을 포함한다.

[0247] 일부 구현예에서, 이러한 링커는 본원에서 GS-링커로 지칭되는, 글리신 및 세린 아미노산으로 주로 구성된다. 일부 구현예에서, 링커는 (GGS)n을 함유하고, 여기서 n은 1 내지 10, 예컨대 1 내지 5, 예를 들어, 1 내지 3이고, 예컨대 GGS(GGS)n (서열번호 171), 여기서 n은 0 내지 10이다. 특정 구현예에서, 링커는 서열 (GGGGS)n (서열번호 173)을 함유하고, 여기서 n은 1 내지 10이거나 n은 1 내지 5, 예컨대 1 내지 3이다. 추가의 구현예에서, 링커는 (GGGGGS)n (서열번호 172)을 함유하고, 여기서 n은 1 내지 4, 예컨대 1 내지 3이다. 링커는 2, 3, 4 또는 5의 반복과 같이 상기 임의의 조합을 포함할 수 있고, GS, GGS, GGGGS, 및/또는 GGGGGS 링커가 조합될 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 링커는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 또는 19개의 아미노산 길이이다.

[0248] 일부 구현예에서, 링커는 (1-문자 아미노산 코드로): GGS, GGGGS (서열번호 149), 또는 GGGGGS (서열번호 135)이다. 일부 구현예에서, GS-링커는 GGSGGS의 아미노산 서열, 즉, $(GGS)_2$ (서열번호 10); GGSGGSGGS, 즉, $(GGS)_3$ (서열번호 11); GGSGGSGGSGGS, 즉, $(GGS)_4$ (서열번호 12); GGSGGSGGSGGSGGS, 즉, $(GGS)_5$ (서열번호 13); GGGGGSGGGGGSGGGGGS, 즉, $(G5S)_3$ (서열번호 119), GGSGGGGSGGGGSGGGGS (서열번호 147) 및 GGGGSGGGGSGGGGS (서열번호 170)를 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 GGGG (서열번호 103)이다. 상기 예 중 일부에서, 세린은 알라닌 (예를 들어, (Gly4Ala) 또는 (Gly3Ala))으로 대체될 수 있다.

[0249] 일부 구현예에서, 링커는 아미노산 서열 $Gly_xXaa\text{-}Gly_y\text{-}Xaa\text{-}Gly_z$ (서열번호 174)를 갖는 펩티드 링커를 포함하고,

여기서 각 Xaa는 독립적으로 알라닌 (Ala), 발린 (Val), 류신 (Leu), 이소류신 (Ile), 메티오닌 (Met), 페닐알라닌 (Phe), 트립토판 (Trp), 프롤린 (Pro), 글리신 (Gly), 세린 (Ser), 트레오닌 (Thr), 시스테엔 (Cys), 티로신 (Tyr), 아스파라긴 (Asn), 글루타민 (Gln), 리신 (Lys), 아르기닌 (Arg), 히스티딘 (His), 아스파르트산 (Asp), 및 글루탐산 (Glu)으로부터 선택되고, 여기서 x, y, 및 z는 각각 1 내지 5의 범위의 정수이다. 일부 구현예에서, 각 Xaa는 독립적으로 Ser, Ala, 및 Thr으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 변이에서, x, y, 및 z 각각은 3과 같고 (이에 의해 아미노산 서열 Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly (서열번호 175)을 갖는 펩티드 링커를 생성함), 여기서 각 Xaa는 상기와 같이 선택된다.

[0250] 일부 구현예에서, 링커는 (SSSSG)y (서열번호 185) 모티프의 반복에 기초한 세린-풍부 링커이고, 여기서 y 적어도 1이지만, y는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 및 9일 수 있다.

[0251] 일부의 경우, 펩티드 링커에 약간의 강도를 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 이는 펩티드 링커의 아미노산 서열에 프롤린 잔기를 포함시킴으로써 성취될 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 링커는 펩티드 링커의 아미노산 서열에 적어도 하나의 프롤린을 포함한다. 예를 들어, 펩티드 링커는 아미노산 잔기의 적어도 25% (예를 들어, 적어도 50% 또는 적어도 75%)가 프롤린 잔기인 아미노산 서열을 가질 수 있다. 하나의 특정 구현예에서, 펩티드 링커는 프롤린 잔기만 포함한다.

[0252] 일부 측면에서, 펩티드 링커는 하나의 시스테인 잔기와 같이, 적어도 하나의 시스테인 잔기를 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 링커는 적어도 하나의 시스테인 잔기와 Gly, Ser, Ala, 및 Thr으로 구성되는 군으로부터 선택되는 잔기를 포함한다. 일부 이러한 구현예에서, 링커는 글리신 잔기 및 시스테인 잔기, 예컨대 글리신 잔기 및 시스테인 잔기만을 포함한다. 전형적으로 펩티드 링커 당 단 하나의 시스테인 잔기만이 포함될 것이다. 시스테인 잔기를 포함하는 특정 링커의 하나의 예는 아미노산 서열 Gly_m-Cys-Gly_n을 갖는 펩티드 링커를 포함하고, 여기서 n과 m은 각각 1-12, 예를 들어, 3-9, 4-8, 또는 4-7의 정수이다. 특정 변형에서, 이러한 펩티드 링커는 아미노산 서열 GGGGG-C-GGGGG (서열번호 177)를 갖는다.

[0253] 일부 구현예에서, 융합 단백질의 링커는 구조적 또는 제한적 링커이다. 특정 구현예에서, 구조적 링커는 서열 (AP)n 또는 (EAAAK)n (서열번호 178)을 함유하고, 여기서 n은 2 내지 20, 바람직하게는 4 내지 10이고, AS-(AP)n-GT (서열번호 179) 또는 AS-(EAAAK)n-GT (서열번호 180)를 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 여기서 n은 2 내지 20, 예컨대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15이다. 다른 구현예에서, 링커는 서열 (GGGGA)n (서열번호 181), (PGGGS)n (서열번호 182), (AGGGS)n (서열번호 183) 또는 GGS-(EGKSSGSGSESKST)n-GGS (서열번호 184)를 포함하고, 여기서 n은 2 내지 20이다. 일부 구현예에서, 링커는 SSSASASSA (서열번호 186), GSPGSPG (서열번호 187), 또는 ATTTGSSPGPT (서열번호 176)이다. 일부 구현예에서, 이러한 링커는 이의 구조로 인해 단백질분해성 분해에 더욱 내성이 있어, 생체 내 (in vivo) 주사 시 이점을 제공할 수 있다.

[0254] 일부 구현예에서, 링커는 소위 비-절단가능한 링커인, 절단가능한 링커가 아니다. 일부 구현예에서, 링커는 프로테아제에 의해 절단될 수 없다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커가 아닌 링커 도는 프로테아제에 의해 절단될 수 없는 링커는 생체 내 (in vivo) 전달 도는 재조합 생산에 일반적으로 안정한 링커이다. 일부 측면에서, 프로테아제에 의해 절단될 수 없는 링커는 바람직하게는 프로테아제의 절단가능한 펩티드 서열 또는 인식 부위 내에 있는 적어도 하나의 펩티드 결합을 함유하지 않는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 비-절단가능한 링커는 프로테아제에 대한 표적 기질이 아니므로, 동일한 프로테아제에 대한 기질 인식 부위를 함유하는 링커와 비교하여 프로테아제에 의해 우선적으로 또는 특이적으로 절단되지 않는다.

[0255] 일부 구현예에서, 링커는 절단가능한 링커이다. 일부 측면에서, 절단가능한 링커는 생리학적 조건 하에서 깨질 수 있는 적어도 하나의 결합의 존재로 인해 프로테아제에 대한 기질인 서열을 포함하는 링커이다. 일부의 경우, 절단가능한 링커는 생체 내 (in vivo)에 존재하는 특정 조건, 예컨대 생체 내 (in vivo)에서 세포 환경에 존재하는 것을 포함하는, 세포외 프로테아제에 노출된 후의 절단에 영향을 받기 쉽거나 민감하다. 일부의 경우, 프로테아제는 종양 미세환경과 같은 특정한 생리학적 미세환경에 존재할 수 있으며, 이에 의해 절단이 발생할 수 있는 부위를 제한한다.

[0256] 프로테아제는 전형적으로 다른 비-표적 기질과 비교하여 특정 표적 기질의 절단에 대한 특이성 또는 선호도를 나타낸다. 이러한 특이성의 정도는 서열, 예를 들어, 링커의 절단 속도 상수에 기초하여 결정될 수 있고, 이는 이의 기질에 대한 프로테아제의 선호도 및 효소의 효율의 척도이다. 기질의 다양한 농도의 존재 시 시간에 따른 절단의 증가 속도를 결정하는 임의의 방법이 특이성 상수를 계산하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 기질은 형광발생 성분에 연결되며, 이는 프로테아제에 의해 절단 시 방출된다. 상이한 프로테아제 농도에서 절단 속도를

결정함으로써, 절단에 대한 특이성 상수 (k_{cat}/K_m)는 특정 링커에 대한 특정 프로테아제에 대해 결정될 수 있다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 약 적어도 $1X10^4$ $M^{-1}S^{-1}$, 또는 적어도 $5X10^4$ $M^{-1}S$, 적어도 $10X10^4$ $M^{-1}S$, 적어도 $10X10^5$ $M^{-1}S$ 또는 그 이상의 속도로 프로테아제에 의해 특이적으로 절단될 수 있는 링커이다.

[0257] *절단가능한 링커*

[0258] 일부 구현예에서, 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 제1 및 제2 구성요소를 연결하는 절단가능한 링커를 포함한다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 프로테아제, 통상 세포외 프로테아제에 대한 기질로 작용할 수 있는 아미노산 서열을 포함한다. 예를 들어, 절단가능한 링커는 바람직하게는 프로테아제의 절단가능한 펩티드 서열 내에 있는 적어도 하나의 펩티드 결합을 함유하는 절단 서열을 포함할 수 있다. 적합한 프로테아제는, 예를 들어, 기질금속단백질분해효소 (MMP), 시스테인 프로테아제, 세린 프로테아제 및 플라스민 활성화제를 포함하며, 이는 류마티스 관절염 또는 암과 같은 질환에서 강화된 방식으로 형성되거나 활성화되어, 과도한 조직 분해, 염증 및 전이를 초래한다. 특정 구현예에서, 프로테아제는 종양, 활성화된 면역 효과기 세포 (예를 들어, T 세포 또는 NK 세포), 또는 종양 미세환경의 세포에 의해 생산되는 프로테아제이다. 일부 구현예에서, 프로테아제는 그랜자임 B, 매트립타아제 또는 MMP-2와 같은 MMP이다.

[0259] 절단가능한 링커는 표적을 발현하는 세포에 근접해 있는 종양에 의해 생산되고/되거나 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 바람직한 표적으로 조직에서 공동-국소화된 종양에 의해 생산되는 프로테아제에 기초하여 선택될 수 있다. 다수의 암, 예를 들어, 고형 종양에서 공지된 기질을 갖는 증가된 수준의 프로테아제에 대한 문헌에 보고가 있다. 예를 들어, La Rocca 등의 (2004) British J. of Cancer 90(7): 1414-1421을 참고한다.

[0260] 일부 구현예에서, 제1 및 제2 구성요소 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트를 연결하는 절단가능한 링커는 구성요소 중 하나에 의해 활성화되는 면역 효과기 세포에 의해 생성된 프로테아제에 의해 절단된다. 예를 들어, 효과기 가능 또는 강화된 IgG Fc 영역을 포함하는 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트 표적 항원과 관계될 때 ADCC를 유도할 수 있다. ADCC에 대한 중심은 효과기 세포, 즉, NK 세포 및 세포독성 T-세포로부터 그랜자임 B와 퍼포린의 방출이다. 방출 시 그랜자임 B는 아폽토시스를 매개하는 퍼포린 의존 방식으로 표적 세포로 진입한다. 중요하게, 그랜자임 B는 효과기 세포와 표적 세포 사이의 세포외 시냅스 내에서 활성이다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 구성요소 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트를 연결하는 절단가능한 링커는 그랜자임 B에 의해 절단된다. 그랜자임 B는 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 구성요소 중 하나에 의해 매개되는 효과기 세포 활성화 동안 방출된다. 일부 구현예에서, 그랜자임 B와 다른 프로테아제는 활성화된 T 세포 또는 NK 세포를 포함하는, 면역 효과기 세포에 의해 생산될 수 있다. 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트에 의한 TAA의 결합 시 CD3 관여에 의한 T 세포의 활성화는 이러한 프로테아제를 방출할 수 있고, 그런 다음 이는 특이적 절단가능한 링커를 절단할 수 있으며, 이에 의해 CD3 결합 분자의 활성을 강화 또는 증가시켜 CD3에 관여한다. 일부 구현예에서, 절단은 비절단 상태에서 TAA에 결합될 때 다중특이적 컨스트럭트에 의해 달성되는 활성을 증폭 또는 증가시킬 수 있다.

[0261] 예시적인 기질은 다음의 효소 또는 프로테아제 중 하나 이상에 의해 절단가능한 기질을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다: ADAMS, ADAMTS, 예를 들어, ADAM8; ADAM9; ADAM10; ADAM12; ADAM15; ADAM17/TACE; ADAMDEC1; ADAMTS1; ADAMTS4; ADAMTS5; 아스파르트산 프로테아제, 예를 들어, BACE 또는 레닌; 아스파르트산 카텝신 (aspartic cathepsin), 예를 들어, 카텝신 D 또는 카텝신 E; 카스파아제, 예를 들어, 카스파아제 1, 카스파아제 2, 카스파아제 3, 카스파아제 4, 카스파아제 5, 카스파아제 6, 카스파아제 7, 카스파아제 8, 카스파아제 9, 카스파아제 10, 또는 카스파아제 14; 시스테인 카텝신, 예를 들어, 카텝신 B, 카텝신 C, 카텝신 K, 카텝신 L, 카텝신 S, 카텝신 V/L2, 카텝신 X/Z/P; 시스테인 프로테이나아제, 예를 들어, 크루지페인 (Cruzipain); 레구메인 (Legumain); 오투베인-2 (Otubain-2); KLK, 예를 들어, KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK10, KLK11, KLK13, 또는 KLK14; 금속단백분해효소, 예를 들어, 메프린; 네프릴리신; PSMA; BMP-1; MMP, 예를 들어, MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9, MMP10, MMP11, MMP12, MMP13, MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP19, MMP20, MMP23, MMP24, MMP26, 또는 MMP27, 세린 프로테아제, 예를 들어, 활성화된 단백질 C, 카텝신 A, 카텝신 G, 키마아제, 응고 인자 프로테아제 (예를 들어, FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa), 엘라스타아제, 그랜자임 B, 구아니디노벤조에이타아제 (Guanidinobenzoatase), HtrA1, 인간 호중성 엘라스타아제, 락토페린, 마랍신, NS3/4A, PACE4, 플라스민, PSA, tPA, 트롬빈, 트립타아제, uPA; 제II형 트랜스멤브레인 세린 프로테아제 (TTSPs), 예를 들어, DESC1, DPP-4, FAP, 헵신, 매트립타아제-2, 매트립타아제, TMPRSS2, TMPRSS3, 또는 TMPRSS4; 및 이의 임의의 조합.

[0262] 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 다중 프로테아제, 예를 들어, 2개 또는 그 이상의 프로테아제, 3개 또는 그 이상의 프로테아제, 4개 또는 그 이상의 프로테아제 등에 의해 절단된다.

[0263] 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 특이적 프로테아제, 예를 들어 표적을 발현하는 세포에 근접해 있는 종양에 의해 생산되고/되거나 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 표적으로 공동-국소화된 종양에 의해 생산되는 것으로 공지된 프로테아제와 함께 사용하기 위해 선택된다.

[0264] 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 특정 프로테아제에 대한 기질 인식 부위 또는 절단 부위를 함유하며, 이는 프로테아제에 의해 절단되는 프로테아제의 활성 부위에 의해 인식되는 서열이다. 전형적으로, 예를 들어, 세린 프로테아제의 경우, 절단가능한 서열은 기질에서 P1-P4 및 P1'-P4' 아미노산으로 구성되며, 여기서 절단은 P1 위치 이후에 발생한다. 전형적으로, 세린 프로테아제에 대한 절단 서열은 많은 프로테아제의 연장된 기질 특이성과 매치시키기 위한 길이는 6개의 잔기이지만, 프로테아제에 따라 더 길거나 더 짧을 수 있다. 전형적으로, 절단가능한 링커는 프로테아제에 의해 인식되는 P1-P1′ 자를 수 있는 결합 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 절단가능한 링커는 특정 프로테아제에 의해, 예를 들어, 프로테아제의 기질 인식 부위 서열 또는 절단가능한 서열을 도입함으로써, 절단될 수 있는 펩티드 결합을 도입하도록 조작된다.

[0265] 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 2개 이상의 기질 서열의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 각 기질 서열은 동일한 프로테아제에 의해 절단된다. 일부 구현예에서, 기질 서열 중 적어도 2개는 상이한 프로테아제에 의해 절단된다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 그랜자임 B에 대한 기질인 아미노산을 포함한다. 일부 구현예에서, 그랜자임 B 절단가능한 링커는 일반식 P4 P3 P2 P1↓ P1' (서열번호 150)를 갖는 아미노산 서열을 함유하고, 여기서 P4는 아미노산 I, L, Y, M, F, V, 또는 A이고; P3은 아미노산 A, G, S, V, E, D, Q, N, 또는 Y이며; P2는 아미노산 H, P, A, V, G, S, 또는 T이고; P1은 아미노산 D 또는 E이며; 그리고 P1'는 아미노산 I, L, Y, M, F, V, T, S, G 또는 A이다. 일부 구현예에서, 그랜자임 B 절단가능한 링커는 일반식 P4 P3 P2 P1↓ P1' (서열번호 151)를 갖는 아미노산 서열을 함유하고, 여기서 P4는 아미노산 I 또는 L이고; P3은 아미노산 E이며; P2는 아미노산 P 또는 A이고; P1은 아미노산 D이며; 그리고 P1'는 아미노산 I, V, T, S, 또는 G이다.

[0266] 일부 구현예에서, 그랜자임 B에 대한 기질은 아미노산 서열 LEAD (서열번호 22), LEPG (서열번호 142), 또는 LEAE (서열번호 143)을 포함한다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 아미노산 서열을 함유하며, 절단가능한 링커는 아미노산 서열 IEPDI (서열번호 136), LEPDG (서열번호 152), LEADT (서열번호 137), IEPDG (서열번호 138), IEPDV (서열번호 139), IEPDS (서열번호 140), IEPDT (서열번호 141), IEPDP (서열번호 144), LEPDG (서열번호 152) 또는 LEADG (서열번호 153)을 포함한다.

[0267] 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 매트립타아제에 대한 기질인 아미노산을 포함한다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 서열 P4QAR↓(A/V) (서열번호 154)을 포함하고, 여기서 P4는 임의의 아미노산이다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 서열 RQAR(A/V) (서열번호 155)을 포함한다. 일부 구현예에서, 매트립타아제에 대한 기질은 아미노산 서열 RQAR (서열번호 23)을 포함한다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 아미노산 서열 RQARV (서열번호 156)를 포함한다.

[0268] 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 하나 이상의 기질금속단백질분해효소 (MMP)에 대한 기질인 아미노산을 포함한다. 일부 구현예에서, MMP는 MMP-2이다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 일반식 P3 P2 P1↓ P1' (서열번호 157)를 함유하고, 여기서 P3은 P, V 또는 A이고; P2는 Q 또는 D이며; P1은 A 또는 N이고; 그리고 P1'는 L, I 또는 M이다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 일반식 P3 P2 P1↓ P1' (서열번호 158)을 함유하고, 여기서 P3은 P이고; P2는 Q 또는 D이며; P1은 A 또는 N이고; 그리고 P1'는 L 또는 I이다. 일부에서, MMP에 대한 기질은 아미노산 서열 PAGL (서열번호 24)를 포함한다.

[0269] 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 그랜자임 B에 대한 기질인 아미노산 서열 및 매트립타아제에 대한 기질인 아미노산 서열의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 아미노산 서열 LEAD (서열번호 22) 및 아미노산 서열 RQAR (서열번호 23)의 조합을 포함한다.

[0270] 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 그랜자임 B에 대한 기질인 아미노산 서열 및 MMP에 대한 기질인 아미노산 서열의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 아미노산 서열 LEAD (서열번호 22) 및 아미노산 서열 PAGL (서열번호 24)의 조합을 포함한다.

[0271] 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 매트립타아제에 대한 기질인 아미노산 서열 및 MMP에 대한 기질인 아미노산 서열의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 아미노산 서열 RQAR (서열번호 23) 및 아미노산 서열 PAGL (서열번호 24)의 조합을 포함한다.

[0272] 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 그랜자임 B에 대한 기질인 아미노산 서열, 매트립타아제에 대한 기질인 아미노산 서열, 및 MMP에 대한 기질인 아미노산 서열의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 그랜자임 B에 대한 기질인 아미노산 서열, MMP에 대한 기질인 아미노산 서열의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 아미노산 서열 LEAD (서열번호 22), 아미노산 서열 RQAR (서열번호 23), 및 아미노산 서열 PAGL (서열번호 24)의 조합을 포함한다.

[0273] 절단가능한 링커는 임의의 공지된 링커를 포함할 수 있다. 절단가능한 링커의 예는 Be'liveau 등의 (2009) FEBS Journal, 276; 미국 공개 출원번호 US20160194399호; US20150079088호; US20170204139호; US20160289324호; US20160122425호; US20150087810호; US20170081397호; 미국특허번호 US9644016호에 기재되어 있다.

[0274] 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 TGLEADGSPAGLGRQARVG (서열번호 25); TGLEADGSRQARVGPAGLG (서열번호 26); TGSPAGLEADGSRQARVGS (서열번호 27); TGPAGLGLEADGSRQARVG (서열번호 28); TGRQARVGLEADGSPAGLG (서열번호 29); TGSRQARVGPAGLEADGS (서열번호 30); 및 TGPAGLGSRQARVGLEADGS (서열번호 31); GPAGLGLEPDGSRQARVG (서열번호 104); GGSGGGGIEPDIGGSGGS (서열번호 105); GGSGGGGLEADTGGSGGS (서열번호 106); GSIEPDIGS (서열번호 107); GSLEADTGS (서열번호 108); GGSGGGGIEPDGGGSGGS (서열번호 109); GGSGGGGIEPDVGGSGGS (서열번호 110); GGSGGGGIEPDSGGSGGS (서열번호 111); GGSGGGGIEPDTGGSGGS (서열번호 112); GGGSLEPDGSGS (서열번호 113); 및 GPAGLGLEADGSRQARVG (서열번호 114), GGEGGGGSGGSGGGS (서열번호 115); GSSAGSEAGGSGQAGVGS (서열번호 116); GGSGGGGLEAEGSGGGGS (서열번호 117); GGSGGGGIEPDPGGSGGS(서열번호 118); TGGSGGGGIEPDIGGSGGS (서열번호 148)로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0275] ***4. 항원 결합 도메인:***

[0276] 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 적어도 하나의 항원 결합 도메인, 예컨대 적어도 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인을 포함한다. 일부 측면에서, 항원 결합 도메인, 또는 항원 결합 도메인 각각은 독립적으로 항체 또는 항원 결합 단편, 천연 동족 결합 파트너, 안티칼린 (조작된 리포칼린), 다르핀 (Darpin), 피노머, 센티린 (조작된 피브로네티신 (fibroneticin) III 도메인), 시스틴-노트 (knot) 도메인, 아필린, 아피바디, 또는 조작된 CH3 도메인으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 천연의 동족 결합 파트너는 TAA의 천연 동족 결합 파트너의 세포외 도메인 또는 이의 결합 단편, 또는 TAA에 대한 결합 활성을 나타내는 이의 변이체를 포함한다.

[0277] 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인, 또는 제1 항원-결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인과 같은 항원 결합 도메인 각각은 독립적으로 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 하나 이상의 카피를 포함한다. 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인 또는 제1 항원-결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인과 같은 항원 결합 도메인 각각은 독립적으로 Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편, Fv 단편, scFv, scAb, dAb, 단일 도메인 중쇄 항체, 및 단일 도메인 경쇄 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 하나 이상의 카피를 포함한다. 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인 또는 제1 항원-결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인과 같은 항원 결합 도메인 각각은 독립적으로 하나 이상의 단일 도메인 항체 (sdAb) 단편, 예를 들어 V_HH, V_{NAR}, 조작된 V_H 또는 V_K 도메인을 포함한다. V_HH는 천연 낙타 중쇄 전용 항체, 중쇄 전용 항체를 생성하는 유전적으로 변형된 설치류, 또는 나이브/합성 낙타 또는 인간화 낙타 단일 도메인 항체 라이브러리로부터 제작될 수 있다. V_{NAR}은 연골 어류 중쇄 전용 항체로부터 제작될 수 있다. 인터페이스 공학 및 특정 생식계열 패밀리의 선택을 포함하는, 통상적으로 이종이량체 V_H 및 V_K 도메인으로부터 단량체 sdAb를 제조하기 위한 다양한 방법이 구현되었다. 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인 또는 다중특이적 폴리펩티트 컨스트럭트의 제1 항원-결합 도메인 및/또는 제2 항원 결합 도메인과 같은 각각의 항원 결합 도메인은 독립적으로 FAB 또는 scFv로서 조립된 VH 및 VL 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 항원 결합 도메인 또는 제1 항원-결합 도메인 및/또는 제2 항원 결합 도메인과 같은 항원 결합 도메인 각각은 독립적으로 단일 도메인 항체 (sdAb)로 결합 도메인을 함유한다.

[0278] 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인, 또는 항원 결합 도메인 각각은 독립적으로 TAA의 천연 동족의 결합 파트너의 세포외 도메인 또는 이의 결합 단편, 또는 TAA에 대한 결합 활성을 나타내는 이의 변이체이거나, 이를 포함한다.

[0279] 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인 또는 제1 항원-결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인과 같은 항원 결합 도메인 각각은 독립적으로 동일한 항원에 결합한다. 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인 또는 제1 항원-결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인과 같은 항원 결합 도메인 각각은 독립적으로 상이한 항원에 결합한다. 일부 구현예

에서, 항원 결합 도메인 또는 제1 항원-결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인과 같은 항원 결합 도메인 각각은 독립적으로 동일한 종양 관련 항원 (TAA)에 결합한다. 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인 또는 제1 항원-결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인과 같은 항원 결합 도메인 각각은 독립적으로 상이한 TAA에 결합한다. 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인 또는 제1 항원-결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인과 같은 항원 결합 도메인 각각은 독립적으로 동일한 TAA 상의 상이한 에피토프에 결합한다. 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인 또는 제1 항원-결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인과 같은 항원 결합 도메인 각각은 독립적으로 동일한 TAA 상의 동일한 에피토프에 결합한다.

[0280] 일부 구현예에서, TAA에 결합하는 항원 결합 도메인, 또는 항원 결합 도메인 각각은 독립적으로 TAA에 대한 1가, 2가, 3가, 또는 4가 결합을 야기한다.

[0281] 일부 구현예에서, TAA는 1-92-LFA-3, 5T4, 알파-4 인테그린, 알파-V 인테그린, 알파4베타1 인테그린, 알파4베타7 인테그린, AGR2, 항-루이스-Y, 아펠린 J 수용체, APRIL, B7-H3, B7-H4, BAFF, BTLA, C5 보체, C-242, CA9, CA19-9, (루이스 a), 탄산무수화효소 9, CD2, CD3, CD6, CD9, CD11a, CD19, CD20, CD22, CD24, CD25, CD27, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD40L, CD41, CD44, CD44v6, CD47, CD51, CD52, CD56, CD64, CD70, CD71, CD74, CD80, CD81, CD86, CD95, CD117, CD123, CD125, CD132, (IL-2RG), CD133, CD137, CD138, CD166, CD172A, CD248, CDH6, CEACAM5 (CEA), CEACAM6 (NCA-90), CLAUDIN-3, CLAUDIN-4, cMet, 콜라겐, 크립토, CSFR, CSFR-1, CTLA-4, CTGF, CXCL10, CXCL13, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CYR61, DL44, DLK1, DLL3, DLL4, DPP-4, DSG1, EDA, EDB, EGFR, EGFRviii, 엔도텔린 B 수용체 (ETBR), ENPP3, EpCAM, EPHA2, EPHB2, ERBB3, RSV의 F 단백질, FAP, FGF-2, FGF8, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT-3, 엽산 수용체 알파 (FRα), GAL3ST1, G-CSF, G-CSFR, GD2, GITR, GLUT1, GLUT4, GM-CSF, GM-CSFR, GP IIb/IIIa 수용체, Gp130, GPIIB/IIIA, GPNMB, GRP78, HER2/neu, HER3, HER4, HGF, hGH, HVEM, 히알루로니다아제, ICOS, IFN알파, IFN베타, IFN감마, IgE, IgE 수용체 (FceRI), IGF, IGF1R, IL1B, IL1R, IL2, IL11, IL12, IL12p40, IL-12R, IL-12R베타1, IL13, IL13R, IL15, IL17, IL18, IL21, IL23, IL23R, IL27/IL27R (wsx1), IL29, IL-31R, IL31/IL31R, IL2R, IL4, IL4R, IL6, IL6R, 인슐린 수용체, 재기드 리간드, 재기드 1, 재기드 2, KISS1-R, LAG-3, LIF-R, 루이스 X, LIGHT, LRP4, LRRC26, Ly6G6D, LyPD1, MCSP, 메소텔린, MRP4, MUC1, 뮤신-16 (MUC16, CA-125), Na/K ATPase, NGF, 니카스트린, 노치 수용체, 노치 1, 노치 2, 노치 3, 노치 4, NOV, OSM-R, OX-40, PAR2, PDGF-AA, PDGF-BB, PDGFR알파, PDGFR베타, PD-1, PD-L1, PD-L2, 포스파티딜-세린, P1GF, PSCA, PSMA, PSGR, RAAG12, RAGE, SLC44A4, 스핑고신 1 포스페이트, STEAP1, STEAP2, TAG-72, TAPA1, TEM-8, TGF베타, TIGIT, TIM-3, TLR2, TLR4, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TMEM31, TNF알파, TNFR, TNFRS12A, TRAIL-R1, TRAIL-R2, 트랜스페린, 트랜스페린 수용체, TRK-A, TRK-B, uPAR, VAP1, VCAM-1, VEGF, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, VISTA, WISP-1, WISP-2, 및 WISP-3으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0282] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 항원 결합 도메인, 또는 항원 결합 도메인 각각은 독립적으로 종양 관련 항원 (TAA) 엽산 수용체 알파 (FRα)에 결합한다. 예를 들어, 항원 결합 도메인은 FRα에 결합하는 sdAb로 결합 도메인을 함유한다. 예시적인 FRα-결합 sdAb는 서열번호 120, 121, 및 122에 기재되어 있다.

[0283] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 항원 결합 도메인, 또는 항원 결합 도메인 각각은 독립적으로 종양 관련 항원 (TAA) cMET에 결합한다. 예를 들어, 항원 결합 도메인은 cMET에 결합하는 sdAb로 결합 도메인을 함유한다. 예시적인 cMET-결합 sdAb는 서열번호 123에 기재되어 있다 (미국특허번호 9,346,884호).

[0284] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 항원 결합 도메인, 또는 항원 결합 도메인 각각은 독립적으로 종양 관련 항원 (TAA) B7H3에 결합한다. 예를 들어, 항원 결합 도메인은 B7H3에 결합하는 scFv로 결합 도메인을 함유한다. 예시적인 B7H3-결합 scFv는 서열번호 124에 기재되어 있다. 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인은 VH-CH1 (Fd) 및 LC를 포함하는 Fab 항체 단편이거나 이를 함유한다. 예시적인 B7H3 Fd는 서열번호 127에 기재되어 있고, 예시적인 B7H3 LC는 서열번호 128에 기재되어 있다 (PCT 공개 번호 WO2017/030926호).

[0285] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 항원 결합 도메인, 또는 항원 결합 도메인 각각은 독립적으로 종양 관련 항원 (TAA) CD20에 결합한다. 예를 들어, 항원 결합 도메인은 CD20에 결합하는 scFv로 결합 도메인을 함유한다. 예시적인 CD20-결합 scFv는 서열번호 125, 189, 및 190에 기재되어 있다 (미국 공개 번호 US 2005/0123546호).

[0286] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 항원 결합 도메인, 또는 항원 결합 도메인 각각은 독립적으로 종양 관련 항원 (TAA) DLL3에 결합한다. 예를 들어, 항원 결합 도메인은 DLL3에 결합하는 scFv로 결합 도메인을 함유한다. 예시적인 DLL3-결합 scFv는 서열번호 126 및 189에 기재되어 있다 (미국 공개 번호 US 2017/0037130호). 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인은 DLL3에 결합하는 Fd 및 LC를 포함하는 Fab 항체 단편이거나 또는 이를 함유한다.

예시적인 DLL3 Fd는 서열번호 133에 기재되어 있고 예시적인 DLL3 LC는 서열번호 134에 기재되어 있다 (미국 특허 번호 US 8,044,178호).

[0287] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 항원 결합 도메인, 또는 항원 결합 도메인 각각은 독립적으로 종양 관련 항원 (TAA) 5T4에 결합한다. 예시적인 5T4 Fd는 서열번호 129에 기재되어 있고 예시적인 5T4 LC는 서열번호 130에 기재되어 있다. 일부 구현예에서, 항체 결합 도메인은 서열번호 167 및 168에 기재된 VH-CH1 (Fd) 또는 VL-CL을 포함한다 (미국특허번호 US 8,044,178호).

[0288] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 항원 결합 도메인, 또는 항원 결합 도메인 각각은 독립적으로 종양 관련 항원 (TAA) gpNMB에 결합한다. 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인은 Fd 및 LC 사슬을 포함하는 Fab 단편이거나 이를 함유한다. 예시적인 gpNMB Fd는 서열번호 131에 기재되어 있고 예시적인 gpNMB LC는 서열번호 132에 기재되어 있다.

[0289] 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인은 링커를 통해 Fc 영역 및또는 CD3 결합 영역에 직접 또는 간접적으로 연결된다. 일부 구현예에서, 연결은 링커를 통해 이루어진다. 일구 구현예에서, 링커는 연결 펩티드 (LP)이고, 이는 섹션 II.3에 기재된 임의의 유연하거나 또는 단단한 링커를 포함할 수 있지만, 일반적으로 항원 결합 도메인 또는 도메인들을 연결하는 펩티드는 절단가능한 링커가 아니다.

[0290] 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 제1 항원 결합 도메인과 Fc 영역 사이에 제1 연결 펩티드 (LP1)를 포함한다. 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 CD 결합 영역과 제2 항원 결합 도메인 사이에 제2 연결 펩티드 (LP2)를 포함한다. 일부 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 제1 항원 결합 도메인과 Fc 영역 사이에 제1 연결 펩티드 (LP1) 및 CD3 결합 영역과 제2 항원 결합 도메인 사이에 제2 연결 펩티드 (LP2)를 포함한다. 일부 측면에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 N-말단부터 C-말단까지 다음과 같이 구조적 배열을 갖는다: 제1 항원 결합 도메인 - LP1 - Fc 영역 - 링커 - CD3 결합 영역 - LP2 - 제2 항원 결합 도메인. 일부 구현예에서, 2개의 연결 펩티드는 서로 동일하지 않다.

[0291] 일부 구현예에서, LP1 또는 LP2는 독립적으로 약 1 내지 20개의 아미노산 길이의 펩티드이다. 일부 구현예에서, LP1 또는 LP2는 독립적으로 서열번호 10-13, 119, 135, 147, 149에 기재된 임의의 Gly-Ser 링커 또는 GGS이거나 이를 포함하는 펩티드이다.

[0292] **Ⅲ. 약학 조성물**

[0293] 제공된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트 중 임의의 것의 조성물이 본원에 제공된다. 본 발명에 따른 치료제 실체의 투여는 개선된 이동, 전달, 내성 등을 제공하기 위해 제형에 포함되는 적합한 담체, 부형제, 및 다른 제제와 함께 투여될 것임을 이해할 것이다. 다수의 적절한 제형은 모든 약학 화학자에게 공지된 처방서에서 찾을 수 있다: Remington's Pharmaceutical Sciences (15th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), 특히 Blaug, Seymour가 쓴 챕터 87. 이들 제형은, 예를 들어, 분말, 페이스트, 연고, 젤리, 왁스, 오일, 지질, 지질 (양이온 또는 음이온) 함유 소포 (예컨대 Lipofectin™), DN 접합체, 무수 흡수 페이스트, 수중유 및 유중수적형 에멀젼, 에멀젼 카보왁스 (다양한 분자량의 폴리에틸렌 글리콜), 반-고체 겔, 및 카보왁스를 함유하는 반고체 혼합물을 포함한다. 상기 혼합물 중 임의의 것은, 제형 중 유효성분이 제형에 의해 비활성화되지 않고 제형이 투여 경로와 생리학적으로 양립가능하고 견딜 수 있는 한, 본 발명에 따른 치료 및 요법에 적합할 수 있다. 약학 화학자에게 잘 알려진 제형, 부형제 및 담체와 관련된 추가의 정보에 대해서는 문헌 [Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2):210-8 (2000)], [Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." Int. J. Pharm. 203(1-2):1-60 (2000)], [Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts." J Pharm Sci.89(8):967-78 (2000)], [Powell 등의 "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J Pharm Sci Technol. 52:238-311 (1998)] 및 여기에 인용된 것을 또한 참조한다.

[0294] 일부 구현예에서, 본원에서 총괄적으로 치료제(들) 및 이의 유도체, 단편, 유사체 및 동족체로 지칭되는, 다중특이적 폴리펩티드, 접합된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트, 및 이의 조성물은 투여에 적합한 약학 조성물에 혼합될 수 있다. 구성요소의 선택에 대한 지침뿐만 아니라, 이러한 조성물을 제조하는 것과 관련된 원리 및 고려사항이, 예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences: The Science And Practice Of Pharmacy 19th ed. (Alfonso R. Gennaro, 등의 편집자) Mack Pub. Co., Easton, Pa.: 1995]; 문헌 [Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne,

Pa., 1994]; 및 문헌 [Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York]에 제공된다.

[0295] 이러한 조성물은 전형적으로 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트 또는 이의 접합체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트가 항체의 단편을 포함하는 경우, 표적 단백질에 특이적으로 결합하는 항체의 가장 작은 단편이 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체의 가변 영역 서열에 기초하여, 표적 단백질 서열에 결합하는 항체의 능력을 보유하는 펩티드 분자가 설계될 수 있다. 이러한 펩티드는 화학적으로 합성 및/또는 재조합 DNA 기술에 의해 생성될 수 있다 (예를 들어, Marasco 등의 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)를 참고한다).

[0296] 본원에 사용된, 용어 "약학적으로 허용가능한 담체"는 약학적 투여와 양립가능한, 임의의 그리고 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항균제 및 항진균제, 등장성 제제 및 흡수 지연제 등을 포함하는 것으로 의도된다. 적합한 담체는 당해 분야의 표준 참고문헌인 Remington's Pharmaceutical Sciences의 가장 최신판에 기재되어 있으며, 이 문헌은 본원에서 참고로 포함된다. 이러한 담체 또는 희석제의 적합한 예는 물, 식염수, 링거액, 덱스트로스 용액, 및 5% 인간 혈청 알부민을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 리포좀 및 고정된 오일과 같은 비-수성 비히클 또한 사용될 수 있다. 약학적 활성 물질에 대한 이러한 매질 및 제제의 사용은 당해 기술분야에 잘 알려져 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 제제가 활성 화합물과 양립할 수 없는 것을 제외하면, 조성물에서의 이의 사용이 고려된다.

[0297] 생체 내 (*in vivo*) 투여에 사용되는 제형은 반드시 멸균되어야 한다. 이는 멸균 여과막을 통한 여과로 용이하게 성취된다.

[0298] 본 발명의 약학 조성물은 그의 의도된 투여 경로에 적합하도록 제형화된다. 투여 경로의 예는 비경구, 예를 들어, 정맥내, 피내, 피하, 경구 (예를 들어, 흡입), 경피 (즉, 국소), 점막경유, 및 직장 투여를 포함한다. 비경구, 피내, 또는 피하 적용에 사용되는 용액 또는 현탁액은 다음의 성분을 포함할 수 있다: 주사용 수 (water), 식염수 용액, 고정유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 합성 용매와 같은 멸균된 희석액; 벤질 알코올 또는 메틸 파라벤과 같은 항균제; 아스코르브산 또는 중아황산나트륨과 같은 항산화제; 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA)과 같은 킬레이트제; 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트와 같은 버퍼, 및 염화나트륨 또는 덱스트로오스와 같은 등장성 조절을 위한 제제. pH는 염산 또는 수산화나트륨과 같은 산 또는 염기로 조정될 수 있다. 비경구 제제는 앰플, 일회용 주사기 또는 유리 또는 플라스틱으로 제조된 다중 투여량 바이알에 넣을 수 있다.

[0299] 주사용으로 적합한 약학 조성물은 멸균 수용액 (수용성인 경우) 또는 분산액 및 멸균 주사용 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 정맥내 투여의 경우, 적합한 담체는 생리식염수, 정균수 (bacteriostatic water), Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) 또는 포스페이트 완충 식염수 (PBS)를 포함한다. 모든 경우에, 조성물은 멸균되어야 하고 용이한 주사능 (syringeability)이 존재하는 정도로 유동적이어야 한다. 이는 제조 및 보관의 조건에서 안정적이어야 하고, 박테리아 및 곰팡이와 같은 미생물의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 담체는, 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리콜, 프로필렌 글리콜, 및 액상 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅의 사용, 분산의 경우 요구되는 입자 크기의 유지 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물 작용의 예방은 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 및 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 많은 경우, 등장화제, 예를 들어, 당, 폴리알코올, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 염화나트륨을 포함하는 것이 적합할 것이다. 주사 가능한 조성물의 연장된 흡수는 조성물에 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함시키는 것만으로 야기될 수 있다.

[0300] 멸균 주사용 용액은, 필요에 따라, 활성 화합물을 필요한 양으로 상기 열거된 하나의 성분 또는 성분의 조합과 함께 적절한 용매에 혼입시킨 다음, 여과 멸균함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 기본 분산 매질 및 상기 열거된 것으로부터 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클에 혼입함으로써 제조된다. 멸균 주사 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 제조방법은 유효성분의 분말 및 이전에 멸균-여과된 이의 용액으로부터 임의의 추가적인 바람직한 성분을 생성하는 진공 건조 및 동결건조이다. 조성물이 동결건조되는 경우, 이 방법을 사용한 멸균은 동결건조 및 재구성 전 또는 후에 수행될 수 있다. 비경구 투여용 조성물은 동결건조된 형태 또는 용액으로 저장될 수 있다. 또한, 비경구 조성물은 일반적으로 멸균 접근 포트를 갖는 용기, 예를 들어, 피하주사바늘에 의해 관통될 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 백 (bag) 또는 바이알에 배

치된다.

[0301] 일부 구현예에서, 약학 조성물은 경구, 경피, 흡입, 정맥내, 동맥내, 근육내, 상처 부위에 직접 적용, 수술 부위에 적용, 복강내, 좌약, 피하, 피내, 경피, 분무, 흉막내, 심실내, 관절내, 안구내, 또는 척수내를 포함하는 임의의 경로를 통해 개체에 투여된다.

[0302] 경구 조성물은 일반적으로 비활성화 희석제 또는 식용 담체를 포함한다. 이들은 젤라틴 캡슐 내에 동봉되거나 정제로 압착될 수 있다. 경구 치료제 투여의 목적으로, 활성 화합물은 부형제와 혼입되어 정제, 트로키제 (troches), 또는 캡슐의 형태로 사용될 수 있다. 경구 조성물은 구강세정제로 사용하기 위한 유체 담체를 사용하여 제조될 수도 있으며, 유체 담체 내 화합물은 경구로 적용되어 휙 지나가 뱉어지거나 삼켜진다. 약제학적으로 적합한 결합제 및/또는 보조물질은 조성물의 일부로 포함될 수 있다. 정제 환제, 캡슐, 트로키제 등은 다음의 성분 중 임의의 것 또는 유사한 성질의 화합물을 함유할 수 있다: 미결정 셀룰로오스, 검 트래거캔스 고무 또는 젤라틴과 같은 바인더 (binder); 전분 또는 락토오스와 같은 부형제, 알긴산, 프리모겔 (Primogel), 또는 옥수수 전분과 같은 붕해제; 마그네슘 스테아레이트 또는 스테로테스 (Sterotes)와 같은 윤활제; 콜로이드성 이산화규소와 같은 활택제 (glidant); 수크로오스 또는 사카린과 같은 감미제; 또는 페퍼민트, 메틸 살리실레이트, 또는 오렌지 향료와 같은 착향료.

