(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0000650
(43) 공개일자 2024년01월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C07K 16/18* (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
*C07K 16/24* (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*C07K 16/18* (2013.01)
*C07K 16/241* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7043908(분할)
(22) 출원일자(국제) 2017년10월18일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2019-7013738
원출원일자(국제) 2017년10월18일
심사청구일자 2020년10월16일
(85) 번역문제출일자 2023년12월19일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/057268
(87) 국제공개번호 WO 2018/075692
국제공개일자 2018년04월26일
(30) 우선권주장
62/410,054 2016년10월19일 미국(US)
*(뒷면에 계속)*

(71) 출원인
**인벤라 인코포레이티드**
미국, 위스콘신 53719, 매디슨, 스위트 235, 사우스 로사 로드 505
(72) 발명자
**베일리, 루카스**
미국, 위스콘신 53719, 매디슨, 스위트 235, 사우스 로사 로드 505 인벤라 인코포레이티드 사내
**글레이저, 브라이언**
미국, 위스콘신 53719, 매디슨, 스위트 235, 사우스 로사 로드 505 인벤라 인코포레이티드 사내
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**김영철, 김 순 영**

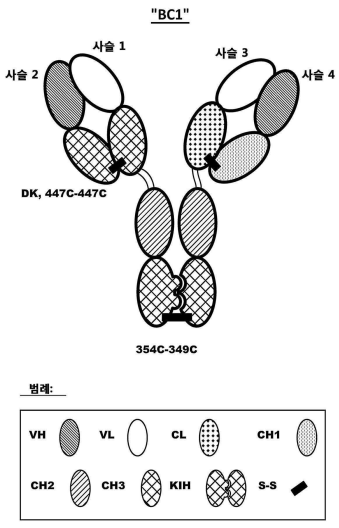
전체 청구항 수 : 총 49 항

(54) 발명의 명칭 **항체 구조물**

## (57) 요 약

다가 항체 구조물, 상기 구조물을 포함하는 약학 조성물, 및 그의 사용 방법이 개시된다.

*대 표 도* - 도6



(52) CPC특허분류
***C07K 16/2818*** (2013.01)
*A61K 2039/505* (2013.01)
*C07K 2317/24* (2013.01)
*C07K 2317/31* (2013.01)
*C07K 2317/524* (2013.01)
*C07K 2317/526* (2013.01)
*C07K 2317/64* (2013.01)
*C07K 2317/94* (2013.01)

(72) 발명자
**리, 쿠페이**
미국, 위스콘신 53719, 매디슨, 스위트 235, 사우스 로사 로드 505 인벤라 인코포레이티드 사내
**그린, 롤랜드**
미국, 위스콘신 53719, 매디슨, 스위트 235, 사우스 로사 로드 505 인벤라 인코포레이티드 사내

(30) 우선권주장
62/549,894 2017년08월24일 미국(US)
62/555,498 2017년09월07일 미국(US)

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

결합 분자로서,

제1 및 제2 폴리펩티드 사슬을 포함하고,

(a) 상기 제1 폴리펩티드 사슬은 도메인 A, 도메인 B, 도메인 D, 및 도메인 E를 포함하고,

상기 도메인들은, A-B-D-E 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며,

도메인 A는 VL 아미노산 서열을 갖고, 도메인 B는 CH3 아미노산 서열을 가지며, 도메인 D는 CH2 아미노산 서열을 갖고, 도메인 E는 불변 영역(constant region) 도메인 아미노산 서열을 가지며;

(b) 상기 제2 폴리펩티드 사슬은 도메인 F 및 도메인 G를 포함하고,

상기 도메인들은, F-G 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며,

도메인 F는 VH 아미노산 서열을 갖고, 도메인 G는 CH3 아미노산 서열을 가지며; 및

(c) 상기 제1 및 제2 폴리펩티드는 상기 결합 분자를 형성하기 위하여 상기 A 및 F 도메인 사이의 상호작용 및 상기 B 및 G 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되는, 결합 분자.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

제3 및 제4 폴리펩티드 사슬을 더 포함하고,

(a) 상기 제3 폴리펩티드 사슬은 도메인 H, 도메인 I, 도메인 J, 및 도메인 K를 포함하고,

상기 도메인들은, H-I-J-K 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며,

도메인 H는 가변 영역(variable region) 도메인 아미노산 서열을 갖고, 도메인 I는 불변 영역 도메인 아미노산 서열을 가지며, 도메인 J는 CH2 아미노산 서열을 갖고, 및 K는 불변 영역 도메인 아미노산 서열을 가지며;

(b) 상기 제4 폴리펩티드 사슬은 도메인 L 및 도메인 M을 포함하고,

상기 도메인들은, L-M 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며,

도메인 L은 가변 영역 도메인 아미노산 서열을 갖고 도메인 M은 불변 영역 아미노산 서열을 가지며;

(c) 상기 제3 및 제4 폴리펩티드는 상기 H 및 L 도메인 사이의 상호작용 및 상기 I 및 M 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되며; 및

(d) 상기 제1 및 제3 폴리펩티드는 상기 결합 분자를 형성하기 위하여 상기 D 및 J 도메인 사이의 상호작용 및 상기 E 및 K 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되는, 결합 분자.

### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 B 및 G 도메인의 아미노산 서열은 동일하며, 상기 서열은 내인성(endogenous) CH3 서열인, 결합 분자.

### 청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 B 및 G 도메인의 아미노산 서열은 상이하며 내인성 CH3 서열 내에서 각각 직교 변형을 개별적으로 포함하고, 상기 B 도메인은 상기 G 도메인과 상호작용하며, 상기 B 도메인 및 G 도메인 모두 직교 변형이 없는 CH3 도메인과 유의하게 상호작용하지 않는, 결합 분자.

**청구항 5**

제4항에 있어서, 상기 직교 변형은 도메인 B 및 G 사이에 조작된 이황화 결합(engineered disulfide bridges)을 생성시키는 돌연변이를 포함하는, 결합 분자.

**청구항 6**

제5항에 있어서, 상기 조작된 이황화 결합을 생성시키는 돌연변이는 상기 B 도메인 및 G 도메인 중 하나에서의 S354C 돌연변이, 및 다른 도메인에서의 349C인, 결합 분자.

**청구항 7**

제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 직교 변형은 노브-인-홀(knob-in-hole) 돌연변이를 포함하는, 결합 분자.

**청구항 8**

제7항에 있어서, 상기 노브-인-홀 돌연변이는 상기 B 도메인 및 G 도메인 중 하나에서의 T366W 돌연변이, 및 다른 도메인에서의 T366S, L368A, 및 Y407V 돌연변이인, 결합 분자.

**청구항 9**

제4항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 직교 변형은 전하-쌍(charge-pair) 돌연변이를 포함하는, 결합 분자.

**청구항 10**

제9항에 있어서, 상기 전하-쌍 돌연변이는 상기 B 도메인 및 G 도메인 중 하나에서의 T366K 돌연변이, 및 다른 도메인에서의 L351D 돌연변이인, 결합 분자.

**청구항 11**

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 도메인 E는 CH3 아미노산 서열을 갖는, 결합 분자.

**청구항 12**

제2항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 E 및 K 도메인의 아미노산 서열은 동일하며, 상기 서열은 내인성 CH3 서열인, 결합 분자.

**청구항 13**

제2항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 E 및 K 도메인의 아미노산 서열은 상이한, 결합 분자.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 상기 상이한 서열은 내인성 CH3 서열 내에서 각각 직교 변형을 개별적으로 포함하고, 상기 E 도메인은 상기 K 도메인과 상호작용하며, 상기 E 도메인 및 K 도메인 모두 직교 변형이 없는 CH3 도메인과 유의하게 상호작용하지 않는, 결합 분자.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 상기 직교 변형은 도메인 E 및 K 사이의 조작된 이황화 결합을 생성시키는 돌연변이를 포함하는, 결합 분자.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 상기 조작된 이황화 결합을 생성시키는 돌연변이는 상기 E 도메인 및 K 도메인 중 하나에서의 S354C 돌연변이, 및 다른 도메인에서의 349C인, 결합 분자.

**청구항 17**

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 E 및 K 도메인 내의 직교 변형은 노브-인-홀 돌연변이를 포함하는, 결합 분자.

**청구항 18**

제17항에 있어서, 상기 노브-인-홀 돌연변이는 상기 E 도메인 또는 K 도메인 중 하나에서의 T366W 돌연변이, 및 다른 도메인에서의 T366S, L368A, 및 Y407V 돌연변이인, 결합 분자.

**청구항 19**

제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 직교 변형은 전하-쌍 돌연변이를 포함하는, 결합 분자.

**청구항 20**

제19항에 있어서, 상기 전하-쌍 돌연변이는 상기 E 도메인 또는 K 도메인 중 하나에서의 T366K 돌연변이 및 다른 도메인에서의 상응하는 L351D 돌연변이인, 결합 분자.

**청구항 21**

제13항에 있어서, 상기 E 도메인 및 K 도메인의 아미노산 서열은, 상기 제1 및 제3 폴리펩티드 사이의 특이적 결합을 촉진시키는 특이적 상호작용을 갖도록 선택되는 두 개의 상이한 항체 도메인의 내인성 서열인, 결합 분자.

**청구항 22**

제21항에 있어서, 상기 두 개의 상이한 아미노산 서열은 CH1 서열 및 CL 서열인, 결합 분자.

**청구항 23**

제2항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 도메인 I는 CL 서열을 갖고 도메인 M은 CH1 서열을 갖는, 결합 분자.

**청구항 24**

제2항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 도메인 H는 VL 서열을 갖고 도메인 L은 VH 서열을 갖는, 결합 분자.

**청구항 25**

제2항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서,

도메인 H는 VL 아미노산 서열을 갖고;

도메인 I는 CL 아미노산 서열을 가지며;

도메인 K는 CH3 아미노산 서열을 갖고;

도메인 L은 VH 아미노산 서열을 가지며; 및

도메인 M은 CH1 아미노산 서열을 갖는, 결합 분자.

**청구항 26**

제2항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 제2 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성하는, 결합 분자.

**청구항 27**

결합 분자로서,

제1, 제2, 제3, 및 제4 폴리펩티드 사슬을 포함하고,

(a) 상기 제1 폴리펩티드 사슬은 도메인 A, 도메인 B, 도메인 D, 및 도메인 E를 포함하며,

상기 도메인들은, A-B-D-E 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며,

도메인 A는 VL 아미노산 서열을 갖고, 도메인 B는 CH3 아미노산 서열을 가지며, 도메인 D는 CH2 아미노산 서열을 갖고, 도메인 E는 불변 영역 도메인 아미노산 서열을 가지며;

(b) 상기 제2 폴리펩티드 사슬은 도메인 F 및 도메인 G를 포함하고,

상기 도메인들은, F-G 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며,

도메인 F는 VH 아미노산 서열을 갖고 도메인 G는 CH3 아미노산 서열을 가지며;

(c) 상기 제3 폴리펩티드 사슬은 도메인 H, 도메인 I, 도메인 J, 및 도메인 K를 포함하고,

상기 도메인들은, H-I-J-K 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며,

도메인 H는 가변 영역 도메인 아미노산 서열을 갖고, 도메인 I는 불변 영역 도메인 아미노산 서열을 가지며, 도메인 J는 CH2 아미노산 서열을 갖고, 및 K는 불변 영역 도메인 아미노산 서열을 가지며;

(d) 상기 제4 폴리펩티드 사슬은 도메인 L 및 도메인 M을 포함하고,

상기 도메인들은, L-M 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며,

도메인 L은 가변 영역 도메인 아미노산 서열을 갖고 도메인 M은 불변 영역 도메인 아미노산 서열을 가지며;

(e) 상기 제1 및 제2 폴리펩티드는 상기 A 및 F 도메인 사이의 상호작용 및 상기 B 및 G 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되고;

(f) 상기 제3 및 제4 폴리펩티드는 상기 H 및 L 도메인 사이의 상호작용 및 상기 I 및 M 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되며; 및

(g) 상기 제1 및 제3 폴리펩티드는 상기 결합 분자를 형성하기 위하여 상기 D 및 J 도메인 사이의 상호작용 및 상기 E 및 K 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되는, 결합 분자.

**청구항 28**

제27항에 있어서,

상기 도메인 E는 CH3 아미노산 서열을 갖고;

도메인 H는 VL 아미노산 서열을 가지며;

도메인 I는 CL 아미노산 서열을 갖고;

도메인 K는 CH3 아미노산 서열을 가지며;

도메인 L은 VH 아미노산 서열을 갖고; 및

도메인 M은 CH1 아미노산 서열을 갖는, 결합 분자.

**청구항 29**

제2항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서,

제5 폴리펩티드 사슬을 더 포함하고,

(a) 상기 제1 폴리펩티드 사슬은 도메인 N 및 도메인 O를 더 포함하며, 상기 도메인들은, N-O-A-B-D-E 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되고,

도메인 N은 VL 아미노산 서열을 가지며, 도메인 O는 CH3 아미노산 서열을 갖고;

(b) 상기 결합 분자는 도메인 P 및 도메인 Q를 포함하는 제5 폴리펩티드 사슬을 더 포함하며, 상기 도메인들은 P-Q 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되고,

도메인 P는 VH 아미노산 서열을 가지며 도메인 Q는 CH3 아미노산 서열을 갖고; 및

(c) 상기 제1 및 제5 폴리펩티드는 상기 결합 분자를 형성하기 위하여 상기 N 및 P 도메인 사이의 상호작용 및 상기 O 및 Q 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되는, 결합 분자.

**청구항 30**

제29항에 있어서,

(a) 상기 도메인 N 및 도메인 A의 아미노산 서열은 동일하고,

상기 도메인 H의 아미노산 서열은 도메인 N 및 A와 상이하며,

상기 도메인 O 및 도메인 B의 아미노산 서열은 동일하고,

상기 도메인 I의 아미노산 서열은 도메인 O 및 B와 상이하며,

상기 도메인 P 및 도메인 F의 아미노산 서열은 동일하고,

상기 도메인 L의 아미노산 서열은 도메인 P 및 F와 상이하며,

상기 도메인 Q 및 도메인 G의 아미노산 서열은 동일하고,

상기 도메인 M의 아미노산 서열은 도메인 Q 및 G와 상이하며; 및

(b) 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 제2 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성하며, 상기 도메인 N 및 도메인 P는 상기 제1 항원에 특이적인 제3 항원 결합 부위를 형성하는, 결합 분자.

**청구항 31**

제29항에 있어서,

(a) 상기 도메인 N, 도메인 A, 및 도메인 H의 아미노산 서열은 상이하고,

상기 도메인 O, 도메인 B, 및 도메인 I의 아미노산 서열은 상이하며,

상기 도메인 P, 도메인 F, 및 도메인 L의 아미노산 서열은 상이하고,

상기 도메인 Q, 도메인 G, 및 도메인 M의 아미노산 서열은 상이하며; 및

(b) 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고,

상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 제2 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성하며,

상기 도메인 N 및 도메인 P는 제3 항원에 특이적인 제3 항원 결합 부위를 형성하는, 결합 분자.

**청구항 32**

제2항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서,

제6 폴리펩티드 사슬을 더 포함하고,

(a) 상기 제3 폴리펩티드 사슬은 도메인 R 및 도메인 S를 더 포함하고,

상기 도메인들은, R-S-H-I-J-K 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며,

도메인 R은 VL 아미노산 서열을 갖고 도메인 S는 불변 도메인 아미노산 서열을 가지며;

(b) 상기 결합 분자는 도메인 T 및 도메인 U를 포함하는 제6 폴리펩티드 사슬을 더 포함하고,

상기 도메인들은, T-U 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며,

도메인 T는 VH 아미노산 서열을 갖고 도메인 U는 불변 도메인 아미노산 서열을 가지며; 및

(c) 상기 제3 및 제6 폴리펩티드는 상기 결합 분자를 형성하기 위하여 상기 R 및 T 도메인 사이의 상호작용 및 상기 S 및 U 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되는, 결합 분자.

**청구항 33**

제32항에 있어서,

(a) 상기 도메인 R 및 도메인 A의 아미노산 서열은 동일하고,

상기 도메인 H의 아미노산 서열은 도메인 R 및 A와 상이하며,

상기 도메인 S 및 도메인 B의 아미노산 서열은 동일하고,

상기 도메인 I의 아미노산 서열은 도메인 S 및 B와 상이하며,

상기 도메인 T 및 도메인 F의 아미노산 서열은 동일하고,

상기 도메인 L의 아미노산 서열은 도메인 T 및 F와 상이하며,

상기 도메인 U 및 도메인 G의 아미노산 서열은 동일하고,

상기 도메인 M의 아미노산 서열은 도메인 U 및 G와 상이하며; 및

(b) 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고,

상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 제2 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성하며,

상기 도메인 R 및 도메인 T는 상기 제1 항원에 특이적인 제3 항원 결합 부위를 형성하는, 결합 분자.

**청구항 34**

제32항에 있어서,

(a) 상기 도메인 R 및 도메인 H의 아미노산 서열은 동일하고,

상기 도메인 A의 아미노산 서열은 도메인 R 및 H와 상이하며,

상기 도메인 S 및 도메인 I의 아미노산 서열은 동일하고,

상기 도메인 B의 아미노산 서열은 도메인 S 및 I와 상이하며,

상기 도메인 T 및 도메인 L의 아미노산 서열은 동일하고,

상기 도메인 F의 아미노산 서열은 도메인 T 및 L와 상이하며,

상기 도메인 U 및 도메인 M의 아미노산 서열은 동일하고,

상기 도메인 G의 아미노산 서열은 도메인 U 및 M와 상이하며; 및

(b) 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고,

상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 제2 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성하며,

상기 도메인 R 및 도메인 T는 상기 제2 항원에 특이적인 제3 항원 결합 부위를 형성하는, 결합 분자.

**청구항 35**

제32항에 있어서,

(a) 상기 도메인 R, 도메인 A, 및 도메인 H의 아미노산 서열은 상이하고,

상기 도메인 S, 도메인 B, 및 도메인 I의 아미노산 서열은 상이하며,

상기 도메인 T, 도메인 F, 및 도메인 L의 아미노산 서열은 상이하고,

상기 도메인 U, 도메인 G, 및 도메인 M의 아미노산 서열은 상이하며; 및

(b) 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고,

상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 제2 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성하며,

상기 도메인 R 및 도메인 T는 제3 항원에 특이적인 제3 항원 결합 부위를 형성하는, 결합 분자.