[0303] 흡입에 의한 투여의 경우, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 적합한 분사제, 예를 들어, 이산화탄소와 같은 가스를 함유하는 가압 용기 또는 디스펜서 (dispenser), 또는 분무기로부터 에어로졸 스프레이 형태로 전달된다.

[0304] 전신 투여는 또한 점막경유 또는 경피 방식으로 이루어질 수 있다. 점막경유 또는 경피 투여의 경우, 침투될 장벽에 적합한 침투제가 제형에 사용된다. 이러한 침투제는 당해 기술분야에 일반적으로 공지되어 있으며, 예를 들어, 점막경유 투여, 세정제, 담즙산염 및 푸시디산 유도체를 포함한다. 점막경유 투여는 비강 스프레이 또는 좌약의 사용을 통해 달성될 수 있다. 경피 투여의 경우. 활성 화합물은 당해 기술분야에 일반적으로 알려진 연고, 고약 (salve), 또는 크림으로 제형화된다.

[0305] 화합물은 또한 좌약 (예를 들어, 코코아 버터 및 다른 글리세라이드와 같은 통상적인 좌약 기제와 함께), 또는 직장 전달을 위한 정체 관장의 형태로 제조될 수도 있다.

[0306] 하나의 구현예에서, 치료제는 임플란트 및 마이크로캡슐화 전달 시스템을 포함하는, 서방/제어 방출 제형과 같이, 신체로부터 화합물이 빠르게 제거되는 것을 보호하는 담체와 함께 제조된다. 생분해성, 생체적합성 폴리머, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리산무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르쏘에스테르, 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 이러한 제형의 제조방법은 통상의 기술자에게 명백할 것이다.

[0307] 예를 들어, 치료제는 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합으로 제조된 마이크로캡슐에, 예를 들어, 콜로이드 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포좀, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀션, 나노-입자, 및 나노캡슐)에서 또는 마크로에멀션 (macroemulsion)에서 각각 하이드록시메틸셀룰로오스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐에 포획될 수 있다.

[0308] 일부 구현예에서, 약학 조성물은 약제학적으로-허용가능한 부형제, 예를 들어, 충전제, 바인더, 코팅제, 보존제, 윤활제, 착향료, 감미제, 착색제, 용매, 완충제, 킬레이트제, 또는 안전화제를 포함한다. 약학적으로-허용가능한 충전제의 예는 셀룰로오스, 이염기성 칼슘 포스페이트. 칼슘 카보네이트, 미결정 셀룰로오스, 수크로오스, 락토오스, 글루코오스, 만니톨, 소르비톨, 말톨, 전호화분 전분, 옥수수 전분, 또는 감자 전분을 포함한다. 약학적으로-허용가능한 바인터의 예는 폴리비닐피롤리돈, 전분, 락토오스, 자일리톨, 소르비톨, 말티톨, 젤라틴, 수크로오스, 폴리에틸렌 글리콜, 메틸셀룰로오스, 또는 셀룰로오스를 포함한다. 약학적으로-허용간으한 코팅제의 예는 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스 (HPMC), 셀락, 옥수수 단백질 제인, 또는 젤라틴을 포함한다. 약학적으로-허용가능한 붕괴제는 폴리비닐피롤리돈, 카르복시메틸 셀룰로오스, 또는 전분글리콜산나트륨 (sodium starch glycolate)을 포함한다. 약학적으로-허용가능한 윤활제의 예는 폴리에틸렌 글리콜, 스테아르산 마그네슘, 또는 스테아르산을 포함한다. 약학적으로-허용가능한 보존제의 예는 메틸 파라벤, 에틸 파라벤, 프로필 파라벤, 벤조산, 또는 소르브산을 포함한다. 약학적으로-허용가능한 감미제의 예는 수크로오스, 사카린, 아스파탐, 또는 소르비톨을 포함한다. 약학적으로-허용가능한 완충제의 예는 카보네이트, 시트레이트, 글루코네이트, 아세테이트, 포스페이트, 또는 타르트레이트를 포함한다.

[0309] 서방성-방출 제제를 제조할 수 있다. 서방성-방출 제제의 적합한 예는 항체를 함유하는 고형 소수성 폴리머의 반투과성 매트릭스를 포함하며, 이 매트릭스는 성형된 물품의 형태, 예를 들어, 필름, 또는 마이크로캡슐이다.

일부 구현예에서, 약학 조성물은 추가로 생성물의 제어 또는 서방형 방출용 제제, 예컨대 주사가능한 마이크로스피어, 생-침식성 입자, 폴리머 화합물 (폴리락트산, 폴리글리콜산), 비드, 또는 리포좀을 포함한다. 서방형-방출 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 하이드로겔 (예를 들어, 폴리(2-하이드록시에틸-메타크릴레이트), 또는 폴리(비닐알코올), 폴리락타이드 (미국특허번호 3,773,919호), L-글루탐산 및 γ 에틸-L-글루타메이트, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예컨대 LUPRON DEPOT™ (락트산-글리콜산 공중합체 및 초산류프롤리드로 구성된 주사가능한 마이크로스피어), 및 폴리-D-(-)-3-하이드록시부티르산을 포함한다. 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산과 같은 중합체가 100일 넘게 분자의 방출을 가능하게 하는 반면, 특정 하이드로겔은 더 짧은 시간의 기간 동안 단백질을 방출한다.

[0310] 물질은 또한 Alza Corporation 및 Nova Pharmaceuticals, Inc로부터 상업적으로 수득할 수 있다. 리포좀 현탁액 (바이러스 항원에 대한 모노클로날 항체로 감염된 세포를 표적화하는 리포좀을 포함함)은 또한 약학적으로 허용가능한 담체로 사용될 수 있다. 이들은, 예를 들어, 미국특허번호 4,522,811호에 기재된 바와 같이, 통상의 기술자에게 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0311] 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 경구 또는 비경구 조성물을 투여 단위 형태로 제형화하는 것이 특히 유리하다. 본원에서 사용된 투여량 단위 형태는 치료될 대상에 대한 단위 투여량으로 적합한 물리적으로 별개의 단위를 지칭하고; 각 단위는 필요한 약학적 담체와 함께 원하는 치료효과를 생성하도록 계산된, 사전에 결정된 양의 활성 화합물을 함유한다. 본 발명의 투여 단위 형태에 대한 사양은 활성 화합물 고유의 특성 및 달성되는 특정 치료 효과, 그리고 개인의 치료를 위한 이러한 활성 화합물을 배합하는 기술에 내재된 한계점에 의해 영향을 받고 직접적으로 이에 따라 좌우된다.

[0312] 본원에 기재된 약학 조성물 (또는 제조 물품)을 포함하는 키트가 추가로 제공된다. 약학 조성물은 투여 지침서와 함께 용기, 팩, 또는 디스펜서에 포함될 수 있다. 본원에 기재된 키트는 또한 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 주사기, 및 본원에 기재된 임의의 방법을 수행하기 위한 지침서와 함께 패키지 삽입물을 비롯한, 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질을 또한 포함할 수 있다.

[0313] 제형은 또한 치료될 특정 적응증, 예를 들어, 서로에 불리하게 영향을 미치지 않는 상보적 활성을 갖는 것에 필요한 하나 이상의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 또는 추가로, 조성물은 예를 들어, 세포독성제, 사이토카인, 화학요법제, 또는 성장-억제제와 같이 이의 기능을 향상시키는 제제, 또는 성장-억제제를 포함할 수 있다. 이러한 분자는 의도된 목적에 효과적인 양으로 조합하여 적합하게 존재한다.

[0314] 일부 구현예에서, 약학 조성물의 투여량은 단일 투여량 또는 반복 투여량이다. 일부 구현예에서, 투여량은 하루에 한 번, 하루에 두 번, 하루에 세 번, 하루에 네 번 또는 그 이상의 횟수로 개체에게 제공된다. 일부 구현예에서, 약 1회 또는 그 이상 (예컨대 약 2회 또는 그 이상, 약 3회 또는 그 이상, 약 4회 또는 그 이상, 약 5회 또는 그 이상, 약 6회 또는 그 이상, 또는 약 7회 또는 그 이상)의 투여량이 1주일에 제공된다. 일부 구현예에서, 며칠, 몇 주, 몇 개월 또는 몇 년에 걸쳐 다중 투여량이 제공된다. 일부 구현예에서, 치료 과정은 약 1회 또는 그 이상의 투여량 (예컨대 약 2회 또는 그 이상의 투여량, 약 3회 또는 그 이상의 투여량, 약 4회 또는 그 이상의 투여량, 약 5회 또는 그 이상의 투여량, 약 7회 또는 그 이상의 투여량, 약 10회 또는 그 이상의 투여량, 약 15회 또는 그 이상의 투여량, 약 25회 또는 그 이상의 투여량, 약 40회 또는 그 이상의 투여량, 약 50회 또는 그 이상의 투여량, 또는 약 100회 또는 그 이상의 투여량)이다.

[0315] 일부 구현예에서, 약학 조성물은 개체에 투여된다. 일반적으로, 약학 조성물의 투여량 및 투여 경로는 표준 약학 실무에 따라 개체의 크기 및 상태에 따라 결정된다. 예를 들어, 치료학적 유효 투여량은 세포 배양 어세이 또는 마우스, 래트, 토끼, 개, 돼지, 또는 원숭이와 같은 동물 모델에서 초기에 추정될 수 있다. 적절한 농도 범위 및 투여 경로를 결정하기 위해 동물 모델이 또한 사용될 수 있다. 이러한 정보는 인간에게 투여하기에 유용한 투여량 및 경로를 결정하는데 사용될 수 있다. 정확한 투여량은 치료를 필요로 하는 개체와 관련된 인자에 비추어 결정될 것이다. 투여량 및 투여는 충분한 수준의 활성 화합물을 제공하거나 또는 원하는 효과를 유지하도록 조정된다. 고려할 수 있는 인자는 질병 상태의 심각도, 개체의 일반적인 건강 상태, 개체의 연령, 체중, 및 성별, 투여 시간 및 빈도, 약물 조합(들), 반응 민감도 및 치료에 대한 반응을 포함한다. 특정 환자에 대한 최적의 투여량과 치료요법은 의약 분야의 통상의 기술자가 질병의 징후에 대해 환자를 모니터링하고 이에 따라 치료법을 조정함으로써 용이하게 결정될 수 있다.

[0316] **Ⅳ. 사용 및 치료 투여 방법**

[0317] 다중특이적 폴리펩티드의 사용 및 사용방법이 제공된다. 이러한 방법 및 사용은, 예를 들어, 이를 함유하는 분자 또는 조성물을 종양 또는 암과 같은 질병, 질환, 또는 장애를 갖는 개체에 투여하는 것을 포함하는 치료방법 및 사용을 포함한다. 일부 구현예에서, 분자 및/또는 조성물은 질병 또는 장애의 치료에 영향을 미치는 유효량으로 투여된다. 용도는 이러한 방법 및 치료, 그리고 이러한 치료방법을 수행하기 위한 약제의 제조에서 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 용도를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 질병 또는 질환을 갖거나 갖는 것으로 의심되는 개체에 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트, 또는 이를 포함하는 조성물을 투여함으로써 수행된다. 일부 구현예에서, 이에 의해 방법은 개체에서 질병 또는 질환을 치료한다.

[0318] 하나의 구현예에서, 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 치료제로서 사용될 수 있다. 이러한 제제는 일반적으로 개체에서 질병 또는 병리를 진단, 예후, 모니터링, 치료, 완화 및/또는 예방하는데 적용될 것이다. 치료요법은 표준방법을 사용하여 장애로 고통받는 (또는 발병 위험이 있는) 개체, 예를 들어, 인간 환자 또는 다른 포유동물을 확인함으로써 수행된다. 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 개체에 투여된다. 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 개체에 투여되며, 일반적으로 표적(들)과의 결합으로 인한 효과를 가질 것이다.

[0319] 일부 구현예에서, 치료학적 유효량의 임의의 제공된 다중특이적 접합체 또는 약학 조성물을 투여함으로써 개체에서 면역반응을 조절하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 면역반응을 조절하는 방법은 개체에서 면역반응을 증가시키거나 향상시킨다. 예를 들어, 증가 또는 향상된 반응은 세포-매개 면역성의 증가일 수 있다. 일부 예에서, 방법은 세포용해성 T-세포 (CTL) 활성과 같은 T-세포 활성을 증가시킨다. 일부 구현예에서, 조절된 (예를 들어, 향상된) 면역반응은 종양 또는 암에 대한 것이다.

[0320] 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 투여는 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 Fc-영역을 통한 FcηR의 관여를 통해 선천성 면역 세포를 활성화시킬 수 있다. 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 투여는 ADCC, 사이토카인 방출, 탈과립 및/또는 ADCP를 포함하는, 선천성 면역세포 효과기 기능을 작용, 자극, 활성화 및/또는 증강시킬 수 있다. 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 투여는 제1 및 제2 구성요소를 연결하는 링커(들)가 일단 프로테아제에 의해 절단되면, T-세포를 활성화시켜, 항-CD3 결합 부분이 T 세포 상의 CD3ε에 결합하게 한다. 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 투여는 CD3-매개 T 세포 활성화, 세포독성, 사이토카인 방출 및/또는 증식을 작용, 자극, 활성화, 및/또는 증강시킬 수 있다.

[0321] 일부 구현예에서, 제공된 방법은 치료학적 유효량의 임의의 제공된 다중특이적 접합체 또는 약학 조성물을 투여함으로써 개체의 질병 또는 질환을 치료하기 위한 것이다. 일부 구현예에서, 질병 또는 질환은 종양 또는 암이다. 일반적으로, 질병 또는 장애의 완화 또는 치료는 질병 또는 장애와 관련된 하나 이상의 증상 또는 의학적 문제의 감소를 포함한다. 예를 들어, 암의 경우, 치료학적으로 유효한 양의 약물은 다음 중 하나 또는 조합을 달성할 수 있다: 암세포의 수를 감소시킴; 종양 크기를 감소시킴; 주변 기관으로의 암세포 침윤을 억제함 (즉, 어느 정도 감소 및/또는 정지시킴); 종양 전이를 억제함; 종양 성장을 일부 억제함; 및/또는 암과 관련된 하나 이상의 증상을 어느 정도 경감시킴. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물은 개체, 예를 들어 인간 또는 다른 포유동물, 예컨대 비-인간 영장류, 반려동물 (예를 들어, 고양이, 개, 말), 농장동물, 업무동물 (work animal), 또는 동물원 동물의 질병 또는 장애의 발병 또는 재발을 예방하기 위해 사용될 수 있다. 용어 재체 및 환자는 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

[0322] 일부 구현예에서, 약학 조성물은 포유동물 암세포 (예컨대 인간 암세포)의 성장을 억제하는데 사용될 수 있다. 암을 치료하는 방법은 유효량의 본원에 기재된 임의의 약학 조성물을 암을 갖는 개체에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 약학 조성물의 유효량은 암의 진행을 억제, 중단, 또는 역전시키기 위해 투여될 수 있다. 인간 암 세포는 생체 내 (*in vivo*), 또는 탈체 (*ex vivo*)에서 치료될 수 있다. 인간 환자의 탈체 (*ex vivo*) 치료에서, 암세포를 함유하는 조직 또는 체액은 신체 외부에서 치료된 다음 조직 또는 체액이 환자에게 다시 도입된다. 일부 구현예에서, 암은 치료학적 조성물을 환자에게 투여함으로써 인간 환자 생체 내 (in vivo)에서 치료된다.

[0323] 비-제한적인 질환의 예는: 모든 종류의 암 (유방, 폐, 대장, 전립선, 흑색종, 두경부, 췌장 등), 류마티스 관절염, 크론병, SLE, 심혈관 손상, 허혈 등을 포함한다. 예를 들어, 적응증은 T-세포 급성 림프모구백혈병 (T-ALL)을 포함하는 백혈병, 다발성 골수종을 포함하는 림프모구성 질병, 폐, 대장, 전립선, 췌장, 및 삼중음성유방암을 포함하는 유방을 포함하는 고형 종양을 포함한다. 예를 들어, 적응증은 원발성 종양 기원에 관계없이 암에서의 골 질병 또는 전이; 비-제한적인 예로, ER/PR+ 유방암, Her2+ 유방암, 삼중-음성유방암을 포함하는 유방암; 대장암; 자궁내막암; 위암; 교모세포종; 두경부암, 예컨대 식도암; 폐암, 예컨대 비-제한적인 예로, 비-소세포폐암; 다발성 골수종 난소암; 췌장암; 전립선암; 육종, 예컨대 골육종; 신장암, 예컨대 비제한적인 예로, 신장 세포 암종; 및/또는 피부암, 예컨대 비제한적인 예로, 편평세포암, 기저세포암종, 또는 흑색종을

포함한다. 일부 구현예에서, 암은 편평세포암이다. 일부 구현예에서, 암은 피부 편평세포암종이다. 일부 구현예에서, 암은 식도 편평세포암종이다. 일부 구현예에서, 암은 두경부 편평세포암종이다. 일부 구현예에서, 암은 폐 편평세포암종이다.

[0324] 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 치료학적으로 유효한 양은 일반적으로 치료 목적을 달성하는데 필요한 양에 관한 것이다. 상기 언급한 바와 같이, 이는 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트와 이의 표적 항원(들) 사이의 결합 상호작용, 일부의 경우, FcηR-매개 선천성 면역 세포 활성화 또는 CD3-매개 T 세포 활성화를 작용, 자극, 활성화, 및/또는 증강시키는 것일 수 있다. 투여되는데 필요한 양은 또한 이의 특이적 항원(들)에 대한 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 결합 친화도에 의존할 것이고, 또한 투여된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 이것이 투여된 다른 개체의 자유 부피 (free volume)로부터 고갈되는 속도에 의존할 것이다. 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 치료학적으로 유효한 투여량을 위한 일반적인 범위는, 비제한적인 예로, 약 0.01 μg/kg 체중 내지 약 10 mg/kg 체중일 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 치료학적으로 유효한 투여량의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트, 비제한적인 예로, 약 0.01 mg/kg 체중 내지 약 5-10 mg/kg 체중일 수 있다. 일반적인 투여 빈도는, 예를 들어, 매일 2회 내지 일주일에 1회의 범위일 수 있다.

[0325] 치료의 효능은 특정 장애를 진단 또는 치료하기 위한 임의의 공지된 방법과 관련하여 결정된다. 원하는 특이성을 갖는 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 스크리닝 방법은 효소결합면역흡착분석법 (ELISA) 및 관련 기술분야에 공지된 다른 면역학적으로 매개된 기술을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 제공된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 투여가 면역세포 매개 또는 매개 가능한 바람직하지 않은 면역 반응을 제거, 격리, 또는 비활성화시킴으로써; 보호 면역 반응을 매개하거나 매개할 수 있는 면역세포를 유도, 생성, 또는 자극(turning on)함으로써; 면역세포의 물리적 또는 기능적 특성을 변경함으로써; 또는 이러한 효과의 조합으로 면역학적 활성을 충분히 조절하는지 결정하기 위한 다양한 수단이 공지되어 있다. 면역학적 활성 조절의 측정의 예는 면역세포 집단의 존재 또는 부재의 검사 (유세포 분석, 면역조직화학, 조직학, 전자 현미경, 중합효소연쇄반응 (PCR)); 신호에 반응하여 증식 또는 분열하는 능력 또는 저항성을 포함하는 면역세포의 기능적 능력의 측정 (예컨대 T-세포 증식 어세이 및 항-CD3 항체, 항-T-세포 수용체 항체, 항-CD28 항체, 칼슘 이온투과담체, 펩티드 또는 단백질 항원이 로딩된 PMA (포르볼-12-미리스테이트 13-아세테이트) 항원 제시 세포로 자극 후 3H-티미딘 혼합을 기반으로 하는 펩스캔 (pepscan) 분석; B 세포 증식 어세이); 다른 세포를 죽이거나 용해시키는 능력의 측정 (예컨대 세포독성 T 세포 어세이); 사이토카인, 케모카인, 세포 표면 분자 항체 및 세포의 다른 산물의 측정 (예를 들어, 유세포 분석, 효소-결합 면역흡착 어세이, 웨스턴 블랏 어세이, 단백질 마이크로어레이 분석, 면역침전분석에 의해); 면역세포의 활성화의 생화학적 마커 또는 면역세포 내 신호전달경로의 측정 (예를 들어, 티로신, 세린 또는 트레오닌 인산화, 폴리펩티드 절단 및 단백질 복합체의 형성 또는 분리의 웨스턴 블랏 및 면역침전 분석; 단백질 어레이 분석; DNA 어레이 또는 감수잡종형성 (subtractive hybridization)을 이용한 DNA 전사, 프로파일링); 아폽토시스, 괴사, 또는 다른 메카니즘에 의한 세포 사멸의 측정 (예를 들어, 아넥신 V 염색, TUNEL 어세이, DNA 레더링 (laddering)을 측정하기 위한 겔 전기영동, 조직학; 형광발생 카스파제 어세이, 카스파제 기질의 웨스턴 블랏 분석); 유전자, 단백질, 및 면역세포에 의해 생성된 다른 분자의 측정 (예를 들어, 노던 블랏 분석, 중합효소연쇄반응, DNA 마이크로어레이, 단백질 마이크로어레이, 2-차원 겔 전기영동, 웨스턴 블랏 분석, 효소 결합 면역흡착 어세이, 유세포 분석); 및 예를 들어, 재발률 또는 질환 중증도를 측정함으로써 자가면역, 신경퇴행성, 및 자가-단백질 또는 자가-폴리펩티드를 수반하는 다른 질환의 개선과 같은 임상적 증상 또는 결과의 측정 (임상적 점수, 추가 요법의 사용에 대한 필요성, 기능적 상태, 이미징 연구)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0326] 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 또한 다양한 진단 및 예방 제형에 유용하다. 하나의 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 상기 언급된 장애 중 하나 이상이 발생할 위험이 있는 환자에 투여된다. 하나 이상의 장애에 대한 환자 또는 기관의 소인은 유전자형, 혈청학적 또는 생화학적 마커를 사용하여 결정될 수 있다.

[0327] 본 발명의 다른 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 상기 언급된 장애 중 하나 이상과 관련된 임상 적응증으로 진단된 인간 개체에 투여된다. 진단 시, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 임상 적응증의 효과를 완화하거나 역전시키기 위해 투여된다.

[0328] *조합 치료법*

[0329] 일부 구현예에서, 본원에서 총괄적으로 치료제(들)로 지칭되는 - 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트, 접합된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트, 및 이의 조성물은 하나 이상의 추가 제제, 또는 추가 제제의 조합과 함께 투여된다. 적합한 추가 제제는 의도된 적용을 위한 현재의 약학 및/또는 외과적 치료법을 포함한다. 예를 들어,

치료제(들)은 추가의 화학요법제 또는 항-신생물제와 함께 사용될 수 있다. 예를 들어, 치료제(들) 및 추가 제제는 단일 치료 조성물로 제형화되고, 그리고 치료제(들) 및 추가 제제는 동시에 투여된다. 일부 구현예에서, 치료제(들) 및 추가 제제는 서로 분리되어 있고, 예를 들어, 각각 개별적인 치료 조성물로 제형화되며, 그리고 치료제(들) 및 추가 제제는 동시에 투여되거나, 또는 치료제(들) 및 추가 제제는 치료요법 동안 상이한 시간에 투여된다. 예를 들어, 치료제(들)는 추가 제제의 투여 전에 투여되거나, 치료제(들)는 추가 제제의 투여 후에 투여되거나, 치료제(들) 및 추가 제제는 교대로 투여된다. 본원에 기재된 바와 같이, 치료제(들) 및 추가 제제는 단일 투여량 또는 다중 투여량으로 투여된다. 일부 구현예에서, 추가 제제는 치료제(들)에 결합되거나 다르게는 부착된다. 적합한 추가 제제는 의도된 적용 (즉, 사멸, 세포 증식의 방지, 호르몬 요법 또는 유전자 요법)의 목적에 따라 선택된다. 이러한 제제는, 예를 들어, 약학 제제, 독소, 독소의 단편, 알킬화제, 효소, 항생제, 항대사성물질, 항증식제, 호르몬, 신경전달물질, DNA, RNA, siRNA, 올리고뉴클레오티드, 안티센스 RNA, 앱타머, 진단제, 방사선 불투과성 염료, 방사성 동위원소, 형광발생 화합물, 자기 (magnetic) 표지, 나노입자, 마커 화합물, 렉틴, 세포막 투과성을 변경시키는 화합물, 광화학 화합물, 소분자, 리포좀, 미셀, 유전자 요법 벡터, 바이러스 벡터 등을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 마지막으로, 제제의 조합 또는 상이한 클래스 제제의 조합이 사용될 수 있다.

[0330] 하나의 구현예에서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 병용 요법, 즉, 다른 제제, 예를 들어, 자가면역질질환 및 염증성 질환과 같은 병리학적 질환 또는 장애를 치료하는데 유용한 예컨대 치료제와 조합하여 투여된다. 이와 관련해서 용어 "조합된 (in combination)"은 제제가 실질적으로 동시에, 동시에 또는 순차적으로 주어지는 것을 의미한다. 순차적으로 주어지는 경우, 제2 화합물의 투여의 개시에, 2개의 화합물 중 제1 화합물은 여전히 치료 부위에서 유효 농도로 검출가능한다.

[0331] 예를 들어, 병용 요법은 하나 이상의 치료제, 예를 들어, 하기에 보다 자세히 기재된, 하나 이상의 사이토카인 및 성장인자 억제제, 면역억제제, 항-염증제, 대사 억제제, 효소 억제제, 및/또는 세포독성제 또는 세포정지제와 공동-제형화되거나/되고 공동-투여되는 본 발명의 하나 이상의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트를 포함할 수 있다. 추가로, 본원에 기재된 하나 이상의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 본원에 기재된 둘 이상의 치료제와 조합하여 사용될 수 있다. 이러한 조합 치료법은 유리하게는 적은 투여량의 투여된 치료제를 이용할 수 있으므로, 다양한 단일요법과 관련된 가능한 독성 또는 합병증을 피할 수 있다.

[0332] 다른 구현예에서, 본 발명의 하나 이상의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 하나 이상의 항-염증 약물, 면역억제제, 또는 대사 또는 효소 억제제와 함께 공동-제형화되고/되거나 공동-투여될 수 있다. 본원에 기재된 항체와 조합하여 사용될 수 있는 약물 또는 억제제의 비제한적인 예는 하나 이상의: 비스테로이드성 항-염증 약물(들) (NSAIDs), 예를 들어, 이부로펜, 테니댑, 나프록센, 멜록시캄, 피록시캄, 디클로페낙, 및 인도메타신; 설파살라진; 프레드니솔론과 같은 코르티코스테로이드; 사이토카인 억제성 항-염증 약물(들) (CSAIDs); 뉴클레오티드 생합성 억제제, 예를 들어, 퓨린 생합성 억제제, 엽산 길항제 (예를 들어, 메토트렉세이트 (N-[4-[[(2,4-디아미노-6-프테리디닐)메틸]메틸아미노]벤조일]-L-글루탐산); 및 피리미딘 생합성 억제제, 예를 들어, 디하이드로오로테이트 디하이드로게나아제 (dihydroorotate dehydrogenase, DHODH) 억제제를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 항체와 조합하여 사용하기에 적합한 치료제는 NSAIDs, CSAIDs, (DHODH) 억제제 (예를 들어, 레플루노미드), 및 엽산 길항제 (예를 들어, 메토트렉세이트)를 포함한다.

[0333] 추가 억제제의 예는 하나 이상의: 코르티코스테로이드 (경구, 흡입 및 국소 주사); 면역억제제, 예를 들어, 사이클로스포린, 타크로리무스 (FK-506); 및 mTOR 억제제, 예를 들어, 시롤리무스 (라파마이신 - RAPAMUNE™ 또는 라파마이신 유도체, 예를 들어, 가용성 라파마이신 유도체 (예를 들어, 에스테르 라파마이신 유도체, 예를 들어, CCI-779); TNFα 또는 IL-1과 같은 전염증성 사이토카인에 의한 신호전달을 방해하는 제제 (예를 들어, IRAK, NIK, IKK, p38 또는 MAP 키나아제 억제제); COX2 억제제, 예를 들어, 셀레콕시브, 로페콕시브 및 이의 변이체; 포스포디에스터라아제 (phosphodiesterase) 억제제, 예를 들어, R973401 (포스포디에스터라아제 제IV형 억제제); 포스포리파아제 억제제, 예를 들어, 사이토솔릭 포스포리파아제 2 (cPLA2) (예를 들어, 트리플루오로메틸 케톤 유사체)의 억제제; 혈관내피세포 성장인자 또는 성장인자 수용체, 예를 들어, VEGF 억제제 및/또는 VEGF-R 억제제; 및 혈관신생 억제제를 포함한다. 본 발명의 항체와 조합하여 사용하기에 적합한 치료제는 면역억제제, 예를 들어, 사이클로스포린, 타크로리무스 (FK-506); mTOR 억제제, 예를 들어, 시롤리무스 (라파마이신) 또는 라파마이신 유도체, 예를 들어, 가용성 라파마이신 유도체 (예를 들어, 에스테르 라파마이신 유도체, 예를 들어, CCI-779); COX2 억제제, 예를 들어, 셀레콕시브 및 이의 변이체; 및 포스포리파아제 억제제, 예를 들어, 사이토솔릭 포스포리파아제 2 (cPLA2)의 억제제, 예를 들어, 트리플루오로메틸 케톤 유사체이다. 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트와 조합될 수 있는 치료제의 추가의 예는 하나 이상의: 6-머캅토퓨린

(6-MP); 아자티오프린 설파살라진; 메살라진; 올살라진; 클로로퀸/하이드록시클로로퀸 (PLAQUENIL®); 페니실라민; 오로티오말레이트 (근육내 및 경구); 아자티오프린; 콜히친; 베타-2 아드레날린수용체 작용제 (살부타몰, 터부탈린, 살메테랄); 잔틴 (테오필린, 아미노필린); 크로모글리세이트 (cromoglycate); 네도크로밀; 케토티펜; 이프라트로피움 및 옥시트로피움; 마이코페놀레이트 모페틸; 아데노신 작용제; 항혈전제; 보체 억제제; 및 아드레날린성 제제를 포함한다.

[0334] **Ⅴ. 예시적 구현예**

[0335] 제공된 구현예 중에는:

[0336] 1. 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트로서, 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 제1 구성요소 및 CD3-결합 영역을 포함하는 제2 구성요소를 포함하고,

[0337] 여기서, 제1 및 제2 구성요소는 링커로 결합되며, Fc 영역은 CD3-결합 영역에 대해 N-말단에 위치하고; 그리고

[0338] 제1 및 제2 구성요소 중 하나 또는 둘 다는 종양 관련 항원 (TAA)에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0339] 2. 제1 구현예에 있어서, CD3-결합 영역은 CD3 (CD3ε)에 결합하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0340] 3. 제1 구현예 또는 제2 구현예에 있어서, 항원 결합 도메인은 Fc 영역에 대해 아미노-말단에 위치하고/하거나 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 CD3 결합 영역에 대해 카르복시-말단에 위치하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0341] 4. 제1 내지 제3 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 구성요소는 제1 항원 결합 도메인을 포함하고 제2 구성요소는 제2 항원 결합 도메인을 포함하며, 항원 결합 도메인들 중 각각은 종양 관련 항원 (TAA)에 결합하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0342] 5. 제4 구현예에 있어서, 제1 항원 결합 도메인은 다중특이적 컨스트럭트의 Fc 영역에 대해 아미노-말단에 위치하고 제2 항원 결합 도메인은 다중특이적 컨스트럭트의 CD3 결합 영역에 대해 카르복시-말단에 위치하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0343] 6. 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트로서, 상기 다중특이적 컨스트럭트는 순서대로 N-말단부터 C-말단까지:

[0344] 종양-관련 항원 (TAA)에 결합하는 제1 항원 결합 도메인;

[0345] 면역글로불린 Fc 영역;

[0346] 링커;

[0347] CD3 (CD3ε)에 결합하는 CD3 결합 영역; 및

[0348] 종양-관련 항원 (TAA)에 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0349] 7. 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트로서, 상기 다중특이적 컨스트럭트는 순서대로 N-말단부터 C-말단까지:

[0350] 면역글로불린 Fc 영역;

[0351] 링커;

[0352] CD3 (CD3ε)에 결합하는 CD3 결합 영역; 및

[0353] 종양-관련 항원 (TAA)에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0354] 8. 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트로서, 상기 다중특이적 컨스트럭트는 순서대로 N-말단부터 C-말단까지:

[0355] 종양-관련 항원 (TAA)에 결합하는 항원 결합 도메인;

[0356] 면역글로불린 Fc 영역;

[0357] 링커; 및

[0358] CD3 (CD3ε)에 결합하는 CD3 결합 영역을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0359] 9. 제1 내지 제8 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, Fc 영역은 동종이량체 Fc 영역인, 다중특이적 폴리펩티드

컨스트럭트.

[0360] 10. 제1 내지 제9 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, Fc 영역은 인간 IgG1, 인간 IgG2, 인간 IgG3, 또는 인간 IgG4의 Fc 영역이거나, 면역학적으로 활성인 이의 단편인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0361] 11. 제1 내지 제10 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, Fc 영역은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열 또는 서열번호 1과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산의 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0362] 12. 제1 내지 제10 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, Fc 영역은 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열 또는 서열번호 2와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산의 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하거나;

[0363] Fc 영역은 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열 또는 서열번호 4와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산의 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하거나; 또는

[0364] Fc 영역은 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열 또는 서열번호 5와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산의 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0365] 13. 제1 내지 제6, 제9 및 제12 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, Fc 영역은 이종이량체 Fc 영역인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0366] 14. 제13 구현예에 있어서, 이종이량체 Fc 영역의 Fc 폴리펩티드 중 하나 또는 둘 다는 동종이량체 Fc 영역의 폴리펩티드에 비해, 선택적으로 서열번호 1에 기재된 Fc 폴리펩티드 또는 면역학적으로 활성인 이의 단편에 비해, 이종이량체화를 유도하는 적어도 하나의 변형을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0367] 15. 제14 구현예에 있어서, 이종이량체 Fc의 Fc 폴리펩티드 각각은 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0368] 16. 제15 구현예에 있어서, 이종이량체 Fc의 Fc 폴리펩티드 각각은 노브-인투-홀 (knob-into-hole) 변형을 포함하거나 폴리펩티드의 정전기적 상보성을 증가시키기 위한 전하 돌연변이를 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0369] 17. 제16 구현예에 있어서, 아미노산 변형은 노브-인투-홀 (knob-into-hole) 변형인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0370] 18. 제13 내지 제17 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 이종이량체 Fc의 제1 Fc 폴리펩티드는 Thr366Ser, Leu368Ala, Tyr407Val, 및 이들의 조합으로부터 선택되는 변형을 포함하고 이종이량체 Fc의 제2 Fc 폴리펩티드는 T366W 변형을 포함하는, 다중특이적 융합 폴리펩티드.

[0371] 19. 제18 구현예에 있어서, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 비-시스테인 잔기에서 시스테인 잔기로의 변형을 추가로 포함하고, 여기서 제1 폴리펩티드의 변형은 Ser354 및 Y349 위치 중 하나이고 제2 Fc 폴리펩티드의 변형은 Ser354 및 Y349 위치 중 나머지 다른 하나인, 다중특이적 융합 폴리펩티드.

[0372] 20. 제16 구현예에 있어서, 아미노산 변형은 폴리펩티드의 정전기적 상보성을 증가시키는 전하 돌연변이인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트

[0373] 21. 제13 내지 제16 및 20 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 및/또는 제2 Fc 폴리펩티드 또는 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드 각각은 상보적 위치에 변형을 포함하고, 여기서 변형은 다른 폴리펩티드의 상보적 아미노산에 반대 전하를 갖는 아미노산으로의 치환인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0374] 22. 제14 내지 제21 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 이종이량체 Fc의 제1 또는 제2 Fc 폴리펩티드 중 하나는 Ile253 잔기의 변형을 추가로 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0375] 23. 제22 구현예에 있어서, 변형은 Ile253Arg인 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0376] 24. 제14 내지 제23 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 이종이량체 Fc의 제1 또는 제2 Fc 폴리펩티드 중 하나는 His435 잔기의 변형을 추가로 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0377] 25. 제24 구현예에 있어서, 변형은 His435Arg인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0378] 26. 제1 내지 제25 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, Fc 영역은 Lys447이 결여된 폴리펩티드를 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0379] 27. 제1 내지 제26 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, Fc 영역은 FcRn 결합을 향상시키는 적어도 하나의 변형을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0380] 28. 제27 구현예에 있어서, 변형은 Met252, Ser254, Thr256, Met428, Asn434, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 위치인, 다중특이적 융합 폴리펩티드.

[0381] 29. 제28 구현예에 있어서, 변형은 Met252Y, Ser254T, Thr256E, Met428L, Met428V, Asn434S, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 위치인, 다중특이적 융합 폴리펩티드.

[0382] 30. 제28 구현예에 있어서, 변형은 Met252 위치 및 Met428 위치인, 다중특이적 융합 폴리펩티드.

[0383] 31. 제30 구현예에 있어서, 변형은 Met252Y 및 Met428L인, 다중특이적 융합 폴리펩티드.

[0384] 32. 제30 구현예에 있어서, 변형은 Met252Y and Met428V인, 다중특이적 융합 폴리펩티드.

[0385] 33. 제13 내지 제32 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 이종이량체 Fc의 제1 폴리펩티드는 서열번호 82, 86, 94 또는 96 중 어느 하나에 기재된 아미노산의 서열을 포함하고, 이종이량체 Fc의 제2 폴리펩티드는 서열번호 83, 87, 90, 92, 98 또는 100 중 어느 하나에 기재된 아미노산의 서열을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0386] 34. 제1 내지 제33 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, Fc 영역은 효과기 기능을 감소시키고/시키거나 Fc 감마 수용체 또는 C1q로부터 선택되는 효과기 분자에 대한 결합을 감소시키는 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0387] 35. 제34 구현예에 있어서, 하나 이상의 아미노산 변형은 Glu233, Leu234 또는 Leu235 중 하나 이상의 결실인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0388] 36. 제13 내지 제32, 제34 및 제35 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 이종이량체 Fc의 제1 폴리펩티드는 서열번호 84, 88, 95 또는 97 중 어느 하나에 기재된 아미노산의 서열을 포함하고 이종이량체 Fc의 제2 폴리펩티드는 서열번호 85, 89, 91, 93, 99 또는 101 중 어느 하나에 기재된 아미노산의 서열을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0389] 37. 제1 내지 제32 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, Fc 영역은 FcγR 결합을 향상시키는 적어도 하나의 변형을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0390] 38. 제37 구현예에 있어서, 변형은 Ser239 또는 Ile332에서의 변형인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0391] 39. 제1 내지 제32 및 제37 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, Fc 영역의 글리코실화는 비변형 Fc 영역에 비해 FcγR 결합을 향상시키기 위해 변형되는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0392] 40. 제39 구현예에 있어서, Fc 영역은 푸코오스 함량이 결여되어 있거나 푸코오스 함량을 감소시키는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0393] 41. 제1 내지 제40 구현예에 있어서, CD3 결합 영역은 항-CD3 항체 또는 항원-결합 단편인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0394] 42. 제41 구현예에 있어서, 항-CD3 항체 또는 항원 결합 단편은 가변 중쇄 영역 (VH) 및 가변 경쇄 영역 (VL)을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0395] 43. 제1 내지 제42 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, CD3 결합 영역은 1가인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0396] 44. 제41 내지 제43 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 항-CD3 항체 또는 항원 결합 단편은 단일 사슬 항체가 아니고, 선택적으로 단일 사슬 가변 단편 (scFv)이 아닌, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0397] 45. 제42 또는 제44 구현예에 있어서, Fc는 이종이량체 Fc이고 항-CD3 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 VH 및 VL은 이종이량체 Fc의 다른 폴리펩티드들에 연결되는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0398] 46. 제1 내지 제45 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, CD3 결합 영역은, 항원 결합 도메인 중 적어도 하나가

이의 TAA에 결합하지 않는 한, CD3에 결합 또는 관여할 수 없거나, 또는 실질적으로 결합 또는 관여할 수 없는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0399] 47. 제1 내지 제46 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, CD3 결합 영역은, 항원 결합 도메인 중 적어도 두 개가 이의 TAA에 결합하지 않는 한, CD3에 결합 또는 관여할 수 없거나, 또는 실질적으로 결합 또는 관여할 수 없는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0400] 48. 제1 내지 제47 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 링커는 폴리펩티드 링커인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0401] 49. 제48 구현예에 있어서, 링커는 최대 25개의 아미노산 길이의 폴리펩티드인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0402] 50. 제48 구현예 또는 제49 구현예에 있어서, 링커는 2개 또는 약 2개 내지 24개의 아미노산, 2개 내지 20개의 아미노산, 2개 내지 18개의 아미노산, 2개 내지 14개의 아미노산, 2개 내지 12개의 아미노산, 2개 내지 10개의 아미노산, 2개 내지 8개의 아미노산, 2개 내지 6개의 아미노산, 6개 내지 24개의 아미노산, 6개 내지 20개의 아미노산, 6개 내지 18개의 아미노산, 6개 내지 14개의 아미노산, 6개 내지 12개의 아미노산, 6개 내지 10개의 아미노산, 6개 내지 8개의 아미노산, 8개 내지 24개의 아미노산, 8개 내지 20개의 아미노산, 8개 내지 18개의 아미노산, 8개 내지 14개의 아미노산, 8개 내지 12개의 아미노산, 8개 내지 10개의 아미노산, 10개 내지 24개의 아미노산, 10개 내지 20개의 아미노산, 10개 내지 18개의 아미노산, 10개 내지 14개의 아미노산, 10개 내지 12개의 아미노산, 12개 내지 24개의 아미노산, 12개 내지 20개의 아미노산, 12개 내지 18개의 아미노산, 12개 내지 14개의 아미노산, 14개 내지 24개의 아미노산, 14개 내지 20개의 아미노산, 14개 내지 18개의 아미노산, 18개 내지 24개의 아미노산, 18개 내지 20개의 아미노산 또는 20개 내지 24개의 아미노산의 폴리펩티드인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0403] 51. 제48 내지 제50 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 링커는 길이가 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 아미노산인 폴리펩티드인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0404] 52. 제1 내지 제51 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 링커는 절단가능한 링커인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0405] 53. 이종이량체 Fc 영역을 포함하는 제1 구성 요소 및 가변 중쇄 영역 (VH) 및 가변 경쇄 영역 (VL)을 포함하는 항-CD3 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 제2 구성 요소를 포함하는 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트로서,

[0406] 여기서,

[0407] 항-CD3 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 VH 및 VL은 이종이량체 Fc의 다른 폴리펩티드들에 연결되고;

[0408] 제1 및 제2 구성 요소는 절단가능한 링커로 결합되며, 여기서, 이종이량체 Fc 영역은 항-CD3 항체에 대해 N-말단에 위치하고; 그리고

[0409] 제1 및 제2 구성요소 중 하나 또는 둘 다는 종양 관련 항원 (TAA)에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0410] 54. 제52 구현예 또는 제53 구현예에 있어서, CD3에 대한 CD3-결합 영역의 결합은, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트가 절단된 상태에 비해 비절단된 상태일 때, 실질적으로 감소되는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0411] 55. 제52 내지 제54 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 절단된 상태에서 제1 및 제2 구성 요소는 연결되지 않는, 다중특이적 폴리펩티드.