**청구항 36**

제2항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서,

제5 및 제6 폴리펩티드 사슬을 더 포함하고,

(a) 상기 제1 폴리펩티드 사슬은 도메인 N 및 도메인 O를 더 포함하며, 상기 도메인들은, N-O-A-B-D-E 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되고;

(b) 상기 제3 폴리펩티드 사슬은 도메인 R 및 도메인 S를 더 포함하며, 상기 도메인들은, R-S-H-I-J-K 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되고;

(c) 상기 결합 분자는 제5 및 제6 폴리펩티드 사슬을 더 포함하고,

상기 제5 폴리펩티드 사슬은 도메인 P 및 도메인 Q를 포함하며, 상기 도메인들은 P-Q 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되고,

상기 제6 폴리펩티드 사슬은 도메인 T 및 도메인 U를 포함하며,

상기 도메인들은, T-U 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며; 및

(d) 상기 제1 및 제5 폴리펩티드는 상기 N 및 P 도메인 사이의 상호작용 및 상기 O 및 Q 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되고,

상기 제3 및 제6 폴리펩티드는 상기 결합 분자를 형성하기 위하여 상기 R 및 T 도메인 사이의 상호작용 및 상기 S 및 U 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되는, 결합 분자.

**청구항 37**

제36항에 있어서,

(a) 상기 도메인 N 및 도메인 A의 아미노산 서열은 동일하고,

상기 도메인 H 및 도메인 R의 아미노산 서열은 동일하고,

상기 도메인 O 및 도메인 B의 아미노산 서열은 동일하고,

상기 도메인 I 및 도메인 S의 아미노산 서열은 동일하고,

상기 도메인 P 및 도메인 F의 아미노산 서열은 동일하고,

상기 도메인 L 및 도메인 T의 아미노산 서열은 동일하고,

상기 도메인 Q 및 도메인 G의 아미노산 서열은 동일하고,

상기 도메인 M 및 도메인 U의 아미노산 서열은 동일하고; 및

(b) 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 도메인 N 및 도메인 P는 상기 제1 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성하며, 상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 제2 항원에 특이적인 제3 항원 결합 부위를 형성하며, 상기 R 도메인 및 T 도메인 사이의 상호작용은 상기 제2 항원에 특이적인 제4 항원 결합 부위를 형성하는, 결합 분자.

**청구항 38**

제36항에 있어서,

(a) 상기 도메인 H 및 도메인 A의 아미노산 서열은 동일하고,

상기 도메인 N 및 도메인 R의 아미노산 서열은 동일하고,

상기 도메인 I 및 도메인 B의 아미노산 서열은 동일하고,

상기 도메인 O 및 도메인 S의 아미노산 서열은 동일하고,

상기 도메인 L 및 도메인 F의 아미노산 서열은 동일하고,

상기 도메인 P 및 도메인 T의 아미노산 서열은 동일하고,

상기 도메인 M 및 도메인 G의 아미노산 서열은 동일하고,

상기 도메인 Q 및 도메인 U의 아미노산 서열은 동일하고; 및

(b) 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 도메인 N 및 도메인 P는 제2 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성하며, 상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 상기 제1 항원에 특이적인 제3 항원 결합 부위를 형성하며, 상기 R 도메인 및 T 도메인 사이의 상호작용은 상기 제2 항원에 특이적인 제4 항원 결합 부위를 형성하는, 결합 분자.

**청구항 39**

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 A 도메인 및 B 도메인 사이의 접합부를 형성하는 서열은 IKRTPREP 또는 IKRTVREP인, 결합 분자.

**청구항 40**

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 F 도메인 및 G 도메인 사이의 접합부를 형성하는 서열은 SSASPREP인, 결합 분자.

**청구항 41**

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 CH3 아미노산 서열은 상기 CH3 아미노산 서열을 힌지(hinge) 아미노산 서열에 연결시키는 C-말단 트리펩티드 삽입을 가지며, 상기 트리펩티드 삽입은 PGK, KSC, 및 GEC로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 결합 분자.

**청구항 42**

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 서열은 인간 서열인, 결합 분자.

**청구항 43**

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 CH3 아미노산 서열은 IgG 서열인, 결합 분자.

**청구항 44**

제43항에 있어서, 상기 IgG 서열은 IgG1 서열인, 결합 분자.

**청구항 45**

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 CH3 아미노산 서열은 하나 이상의 동종동질이형체(isoallotype) 돌연변이를 갖는, 결합 분자.

**청구항 46**

제45항에 있어서, 상기 동종동질이형체 돌연변이는 D356E 및 L358M인, 결합 분자.

**청구항 47**

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CL 아미노산 서열은 $C_{kappa}$ 서열인, 결합 분자.

**청구항 48**

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항의 결합 분자, 및

약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 약학 조성물.

**청구항 49**

치료를 필요로 하는 대상체에게 제48항의 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 치료 방법.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] **1.관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2017년 9월 7일에 출원된 미국 가출원 번호 제62/555,498호, 2017년 8월 24일에 출원된 미국 가출원 번호 제62/549,894호, 및 2016년 10월 19일에 출원된 미국 가출원 번호 제62/410,054호의 이익을 주장하며, 이들의 개시 내용은 전체적으로 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0003] **2.서열목록**

[0004] 본 출원은 EFS-Web을 통해 제출된 서열 목록을 포함하며, 그 전체가 본 명세서에 참조로 포함된다. 2017년 월 XX에 생성된 상기 ASCII 사본은 XXXXXUS_sequencelisting.txt로 명명되며, 크기는 X,XXX,XXX 바이트이다.

## *배 경 기 술*

[0005] **3.배경기술**

[0006] 항체는 의료 분야에서 매우 유용한 도구이다. 특히, 과학 연구 및 의학 진단법에서의 역할을 포함한, 단일 클론 항체의 중요성은 수십 년 동안 널리 인식되어 왔다. 그러나, 성공적인 치료제인 아달리무맙(adalimumab; Humira), 리툭시맙(rituximab; Rituxan), 인플릭시맙(infliximab; Remicade), 베바시주맙(bevacizumab; Avastin), 트라스투주맙(trastuzumab; Herceptin), 펨브롤리주맙(pembrolizumab; Keytruda), 및 이필리무맙(ipilimumab; Yervoy)에 의해 입증된 바와 같이, 항체의 완전한 잠재력, 특히 치료제로서의 성공적인 사용은 보다 최근에 입증되었다. 이러한 임상적 성공에 이어, 항체 치료에 대한 관심은 계속해서 증가할 것이다. 따라서, 연구 약물 개발 및 후속 임상 설정의 모든 분야에서, 항체의 효율적인 생성 및 제조가 필요하다.

[0007] 항체 치료 분야 내에서 활발한 연구 분야는 다중 특이성 항체, 즉, 다수의 표적을 인식하도록 조작된 단일 항체의 설계 및 사용이다. 이들 항체는 보다 큰 치료적 제어의 가능성을 제공한다. 예를 들어, 특히 항체 기반 면역치료의 경우, 많은 항체 치료와 관련된 오프-타겟(off-target) 효과를 감소시키기 위하여 표적 특이성을 개선시킬 필요가 있다. 또한, 다중 특이성 항체는, 특히 면역 치료의 맥락에서, 다중 세포 수용체의 상승적인(synergistic) 표적화와 같은 새로운 치료 전략을 제공한다.

[0008] 다중 특이성 항체의 상기 가능성에도 불구하고, 이들의 생산 및 사용은 이들의 실제 구현을 제한하는 수많은 제약에 의해 어려움을 겪고 있다. 일반적으로, 모든 다중 특이성 항체 플랫폼은 동족 중쇄 및 경쇄(heavy and light chain) 쌍 사이의 고충실도(high fidelity) 페어링(pairing)을 보장하는 문제를 해결해야 한다. 그러나, 다양한 플랫폼을 걸쳐 여러 가지의 문제가 존재한다. 예를 들어, 항체 사슬 공학은 조립된 항체의 불량한 안정성, 항체 사슬의 빈약한 발현 및 폴딩, 및/또는 면역성 펩타이드의 생성을 초래할 수 있다. 다른 접근법들은 복잡한 시험관 내(*in vitro*) 조립(assembly) 반응 또는 정제 방법과 같은 비실용적인 제조 공정으로 어려움을 겪는다. 또한, 여러 가지의 플랫폼은 서로 다른 항체 결합 도메인을 쉽고 효율적으로 연결할 수 없다는 점에서 어려움을 겪는다. 다중 특이성 항체 제조와 관련된 이러한 다양한 문제는 많은 플랫폼의 적용 가능성을 제한하며, 특히 많은 치료 약물 파이프라인(pipelines)에 필요한 고효율(high-throughput) 스크린에서의 이들의 사용을 제한한다.

[0009] 따라서, 고도의 발현 및 효율적인 정제가 가능한 항체 플랫폼이 필요하다. 특히, 연구 및 치료 환경 모두에서 직접 적용할 수 있는 다중 특이성 항체의 제조 능력을 향상시키는 다중 특이성 항체 플랫폼이 필요하다.

## *발명의 내용*

[0010] **4.개요**

[0011] 본 발명자들은 다양한 신규한 다가 항체 구조물을 고안하였다. 이들 다가 결합 분자의 구조는 단일 특이적, 이중 특이적, 삼중 특이적, 및 사중 특이적 구조물의 항원 결합 부위를 함께 형성하는 동족 폴리펩티드 사슬의 고충실도 페어링을 유도한다. 상기 결합 분자는, 시험관 내(*in vitro*) 무세포(cell-free) 번역 시스템 및 포유류의 일시적 트랜스펙션(transient transfection) 시스템을 포함하는, 통상적인 항체 발현 시스템을 사용하여 용이하게 발현되며, CH1 친화성 수지로 단일-단계에서 정제될 수 있다. 고충실도 조립, 고도의 시험관 내(*in vitro*) 발현, 및 단일 단계에서 발현 생성물을 정제하는 능력은 가변 영역(variable region) 라이브러리의 고효율 스크리닝에 매우 적합한 이들 구조를 만든다. 이러한 구조는 또한 다중 특이적인 치료제로서 매우 적합하게 하는 장기간의 안정성을 보여준다.

[0012] 따라서, 제1 측면에 있어서, 결합 분자는 제1 및 제2 폴리펩티드 사슬을 포함하며, 여기서: (a) 상기 제1 폴리

펩티드 사슬은 도메인 A, 도메인 B, 도메인 D 및 도메인 E를 포함하고, 상기 도메인들은, A-B-D-E 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 A는 VL 아미노산 서열을 갖고, 도메인 B는 CH3 아미노산 서열을 가지며, 도메인 D는 CH2 아미노산 서열을 갖고, 도메인 E는 불변 영역(constant region) 도메인 아미노산 서열을 가지며; (b) 상기 제2 폴리펩티드 사슬은 도메인 F 및 도메인 G를 포함하고, 상기 도메인들은, F-G 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 F는 VH 아미노산 서열을 갖고 도메인 G는 CH3 아미노산 서열을 가지며; 및 (c) 상기 제1 및 제2 폴리펩티드는 상기 결합 분자를 형성하기 위하여 상기 A 및 F 도메인 사이의 상호작용 및 상기 B 및 G 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합된다.

[0013] 특정 측면에 있어서, 상기 결합 분자는 제3 및 제4 폴리펩티드 사슬을 더 포함하며, 여기서: (a) 상기 제3 폴리펩티드 사슬은 도메인 H, 도메인 I, 도메인 J, 및 도메인 K를 포함하고, 상기 도메인들은, H-I-J-K 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 H는 가변 영역 도메인 아미노산 서열을 갖고, 도메인 I는 불변 영역 도메인 아미노산 서열을 가지며, 도메인 J는 CH2 아미노산 서열을 갖고, 및 K는 불변 영역 도메인 아미노산 서열을 가지며; (b) 상기 제4 폴리펩티드 사슬은 도메인 L 및 도메인 M을 포함하고, 상기 도메인들은, L-M 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 L은 가변 영역 도메인 아미노산 서열을 갖고 도메인 M은 불변 영역 아미노산 서열을 가지며; (c) 상기 제3 및 제4 폴리펩티드는 상기 H 및 L 도메인 사이의 상호작용 및 상기 I 및 M 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되고; 및 (d) 상기 제1 및 제3 폴리펩티드는 상기 결합 분자를 형성하기 위하여 상기 D 및 J 도메인 사이의 상호작용 및 상기 E 및 K 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합된다.

[0014] 특정 측면에 있어서, 상기 B 및 G 도메인의 아미노산 서열은 동일하며, 상기 서열은 내인성(endogenous) CH3 서열이다.

[0015] 특정 측면에 있어서, 상기 B 및 G 도메인의 아미노산 서열은 상이하며 내인성 CH3 서열 내에서 각각 직교 변형을 개별적으로 포함하고, 상기 B 도메인은 상기 G 도메인과 상호작용하며, 상기 B 도메인 및 G 도메인 모두 직교 변형이 없는 CH3 도메인과 유의하게 상호작용하지 않는다. 특정 측면에 있어서, 기 직교 변형은 도메인 B 및 G 사이에 조작된 이황화 결합(engineered disulfide bridges)을 생성시키는 돌연변이를 포함한다. 특정 측면에 있어서, 상기 조작된 이황화 결합을 생성시키는 돌연변이는 상기 B 도메인 및 G 도메인 중 하나에서의 S354C 돌연변이, 및 다른 도메인에서의 349C이다. 특정 측면에 있어서, 상기 직교 변형은 노브-인-홀(knob-in-hole) 돌연변이를 포함한다. 특정 측면에 있어서, 상기 노브-인-홀 돌연변이는 상기 B 도메인 및 G 도메인 중 하나에서의 T366W 돌연변이, 및 다른 도메인에서의 T366S, L368A, 및 Y407V 돌연변이이다. 특정 측면에 있어서, 상기 직교 변형은 전하-쌍(charge-pair) 돌연변이를 포함한다. 특정 측면에 있어서, 상기 전하-쌍 돌연변이는 상기 B 도메인 및 G 도메인 중 하나에서의 T366K 돌연변이, 및 다른 도메인에서의 L351D 돌연변이이다.

[0016] 특정 측면에 있어서, 상기 도메인 E는 CH3 아미노산 서열을 갖는다. 특정 측면에 있어서, 상기 E 및 K 도메인의 아미노산 서열은 동일하며, 상기 서열은 내인성 CH3 서열이다.

[0018] *특정 측면에 있어서, 상기 E 및 K 도메인의 아미노산 서열은 상이하다. 특정 측면에 있어서, 상기 상이한 서열은 내인성 CH3 서열 내에서 각각 직교 변형을 개별적으로 포함하고, 상기 E 도메인은 상기 K 도메인과 상호작용하며, 상기 E 도메인 및 K 도메인 모두 직교 변형이 없는 CH3 도메인과 유의하게 상호작용하지 않는다. 특정 측면에 있어서, 상기 직교 변형은 도메인 E 및 K 사이의 조작된 이황화 결합을 생성시키는 돌연변이를 포함한다. 특정 측면에 있어서, 상기 조작된 이황화 결합을 생성시키는 돌연변이는 상기 E 도메인 및 K 도메인 중 하나에서의 S354C 돌연변이, 및 다른 도메인에서의 349C이다. 특정 측면에 있어서, 상기 E 및 K 도메인 내의 직교 변형은 노브-인-홀 돌연변이를 포함한다. 특정 측면에 있어서, 상기 노브-인 홀 돌연변이는 상기 E 도메인 또는 K 도메인 중 하나에서의 T366W 돌연변이, 및 다른 도메인에서의 T366S, L368A, 및 Y407V 돌연변이이다. 특정 측면에 있어서, 상기 직교 변형은 전하-쌍 돌연변이를 포함한다. 특정 측면에 있어서, 상기 전하-쌍 돌연변이는 상기 E 도메인 또는 K 도메인 중 하나에서의 T366K 돌연변이 및 다른 도메인에서의 상응하는 L351D 돌연변이이다.

[0019] 특정 측면에 있어서, 상기 E 도메인 및 K 도메인의 아미노산 서열은, 상기 제1 및 제3 폴리펩티드 사이의 특이적 결합을 촉진시키는 특이적 상호작용을 갖도록 선택되는 두 개의 상이한 항체 도메인의 내인성 서열이다. 특정 측면에 있어서, 상기 두 개의 상이한 아미노산 서열은 CH1 서열 및 CL 서열이다. 특정 측면에 있어서, 상기 도메인 I는 CL 서열을 갖고 도메인 M은 CH1 서열을 갖는다.

[0020] 특정 측면에 있어서, 도메인 H는 VL 서열을 갖고 도메인 L은 VH 서열을 갖는다.

[0021] 특정 측면에 있어서, 도메인 H는 VL 아미노산 서열을 갖고; 도메인 I는 CL 아미노산 서열을 가지며; 도메인 K는

CH3 아미노산 서열을 갖고; 도메인 L은 VH 아미노산 서열을 가지며; 및 도메인 M은 CH1 아미노산 서열을 갖는다.

[0022] 특정 측면에 있어서, 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 제2 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성한다.

[0023] 특정 측면에 있어서, 상기 결합 분자는 제5 폴리펩티드 사슬을 더 포함하고, 여기서: (a) 상기 제1 폴리펩티드 사슬은 메인 N 및 도메인 O를 더 포함하며, 상기 도메인들은, N-O-A-B-D-E 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되고, 도메인 N은 VL 아미노산 서열을 가지며, 도메인 O는 CH3 아미노산 서열을 갖고; (b) 상기 결합 분자는 도메인 P 및 도메인 Q를 포함하는 제5 폴리펩티드 사슬을 더 포함하며, 상기 도메인들은 P-Q 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되고, 도메인 P는 VH 아미노산 서열을 가지며 도메인 Q는 CH3 아미노산 서열을 갖고; 및 (c) 상기 제1 및 제5 폴리펩티드는 상기 결합 분자를 형성하기 위하여 상기 N 및 P 도메인 사이의 상호작용 및 상기 O 및 Q 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합된다.

[0024] 특정 측면에 있어서, (a) 상기 도메인 N 및 도메인 A의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 H의 아미노산 서열은 도메인 N 및 A와 상이하며, 상기 도메인 O 및 도메인 B의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 I의 아미노산 서열은 도메인 O 및 B와 상이하며, 상기 도메인 P 및 도메인 F의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 L의 아미노산 서열은 도메인 P 및 F와 상이하며, 상기 도메인 Q 및 도메인 G의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 M의 아미노산 서열은 도메인 Q 및 G와 상이하며; 및 (b) 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 제2 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성하며, 상기 도메인 N 및 도메인 P는 제1 항원에 특이적인 제3 항원 결합 부위를 형성한다.

[0025] 특정 측면에 있어서, (a) 상기 도메인 N, 도메인 A, 및 도메인 H의 아미노산 서열은 상이하고, 상기 도메인 O, 도메인 B, 및 도메인 I의 아미노산 서열은 상이하며, 상기 도메인 P, 도메인 F, 및 도메인 L의 아미노산 서열은 상이하고, 상기 도메인 Q, 도메인 G, 및 도메인 M의 아미노산 서열은 상이하며; 및 (b) 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 제2 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성하며, 상기 도메인 N 및 도메인 P는 제3 항원에 특이적인 제3 항원 결합 부위를 형성한다.

[0026] 특정 측면에 있어서, 상기 결합 분자는 제6 폴리펩티드 사슬을 더 포함하고, 여기서: (a) 상기 제3 폴리펩티드 사슬은 도메인 R 및 도메인 S를 더 포함하고, 상기 도메인들은, R-S-H-I-J-K 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 R은 VL 아미노산 서열을 갖고 도메인 S는 불변 도메인 아미노산 서열을 가지며; (b) 상기 결합 분자는 도메인 T 및 도메인 U를 포함하는 제6 폴리펩티드 사슬을 더 포함하고, 상기 도메인들은, T-U 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 T는 VH 아미노산 서열을 갖고 도메인 U는 불변 도메인 아미노산 서열을 가지며; 및 (c) 상기 제3 및 제6 폴리펩티드는 상기 결합 분자를 형성하기 위하여 상기 R 및 T 도메인 사이의 상호작용 및 상기 S 및 U 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합된다.

[0027] 특정 측면에 있어서, (a) 상기 도메인 R 및 도메인 A의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 H의 아미노산 서열은 도메인 R 및 A와 상이하며, 상기 도메인 S 및 도메인 B의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 I의 아미노산 서열은 도메인 S 및 B와 상이하며, 상기 도메인 T 및 도메인 F의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 L의 아미노산 서열은 도메인 T 및 F와 상이하며, 상기 도메인 U 및 도메인 G의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 M의 아미노산 서열은 도메인 U 및 G와 상이하며; 및 (b) 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 제2 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성하며, 상기 도메인 R 및 도메인 T는 제1 항원에 특이적인 제3 항원 결합 부위를 형성한다.

[0028] 특정 측면에 있어서, (a) 상기 도메인 R 및 도메인 H의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 A의 아미노산 서열은 도메인 R 및 H와 상이하며, 상기 도메인 S 및 도메인 I의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 B의 아미노산 서열은 도메인 S 및 I와 상이하며, 상기 도메인 T 및 도메인 L의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 F의 아미노산 서열은 도메인 T 및 L와 상이하며, 상기 도메인 U 및 도메인 M의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 G의 아미노산 서열은 도메인 U 및 M와 상이하며; 및 (b) 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 제2 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성하며, 상기 도메인 R 및 도메인 T는 제2 항원에 특이적인 제3 항원 결합 부위를 형성한다.

[0029] 특정 측면에 있어서, (a) 상기 도메인 R, 도메인 A, 및 도메인 H의 아미노산 서열은 상이하고, 상기 도메인 S, 도메인 B, 및 도메인 I의 아미노산 서열은 상이하며, 상기 도메인 T, 도메인 F, 및 도메인 L의 아미노산 서열은 상이하고, 상기 도메인 U, 도메인 G, 및 도메인 M의 아미노산 서열은 상이하며; 및 (b) 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 제2 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성하며, 상기 도메인 R 및 도메인 T는 제3 항원에 특이적인 제3 항원 결합 부위를 형성한다.

[0030] 특정 측면에 있어서, 상기 결합 분자는 제5 및 제6 폴리펩티드 사슬을 더 포함하고, 여기서: (a) 상기 제1 폴리펩티드 사슬은 도메인 N 및 도메인 O를 더 포함하며, 상기 도메인들은, N-O-A-B-D-E 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되고; (b) 상기 제3 폴리펩티드 사슬은 도메인 R 및 도메인 S를 더 포함하며, 상기 도메인들은, R-S-H-I-J-K 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되고; (c) 상기 결합 분자는 제5 및 제6 폴리펩티드 사슬을 더 포함하고, 여기서: 상기 제5 폴리펩티드 사슬은 도메인 P 및 도메인 Q를 포함하며, 상기 도메인들은 P-Q 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되고, 상기 제6 폴리펩티드 사슬은 도메인 T 및 도메인 U를 포함하며, 상기 도메인들은, T-U 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며; 및 (d) 상기 제1 및 제5 폴리펩티드는 상기 N 및 P 도메인 사이의 상호작용 및 상기 O 및 Q 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되고, 상기 제3 및 제6 폴리펩티드는 상기 결합 분자를 형성하기 위하여 상기 R 및 T 도메인 사이의 상호작용 및 상기 S 및 U 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합된다.

[0031] 특정 측면에 있어서, (a) 상기 도메인 N 및 도메인 A의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 H 및 도메인 R의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 O 및 도메인 B의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 I 및 도메인 S의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 P 및 도메인 F의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 L 및 도메인 T의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 Q 및 도메인 G의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 M 및 도메인 U의 아미노산 서열은 동일하고; 및 (b) 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 도메인 N 및 도메인 P는 상기 제1 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성하며, 상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 제2 항원에 특이적인 제3 항원 결합 부위를 형성하며, 상기 R 도메인 및 T 도메인 사이의 상호작용은 상기 제2 항원에 특이적인 제4 항원 결합 부위를 형성한다.

[0032] 특정 측면에 있어서, 청구항 36 결합 분자는, (a) 상기 도메인 H 및 도메인 A의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 N 및 도메인 R의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 I 및 도메인 B의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 O 및 도메인 S의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 L 및 도메인 F의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 P 및 도메인 T의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 M 및 도메인 G의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 Q 및 도메인 U의 아미노산 서열은 동일하고; 및 (b) 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 도메인 N 및 도메인 P는 제2 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성하며, 상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 상기 제1 항원에 특이적인 제3 항원 결합 부위를 형성하며, 상기 R 도메인 및 T 도메인 사이의 상호작용은 상기 제2 항원에 특이적인 제4 항원 결합 부위를 형성한다.

[0033] 특정 측면에 있어서, 상기 A 도메인 및 B 도메인 사이의 접합부를 형성하는 서열은 IKRTPREP 또는 IKRTVREP이다. 특정 측면에 있어서, 상기 F 도메인 및 G 도메인 사이의 접합부를 형성하는 서열은 SSASPREP이다.

[0034] 특정 측면에 있어서, 적어도 하나의 CH3 아미노산 서열은 상기 CH3 아미노산 서열 및 힌지(hinge) 아미노산 서열을 연결시키는 C-말단 트리펩티드 삽입을 가지며, 상기 트리펩티드 삽입은 PGK, KSC, 및 GEC로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0035] 특정 측면에 있어서, 상기 서열은 인간 서열이다. 특정 측면에 있어서, 적어도 하나의 CH3 아미노산 서열은 IgG 서열이다. 특정 측면에 있어서, 상기 IgG 서열은 IgG1 서열이다. 특정 측면에 있어서, 적어도 하나의 CH3 아미노산 서열은 하나 이상의 동종동질이형체(isoallotype) 돌연변이를 갖는다. 특정 측면에 있어서, 상기 동종동질이형체 돌연변이는 D356E 및 L358M이다. 특정 측면에 있어서, 상기 CL 아미노산 서열은 $C_{kappa}$ 서열이다.

[0036] 본 명세서에는 또한, 제1, 제2, 제3, 및 제4 폴리펩티드 사슬을 포함하는 결합 분자가 개시되며, 여기서: (a) 상기 제1 폴리펩티드 사슬은 도메인 A, 도메인 B, 도메인 D, 및 도메인 E를 포함하며, 상기 도메인들은, A-B-D-E 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 A는 VL 아미노산 서열을 갖고, 도메인 B는 CH3 아미노산

서열을 가지며, 도메인 D는 CH2 아미노산 서열을 갖고, 도메인 E는 불변 영역 도메인 아미노산 서열을 가지며; (b) 상기 제2 폴리펩티드 사슬은 도메인 F 및 도메인 G를 포함하고, 상기 도메인들은, F-G 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 F는 VH 아미노산 서열을 갖고 도메인 G는 CH3 아미노산 서열을 가지며; (c) 상기 제3 폴리펩티드 사슬은 도메인 H, 도메인 I, 도메인 J, 및 도메인 K를 포함하고, 상기 도메인들은, H-I-J-K 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 H는 가변 영역 도메인 아미노산 서열을 갖고, 도메인 I는 불변 영역 도메인 아미노산 서열을 가지며, 도메인 J는 CH2 아미노산 서열을 갖고, 및 K는 불변 영역 도메인 아미노산 서열을 가지며; (d) 상기 제4 폴리펩티드 사슬은 도메인 L 및 도메인 M을 포함하고, 상기 도메인들은, L-M 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 L은 가변 영역 도메인 아미노산 서열을 갖고 도메인 M은 불변 영역 도메인 아미노산 서열을 가지며; (e) 상기 제1 및 제2 폴리펩티드는 상기 A 및 F 도메인 사이의 상호작용 및 상기 B 및 G 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되고; (f) 상기 제3 및 제4 폴리펩티드는 상기 H 및 L 도메인 사이의 상호작용 및 상기 I 및 M 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되며; 및 (g) 상기 제1 및 제3 폴리펩티드는 상기 결합 분자를 형성하기 위하여 상기 D 및 J 도메인 사이의 상호작용 및 상기 E 및 K 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합된다.

[0037] 특정 측면에 있어서, 상기 도메인 E는 CH3 아미노산 서열을 갖고; 도메인 H는 VL 아미노산 서열을 가지며; 도메인 I는 CL 아미노산 서열을 갖고 도메인 K는 CH3 아미노산 서열을 가지며; 도메인 L은 VH 아미노산 서열을 갖고; 및 도메인 M은 CH1 아미노산 서열을 갖는다.

[0038] 본 명세서에는 또한, 본 명세서에 개시되거나 기술된 임의의 결합 분자, 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 약학 조성물이 개시된다.

[0039] 본 명세서에는 또한, 치료를 필요로 하는 대상체에게 본 명세서에 개시되거나 기술된 임의의 결합 분자 및 본 명세서에 개시되거나 기술된 임의의 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 치료 방법이 개시된다.

## *도면의 간단한 설명*

[0040] **5.도면의 간단한 설명**

도 1은 CH3-CH3 IgG1 이량체 쌍과 CH1-$C_L$의 정렬(alignment)을 도시한다. 4차 구조는 약 1.6 Å의 RMSD로 조정된다.

도 2는 본 명세서에 기술된 다양한 결합 분자 (항체 구조물이라고도 칭함)에 대하여, 각각의 명명 규칙(naming conventions)과 함께 개략적인 구조를 나타낸다.

도 3은 본 명세서에 기술된 2가 1x1 항체 구조물에 대하여, 각각의 명명 규칙과 함께 폴리펩티드 사슬 및 그의 도메인의 고해상도 도식을 나타낸다.

도 4는 예시적인 2가의, 단일 특이적인, 구조물의 구조를 도시한다.

도 5는 실시예 1에 기술된, 바이오 층 간섭계(biolayer interferometry, BLI) 실험으로부터의 데이터를 도시하며, 여기에서 도 4에 도시된 구조를 갖는 2가의 단일 특이성 결합 분자[폴리펩티드 1: VL-CH3(노브)-CH2-CH3 / 폴리펩티드 2: VH-CH3(홀)]가 분석되었다. 항원 결합 부위는 TNFα에 특이적이었다. 결합 분자 고정(immobilization) 및 고정된 구조물에 대한 TNFα 결합으로부터의 BLI 반응은 항원에 대하여 강력하고, 특이적인, 2가 결합을 나타낸다. 상기 데이터는 폴리펩티드 1 및 폴리펩티드 2의 의도된 페어링의 비율이 높은 분자와 일치한다.

도 6은 예시적인 2가의 1x1 이중 특이성 결합 분자, "BC1"의 특징을 도시한다.

도 7a는 "BC1"의 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography, SEC) 분석을 나타내며, 이는 단일-단계 CH1 친화성 정제 단계 (CaptureSelect™ CH1 친화성 수지)가 >98%가 집합되지 않은(unaggregated) 2가 단백질인 겔(gel) 여과를 통해 단일의, 단순분산(monodisperse) 피크를 산출하는 것을 나타낸다. 도 7b는 CrossMab 2가 항체 구조물의 SEC 분석의 비교 문헌 데이터를 나타낸다 [데이터 출처: Schaefer *et al.* (*Proc Natl Acad Sci USA*. 2011 Jul 5;108(27):11187-92)].

도 8a는 단일의 단단한 피크를 나타내는, CaptureSelect™ CH1 친화성 수지를 사용한 일-단계 정제 후의 "BC1"의 양이온 교환 크로마토그래피 용리(elution) 프로파일(profile)이다. 도 8b는 표준 단백질 A 정제를 사용한

정제 후의 “BC1”의 양이온 교환 크로마토그래피 용리 프로파일이다.

도 9는 정제의 다양한 단계에서의 “BC1”의 비환원성 SDS-PAGE 겔을 도시한다.

도 10a 및 10b는 비-환원 및 환원 조건 둘 다 하에서 단일-단계 CH1-친화성 정제 후의 “BC1”의 SDS-PAGE 겔(도 10a)과 참조 문헌에 공개된 바와 같은 비-환원 및 환원 조건 하에서 CrossMab 이중 특이성 항체의 SDS-PAGE 겔(도 10b)을 비교한다.

도 11a 및 11b는 환원 조건 하에서 2 개의 뚜렷한 중쇄(도 11a) 및 2 개의 뚜렷한 경쇄(도 11b)를 나타내는, “BC1”의 질량 분광 분석을 나타낸다.

도 12는 정제 후에 불완전한 페어링이 존재하지 않음을 보여주는, 비-환원 조건 하에서 정제된 “BC1”의 질량 분광 분석을 나타낸다.

도 13은 2 개의 IgG 대조군 항체와 비교하여, 40℃에서 8주 동안 “BC1”의 안전성을 보여주는 가속 안정성 시험 데이터를 나타낸다.

도 14는 실시예 3에 추가로 기술된, 예시적인 2가의 1x1 이중 특이성 결합 분자, “BC6”의 특징을 도시한다.

도 15a는 CaptureSelect™ CH1 친화성 수지를 사용한 일-단계 정제 후의 “BC6”의 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 분석을 나타내며, 이는 단일 단계 CH1 친화성 정제가 단일의 단순분산 피크를 산출하고 비-공유(non-covalent) 집합체가 없음을 보여준다. 도 15b는 비-환원 조건 하에서 “BC6”의 SDS-PAGE 겔을 나타낸다.

도 16은 실시예 4에 추가로 기술된, 예시적인 2가의 이중 특이성 결합 분자, “BC28”의 특징을 도시한다.

도 17은 “BC28”, “BC29”, “BC30”, “BC31”, 및 “BC32”의 단일-단계 CH1 친화성 정제 후 비-환원 조건 하에서의 SDS-PAGE 분석을 나타낸다.

도 18은 각각 CaptureSelect™ CH1 친화성 수지를 사용한 일-단계 정제 후의 “BC28” 및 “BC30”의 SEC 분석을 나타낸다.

도 19는 실시예 5에 추가로 기술된, 예시적인 2가의 이중 특이성 결합 분자, “BC44”의 특징을 도시한다.

도 20a 및 20b는 가속 안정성 시험 조건 하에서, 2개의 2가 결합 분자, “BC15” 및 “BC16”의 크기 배제 크로마토그래피 데이터를 각각 나타낸다. “BC15” 및 “BC16”은 상이한 가변 영역-CH3 접합부를 갖는다.

도 21은 본 명세서에 기술된 3가의 2x1 항체 구조물에 대하여, 각각의 명명 규칙과 함께 폴리펩티드 사슬 및 그의 도메인의 도식을 나타낸다.

도 22는 실시예 7에 추가로 기술된, 예시적인 3가의 2x1 이중 특이성 결합 분자, “BC1-2x1”의 특징을 도시한다.

도 23은 정제의 다양한 단계에서, ThermoFisher Expi293 일시적 트랜스펙션 시스템을 사용하여 발현된 “BC1” 및 “BC1-2x1” 단백질의 비-환원성 SDS-PAGE를 나타낸다.

도 24는 옥텟(Octet, Pall ForteBio) 바이오 층 간섭계 분석을 사용하여 2가의 1x1 구조물 “BC1”의 결합활성(avidity)과 3가의 2x1 구조물 “BC1-2x1”의 결합활성을 비교한다.

도 25는 3가의 2x1 구조물, “TB111”의 핵심적인 특징을 도시한다.

도 26은 본 명세서에 기술된 3가의 1x2 항체 구조물에 대하여, 각각의 명명 규칙과 함께 폴리펩티드 사슬 및 그의 도메인의 도식을 나타낸다.

도 27은 실시예 10에 추가로 기술된, 예시적인 3가의 1x2 구조물 “CTLA4-4 x Nivo x CTLA4-4”의 특징을 도시한다.

도 28은 비-환원(“-DTT”) 및 환원(“+DTT”) 조건 하에서의 3가의 1x2 구조물 CTLA4-4 x Nivo x CTLA4-4” 구조물을 나타내는 레인이 네모 칸으로 표시된 SDS-PAGE 겔이다.

도 29는 2 개의 항체 사이의 항원 결합의 비교를 나타낸다: 2가의 1x1 구조물 “CTLA4-4 x OX40-8” 및 3가의 1x2 구조물 “CTLA4-4 x Nivo x CTLA4-4”. “CTLA4-4 x OX40-8”은 CTLA4에 1가로 결합하고, 반면 “CTLA4-4 x Nivo x CTLA4-4”는 CTLA4에 2가로 결합한다.

도 30은 실시예 11에 추가로 기술된 예시적인 3가의 1x2 삼중 특이성 구조물, “BC28-1x1x1a”의 특징을 도시한

다.

도 31은 일시적인 발현 및 단일 단계 CH1 친화성 수지 정제 후의 "BC28-1x1x1a"의 크기 배제 크로마토그래피를 나타내며, 이는 단일의 뚜렷한 피크를 나타낸다.