[0412] 56. 제52 내지 제55 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 절단가능한 링커는 프로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0413] 57. 제56 구현예에 있어서, 프로테아제는 면역 효과기 세포, 종양, 또는 종양 미세환경에 존재하는 세포에 의해 생산되는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0414] 58. 제57 구현예에 있어서, 프로테아제는 면역 효과기 세포에 의해 생산되고 면역 효과기 세포는 활성화된 T 세포, 자연살해 (NK) 세포, 또는 NK T 세포인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0415] 59. 제56 내지 제58 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 프로테아제는 매트립타아제 (matriptase), 기질금속단

백질분해효소 (MMP), 그랜자임 B, 및 이들의 조합 중에서 선택되는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0416] 60. 제59 구현예에 있어서, 프로테아제는 그랜자임 B인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0417] 61. 제52 내지 제60 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 절단가능한 링커는 일반식 P4 P3 P2 P1↓P1' (서열번호 150)의 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 P4는 I, L, Y, M, F, V, 또는 A 아미노산이고; P3은 A, G, S, V, E, D, Q, N, 또는 Y 아미노산이며; P2는 H, P, A, V, G, S, 또는 T 아미노산이고; P1은 D 또는 E 아미노산이며; 그리고 P1'는 I, L, Y, M, F, V, T, S, G 또는 A 아미노산인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0418] 62. 제52 내지 제61 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 절단가능한 링커는 일반식 P4 P3 P2 P1↓P1' (서열번호 151)의 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 P4는 I 또는 L 아미노산이고; P3은 E 아미노산이며; P2는 P 또는 A 아미노산이고; P1은 D 아미노산이며; 그리고 P1'는 I, V, T, S, 또는 G 아미노산인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0419] 63. 제52 내지 제62 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 절단가능한 링커는 아미노산 서열 IEPDI (서열번호 136), LEPDG (서열번호 152), LEADT (서열번호 137), IEPDG (서열번호 138), IEPDV (서열번호 139), IEPDS (서열번호 140), IEPDT (서열번호 141) 또는 LEADG (서열번호 153)를 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0420] 64. 제52 내지 제63 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 절단가능한 링커는 서열번호 22, 105-112, 136-141, 148, 150-153으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0421] 65. 제59 구현예에 있어서, 프로테아제는 매트립타아제인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0422] 66. 제52 내지 제65 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 절단 가능한 링커는 서열 P1QAR↓(A/V) (서열번호 154)를 포함하고, 여기서, P1은 임의의 아미노산이거나; 또는 절단가능한 링커는 서열 RQAR(A/V) (서열번호 155)를 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0423] 67. 제52 내지 제66 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 절단가능한 링커는 서열 RQARV (서열번호 156)를 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0424] 68. 제52 내지 제67 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 절단가능한 링커는 서열번호 23, 154-156으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0425] 69. 제59 구현예에 있어서, 프로테아제는 MMP인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0426] 70. 제69 구현예에 있어서, MMP는 MMP-2인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0427] 71. 제52 내지 제70 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 절단가능한 링커는 일반식 P3 P2 P1↓P1' (서열번호 157)를 포함하고, 여기서 P3은 P, V 또는 A이고; P2는 Q 또는 D이며; P1은 A 또는 N이고; 그리고 P1'는 L, I 또는 M인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0428] 72. 제52 내지 제71 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 절단가능한 링커는 일반식 P3 P2 P1↓ P1' (서열번호 158)를 포함하고, 여기서 P3은 P이고; P2는 Q 또는 D이며; P1은 A 또는 N이고; 그리고 P1'는 L 또는 I인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0429] 73. 제52 내지 제72 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 절단가능한 링커는 서열 PAGL (서열번호 24)을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0430] 74. 제52 내지 제73 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 절단가능한 링커는 서열번호 22-31, 104-114, 117-118, 136-144, 148, 150-158로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0431] 75. 제45 내지 제74 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 적어도 (i) 이종이량체 Fc 영역의 제1 Fc 폴리펩티드, 링커 및 항-CD3 항체 또는 항원 결합 단편의 VH 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드; 및 (ii) 이종이량체 Fc 영역의 제2 Fc 폴리펩티드, 링커 및 항-CD3 항체 또는 항원 결합 단편의 VL 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 폴리펩티드 중 하나 또는 둘 다는 종양 관련 항원 (TAA)에 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0432] 76. 제1 내지 제75 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, TAA에 결합하는 하나 이상의 항원 결합 도메인은 TAA에 대한 1가, 2가, 3가 또는 4가 결합을 생성하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0433] 77. 제75 구현예에 있어서, 제1 또는 제2 폴리펩티드 중 단 하나만 TAA에 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 도메인을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0434] 78. 제75 구현예 또는 제77 구현예에 있어서, 적어도 하나의 항원 결합 도메인은 Fc 영역에 대해 아미노-말단에 위치하고/하거나 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 제1 또는 제2 폴리펩티드 중 하나의 CD3 결합 영역에 대해 카르복시-말단에 위치하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0435] 79. 제75 구현예 또는 제77 구현예에 있어서, 적어도 하나의 항원 결합 도메인은 다중특이적 컨스트럭트의 Fc 영역에 대해 아미노-말단에 위치하고 제2 항원 결합 도메인은 다중특이적 컨스트럭트의 CD3 결합 영역에 대해 카르복시-말단에 위치하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0436] 80. 제1 내지 제79 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 항원 결합 도메인, 또는 항원 결합 도메인들 중 각각은 독립적으로 TAA의 천연의 동족 (cognate) 결합 파트너의 세포외 도메인 또는 이의 결합 단편, 또는 TAA에 대한 결합 활성을 나타내는 이의 변이체를 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0437] 81. 제1 내지 제79 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 항원 결합 도메인, 또는 항원 결합 도메인들 중 각각은 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 Fab 단편, F(ab')2 단편, Fv 단편, scFv, scAb, dAb, 단일 도메인 중쇄 항체, 및 단일 도메인 경쇄 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0438] 82. 제81 구현예에 있어서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 Fv, scFv, Fab, 단일 도메인 항체 (sdAb), VNAR, 또는 VHH인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0439] 83. 제81 구현예 또는 제82 구현예에 있어서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 sdAb인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0440] 84. 제83 구현예에 있어서, sdAb는 인간 또는 인간화 sdAb인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0441] 85. 제83 구현예 또는 제84 구현예에 있어서, sdAb는 VHH, VNAR, 조작된 VH 도메인 또는 조작된 VK 도메인인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0442] 86. 제81 구현예 또는 제82 구현예에 있어서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 scFv인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0443] 87. 제81 구현예 또는 제82 구현예에 있어서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 Fab인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0444] 88. 제87 구현예에 있어서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는:

[0445] (i) 이종이량체 Fc 영역의 제1 Fc 폴리펩티드, 링커 및 항-CD3 항체 또는 항원 결합 단편의 VH 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드;

[0446] (ii) 이종이량체 Fc 영역의 제2 Fc 폴리펩티드, 링커 및 항-CD3 항체 또는 항원 결합 단편의 VL 도메인을 포함하느 제2 폴리펩티드, 및

[0447] (iii) 종양-관련 항원에 결합하는 Fab 항체 단편의 VH-CH1 (Fd) 또는 VL-CL을 포함하는 제3 폴리펩티드를 포함하고,

[0448] 여기서 제1 및/또는 제2 폴리펩티드는 Fab 항체 단편의 VH-CH1 (Fd) 또는 VL-CL 중 나머지 다른 하나를 더 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0449] 89. 제88 구현예에 있어서, 제1 또는 제2 폴리펩티드 중 단 하나만 Fab 항체 단편의 VH-CH1 (Fd) 또는 VL-CL 중 나머지 다른 하나를 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0450] 90. 제89 구현예에 있어서, 제1 또는 제2 폴리펩티드 둘 다는 Fab 항체 단편의 VH-CH1 (Fd) 또는 VL-CL의 다른 하나를 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0451] 91. 제89 구현예 또는 제90 구현예에 있어서, Fab 항체 단편의 VH-CH1 (Fd) 또는 VL-CL 중 나머지 다른 하나는 Fc 영역에 대해 아미노-말단에 위치하고/하거나 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 제1 또는 제2 폴리펩티드

중 하나의 CD3 결합 영역에 대해 카르복시-말단에 위치하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0452] 92. 제89 내지 제91 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, Fab 항체 단편의 VH-CH1 (Fd) 또는 VL-CL의 나머지 다른 하나는 제1 폴리펩티드 또는 제2 폴리펩티드의 Fc 영역에 대해 아미노-말단 및 제1 또는 제2 폴리펩티드의 나머지 다른 하나의 CD3 결합 영역에 대해 카르복시-말단에 위치하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0453] 93. 제1 내지 제92 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 항원 결합 도메인 또는 항원 결합 도메인들 중 각각은 독립적으로 1-92-LFA-3, 5T4, 알파-4 인테그린, 알파-V 인테그린, 알파4베타1 인테그린, 알파4베타7 인테그린, AGR2, 항-루이스-Y, 아펠린 J 수용체, APRIL, B7-H3, B7-H4, BAFF, BTLA, C5 보체, C-242, CA9, CA19-9, (루이스 a), 탄산무수화효소 9, CD2, CD3, CD6, CD9, CD11a, CD19, CD20, CD22, CD24, CD25, CD27, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD40L, CD41, CD44, CD44v6, CD47, CD51, CD52, CD56, CD64, CD70, CD71, CD74, CD80, CD81, CD86, CD95, CD117, CD123, CD125, CD132, (IL-2RG), CD133, CD137, CD138, CD166, CD172A, CD248, CDH6, CEACAM5 (CEA), CEACAM6 (NCA-90), CLAUDIN-3, CLAUDIN-4, cMet, 콜라겐, 크립토 (Cripto), CSFR, CSFR-1, CTLA-4, CTGF, CXCL10, CXCL13, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CYR61, DL44, DLK1, DLL3, DLL4, DPP-4, DSG1, EDA, EDB, EGFR, EGFRviii, 엔도텔린 B 수용체 (ETBR), ENPP3, EpCAM, EPHA2, EPHB2, ERBB3, RSV의 단백질 F, FAP, FGF-2, FGF8, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT-3, 엽산 수용체 알파 (FRα), GAL3ST1, G-CSF, G-CSFR, GD2, GITR, GLUT1, GLUT4, GM-CSF, GM-CSFR, GP IIb/IIIa 수용체, Gp130, GPIIB/IIIA, GPNMB, GRP78, HER2/neu, HER3, HER4, HGF, hGH, HVEM, 히알루로니다아제, ICOS, IFN알파, IFN베타, IFN감마, IgE, IgE 수용체 (FceRI), IGF, IGF1R, IL1B, IL1R, IL2, IL11, IL12, IL12p40, IL-12R, IL-12R베타1, IL13, IL13R, IL15, IL17, IL18, IL21, IL23, IL23R, IL27/IL27R (wsx1), IL29, IL-31R, IL31/IL31R, IL2R, IL4, IL4R, IL6, IL6R, 인슐린 수용체, 재기드 리간드 (Jagged Ligands), 재기드 1, 재기드 2, KISS1-R, LAG-3, LIF-R, 루이스 X, LIGHT, LRP4, LRRC26, Ly6G6D, LyPD1, MCSP, 메소텔린, MRP4, MUC1, 뮤신-16 (MUC16, CA-125), Na/K ATPase, NGF, 니카스트린, 노치 (Notch) 수용체, 노치 1, 노치 2, 노치 3, 노치 4, NOV, OSM-R, OX-40, PAR2, PDGF-AA, PDGF-BB, PDGFR알파, PDGFR베타, PD-1, PD-L1, PD-L2, 포스파티딜-세린, P1GF, PSCA, PSMA, PSGR, RAAG12, RAGE, SLC44A4, 스핑고신 1 포스페이트, STEAP1, STEAP2, TAG-72, TAPA1, TEM-8, TGF베타, TIGIT, TIM-3, TLR2, TLR4, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TMEM31, TNF알파, TNFR, TNFRS12A, TRAIL-R1, TRAIL-R2, 트랜스페린, 트랜스페린 수용체, TRK-A, TRK-B, uPAR, VAP1, VCAM-1, VEGF, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, VISTA, WISP-1, WISP-2, 및 WISP-3 중에서 선택된 종양 항원에 결합하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0454] 94. 제1 내지 제93 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 다중특이적 항원 결합 도메인은 적어도 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인을 포함하고, 여기서, 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 동일한 TAA에 결합하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0455] 95. 제94 구현예에 있어서, 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 동일한 TAA의 상이한 에피토프에 결합하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0456] 96. 제94 구현예에 있어서, 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 동일한 TAA의 동일한 에피토프에 결합하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0457] 97. 제1 내지 제96 구현예에 있어서, 다중특이적 항원 결합 도메인은 적어도 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인을 포함하고 여기서, 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 상이한 TAA에 결합하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0458] 98. 제5 내지 제97 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 제1 항원 결합 도메인과 Fc 영역 사이에 제1 연결 펩티드 (LP1)를 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0459] 99. 제5 내지 제98 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 CD3 결합 영역과 제2 항원 결합 도메인 사이에 제2 연결 펩티드 (LP2)를 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0460] 100. 제5 내지 제99 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 제1 항원 결합 도메인과 Fc 영역 사이에 제1 연결 펩티드 (LP1) 및 CD3 결합 영역과 제2 항원 결합 도메인 사이에 제2 연결 펩티드 (LP2)를 포함하고, 여기서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 N-말단부터 C-말단까지 다음과 같이 구조적 배열을 갖는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트:

[0461] 제1 항원 결합 도메인 - LP1 - Fc 영역 - 링커 - CD3 결합 영역 - LP2 - 제2 항원 결합 도메인.

[0462] 101. 제100 구현예에 있어서, 링커는 절단 가능한 링커인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0463] 102. 제100 구현예 및 제101 구현예에 있어서, 2개의 연결 펩티드는 서로 동일하지 않은, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0464] 103. 제98 내지 제102 구현예에 있어서, LP1 또는 LP2는 독립적으로 약 1개 내지 20개의 아미노산 길이의 펩티드인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0465] 104. 제103 구현예에 있어서, LP1 또는 LP2는 독립적으로 서열번호 10-13, 119, 135, 147, 149에 기재된 임의의 Gly-Ser 링커 또는 GGS이거나 이를 포함하는 펩티드를 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드.

[0466] 105. 제41 내지 제104 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 항-CD3 항체 또는 항원 결합 단편은 Fv 항체 단편인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0467] 106. 제105 구현예에 있어서, Fv 항체 단편은 이황화 안정화 항-CD3 결합 Fv 단편 (dsFv)을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0468] 107. 제41 내지 제106 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 항-CD3 항체 또는 항원-결합 단편은 아미노산 서열 TYAMN (서열번호: 16)을 포함하는 VH CDR1; 아미노산 서열 RIRSKYNNYATYYADSVKD (서열번호 17)를 포함하는 VH CD2; 아미노산 서열 HGNFGNSYVSWFAY (서열번호 18)를 포함하는 VH CDR3, 아미노산 서열 RSSTGAVTTSNYAN (서열번호 19)을 포함하는 VL CDR1; 아미노산 서열 GTNKRAP (서열번호 20)를 포함하는 VL CDR2; 및 아미노산 서열 ALWYSNLWV (서열번호 21)를 포함하는 VL CDR3을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0469] 108. 제106 구현예 또는 제107 구현예에 있어서, 항-CD3 dsFv는:

[0470] 서열번호 14 및 32-62 중 임의의 아미노산 서열 또는 서열번호 14 및 32-62 중 임의의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 서열을 갖는 VH; 및

[0471] 서열번호 15 및 63-81 중 임의의 아미노산 서열 또는 서열번호 14 및 32-62 중 임의의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 서열을 갖는 VL;을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0472] 109. 제106 내지 제108 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 항-CD3 dsFv는 서열번호 14의 아미노산 서열 및 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0473] 110. 제102 내지 제104 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 항-CD3 dsFv는 서열번호 44의 아미노산 서열 및 서열번호 72의 아미노산 서열을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0474] 111. 제1 내지 제109 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 제제에 결합되는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0475] 112. 제111 구현예에 있어서, 제제는 치료제, 항신생물제, 독소 또는 이의 단편, 검출가능한 성분 또는 진단제인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0476] 113. 제112 구현예에 있어서, 제제는 링커를 통해 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트에 결합되는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0477] 114. 제1 내지 제113 구현예 중 어느 한 구현예의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(들).

[0478] 115. 제1 내지 제113 구현예 중 어느 한 구현예의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트 중 임의의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 폴리펩티드 사슬을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

[0479] 116. 제1 내지 제115 구현예 중 어느 한 구현예의 다중특이적 컨스트럭트의 제1 폴리펩티드를 코딩하는 제1 핵산 서열 및 상기 다중특이적 컨스트럭트의 제2 폴리펩티드를 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드로서, 여기서 제1 및 제2 핵산 서열은 내부 리보솜 도입 부위 (IRES), 또는 자가-절단가능한 펩티드 또는 리보솜 스킵핑 (skipping)을 초래하는 펩티드를 코딩하는 핵산에 의해 분리되는, 폴리뉴클레오티드.

[0480] 117. 제116 구현예에 있어서, 제1 핵산 서열 및 제2 핵산 서열은 동일한 프로모터에 작동가능하게 연결되는, 폴리뉴클레오티드.

[0481] 118. 제116 구현예 또는 제117 구현예에 있어서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 제3 폴리펩티드 사슬을

포함하고, 폴리뉴클레오티드는 다중특이적 컨스트럭트의 제3 폴리펩티드를 코딩하는 제3 핵산을 더 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

[0482] 119. 제118 구현예에 있어서, 제3 핵산은 내부 리보솜 도입 부위 (IRES), 또는 자가-절단 펩티드 또는 리보솜 스킵핑 (skipping)을 초래하는 펩티드를 코딩하는 핵산에 의해 제1 및/또는 제2 폴리펩티드로부터 분리되고/되거나 제3 핵산 서열은 제1 및/또는 제2 핵산 서열로서 동일한 프로모터에 작동가능하게 연결되는, 폴리뉴클레오티드.

[0483] 120. 제116 내지 제119 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 자가-절단 펩티드 또는 리보솜 스킵핑 (skipping)을 초래하는 펩티드를 코딩하는 핵산은 T2A, P2A, E2A 또는 F2A로부터 선택되는, 폴리뉴클레오티드.

[0484] 121. 제114 내지 제120 구현예 중 어느 한 구현예의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 벡터.

[0485] 122. 제121 구현예에 있어서, 발현 벡터인 벡터.

[0486] 123. 제121 또는 122 구현예에 있어서, 바이러스 벡터 또는 진핵생물 벡터이며, 선택적으로 진핵생물 벡터는 포유동물 벡터인, 벡터.

[0487] 124. 제114 내지 제120 구현예 중 어느 한 구현예의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드들, 또는 제121 내지 제123 구현예 중 어느 한 구현예의 벡터 또는 벡터들을 포함하는 세포.

[0488] 125. 제124 구현예에 있어서, 세포는 재조합 또는 분리된 것인, 세포.

[0489] 126. 제125 구현예에 있어서, 세포는 포유동물 세포인, 세포.

[0490] 127. 제126 구현예에 있어서, 세포는 HEK293 또는 CHO 세포인, 세포.

[0491] 128. 제114 내지 제120 구현예 중 어느 한 구현예의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드들 또는 제121 내지 제123 구현예의 중 어느 한 구현예의 벡터 또는 벡터들을 세포에 도입하는 단계 및 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트를 제조하기 위한 조건 하에 상기 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트를 제조하는 방법.

[0492] 129. 제124 내지 제127 구현예 중 어느 한 구현예의 세포를 다중특이적 폴리펩티드가 상기 세포에 의해 생산되는 조건 하에서 배양하는 단계를 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트를 제조하는 방법.

[0493] 130. 제128 또는 제129 구현예에 있어서, 세포는 포유동물 세포인, 세포.

[0494] 131. 제130 구현예에 있어서, 세포는 HEK293 또는 CHO 세포인, 세포.

[0495] 132. 제128 구현예 또는 제129 구현예에 있어서, 세포로부터 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트를 분리 또는 정제하는 단계를 더 포함하는, 방법.

[0496] 133. 제128 내지 제132 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 이종이량체인, 방법.

[0497] 134. 제128 내지 제133 구현예 중 어느 한 구현예의 방법에 의해 제조되는 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0498] 135. 제1 내지 제113 구현예 또는 제134 구현예 중 어느 한 구현예의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물.

[0499] 136. 제135 구현예에 있어서, 멸균된 약학 조성물.

[0500] 137. 표적 세포와 T 세포를 제1 내지 제113 구현예 또는 제134 구현예 중 어느 한 구현예의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트 또는 제109 구현예 또는 제110 구현예의 약학 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는 면역 반응을 자극 또는 유도하는 방법으로, 상기 표적 세포는 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트에 의해 인식되는 종양 관련 항원을 발현하는, 면역 반응을 자극 또는 유도하는 방법.

[0501] 138. 제137 구현예에 있어서, 표적 세포는 종양 관련 항원 (TAA)을 발현하는 종양 세포인, 방법.

[0502] 139. 제138 구현예 또는 제138 구현예에 있어서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 프로테아제에 대한 기질로서 기능하는 절단가능한 링커를 포함하고 면역 반응을 유도 또는 자극하는 것은 프로테아제의 존재 시 증가하는, 방법.

[0503] 140. 제139 구현예에 있어서, 프로테아제는 면역 효과기 세포, 종양, 또는 종양 미세환경에 존재하는 세포에 의

해 생산되는, 방법.

[0504] 141. 제139 구현예 또는 제140 구현예에 있어서, 프로테아제는 면역 효과기 세포에 의해 생산되고 상기 면역 효과기 세포는 활성화된 T 세포, 자연 살해 (NK) 세포, 또는 NK 세포인, 방법.

[0505] 142. 제141 구현예에 있어서, 면역 효과기 세포는 항원을 발현하는 세포에 근접해 있는, 방법.

[0506] 143. 제137 내지 제142 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 프로테아제는 조직에서 TAA를 발현하는 세포에 근접해 있는 종양에 의해 생성되고/되거나 조직에서 TAA로 공동-국소화된 종양에 의해 생산되고, 여기서, 프로테아제는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트가 프로테아제에 노출될 때, 상기 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 절단가능한 링커를 절단하는, 방법.

[0507] 144. 제137 내지 제143 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 프로테아제는 매트립타아제, 기질금속단백질분해효소 (MMP), 그랜자임 B, 및 이들의 조합 중에서 선택되는, 방법.

[0508] 145. 제144 구현예에 있어서, 프로테아제는 그랜자임 B인, 방법.

[0509] 146. 제137 내지 제145 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 접촉은 탈체 (ex vivo) 또는 생체 외 (in vitro)에서 수행되는, 방법.

[0510] 147. 제137 내지 제145 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 접촉은 개체의 생체 내 (in vivo)에서 수행되는, 방법.

[0511] 148. 제1 내지 제113 구현예 또는 제134 구현예 중 어느 한 구현예의 다중특이적 접합체 또는 제109 구현예 또는 제110 구현예의 약학 조성물의 치료학적 유효량을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 개체 내에서 면역 반응을 자극 또는 유도하는 방법.

[0512] 149. 제137 내지 제147, 및 제148 구현예에 있어서, 세포-매개 면역을 증가시키는 방법.

[0513] 150. 제137 내지 제147, 제148 및 제149 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, T-세포 활성을 증가시키는, 방법.

[0514] 151. 제137 내지 제147, 제148 내지 제150 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 세포 용해성 T-세포 (CTL) 활성을 증가시키는, 방법.

[0515] 152. 제137 내지 제147, 제148 내지 제151 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 면역 반응은 종양 또는 암에 대해 증가하는, 방법.

[0516] 153. 제137 내지 제147, 제148 내지 제152 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 방법은 개체의 질병 또는 질환을 치료하는, 방법.

[0517] 154. 제1 내지 제113 구현예 중 어느 한 구현예의 다중특이적 접합체 또는 제135 구현예 또는 제136 구현예의 약학 조성물의 치료학적 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 개체의 질병 또는 질환을 치료하는 방법.

[0518] 155. 제153 구현예 또는 제154 구현예에 있어서, 질병 또는 질환은 종양 또는 암인, 방법.

[0519] 156. 제147, 148-155 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 개체는 인간인, 방법.

[0520] 157. 제1 구성요소와 제2 구성요소를 포함하는, 비활성 상태의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트로서, 여기서 제1 및 제2 구성요소는 작동가능하게 연결되고, 제1 및 제2 구성요소 각각은 종양 관련 항원 (TAA)에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하며, 제1 구성요소는 Fc 영역을 포함하고, 제2 구성요소는 CD3-결합 영역을 포함하며, 제1 및 제2 구성요소는 절단가능한 링커로 결합되는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0521] 158. 제157 구현예에 있어서, 비활성 상태에서, CD3에 대한 CD3-결합 영역의 결합은 억제되거나 또는 실질적으로 감소되는, 다중특이적 폴리펩티드.

[0522] 159. 제157 구현예에 있어서, 비활성 상태에서, 제1 및 제2 구성요소는 작동가능하게 연결되지 않은, 다중특이적 폴리펩티드.

[0524] *160. 제157 구현예에 있어서, 비활성 상태에서, 제2 구성요소는 CD3의 엡실론 사슬 (CD3ε) 및 종양 관련 항원 (TAA)에 결합하는, 다중특이적 폴리펩티드.

[0525] 161. 활성 상태에서 CD3의 엡실론 사슬 (CD3ε) 및 종양 관련 항원 (TAA)에 결합하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트로서, 상기 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는:

[0526] TAA 상의 제1 에피토프에 결합하는 제1 항원 결합 도메인;

[0527] CD3ε에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편;

[0528] 면역글로불린 Fc 폴리펩티드 영역;

[0529] TAA 상의 제2 에피토프에 결합하는 제2 항원 결합 도메인; 및

[0530] 면역글로불린 Fc 폴리펩티드 영역 및 제2 항원 결합 도메인에 결합된 절단가능한 링커를 포함하고, 여기서, 절단가능한 링커는 프로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0531] 162. 제161 구현예에 있어서, 프로테아제는 면역 효과기 세포에 의해 생산되는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0532] 163. 제162 구현예에 있어서, 면역 효과기 세포는 TAA를 발현하는 세포에 근접해 있는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0533] 164. 제161 내지 제163 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 프로테아제는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트가 상기 프로테아제에 노출될 때, 상기 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트에서 절단 가능한 링커를 절단하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0534] 165. 제161 구현예에 있어서, 프로테아제는 조직에서 TAA를 발현하는 세포에 근접해 있는 종양에 의해 생산되거나/되고 조직에서 TAA로 공동-국소화된 종양에 의해 생산되며, 여기서 프로테아제는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트가 상기 프로테아제에 노출될 때, 상기 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트에서 절단 가능한 링커를 절단하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0535] 166. 제161 구현예에 있어서, 절단 가능한 링커는 최대 25개 아미노산 길이의 폴리펩티드인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0536] 167. 제161 구현예에 있어서, 절단가능한 링커는 매트립타아제, 기질금속단백질분해효소 (MMP), 그랜자임 B, 및 이들의 조합에 대한 기질인, 다주특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0537] 168. 제161 구현예에 있어서, 절단가능한 링커는 서열번호 24-31로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0538] 169. 제161 구현예에 있어서, 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인 각각은 Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편, Fv 단편, scFv, scAb, dAb, 단일 도메인 중쇄 항체, 및 단일 도메인 경쇄 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체 또는 이의 항원-결합 단편인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0539] 170. 제169 구현예에 있어서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 Fv, scFv, a Fab, 단일 도메인 항체 (sdAb), V_{NAR}, 또는 VHH인, 다중특이적 융합 폴리펩티드.

[0540] 171. 제169 구현예에 있어서, 항체 또는 항원-결합 단편은 sdAb인, 다중특이적 융합 폴리펩티드.

[0541] 172. 제171 구현예에 있어서, sdAb는 인간 또는 인간화 sdAb인, 다중특이적 융합 폴리펩티드.

[0542] 173. 제171 구현예에 있어서, sdAb는 VHH, V_{NAR}, 조작된 VH 도메인 또는 조작된 VK 도메인인, 다중특이적 융합 폴리펩티드.

[0543] 174. 제161 구현예에 있어서, 면역글로불린 Fc 영역 폴리펩티드는 서열번호 1-2로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 사열을 포함하는, 다중특이적 융합 폴리펩티드.

[0545] *175. 제174 구현예에 있어서, 면역글로불린 Fc 영역 폴리펩티드는 FcηR 결합을 향상시키는 적어도 하나의 변형을 포함하는, 다중특이적 융합 폴리펩티드.

[0546] 176. 제175 구현예에 있어서, 변형은 Ser239 또는 I1e332에서의 변형인, 다중특이적 융합 폴리펩티드.

[0547] 177. 제174 구현예에 있어서, 면역글로불린 Fc 글리코실화는 비변형 Fc 영역에 비해 FcηR 결합을 향상시키기

위해 변형되는, 다중특이적 융합 폴리펩티드.

[0548] 178. 제177 구현예에 있어서, 면역글로불린 Fc 글리코실화는 푸코오스 함량이 결여되어 있거나 푸코오스 함량을 감소시키는, 다중특이적 융합 폴리펩티드.

[0549] 179. 제174 구현예에 있어서, 면역글로불린 Fc 영역 폴리펩티드는 이종이량체화를 유도하는 적어도 하나의 변형을 포함하는, 다중특이적 융합 폴리펩티드.

[0550] 180. 제179 구현예에 있어서, 변형은 Thr366, Leu368, 및 Tyr407, 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 위치인, 다중특이적 융합 폴리펩티드.

[0551] 181. 제180 구현예에 있어서, 변형은 Thr366Ser, Leu368Ala, Tyr407Val, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 다중특이적 융합 폴리펩티드.

[0552] 182. 제181 구현예에 있어서, Ser354, Y349, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 위치에서의 비-시스테인 잔기에서 시스테인 잔기로의 변형을 더 포함하는, 다중특이적 융합 폴리펩티드.

[0553] 183. 제181 구현예에 있어서, Ile235 잔기에서의 변형을 더 포함하는, 다중특이적 융합 폴리펩티드.

[0554] 184. 제183 구현예에 있어서, 변형은 Ile235Arg인, 다중특이적 융합 폴리펩티드.

[0555] 185. 제174 구현예에 있어서, 면역글로불린 Fc 영역 폴리펩티드는 Ile235 잔기에서의 변형을 포함하는, 다중특이적 융합 폴리펩티드.

[0556] 186. 제185 구현예에 있어서, 변형은 Ile235Arg인, 다중특이적 융합 폴리펩티드.

[0557] 187. 제174 구현예에 있어서, 면역글로불린 Fc 영역 폴리펩티드는 FcRn 결합을 향상시키는 적어도 하나의 변형을 포함하는, 다중특이적 융합 폴리펩티드.

[0558] 188. 제187 구현예에 있어서, 변형은 Met252, Ser254, Thr256, Met428, Asn434, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 위치인, 다중특이적 융합 폴리펩티드.

[0559] 189. 제188 구현예에 있어서, 변형은 Met252Y, Ser254T, Thr256E, Met428L, Met428V, Asn434S, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 위치인, 다중특이적 융합 폴리펩티드.

[0560] 190. 제187 구현예에 있어서, 변형은 Met252 위치 및 Met428 위치인, 다중특이적 융합 폴리펩티드.

[0561] 191. 제190 구현예에 있어서, 변형은 Met252Y 및 M428L인, 다중특이적 융합 폴리펩티드.

[0562] 192. 제190 구현예에 있어서, 변형은 Met252Y 및 M428V인, 다중특이적 융합 폴리펩티드.

[0563] 193. 제161 구현예에 있어서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 제1 항원 결합 도메인과 면역글로불린 Fc 폴리펩티드 영역 사이에 제1 연결 펩티드 (LP1)를 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0564] 194. 제161 구현예에 있어서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 항-CD3 결합 도메인과 제2 항원 결합 도메인 사이에 제2 연결 펩티드 (LP2)를 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0565] 195. 제161 구현예에 있어서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 제1 항원 결합 도메인과 면역글로불린 Fc 폴리펩티드 영역 사이에 제1 연결 펩티드 (LP1) 및 항-CD3 결합 도메인과 제2 항원 결합 도메인 사이에 제2 연결 펩티드 (LP2)를 포함하고, 여기서 비절단된 상태의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 N-말단부터 C-말단까지 다음과 같이 구조적 배열을 갖는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트:

[0566] 제1 항원 결합 도메인 - LP1 - 면역글로불린 Fc 폴리펩티드 링커 영역 - 절단 가능한 링커 - 항-CD3 결합 도메인 - LP2 - 제2 항원 결합 도메인.

[0567] 196. 제195 구현예에 있어서, 2개의 연결 펩티드는 서로 동일하지 않은, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0568] 197. 제195 구현예에 있어서, LP1 및 LP2 각각은 약 1개 내지 20개의 아미노산 길이의 펩티드인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0569] 198. 제161 구현예에 있어서, CD3ε에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 Fv 항체 단편인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0570] 199. 제198 구현예에 있어서, Fv 항체는 이황화 안정화 항-CD3 결합 Fv 단편 (dsFv)을 포함하는, 다중특이적 폴

리펩티드 컨스트럭트.

[0571] 200. 제199 구현예에 있어서, 항-CD3 dsFv는 아미노산 서열 TYAMN (서열번호 16)을 포함하는 VH CDR1; 아미노산 서열 RIRSKYNNYATYYADSVKD (서열번호 17)를 포함하는 VH CDR2; 아미노산 서열 HGNFGNSYVSWFAY (서열번호 18)을 포함하는 VH CDR3, 아미노산 서열 RSSTGAVTTSNYAN (서열번호 19)을 포함하는 VL CDR1; 아미노산 서열 GTNKRAP (서열번호 20)를 포함하는 VL CDR2; 및 VL CDR3 아미노산 서열 ALWYSNLWV (서열번호 21)를 포함하는 VL CDR3을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0572] 201. 제198 구현예에 있어서, 항-CD3 결합 Fv를 포함하는 VH 및 VL은 이종이량체 Fc의 다른 측들(opposite sides)에 연결되는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0573] 202. 제200 구현예에 있어서, 항-CD3 dsFv는 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0574] 203. 제200 구현예에 있어서, 항-CD3 dsFv는 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0575] 204. 제200 구현예에 있어서, 항-CD3 dsFv는 서열번호 14의 아미노산 서열 및 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0576] 205. 제204 구현예에 있어서, 항-CD3 dsFv는 서열번호 32-81로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0577] 206. 제204 구현예에 있어서, 항-CD3 dsFv는 서열번호 32-62로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 및 서열번호 63-81로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열의 조합을 포함하는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0578] 207. 제1 내지 제206 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트는 제제에 결합되는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0579] 208. 제207 구현예에 있어서, 제제는 치료제, 항신생물제, 독소 또는 이의 단편, 검출가능한 성분 또는 진단제인, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0580] 209. 제207 구현예에 있어서, 제제는 링커를 통해 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트에 결합되는, 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트.

[0581] 210. 제1 내지 제209 구현예 중 어느 한 구현예의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트를 포함하는, 약학 조성물.

[0582] 211. 제157 내지 제209 구현예 중 어느 한 구현예의 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트 또는 제210 구현예의 약학 조성물을 질환과 관련된 임상 적응증의 증상을 완화하기에 충분한 양으로 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 개체의 질환과 관련된 임상 적응증의 증상을 치료 또는 완화하는 방법.

[0583] 212. 제211 구현예에 있어서, 상기 개체는 인간인, 방법.

[0584] 213. 제211 구현예에 있어서, 질환은 암인, 방법.

[0585] **VI. 실시예**

[0586] 다음의 실시예는 단지 예시적 목적으로 포함되며 본 발명의 범위를 제한하려는 의도는 아니다.

실 시 예 1

[0587] **제한된 CD3 결합 단백질을 생산하는 방법**

[0588] 실시예 1은 제한 CD3 결합을 나타내는 CD3 결합 영역을 함유하는 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 제조 및 발현을 기재한다. 다중특이적 컨스트럭트는 **도 1, 도 2, 도 3, 도 4a-4c, 도 5a-5e, 도 6a-6b, 도 7, 도 8 및 도 9**에 나타난 바와 같이, CD3 결합 영역에 링커 (예를 들어, 절단가능한 링커)에 의해 결합된 면역글로불린의 이종이량체 Fc 영역, 및 Fc 영역에 대해 아미노-말단 및/또는 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 CD3 결합 영역에 대해 카르복시-말단에 위치한 종양 관련 항원 (TAA)에 결합하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 함유하는 다양한 구성으로 제작되었다. 상이한 TAA 항원 결합 도메인과 링커를 갖는 예시의 대표적인 컨스트럭트가 제조되었다.

[0589] 이종이량체 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 적어도 제1 폴리펩티드 사슬 및 제2 폴리펩티드 사슬을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 제조되고 발현을 위한 플라스미드로 클로닝되었다. 제1 폴리펩티드 사슬은 일반적으로, N-말단부터 C-말단까지 순서대로 Fc 홀 (hole) 폴리펩티드 (예를 들어, 서열번호 83에 기재됨); 프로테아제에 대해 하나 이상의 기질 인식 부위를 함유하는 것과 같은, 절단가능한 링커; 및 dsFv 항-CD3 항체의 가변 경 (VL) 도메인 (예를 들어, 서열번호 72에 기재됨)을 포함한다. 제2 폴리펩티드 사슬은 일반적으로, N-말단부터 C-말단까지 순서대로 Fc 노브 (knob) 폴리펩티드 (예를 들어, 서열번호 82에 기재됨); 제1 폴리펩티드 사슬과 동일한 절단가능한 링커; 및 dsFv 항-CD3 항체의 가변 중 (heavy) 도메인 (예를 들어, 서열번호 44에 기재됨)을 포함한다. 언급된 경우를 제외하고, 예시적인 절단가능한 링커인, 그랜자임 B에 대한 기질 인식 부위를 함유하는 GGSGGGGIEPDIGGSGGS (서열번호 105)가 예시적인 컨스트럭트에 사용되었다. 유사한 링커, TGGSGGGGIEPDIGGSGGS (서열번호 148)가 FRα를 함유하는 예시적인 컨스트럭트 cx1547에 사용되었다. 예시적인 컨스트럭트 cx309의 경우, 예시적인 절단가능한 링커 GSPAGLEADGSRQARVGS (서열번호 166)가 사용되었다. 유사한 컨스트럭트가 다른 노브-인투-홀 구성, 예컨대 기재된 임의의 것을 포함하는 다른 이종이량체 Fc 구성; 다른 절단가능한 링커를 포함하는 다른 링커, 특히 그랜자임 B, 매트립타아제 및/또는 MMP와 같은, 프로테아제에 대한 기질 인식 부위를 포함하는 폴리펩티드 링커; 및 dsFv 또는 다른 1가 단편을 포함하는 다른 항-CD3 항체를 포함하는 다른 CD3-결합 영역; 또는 scFv, sdAb 또는 Fab 형태와 같은 다른 TAA 항원-결합 단편을 사용하여 제작될 수 있다.

[0590] 일부의 경우, 유사한 컨스트럭트가 비-절단가능한 링커를 함유하는 것을 제외하고 제작될 수 있다. 비-절단가능한 링커는 3-18개 범위의 아미노산 크기의 링커를 포함하였다. 예시의 제조된 분자에 사용된 비-절단가능한 링커의 예는 GGS (예를 들어, 예시적인 컨스트럭트 cx1356에 포함됨), GGSGGS (서열번호 10, 예시적인 컨스트럭트 cx1357에 포함됨), GGSGGSGGS (서열번호 11, 예시적인 컨스트럭트 cx1358에 포함됨), GGSGGSGGSGGS (서열번호 12, 예시적인 컨스트럭트 cx1359에 포함됨), GGSGGSGGSGGSGGS (서열번호 13, 예시적인 컨스트럭트 cx1360에 포함됨), 및 GGGGGSGGGGGSGGGGGS (서열번호 119) 또는 GGSGGGGSGGGGSGGGGS (서열번호 147, 예시적인 컨스트럭트 cx681에 포함됨)였다.

[0591] 폴리펩티드 사슬 중 하나 또는 둘 다는, 다양한 구성으로, 추가적으로 Fc 도메인에 대한 아미노 말단 및/또는 CD3 결합 영역에 대한 카르복시 말단의 하나 이상의 TAA 항원 결합 도메인을 코딩하였다. TAA가 단일 사슬 단편, 예를 들어, sdAb 또는 scFv로 제공된 경우, TAA 항원 결합 도메인은 펩티드 링커, 예를 들어, PGGGG (서열번호 102)에 의해 Fc 이종이량체의 하나 또는 둘 다의 폴리펩티드 사슬 (예를 들어, 홀 및/또는 노브)에 대한 N-말단에 연결되었고/되었거나 펩티드 링커, 예를 들어, GGGG (서열번호 103)에 의해 CD3 결합 영역의 하나 또는 둘 다의 도메인 (예를 들어, VH 및/또는 VL)에 대한 C-말단에 연결되었다. 다른 유사한 펩티드 링커가 적용될 수 있다. TAA가 cx3313 또는 cx3315로 지정된 예시적인 컨스트럭트에서와 같이 Fab로서 제공될 때, Fab의 경쇄를 코딩하는 추가의 폴리뉴클레오티드는 플라스미드로 클로닝되었다. 이 예에서, 코딩된 폴리펩티드는 Fab의 VH-CH1 (Fd)가 Fc 이종이량체의 하나 또는 둘 다의 폴리펩티드 사슬의 N-말단에 연결되었고/되었거나 상기와 유사한, CD3 결합 영역 중 하나 또는 둘 다의 도메인의 C-말단에 연결되었던 하나 이상의 폴리펩티드 사슬을 포함하였다. 제3 폴리펩티드는 VL-CL of the Fab의 VL-CL을 코딩하였다. TAA에 결합하는 임의의 항원 결합 도메인은 제공된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트에 적용될 수 있다.

[0592] 예시의 제조된 단백질은 다음의 종양 관련 항원 중 하나에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하였다: 엽산 수용체 알파 (FRα), B7H3, EGFR, 5T4, CD20, 및 DLL3. 제조된 단백질은 Fab 또는 scFv로서 조립된 VH 및 VL 서열로 구성되었거나, 또는, 단일 도메인 항체 (sdAb)로서 결합 도메인을 함유하도록 제조되었다. 다음의 공급원을 비롯하여, sdAb, scFv 및 Fab를 포함하는 본원에 사용된 다양한 TAA-결합 도메인: 서열번호 123에 기재된 바와 같은 cMet sdAb (미국특허번호 US9,346,884호); 서열번호 127 및 128에 기재된 바와 같은 B7H3 Fab 및 scFv와 서열번호 124에 기재된 바와 같은 scFv (PCT 공개번호 WO2017030926호); 서열번호 129, 130, 167, 및 168에 기재된 바와 같은 5T4 scFv (미국특허번호 US8,044,178호); 서열번호 289에 기재된 바와 같은 DLL3 scFv (미국공개번호 US 2017/0037130호); 서열번호 125, 189, 및 190에 기재된 바와 같은 CD20 GA101 (미국공개번호 US 2005/0123546호). 1가, 2가, 3가 또는 4가 결합을 제공하기 위한 것과 같은, 1, 2, 3, 4개의 TAA 항원 결합 도메인을 함유하는 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트가 제조되었다. 일부의 경우, TAA 항원 결합 도메인은 동일하였다. 일부의 경우, TAA 항원 결합 도메인은 상이하여, 제조된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트가 적어도 2개의 상이한 TAA, 동일한 TAA의 상이한 에피토프 또는 동일한 TAA의 동일한 에피토프에 대한 특이성을 나타내었다. 예를 들어, EGFR 및 cMet에 대한 특이성을 갖는 항원 결합 도메인을 함유하는 예시적인 이중 표적화된 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트가 제조되었다 (예를 들어, **도 5c** 및 cx2973, cx2979 및 cx2977로 지정된 예시적

인 컨스트럭트를 참고한다). 또한, B7H3의 동일한 에피토프에 대해 특이적이거나 또는 B7H3의 2개의 상이한 에피토프에 대해 특이적이거나 (예를 들어, **도 6a** 및 각각 cx2846 및 cx3094로 지정된 예시적인 컨스트럭트) 또는 5T4의 동일한 에피토프에 대해 특이적인 (예를 들어, **도 7**, 예시적인 컨스트럭트 cx3252) 상이한 TAA 항원 결합 도메인을 함유하는 예시적인 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트가 제조되었다.

[0593] 폴리뉴클레오티드는, **도 3, 4a(상측 구획)-4c, 5a-5e, 6a-6b, 7, 8**, 및 **9**에 도시된 바와 같은 컨스트럭트를 포함하는, cx1547, cx309, cx1356, cx1357, cx1358, cx1359, cx1360, cx681 및 cx1762 (각각 FRα를 표적화함); cx2513 및 cx3030 (각각 EGFR을 표적화함); cx2973, cx2979, cx2977 (각각 cMET 및 EGFR을 표적화함); cx3095, cx2846, cx3094, cx3314 및 cx3313 (각각 B7H3을 표적화함); cx3315, cx3265 및 cx3262 (각각 5T4를 표적화함); cx3309 (CD20을 표적화함); 및 cx3308 (DLL3을 표적화함)로 지정된 예시적인 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 폴리펩티드 사슬을 코딩하도록 제조되었다. 컨스트럭트는 절단가능한 또는 비-절단가능한 링커를 함유하도록 제조되었다.

[0594] 이종이량체 제한 CD3 결합 단백질의 각 사슬을 코딩하는 개별적인 플라스미드를 폴리에틸렌이민을 이용하여 포유동물 세포 (HEK293 또는 CHO)에 등 몰비로 일시적으로 형질감염시켰다. 상층액에 분비된 재조합 단백질을 수집하고 3-7일 후, 단백질 A 크로마토그래피로 정제하여 예비의 크기 배제 크로마토그래피 (SEC) 또는 플로우-스루 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC) 중 하나를 수행하였다. 이종이량체 단백질은 단백질 A에 결합하지 않도록 위치 I253R 또는 H435R (보통 홀-Fc)에서 이종이량체 Fc의 하나의 사슬에 설계된 돌연변이로 인해 선택적으로 정제되었다. SEC (Superdex-200 수지를 갖는 AKTA) 또는 FT-HIC (부틸/페닐 세파로오스를 갖는 AKTA) 상에서 제2 크로마토그래피 단계는 보다 소수성이고 예상 분자량의 2배인 2개의 이종이량체 Fc를 함유하는 바람직하지 않은 교차-쌍으로된 종을 제거하기 위해 사용되었다.

[0595] 방법은 기재된 바와 같은 Fc 이종이량체 Fc의 적절하게 짝 지어진 종과 이황화 안정화 항-CD3 Fv (서열번호 44에 기재된 바와 같이 돌연변이 G44C를 갖는 항-CD3 VH 및 서열번호 72에 기재된 돌연변이 G100C를 갖는 VL)를 함유하는 이종이량체 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 생산을 선호하였다. 정제된 이종이량체 제한 CD3 결합 단백질은 안정하였고 4℃ 또는 증가된 단백질 농도에서 연장된 배양 시 교차-쌍의 종을 축적하지 않았다.

[0596] **도 10a**는 FRα-표적화 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트인 cx1547의 SDS-PAGE 이미지로, 환원 (R) 및 비-환원 (NR) 조건을 나타낸다 (예상 분자량 135kDa). **도 10b** 및 **10c**는 cx1547의 크기-배제 분석의 크로마토그램 그래프를 나타내며, 이는 137.9kDa의 결정된 분자량을 갖는 단일 종이 관찰되었음을 입증한다.

실 시 예 2

[0597] **유세포 분석에 의한 암 세포 및 원발성 T 세포에 대한 결합**

[0598] 본 실시예는 예시적인 컨스트럭트의 T 세포 또는 암세포에 대한 결합을 평가하는 연구를 기술한다. 이러한 연구는 서로 분리된 T 세포만을 함유하거나 암세포만을 함유하는 단일 배양에서 수행하였다.

[0599] 1. 절단 및 비절단된 상태에서 원발성 (primary) T 세포에 대한 결합

[0600] 본원에서 cx309로 지칭되는 본 발명의 예시적인 다중특이적 폴리펩티드 컨스트럭트의 원발성 T 세포의 표면 상의 CD3에 대한 결합은 매트립타아제, 그랜자임 B, 및 MMP-2에 대한 기질 인식 부위를 함유하는 이의 절단가능한 링커인, GSPAGLEADGSRQARVGS (서열번호 27)의 단백질분해 절단 후에 평가하였다. cx309의 종양 항원 결합 도메인은 원발성 T 세포 상에 발현되지 않는 엽산 수용체 알파 (FRα)에 결합한다.

[0601] 원발성 T 세포는 건강한 인간 공여자 류코팩 (leukopaks)으로부터 분리된 PBMC로부터 음성적으로 농축되었다. 언급된 경우, cx309는 세포에 첨가하기 전에 사전-절단되었으며, SDS-PAGE에 의해 절단이 확인되었다. 구체적으로, cx309는 매트립타아제 (**도 11a**) 또는 기질금속단백질분해효소 2 (MMP-2) (**도 11b**) (절단)에 노출되거나 프로테아제에 노출되지 않았다 (비절단). 절단 또는 비절단된 cx309 컨스트럭트를 세포 상에 적정하거나 단일, 포화 농도로 첨가하였다. 결합된 cx309는 인간 Fc 또는 인간화 vhh 중 하나에 대해 특이적인 형광단-접합 2차 항체로 검출되었고, 결합은 유세포 분석으로 측정되었다. 2차 항체와만 함께 배양된 세포는 음성 대조군으로 역할을 하였다.

[0602] **도 11a 및 11b**에 나타난 바와 같이, 컨스트럭트가 결합 어세이의 개시 전에 Fc와 CD3 결합 도메인 사이의 링커 내에서 매트립타아제 또는 MMP-2에 의해 절단된 후에 cx309는 T 세포에 결합하였다. T 세포에 대한 결합은 비절단된 컨스트럭트에서 관찰되지 않았으며, 이는 절단된, 즉 활성 상태에서, cx309가 T-세포에 결합할 수 있었지만, 비절단된 형태에서는 비검출가능한 T-세포 결합을 나타내었음을 보여준다.

[0603] 2. T 세포 대 항원-발현 암세포에 대한 결합의 비교

[0604] Fc와 CD3 결합 도메인의 구성요소 사이의 다양한 링커를 갖는 추가의 대표적인 FRα-표적화 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트가 상기 기재된 바와 같이 T 세포에 대한 결합 및 FRα 발현 세포 (Ovcar-5)에 대한 결합에 대해 평가되었다. 이 연구를 위해, 100nM의 각 컨스트럭트, cx1356, cx681 또는 cx1547이 사용되었다. Fc와 CD3 결합 도메인의 구성요소 사이의 다양한 링커를 갖는 추가의 대표적인 FRα-표적화 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트는 FRα 발현 세포 (Ovcar-5)에 결합하는 것으로 밝혀졌지만 (**도 12a 및 12c**), T-세포에 결합하는 능력이 결여되었다 (**도 12b** 및 **12d**).

[0605] 유사한 연구에서, 실시예 1에 실질적으로 기재된 바와 같이 제조된 대표적인 EGFR-표적화 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트인 cx3030은 EGFR 발현 세포 (Colo-205)에 결합하는 것으로 밝혀졌지만 (**도 13a**), T 세포 결합 능력이 결여되었다 (**도 13b**). 400nM의 각 컨스트럭트가 사용되었다. 이러한 관찰은 추가로 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트가 분리된 상태에서 약화된 T-세포 결합을 나타낸다는 것을 입증한다.

[0606] **도 14a-14d**에 나타난 바와 같이, 유사한 결과가 대표적인 B7H3-표적화 제한 CD3 인게이저인, cx3313, cx3314 및 cx3095에 대해 관찰되었다. Cx3313 및 cx3314는 실시예 1에 실질적으로 기재된 바와 같이 제조되었고 실시예 1에 기재된 바와 같이 각각 Fab 또는 scFv로서 조립된 동일한 B7H3 VH 및 VL로 구성되었다. cx3095는 단일 도메인 항체인 B7H3 결합 도메인을 함유하였다. **도 14a** 및 **14b**에 나타난 바와 같이, 대표적인 B7H3-표적화 제한 CD3 인게이저는 B7H3을 발현하는 A375 세포에 결합하는 것으로 밝혀졌다. 그러나, **도 14c 및 14d**에 나타난 바와 같이, 동일한 컨스트럭트는 분리된 상태에서 T 세포에 결합할 수 없었다. 이러한 연구에서, 대표적인 B7H3-표적화 제한 CD3 인게이저인 cx3313, cx3314 및 cx3095의 결합을 B7H3 및 CD3을 표적하는 이중-친화도 재-표적화 항체 (DART)-단량체 Fc 형태 (DART-Fc B7H3xCD3; 예를 들어, WO2017030926A1호를 참고한다)와 비교하였다. DART-Fc B7H3xCD3은 서열번호 169, 145, 또는 146에 기재된 바와 같은 B7H3 서열을 함유하였다. 특히 B7H3 관여의 부재시 DART-Fc 형태만이 T-세포 결합을 허용하는 것으로 관찰되었지만 (**도 14c 및 14d**), 모든 형태는 B7H3-발현 세포에 대한 결합을 나타냈다 (**도 14a 및 14b**).

[0607] 추가의 연구에서, 유사한 제한 결합이 실시예 1에 실질적으로 기재된 바와 같이 제조된 대표적인 5T4-표적화 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트인 cx3262 및 cx3315에 대해 관찰되었다. cx3262의 5T4 결합 도메인은 단일 도메인 항체로서 제조된 반면, cx3315의 5T4 결합 도메인은 서열번호 167 및 168에 기재된 바와 같이 유래된 scFv로 제조되었다. (미국특허번호 US8,044,178호를 참고한다). 대표적인 5T4-표적화 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트 둘 다는 5T4 발현 세포 (Ovcar-5)에 결합하는 것으로 밝혀졌지만 (**도 15a**), T-세포 결합 능력은 결여되었다 (**도 15b**). 400nM의 각 컨스트럭트가 사용되었다. 이러한 관찰은 추가로 본원에 기재된 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트가 분리된 상태에서 약화된 T-세포 결합을 나타낸다는 것을 입증한다.

[0608] **도 16a-16d**에 나타난 바와 같이, 대표적인 CD20-표적화 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트인 cx3490이 CD20 발현 세포 (Ramos)에 결합하는 것으로 밝혀졌지만, T-세포 결합 능력을 결여되었다. 100nM의 cx3490 컨스트럭트가 사용되었다. CD20 binding domains of cx3490의 CD20 결합 도메인은 실시예 1에 기재된 바와 같은 CD20 항체 GA101의 VH 및 VL로부터 유래된 scFv였다.

실 시 예 3

[0609] **리포터 어세이를 이용한 CD3 리포터 T 세포 활성화의 평가**

[0610] 본 실시예는 표적 항원-발현 세포와의 공동-배양에서 CD3 NFAT 리포터 Jurkat 세포주를 활성화시키는 다양한 컨스트럭트의 능력의 평가를 기재한다. 이러한 어세이는 CD3-결합 도메인을 통한 T-세포 결합이 분리된 T-세포 상에 제한되거나 억제되지만 (실시예 2에 나타난 바와 같이), 본원에 제공된 다중특이적 폴리펩티드가 동족 항원에 결합되면, 이들이 T-세포를 인게이징할 수 있고 T-세포 활성화를 매개할 수 있다는 것을 입증기 위해 사용된다.

[0611] 1. 루시페라아제 리포터 어세이

[0612] 항원 표적화 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트는 표적 세포와 NFAT-유도된 루시페라아제 리포터 (Promega, USA)를 발현하는, 유전적으로 조작된 Jurkat 세포의 공동 배양물에 적정하였다. 이 어세이에서, CD3의 관여는 NFAT 신호전달 및 세포 내 루시페라아제의 생성을 초래한다. 어세이 플레이트는 37℃에서 약 6시간 동안 배양되었고 그 다음 실온으로 평형화시켰다. Bio-Glo 시약을 샘플 웰에 첨가하고 SpectraMax L 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 상층액의 발광을 측정하였다

[0613] **도 17**에 나타난 바와 같이, 대표적인 FRα-표적화 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트인 cx309는 Fc와 CD3 결합 도메인 사이의 링커에서 절단될 때, T-세포를 활성화시키는 능력이 현저하게 향상되었다. 여기에서, cx309는 분석 개시 전에 매트립타아제로 사전-절단되었다. 특히 T-세포 활성화는 FRα 양성 Ovcar-5 세포주의 존재 시에만 관찰되었다. 비절단된 cx309에서 일부 T-세포 활성화가 관찰되었다. 이러한 결과는 단백질분해 절단 후 증가된 CD3 관여와 함께, 이의 항원에 대한 결합 시, CD3 결합을 나타내는 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트의 능력과 일치한다.

[0614] 2. GFP 리포터 어세이

[0615] 항원 표적화 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트는 표적 세포 및 NFAT-유도 녹색 형광 단백질 (GFP)을 발현하는 조작된 Jurkat 세포의 공동-배양물에 적정하였다. CD3의 관여는 NFAT 신호전달 및 녹색 형광의 생성을 초래한다. 부착성 표적 세포를 이용한 리포터 어세이를 위해, 표적세포를 파종하고, 균일한 분포를 위해 실온에서 정착시키고, 리포터 세포 및 항원 표적화 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트의 첨가 전에 부착을 허용하기 위해 37℃에서 몇 시간 동안 배양하였다. 분석 플레이트를 IncuCyte ZOOM 시스템을 사용하여 연속으로 이미지화하였고 CD3 리포터 세포 활성화는 총 녹색 대상 통합된 강도를 측정함으로써 결정되었다.

[0616] **도 18 및 19a-19d**는 엽산 수용체 (FRα)를 표적화하는 컨스트럭트를 보여주고; **도 20a-20d**는 EGFR 또는 EGFR 및 cMET를 표적하는 컨스트럭트를 보여주며; **도 21a-21b** 및 **22a-22f**는 B7H3을 표적화하는 컨스트럭트를 보여주고; **도 23a-23b** 및 **24**는 5T4를 표적하는 컨스트럭트를 보여주며; **도 25**는 CD20을 표적화하는 컨스트럭트를 보여주고; 그리고 **도 26**은 DLL3을 표적화하는 컨스트럭트를 보여준다. 모든 도면에 나타난 바와 같이, 테스트된 대표적인 컨스트럭트 각각은 증가된 GFP 신호에 의해 나타낸 바와 같이 표적-발현 세포의 존재 시 항원 의존적 T-세포 활성화를 유도할 수 있었다. **도 22a-f**는 활성화 정도가 실시예 2에 기재된 비교기 (comparator) 분자 DART-Fc: B7H3xCD3와 유사하거나, 또는 일부의 경우 이보다 더크다는 것을 보여준다.

[0617] 특히 **도 19a-19d**는 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트의 Fc 부분이 제거된 경우, 무제한 T-세포 관여를 허용하여, 성취되는 향상된 T-세포 활성화 능력을 입증한다. 단백질분해 절단가능한 링커가 Fc와 CD3 결합 도메인 사이에 포함되는 경우, 이러한 CD3 인게이징 컨스트럭트의 Fc는 단백질분해를 통해 제거될 수 있다. cx3238은 완전히 절단된 C-말단 부분을 나타내고, 1) C-말단 FRα-결합 sdAb에 연결된 항-CD3 VH 및 2) FRα-결합 sdAb C-말단에 연결된 항-CD3 VL를 코딩하는 2개의 플라스미드의 공동-발현을 통해 생산되었다. 이 결과는 CD3에 결합하는 CD3 결합 영역의 능력을 제한하는 Fc 도메인의 위치 설정과 일치한다.

실 시 예 4

[0618] **활성에 대한 링커 길이의 평가**

[0619] Fc와 CD3 결합 영역을 포함하는 구성요소 도메인 (VH 및 VL) 사이의 다양한 길이의 링커의 T-세포 활성화 능력에 대한 영향을 실시예 3에 기재된 Jurkat 리포터 어세이를 이용하여 테스트하였다. 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조된, **표 2**에 열거된 다양한 길이의 GlySer-기반 링커를 함유하는 FRα-표적화 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트를 본 어세이에 사용하였다.

표 2

[0620]

테스트된 링커 길이	
서열번호	**링커**
-	gs3: GGS
10	gs6: GGSGGS
11	gs9: GGSGGSGGS
12	gs12: GGSGGSGGSGGS
13	gs15: GGSGGSGGSGGSGGS
119	gs18: GGGGGSGGGGGSGGGGGS
147	gs18: GGSGGGGSGGGGSGGGGS

[0621] **도 27a-27f**에 나타난 바와 같이, 링커의 길이와 T-세포 활성화 능력은 양의 상관관계를 가졌다. T- 세포 활성화 능력은 링커 길이와 직접적으로 관련이 있는 것으로 나타났으며, 더 짧은 링커는 CD3 결합을 더 크게 제한한다는 것을 나타냈다. 중요하게는, 이들 컨스트럭트가 상기 실시예 2에 나타난 바와 같이 분리된 상태 (예를 들어,

표적 TAA에 결합되지 않은 경우 용액 형태)에서 T-세포 결합 능력을 나타내지 않았기 때문에 (**도 12a-12d**), 컨스트럭트의 T-세포 관여는 TAA-결합에 의존적이다. 종합해서, 이들 컨스트럭트는 CD3에 대한 제한 또는 억제된 결합을 나타내었지만, 표적 의존 방식으로 T-세포를 활성화시킬 수 있었다.

실 시 예 5

[0622] **기능적 활성의 평가**

[0623] 본 실시예는 인간 원발성 T 세포 생체 외 (*in vitro*) 어세이에서 테스트된 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트의 평가 및 특성 규명을 기재한다.

[0624] 1. T 세포-매개 세포독성

[0625] 표적 세포를 CytoID 레드로 형광으로 표지하였다. 부착성 표적 세포를 이용하는 세포독성 어세이를 위해, 표적 세포를 파종하고, 균일한 분포를 위해 실온에서 정착시키고, 다른 어세이 구성요소의 첨가 전에 부착을 허용하기 위해 37℃에서 몇 시간 동안 배양하였다. 원발성 T 세포를 건강한 인간 공여자 류코팩 (leukopaks)으로부터 분리된 PBMC로부터 음성적으로 농축되었고 10:1-40:1 T 세포 대 표적 세포 비율로 첨가되었다. 녹색 카스파제-3/7 시약이 첨가되었고, 이는 아폽토시스를 겪고 있는 세포의 핵 DNA를 형광 표지하였다. 항체를 공-배양에 적정하고 IncuCyte ZOOM 시스템을 이용하여 어세이 플레이트를 연속으로 이미지화하였다. 표적 세포 사멸은 총 적색/녹색 중복 대상 영역을 측정함으로써 결정되었다.

[0626] **도 28a-28c**에 나타난 바와 같이, cx1547, FRα-표적화 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트는 항원-의존적 T 세포 활성화를 강력하게 유도하는 능력과 일치하여, 항원 양성 세포주의 T-세포-매개 독성을 유도하지만, 항원 음성 세포주에 대해서는 그렇지 않았다. 유사하게, **도 29a-29f 및 30**에 나타난 바와 같이, B7H3-표적화 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트는 항원 양성 세포주의 강력한 T-세포-매개 독성을 유도하였으나, 하원 음성 세포주에 대해서는 그렇지 않았다. 이러한 컨스트럭트는 대안적인 형태인 DART-Fc B7H3xCD3와 유사한 효능을 나타냈다. 이러한 관찰은 당해 기술분야에 공지된 다른 CD3 인게이징 형태와 비교하여 본원에 제공된 항원-표적화 제한 CD3 형태가 강력한 항원-의존적 T-세포 세포독성 유도 능력을 유지하면서, 분리 시 T-세포 결합이 결여되거나 감소되었다는 것을 뒷받침한다.

[0627] **도 31a-31f**에 나타난 바와 같이, cx2190로 지정된 TAA-결합 도메인에 작동가능하게 연결된 CD3 결합 도메인만을 함유하는 C-말단 단백질분해 산물을 대표하는 컨스트럭트 (도 4c를 참조한다)는 cx1762로 지정된 비절단된 FRα-표적화 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트 (도 4a를 참조한다)와 비교하여 향상된 항원-의존적 T-세포 세포독성 유도 능력을 나타냈다.

[0628] **도 32**에 나타난 바와 같이, 대표적인 5T4-표적화 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트인 cx3315는 5t4 발현 세포주인 Ovcar-5에 대해 특이적인 T-세포 세포독성을 유도하였으나, 5T4 음성 세포주인 CCRF-CEM에 대해서는 그렇지 않았다.

[0629] 2. T 세포 활성화

[0630] T 세포 활성화를 평가하기 위해, T 세포-매개 세포독성 어세이로부터 현탁액 세포를 수집하고 살아있는/죽은 염색 및 형광단-접합 항-CD4, 항-CD8, 항-CD25, 및또는 항-CD71 항체로 염색하였다. 세포를 SONY SA3800 스펙트럼 분석기를 이용하여 분석하였고, CD4+ 또는 CD8+ T 세포 활성화는 CD25 또는 CD71의 발현 수준 또는 CD25- 또는 CD71-양성 백분율을 측정하여 결정하였다.

[0631] **도 33**은 T-세포 및 Ovcar5 세포의 공동-배양에서 절단된 cx309 및 비절단된, 즉, 비활성 cx309 컨스트럭트를 20시간 동안 배양하여 측정된 T 세포 활성화를 나타낸다. 도시된 바와 같이, 절단된 cx309만이 CD3 결합을 통해 FRα-의존적 T-세포 활성화를 매개할 수 있었다. T-세포 활성화는 CD4 및 CD8 집단의 CD25%의 유세포 분석으로 모니터링하였다.

[0632] 추가로, B7H3 TAA를 함유하는 컨스트럭트도 테스트하였다. **도 34a-34h**에 나타난 바와 같이, B7H3-표적화 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트는 또한 CD3 결합을 통해 B7H3-의존적 T-세포 활성화를 매개하였다. 이러한 두 가지 형태에 의한 T-세포 결합의 현저한 차이에도 불구하고, 제한된 CD3 인게이징 컨스트럭트 및 DART-Fc 형태에 의한 T-세포 활성화의 유사한 효능이 관찰되었다 (도 14a-14d).

[0633] 따라서, 결과는 테스트된 항원-표적 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트가 CD4 및 CD8 T-세포 둘 다의 강력한 항원-의존적 활성화를 유도하였다는 것을 입증하였다.

[0634] 3. T 세포 사이토카인 생성 (ELISA)

[0635] T 세포-매개 세포독성 어세이의 상청액을 샌드위치 ELISA (BioLegend, USA)로 IFNɣ 함량에 대해 분석하였다. 제조사의 지시를 따랐고 상청액 샘플의 사이토카인 농도 값이 보간된 (interpolated) 표준 곡선을 생성하였다. 검출 하한 미만의 흡광도 값을 갖는 샘플에는 가장 낮은 표준 농도의 그 절반과 동일한 사이토카인 농도가 할당되었다. **도 35**는 대표적인 B7H3-표적화 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트가 항원 의존 방식으로 T-세포에 의한 IFNɣ 생성을 유도하는 것으로 관찰되었음을 보여준다.

[0636] 4. T 세포 사이토카인 생성 (플루오로스팟)

[0637] FluoroSpot 멤브레인을 4℃에서 밤새 IFNɣ 및 IL-2 포획 항체로 코딩하였다. 멤브레인을 PBS로 세척하고 항체 적정, 표적 세포, 및 PBMC 또는 PBMC로부터 음성적으로 농축된 T 세포를 첨가하였다. 표적 세포 : PBMC 공동-배양의 경우, 세포를 1:20 비율로 파종하였다. 표적 세포 : T 세포 공동-배양의 경우, 세포를 1:10 비율로 파종하였다. 어세이 플레이트를 37℃에서 ~24시간 동안 배양하였고 멤브레인을 제조사 (C.T.L.)의 지시에 준비하였다. 멤브레인을 CTL-ImmunoSpot S6 Universal 분석기를 이용하여 이미지화하였다. 사이토카인 스팟 수를 어세이 웰 사이의 균일한 노출 시간 및 강도 설정을 이용하여 측정하였다. **도 36a-36b** 및 **37**은 각각 FRα 또는 B7H3-의존 방식으로 T-세포로부터 사이토카인 생성을 유도하는 항원-표적화 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트의 능력을 도시한다.

[0638] 5. 해리된 종양 세포 사멸

[0639] 난소암 해리 종양 세포 샘플 (Conversant)을 Zombie Red 및 형광단-접합 항-CD45 및 항-EpCAM 항체로 염색하여 유세포 분석으로 종양 세포 (CD45-/EpCAM+) 및 종양 침윤 면역세포 (CD45+/EpCAM-)를 확인하였다. 염색되지 않은 세포를 96-웰 조직 배양 플레이트에 파종하였고 대표적인 FRα-제한 CD3 인게이징 컨스트럭트 및 재조합 인간 IL-2를 20 nM 및 10ng/mL의 최종 농도로 첨가하였다. 37℃에서 6시간 동안 배양한 후, 상청액 분취액을 샌드위치 ELISA (상기 기술됨)로 IFNɣ 함량의 분석을 위해 수집하였고 비-부착성 세포를 함유하는 남아있는 상청액을 제거하였다. 부착성 세포를 PBS로 부드럽게 세척하여 잔류 현탁액 세포 및 잔해를 제거하고, 배지를 세포에 첨가하고, 어세이 웰을 IncuCyte ZOOM 시스템을 사용하여 이미지화하여 종양 세포 컨플루언시 (confluency)를 시각화하였다. 동일한 부피의 CellTiter-Glo 생존 시약을 샘플 웰에 첨가하고 SpectraMax L 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 발광을 측정하였다. **도 38a-38d**는 이전에 종양 샘플에 침윤되었고 세포독성 및 종양세포 제거를 매개한 T-세포를 활성화하는 항원-표적화 제한 CD3 인게이징 컨스트럭트의 능력을 도시한다.

[0640] **다른 구현예**

[0641] 본 발명은 이의 상세한 설명과 관련하여 기술되었지만, 전술한 설명은 첨부된 청구범위의 범위에 의해 정의되는 본 발명의 범위를 예시하고자 하는 의도일 뿐 제한하는 것은 아니다. 다른 측면들, 이점들, 및 변형들이 다음의 청구범위의 범위 내에 있다.

표 3

[0642] **서열 표**

서열 번호	서열	설명
1	PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK	IgG1 Fc
2	PAPGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK	IgG2 Fc
3	PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK	IgG2 Fc

4	PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFKWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST FRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKT KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESSGQPEN NYNTTPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNIFSCSVMH EALHNRFTQK SLSLSPGK	IgG3 Fc
5	PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	IgG4 Fc
6	PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	IgG4 Fc
7	EPKSSDKTHTCPPC	힌지
8	DKTHTCPPC	힌지
9	ESKYGPPCPPC	힌지
10	GGSGGS	(GGS)2
11	GGSGGSGGS	(GGS)3
12	GGSGGSGGSGGS	(GGS)4
13	GGSGGSGGSGGSGGS	(GGS)5
14	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSA	항-CD3 Hv
15	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGG TNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGT KLTVL	항-CD3 Lv
16	TYAMN	항-CD3 VH CDR1
17	RIRSKYNNYATYYADSVKD	항-CD3 VH CDR2
18	HGNFGNSYVSWFAY	항-CD3 VH CDR3
19	RSSTGAVTTSNYAN	항-CD3 VL CDR1
20	GTNKRAP	항-CD3 VL CDR2
21	ALWYSNLWV	항-CD3 VL CDR3
22	LEAD	그랜자임 B 기질
23	RQAR	그랜자임 B 기질
24	PAGL	MMP 기질
25	TGLEADGSPAGLGRQARVG	링커
26	TGLEADGSRQARVGPAGLG	링커
27	TGSPAGLEADGSRQARVGS	링커
28	TGPAGLGLEADGSRQARVG	링커
29	TGRQARVGLEADGSPAGLG	링커
30	TGSRQARVGPAGLEADGS	링커
31	TGPAGLGSRQARVGLEADGS	링커
32	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	항-CD3 VH1
33	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	항-CD3 VH2
34	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	항-CD3 VH3
35	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	항-CD3 VH4
36	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	항-CD3 VH5

37	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRI RSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	항-CD3 VH6
38	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVGRI RSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHG NFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	항-CD3 VH7
39	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYWGQGTLVTVS	항-CD3 VH8
40	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGQGTTVTVSS	항-CD3 VH9
41	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHG NFGNSYVSYFAYWGQGTTVTVSS	항-CD3 VH10
42	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	항-CD3 VH11
43	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVKP	항-CD3 VH12
44	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVKP	항-CD3 VH13
45	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGCGTLVTVKP	항-CD3 VH14
46	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	항-CD3 VH15
47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRI RSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	항-CD3 VH16
48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRI RSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	항-CD3 VH17
49	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKCLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	항-CD3 VH18
50	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVSRI RSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	항-CD3 VH19
51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKCLEWVSRI RSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	항-CD3 VH20
52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKCLEWVGRI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	항-CD3 VH21
53	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	항-CD3 VH22
54	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	항-CD3 VH23

55	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	항-CD3 VH24
56	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	항-CD3 VH25
57	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKCLEWVSRI RSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	항-CD3 VH26
58	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPGKCLEWVGRI RSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHG NFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	항-CD3 VH27
59	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKCLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYWGQGTLVTVS	항-CD3 VH28
60	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGQGTTVTVSS	항-CD3 VH29
61	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHG NFGNSYVSYFAYWGQGTTVTVSS	항-CD3 VH30
62	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	항-CD3 VH31
63	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGG TNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGT KLTVL	항-CD3 VL1
64	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGG TNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGCGT KLEIK	항-CD3 VL2
65	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGG TNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGT KLTVL	항-CD3 VL3
66	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAFRGLIGG TNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALWYSNLWVFGGGT KLTVL	항-CD3 VL4
67	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAFRGLIGG TNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDESIYFCALWYSNLWVFGGGT KLTVL	항-CD3 VL5
68	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAFRGLIGG TNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCALWYSNLWVFGGGT KLTVL	항-CD3 VL6
69	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGG TNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGT KLTVL	항-CD3 VL7
70	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVL	항-CD3 VL8
71	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAFRGLIGG TNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGT KLEIK	항-CD3 VL9
72	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAFRGLIGG TNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGCGT KLEIK	항-CD3 VL10

73	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQCFRGLIGG TNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGEGT KLEIK	항-CD3 VL11
74	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGG TNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGCGT KLTVL	항-CD3 VL12
75	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGG TNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGT KLEIK	항-CD3 VL13
76	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGG TNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGC GTKLTVL	항-CD3 VL14
77	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAFRGLIGG TNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALWYSNLWVFGGGT KLTVL	항-CD3 VL15
78	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAFRGLIGG TNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDESIYFCALWYSNLWVFGCGT KLTVL	항-CD3 VL16
79	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAFRGLIGG TNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCALWYSNLWVFGCG TKLTVL	항-CD3 VL17
80	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGG TNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGCG TKLTVL	항-CD3 VL18
81	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGCG TKLTVL	항-CD3 VL19
82	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPT	노브 Fc
83	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPT	홀 Fc
84	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPT	노브 Fc
85	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPT	홀 Fc
86	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	노브 Fc

87	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	홀 Fc
88	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG	노브 Fc
89	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG	홀 Fc
90	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNRYTQKSLSLSPT	홀 Fc
91	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNRYTQKSLSLSPT	홀 Fc
92	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNRYTQKSLSLSPG	홀 Fc
93	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNRYTQKSLSLSPG	홀 Fc
94	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVV HEALHNHYTQKSLSLSPT	노브 Fc
95	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVV HEALHNHYTQKSLSLSPT	노브 Fc
96	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVV HEALHNHYTQKSLSLSPG	노브 Fc
97	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVH EALHNHYTQKSLSLSPG	노브 Fc

98	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVH EALHNRYTQKSLSLSPT	홀 Fc
99	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHE ALHNRYTQKSLSLSPT	홀 Fc
100	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVH EALHNRYTQKSLSLSPG	홀 Fc
101	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHE ALHNRYTQKSLSLSPG	홀 Fc
102	PGGGG	펩티드 링커
103	GGGG	펩티드 링커
104	GPAGLGLEPDGSRQARVG	링커
105	GGSGGGGIEPDIGGSGGS	링커
106	GGSGGGGLEADTGGSGGS	링커
107	GSIEPDIGS	링커
108	GSLEADTGS	링커
109	GGSGGGGIEPDGGGSGGS	링커
110	GGSGGGGIEPDVGGSGGS	링커
111	GGSGGGGIEPDSGGSGGS	링커
112	GGSGGGGIEPDTGGSGGS	링커
113	GGGSLEPDGSGS	링커
114	GPAGLGLEADGSRQARVG	링커
115	GGEGGGGSGGSGGGS	링커
116	GSSAGSEAGGSGQAGVGS	링커
117	GGSGGGGLEAEGSGGGGS	링커
118	GGSGGGGIEPDPGGSGGS	링커
119	GGGGGSGGGGGSGGGGGS	링커
120	QLQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDNYAIGWFRQAPGKEREGVSCIS SSDGSTYYADSVKGRFTISRNNAKGTVYLLMNSLKPEDTAVYYCATELVPAC TYSNGRGPLDGMDYWGKGTQVTVKP	FR 알파 sdAb
121	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSIDATAWYRQAPGKQRELVAIITSS GSTNYPESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNAITRYGGSTY DFWGQGTLVTVKP	FR 알파 sdAb
122	EVQPGGSLRLSCAASETFGVVFTLGWYRQAPGKGREFVARVTGTDTVDYAE SVKGRFTISSDFARNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCNTGAYWGQGTLVTVKP	FR 알파 sdAb
123	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFILDYYAIGWFRQAPGKEREGVLCID ASDDITYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCATPIGLSSS CLLEYDYDYWGQGTLVTVKP	cMET sdAb
124	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVAYI SSDSSAIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCGRGRENI YYGSRLDYWGQGTTVTVSSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPSFLSASVGD RVTITCKASQNVDTNVAWYQQKPGKAPKALIYSASYRYSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPFTFGQGTKLEIK	B7H3 scFv

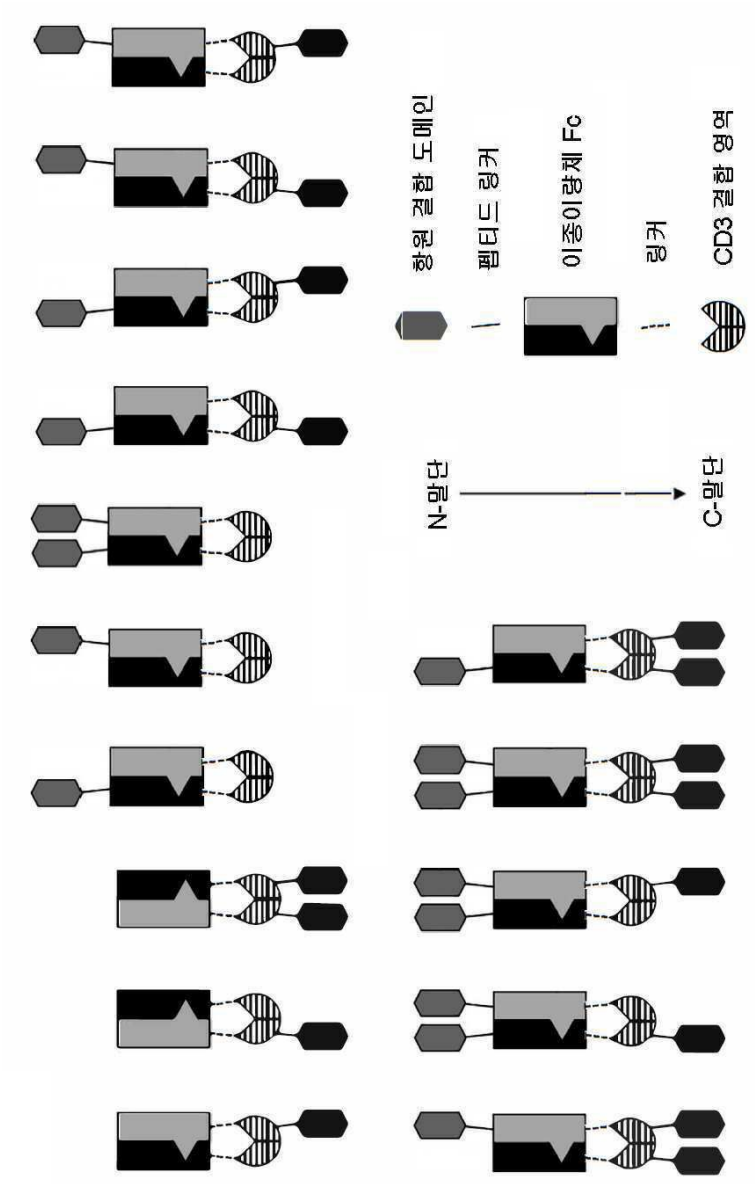
125	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEWMGR IFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFD GYWLVYWGQGTLVTVSGSGGGGSGGGGTGGGGSDIVMTQTPLSLPVTPGEP ASISCRSSKSLLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKVEIK	CD20 scFv
126	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYVYY SGTTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCASIAVTGFYFD YWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERVTLSCRA SQRVNNNYLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYCQQYDRSPLTFGGGTKLEIK	DLL3 scFv
127	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVAYI SSDSSAIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCGRGRENI YYGSRLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSC	B7H3 Fd
128	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQNVDTNVAWYQQKPGKAPKALIYSAS YRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPFTFGQGTKLEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	B7H3 LC
129	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRQ WDYDVRAMNYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	5T4 Fd
130	DIVMTQSHIFMSTSVGDRVSITCKASQDVDTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWAS TRLTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYPYTFGGGTKLE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC	5T4 LC
131	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSFNYYWSWIRHHPGKGLEWIGYI YYSGSTYSNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLTLSSVTAADTAVYYCARGYNWNY FDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSC	gpNMB Fd
132	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVDNNLVWYQQKPGQAPRLLIYGAS TRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPPWTFGQGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC	gpNMB LC
133	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMAW INTYTGEPTYADDFKGRFAFSLETSASTASLQIINLKNEDTATYFCARIGDSSPS DYWGQGTTLTVSSSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSC	DLL3 Fd
134	SIVMTQTPKFLLVSAGDRVTITCKASQSVSNDVVWYQQKPGQSPKLLIYYAS NRYTGVPDRFAGSGYGTDFSFTISTVQAEDLAVYFCQQDYTSPWTFGGGTKL EIRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC	DLL3 LC
135	GGGGGS	펩티드 링커
136	IEPDI	링커
137	LEADT	링커
138	IEPDG	링커
139	IEPDV	링커

140	IEPDS	링커
141	IEPDT	링커
142	LEPD	링커
143	LEAE	링커
144	IEPDP	링커
145	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGG TNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGG GTKLTVLGGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMH WVRQAPGKGLEWVAYISSDSSAIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RDEDTAVYYCGRGRENIYYGSRLDYWGQGTTVTVSSGGCGGGKVAALKEK VAALKEKVAALKEKVAALKE	B7-H3 x CD3 이중특이적 DART-A 디아바디의 제2 폴리펩티드 사슬
146	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNRYTQKSLSLSPGK	B7-H3 x CD3 이중특이적 DART-A 디아바디의 제3 폴리펩티드 사슬
147	GGSGGGGSGGGGSGGGGS	링커
148	TGGSGGGGIEPDIGGSGGS	링커
149	GGGGS	링커
150	X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 (P4 P3 P2 P1↓P1') X1= I, L, Y, M, F, V, 또는 A; (P4 = I, L, Y, M, F, V, 또는 A) X2 = A, G, S, V, E, D, Q, N, 또는 Y; (P3 = A, G, S, V, E, D, Q, N, 또는 Y) X3 = H, P, A, V, G, S, 또는 T; (P2 = H, P, A, V, G, 또는 T) X4 = D 또는 E; (P1 = D 또는 E) X5 = I, L, Y, M, F, V, T, S, 또는 A (P1' = I, L, Y, M, F, V, T, S, G 또는 A)	링커 컨센서스
151	X1 E X3 D X5 (P4 P3 P2 P1↓P1') X1 = I 또는 L; (P4 = I 또는 L) (P3 = E) X3 = P or A; (P2 = P 또는 A) X5 = I, V, T, S, 또는 G (P1' = I, V, T, S, 또는 G)	링커 컨센서스
152	LEPDG	링커
153	LEADG	링커
154	X_1QARX_5 (P1QAR↓(A/V) X1 = 임의의 아미노산; (P1은 임의의 아미노산임) X5 = A 또는 V	링커 컨센서스
155	RQARX_5 (RQAR(A/V)) X5 = A 또는 V	링커 컨센스서
156	RQARV	링커
157	X1X2 X3 X4 (P3 P2 P1↓P1') X1 = P, V 또는 A; (P3 = P, V 또는 A) X2 = Q 또는 D; (P2 = Q 또는 D) X3 = A 또는 N; (P1 = A 또는 N) X4 = L, I 또는 M (P1' = L, I 또는 M)	링커 컨센서스
158	PX2X3X4 (P3 P2 P1↓P1') (P3 = P) X2 = Q 또는 D; (P2 = Q 또는 D) X3 = A 또는 N; (P1은 A 또는 N) X4 = L 또는 I (P1'는 L 또는 I)	링커 컨센서스
159	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
160	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
161	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
162	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
163	EGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A
164	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A