도 32는 실시예 12에 추가로 기술된 바와 같은, 비-환원 및 환원 조건 하에서, 각각 일시적 발현 및 CaptureSelect™ CH1 친화성 수지를 사용한 일-단계 정제 후의 2가 및 3가 구조물의 SDS-PAGE 결과를 나타낸다.

도 33a 내지 33c는 PD1, 항원 "A", 및 CTLA4의 3 가지 항원에 대한 옥텟 결합 분석을 나타낸다. 실시예 13에 추가로 기술된 바와 같이, 도 33a는 "BC1"의 PD1 및 항원 "A"에 대한 결합을 나타내며; 도 33b는 2가의 이중 특이성 구조물 "CTLA4-4 x OX40-8"의 CTLA4, 항원 "A", 및 PD1에 대한 결합을 나타내고; 도 33c는 3가의 삼중 특이성 "BC28-1x1x1a"의 PD1, 항원 "A", 및 CTLA4에 대한 결합을 나타낸다.

도 34는 본 명세서에 기술된 특정한 4가의 2x2 구조물에 대하여, 각각의 명명 규칙과 함께 폴리펩티드 사슬 및 그의 도메인의 도식을 나타낸다.

도 35는 실시예 14에 추가로 기술된 예시적인 4가의 2x2 구조물 "BC22-2x2"의 핵심적인 특징을 도시한다.

도 36은 정제의 각각 다른 단계에서 2x2 4가의 "BC22-2x2" 구조물을 1x2 3가의 구조물 "BC12-1x2" 및 2x1 3가의 구조물 "BC21-2x1"과 비교하는 비-환원성 SDS-PAGE 겔이다.

도 37은 예시적인 4가의 2x2 구조물에 대한 구조를 제공한다.

도 38은 본 명세서에 기술된 특정한 4가의 구조물에 대하여, 각각의 명명 규칙과 함께 폴리펩티드 사슬 및 그의 도메인의 도식을 나타낸다.

도 39는 이중 특이성 4가 구조물의 예시적인 구조를 제공한다.

도 40은 공동 경쇄(common light chain) 전략을 활용하는 삼중 특이성 4가 구조물에 대한 예시적인 구조를 제공한다.

도 41은 도 39에 개략적으로 도시된 4가 구조물에 의한 이중 특이성 항원 결합(antigen engagement)을 나타내며, 이는 이 구조가 동시 결합이 가능함을 나타낸다. B-바디(B-Body) 고정 및 고정된 구조물에 대한 TNF α 결합으로부터의 바이오 층 간섭계(BLI) 반응은 의도된 사슬 페어링의 비율이 높은 분자와 일치한다.

도 42는 세포-표면 항원에 결합하는 B-바디의 유세포계측(flow cytometry) 분석을 제공한다. 직교 평행선(cross-hatched)으로 표시된 부분은 항원이 없는 세포를 나타내며; 점선으로 표시된 부분은 표면 항원으로 일시적으로 트랜스펙션된 세포를 나타낸다.

도 43은 3가 구조물의 예시적인 구조를 제공한다.

도 44는 3가 구조물의 예시적인 구조를 제공한다.

도 45는 실시예 17에 추가로 기술된 바와 같은, 비-환원 및 환원 조건 하에서, 각각 일시적 발현 및 CaptureSelect™ CH1 친화성 수지를 사용한 일-단계 정제 후의 2가 및 3가 구조물의 SDS-PAGE 결과를 나타낸다.

도 46은 접합부 변형들의 페어링 안정성을 평가하기 위하여 측정된 "BC24jv", "BC26jv", 및 "BC28jv"에 대한 열 전이(thermal transitions)의 차이를 나타낸다.

상기 도면들은 오직 예시를 통한 설명의 목적으로만 본 발명의 다양한 구현 예를 도시한다. 당업자는 하기 설명으로부터 본 명세서에 도시된 구조 및 방법의 대안적인 구현 예가 본 명세서에 기술된 본 발명의 원리를 벗어나지 않고 적용될 수 있다는 것을 쉽게 인식할 것이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0041] **6.상세한 설명**

[0042] **6.1.정의**

[0043] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 다음의 용어들은 아래에 기술된 의미를 갖는다.

[0044] "**항원 결합 부위**"는 주어진 항원 또는 에피토프(epitope)에 특이적으로 인식하거나 결합하는 결합 분자의 영역을 의미한다.

[0045] "**B-바디(B-Body)**"는 본 명세서에 기술된 임의의 결합 분자 구조물을 의미한다.

[0046] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "**치료하다(treat)**" 또는 "**치료(treatment)**"는 다발성 경화증, 관절염, 또는 암의 진행과 같은, 바람직하지 않은 생리학적 변화 또는 장애를 예방 또는 감속(감소)시키는 것을 목적으로 하는, 치료적인 처치 및 예방의(prophylactic) 또는 예방을 위한(preventative) 조치를 모두 지칭한다. 유익하거나 바람직한 임상 결과는, 이에 한정되지는 않으나, 증상의 완화, 질병 범위의 감소, 안정화된(즉, 악화되지 않은) 질병의 상태, 질병 진행의 지연 또는 감속, 질병 상태의 개선 또는 일시적 완화, 및 진통의 경감(부분적이든 전체적이든)을 검출 여부를 불문하고 포함한다. "치료(treatment)"는 또한 치료를 받지 않을 경우 예상되는 생존과 비교하여 생존 기간을 연장시킬 수 있음을 의미한다. 치료가 필요한 이들은 이미 질환 또는 장애가 있는 이들뿐만 아니라 질환 또는 장애를 가질 경향이 있는 이들 또는 질환 또는 장애가 예방되어야 하는 이들을 포함한다.

[0047] "**대상체(subject)**" 또는 "**개체(individual)**" 또는 "**동물(animal)**" 또는 "**환자(patient)**" 또는 "**포유동물(mammal)**"은 진단, 예후, 또는 치료가 요구되는 임의의 대상체, 특히, 포유류 대상체를 의미한다. 포유류 대상체는 인간, 가축, 농장 동물, 및 개, 고양이, 기니피그, 토끼, 쥐(rats), 생쥐(mice), 말, 소(cattle), 암소(cows) 등과 같은 동물원, 스포츠용, 또는 애완용 동물을 포함한다.

[0048] 용어 "**충분한 양(sufficient amount)**"은 원화는 효과를 생성시키기에 충분한 양, 예를 들어, 세포 내에서 단백질 집합체를 조절하기에 충분한 양을 의미한다.

[0049] 용어 "**치료적으로 유효한 양(therapeutically effective amount)**"은 질병의 증상을 개선시키는데 효과적인 양이다. 치료적으로 유효한 양은 질병 예방이 치료로 간주될 수 있기 때문에 "**예방적으로 유효한 양(prophylactically effective amount)**"일 수 있다.

[0050] **6.2다른 해석 규칙**

[0051] 달리 명시되지 않는 한, 본 명세서 내의 서열에 대한 모든 언급은 아미노산 서열에 관한 것이다.

[0052] 달리 명시되지 않는 한, 항체 불변 영역 잔기(residue) 넘버링은,

[0053] 본 명세서에 전체로서 참조로 포함되는, www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html#refs (2017년 8월 22일자로 접속 가능) 및 Edelman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. USA*, 63:78-85 (1969)에 기술된 Eu 지수에 따르며, 본 명세서에 기술된 결합 분자의 사슬 내의 잔기의 물리적 위치에 관계 없이 내인성 불변 영역 서열 내에서의 그의 위치에 따라 잔기를 식별한다. "내인성 서열(endogenous sequence)" 또는 "원생 서열(native sequence)"은 유기체, 조직, 또는 세포로부터 기원하고 인위적으로 변형되거나 돌연변이되지 않은 핵산 및 아미노산 서열을 모두 포함하는, 임의의 서열을 의미한다.

[0054] 본 명세서에서, "포함하다(comprises)", "포함하는(comprising)", "함유하는(containing)", "갖는(having)", "포함하다(includes)", "포함하는(including)", 및 이들의 언어적 변형들은 미국 특허법에 부여된 의미를 가지며, 명시적으로 열거된 것 이상의 추가적인 구성요소의 존재를 허용한다.

[0055] 본 명세서에 제공된 범위들은 열거된 끝점(endpoints)을 포함하여, 상기 범위 내의 모든 값에 대한 약칭인 것으로 이해된다. 예를 들어, 1 내지 50의 범위는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 및 50으로 구성되는 군으로부터의 임의의 숫자, 숫자의 조합, 또는 하위 범위(sub-range)를 포함하는 것으로 이해된다.

[0056] 구체적으로 명시되거나 문맥으로부터 명백한 경우가 아니라면, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "또는"은 포괄적인 것으로 이해된다. 구체적으로 명시되거나 문맥으로부터 명백한 경우가 아니라면, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "단수관사(a, an)" 및 "상기(the)"는 단수형 또는 복수형인 것으로 이해된다.

[0057] 구체적으로 명시되거나 문맥으로부터 다르게 명백한 경우가 아니라면, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "약(about)"은 당업계에서 평균적으로 용인되는 범위 내, 예를 들어, 평균의 2 표준 편차 내로 이해된다. 약은 명시된 값의 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05%, 또는 0.01% 내인 것으로 이해될 수 있다. 문맥으로부터 다르게 명확한 경우가 아니라면, 본 명세서에 제공되는 모든 수치 값들은 용어 약

(about)으로 수정된다.

[0058] **6.3.결합 분자**

[0059] 제1 측면에 있어서, 결합 분자가 제공된다.

[0060] **도 3**을 참조하면, 제1 일련의 구현 예에서, 상기 결합 분자는 제1 및 제2 폴리펩티드 사슬을 포함하며, 여기서: (a) 상기 제1 폴리펩티드 사슬은 도메인 A, 도메인 B, 도메인 D 및 도메인 E를 포함하고, 상기 도메인들은, A-B-D-E 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 A는 VL 아미노산 서열을 갖고, 도메인 B는 CH3 아미노산 서열을 가지며, 도메인 D는 CH2 아미노산 서열을 갖고, 도메인 E는 불변 영역(constant region) 도메인 아미노산 서열을 가지며; (b) 상기 제2 폴리펩티드 사슬은 도메인 F 및 도메인 G를 포함하고, 상기 도메인들은, F-G 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 F는 VH 아미노산 서열을 갖고 도메인 G는 CH3 아미노산 서열을 가지며; 및 (c) 상기 제1 및 제2 폴리펩티드는 상기 결합 분자를 형성하기 위하여 상기 A 및 F 도메인 사이의 상호작용 및 상기 B 및 G 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합된다.

[0061] 또한 **도 3**을 참조하면, 제2 일련의 구현 예에서, 상기 결합 분자는 제3 및 제4 폴리펩티드 사슬을 더 포함하며, 여기서: (a) 상기 제3 폴리펩티드 사슬은 도메인 H, 도메인 I, 도메인 J, 및 도메인 K를 포함하고, 상기 도메인들은, H-I-J-K 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 H는 가변 영역 도메인 아미노산 서열을 갖고, 도메인 I는 불변 영역 도메인 아미노산 서열을 가지며, 도메인 J는 CH2 아미노산 서열을 갖고, 및 K는 불변 영역 도메인 아미노산 서열을 가지며; (b) 상기 제4 폴리펩티드 사슬은 도메인 L 및 도메인 M을 포함하고, 상기 도메인들은, L-M 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 L은 가변 영역 도메인 아미노산 서열을 갖고 도메인 M은 불변 영역 아미노산 서열을 가지며; (c) 상기 제3 및 제4 폴리펩티드는 상기 H 및 L 도메인 사이의 상호작용 및 상기 I 및 M 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되고; 및 (d) 상기 제1 및 제3 폴리펩티드는 상기 결합 분자를 형성하기 위하여 상기 D 및 J 도메인 사이의 상호작용 및 상기 E 및 K 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합된다.

[0062] 다양한 구현 예에서, 상기 제1 및 제3 폴리펩티드 사슬은 서열이 서로 동일하며, 상기 제2 및 제4 폴리펩티드는 서열이 서로 동일하다. 이들 구현 예에서, 도메인 E 및 K 사이의 상호작용을 통한 제1 및 제3 폴리펩티드 사슬의 결합은(하기 6.3.15. 절 참조) 하기 실시예 1에서 예시된 바와 같은, 2가의, 단일 특이성, 항체 구조물을 형성한다.

[0063] 다른 구현 예에서, 상기 제1 및 제3 폴리펩티드 사슬은 서열이 서로 동일하지 않으며, 상기 제2 및 제4 폴리펩티드는 서열이 서로 동일하지 않다. 이들 구현 예에서, 도메인 E 및 K 사이의 상호작용을 통한 제1 및 제3 폴리펩티드 사슬의 결합은(하기 6.3.15. 절 참조) 2가의, 이중 특이성, 항체 구조물을 형성할 수 있다.

[0064] **6.3.1.도메인 A (VL)**

[0065] 본 명세서에 기술된 상기 결합 분자에서, 도메인 A는 VL 아미노산 서열을 갖는다. 본 명세서에 기술된 상기 결합 분자에서 유용한 상기 VL 아미노산 서열은 항체 경쇄 가변 도메인 서열이다. 본 명세서에 기술된 천연 항체 및 항체 구조물 둘 다의 일반적인 배열에서, 특정 VL 아미노산 서열은 항원-결합 부위를 형성하기 위하여 특정 VH 아미노산 서열과 결합한다. 다양한 구현 예에서, 상기 VL 아미노산 서열은 하기 6.3.1.1. 및 6.3.1.2. 절에서 보다 상세히 기술된 바와 같이, 인간 서열, 합성 서열, 또는 인간, 비-인간 포유류, 포유류, 및/또는 합성 서열의 조합을 포함하는, 포유류 서열이다.

[0066] 다양한 구현 예에서, VL 아미노산 서열은 천연 발생 서열의 돌연변이된 서열이다. 특정 구현 예에서, 상기 VL 아미노산 서열은 람다(lambda, λ) 경쇄 가변 도메인 서열이다. 특정 구현 예에서, 상기 VL 아미노산 서열은 카파(kappa, κ) 경쇄 가변 도메인 서열이다. 바람직한 구현 예에서, 상기 VL 아미노산 서열은 카파(κ) 경쇄 가변 도메인 서열이다.

[0067] 본 명세서에 기술된 결합 분자에서, 도메인 A의 C-말단은 도메인 B의 N-말단에 연결된다. 특정 구현 예에서, 도메인 A는 하기 6.3.19.1. 절 및 실시예 6에서 보다 상세히 기술된 바와 같이, 도메인 A와 도메인 B의 접합부에서의 그의 C-말단에서 돌연변이된 VL 아미노산 서열을 갖는다.

[0068] **6.3.1.1.상보성 결정 영역**

[0069] 상기 VL 아미노산 서열은 "**상보성 결정 영역(complementarity determining regions)**"(CDR), 일반적으로 3개의 CDR (CDR1, CDR2, 및 CDR3)로 지칭되는 매우 가변적인 서열을 포함한다. 다양한 구현 예에서, 상기 CDR은, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 햄스터, 토끼, 낙타, 당나귀, 염소, 및 인간 서열을 포함하나, 이에 한정되지는 않는,

포유류 서열이다. 바람직한 구현 예에서, 상기 CDR은 인간 서열이다. 다양한 구현 예에서, 상기 CDR은 천연 발생 서열이다. 다양한 구현 예에서, 상기 CDR은 특정 항원 또는 에피토프에 대한 항원-결합 부위의 결합 친화성을 바꾸기 위해 돌연변이된 천연 발생 서열이다. 특정 구현 예에서, 상기 천연 발생 CDR은 친화성 성숙(affinity maturation) 및 체세포 과변이(somatic hypermutation)를 통해 생체 내(*in vivo*) 숙주 내에서 돌연변이된다. 특정 구현 예에서, 상기 CDR은 PCR-돌연변이생성 및 화학적 돌연변이 생성을 포함하나, 이에 한정되지는 않는, 방법을 통해 시험관 내(*in vitro*)에서 돌연변이된다. 다양한 구현 예에서, 상기 CDR은 랜덤 서열 CDR 라이브러리 및 합리적으로 고안된 CDR 라이브러리로부터 획득된 CDR을 포함하나, 이에 한정되지는 않는, 합성 서열이다.

[0070] **6.3.1.2.프레임워크(Framework) 영역 및 CDR 그래프팅(Grafting)**

[0071] 상기 VL 아미노산 서열은 "**프레임워크 영역(framework region)**" (FR) 서열을 포함한다. FR은 일반적으로, 일반적으로 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 배열 (N-말단에서 C-말단까지) 내에 산재한, CDR (6.3.1.1. 절 참조)에 대한 스캐폴드(scaffold)로서 작용하는 보존된 서열 영역이다. 다양한 구현 예에서, FR은 생쥐(mouse), 쥐(rat), 햄스터, 토끼, 낙타, 당나귀, 염소, 및 인간 서열을 포함하나, 이에 한정되지는 않는, 포유류 서열이다. 바람직한 구현 예에서, 상기 FR은 인간 서열이다. 다양한 구현 예에서, 상기 FR은 천연 발생 서열이다. 다양한 구현 예에서, 상기 FR은 합리적으로 고안된 서열을 포함하나, 이에 한정되지는 않는, 합성 서열이다.

[0072] 다양한 구현 예에서, 상기 FR 및 CDR은 모두 동일한 천연 발생 가변 도메인 서열로부터 유래한다. 다양한 구현 예에서, 상기 FR 및 CDR은 상이한 가변 도메인 서열로부터 유래하며, 상기 CDR은 특정 항원에 대한 특이성을 제공하는 CDR과 함께 FR 스캐폴드 상에 그래프트된다. 특정 구현 예에서, 상기 그래프트된 CDR은 모두 동일한 천연 발생 가변 도메인 서열로부터 유래한다. 특정 구현 예에서, 상기 그래프트된 CDR은 상이한 가변 도메인 서열로부터 유래한다. 특정 구현 예에서, 상기 그래프트된 CDR은 랜덤 서열 CDR 라이브러리 및 합리적으로 고안된 CDR 라이브러리로부터 획득된 CDR를 포함하나, 이에 한정되지는 않는, 합성 서열이다. 특정 구현 예에서, 상기 그래프트된 CDR 및 FR은 동일한 종으로부터 유래된다. 특정 구현 예에서, 상기 그래프트된 CDR 및 FR은 상이한 종으로부터 유래된다. 바람직한 그래프트된 CDR 구현 예에서, 항체는 "**인간화(humanized)**" 된 것이며, 여기서 상기 그래프트된 CDR은 생쥐(mouse), 쥐(rat), 햄스터, 토끼, 낙타, 당나귀, 및 염소 서열을 포함하나, 이에 한정되지는 않는, 비-인간 포유류 서열이고, 상기 FR은 인간 서열이다. 인간화된 항체는, 본 명세서에 그가 교시하는 모든 내용이 참조로서 포함되는, 미국 특허 제6,407,213호에 보다 상세히 기술되어 있다. 다양한 구현 예에서, 하나의 종으로부터의 FR의 일부 또는 특정 서열은 또 다른 종의 FR의 일부 또는 특정 서열을 대체하기 위하여 사용된다.