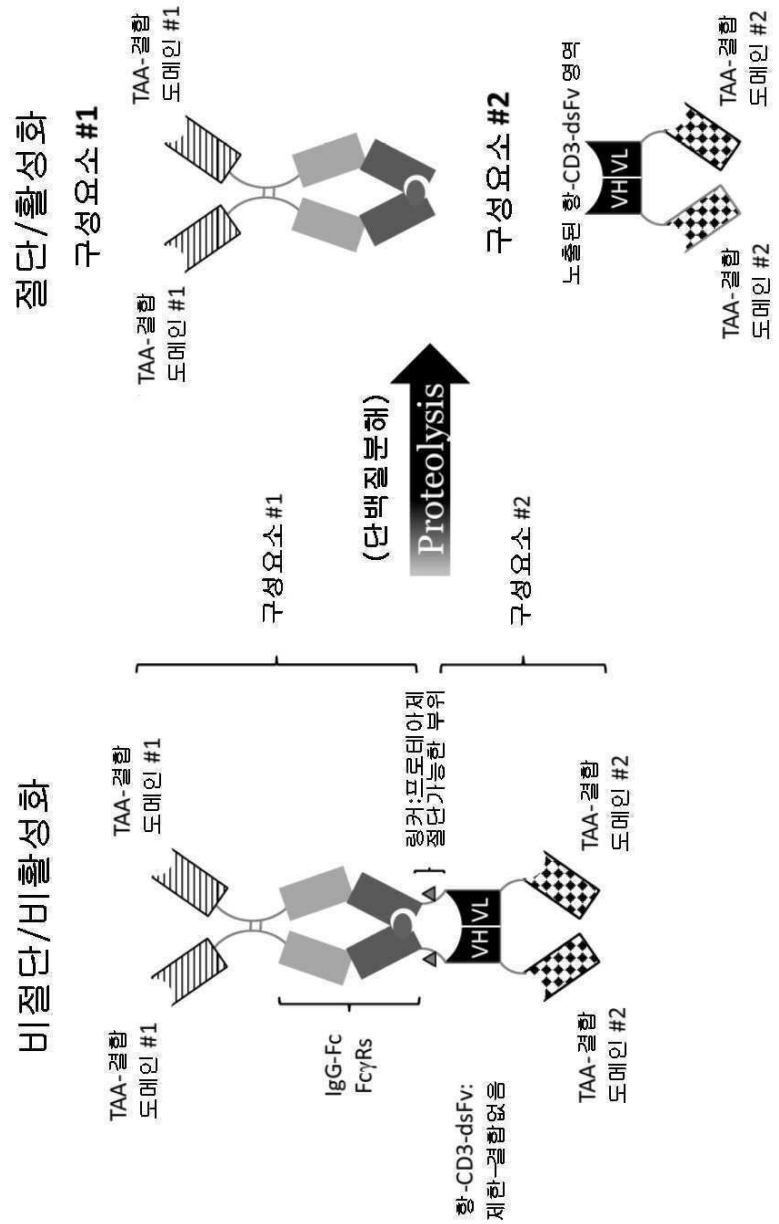
165	GGATCTGGAGCAACAAACTTCTCACTACTCAAACAAGCAGGTGACGTGGAGGA GAATCCCGGACCC	P2A DNA
166	GSPAGLEADGSRQARVGS	링커
167	EVQLVESGGGL VQPKGSLKLS CAASGFTFNT YAMNWVRQAP GKGLEWVARI RSKSNNYATY YADSVKDRFT ISRDDSQSML YLQMNNLKTE DTAMYXCVRQ WDYDVRAMNY WGQGTSVTVS S	항-5T4 VH
168	DIVMTQSHIF MSTSVGDRVS ITCKASQDVD TAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRLTGVPD RFTGSGSGTD FTLTISNVQS EDLADYFCQQ YSSYPYTFGG GTKLEIK	항-5T4 VL
169	DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVD TNVAWYQQKP GKAPKALIYS ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQ GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN WVRQAPGKGL EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKDRFTISRD DSKNSLYLQM NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGTLVTVSS GGCGGGEVAA LEKEVAALEK EVAALEKEVA ALEKGGGDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLWCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK	B7-H3 x CD3 이중특이적 DART-A 디아바디의 제1 폴리펩티드 사슬
170	GGGGSGGGGSGGGGS	링커
171	GGS(GGS)n 여기서 n은 0 내지 10임	링커
172	(GGGGGS)n 여기서 n은 1 내지 4임	링커
173	(GGGGS)n 여기서 n은 1 내지 5임	링커
174	$Gly_xXaa-Gly_y-Xaa-Gly_z$ Xaa는 A, V, L, I, M,F, W, P, G, S, T, C, Y, N,Q, K, R, H, D, 또는 E로부터 독립적으로 선택되고 x, y, 및 z는 각각 1-5 범위의 정수임	링커
175	Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly Xaa는 A, V, L, I, M,F, W, P, G, S, T, C, Y, N,Q, K, R, H, D, 또는 E로부터 독립적으로 선택됨	링커
176	ATTTGSSPGPT	링커
177	GGGGG-C-GGGGG	링커
178	(EAAAK)nn=2-20	링커
179	AS-(AP)n-GTn=2-20	링커
180	AS-(EAAAK)n-GTn=2-20	링커
181	(GGGGA)nn=2-20	링커
182	(PGGGS)nn=2-20	링커
183	(AGGGS)nn=2-20	링커
184	GGS-(EGKSSGSGSESKST)n-GGSn=2-20	링커
185	(SSSSG)nn=1-9	링커
186	SSSASASSA	링커
187	GSPGSPG	링커
188	QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSIS SYYWSWIRQP PGKGLEWIGY VYYSGTTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCASIAV TGFYFDYWGQ GTLVTVSSGG GGSGGGGSGG GGSEIVLTQS PGTLSLSPGE RVTLSCRASQ RVNNNYLAWY QQRPGQAPRL LIYGASSRAT GIPDRFSGSG SGTDFTLTIS RLEPEDFAVY YCQQYDRSPL TFGGGTKLEI K	DLL3 scFv
189	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYAFS YSWINWVRQA PGQGLEWMGR IFPGDGDTDY NGKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARNV FDGYWLVYWG QGTLVTVSS	CD20 VH
190	DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSSKSLL HSNGITYLYW YLQKPGQSPQ LLIYQMSNLV SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCAQNLELP YTFGGGTKVE IKRTV	CD20 VL

도면

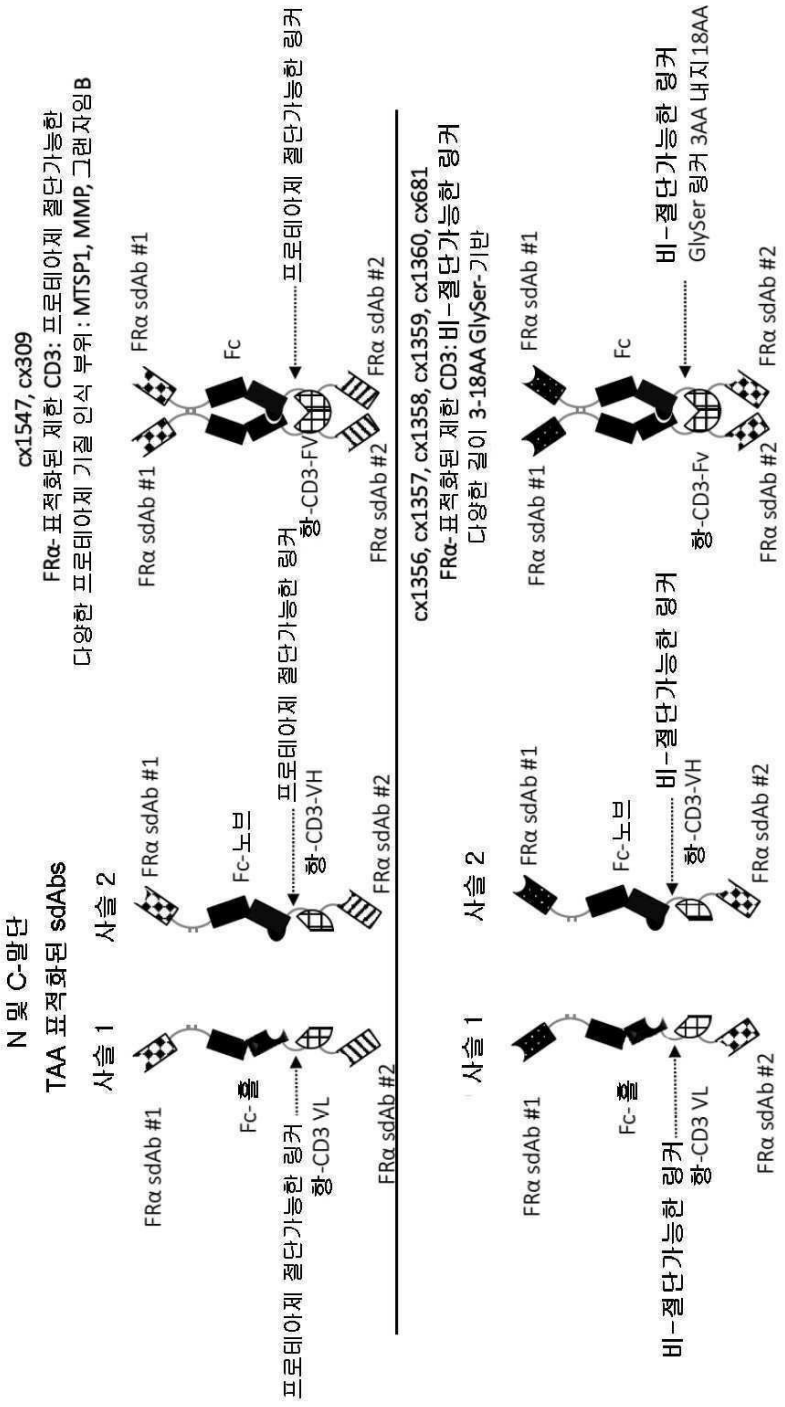
도면1



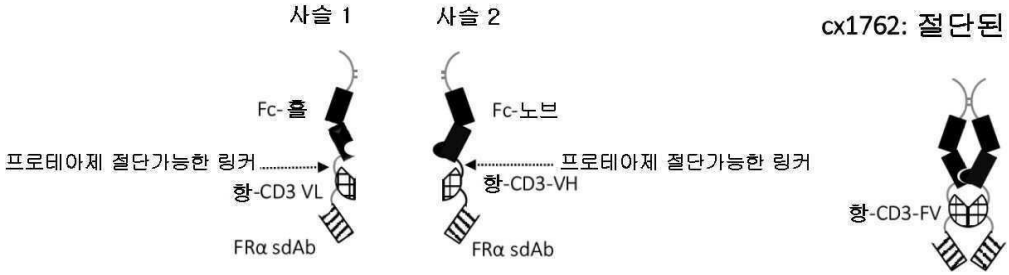
도면2


비절단/비활성화
TAA-결합 도메인 #1
IgG-Fc FcγRs
링커:프로테아제 절단가능한 부위
VH VL
항-CD3-dsFv: 제한-결합없음
TAA-결합 도메인 #2
TAA-결합 도메인 #2
구성요소 #1
구성요소 #2
(단백질분해)
Proteolysis
절단/활성화
구성요소 #1
TAA-결합 도메인 #1
TAA-결합 도메인 #1
구성요소 #2
노출된 항-CD3-dsFv 영역
VH VL
TAA-결합 도메인 #2
TAA-결합 도메인 #2

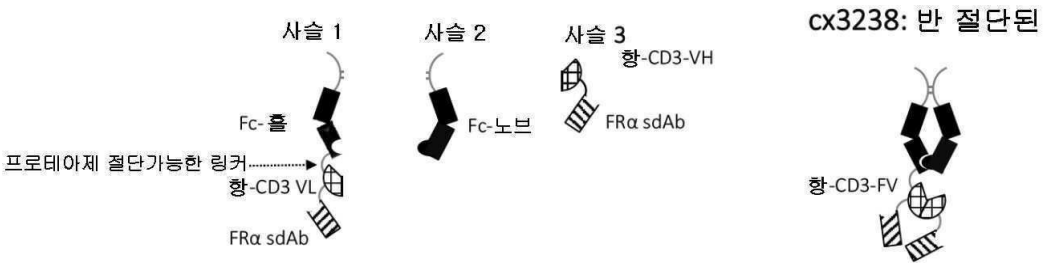
도면3


cx1547, cx309
FRα- 표적화된 제한 CD3: 프로테아제 절단가능한
다양한 프로테아제 기질 인식 부위 : MTSP1, MMP, 그랜자임B
N 및 C-말단
TAA 표적화된 sdAbs
사슬 1
사슬 2
FRα sdAb #1
FRα sdAb #2
Fc-홀
Fc-노브
Fc
프로테아제 절단가능한 링커
항-CD3 VL
항-CD3-VH
항-CD3-FV
cx1356, cx1357, cx1358, cx1359, cx1360, cx681
FRα- 표적화된 제한 CD3: 비-절단가능한 링커
다양한 길이 3-18AA GlySer-기반
비-절단가능한 링커
항-CD3-Fv
GlySer 링커 3AA 내지 18AA

도면4a


사슬 1
사슬 2
cx1762: 절단된
Fc-홀
Fc-노브
프로테아제 절단가능한 링커
항-CD3 VL
항-CD3-VH
FRα sdAb
항-CD3-FV

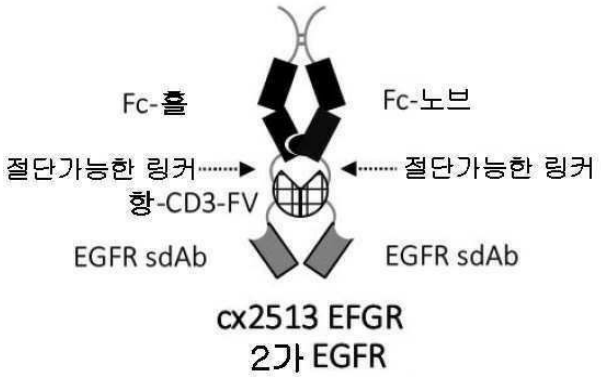
도면4b



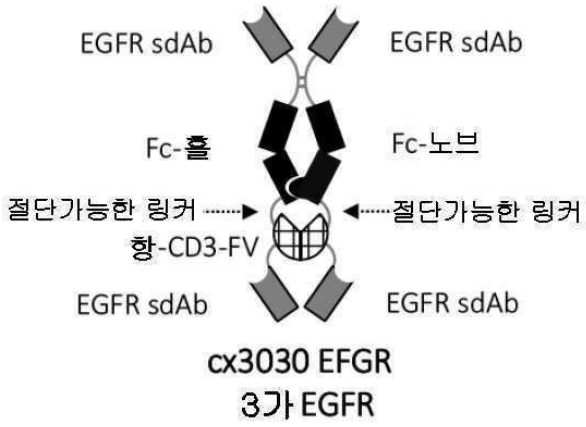
도면4c



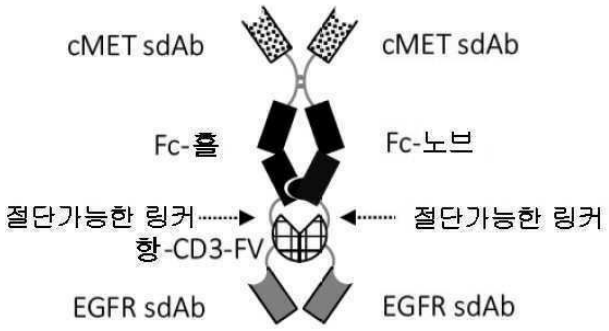
도면5a



도면5b

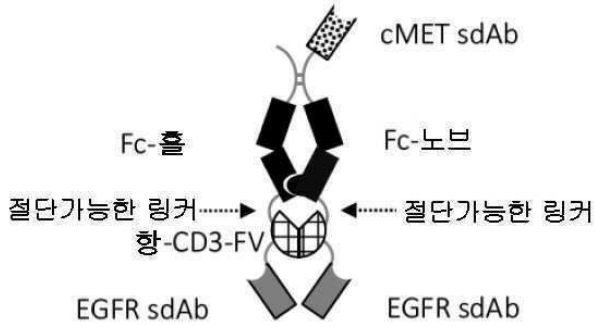


도면5c



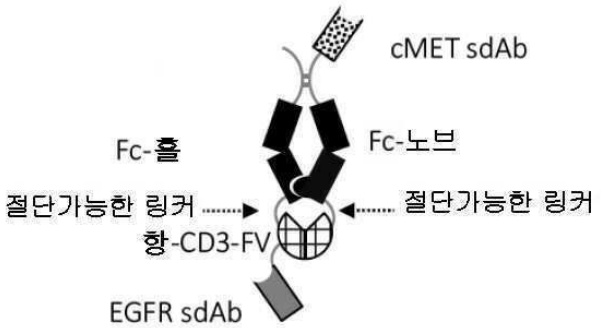
cx2973 cMet x EFGR
2가 cMet
2가 EGFR

도면5d



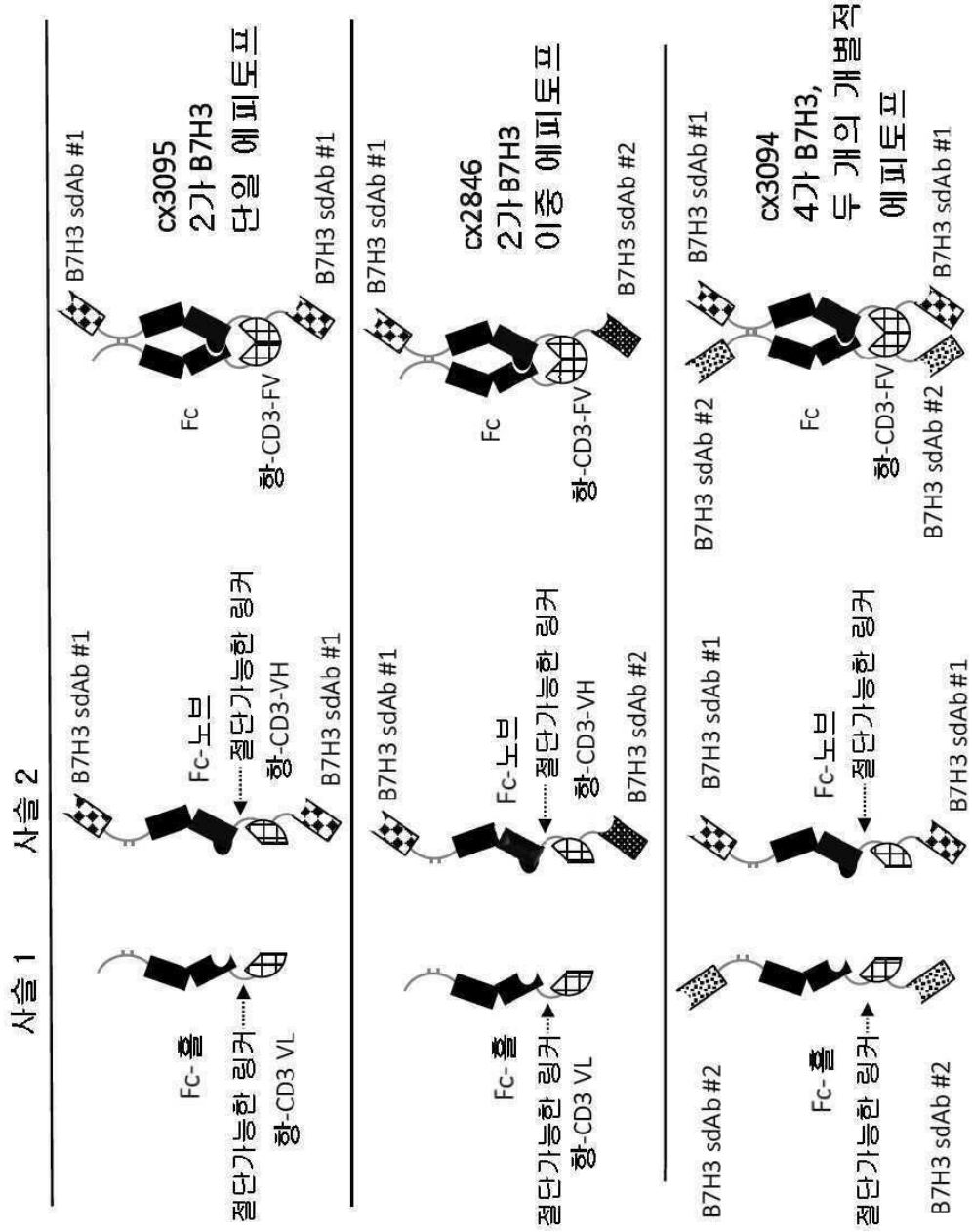
cx2979 cMet x EFGR
1가 cMet
2가 EGFR

도면5e

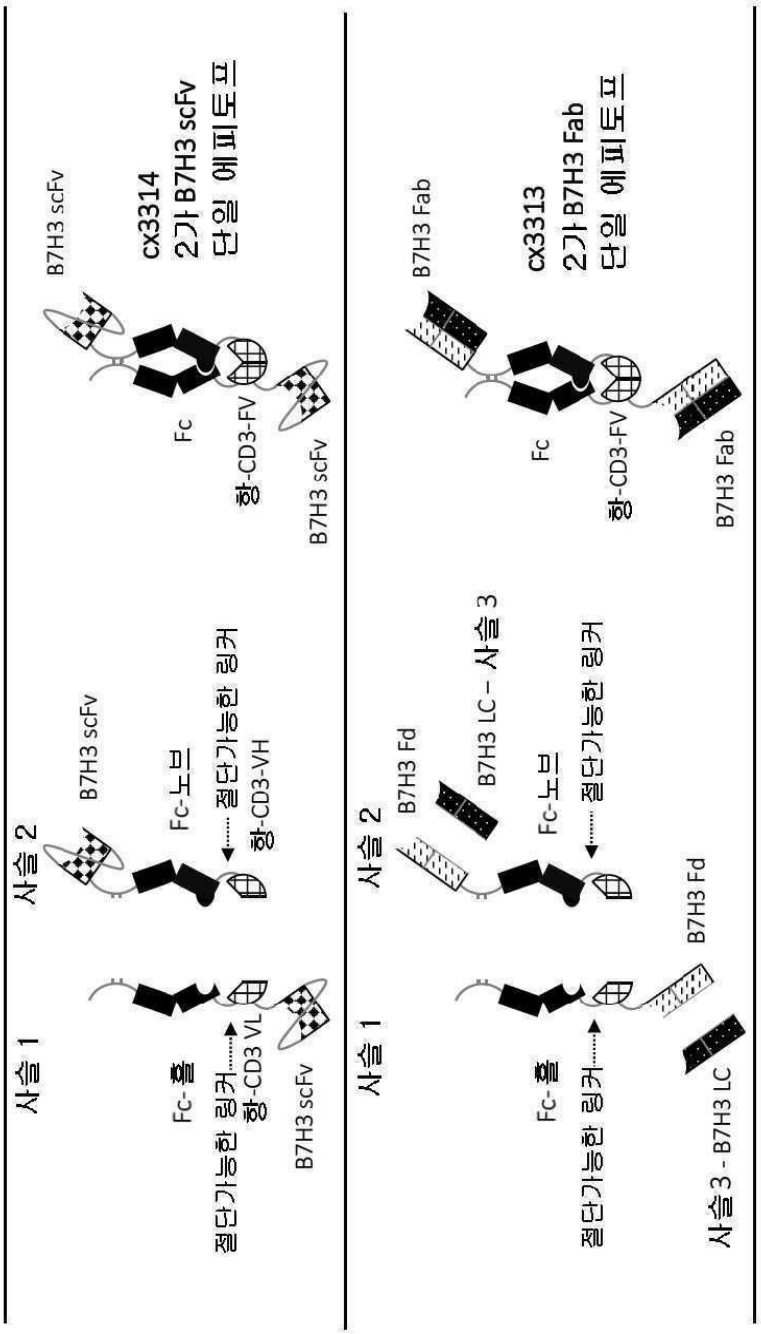


cx2977 cMet x EFGR
1가 cMet
1가 EGFR

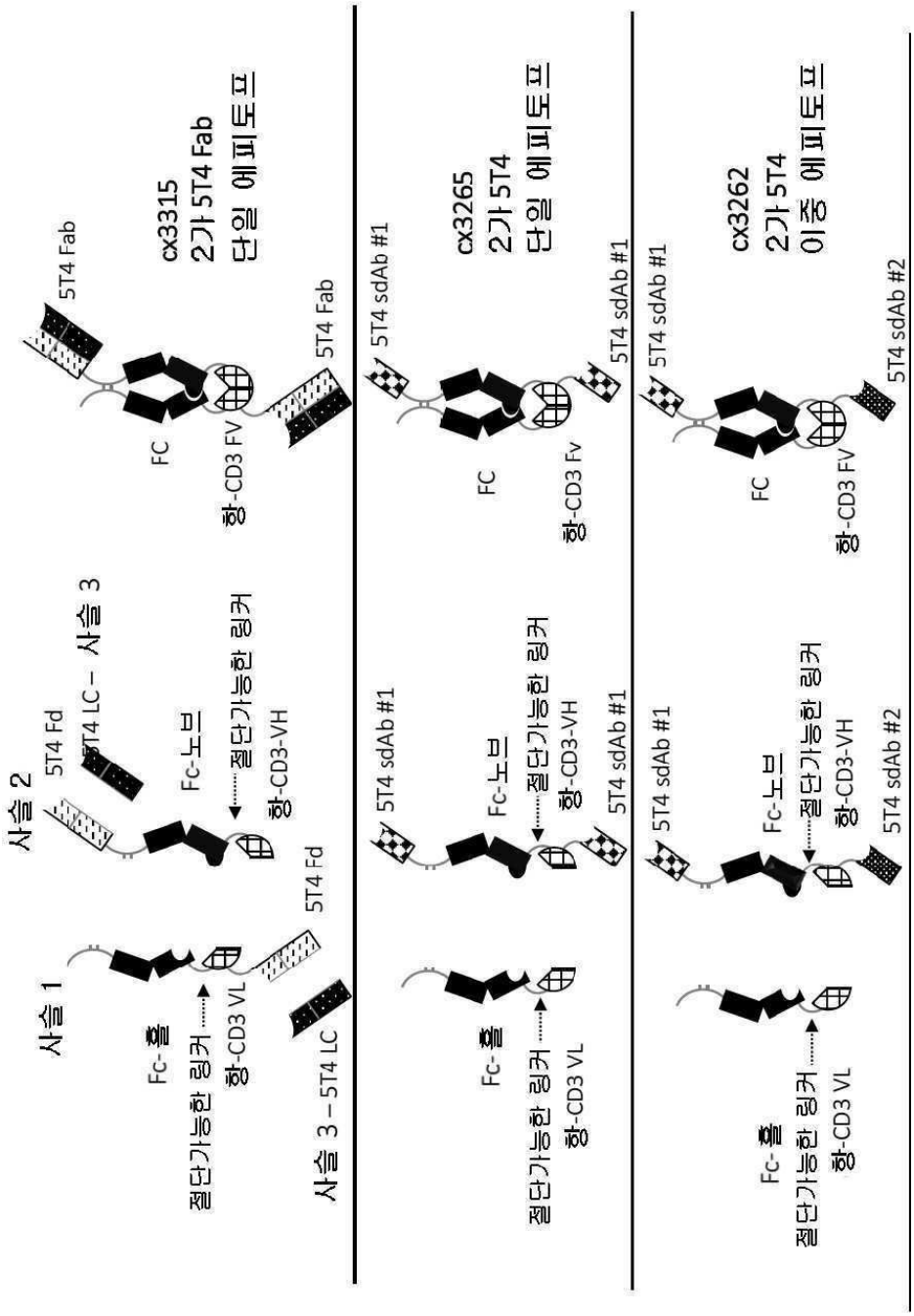
도면6a


사슬 1
사슬 2
B7H3 sdAb #1
Fc-노브
절단가능한 링커
항-CD3-VH
B7H3 sdAb #1
Fc
항-CD3-FV
cx3095
2가 B7H3
단일 에피토프
Fc-홀
절단가능한 링커
항-CD3 VL
B7H3 sdAb #2
cx2846
2가 B7H3
이중 에피토프
cx3094
4가 B7H3,
두 개의 개별적인
에피토프

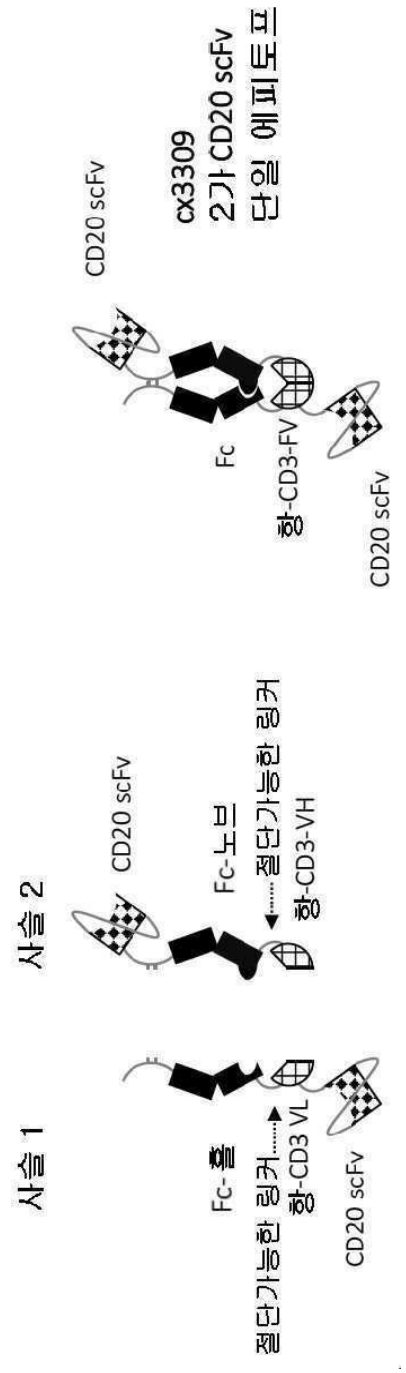
도면6b


사슬 1
사슬 2
Fc-홀
절단가능한 링커
항-CD3 VL
B7H3 scFv
Fc-노브
절단가능한 링커
항-CD3-VH
B7H3 scFv
Fc
항-CD3-FV
B7H3 scFv
cx3314
2가 B7H3 scFv
단일 에피토프
사슬 1
사슬 2
사슬 3 - B7H3 LC
B7H3 Fd
Fc-홀
절단가능한 링커
B7H3 Fd
B7H3 LC - 사슬 3
Fc-노브
절단가능한 링커
Fc
항-CD3-FV
B7H3 Fab
B7H3 Fab
cx3313
2가 B7H3 Fab
단일 에피토프

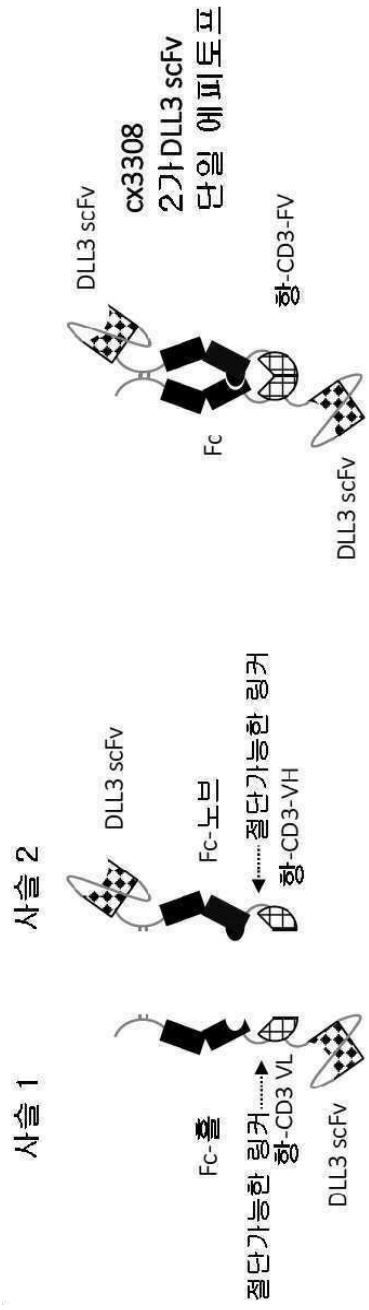
도면7


사슬 1
Fc-홀
절단가능한 링커
항-CD3 VL
사슬 3 – 5T4 LC
5T4 Fd
사슬 2
5T4 Fd
5T4 LC – 사슬 3
Fc-노브
절단가능한 링커
항-CD3-VH
5T4 Fab
FC
항-CD3 FV
cx3315
2가 5T4 Fab
단일 에피토프
Fc-홀
절단가능한 링커
항-CD3 VL
5T4 sdAb #1
Fc-노브
절단가능한 링커
항-CD3-VH
5T4 sdAb #1
FC
항-CD3 Fv
cx3265
2가 5T4
단일 에피토프
Fc-홀
절단가능한 링커
항-CD3 VL
5T4 sdAb #1
Fc-노브
절단가능한 링커
항-CD3-VH
5T4 sdAb #2
FC
항-CD3 FV
cx3262
2가 5T4
이중 에피토프

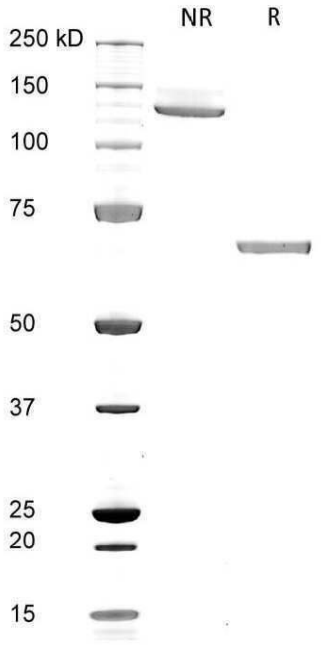
도면8


사슬 1
Fc-홀
절단가능한 링커
항-CD3 VL
CD20 scFv
사슬 2
CD20 scFv
Fc-노브
절단가능한 링커
항-CD3-VH
cx3309
2가 CD20 scFv
단일 에피토프
CD20 scFv
Fc
항-CD3-FV
CD20 scFv

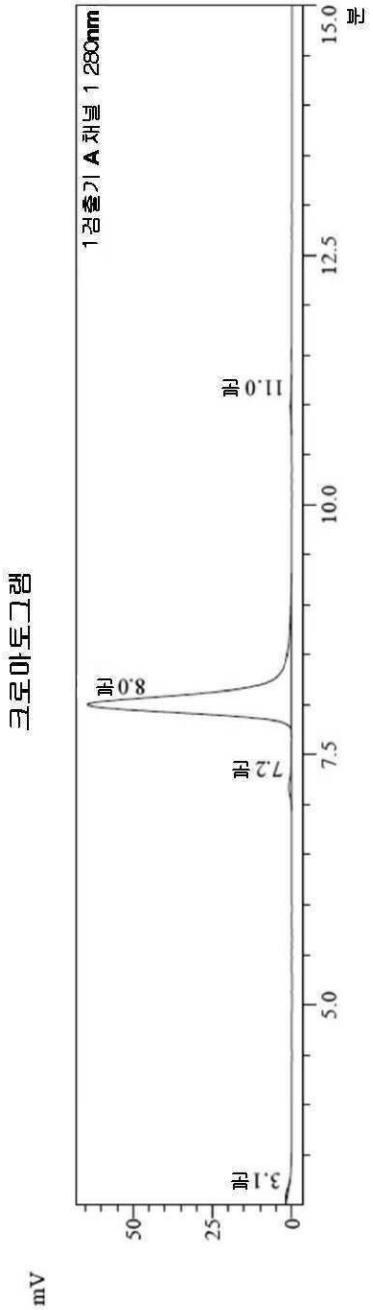
도면9


cx3308
2가DLL3 scFv
단일 에피토프
DLL3 scFv
Fc
항-CD3-FV
DLL3 scFv
사슬 2
DLL3 scFv
Fc-노브
절단가능한 링커
항-CD3-VH
사슬 1
Fc-홀
절단가능한 링커
항-CD3 VL
DLL3 scFv

도면10a



도면10b

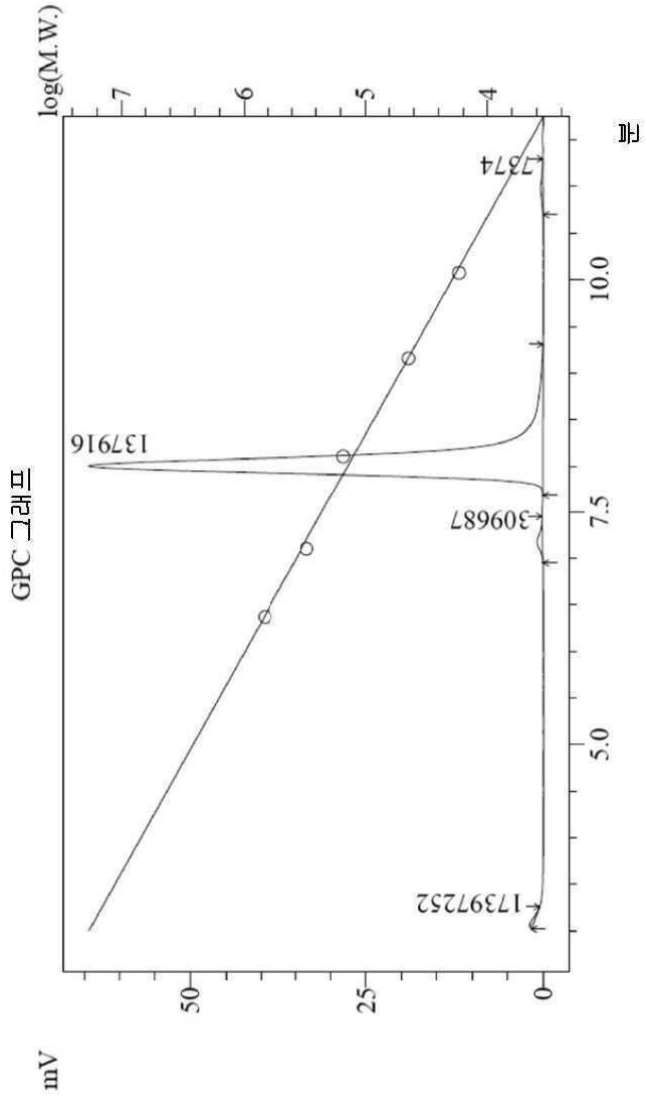


피크 표

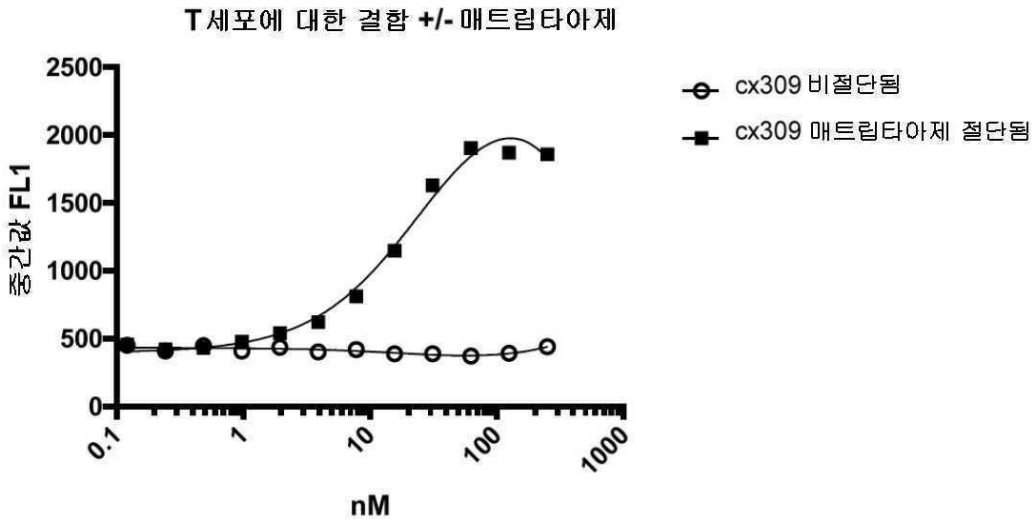
검출기 A 채널 1 280nm

잔류 시간	영역	영역%
3.059분	3065	0.346
7.174분	9190	1.039
8.001분	866802	97.960
10.993분	5799	0.655
	884855	100.000

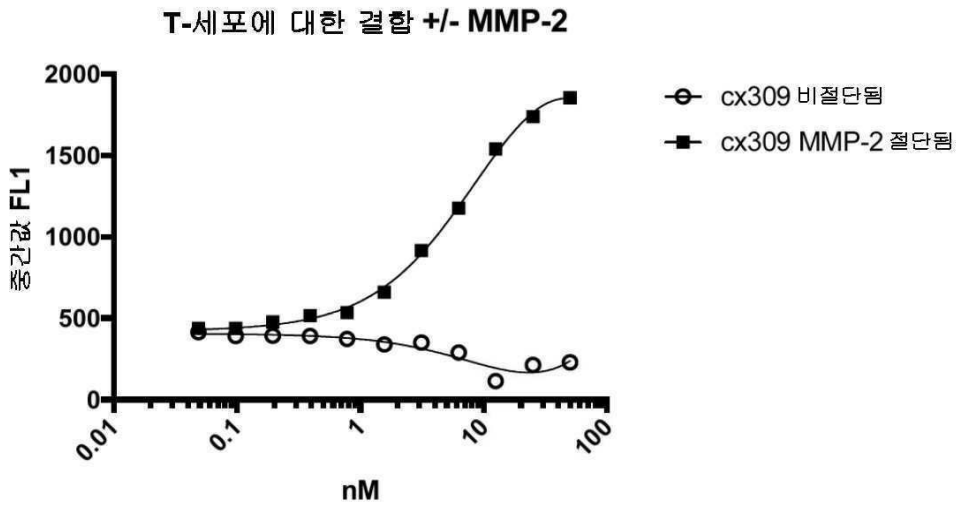
도면10c


GPC 그래프
log(M.W.)
mV
7374
137916
309687
17397252
10.0
7.5
5.0
50
25
0

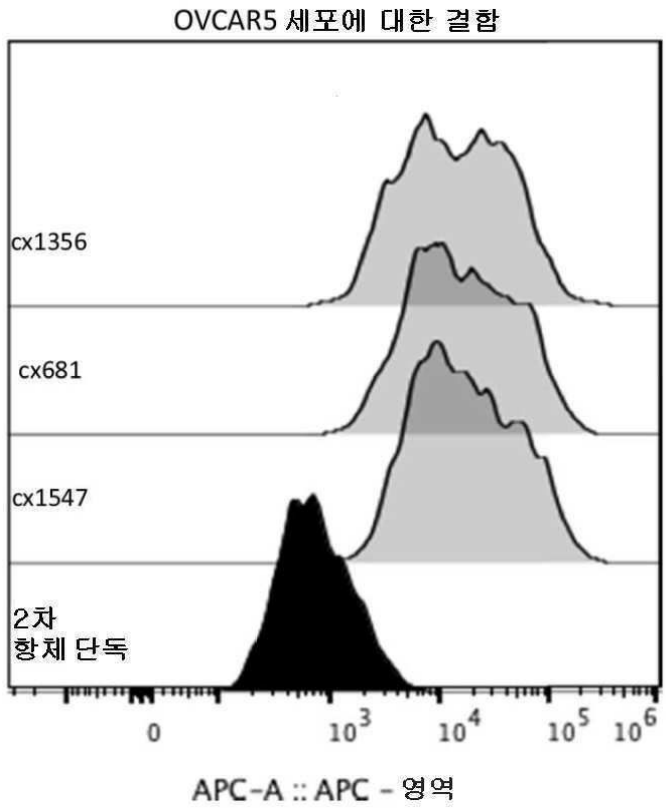
도면11a


T세포에 대한 결합 +/- 매트립타아제
중간값 FL1
nM
cx309 비절단됨
cx309 매트립타아제 절단됨
2500
2000
1500
1000
500
0
0.1
1
10
100
1000

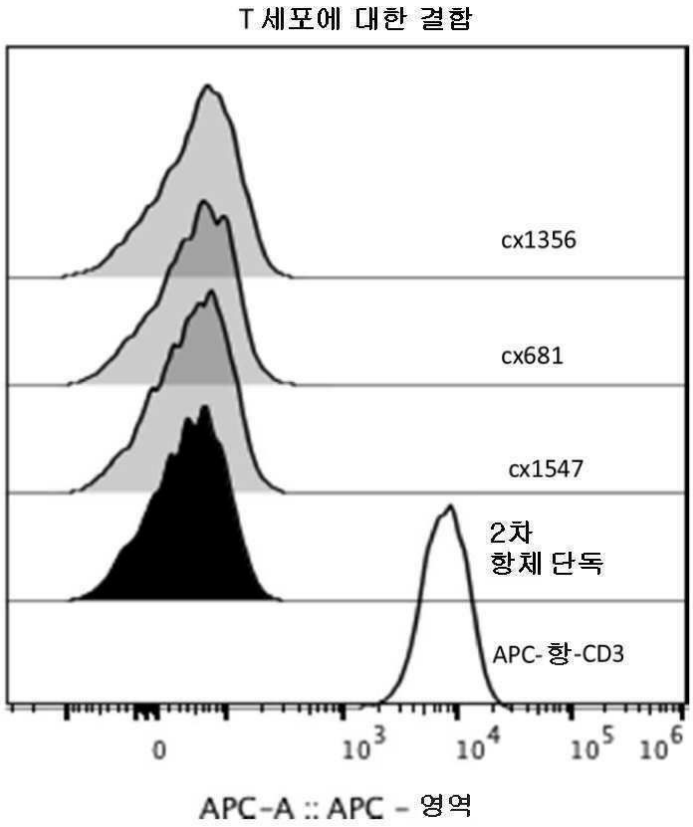
도면11b


T-세포에 대한 결합 +/- MMP-2
중간값 FL1
2000
1500
1000
500
0
0.01
0.1
1
10
100
nM
cx309 비절단됨
cx309 MMP-2 절단됨

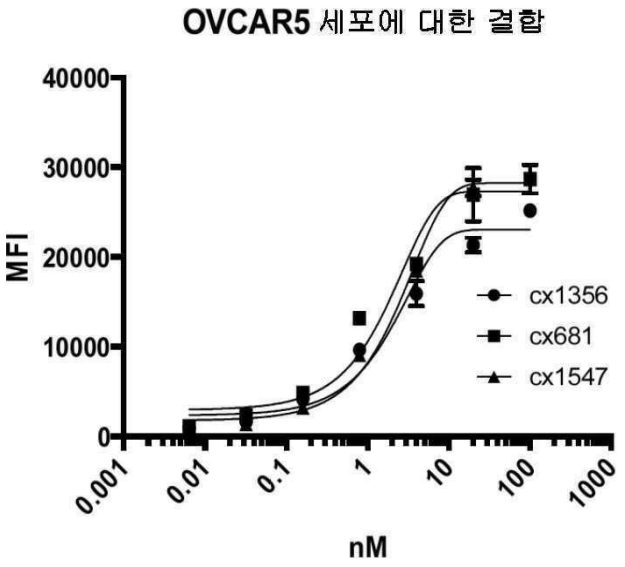
도면12a


OVCAR5 세포에 대한 결합
cx1356
cx681
cx1547
2차
항체 단독
0
10^3
10^4
10^5
10^6
APC-A :: APC - 영역

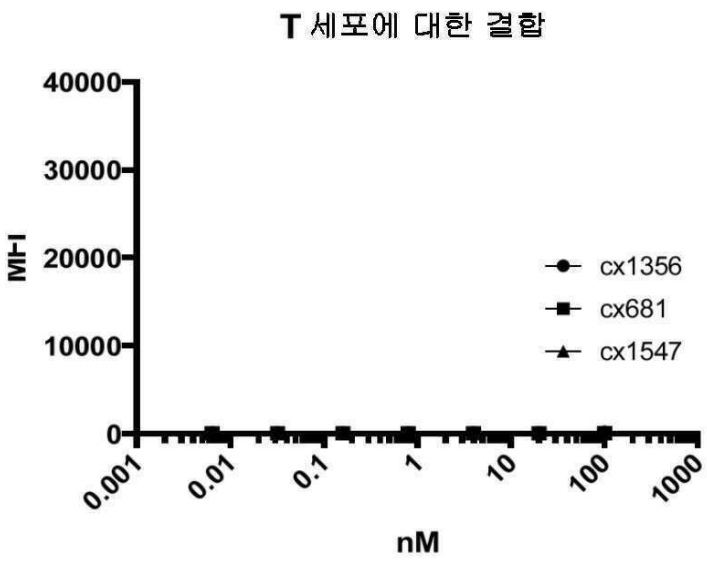
도면12b


T 세포에 대한 결합
cx1356
cx681
cx1547
2차
항체 단독
APC-항-CD3
0
10^3
10^4
10^5
10^6
APC-A :: APC - 영역

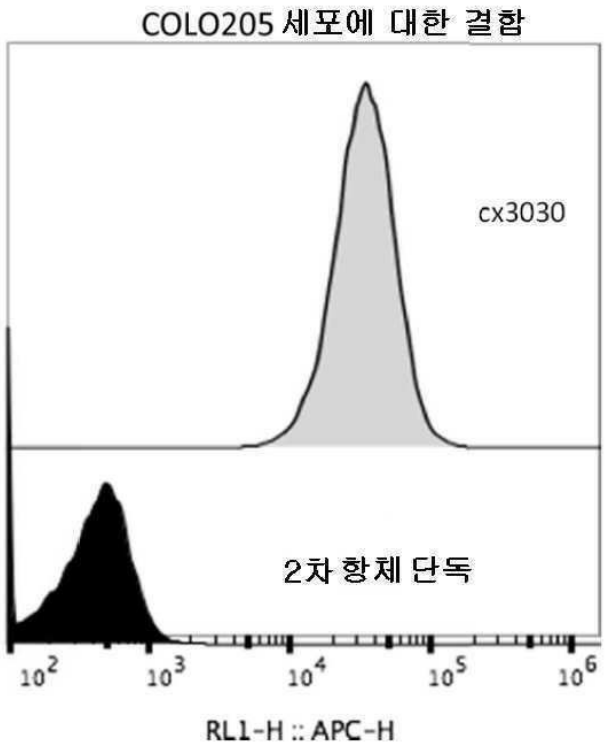
도면12c


OVCAR5 세포에 대한 결합
MFI
40000
30000
20000
10000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
nM
cx1356
cx681
cx1547

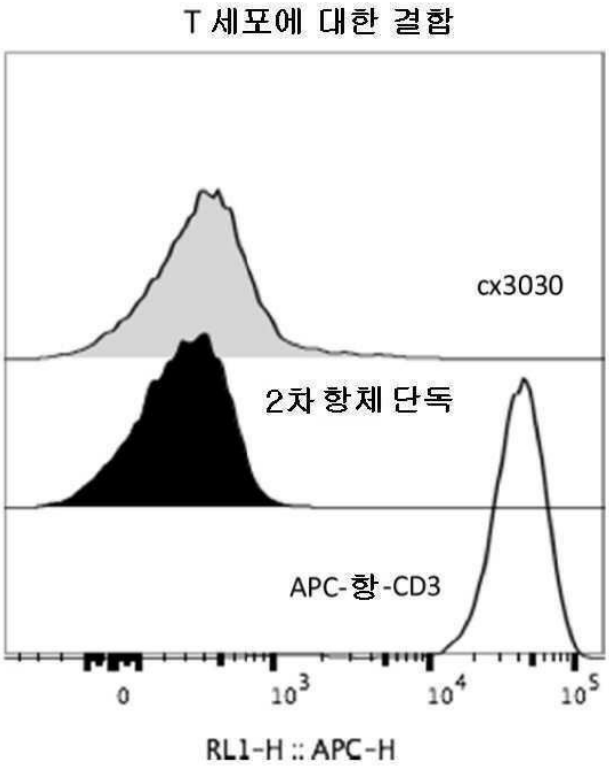
도면12d


T 세포에 대한 결합
MFI
40000
30000
20000
10000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
nM
cx1356
cx681
cx1547

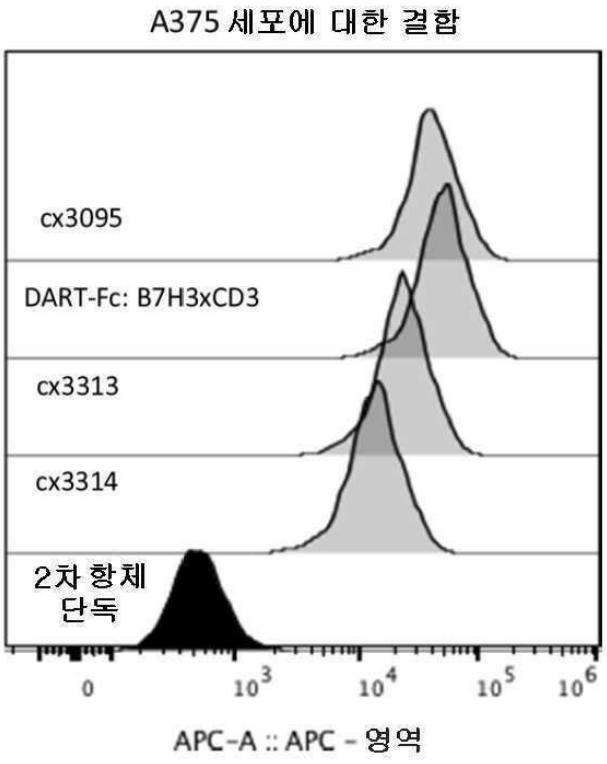
도면13a


COLO205 세포에 대한 결합
cx3030
2차 항체 단독
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
RL1-H :: APC-H

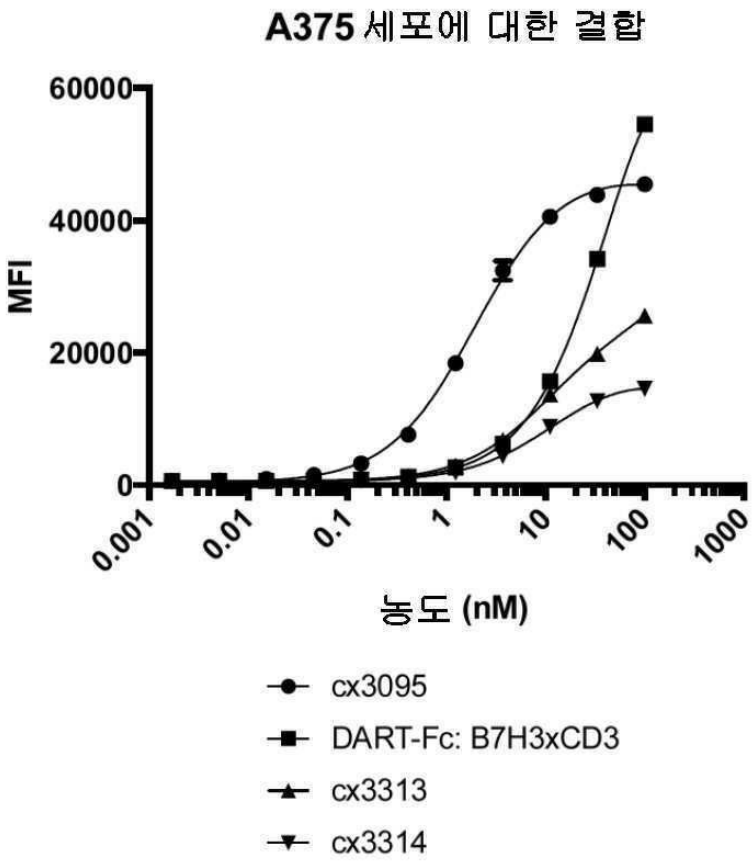
도면13b


T 세포에 대한 결합
cx3030
2차 항체 단독
APC-항-CD3
0
10^3
10^4
10^5
RL1-H :: APC-H

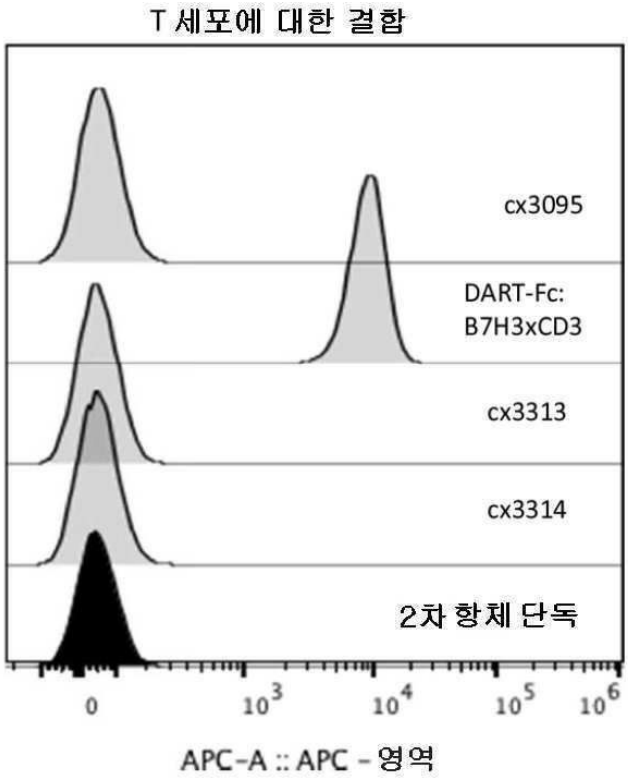
도면14a


A375 세포에 대한 결합
cx3095
DART-Fc: B7H3xCD3
cx3313
cx3314
2차 항체
단독
0
10^3
10^4
10^5
10^6
APC-A :: APC - 영역

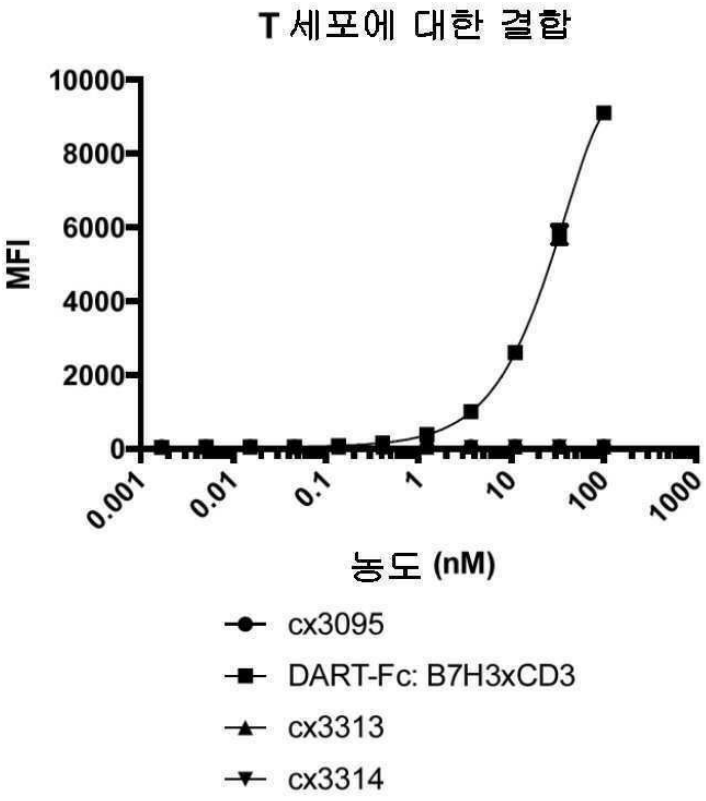
도면14b


A375 세포에 대한 결합
60000
40000
20000
0
MFI
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
농도 (nM)
cx3095
DART-Fc: B7H3xCD3
cx3313
cx3314

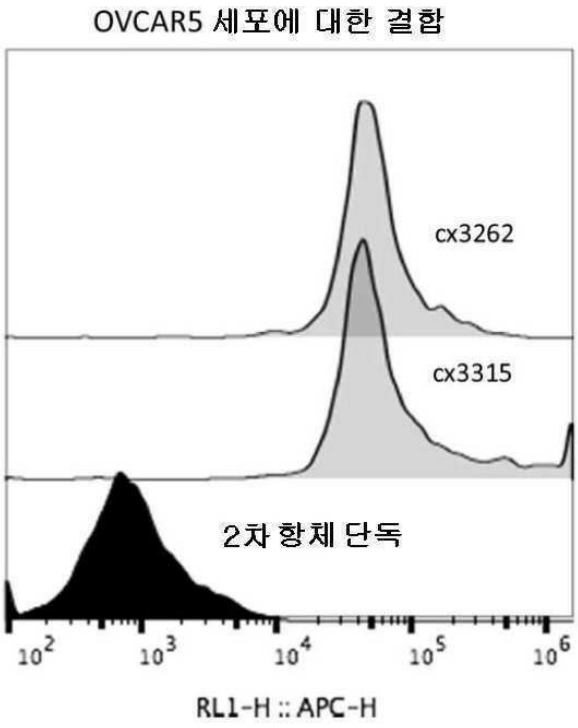
도면14c


T 세포에 대한 결합
cx3095
DART-Fc:
B7H3xCD3
cx3313
cx3314
2차 항체 단독
0
10^3
10^4
10^5
10^6
APC-A :: APC - 영역

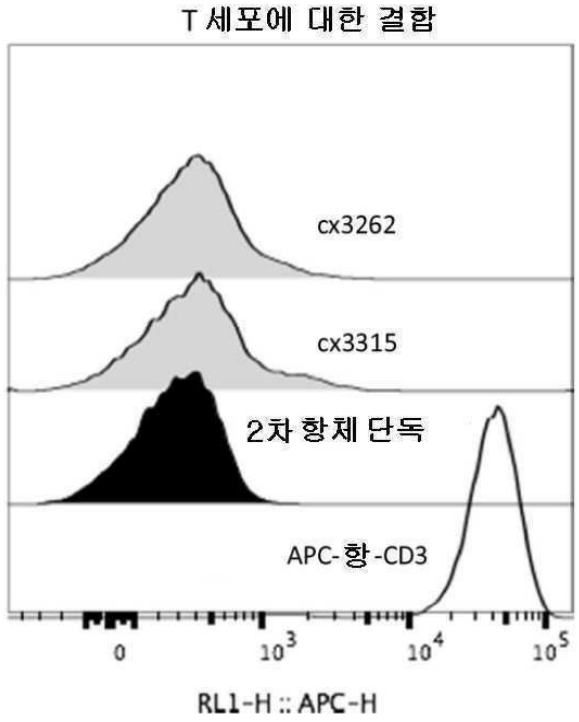
도면14d


T 세포에 대한 결합
10000
8000
6000
4000
2000
0
MFI
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
농도 (nM)
cx3095
DART-Fc: B7H3xCD3
cx3313
cx3314

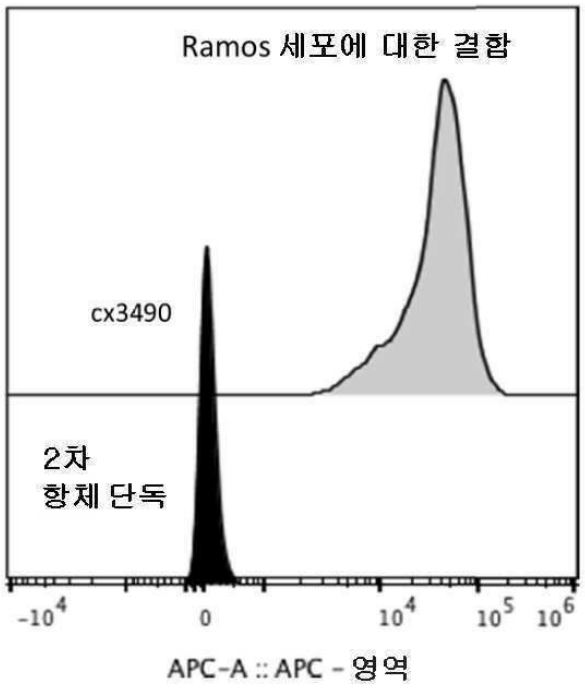
도면15a


OVCAR5 세포에 대한 결합
cx3262
cx3315
2차 항체 단독
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
RL1-H :: APC-H

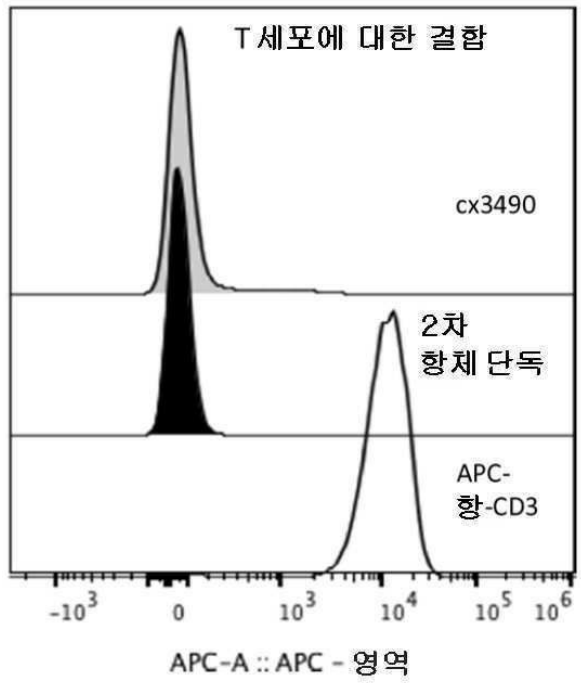
도면15b


T 세포에 대한 결합
cx3262
cx3315
2차 항체 단독
APC-항-CD3
0
10^3
10^4
10^5
RL1-H :: APC-H

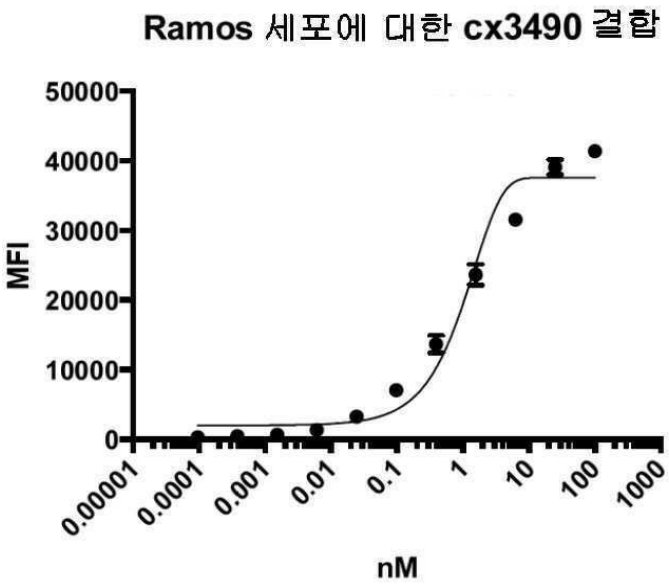
도면16a


Ramos 세포에 대한 결합
cx3490
2차
항체 단독
-10^4
0
10^4
10^5
10^6
APC-A :: APC - 영역

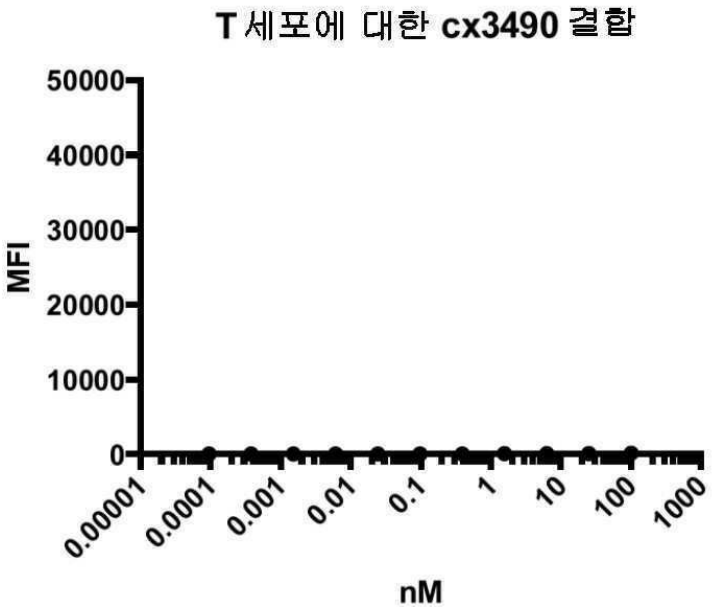
도면16b


T세포에 대한 결합
cx3490
2차
항체 단독
APC-
항-CD3
-10^3
0
10^3
10^4
10^5
10^6
APC-A :: APC - 영역

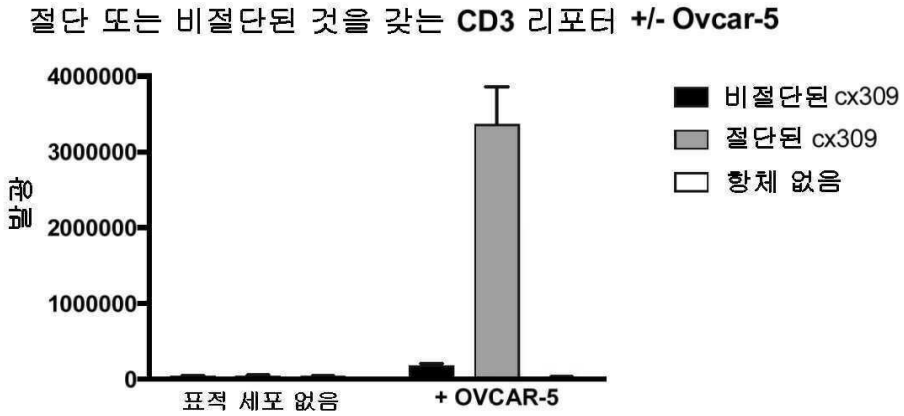
도면16c


Ramos 세포에 대한 cx3490 결합
MFI
50000
40000
30000
20000
10000
0
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
nM

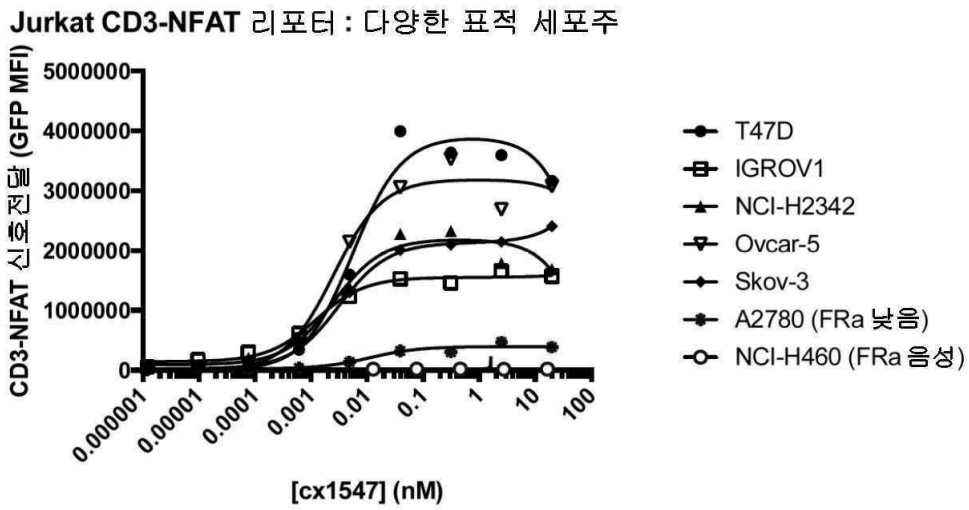
도면16d



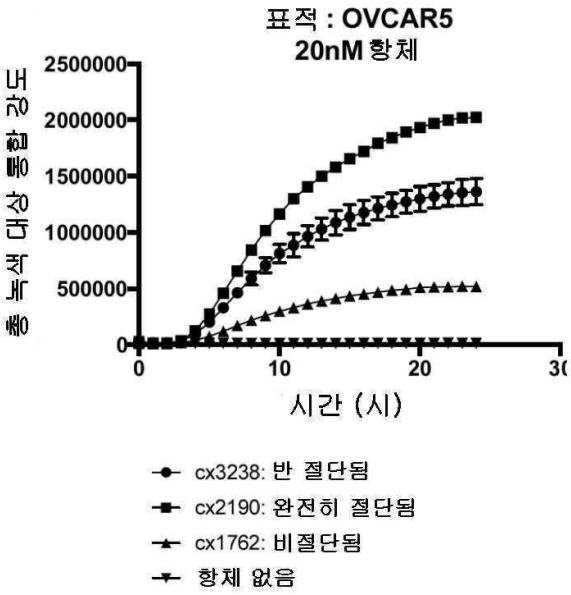
도면17



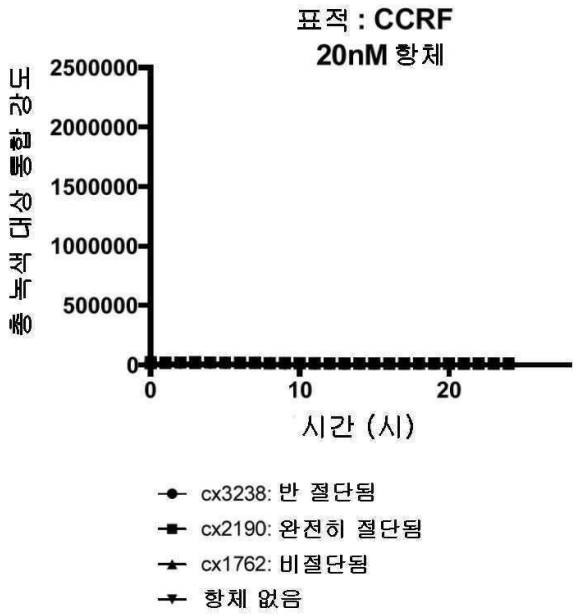
도면18



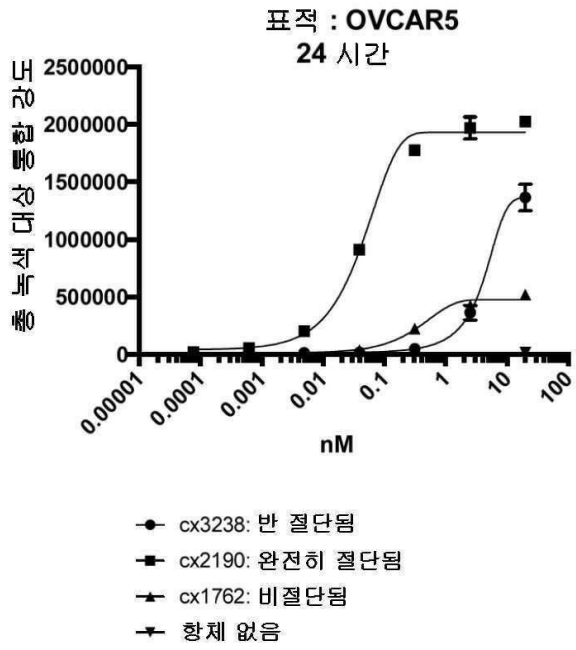
도면19a


표적 : OVCAR5
20nM 항체
총 녹색 대상 통합 강도
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
0
10
20
시간 (시)
cx3238: 반 절단됨
cx2190: 완전히 절단됨
cx1762: 비절단됨
항체 없음

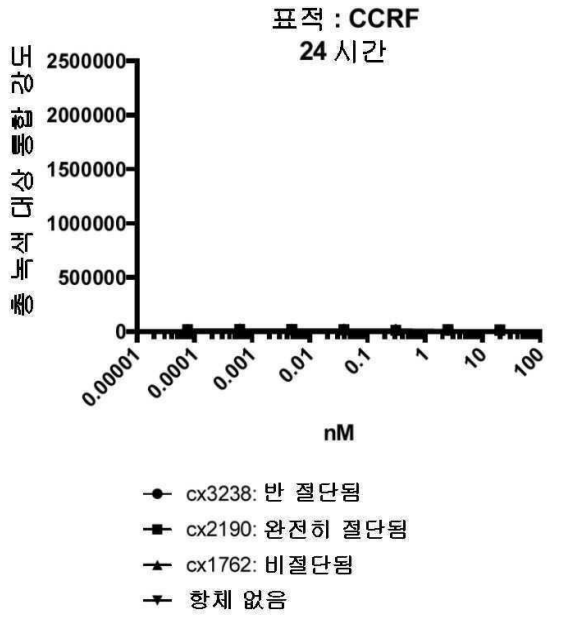
도면19b


표적 : CCRF
20nM 항체
총 녹색 대상 통합 강도
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
0
10
20
시간 (시)
cx3238: 반 절단됨
cx2190: 완전히 절단됨
cx1762: 비절단됨
항체 없음

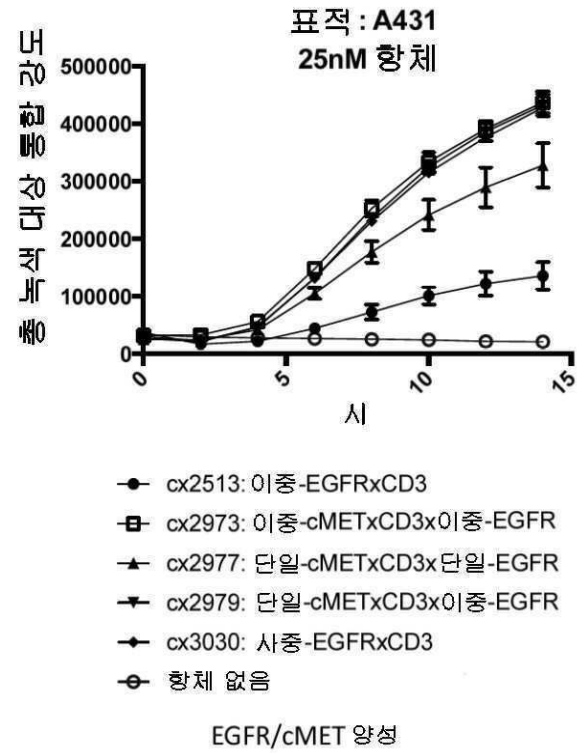
도면19c


표적 : OVCAR5
24 시간
총 녹색 대상 통합 강도
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
nM
cx3238: 반 절단됨
cx2190: 완전히 절단됨
cx1762: 비절단됨
항체 없음

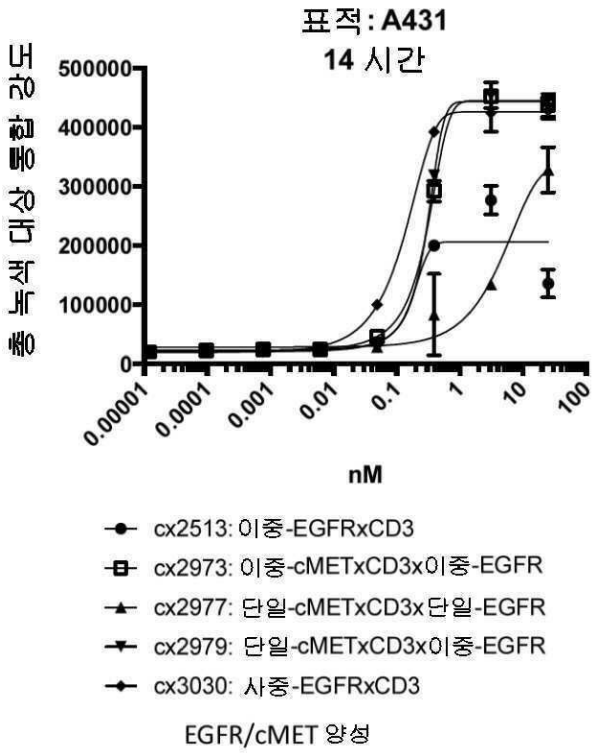
도면19d


표적 : CCRF
24 시간
총 녹색 대상 통합 강도
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
nM
cx3238: 반 절단됨
cx2190: 완전히 절단됨
cx1762: 비절단됨
항체 없음

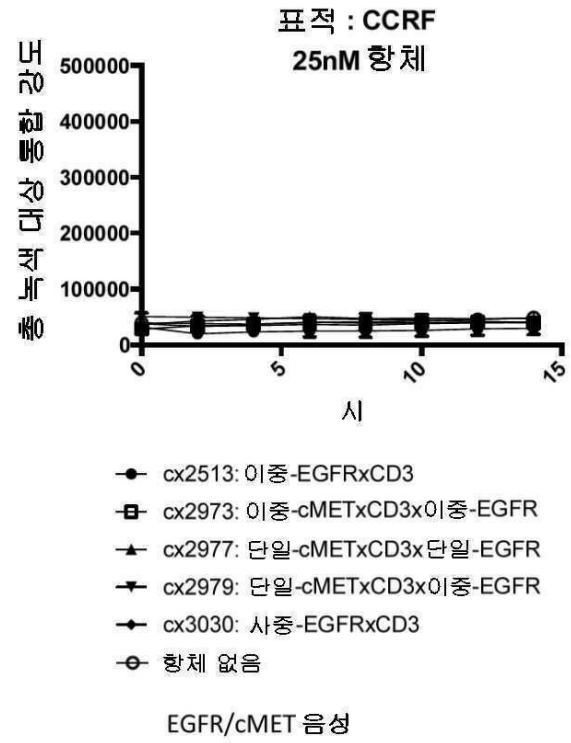
도면20a


표적 : A431
25nM 항체
종속 세포 대상 통합 강도
500000
400000
300000
200000
100000
0
0
5
10
15
시
cx2513: 이중-EGFRxCD3
cx2973: 이중-cMETxCD3x이중-EGFR
cx2977: 단일-cMETxCD3x단일-EGFR
cx2979: 단일-cMETxCD3x이중-EGFR
cx3030: 사중-EGFRxCD3
항체 없음
EGFR/cMET 양성

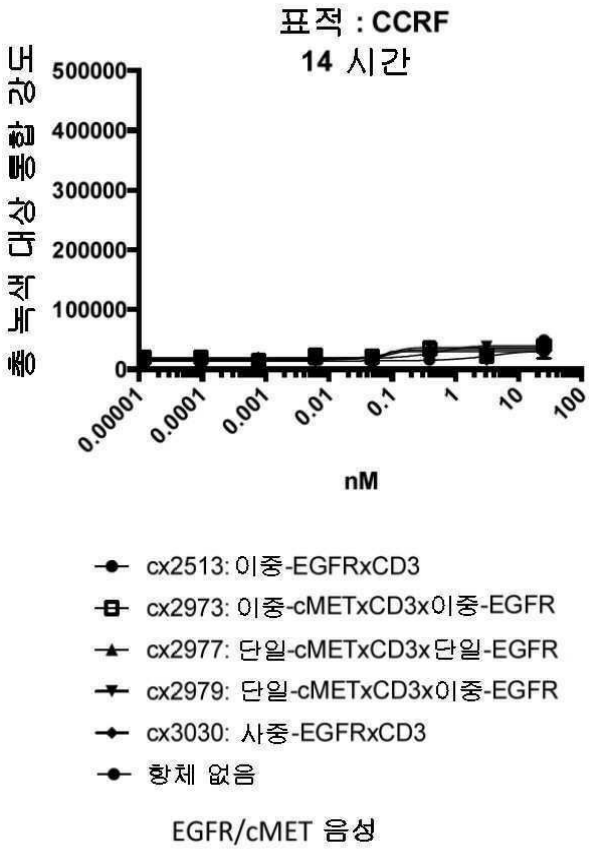
도면20b


표적 : A431
14 시간
종속 세포 대상 통합 강도
500000
400000
300000
200000
100000
0
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
nM
cx2513: 이중-EGFRxCD3
cx2973: 이중-cMETxCD3x이중-EGFR
cx2977: 단일-cMETxCD3x단일-EGFR
cx2979: 단일-cMETxCD3x이중-EGFR
cx3030: 사중-EGFRxCD3
EGFR/cMET 양성

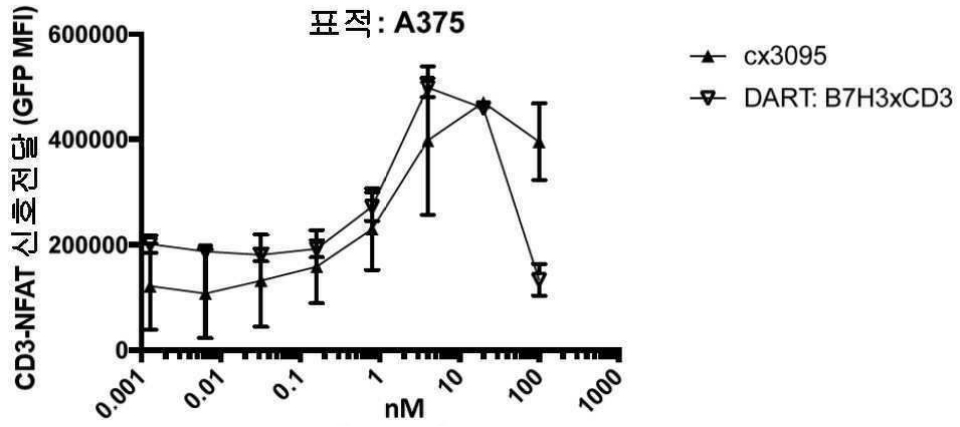
도면20c


표적 : CCRF
25nM 항체
종 녹색 대상 통합 강도
500000
400000
300000
200000
100000
0
0
5
10
15
시
cx2513: 이중-EGFRxCD3
cx2973: 이중-cMETxCD3x이중-EGFR
cx2977: 단일-cMETxCD3x단일-EGFR
cx2979: 단일-cMETxCD3x이중-EGFR
cx3030: 사중-EGFRxCD3
항체 없음
EGFR/cMET 음성

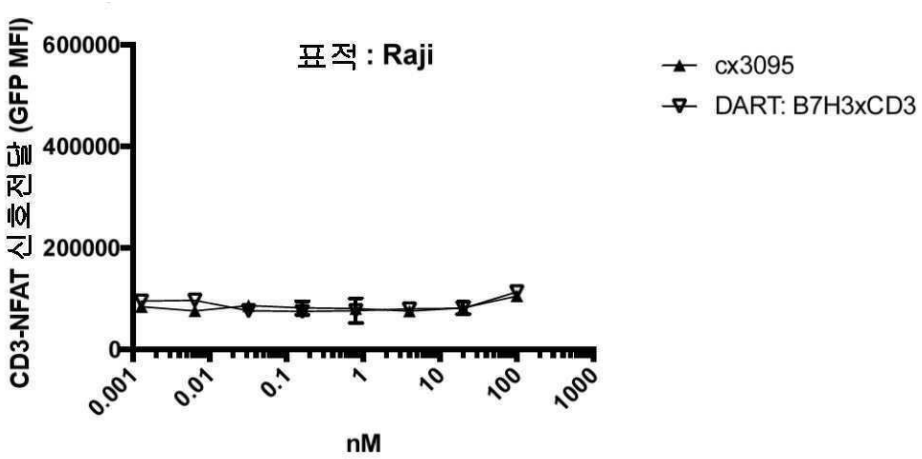
도면20d


표적 : CCRF
14 시간
종 녹색 대상 통합 강도
500000
400000
300000
200000
100000
0
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
nM
cx2513: 이중-EGFRxCD3
cx2973: 이중-cMETxCD3x이중-EGFR
cx2977: 단일-cMETxCD3x단일-EGFR
cx2979: 단일-cMETxCD3x이중-EGFR
cx3030: 사중-EGFRxCD3
항체 없음
EGFR/cMET 음성