[0073] **6.3.2.도메인 B (CH3)**

[0074] 상기 결합 분자에서, 도메인 B는 CH3 아미노산 서열이다. CH3 아미노산 서열은, 본 명세서에 기술된 바와 같이, 항체 중쇄의 C-말단 도메인의 서열이다.

[0075] 다양한 구현 예에서, 상기 CH3 서열은 생쥐(mouse), 쥐(rat), 햄스터, 토끼, 낙타, 당나귀, 염소, 및 인간 서열을 포함하나, 이에 한정되지는 않는, 포유류 서열이다. 바람직한 구현 예에서, 상기 CH3 서열은 인간 서열이다. 특정 구현 예에서, 상기 CH3 서열은 IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgM, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 아이소타입(isotype)으로부터 유래된 것이거나 또는 IgE 또는 IgM 아이소타입으로부터의 CH4 서열로부터 유래된 것이다. 바람직한 구현 예에서, 상기 CH3 서열은 IgG1 아이소타입으로부터 유래된 것이다.

[0076] 특정 구현 예에서, 상기 CH3 서열은 내인성 서열이다. 특정 구현 예에서, 상기 CH3 서열은 유니프롯 수납 번호(UniProt accession number) P01857 아미노산 224-330이다. 다양한 구현 예에서, CH3 서열은 내인성 CH3 서열의 분절(segment)이다. 특정 구현 예에서, CH3 서열은 N-말단 아미노산 G224 및 Q225가 결여된 내인성 CH3 서열을 갖는다. 특정 구현 예에서, CH3 서열은 C-말단 아미노산 P328, G329, 및 K330이 결여된 내인성 CH3 서열을 갖는다. 특정 구현 예에서, CH3 서열은 N-말단 아미노산 G224 및 Q225 및 C-말단 아미노산 P328, G329, 및 K330 모두가 결여된 내인성 CH3 서열을 갖는다. 바람직한 구현 예에서, 결합 분자는 CH3 서열을 갖는 다양한 도메인을 가지며, 여기서 CH3 서열은 완전한(full) 내인성 CH3 서열뿐만 아니라 N-말단 아미노산, C-말단 아미노산, 또는 그 둘 다가 결여된 CH3 서열 모두를 지칭할 수 있다.

[0077] 특정 구현 예에서, 상기 CH3 서열은 하나 이상의 돌연변이를 갖는 내인성 서열이다. 특정 구현 예에서, 상기 돌연변이는 하기 6.3.14.1-6.3.14.3. 절에 보다 상세히 기술된 바와 같이, 특정 CH3 서열의 특이적 페어링을 유도하기 위해 내인성 CH3 서열 내로 도입되는 하나 이상의 직교 돌연변이이다.

[0078] 특정 구현 예에서, 상기 CH3 서열은 알로타입(allotype)의 특정 아미노산을 또 다른 알로타입으로 대체함으로써 항체의 면역원성을 감소시키도록 조작되며 동종동질이형체(isoallotype) 돌연변이로서 본 명세서에 언급되고, 이는 본 명세서에 그가 교시하는 모든 내용이 참조로서 포함되는, Stickler *et al.* (*Genes Immun*. 2011 Apr; 12(3): 213-221)에 보다 상세히 기술되어 있다. 특정 구현 예에서, G1m1 알로타입의 특정 아미노산이 대체된다. 바람직한 구현 예에서, 동종동질이형체 돌연변이 D356E 및 L358M이 상기 CH3 서열 내에서 만들어진다.

[0079] 바람직한 구현 예에서, 도메인 B는 다음의 돌연변이 변화를 갖는 인간 IgG1 CH3 아미노산 서열을 갖는다: P343V; Y349C; 및 트리펩티드 삽입, 445P, 446G, 447K. 다른 바람직한 구현 예에서, 도메인 B는 다음의 돌연변이 변화를 갖는 인간 IgG1 CH3 서열을 갖는다: T366K; 및 트리펩티드 삽입, 445K, 446S, 447C. 또 다른 바람직한 구현 예에서, 도메인 B는 다음의 돌연변이 변화를 갖는 인간 IgG1 CH3 서열을 갖는다: Y349C 및 트리펩티드 삽입, 445P, 446G, 447K.

[0080] 특정 구현 예에서, 도메인 B는 그 외의 내인성 CH3 서열 내로 통합된 447C 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 CH3 서열을 갖는다.

[0081] 본 명세서에 기술된 결합 분자에서, 도메인 B의 N-말단은 도메인 A의 C-말단에 연결된다. 특정 구현 예에서, 도메인 B는, 하기 6.3.19.1. 절 및 실시예 6에 보다 상세히 기술된 바와 같이, 도메인 A 및 도메인 B 사이의 접합부에서의 N-말단에서 돌연변이된 CH3 아미노산 서열을 갖는다.

[0082] 상기 결합 분자에서, 도메인 B의 C-말단은 도메인 D의 N-말단에 연결된다. 특정 구현 예에서, 도메인 B는, 하기 6.3.19.3. 절에 상세히 기술된 바와 같이, 도메인 B 및 도메인 D 사이의 접합부에서의 C-말단에서 연장된 CH3 아미노산 서열을 갖는다.

[0083] **6.3.3.도메인 D (CH2)**

[0084] 본 명세서에 기술된 결합 분자에서, 도메인 D는 CH2 아미노산 서열을 갖는다. 본 명세서에 기술된 바와 같이, CH2 아미노산 서열은, N-말단으로부터 C-말단까지를 기준으로 천연 항체 중쇄의 제3 도메인의 CH2 아미노산 서열이다. 다양한 구현 예에서, 상기 CH2 서열은 생쥐(mouse), 쥐(rat), 햄스터, 토끼, 낙타, 당나귀, 염소, 및 인간 서열을 포함하나, 이에 한정되지는 않는, 포유류 서열이다. 바람직한 구현 예에서, 상기 CH2 서열은 인간 서열이다. 특정 구현 예에서, 상기 CH2 서열은 IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 또는 IgM 아이소타입으로부터 유래된 것이다. 바람직한 구현 예에서, 상기 CH2 서열은 IgG1 아이소타입으로부터 유래된 것이다.

[0085] 특정 구현 예에서, 상기 CH2 서열은 내인성 서열이다. 특정 구현 예에서, 상기 서열은 유니프롯 수납 번호 P01857 아미노산 111-223이다. 바람직한 구현 예에서, 상기 CH2 서열은, 하기 6.3.19.3. 절에 보다 상세히 기술된 바와 같이, N-말단 가변 도메인-불변 도메인 분절을 상기 CH2 도메인에 연결시키는 N-말단 힌지(hinge) 영역 펩티드를 갖는다.

[0086] 상기 결합 분자에서, 도메인 D의 N-말단은 도메인 B의 C-말단에 연결된다. 특정 구현 예에서, 도메인 B는, 하기 6.3.19.3. 절에 보다 상세히 기술된 바와 같이, 도메인 D 및 도메인 B 사이의 접합부에서의 C-말단에서 연장된 CH3 아미노산 서열을 갖는다.

[0087] 상기 결합 분자에서, 도메인 D의 C-말단은 도메인 E의 N-말단에 연결된다. 특정 구현 예에서, 도메인 D는 하기 6.3.19.5. 절에 보다 상세히 기술된 바와 같이, CH1 아미노산 서열 또는 CL 아미노산 서열을 갖는 도메인 E의 N-말단에 연결된다.

[0088] **6.3.4.도메인 E (불변 영역)**

[0089] 상기 결합 분자에서, 도메인 E는 불변 영역 도메인 아미노산 서열을 갖는다. 불변 영역 도메인 아미노산은, 본 명세서에 기술된 바와 같이, 항체의 불변 영역 도메인의 서열이다.

[0090] 다양한 구현 예에서, 상기 불변 영역 서열은 생쥐(mouse), 쥐(rat), 햄스터, 토끼, 낙타, 당나귀, 염소, 및 인간 서열을 포함하나, 이에 한정되지는 않는, 포유류 서열이다. 바람직한 구현 예에서, 상기 불변 영역 서열은 인간 서열이다. 특정 구현 예에서, 상기 불변 영역 서열은 항체 경쇄로부터 유래된 것이다. 특정 구현 예에서, 상기 불변 영역 서열은 람다(lambda) 또는 카파(kappa) 경쇄로부터 유래된 것이다. 특정 구현 예에서, 상기 불변 영역 서열은 항체 중쇄로부터 유래된 것이다. 특정 구현 예에서, 상기 불변 영역 서열은 IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 또는 IgM 아이소타입인 항체 중쇄 서열이다. 바람직한 구현 예에서, 상기 불변 영역 서열은 IgG1 아이소타입으로부터 유래된 것이다. 특정 구현 예에서, 상기 불변 영역 서열은 CH3 서열이다.

CH3 서열은 상기 6.3.2. 절에 보다 상세히 기술되어 있다.

[0091] 특정 구현 예에서, 상기 불변 영역 서열은 하나 이상의 직교 돌연변이를 포함하도록 돌연변이 된다. 바람직한 구현 예에서, 도메인 E는, 하기 6.3.14.2. 절에 보다 상세히 기술된 바와 같은, 노브-홀(knob-hole, 동의어로, "노브-인-홀(knob-in-hole)", "KIH") 직교 돌연변이, 및 하기 6.3.14.1. 절에 보다 상세히 기술된 바와 같은, 직교 돌연변이를 포함하는 CH3 도메인과 조작된 이황화 결합을 형성하는 S354C 또는 Y349C 돌연변이를 포함하는 CH3 서열인 불변 영역 서열을 가진다. 일부 바람직한 구현 예에서, 상기 노브-홀 직교 돌연변이는 T366W 돌연변이이다.

[0092] 특정 구현 예에서, 상기 불변 영역 도메인 서열은 CH1 서열이다. CH1 서열은 하기 6.3.4.1. 절에 보다 상세히 기술되어 있다. 특정 구현 예에서, 상기 CH1 도메인의 N-말단은 하기 6.3.19.5. 절에 보다 상세히 기술된 바와 같이, CH2 도메인의 C-말단에 연결된다.

[0093] 특정 구현 예에서, 상기 불변 영역 서열은 CL 서열이다. CL 서열은 하기 6.3.4.2. 절에 보다 상세히 기술되어 있다. 특정 구현 예에서, 상기 CL 도메인의 N-말단은 하기 6.3.19.5. 절에 보다 상세히 기술된 바와 같이, CH2 도메인의 C-말단에 연결된다.

[0094] **6.3.4.1.CH1 도메인**

[0095] CH1 아미노산 서열은, 본 명세서에 기술된 바와 같이, N-말단으로부터 C-말단까지를 기준으로, 항체 중쇄의 제2 도메인의 서열이다. 특정 구현 예에서, 상기 CH1 서열은 내인성 서열이다. 다양한 구현 예에서, 상기 CH1 서열은 생쥐(mouse), 쥐(rat), 햄스터, 토끼, 낙타, 당나귀, 염소, 및 인간 서열을 포함하나, 이에 한정되지는 않는, 포유류 서열이다. 바람직한 구현 예에서, 상기 CH1 서열은 인간 서열이다. 특정 구현 예에서, 상기 CH1 서열은 IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 또는 IgM 아이소타입으로부터 유래된 것이다. 바람직한 구현 예에서, 상기 CH1 서열은 IgG1 아이소타입으로부터 유래된 것이다. 바람직한 구현 예에서, 상기 CH1 서열은 유니프롯 수납 번호 P01857 아미노산 1-98이다.

[0096] **6.3.4.2.CL 도메인**

[0097] 본 명세서에 기술된 결합 분자에 유용한 CL 아미노산 서열은 항체 경쇄 불변 도메인 서열이다. 특정 구현 예에서, 상기 CL 서열은 내인성 서열이다. 다양한 구현 예에서, 상기 CL 서열은 생쥐(mouse), 쥐(rat), 햄스터, 토끼, 낙타, 당나귀, 염소, 및 인간 서열을 포함하나, 이에 한정되지는 않는, 포유류 서열이다. 바람직한 구현 예에서, 상기 CL 서열은 인간 서열이다.

[0098] 특정 구현 예에서, 상기 CL 아미노산 서열은 람다(lambda, λ) 경쇄 불변 도메인 서열이다. 특정 구현 예에서, 상기 CL 아미노산 서열은 인간 람다 경쇄 불변 도메인 서열이다. 바람직한 구현 예에서, 상기 람다(λ) 경쇄 서열은 유니프롯 수납 번호 P0CG04이다.

[0099] 특정 구현 예에서, 상기 CL 아미노산 서열은 카파(kappa, κ) 경쇄 불변 도메인 서열이다. 바람직한 구현 예에서, 상기 CL 아미노산 서열은 인간 카파(κ) 경쇄 불변 도메인 서열이다. 바람직한 구현 예에서, 상기 카파 경쇄 서열은 유니프롯 수납 번호 P01834이다.

[0100] **6.3.5.도메인 F (VH)**

[0101] 상기 결합 분자에서, 도메인 F는 VH 아미노산 서열을 갖는다. 본 명세서에 기술된 상기 결합 분자 내의 상기 VH 아미노산 서열은 항체 중쇄 가변 도메인 서열이다. 자연 및 본 명세서에 기술된 결합 분자 둘 다에에서의 일반적인 항체 배열 내에서, 특정 VH 아미노산 서열은 항원-결합 부위를 형성하기 위해 특정 VL 아미노산 서열과 결합된다. 다양한 구현 예에서, VH 아미노산 서열은, 상기 6.3.1.1 및 6.3.1.2. 절에 보다 상세히 기술된 바와 같이, 인간 서열, 합성 서열, 또는 비-인간 포유류, 포유류, 및/또는 합성 서열의 조합을 포함하는, 포유류 서열이다. 다양한 구현 예에서, VH 아미노산 서열은 천연 발생 서열의 돌연변이된 서열이다.

[0102] **6.3.6.도메인 G (CH3)**

[0103] 상기 결합 분자에서, 도메인 G는 CH3 아미노산 서열을 갖는다. CH3 서열은 상기 6.3.2. 절에 보다 상세히 기술되어 있다.

[0104] 특정 바람직한 구현 예에서, 도메인 G는 다음의 돌연변이 변화를 갖는 인간 IgG1 CH3 서열을 갖는다: S354C; 및 트리펩티드 삽입, 445P, 446G, 447K. 일부 바람직한 구현 예에서, 도메인 G는 다음의 돌연변이 변화를 갖는 인간 IgG1 CH3 서열을 갖는다: S354C; 및 445P, 446G, 447K 트리펩티드 삽입. 일부 바람직한 구현 예에서, 도메

인 G는 다음의 변화를 갖는 인간 IgG1 CH3 서열을 갖는다: L351D, 및 445G, 446E, 447C의 트리펩티드 삽입.

[0105] **6.3.7.도메인 H (가변 영역)**

[0106] 상기 결합 분자에서, 도메인 H는 가변 영역 도메인 아미노산 서열을 갖는다. 가변 영역 도메인 아미노산 서열은, 본 명세서에 기술된 바와 같이, VL 및 VH 항체 도메인 서열을 포함하는 항체의 가변 영역 도메인 아미노산 서열이다. VL 및 VH 서열은 각각 상기 6.3.1. 및 6.3.5. 절에 보다 상세히 기술되어 있다. 바람직한 구현 예에서, 도메인 H는 VL 항체 도메인 서열이다.

[0107] **6.3.8.도메인 I (불변 영역)**

[0108] 본 명세서에 기술된 상기 결합 분자에서, 도메인 I는 불변 영역 도메인 아미노산 서열을 갖는다. 불변 영역 도메인 아미노산 서열은 상기 6.3.4. 절에 보다 상세히 기술되어 있다. 바람직한 구현 예에서, 도메인 I는, 6.3.4.2. 절에 보다 상세히 기술된 바와 같이, 카파 경쇄로부터의 CL인 불변 영역 서열을 갖는다.

[0109] **6.3.9.도메인 J (CH2)**

[0111] *상기 결합 분자에서, 도메안 J는 CH2 아미노산 서열을 갖는다. CH2 아미노산 서열은 상기 6.3.3. 절에 보다 상세히 기술되어 있다. 바람직한 구현 예에서, 상기 CH2 아미노산 서열은 하기 6.3.19.4. 절에 보다 상세히 기술된 바와 같이, 도메인 J를 도메인 I로 연결시키는 N-말단 힌지 영역을 갖는다.

[0112] 상기 결합 분자에서, 도메인 J의 C-말단은 도메인 K의 N-말단에 연결된다. 특정 구현 예에서, 도메인 J는, 하기 6.3.19.5. 절에 보다 상세히 기술된 바와 같이, CH1 아미노산 서열 또는 CL 아미노산 서열을 갖는 도메인 K의 N-말단에 연결된다.

[0113] **6.3.10.도메인 K (불변 영역)**

[0114] 상기 결합 분자에서, 도메인 K는 불변 영역 도메인 아미노산 서열을 갖는다. 불변 영역 도메인 아미노산 서열은 상기 6.3.4. 절에 보다 상세히 기술되어 있다. 바람직한 구현 예에서, 도메인 K는, 하기 6.3.14.2. 절에 보다 상세히 기술된 바와 같은, 노브-홀 직교 돌연변이; 상기 6.3.2. 절에 상세히 기술된 바와 같은, 동종동질이형체 돌연변이; 및 하기 6.3.14.1. 절에 보다 상세히 기술된 바와 같은, 직교 돌연변이를 포함하는 CH3 도메인과 조작된 이황화 결합을 형성하는 S354C 또는 Y349C 돌연변이를 포함하는 CH3 서열인 불변 영역 서열을 갖는다. 일부 바람직한 구현 예에서, 동종동질이형체 돌연변이와 조합된 노브-홀 직교 돌연변이는 다음과 같은 돌연변이 변화이다: D356E, L358M, T366S, L368A, 및 Y407V.