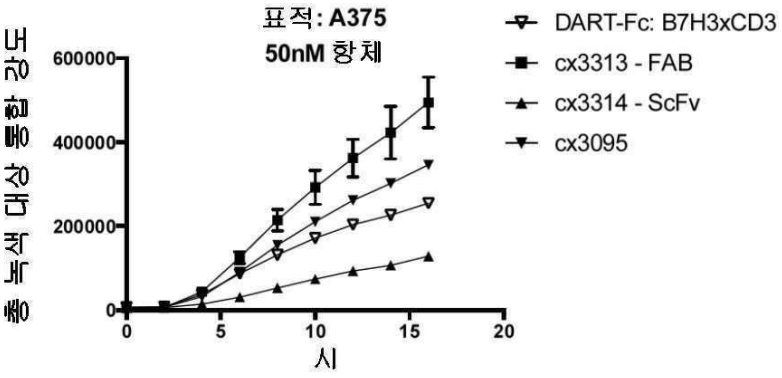
도면21a



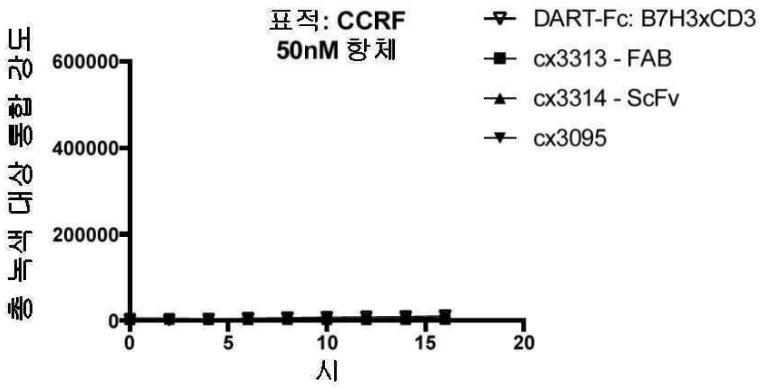
도면21b



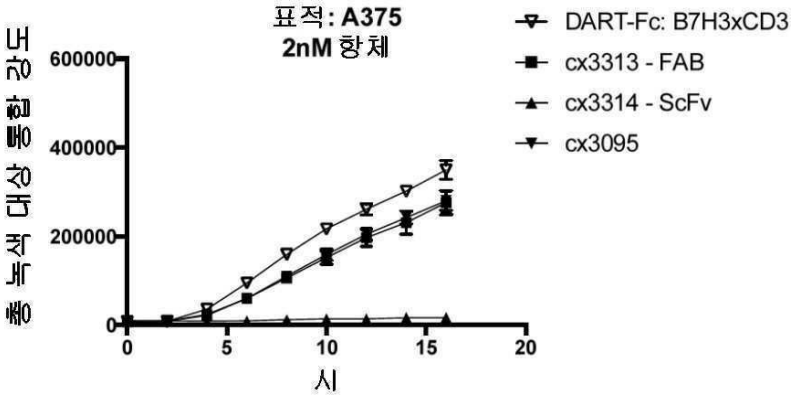
도면22a



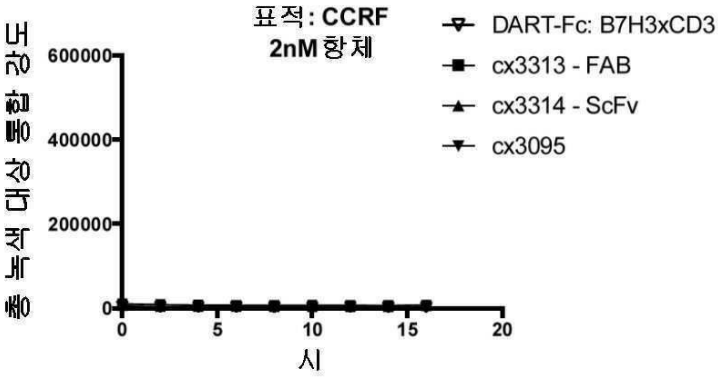
도면22b



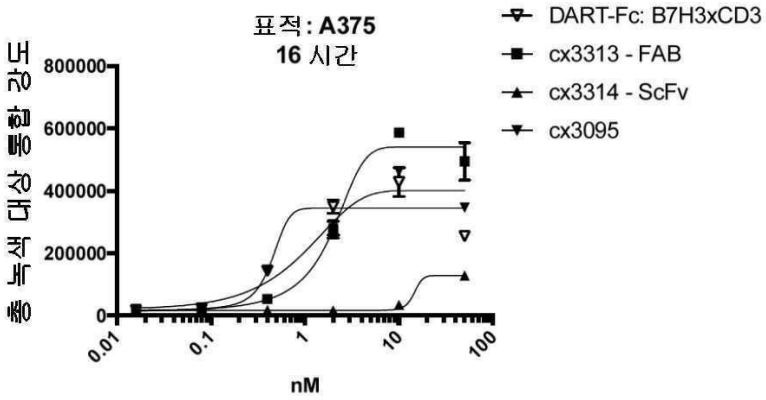
도면22c



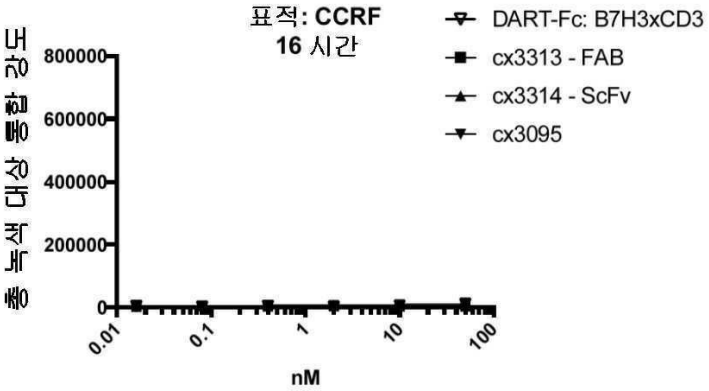
도면22d



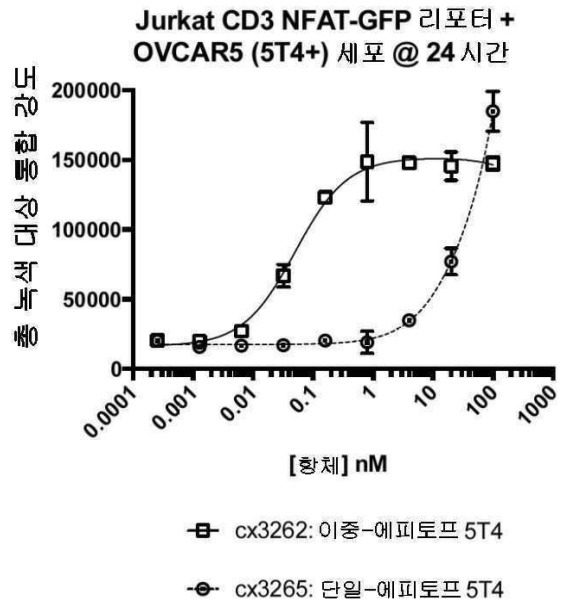
도면22e



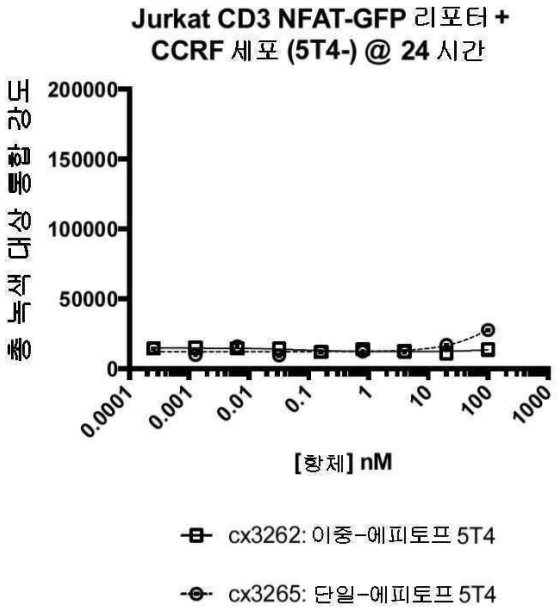
도면22f



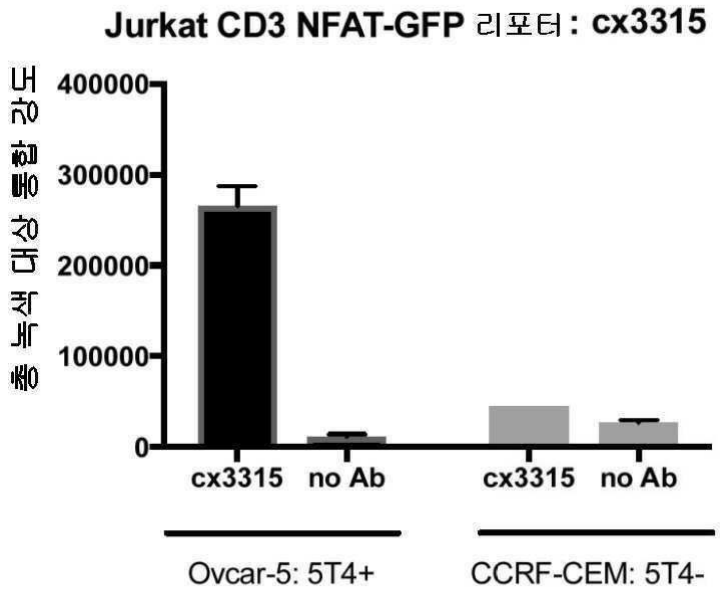
도면23a



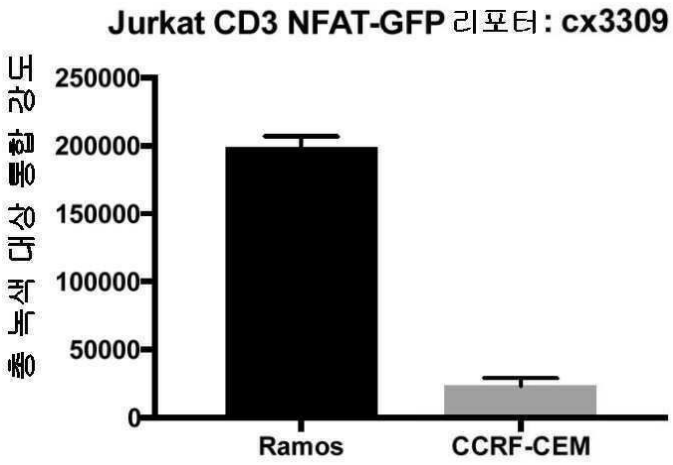
도면23b


Jurkat CD3 NFAT-GFP 리포터 +
CCRF 세포 (5T4-) @ 24 시간
총 녹색 대상 통합 강도
200000
150000
100000
50000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
[항체] nM
cx3262: 이중-에피토프 5T4
cx3265: 단일-에피토프 5T4

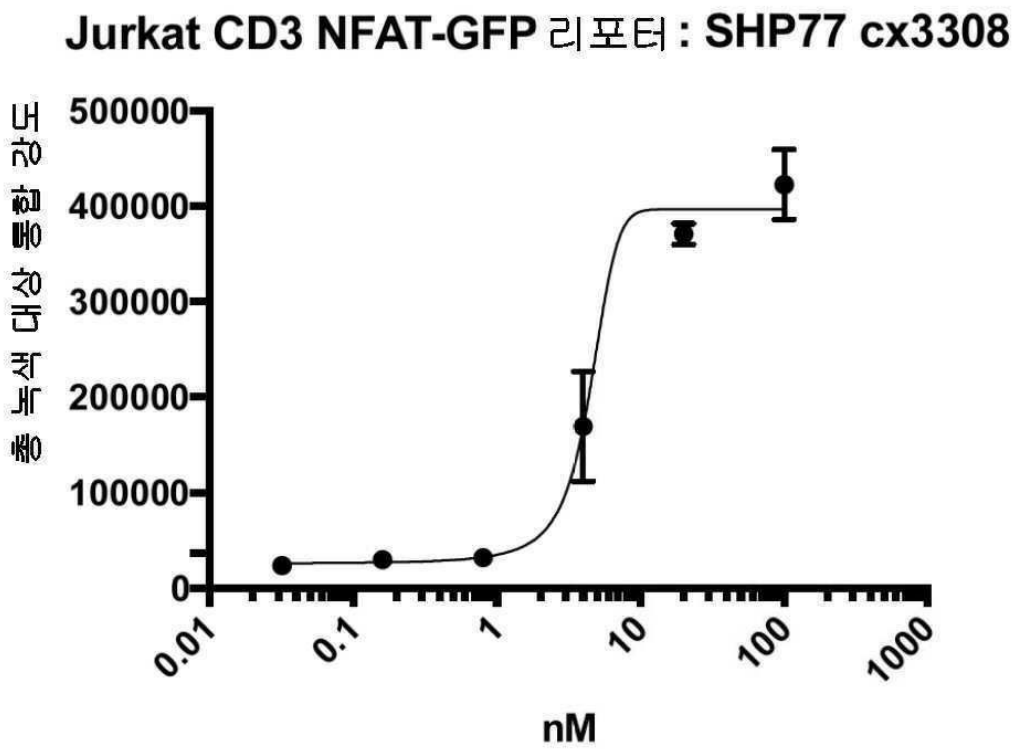
도면24


Jurkat CD3 NFAT-GFP 리포터 : cx3315
총 녹색 대상 통합 강도
400000
300000
200000
100000
0
cx3315
no Ab
cx3315
no Ab
Ovcar-5: 5T4+
CCRF-CEM: 5T4-

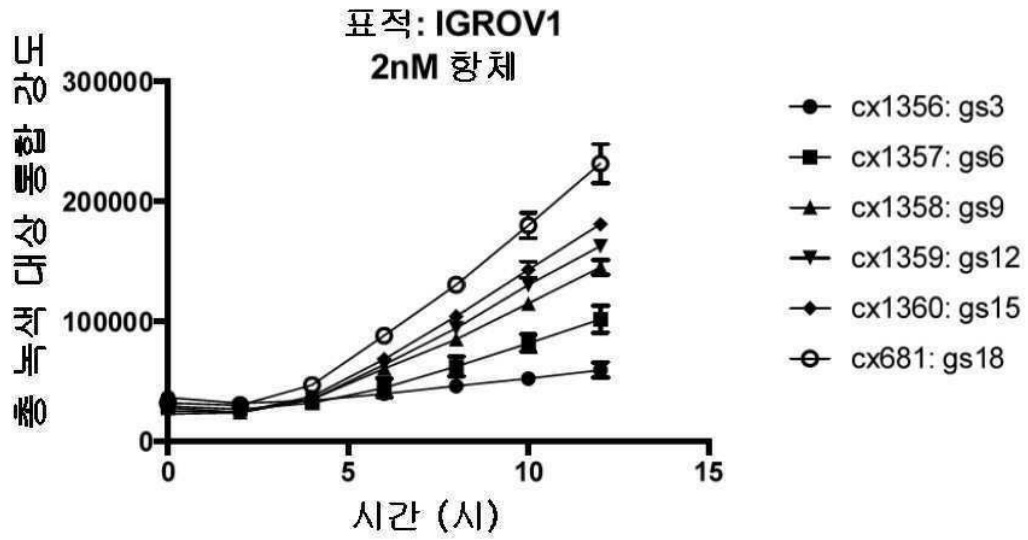
도면25


Jurkat CD3 NFAT-GFP 리포터 : cx3309
총 녹색 대상 통합 강도
250000
200000
150000
100000
50000
0
Ramos
CCRF-CEM

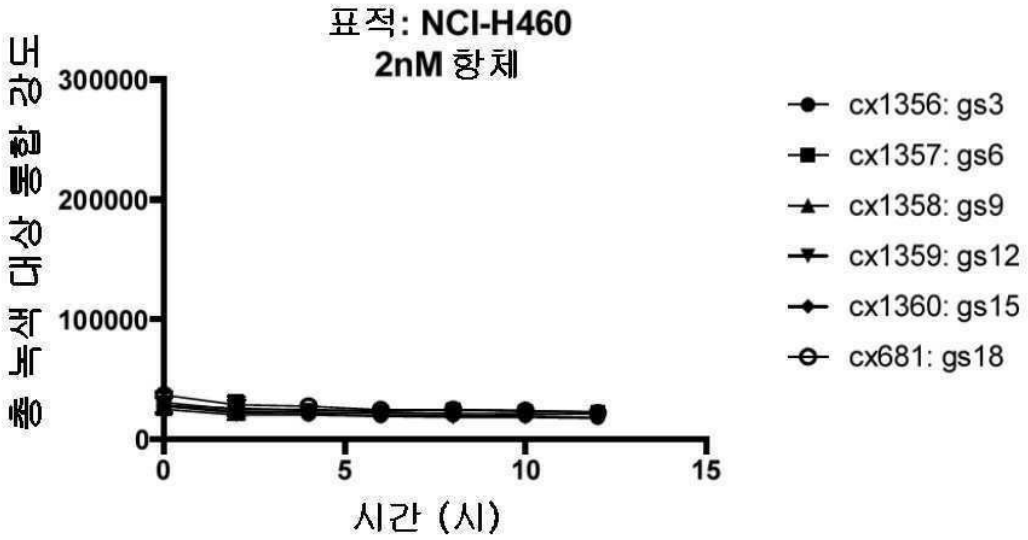
도면26


Jurkat CD3 NFAT-GFP 리포터 : SHP77 cx3308
총 녹색 대상 통합 강도
500000
400000
300000
200000
100000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
nM

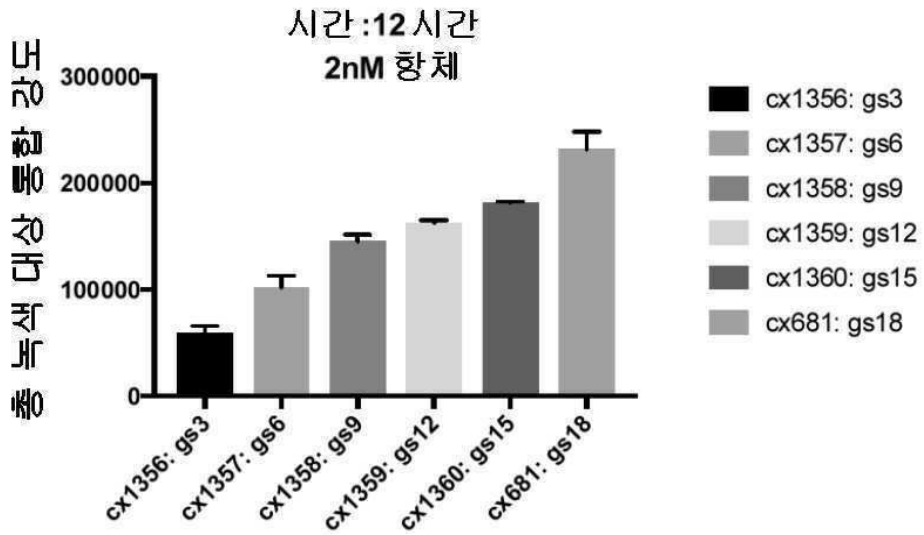
도면27a


표적: IGROV1
2nM 항체
총 녹색 대상 통합 강도
300000
200000
100000
0
0
5
10
15
시간 (시)
cx1356: gs3
cx1357: gs6
cx1358: gs9
cx1359: gs12
cx1360: gs15
cx681: gs18

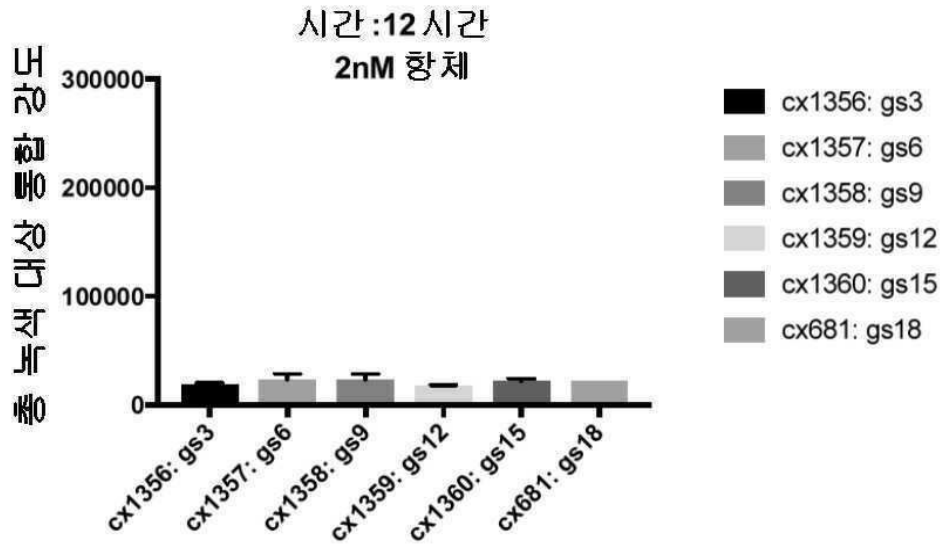
도면27b


표적: NCI-H460
2nM 항체
총 녹색 대상 통합 강도
300000
200000
100000
0
0
5
10
15
시간 (시)
cx1356: gs3
cx1357: gs6
cx1358: gs9
cx1359: gs12
cx1360: gs15
cx681: gs18

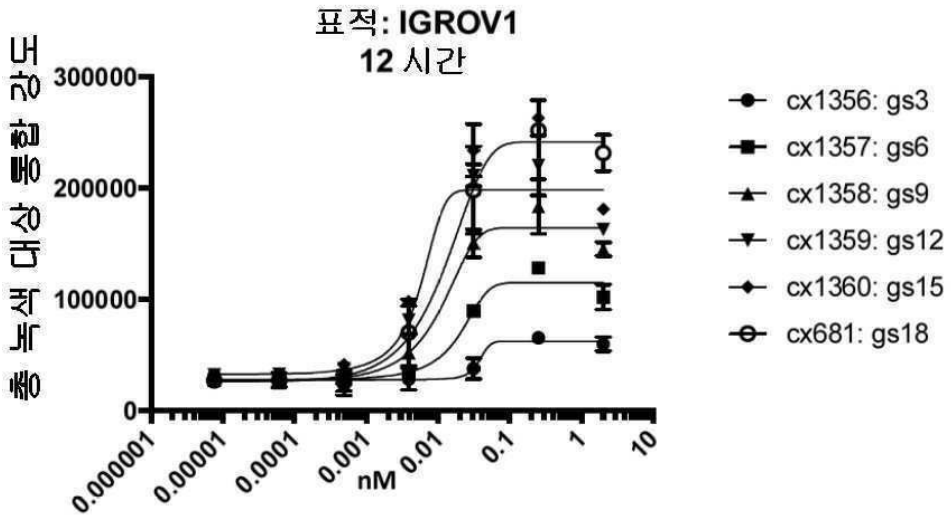
도면27c


시간 :12 시간
2nM 항체
총 녹색 대상 통합 강도
300000
200000
100000
0
cx1356: gs3
cx1357: gs6
cx1358: gs9
cx1359: gs12
cx1360: gs15
cx681: gs18

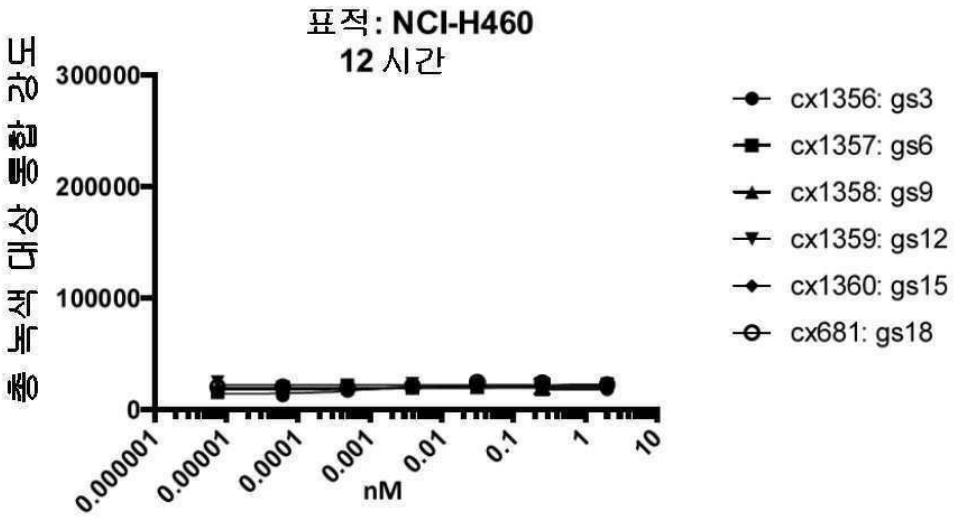
도면27d


시간 :12 시간
2nM 항체
총 녹색 대상 통합 강도
300000
200000
100000
0
cx1356: gs3
cx1357: gs6
cx1358: gs9
cx1359: gs12
cx1360: gs15
cx681: gs18

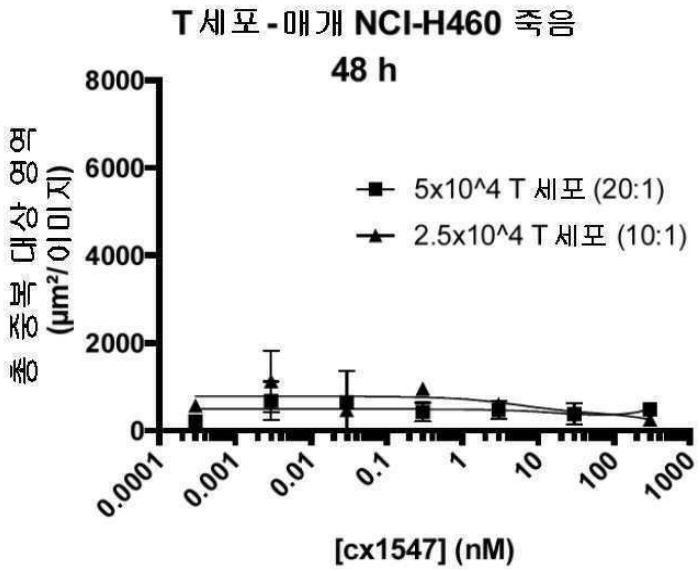
도면27e


표적: IGROV1
12 시간
총 녹색 대상 통합 강도
300000
200000
100000
0
0.000001
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
nM
cx1356: gs3
cx1357: gs6
cx1358: gs9
cx1359: gs12
cx1360: gs15
cx681: gs18

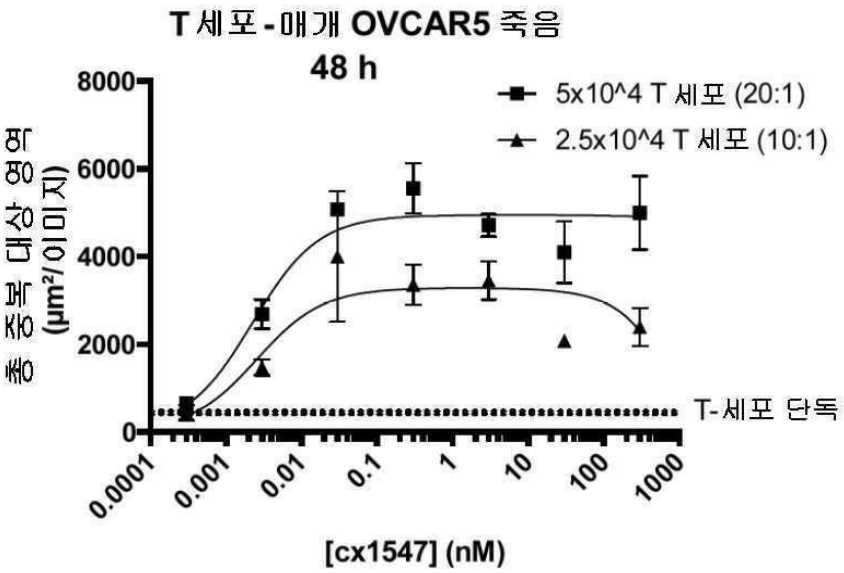
도면27f


표적: NCI-H460
12 시간
총 녹색 대상 통합 강도
300000
200000
100000
0
0.000001
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
nM
cx1356: gs3
cx1357: gs6
cx1358: gs9
cx1359: gs12
cx1360: gs15
cx681: gs18

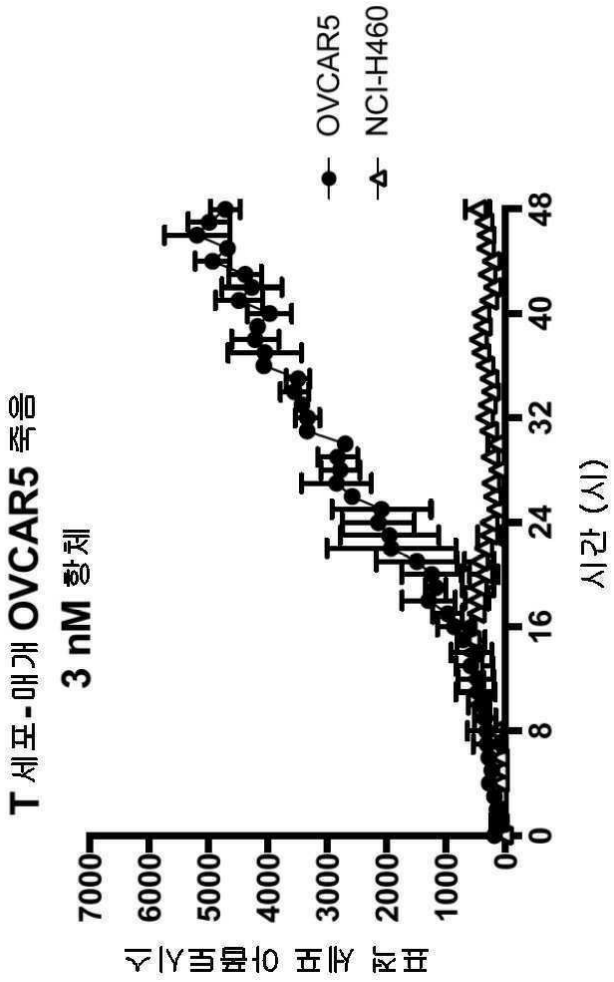
도면28a


T 세포 - 매개 NCI-H460 죽음
48 h
총 융합 대상 영역 (μm²/이미지)
8000
6000
4000
2000
0
5x10^4 T 세포 (20:1)
2.5x10^4 T 세포 (10:1)
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
[cx1547] (nM)

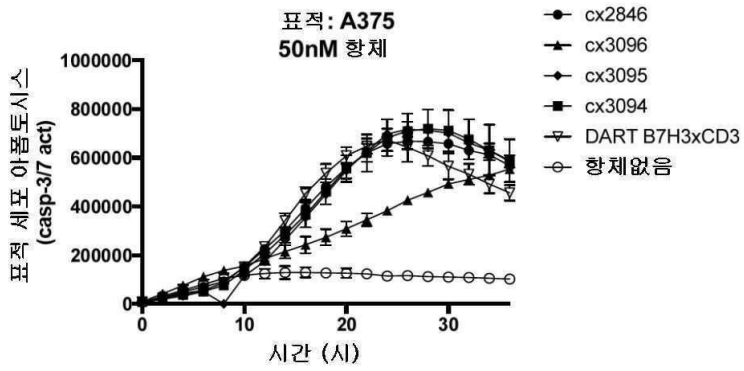
도면28b


T 세포 - 매개 OVCAR5 죽음
48 h
총 융합 대상 영역 (μm²/이미지)
8000
6000
4000
2000
0
5x10^4 T 세포 (20:1)
2.5x10^4 T 세포 (10:1)
T-세포 단독
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
[cx1547] (nM)

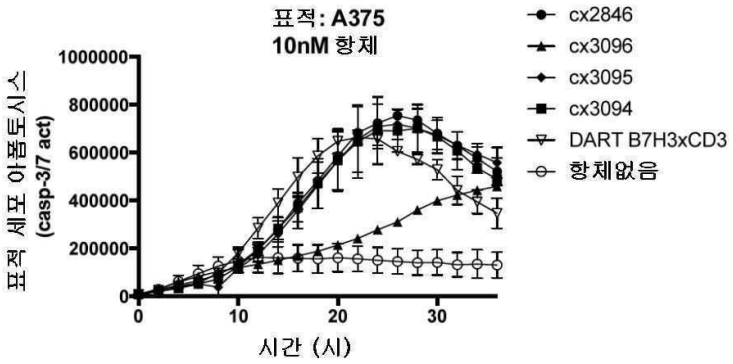
도면28c


OVCAR5
NCI-H460
T 세포-매개 OVCAR5 죽음
3 nM 항체
표적 세포 아폽토시스
시간 (시)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
0
8
16
24
32
40
48

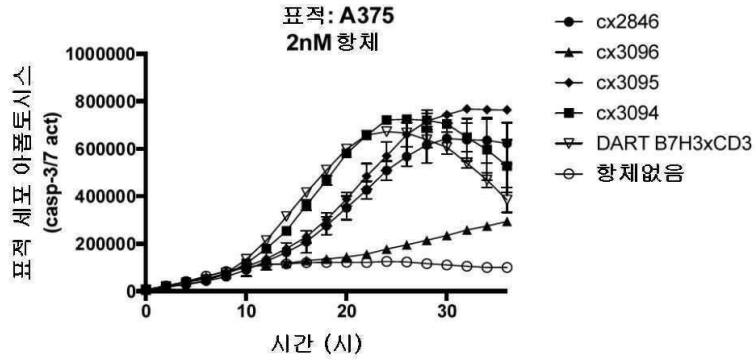
도면29a


표적: A375
50nM 항체
cx2846
cx3096
cx3095
cx3094
DART B7H3xCD3
항체없음
표적 세포 아폽토시스
(casp-3/7 act)
시간 (시)
0
200000
400000
600000
800000
1000000
0
10
20
30

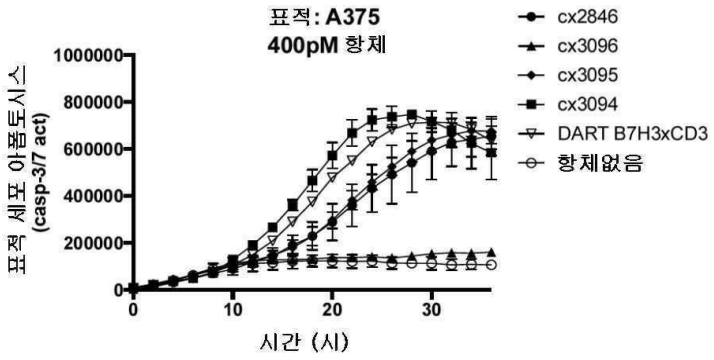
도면29b



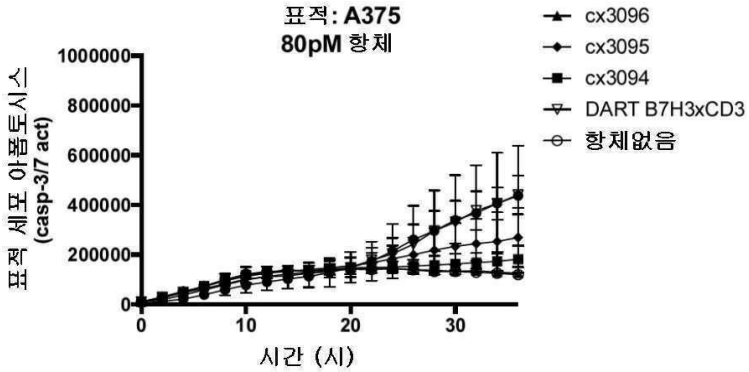
도면29c



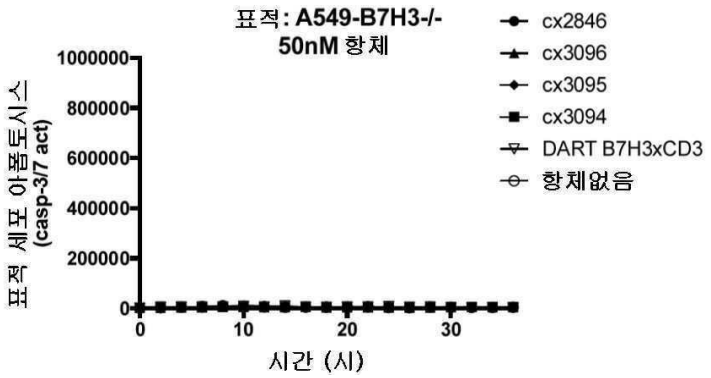
도면29d



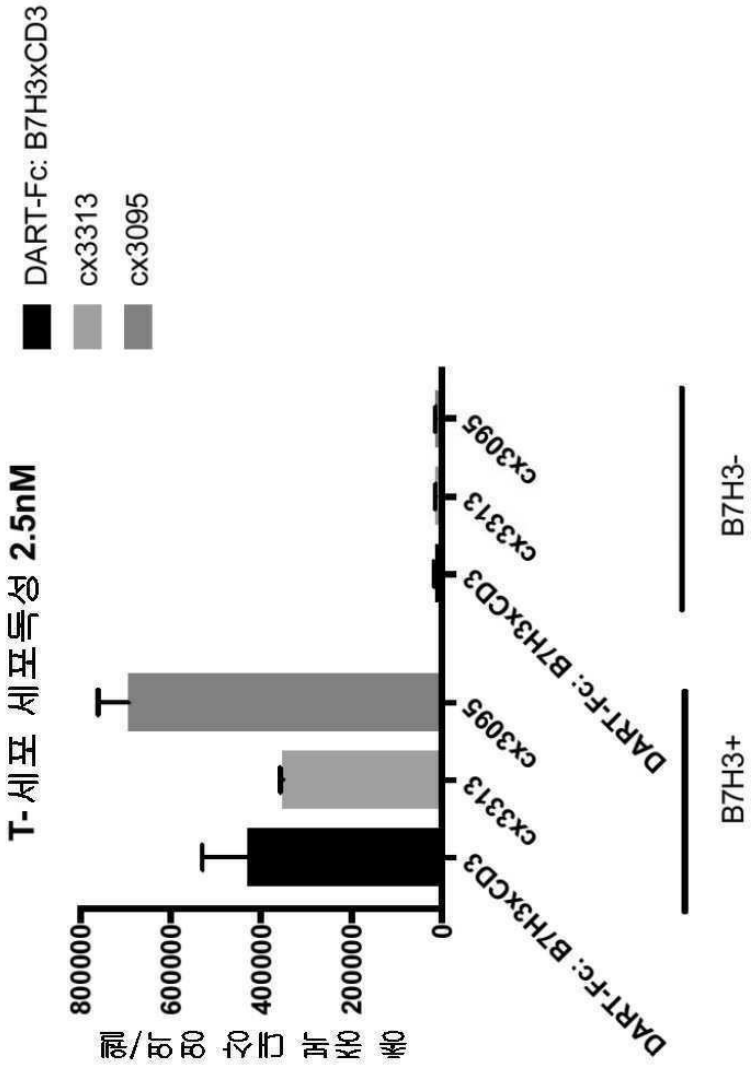
도면29e



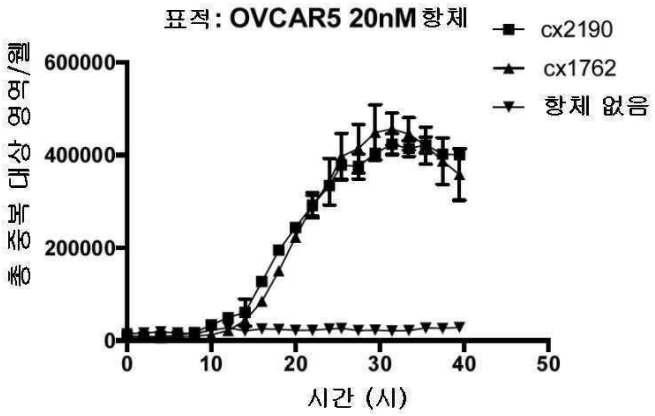
도면29f


표적: A549-B7H3-/-
50nM 항체
cx2846
cx3096
cx3095
cx3094
DART B7H3xCD3
항체없음
표적 세포 아폽토시스
(casp-3/7 act)
1000000
800000
600000
400000
200000
0
0
10
20
30
시간 (시)

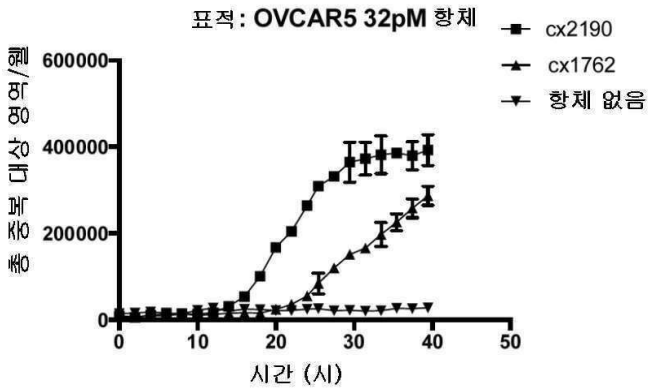
도면30


DART-Fc: B7H3xCD3
cx3313
cx3095
T-세포 세포독성 2.5nM
800000
600000
400000
200000
0
종 중복 대상 영역/웰
cx3095
cx3313
DART-Fc: B7H3xCD3
cx3095
cx3313
DART-Fc: B7H3xCD3
B7H3+
B7H3-

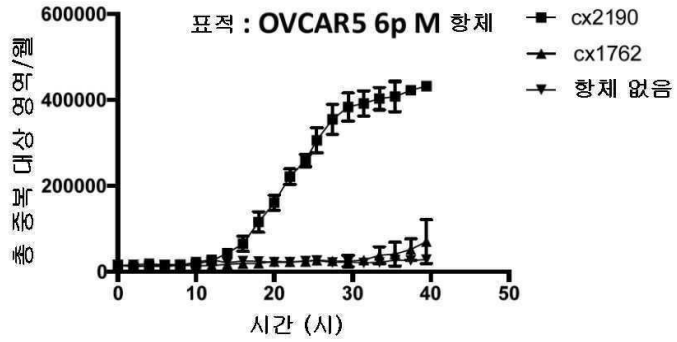
도면31a



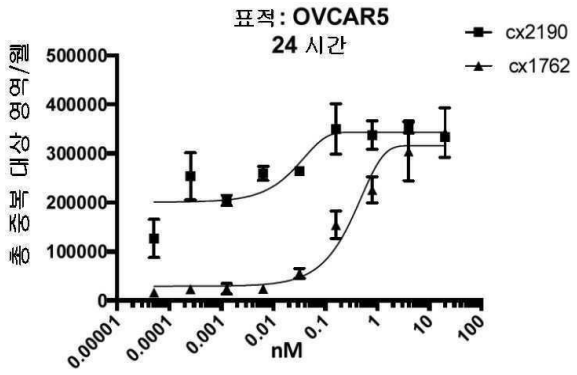
도면31b



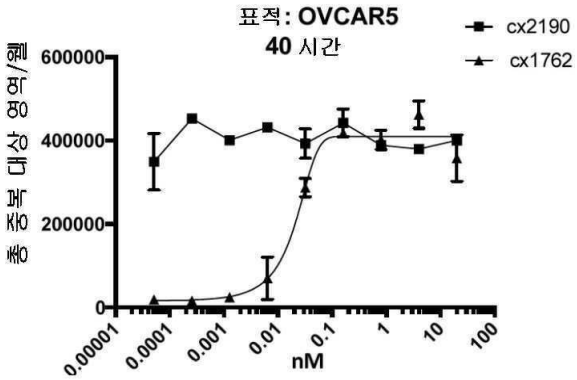
도면31c



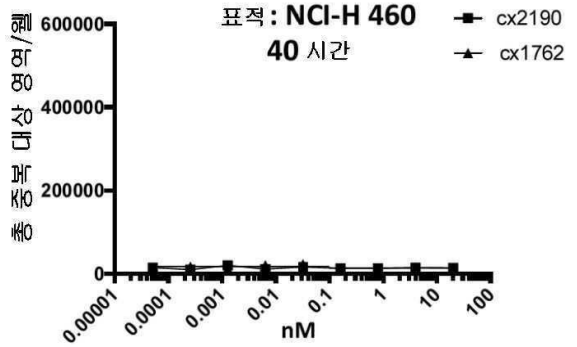
도면31d



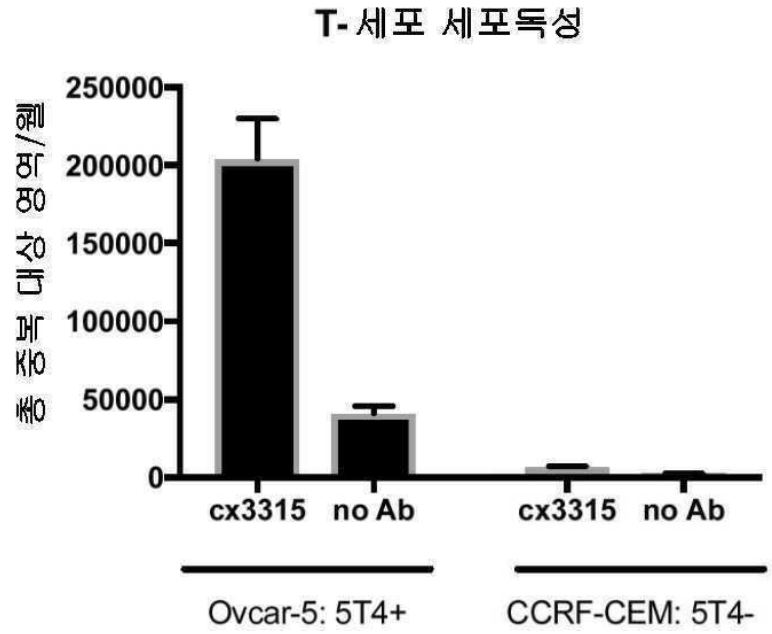
도면31e



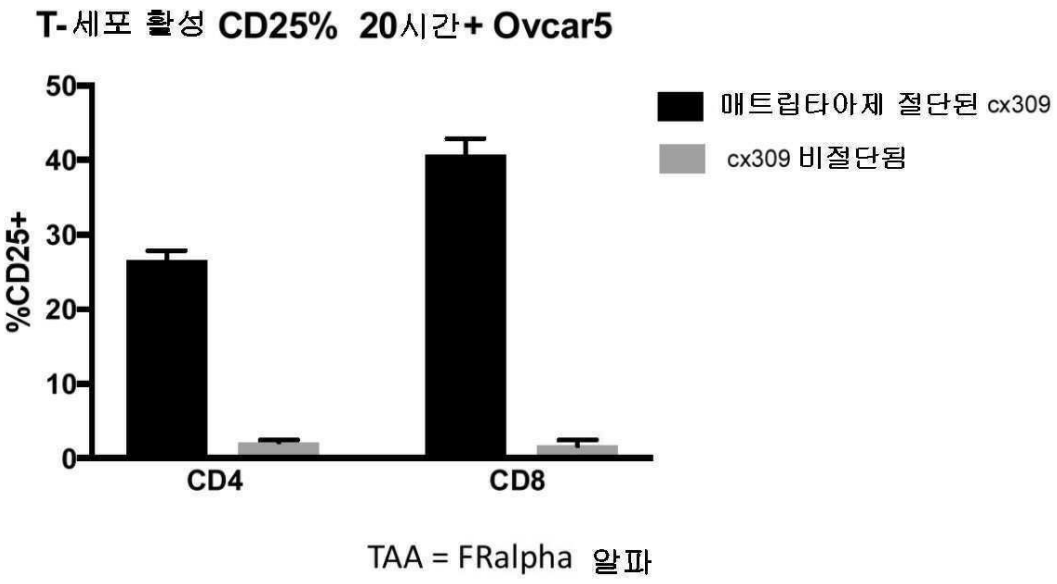
도면31f



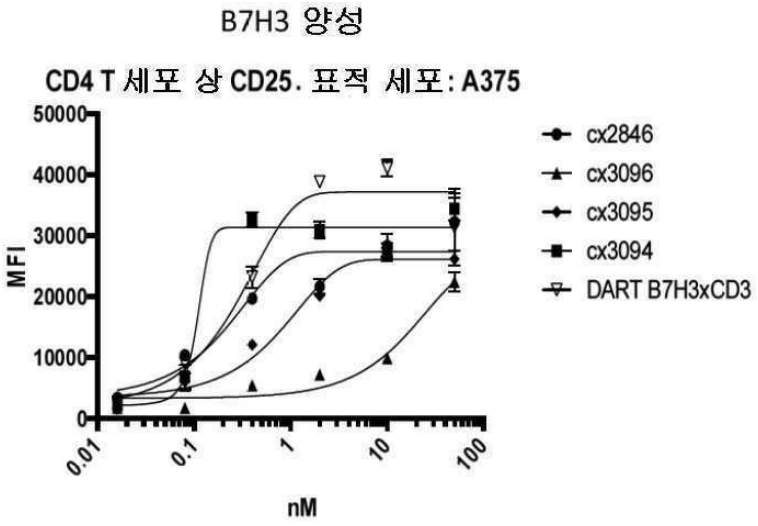
도면32


T-세포 세포독성
250000
200000
150000
100000
50000
0
cx3315
no Ab
cx3315
no Ab
Ovcar-5: 5T4+
CCRF-CEM: 5T4-

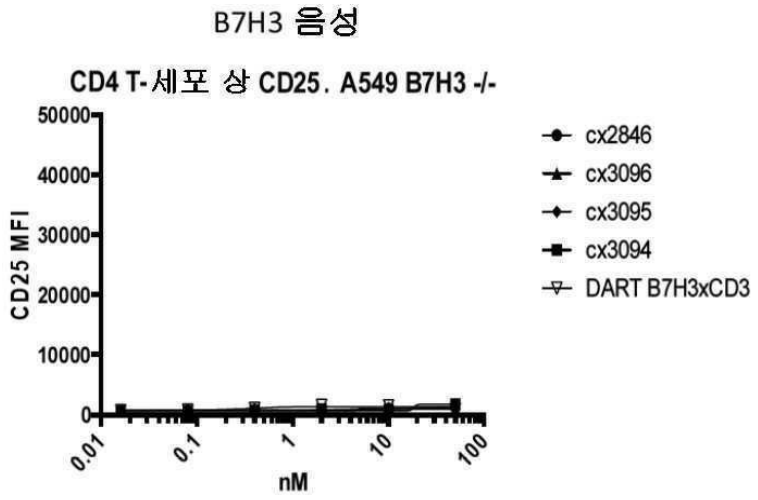
도면33


T-세포 활성 CD25% 20시간+ Ovcar5
50
40
30
20
10
0
%CD25+
CD4
CD8
매트립타아제 절단된 cx309
cx309 비절단됨
TAA = FRalpha 알파

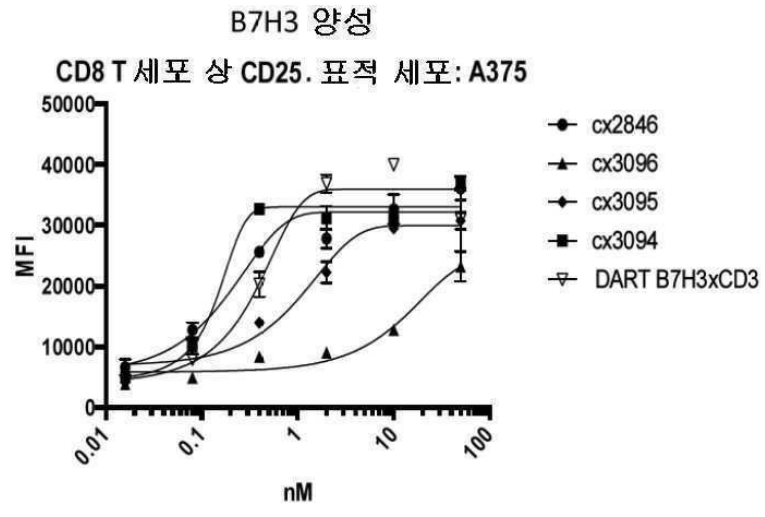
도면34a



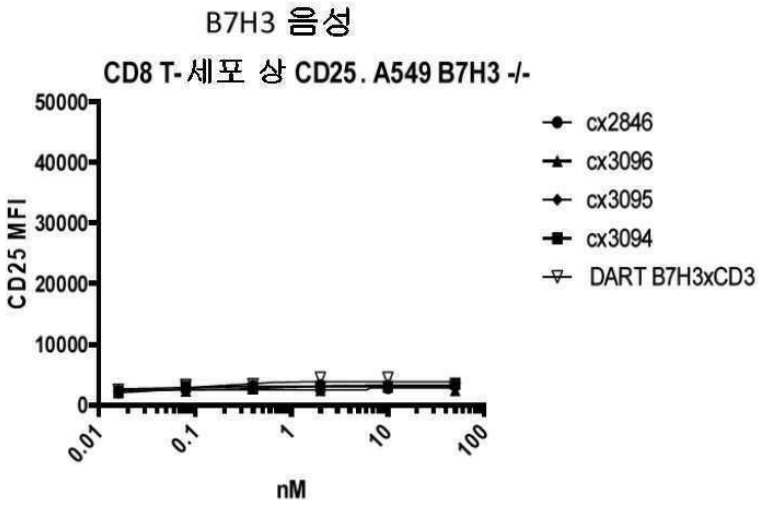
도면34b



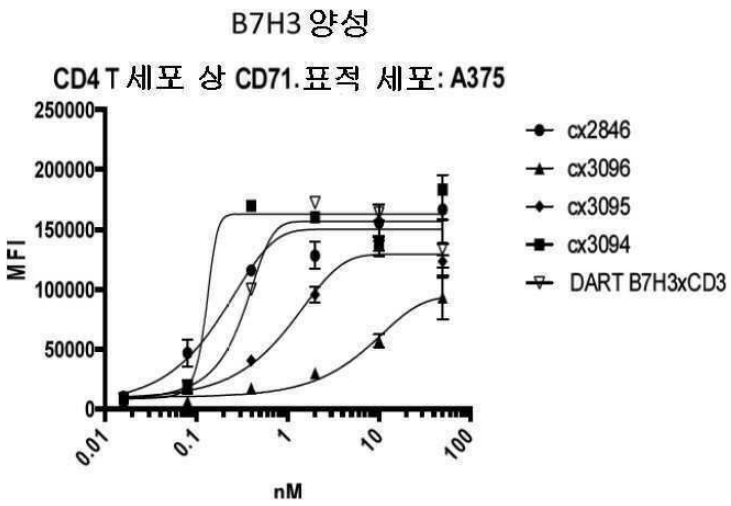
도면34c



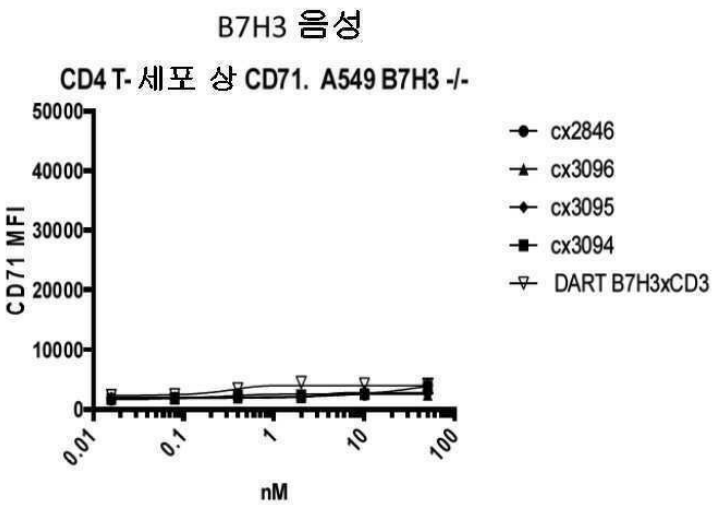
도면34d



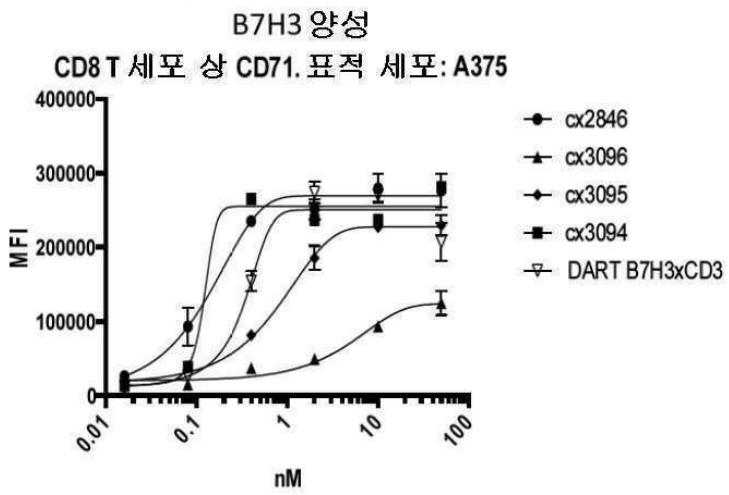
도면34e



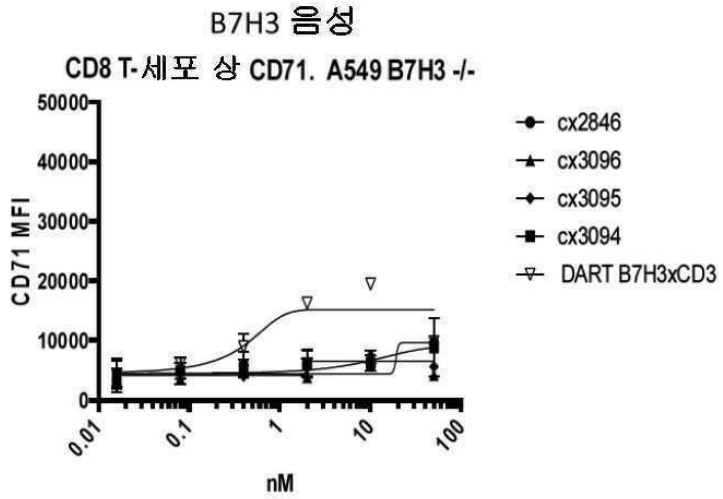
도면34f



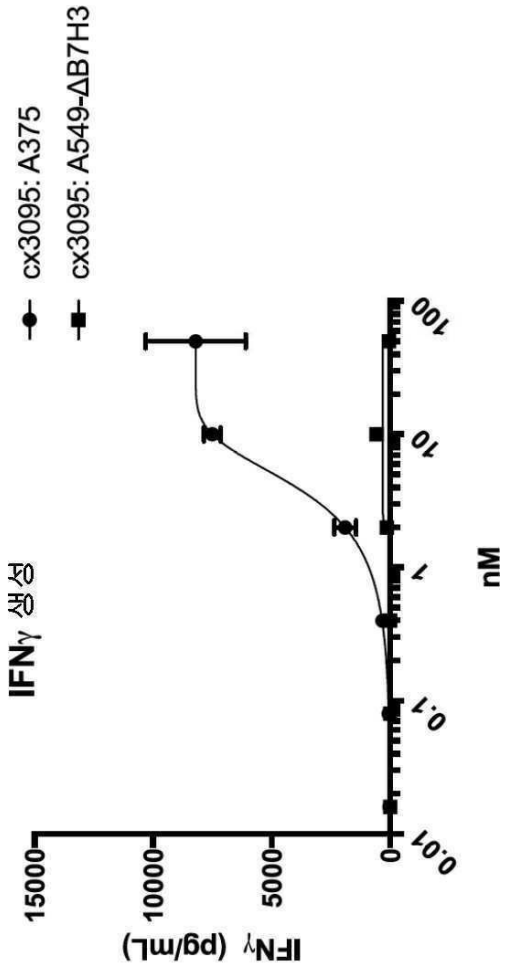
도면34g


B7H3 양성
CD8 T 세포 상 CD71. 표적 세포: A375
MFI
400000
300000
200000
100000
0
0.01
0.1
1
10
100
nM
cx2846
cx3096
cx3095
cx3094
DART B7H3xCD3

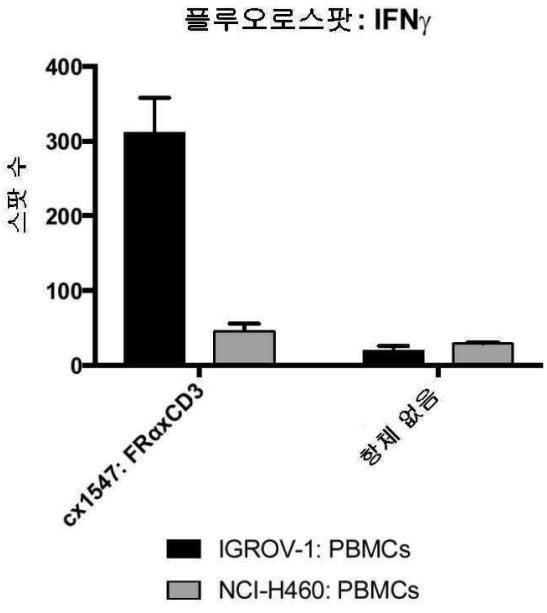
도면34h


B7H3 음성
CD8 T-세포 상 CD71. A549 B7H3 -/-
CD71 MFI
50000
40000
30000
20000
10000
0
0.01
0.1
1
10
100
nM
cx2846
cx3096
cx3095
cx3094
DART B7H3xCD3

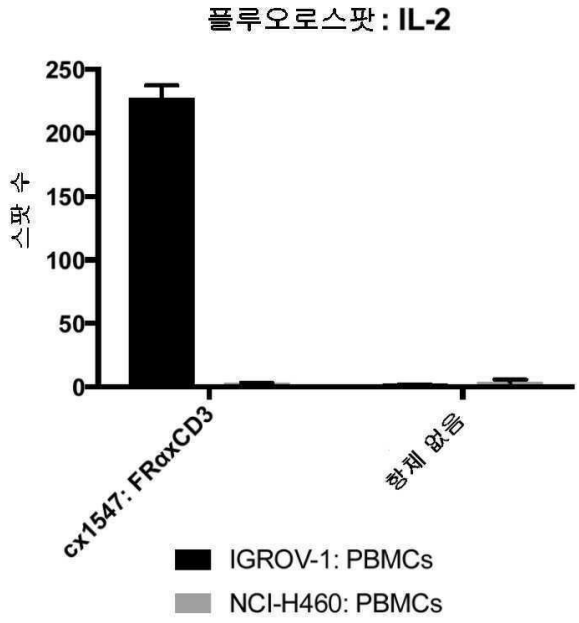
도면35


cx3095: A375
cx3095: A549-ΔB7H3
IFNγ 생성
IFNγ (pg/mL)
15000
10000
5000
0
100
10
1
0.1
0.01
nM

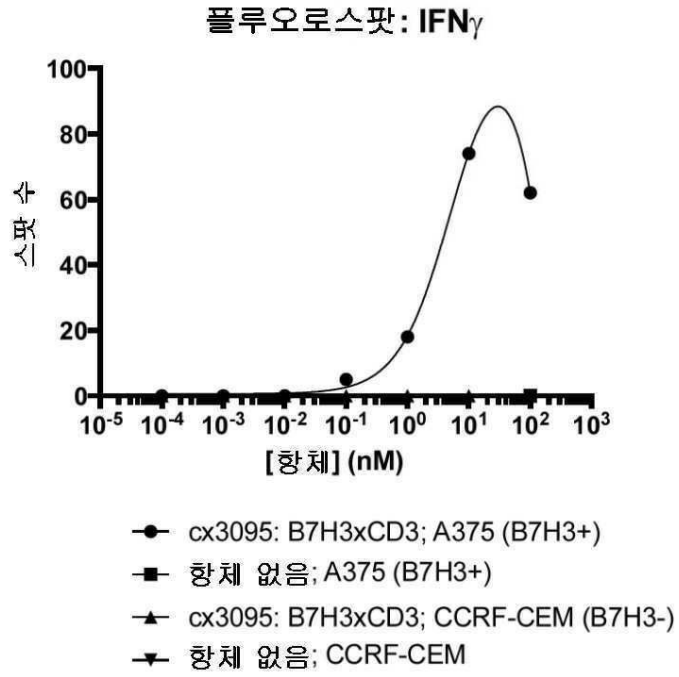
도면36a


플루오로스팟: IFNγ
스팟 수
400
300
200
100
0
cx1547: FRaxCD3
항체 없음
IGROV-1: PBMCs
NCI-H460: PBMCs

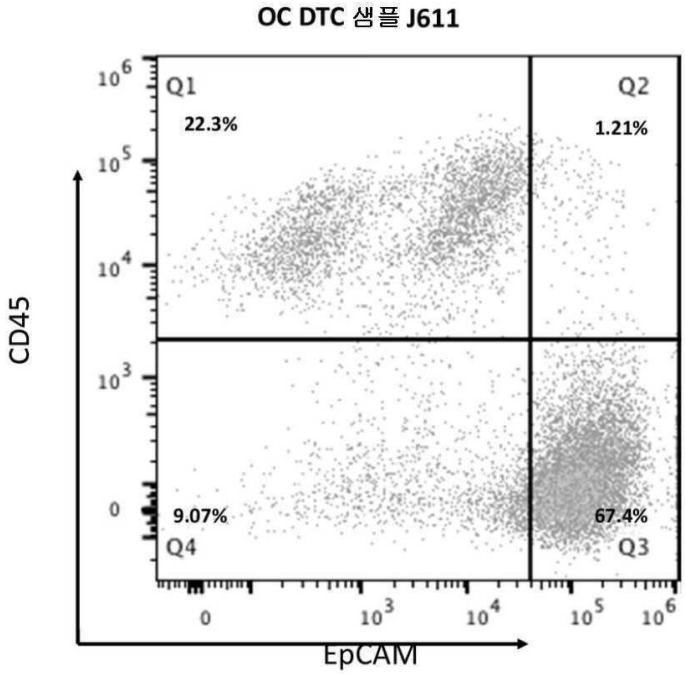
도면36b


플루오로스팟 : IL-2
250
200
150
100
50
0
스팟 수
cx1547: FRαxCD3
항체 없음
IGROV-1: PBMCs
NCI-H460: PBMCs

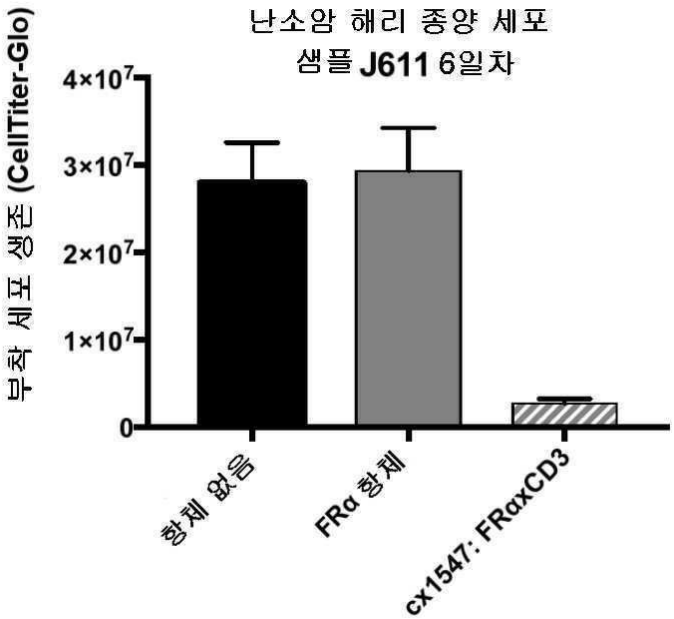
도면37


플루오로스팟 : IFNγ
100
80
60
40
20
0
스팟 수
10-5 10-4 10-3 10-2 10-1 100 101 102 103
[항체] (nM)
cx3095: B7H3xCD3; A375 (B7H3+)
항체 없음; A375 (B7H3+)
cx3095: B7H3xCD3; CCRF-CEM (B7H3-)
항체 없음; CCRF-CEM

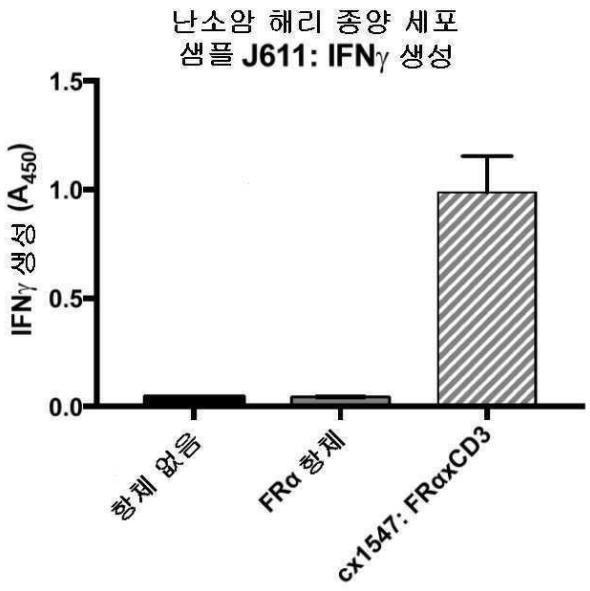
도면38a


OC DTC 샘플 J611
Q1
22.3%
Q2
1.21%
9.07%
Q4
67.4%
Q3
CD45
EpCAM
0
10^3
10^4
10^5
10^6

도면38b


난소암 해리 종양 세포
샘플 J611 6일차
부착 세포 생존 (CellTiter-Glo)
4×10^7
3×10^7
2×10^7
1×10^7
0
항체 없음
FRα 항체
cx1547: FRαxCD3

도면38c


난소암 해리 종양 세포
샘플 J611: IFNγ 생성
IFNγ 생성 (A450)
1.5
1.0
0.5
0.0
항체 없음
FRα 항체
cx1547: FRαxCD3

도면38d



종양 세포 생존 (남아있는 부착 세포)은 림프구를 씻어낸 후에 (현탁액 세포) **CellTiter Glo** 시약을 통해 평가되었다

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> INHIBRX LP

ECKELMAN, Brendan P.

KAPLAN, Michael D.

WILLIS, Katelyn M.

DEVERAUX, Quinn

TIMMER, John C.

<120> MULTISPECIFIC POLYPEPTIDE CONSTRUCTS HAVING CONSTRAINED CD3 BINDING AND METHODS OF USING THE SAME

<130> 744952000140

<150> 62/484,217

<151> 2017-04-11

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently herewith

<160> 190

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG1 Fc

<400> 1

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
1 5 10 15

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
20 25 30

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
35 40 45

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
50 55 60

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
65 70 75 80

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
85 90 95

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
100 105 110

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
115 120 125

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

130 135 140

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

180 185 190

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

195 200 205

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

210 215

<210> 2

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG2 Fc

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

65 70 75 80

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

130 135 140

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

210 215

<210> 3

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG2 Fc

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His

65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

85 90 95

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

100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met

115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

130 135 140

Ser Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

210 215

<210> 4

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG3 Fc

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp

35 40 45

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

50 55 60

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

65 70 75 80

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

85 90 95

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly

100 105 110

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

115 120 125

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

130 135 140

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn

145 150 155 160

Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

165 170 175

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

180 185 190

Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr

195 200 205

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

210 215

<210> 5

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG4 Fc

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp

35 40 45

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

50 55 60

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

65 70 75 80

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

85 90 95

Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

100 105 110

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

115 120 125

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

130 135 140

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn

180 185 190

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

195 200 205

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

210 215

<210> 6

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG4 Fc

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp

35 40 45

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

50 55 60

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

65 70 75 80

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

85 90 95

Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

100 105 110

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

115 120 125

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

130 135 140

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn

180 185 190

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

195 200 205

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

210 215

<210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hinge

<400> 7

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

1 5 10

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hinge

<400> 8

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

1 5

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hinge

<400> 9

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys

1 5 10

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> (GGS)2

<400> 10

Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> (GGS)3

<400> 11

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> (GGS)4

<400> 12

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

1 5 10

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> (GGS)5

<400> 13

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

1 5 10 15

<210> 14

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 Hv

<400> 14

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr

85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110

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

115 120 125

<210> 15

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> anti-CD3 Lv

<400> 15

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

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VH CDR1

<400> 16

Thr Tyr Ala Met Asn

1 5

<210> 17

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VH CDR2

<400> 17

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

1 5 10 15

Val Lys Asp

<210> 18

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VH CDR3

<400> 18

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 19

<211

> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VL CDR1

<400> 19

Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn

1 5 10

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VL CDR2

<400> 20

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VL CDR3

<400> 21

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val

1 5

<210> 22

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Granzyme B substrate

<400> 22

Leu Glu Ala Asp

1

<210> 23

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Granzyme B substrate

<400> 23

Arg Gln Ala Arg

1

<210> 24

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP substrate

<400> 24

Pro Ala Gly Leu

1

<210> 25

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 25

Thr Gly Leu Glu Ala Asp Gly Ser Pro Ala Gly Leu Gly Arg Gln Ala

1 5 10 15

Arg Val Gly

<210> 26

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 26

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

1 5 10 15

Gly Leu Gly

<210> 27

<211> 19

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 27

Thr Gly Ser Pro Ala Gly Leu Glu Ala Asp Gly Ser Arg Gln Ala Arg

1 5 10 15

Val Gly Ser

<210> 28

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 28

Thr Gly Pro Ala Gly Leu Gly Leu Glu Ala Asp Gly Ser Arg Gln Ala

1 5 10 15

Arg Val Gly

<210> 29

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 29

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

1 5 10 15

Gly Leu Gly

<210> 30

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 30

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

1 5 10 15

Gly Ser

<210> 31

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 31

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

1 5 10 15

Ala Asp Gly Ser

20

<210> 32

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VH1

<400> 32

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110

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

115 120 125

<210> 33

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VH2

<400> 33

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

1 5 10 15

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

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

<210> 34
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> anti-CD3 VH3
<400> 34
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg

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

65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 35
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> anti-CD3 VH4
<400> 35

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

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

<210> 36

<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> anti-CD3 VH5
<400> 36

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

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

115 120 125
<210> 37
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> anti-CD3 VH6
<400> 37
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 38
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> anti-CD3 VH7
<400> 38

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

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

100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 39
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VH8

<400> 39

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

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

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 40

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VH9

<400> 40

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 41
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> anti-CD3 VH10
<400> 41

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

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Tyr Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 42
<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VH11

<400> 42

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr

85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110

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

115 120 125

<210> 43

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> anti-CD3 VH12

<400> 43

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

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

<210> 44

<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> anti-CD3 VH13
<400> 44
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

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

115 120 125

<210> 45

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VH14

<400> 45

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

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

Ala Tyr Trp Gly Cys Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro
115 120 125

<210> 46

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VH15

<400> 46

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110

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

115 120 125

<210> 47

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VH16

<400> 47

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110

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

115 120 125

<210> 48

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VH17

<400> 48

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110

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

115 120 125

<210> 49

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VH18

<400> 49

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

1 5 10 15

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

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 50
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> anti-CD3 VH19
<400> 50
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

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

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 51
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> anti-CD3 VH20
<400> 51

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

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

<210> 52

<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VH21

<400> 52

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

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

115 120 125

<210> 53

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VH22

<400> 53

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 54
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> anti-CD3 VH23
<400> 54

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

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

100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 55
<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VH24

<400> 55

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 56

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VH25

<400> 56

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr

20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr

85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 57
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> anti-CD3 VH26
<400> 57

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

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 58

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VH27

<400> 58

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asp Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110

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

115 120 125

<210> 59

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> anti-CD3 VH28

<400> 59

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp

100 105 110

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

115 120

<210> 60

<

211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VH29

<400> 60

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 61

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VH30

<400> 61

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Tyr Phe

100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 62

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VH31

<400> 62

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val

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

100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125
<210> 63
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> anti-CD3 VL1
<400> 63
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

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

85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 64

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VL2

<400> 64

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

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

His Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 65

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VL3

<400> 65

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

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210>

66

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VL4

<400> 66

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ser Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 67

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> anti-CD3 VL5

<400> 67

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ser Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 68

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VL6

<400> 68

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ser Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 69

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VL7

<400> 69

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

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 70

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VL8

<400> 70

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

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

85 90 95
Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 71

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VL9

<400> 71

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

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

85 90 95

His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 72

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VL10

<400> 72

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

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

His Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 73

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VL11

<400> 73

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

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Cys Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

His Trp Val Phe Gly Glu Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210>

74

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VL12

<400> 74

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

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 75

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> anti-CD3 VL13

<400> 75

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

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 76

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VL14

<400> 76

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

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 77

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VL15

<400> 77

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ser Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 78

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VL16

<400> 78

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

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

85 90 95
Leu Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 79

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VL17

<400> 79

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

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

85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 80

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VL18

<400> 80

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

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 81

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 VL19

<400> 81

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

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly

20 25 30

Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

Arg Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210>

82

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Knob Fc

<400> 82

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Pro Thr

225

<210> 83

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hole Fc

<400> 83

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Pro Thr

225

<210> 84

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Knob Fc

<400> 84

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys

130 135 140

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

145 150 155 160

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

165 170 175

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

180 185 190

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

195 200 205

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Thr

210 215 220

<210> 85

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hole Fc

<400> 85

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

145 150 155 160

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

165 170 175

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

180 185 190

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

195 200 205

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Thr

210 215 220

<210> 86

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Knob Fc

<400> 86

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Pro Gly

225

<210> 87

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hole Fc

<400> 87

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

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

20 25 30

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

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

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

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

85 90 95

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

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

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

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

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

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

210 215 220

Pro Gly

225

<210> 88

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Knob Fc

<400> 88

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys

130 135 140

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

145 150 155 160

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

165 170 175

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

180 185 190

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

195 200 205

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

210 215 220

<210> 89

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hole Fc

<400> 89

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

145 150 155 160

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

165 170 175

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

180 185 190

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

195 200 205

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

210 215 220

<210> 90

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hole Fc

<400> 90

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Pro Thr

225

<210> 91

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hole Fc

<400> 91

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

145 150 155 160

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

165 170 175

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

180 185 190

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

195 200 205

Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Thr

210 215 220

<210> 92

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hole Fc

<400> 92

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Pro Gly

225

<210> 93

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hole Fc

<400> 93

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

145 150 155 160

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

165 170 175

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

180 185 190

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

195 200 205

Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

210 215 220

<210> 94

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Knob Fc

<400> 94

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Pro Thr

225

<210> 95

<211> 223

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Knob Fc

<400> 95

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

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Ser Arg
20 25 30

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

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

50 55 60

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

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
85 90 95

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

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

115 120 125

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

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

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
165 170 175

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

180 185 190

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Val His Glu Ala
195 200 205

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Thr
210 215 220

<210> 96

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Knob Fc

<400> 96

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

210 215 220

Pro Gly

225

<210> 97

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Knob Fc

<400> 97

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Pro Ser
1 5 10 15
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Ser Arg
20 25 30

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

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

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
165 170 175
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

180 185 190

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Val His Glu Ala

195 200 205

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

210 215 220

<210> 98

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hole Fc

<400> 98

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Pro Thr

225

<210> 99

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hole Fc

<400> 99

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

1 5 10 15

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Ser Arg

20 25 30

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

35 40 45

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

145 150 155 160

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

165 170 175

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

180 185 190

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Val His Glu Ala

195 200 205

Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Thr

210 215 220

<210> 100

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hole Fc

<400> 100

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Pro Gly

225

<210> 101

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hole Fc

<400> 101

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

1 5 10 15

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Ser Arg

20 25 30

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

35 40 45

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

145 150 155 160

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

165 170 175

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

180 185 190

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Val His Glu Ala

195 200 205

Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

210 215 220

<210> 102

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide Linker

<400> 102

Pro Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 103

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide Linker

<400> 103

Gly Gly Gly Gly

1

<210> 104

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 104

Gly Pro Ala Gly Leu Gly Leu Glu Pro Asp Gly Ser Arg Gln Ala Arg

1 5 10 15

Val Gly

<210> 105

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400

> 105

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Glu Pro Asp Ile Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Ser

<210> 106

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 106

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Leu Glu Ala Asp Thr Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Ser

<210> 107

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 107

Gly Ser Ile Glu Pro Asp Ile Gly Ser

1 5

<210> 108

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 108

Gly Ser Leu Glu Ala Asp Thr Gly Ser

1 5

<210> 109

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 109

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Glu Pro Asp Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Ser

<210

> 110

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Glu Pro Asp Val Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Ser

<210> 111

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 111

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Glu Pro Asp Ser Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Ser

<210> 112

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 112

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Glu Pro Asp Thr Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Ser

<210> 113

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 113

Gly Gly Gly Ser Leu Glu Pro Asp Gly Ser Gly Ser

1 5 10

<210> 114

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Linker

<400> 114

Gly Pro Ala Gly Leu Gly Leu Glu Ala Asp Gly Ser Arg Gln Ala Arg

1 5 10 15

Val Gly

<210> 115

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 115

Gly Gly Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 116

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 116

Gly Ser Ser Ala Gly Ser Glu Ala Gly Gly Ser Gly Gln Ala Gly Val

1 5 10 15

Gly Ser

<210> 117

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 117

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Leu Glu Ala Glu Gly Ser Gly Gly Gly

1 5 10 15

Gly Ser

<210> 118

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 118

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Glu Pro Asp Pro Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Ser

<210> 119

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 119

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

1 5 10 15

Gly Ser

<210> 120

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR alpha sdAb

<400> 120

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asn Tyr

20 25 30

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val

35 40 45

Ser Cys Ile Ser Ser Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Lys Gly Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

<210> 121
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> FR alpha sdAb
<400>
121
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asp
20 25 30
Ala Thr Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
Ala Ile Ile Thr Ser Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Pro Glu Ser Val Lys
50 55 60

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

Thr Leu Val Thr Val Lys Pro
115

<210> 122

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR alpha sdAb

<400> 122

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

Thr Phe Gly Val Val Phe Thr Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly
20 25 30

Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala Arg Val Thr Gly Thr Asp Thr Val Asp
35 40 45

Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Phe Ala
50 55 60

Arg Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
65 70 75 80

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
85 90 95

Val Thr Val Lys Pro
100

<210> 123

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cMET sdAb

<400> 123

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Leu Asp Tyr Tyr
20 25 30

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

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

<210> 124
<211> 245
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> B7H3 scFv
<400> 124

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

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

65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Gly Arg Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser

115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln

130 135 140

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

145 150 155 160

Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln

165 170 175

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr

225 230 235 240

Lys Leu Glu Ile Lys

245

<210> 125

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD20 scFv

<400> 125

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

115 120 125

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

130 135 140

Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser

145 150 155 160

Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr

165 170 175

Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser

180 185 190

Asn Leu Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

195 200 205

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly

210 215 220

Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly

225 230 235 240

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

245

<210> 126

<211> 241

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL3 scFv

<400> 126

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Val Tyr Tyr Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Ile Ala Val Thr Gly Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

115 120 125

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

130 135 140

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln

145 150 155 160

Arg Val Asn Asn Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln

165 170 175

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile

180 185 190

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

195 200 205

Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

210 215 220

Tyr Asp Arg Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile

225 230 235 240

Lys

<210> 127

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> B7H3 Fd

<400> 127

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Arg Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

180 185 190

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

195 200 205

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

Cys
225

<210> 128

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> B7H3 LC

<400> 128

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

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

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

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

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

<210> 129
<211> 225
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 5T4 Fd
<400> 129
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

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

115 120 125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Cys

225

<210> 130

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5T4 LC

<400> 130

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Ile Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ala

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Leu Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 131

<211> 222

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> gpNMB Fd

<400> 131

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

35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Ser Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80
Ser Leu Thr Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Gly Tyr Asn Trp Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

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

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

<210> 132

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> gpNMB LC

<400> 132

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Pro

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 133

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL3 Fd

<400> 133

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met

35 40 45

Ala Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Ile Ile Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Ile Gly Asp Ser Ser Pro Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 134

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL3 LC

<400> 134

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Ser Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Thr Ser Pro Trp

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 135

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 135

Gly Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 136

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 136

Ile Glu Pro Asp Ile

1 5

<210> 137

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 137

Leu Glu Ala Asp Thr

1 5

<210> 138

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 138

Ile Glu Pro Asp Gly

1 5

<210> 139

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 139

Ile Glu Pro Asp Val

1 5

<210> 140

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 140

Ile Glu Pro Asp Ser

1 5

<210> 141

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 141

Ile Glu Pro Asp Thr

1 5

<210> 142

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 142

Leu Glu Pro Asp

1

<210> 143

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 143

Leu Glu Ala Glu

1

<210> 144

<211

> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 144

Ile Glu Pro Asp Pro
1 5

<210> 145

<211> 274

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Second Polypeptide Chain of B7-H3 x CD3 Bispecific DART-A Diabody

<400> 145

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
130 135 140

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ala Ile
165 170 175

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

Ser Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240
Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala
245 250 255
Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu
260 265 270
Lys Glu

<210> 146
<211> 227
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Third Polypeptide Chain of B7-H3 x CD3 Bispecific DART-A Diabody

<400> 146
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
1 5 10 15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

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

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

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

<210> 147
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Linker
<400> 147
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Ser

<210> 148
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 148

Thr Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Glu Pro Asp Ile Gly Gly Ser

1 5 10 15

Gly Gly Ser

<210> 149

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 149

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 150

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker consensus

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> X1= I, L, Y, M, F, V, or A

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> X2 = A, G, S, V, E, D, Q, N, or Y

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> X3 = H, P, A, V, G, S, or T

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> X4 = D or E

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> X5 = I, L, Y, M, F, V, T, S, G or A

<400> 150

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 151

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Linker consensus

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> X1 = I or L

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> X3 = P or A

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> X5 = I, V, T, S, or G

<400> 151

Xaa Glu Xaa Asp Xaa

1 5

<210> 152

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 152

Leu Glu Pro Asp Gly

1 5

<210> 153

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 153

Leu Glu Ala Asp Gly
1 5

<210> 154

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker consensus

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> X1 = any amino acid

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> X5 = A or V

<400> 154

Xaa Gln Ala Arg Xaa
1 5

<210> 155

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker consensus

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> X5 = A or V

<400> 155

Arg Gln Ala Arg Xaa
1 5

<210> 156

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 156

Arg Gln Ala Arg Val

1 5

<210> 157

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker consensus

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> X1 = P, V or A

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> X2 = Q or D

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> X3 = A or N

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> X4 = L, I or M

<400> 157

Xaa Xaa Xaa Xaa

1

<210> 158

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker consensus

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> X2 = Q or D

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> X3 = A or N

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> X4 = L or I

<400> 158

Pro Xaa Xaa Xaa

1

<210> 159

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> P2A

<400> 159

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

1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 160

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> P2A

<400> 160

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

1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 161

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> E2A

<400> 161

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

1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro

20

<210> 162

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F2A

<400> 162

Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val

1 5 10 15

Glu Ser Asn Pro Gly Pro

20

<210> 163

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> T2A

<400> 163

Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro

1 5 10 15

Gly Pro

<210> 164

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> T2A

<400> 164

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

1 5 10 15

Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg

20

<210> 165

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P2A

<400> 165

ggatctggag caacaaactt ctcactactc aaacaagcag gtgacgtgga ggagaatccc 60

ggaccc 66

<210> 166

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 166

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

Gly Ser

<210> 167

<211> 122

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<223> anti-5T4 VH

<220><221> misc_feature

<222> (97)..(97)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 167

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

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

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr

85 90 95

Xaa Cys Val Arg Gln Trp Asp Tyr Asp Val Arg Ala Met Asn Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 168

<211> 107

<212

> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<223> anti-5T4 VL

<400> 168

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Ile Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ala

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Leu Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 169

<211> 504

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> First Polypeptide Chain of B7-H3 x CD3 Bispecific DART-A Diabody

<400> 169

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
115 120 125

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
130 135 140

Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
165 170 175

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
180 185 190

Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr
195 200 205

Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val
210 215 220
Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240
Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala
245 250 255

Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu
260 265 270
Glu Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
275 280 285
Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
290 295 300
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
305 310 315 320

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
325 330 335
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
340 345 350
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
355 360 365
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
370 375 380

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
385 390 395 400
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
405 410 415
Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
420 425 430
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

500

<210> 170

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 170

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

1 5 10 15

<210> 171

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<220><221> REPEAT

<222> (4)..(6)

<223> repeated 0 to 10 times

<400> 171

Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 172

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<220><221> REPEAT

<222> (1)..(6)

<223

> repeated 1 to 4 times

<400> 172

Gly Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 173

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<220><221> REPEAT

<222> (1)..(5)

<223> Repeated 1 to 5 times

<400> 173

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 174

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<220><221> REPEAT

<222> (1)..(1)

<223> Repeated 1 to 5 times

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> X2= A, V, L, I, M,F, W, P, G, S, T, C, Y, N,Q, K, R, H, D, or E

<220><221> REPEAT

<222> (3)..(3)

<223> Repeated 1 to 5 times

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> X4 = A, V, L, I, M,F, W, P, G, S, T, C, Y, N,Q, K, R, H, D, or E

<220><221> REPEAT

<222> (5)..(5)

<223> Repeated 1 to 5 times

<400> 174

Gly Xaa Gly Xaa Gly

1 5

<210> 175

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> X4 = A, V, L, I, M,F, W, P, G, S, T, C, Y, N,Q, K, R, H, D, or E

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> X8 = A, V, L, I, M,F, W, P, G, S, T, C, Y, N,Q, K, R, H, D, or E

<400> 175

Gly Gly Gly Xaa Gly Gly Gly Xaa Gly Gly Gly

1 5 10

<210> 176

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 176

Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr

1 5 10

<210> 177

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 177

Gly Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly Gly

1 5 10

<210> 178

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<220><221> REPEAT

<222> (1)..(5)

<223> Repeated 2 to 20 times

<400> 178

Glu Ala Ala Ala Lys

1 5

<210> 179

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<220><221> REPEAT

<222> (3)..(4)

<223> Repeated 2 to 20 times

<400> 179

Ala Ser Ala Pro Gly Thr

1 5

<210> 180

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<220><221> REPEAT

<222> (3)..(7)

<223> Repeated 2 to 20 times

<400> 180

Ala Ser Glu Ala Ala Ala Lys Gly Thr

1 5

<210> 181

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<220><221> REPEAT

<222> (1)..(5)

<223> Repeated 2 to 20 times

<400> 181

Gly Gly Gly Gly Ala

1 5

<210> 182

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<220><221> REPEAT

<222> (1)..(5)

<223> Repeated 2 to 20 times

<400> 182

Pro Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 183

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<220><221> REPEAT

<222> (1)..(5)

<223> Repeated 2 to 20 times

<400> 183

Ala Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 184

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<220><221> REPEAT

<222> (4)..(17)

<223> Repeated 2 to 20 times

<400> 184

Gly Gly Ser Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser

1 5 10 15

Thr Gly Gly Ser

20

<210> 185

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<220><221> REPEAT

<222> (1)..(5)

<223> Repeated 1 to 9 times

<400> 185

Ser Ser Ser Ser Gly

1 5

<210> 186

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 186

Ser Ser Ser Ala Ser Ala Ser Ser Ala

1 5

<210> 187

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 187

Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly

1 5

<210> 188

<211> 241

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DLL3 scFv

<400> 188

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Val Tyr Tyr Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Ile Ala Val Thr Gly Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

115 120 125

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

130 135 140

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln

145 150 155 160

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

Tyr Asp Arg Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
225 230 235 240
Lys

<210> 189
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CD20 VH
<400> 189
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 190

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD20 VL

<400> 190

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85 90 95

Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val
115