[0115] **6.3.11.도메인 L (가변 영역)**

[0116] 상기 결합 분자에서, 도메인 L은 가변 영역 도메인 아미노산 서열을 갖는다. 가변 영역 도메인 아미노산 서열은, 본 명세서에 기술된 바와 같이, VL 및 VH 항체 도메인 서열을 포함하는 항체의 가변 영역 도메인 아미노산 서열이다. VL 및 VH 서열은 각각 상기 6.3.1. 및 6.3.5. 절에 보다 상세히 기술되어 있다. 바람직한 구현 예에서, 도메인 L은 VH 항체 도메인 서열을 갖는다.

[0117] **6.3.12.도메인 M (불변 영역)**

[0118] 상기 결합 분자에서, 도메인 M은 불변 영역 도메인 아미노산 서열을 갖는다. 불변 영역 도메인 아미노산 서열은 상기 6.3.4. 절에 보다 상세히 기술되어 있다. 바람직한 구현 예에서, 도메인 M은 6.3.4.1. 절에 보다 상세히 기술된 바와 같이, IgG1 아이소타입으로부터의 CH1인 불변 영역 서열을 갖는다.

[0119] **6.3.13.도메인 A 및 F의 페어링**

[0120] 상기 결합 분자에서, 도메인 A VL 아미노산 서열 및 도메인 F VH 아미노산 서열은 결합되어 항원 결합 부위(antigen binding site, ABS)를 형성한다. 상기 A·F 항원 결합 부위(ABS)는 항원의 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다. ABS에 의한 항원 결합은 하기 6.3.13.1. 절에서 보다 상세히 기술된다.

[0121] 다양한 다가의(multivalent) 구현 예에서, 도메인 A 및 F (A·F)에 의해 형성된 상기 ABS는 상기 결합 분자 내의 하나 이상의 다른 ABS와 서열이 동일하고 따라서 상기 결합 분자 내의 하나 이상의 다른 동일-서열의 ABS와 동일한 인식 특이성을 갖는다.

[0122] 다양한 다가의 구현 예에서, 상기 A·F ABS는 상기 결합 분자 내의 하나 이상의 다른 ABS와 서열이 동일하지 않

다. 특정 구현 예에서, 상기 A·F ABS는 상기 결합 분자 내의 하나 이상의 다른 비-동일-서열의 ABS와 상이한 인식 특이성을 갖는다. 특정 구현 예에서, 상기 A·F ABS는 상기 결합 분자 내의 적어도 하나의 다른 비-동일-서열의 ABS에 의해 인식되는 것과 상이한 항원을 인식한다. 특정 구현 예에서, 상기 A·F ABS는 상기 결합 분자 내의 적어도 하나의 다른 비-동일-서열의 ABS에 의해 또한 인식되는 항원의 다른 에피토프를 인식한다. 이들 구현 예에서, 상기 도메인 A 및 F에 의해 형성되는 ABS는 항원의 에피토프를 인식하며, 여기서 상기 결합 분자 내의 하나 이상의 다른 ABS는 동일한 항원을 인식하나 동일한 에피토프를 인식하지 않는다.

[0123] **6.3.13.1.ABS에 의한 항원 결합**

[0125] *ABS, 및 이러한 ABS를 포함하는 결합 분자는, 상기 ABS가 특이적으로 결합하는 에피토프 (또는 보다 일반적으로는, 항원)를 "**인식한다(recognize)**"고 하며, 상기 에피토프 (또는 보다 일반적으로는, 항원)는 상기 ABS의 "**인식 특이성(recognition specificity)**" 또는 "**결합 특이성(binding specificity)**"이라고 한다.

[0126] 상기 ABS는 특이적 친화성으로 그의 특이적 항원 또는 에피토프에 결합한다.

[0127] 본 명세서에 기술된 바와 같이, "**친화성(affinity)**"은 한 분자와 다른 분자 사이의 비-공유 분자간 힘의 상호작용의 강도를 지칭한다. 상기 친화성, 즉, 상기 상호작용의 강도는, 해리 평형 상수($K_D$)로 나타낼 수 있으며, 여기서 $K_D$ 값이 낮을수록 분자간 상호작용이 강함을 의미한다. 항체 구조물의 $K_D$ 값은 바이오-층 간섭계 (예를 들어, 옥텟(Octet)/ FORTEBIO®), 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance, SPR) 기술 (예를 들어, Biacore®), 및 세포 결합 분석을 포함하나, 이에 한정되지는 않는, 당업계에 널리 알려진 방법에 의해 측정된다. 본 명세서에서의 목적을 위해, 친화성은 옥텟(Octet)/ FORTEBIO®을 사용한 바이오-층 간섭계에 의해 측정된 해리 평형 상수이다.

[0128] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "**특이적 결합(specific binding)**"은, ABS 및 그의 동족 항원 또는 에피토프 사이의 친화성을 의미하며, 여기서 $K_D$ 값은 $10^{-6}$M, $10^{-7}$M, $10^{-8}$M, $10^{-9}$M, 또는 $10^{-10}$M 미만이다.

[0129] 본 명세서에 기술된 바와 같은 결합 분자 내의 ABS의 수는 상기 결합 분자의 "**원자가(valency)**"를 정의한다. **도 2**에 개략적으로 도시된 바와 같이, 하나의 ABS를 갖는 결합 분자는 "**1가(monovalent)**"이다. 복수의 ABS를 갖는 결합 분자는 "**다가(multivalent)**"라 불린다. 두 개의 ABS를 갖는 다가 결합 분자는 "**2가(bivalent)**"이다. 세 개의 ABS를 갖는 다가 결합 분자는 "**3가(trivalent)**"이다. 네 개의 ABS를 갖는 다가 결합 분자는 "**4가(tetravalent)**"이다.

[0130] 다양한 다가의 구현 예에서, 모든 복수의 ABS는 동일한 인식 특이성을 갖는다. **도 2**에 개략적으로 도시된 바와 같이, 이러한 결합 분자는 "**단일 특이성(monospecific)**" "다가(multivalent)" 결합 구조물이다. 다른 다가의 구현 예에서, 복수의 ABS의 적어도 2 개는 상이한 인식 특이성을 갖는다. 이러한 결합 분자는 다가 및 "**다중 특이성(multispecific)**"이다. ABS가 총괄하여 2 개의 인식 특이성을 갖는 다가의 구현 예에서, 결합 분자는 "**이중 특이성(bistpecific)**"이다. ABS가 총괄하여 3 개의 인식 특이성을 갖는 다가의 구현 예에서, 결합 분자는 "**삼중 특이성(bistpecific)**"이다.

[0131] ABS가 동일한 항원 상에 존재하는 서로 상이한 에피토프들에 대하여 총괄하여 복수의 인식 특이성을 갖는 다가의 구현 예에서, 결합 분자는 "**다중 파라토픽(multiparatopic)**"이다. ABS가 동일한 항원 상의 2 개의 에피토프를 총괄하여 인식하는 다가의 구현 예는 "**이중 파라토픽(biparatopic)**"이다.

[0132] 다양한 다가의 구현 예에서, 결합 분자의 다가성(multivalency)은 특정 표적에 대한 결합 분자의 결합 활성을 향상시킨다. 본 명세서에 기술된 바와 같이, "**결합 활성(avidity)**"은 둘 이상의 분자, 예를 들어, 특정 표적에 대한 다가 결합 분자 사이의 상호작용의 전체적인 강도를 지칭하며, 여기서 상기 결합 활성은 다중 ABS의 친화성에 의해 제공되는 상호작용의 누적 강도이다. 결합 활성은 상술한 바와 같은, 친화성을 결정하는 데 사용되는 것들과 동일한 방법들에 의해 측정될 수 있다. 특정 구현 예에서, 특정 표적에 대한 결합 분자의 결합 활성은 상호작용이 특이적 결합 상호작용이 되도록 하는 것이며, 여기서 두 분자 사이의 결합 활성은 $10^{-6}$M, $10^{-7}$M, $10^{-8}$M, $10^{-9}$M, 또는 $10^{-10}$M 미만의 $K_D$ 값을 갖는다. 특정 구현 예에서, 특정 표적에 대한 결합 분자의 결합 활성은 상호작용이 특이적 결합 상호작용이 되도록 하는 $K_D$ 값을 가지며, 여기서 개별적인 ABS의 하나 이상의 결합 활성

은 그들의 각각의 항원 또는 에피토프를 그 자체 상에 특이적으로 결합시킬 수 있는 $K_D$ 값을 갖지 않는다. 특정 구현 예에서, 상기 결합 활성은 공유된 특정 표적 또는 복합체(complex) 상의 개별 항원, 예컨대 개개의 세포에서 발견된 개별 항원에 대한 복수의 ABS의 친화성에 의해 제공되는 상호작용의 누적 강도이다. 특정 구현 예에서, 상기 결합 활성은 공유된 개개의 항원 상의 개별 에피토프에 대한 복수의 ABS의 친화성에 의해 제공되는 상호작용의 누적 강도이다.

[0133] **6.3.14.도메인 B 및 G의 페어링**

[0134] 본 명세서에 기술된 결합 분자에서, 도메인 B CH3 아미노산 서열 및 도메인 G CH3 아미노산 서열이 결합된다. CH3 서열은 상기 6.3.2. 절에 보다 상세히 기술되어 있다.

[0135] 다양한 구현 예에서, 상기 B 및 G 도메인의 아미노산 서열은 동일하다. 이들의 특정 구현 예에서, 상기 서열은 내인성 CH3 서열이다.

[0136] 다양한 구현 예에서, 상기 B 및 G 도메인의 아미노산 서열은 상이하며, 내인성 CH3 서열 내에서 각각 직교 변형을 개별적으로 포함하고, 여기서 상기 B 도메인은 G 도메인과 상호작용 하며, 상기 B 도메인 및 G 도메인 모두 직교 변형이 없는 CH3 도메인과 유의하게 상호작용하지 않는다.

[0137] 본 명세서에 기술된 "**직교 변형(orthogonal modifications)**" 또는 동의어로 "**직교 돌연변이(orthogonal mutations)**"는 직교 변형을 갖는 제1 도메인의 상보적인 직교 변형을 갖는 제2 도메인에 대한 결합의 친화성을 증가시키는 항체 도메인의 아미노산 서열 내의 하나 이상의 조작된 돌연변이이다. 특정 구현 예에서, 상기 직교 변형은 상기 직교 변형을 갖는 도메인의 상보적인 직교 변형이 없는 도메인에 대한 친화성을 감소시킨다. 특정 구현 예에서, 직교 변형은 내인성 항체 도메인 서열 내의 돌연변이이다. 다양한 구현 예에서, 직교 변형은 아미노산 첨가 또는 결실을 포함하지만, 이에 한정되지 않는, 내인성 항체 도메인 서열의 N-말단 또는 C-말단의 변형이다. 특정 구현 예에서, 직교 변형은, 하기 6.3.14.1-6.3.14.3. 절에 상세히 기술된 바와 같이, 조작된 이황화 결합, 노브-인-홀 돌연변이, 및 전하-쌍 돌연변이를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 특정 구현 예에서, 직교 변형은 조작된 이황화 결합, 노브-인-홀 돌연변이, 및 전하-쌍 돌연변이로부터 선택되나, 이에 한정되지는 않는, 직교 변형의 조합을 포함한다. 특정 구현 예에서, 상기 직교 변형은 상기 6.3.2. 절에 상세히 기술된 바와 같이, 동종동질이형체 돌연변이와 같은, 면역원성을 감소시키는 아미노산 치환과 조합될 수 있다.

[0138] **6.3.14.1.직교 조작된 이황화 결합**

[0139] 다양한 구현 예에서, 상기 직교 변형은 제1 및 제2 도메인 사이에 조작된 이황화 결합을 생성시키는 돌연변이를 포함한다. 본 명세서에 기술된 바와 같이, "**조작된 이황화 결합(engineered disulfide bridges)**"은 둘 이상의 도메인이 결합 할 때 상기 둘 이상의 도메인 내에서 비-내인성 시스테인 아미노산을 제공하여 비-천연 이황화 결합을 형성하는 돌연변이이다. 조작된 이황화 결합은, 본 명세서에 그가 교시하는 모든 내용이 참조로서 포함되는, Merchant *et al.* (*Nature Biotech* (1998) 16:677-681)에 보다 상세히 기술되어 있다. 특정 구현 예에서, 조작된 이황화 결합은 특정 도메인 사이의 직교 결합을 향상시킨다. 특정 구현 예에서, 상기 조작된 이황화 결합을 생성시키는 돌연변이는 제1 또는 제2 CH3 도메인 중 하나에서의 K392C 돌연변이, 및 다른 하나의 CH3 도메인에서의 D399C이다. 바람직한 구현 예에서, 상기 조작된 이황화 결합을 생성시키는 돌연변이는 제1 또는 제2 CH3 도메인 중 하나에서의 S354C 돌연변이, 및 다른 하나의 CH3 도메인에서의 Y349C이다. 또 다른 바람직한 구현 예에서, 상기 조작된 이황화 결합을 생성시키는 돌연변이는 KSC 트리펩티드 서열을 포함하는 CH3 도메인의 C-말단의 연장에 의해 제공되는 제1 및 제2 CH3 도메인 둘 다에서의 447C 돌연변이이다.

[0140] **6.3.14.2.직교 노브-홀(Knob-Hole) 돌연변이**

[0141] 다양한 구현 예에서, 직교 변형은 노브-홀(동의어로, 노브-인-홀) 돌연변이를 포함한다. 본 명세서에 기술된 바와 같이, 노브-홀 돌연변이는 제1 도메인의 표면의 입체적 특성을 변화시켜 상기 제1 도메인이 상보적인 입체적 돌연변이가 없는 도메인과의 결합에 비해 상보적인 입체적 돌연변이를 갖는 제2 도메인과 우선적으로 결합하도록 하는 돌연변이이다. 노브-홀 돌연변이는, 미국 특허 제5,821,333호 및 미국 특허 제8,216,805호에 보다 상세히 기술되어 있으며, 이들 각각은 전체적으로 본 명세서에 통합된다. 다양한 구현 예에서, 노브-홀 돌연변이는, 본 명세서에 전체로서 참조로 포함되는 Merchant *et al.* (*Nature Biotech* (1998) 16:677-681))에 보다 상세히 기술된 바와 같이, 조작된 이황화 결합과 조합된다. 다양한 구현 예에서, 노브-홀 돌연변이, 동종동질이형체 돌연변이, 및 조작된 이황화 돌연변이가 조합된다.

[0142] 특정 구현 예에서, 상기 노브-인-홀 돌연변이는 제1 도메인에서의 T366Y 돌연변이, 및 제2 도메인에서의 Y407T

돌연변이이다. 특정 구현 예에서, 상기 노브-인-홀 돌연변이는 제1 도메인에서의 F405A, 및 제2 도메인에서의 T394W이다. 특정 구현 예에서, 상기 노브-인-홀 돌연변이는 제1 도메인에서의 T366Y 돌연변이 및 F405A, 및 제2 도메인에서의 T394W 및 Y407T이다. 특정 구현 예에서, 상기 노브-인-홀 돌연변이는 제1 도메인에서의 T366W 돌연변이, 및 제2 도메인에서의 Y407A이다. 특정 구현 예에서, 상기 조합된 노브-인-홀 돌연변이 및 조작된 이황화 돌연변이는 제1 도메인에서의 S354C 및 T366W 돌연변이, 및 제2 도메인에서의 Y349C, T366S, L368A, 및 Y407V 돌연변이이다. 바람직한 구현 예에서, 상기 조합된 노브-인-홀 돌연변이, 동종동질이형체 돌연변이, 및 조작된 이황화 돌연변이는 제1 도메인에서의 S354C 및 T366W 돌연변이, 및 제2 도메인에서의 Y349C, D356E, L358M, T366S, L368A, 및 Y407V 돌연변이이다.

[0143] **6.3.14.3.직교 전하-쌍 돌연변이**

[0144] 다양한 구현 예에서, 직교 변형은 전하-쌍 돌연변이이다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 전하-쌍 돌연변이는 도메인의 표면 내의 아미노산의 전하에 영향을 미쳐서 상기 도메인이 상보적인 전하-쌍 돌연변이가 없는 도메인과의 결합에 비해 상보적인 전하-쌍 돌연변이를 갖는 제2 도메인과 우선적으로 결합하도록 하는 돌연변이이다. 특정 구현 예에서, 전하-쌍 돌연변이는 특정 도메인 사이의 직교 결합을 향상시킨다. 전하-쌍 돌연변이는 미국 특허 제8,592,562호, 미국 특허 제9,248,182호, 및 미국 특허 제9,358,286호에 보다 상세히 기술되어 있으며, 이들 각각은 모든 교시 내용이 참조로서 본 명세서에 포함된다. 특정 구현 예에서, 전하-쌍 돌연변이는 특정 도메인 사이의 안정성을 향상시킨다. 바람직한 구현 예에서, 상기 전하-쌍 돌연변이는 제1 도메인에서의 T366K 돌연변이, 및 다른 도메인에서의 L351D 돌연변이이다.

[0145] **6.3.15.도메인 E 및 K의 페어링**

[0146] 다양한 구현 예에서, 상기 E 도메인은 CH3 아미노산 서열을 갖는다.

[0147] 다양한 구현 예에서, 상기 K 도메인은 CH3 아미노산 서열을 갖는다.

[0148] 다양한 구현 예에서, 상기 E 및 K 도메인의 아미노산 서열은 동일하고, 여기서 상기 서열은 내인성 CH3 서열이다.

[0149] 다양한 구현 예에서, 상기 E 및 K 도메인의 서열은 상이하다. 다양한 구현 예에서, 상기 상이한 서열은 내인성 CH3 서열 내에서 각각 직교 변형을 개별적으로 포함하고, 여기서 상기 E 도메인은 K 도메인과 상호작용하며, 상기 E 도메인 및 K 도메인 모두 직교 변형이 없는 CH3 도메인과 유의하게 상호작용하지 않는다. 특정 구현 예에서, 상기 직교 변형은, 상기 6.3.14.1-6.3.14.3. 절에서 상세히 기술된 바와 같이, 조작된 이황화 결합, 노브-인-홀 돌연변이, 및 전하-쌍 돌르연변이를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 특정 구현 예에서, 직교 변형은, 조작된 이황화 결합, 노브-인-홀 돌연변이, 및 전하-쌍 돌연변이로부터 선택되나, 이에 한정되지는 않는, 직교 변형의 조합을 포함한다. 특정 구현 예에서, 상기 직교 변형은 동종동질이형체 돌연변이와 같은, 면역원성을 감소시키는 아미노산 치환과 조합될 수 있다.

[0150] 다양한 구현 예에서, 상기 E 도메인 및 K 도메인의 아미노산 서열은, 제1 및 제3 폴리펩티드 사이의 특이적인 결합을 촉진시키는 특이적 상호작용을 갖도록 선택되는 두 개의 상이한 항체 도메인의 내인성 서열이다. 다양한 구현 예에서, 상기 두 개의 상이한 아미노산 서열은 CH1 서열 및 CL 서열이다. CH1 서열 및 CL 서열은 상기 6.3.4.1. 및 6.3.4.2. 절에 각각 상세히 기술되어 있다. 특이적 중쇄 결합을 촉진시키기 위한 중쇄의 C-말단에서의 CH1 및 CL 서열의 사용은 그의 모든 교시 내용이 참조로서 본 명세서에 통합되는, 미국 특허 제5,242,247호에 기술되어 있다. 특정 구현 예에서, 상기 CH1 서열 및 CL 서열은 모두 내인성 서열이다. 특정 구현 예에서, 상기 CH1 서열 및 CL 서열은 내인성 CH1 및 CL 서열 내에서 각각 직교 변형을 개별적으로 포함한다. 특정 구현 예에서, 상기 내인성 CH1 및 CL 서열 내의 직교 변형은 상기 CH1 서열의 위치 138 및 상기 CL 서열의 위치 116, 상기 CH1 서열의 위치 128 및 상기 CL 서열의 위치 119, 또는 상기 CH1 서열의 위치 129 및 상기 CL 서열의 위치 210 에서 조작된 시스테인으로부터 선택되는 조작된 이황화 결합이며, 이는 미국 특허 제8,053,562호 및 미국 특허 제9,527,927호에서 보다 상세히 넘버링되고 논의된 바와 같고, 이들은 전체로서 본 명세서에 참조로 포함된다. 바람직한 구현 예에서, 상기 조작된 시스테인은 상기 Eu 지수에 의해 넘버링된 바와 같이, 상기 CH1 서열의 위치 128 및 상기 CL 카파 서열의 위치 118에 존재한다.

[0151] **6.3.16.도메인 I 및 M의 페어링 및 도메인 H 및 L의 페어링**

[0152] 다양한 구현 예에서, 도메인 I는 CL 서열을 갖고 도메인 M은 CH1 서열을 갖는다. 다양한 구현 예에서, 도메인 H는 VL 서열을 갖고 도메인 L은 VH 서열을 갖는다. 바람직한 구현 예에서, 도메인 H는 VL 아미노산 서열을 갖고, 도메인 I는 CL 아미노산 서열을 가지며, 도메인 L은 VH 아미노산 서열을 갖고, 도메인 M은 CH1 아미노산 서열을

갖는다. 또 다른 바람직한 구현 예에서, 도메인 H는 VL 아미노산 서열을 갖고, 도메인 I는 CL 아미노산 서열을 가지며, 도메인 L은 VH 아미노산 서열을 갖고, 도메인 M은 CH1 아미노산 서열을 가지며, 도메인 K는 CH3 아미노산 서열을 갖는다.

[0153] 다양한 구현 예에서, 상기 I 도메인 및 M 도메인의 아미노산 서열은 내인성 서열 내에서 각각 직교 변형을 개별적으로 포함하고, 여기서 상기 I 도메인은 상기 M 도메인과 상호작용하고, 상기 I 도메인 및 M 도메인 모두 직교 변형이 없는 도메인과 유의적으로 상호작용하지 않는다. 일련의 구현 예에서, 상기 I 도메인 내의 직교 변형은 CL 서열 내에 존재하며 상기 M 도메인 내의 직교 변형은 CH1 서열 내에 존재한다. 직교 변형은 상기 6.3.14.1-6.3.14.3. 절에 상세히 기술되어 있다. 다양한 구현 예에서, 상기 CL 서열 및 CH1 서열 내의 직교 변형은 전하-쌍 돌연변이이다. 특정 구현 예에서, 상기 전하-쌍 돌연변이는 상기 CH1 서열 내에 상응하는 A141L을 갖는 상기 CL 서열 내의 F118S, F118A 또는 F118V 돌연변이, 또는 상기 CH1 서열 내에 상응하는 K147D를 갖는 상기 CL 서열 내의 T129R 돌연변이이고, 이는 Eu 지수에 의해 넘버링되고 본 명세서에 그의 모든 교시 내용이 참조로 포함되는 Bonisch *et al.* (*Protein Engineering, Design & Selection*, 2017, pp. 1-12)에 보다 상세히 기술된 바와 같다. 일련의 바람직한 구현 예에서, 상기 전하-쌍 돌연변이는 상기 CH1 서열 내에 상응하는 G166D를 갖는 상기 CL 서열 내의 N138K 돌연변이, 또는 상기 CH1 서열 내에 상응하는 G166K를 갖는 상기 CL 서열 내의 N138D 돌연변이이며, 이는 Eu 지수에 의해 넘버링된 바와 같다.

[0154] 다양한 구현 예에서, 상기 CL 서열 및 CH1 서열 내의 직교 돌연변이는 조작된 이황화 결합을 생성한다. 일련의 바람직한 구현 예에서, 비-내인성 시스테인 아미노산을 제공하는 돌연변이는 상기 CH1 서열 내에 상응하는 A141C를 갖는 상기 CL 서열 내의 F118C 돌연변이, 또는 상기 CH1 서열 내에 상응하는 L128C를 갖는 상기 CL 서열 내의 F118C 돌연변이, 또는 상기 CH1 서열 내에 상응하는 P171C 돌연변이를 갖는 상기 CL 서열 내의 S162C 돌연변이이며, 이는 Eu 지수에 의해 넘버링된 바와 같다.

[0155] 다양한 구현 예에서, 상기 H 도메인 및 L 도메인의 아미노산 서열은 내인성 서열 내에서 각각 직교 변형을 개별적으로 포함하고, 여기서 상기 H 도메인은 상기 L 도메인과 상호작용하며, 상기 H 도메인 및 L 도메인 모두 직교 변형이 없는 도메인과 유의적으로 상호작용하지 않는다. 일련의 구현 예에서, 상기 H 도메인 내의 직교 돌연변이는 VL 서열 내에 존재하며 상기 L 도메인 내의 직교 돌연변이는 VH 서열 내에 존재한다. 특정 구현 예에서, 상기 직교 돌연변이는 VH/VL 인터페이스 상의 전하-쌍 돌연변이이다. 바람직한 구현 예에서, 상기 VH/VL 인터페이스 상의 전하-쌍 돌연변이는 VL 내에 상응하는 Q38K를 갖는 VH 내의 Q39E, 또는 VL 내에 상응하는 Q38E를 갖는 VH 내의 Q39K이며, 이는 본 명세서에 그의 모든 교시 내용이 참조로 포함되는, Igawa *et al.* (*Protein Eng. Des. Sel.*, 2010, vol. 23, 667-677)에 보다 상세히 기술된 바와 같다.

[0156] 특정 구현 예에서, 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 제2 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성한다. 특정 구현 예에서, 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 상기 제1 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성한다.

[0157] **6.3.17.3가 결합 분자**

[0158] 또 다른 일련의 구현 예에서, 상기 결합 분자는 3 개의 항원 결합 부위를 가지며, 따라서, "**3가(trivalent)**"라고 칭한다.

[0159] **도 21**을 참조하면, 다양한 3가의 구현 예에서 상기 결합 분자는 제5 폴리펩티드 사슬을 더 포함하며, 여기서 (a) 제1 폴리펩티드 사슬은 도메인 N 및 도메인 O를 더 포함하고, 상기 도메인들은 N-O-A-B-D-E 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 N은 VL 아미노산 서열을 갖고, 도메인 O는 CH3 아미노산 서열을 가지며; (b) 상기 결합 분자는 도메인 P 및 도메인 Q를 포함하는 제5 폴리펩티드 사슬을 더 포함하고, 상기 도메인들은 P-Q 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 P는 VH 아미노산 서열을 갖고 도메인 Q는 CH3 아미노산 서열을 가지며; 및 (c) 상기 제1 및 제5 폴리펩티드는 상기 결합 분자를 형성하기 위하여 상기 N 및 P 도메인 사이의 상호작용 및 상기 O 및 Q 도메인 사이의 상호작용을 통하여 결합된다. **도 2**에 개략적으로 도시된 바와 같이, 이들 3가의 구현 예들을 "2x1" 3가 구조물이라 칭한다.

[0160] **도 26**을 참조하면, 추가적인 일련의 3가의 구현 예에서, 상기 결합 분자는 제6 폴리펩티드 사슬을 더 포함하며, 여기서 (a) 상기 제3 폴리펩티드 사슬은 도메인 R 및 도메인 S를 더 포함하며, 상기 도메인들은 R-S-H-I-J-K 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 R은 VL 아미노산 서열을 갖고 도메인 S는 불변 도메인 아미노

산 서열을 가지며; (b) 상기 결합 분자는 도메인 T 및 도메인 U를 포함하는 제6 폴리펩티드 사슬을 더 포함하며, 상기 도메인들은 T-U 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 T는 VH 아미노산 서열을 갖고 도메인 U는 불변 도메인 아미노산 서열을 가지며; 및 (c) 상기 제3 및 제6 폴리펩티드는 상기 결합 분자를 형성하기 위하여 상기 R 및 T 도메인 사이의 상호작용 및 상기 S 및 U 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합된다. 도 2에 개략적으로 도시된 바와 같이, 이들 3가의 구현 예들을 "1x2" 3가 구조물이라 칭한다.

[0161] 다양한 구현 예에서, 상기 도메인 O는 펩티드 링커를 통해 도메인 A에 연결된다. 다양한 구현 예에서, 상기 도메인 S는 펩티드 링커를 통해 도메인 H에 연결된다. 바람직한 구현 예에서, 도메인 O를 도메인 A로 연결하거나 도메인 S를 도메인 H로 연결하는 상기 펩티드 링커는 6 아미노산 GSGSGS 펩티드 서열이며, 이는 6.3.19.6. 절에서 보다 상세히 기술된다.

[0162] **6.3.17.1.3가 2x1 이중 특이성 구조물 [2(A-A)x1(B)]**

[0163] **도 21**을 참조하면, 다양한 구현 예에서, 상기 도메인 N 및 도메인 A의 아미노산 서열은 동일하며, 상기 도메인 H의 아미노산 서열은 도메인 N 및 A와 상이하고, 상기 도메인 O 및 도메인 B의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 I의 아미노산 서열은 도메인 O 및 B와 상이하며, 상기 도메인 P 및 도메인 F의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 L의 아미노산 서열은 도메인 P 및 F와 상이하며, 상기 도메인 Q 및 도메인 G의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 M의 아미노산 서열은 도메인 Q 및 G와 상이하며; 및 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 제2 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성하며, 상기 도메인 N 및 도메인 P는 상기 제1 항원에 특이적인 제3 항원 결합 부위를 형성한다.

[0164] **6.3.17.2.3가 2x1 이중 특이성 구조물 [2(A-B)x1(A)]**

[0166] *__도 21__을 참조하면, 다양한 구현 예에서, 상기 도메인 N 및 도메인 H의 아미노산 서열은 동일하며, 상기 도메인 A의 아미노산 서열은 도메인 N 및 H와 상이하고, 상기 도메인 O 및 도메인 I의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 B의 아미노산 서열은 도메인 O 및 I와 상이하며, 상기 도메인 P 및 도메인 L의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 F의 아미노산 서열은 도메인 P 및 L과 상이하며, 상기 도메인 Q 및 도메인 M의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 G의 아미노산 서열은 도메인 Q 및 M과 상이하며; 및 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 제2 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성하며, 상기 도메인 N 및 도메인 P는 상기 제2 항원에 특이적인 제3 항원 결합 부위를 형성한다.

[0167] **6.3.17.3.3가 2x1 삼중 특이성 구조물 [2(A-B)x1(C)]**

[0169] *__도 21__을 참조하면, 다양한 구현 예에서, 상기 도메인 N, 도메인 A, 및 도메인 H의 아미노산 서열은 상이하고, 상기 도메인 O, 도메인 B, 및 도메인 I의 아미노산 서열은 상이하며, 상기 도메인 P, 도메인 F, 및 도메인 L의 아미노산 서열은 상이하고, 상기 도메인 Q, 도메인 G, 및 도메인 M의 아미노산 서열은 상이하며; 및 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 제2 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성하며, 상기 도메인 N 및 도메인 P는 제3 항원에 특이적인 제3 항원 결합 부위를 형성한다.

[0170] 특정 구현 예에서, 6.3.4.1. 및 6.3.4.2. 절에서 보다 상세히 기술된 바와 같이, 도메인 O는 카파 경쇄로부터의 CL인 불변 영역 서열을 가지며 도메인 Q는 IgG1 아이소타입으로부터의 CH1인 불변 영역 서열을 갖는다. 바람직한 구현 예에서, 상기 6.3.14. 절에서 상세히 기술된 바와 같이, 도메인 O 및 도메인 Q는 CH3 서열을 가져 서로 특이적으로 결합한다.

[0171] **6.3.17.4.3가 2x1 단일 특이성 구조물**

[0172] **도 21**을 참조하면, 다양한 구현 예에서, 상기 도메인 N, 도메인 A, 및 도메인 H의 아미노산 서열은 동일하며, 상기 도메인 O 및 도메인 B의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 P, 도메인 F, 및 도메인 L의 아미노산 서열은 동일하며, 상기 도메인 Q 및 도메인 G의 아미노산 서열은 동일하고; 및 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 상기 제1 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성하며, 상기 도메인 N 및 도메인 P는 상기 제1 항원에

특이적인 제3 항원 결합 부위를 형성한다.

[0173] **도 21**을 참조하면, 또 다른 일련의 구현 예에서, 상기 도메인 N, 도메인 A, 및 도메인 H의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 O, 도메인 B, 및 도메인 I의 아미노산 서열은 동일하며, 상기 도메인 P, 도메인 F, 및 도메인 L의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 Q, 도메인 G, 및 도메인 M의 아미노산 서열은 동일하며; 및 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 상기 제1 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성하며, 상기 도메인 N 및 도메인 P는 상기 제1 항원에 특이적인 제3 항원 결합 부위를 형성한다.

[0174] **6.3.17.5.3가 1x2 이중 특이성 구조물 [1(A)x2(B-A)]**

[0175] **도 26**을 참조하면, 다양한 구현 예에서, 상기 도메인 R 및 도메인 A의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 H의 아미노산 서열은 도메인 R 및 A와 상이하며, 상기 도메인 S 및 도메인 B의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 I의 아미노산 서열은 도메인 S 및 B와 상이하며, 상기 도메인 T 및 도메인 F의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 L의 아미노산 서열은 도메인 T 및 F와 상이하며, 상기 도메인 U 및 도메인 G의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 M의 아미노산 서열은 도메인 U 및 G와 상이하며 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 제2 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성하며, 상기 도메인 R 및 도메인 T는 상기 제1 항원에 특이적인 제3 항원 결합 부위를 형성한다.

[0176] **6.3.17.6.3가 1x2 이중 특이성 구조물 [1(A)x2(B-B)]**

[0177] **도 26**을 참조하면, 다양한 구현 예에서, 상기 도메인 R 및 도메인 H의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 A의 아미노산 서열은 도메인 R 및 H와 상이하며, 상기 도메인 S 및 도메인 I의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 B의 아미노산 서열은 도메인 S 및 I와 상이하며, 상기 도메인 T 및 도메인 L의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 F의 아미노산 서열은 도메인 T 및 L와 상이하며, 상기 도메인 U 및 도메인 M의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 G의 아미노산 서열은 도메인 U 및 M와 상이하며 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 제2 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성하며, 상기 도메인 R 및 도메인 T는 상기 제2 항원에 특이적인 제3 항원 결합 부위를 형성한다.

[0178] **6.3.17.7.3가 1x2 삼중 특이성 구조물 [1(A)x2(B-C)]**

[0179] **도 26**을 참조하면, 다양한 구현 예에서, 상기 도메인 R, 도메인 A, 및 도메인 H의 아미노산 서열은 상이하고, 상기 도메인 S, 도메인 B, 및 도메인 I의 아미노산 서열은 상이하며, 상기 도메인 T, 도메인 F, 및 도메인 L의 아미노산 서열은 상이하고, 상기 도메인 U, 도메인 G, 및 도메인 M의 아미노산 서열은 상이하며; 및 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 제2 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성하며, 상기 도메인 R 및 도메인 T는 제3 항원에 특이적인 제3 항원 결합 부위를 형성한다.

[0180] 특정 구현 예에서, 6.3.4.1. 및 6.3.4.2. 절에서 상세히 기술된 바와 같이, 도메인 S는 카파 경쇄로부터의 CL인 불변 영역 서열을 가지며 도메인 U는 IgG1 아이소타입으로부터의 CH1인 불변 영역 서열을 갖는다. 바람직한 구현 예에서, 상기 6.3.14. 절에서 상세히 기술된 바와 같이, 도메인 S 및 도메인 U는 CH3 서열을 가져 서로 특이적으로 결합한다.

[0181] **6.3.17.8.3가 1x2 단일 특이성 구조물**

[0182] **도 26**을 참조하면, 다양한 구현 예에서, 상기 도메인 R, 도메인 A, 및 도메인 H의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 S 및 도메인 B의 아미노산 서열은 동일하며, 상기 도메인 T, 도메인 F, 및 도메인 L의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 U 및 도메인 G의 아미노산 서열은 동일하며; 및 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 상기 제1 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성하며, 상기 도메인 R 및 도메인 T는 상기 제1 항원에 특이적인 제3 항원 결합 부위를 형성한다.

[0183] **6.3.18.4가 2x2 결합 분자**

[0185] *다양한 구현 예에서, 상기 결합 분자는 4 개의 항원 결합 부위를 가지며 따라서 “**4가(tetravalent)**”라고 칭한다.

[0186] **도 34**를 참조하면, 추가적인 일련의 구현 예에서, 상기 결합 분자는 제5 및 제6 폴리펩티드 사슬을 더 포함하고, 여기서 (a) 상기 제1 폴리펩티드 사슬은 도메인 N 및 도메인 O를 더 포함하며, 상기 도메인들은, N-O-A-B-D-E 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되고; (b) 상기 제3 폴리펩티드 사슬은 도메인 R 및 도메인 S를 더 포함하며, 상기 도메인들은, R-S-H-I-J-K 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되고; (c) 상기 결합 분자는 제5 및 제6 폴리펩티드 사슬을 더 포함하고, 상기 제5 폴리펩티드 사슬은 도메인 P 및 도메인 Q를 포함하며, 상기 도메인들은 P-Q 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되고, 상기 제6 폴리펩티드 사슬은 도메인 T 및 도메인 U를 포함하며, 상기 도메인들은, T-U 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며; 및 (d) 상기 제1 및 제5 폴리펩티드는 상기 N 및 P 도메인 사이의 상호작용 및 상기 O 및 Q 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되고, 상기 제3 및 제6 폴리펩티드는 상기 결합 분자를 형성하기 위하여 상기 R 및 T 도메인 사이의 상호작용 및 상기 S 및 U 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합된다.

[0187] 다양한 구현 예에서, 상기 도메인 O는 펩티드 링커를 통해 도메인 A와 연결되고 상기 도메인 S는 펩티드 링커를 통해 도메인 H와 연결된다. 바람직한 구현 예에서, 도메인 O를 도메인 A와 연결시키거나 도메인 S를 도메인 H와 연결시키는 상기 펩티드 링커는 6 아미노산 GSGSGS 펩티드 서열이며, 이는 6.3.19.6. 절에서 보다 상세히 기술된다.

[0188] **6.3.18.1.4가 2x2 이중 특이성 구조물**

[0189] **도 34**를 참조하면, 일련의 4가 2x2 이중 특이성 결합 분자에서, 상기 도메인 N 및 도메인 A의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 H 및 도메인 R의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 O 및 도메인 B의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 I 및 도메인 S의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 P 및 도메인 F의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 L 및 도메인 T의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 Q 및 도메인 G의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 M 및 도메인 U의 아미노산 서열은 동일하고; 및 여기서 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 도메인 N 및 도메인 P는 상기 제1 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성하며, 상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 제2 항원에 특이적인 제3 항원 결합 부위를 형성하며, 상기 R 도메인 및 T 도메인 사이의 상호작용은 상기 제2 항원에 특이적인 제4 항원 결합 부위를 형성한다.

[0190] **도 34**를 참조하면, 또 다른 일련의 4가 2x2 이중 특이성 결합 분자에서, 상기 도메인 H 및 도메인 A의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 N 및 도메인 R의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 I 및 도메인 B의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 O 및 도메인 S의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 L 및 도메인 F의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 P 및 도메인 T의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 M 및 도메인 G의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 Q 및 도메인 U의 아미노산 서열은 동일하고; 및 여기서 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 도메인 N 및 도메인 P는 제2 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성하며, 상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 상기 제1 항원에 특이적인 제3 항원 결합 부위를 형성하며, 상기 R 도메인 및 T 도메인 사이의 상호작용은 상기 제2 항원에 특이적인 제4 항원 결합 부위를 형성한다.

[0191] **6.3.18.2.4가 2x2 단일 특이성 구조물**

[0192] **도 34**를 참조하면, 다양한 구현 예에서, 상기 도메인 N, 도메인 A, 도메인 H 및 도메인 R의 아미노산 서열은 동일하며, 상기 도메인 O 및 도메인 B의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 I 및 도메인 S의 아미노산 서열은 동일하며, 상기 도메인 P, 도메인 F, 도메인 L, 및 도메인 T의 아미노산 서열은 동일하고, 도메인 Q 및 도메인 G의 아미노산 서열은 동일하며, 도메인 M 및 도메인 U의 아미노산 서열은 동일하고; 및 여기서 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 도메인 N 및 도메인 P는 상기 제1 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성하며, 상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 상기 제1 항원에 특이적인 제3 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 R 도메인 및 T 도메인 사이의 상호작용은 상기 제1 항원에 특이적인 제4 항원 결합 부위를 형성한다.

[0193] **도 34**를 참조하면, 또 다른 일련의 4가 2x2 단일 특이성 구현 예에서, 상기 도메인 N, 도메인 A, 도메인 H 및 도메인 R의 아미노산 서열은 동일하며, 상기 도메인 I 및 도메인 B의 아미노산 서열은 동일하고, 상기 도메인 O 및 도메인 S의 아미노산 서열은 동일하며, 상기 도메인 P, 도메인 F, 도메인 L, 및 도메인 T의 아미노산 서열은

동일하고, 상기 도메인 M 및 도메인 G의 아미노산 서열은 동일하며, 상기 도메인 Q 및 도메인 U의 아미노산 서열은 동일하고; 및 여기서 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 도메인 N 및 도메인 P는 상기 제1 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성하며, 상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 상기 제1 항원에 특이적인 제3 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 R 도메인 및 T 도메인 사이의 상호작용은 상기 제1 항원에 특이적인 제4 항원 결합 부위를 형성한다.

[0194] **6.3.19.도메인 접합부(Junctions)**

[0195] **6.3.19.1.VL 및 CH3 도메인 연결 접합부**

[0196] 다양한 구현 예에서, VL 도메인의 C-말단 및 CH3 도메인의 N-말단 사이의 접합부를 형성하는 아미노산 서열은 조작된 서열이다. 특정 구현 예에서, 하나 이상의 아미노산이 상기 VL 도메인의 C-말단에서 결실되거나 부가된다. 특정 구현 예에서, 상기 VL 도메인의 C-말단 및 상기 CH3 도메인의 N-말단을 연결하는 접합부는 하기 6.12.6. 절의 표 2에 기재된 서열 중 하나이다. 특정 구현 예에서, A111은 상기 VL 도메인의 C-말단에서 결실된다. 특정 구현 예에서, 하나 이상의 아미노산이 상기 CH3 도메인의 N-말단에서 결실되거나 부가된다. 특정 구현 예에서, P343은 상기 CH3 도메인의 N-말단에서 결실된다. 특정 구현 예에서, P343 및 R344는 상기 CH3 도메인의 N-말단에서 결실된다. 특정 구현 예에서, 하나 이상의 아미노산이 상기 VL 도메인의 C-말단 및 상기 CH3 도메인의 N-말단 모두에서 결실되거나 부가된다. 특정 구현 예에서, A111은 상기 VL 도메인의 C-말단에서 결실되고 P343은 상기 CH3 도메인의 N-말단에서 결실된다. 바람직한 구현 예에서, A111 및 V110은 상기 VL 도메인의 C-말단에서 결실된다. 또 다른 바람직한 구현 예에서, A111 및 V110은 상기 VL 도메인의 C-말단에서 결실되고 상기 CH3 도메인의 N-말단은 P343V 돌연변이를 갖는다.

[0197] **6.3.19.2.VH 및 CH3 도메인 연결 접합부**

[0198] 다양한 구현 예에서, VH 도메인의 C-말단 및 CH3 도메인의 N-말단 사이의 접합부를 형성하는 아미노산 서열은 조작된 서열이다. 특정 구현 예에서, 하나 이상의 아미노산이 상기 VH 도메인의 C-말단에서 결실되거나 부가된다. 특정 구현 예에서, 상기 VH 도메인의 C-말단 및 상기 CH3 도메인의 N-말단을 연결하는 접합부는 하기 6.12.6. 절의 표 3에 기재된 서열 중 하나이다. 특정 구현 예에서, K177 및 G118은 상기 VH 도메인의 C-말단에서 결실된다. 특정 구현 예에서, 하나 이상의 아미노산이 상기 CH3 도메인의 N-말단에서 결실되거나 부가된다. 특정 구현 예에서, P343은 상기 CH3 도메인의 N-말단에서 결실된다. 특정 구현 예에서, P343 및 R343은 상기 CH3 도메인의 N-말단에서 결실된다. 특정 구현 예에서, P343, R344, 및 E345는 상기 CH3 도메인의 N-말단에서 결실된다. 특정 구현 예에서, 하나 이상의 아미노산은 상기 VH 도메인의 C-말단 및 상기 CH3 도메인의 N-말단 모두에서 결실되거나 부가된다. 바람직한 구현 예에서, T166, K177, 및 G118은 상기 VH 도메인의 C-말단에서 결실된다.

[0199] **6.3.19.3.CH3 C-말단 및 CH2 N-말단 (힌지) 연결 접합부**

[0200] 본 명세서에 기술된 결합 분자에서, 상기 CH2 도메인의 N-말단은 “**힌지(hinge)**” 영역 아미노산 서열을 갖는다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 힌지 영역은 항체의 N-말단 가변 도메인-불변 도메인 분절 및 항체의 CH2 도메인을 연결하는 항체 중쇄의 서열이다. 또한, 상기 힌지 영역은 일반적으로 상기 N-말단 가변 도메인-불변 도메인 분절 및 CH2 도메인 사이의 유연성(flexibility)뿐만 아니라, 중쇄들 (예를 들어, 제1 및 제3 폴리펩티드 사슬) 사이의 이황화 결합을 형성하는 아미노산 서열 모티프(motifs) 둘 다를 제공한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 상기 힌지 영역 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 56이다.

[0201] 다양한 구현 예에서, CH3 아미노산 서열은 상기 CH3 도메인의 C-말단 및 CH2 도메인의 N-말단 사이의 접합부 상의 C-말단에서 연장된다. 특정 구현 예에서, CH3 아미노산 서열은 상기 CH3 도메인의 C-말단 및 힌지 영역 사이의 접합부 상의 C-말단에서 연장되며, 그 다음으로 CH2 도메인의 N-말단에 연결된다. 바람직한 구현 예에서, 상기 CH3 아미노산 서열은 IgG1 힌지 영역의 DKTHT 모티프가 뒤따르는 PGK 트리펩티드 서열을 삽입함으로써 연장된다.

[0202] 특정 구현 예에서, 상기 CH3 도메인의 C-말단에서의 연장은 또 다른 CH3 도메인의 직교 C-말단 연장과 함께 이황화 결합을 형성할 수 있는 아미노산 서열을 포함한다. 바람직한 구현 예에서, 상기 CH3 도메인의 C-말단에서의 연장은 카파 경쇄의 GEC 모티프를 포함하는 또 다른 CH3 도메인의 직교 C-말단 연장과 함께 이황화 결합을 형성하는 IgG1 힌지 영역의 DKTHT 모티프가 뒤따르는 KSC 트리펩티드 서열을 포함한다.

[0203] **6.3.19.4.CL C-말단 및 CH2 N-말단 (힌지) 연결 접합부**

[0204] 다양한 구현 예에서, CL 아미노산 서열은 그의 C-말단을 통해 힌지 영역에 연결되며, 그 다음으로 CH2 도메인의 N-말단에 연결된다. 힌지 영역 서열은 상기 6.3.19.3. 절에 보다 상세히 기술되어 있다. 바람직한 구현 예에서, 상기 힌지 영역 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 56이다.

[0205] **6.3.19.5.CH2 C-말단을 불변 영역 도메인에 연결하는 접합부**

[0206] 다양한 구현 예에서, CH2 아미노산 서열은 그의 C-말단을 통해 불변 영역 도메인의 N-말단에 연결된다. 불변 영역은 상기 6.3.4. 절에 보다 상세히 기술되어 있다. 바람직한 구현 예에서, 상기 CH2 서열은 그의 내인성 서열을 통해 CH3 서열로 연결된다. 다른 구현 예에서, 상기 CH2 서열은 CH1 또는 CL 서열로 연결된다. CH2 서열을 CH1 또는 CL 서열로 연결시키는 것에 관한 예시들은, 본 명세서에 전체로서 포함되는 미국 특허 제8,242,247호에 보다 상세히 기술되어 있다.

[0207] **6.3.19.6.3가 및 4가 분자 상에서 도메인 O를 도메인 A에 또는 도메인 S를 도메인 H에 연결하는 접합부**

[0208] 다양한 구현 예에서, 항체의 중쇄 (예를 들어, 제1 및 제3 폴리펩티드 사슬)는 추가적인 ABS를 제공하는 추가적인 도메인을 포함하기 위하여 그들의 N-말단에서 연장된다. **도 21, 도 26, 및 도 34**를 참조하면, 특정 구현 예에서, 도메인 O 및/또는 도메인 S의 불변 영역 도메인 아미노산 서열의 C-말단은 도메인 A 및/또는 도메인 H의 가변 영역 도메인 아미노산 서열의 N-말단에 각각 연결된다. 일부 바람직한 구현 예에서, 상기 불변 영역 도메인은 CH3 아미노산 서열이고 상기 가변 영역 도메인은 VL 아미노산 서열이다. 일부 바람직한 구현 예에서, 상기 불변 영역 도메인은 CL 아미노산 서열이고 상기 가변 영역 도메인은 VL 아미노산 서열이다. 특정 구현 예에서, 상기 불변 영역 도메인은 펩티드 링커를 통해 상기 가변 영역 도메인에 연결된다. 바람직한 구현 예에서, 상기 펩티드 링커는 6 아미노산 GSGSGS 펩티드 서열이다.

[0209] 다양한 구현 예에서, 항체의 경쇄 (예를 들어, 제2 및 제4 폴리펩티드 사슬)는 항체의 추가적인 가변 도메인-불변 도메인 분절을 포함하기 위하여 그들의 N-말단에서 연장된다. 특정 구현 예에서, 상기 불변 영역 도메인은 CH1 아미노산 서열이고 상기 가변 영역 도메인은 VH 아미노산 서열이다.

[0210] **6.4.특이성 2가 결합 분자**

[0211] 추가적인 측면에서, 2가 결합 분자가 제공된다.

[0212] **도 3**을 참조하면, 제1 일련의 구현 예에서, 상기 결합 분자는 제1, 제2, 제3, 및 제4 폴리펩티드 사슬을 포함하고, 여기서 (a) 상기 제1 폴리펩티드 사슬은 도메인 A, 도메인 B, 도메인 D, 및 도메인 E를 포함하며, 상기 도메인들은, A-B-D-E 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 A는 VL 아미노산 서열을 갖고, 도메인 B는 CH3 아미노산 서열을 가지며, 도메인 D는 CH2 아미노산 서열을 갖고, 도메인 E는 불변 영역 도메인 아미노산 서열을 가지며; (b) 상기 제2 폴리펩티드 사슬은 도메인 F 및 도메인 G를 포함하고, 상기 도메인들은, F-G 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 F는 VH 아미노산 서열을 갖고 도메인 G는 CH3 아미노산 서열을 가지며; (c) 상기 제3 폴리펩티드 사슬은 도메인 H, 도메인 I, 도메인 J, 및 도메인 K를 포함하고, 상기 도메인들은, H-I-J-K 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 H는 가변 영역 도메인 아미노산 서열을 갖고, 도메인 I는 불변 영역 도메인 아미노산 서열을 가지며, 도메인 J는 CH2 아미노산 서열을 갖고, 및 K는 불변 영역 도메인 아미노산 서열을 가지며; (d) 상기 제4 폴리펩티드 사슬은 도메인 L 및 도메인 M을 포함하고, 상기 도메인들은, L-M 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 L은 가변 영역 도메인 아미노산 서열을 갖고 도메인 M은 불변 영역 도메인 아미노산 서열을 가지며; (e) 상기 제1 및 제2 폴리펩티드는 상기 A 및 F 도메인 사이의 상호작용 및 상기 B 및 G 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되고; (f) 상기 제3 및 제4 폴리펩티드는 상기 H 및 L 도메인 사이의 상호작용 및 상기 I 및 M 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되며; 및 (g) 상기 제1 및 제3 폴리펩티드는 상기 결합 분자를 형성하기 위하여 상기 D 및 J 도메인 사이의 상호작용 및 상기 E 및 K 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합된다.

[0213] 바람직한 구현 예에서, 도메인 E는 CH3 아미노산 서열을 갖고, 도메인 H는 VL 아미노산 서열을 가지며, 도메인 I는 CL 아미노산 서열을 갖고, 도메인 K는 CH3 아미노산 서열을 가지며, 도메인 L은 VH 아미노산 서열을 갖고, 도메인 M은 CH1 아미노산 서열을 갖는다.

[0214] 특정 구현 예에서, 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 제2 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성하며, 상기 결합 분자는 이중 특이성 2가 결합 분자이다. 특정 구현 예에서, 상기 A 도메인 및 F 도메인 사이의 상호작용은 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 H 도메인 및 L 도메인 사이의 상호작용은 상

기 제1 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성하며, 상기 결합 분자는 단일 특이성 2가 결합 분자이다.

[0215] **6.4.1.2가 이중 특이성 B-바디 "BC1"**

[0216] **도 3** 및 **도 6**을 참조하면, 일련의 구현 예에서, 상기 결합 분자는 제1, 제2, 제3, 및 제4 폴리펩티드 사슬을 포함하고, 여기서 (a) 상기 제1 폴리펩티드 사슬은 도메인 A, 도메인 B, 도메인 D, 및 도메인 E를 포함하며, 상기 도메인들은, A-B-D-E 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 A는 제1 VL 아미노산 서열을 갖고, 도메인 B는 T366K 돌연변이; 및 IgG1 힌지 영역의 DKTHT 모티프가 뒤따르는 KSC 트리펩티드 서열을 포함하는 C-말단 연장;을 갖는 인간 IgG1 CH3 아미노산 서열을 가지며, 도메인 D는 인간 IgG1 CH2 아미노산 서열을 갖고, 도메인 E는 S354C 및 T366W 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 CH3 아미노산을 가지며; (b) 상기 제2 폴리펩티드 사슬은 도메인 F 및 도메인 G를 포함하고, 상기 도메인들은, F-G 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 F는 제1 VH 아미노산 서열을 갖고 도메인 G는 L351D 돌연변이; 및 GEC 아미노산 이황화 모티프를 포함하는 C-말단 연장;을 갖는 인간 IgG1 CH3 아미노산 서열을 가지며; (c) 상기 제3 폴리펩티드 사슬은 도메인 H, 도메인 I, 도메인 J, 및 도메인 K를 포함하고, 상기 도메인들은, H-I-J-K 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 H는 제2 VL 아미노산 서열을 갖고, 도메인 I는 인간 CL 카파 아미노산 서열을 가지며, 도메인 J는 인간 IgG1 CH2 아미노산 서열을 갖고, 및 K는 Y349C, D356E, L358M, T366S, L368A, 및 Y407V 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 CH3 아미노산 서열을 가지며; (d) 상기 제4 폴리펩티드 사슬은 도메인 L 및 도메인 M을 포함하고, 상기 도메인들은, L-M 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 L은 제2 VH 아미노산 서열을 갖고 도메인 M은 인간 IgG1 CH1 아미노산 서열을 가지며; (e) 상기 제1 및 제2 폴리펩티드는 상기 A 및 F 도메인 사이의 상호작용 및 상기 B 및 G 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되고; (f) 상기 제3 및 제4 폴리펩티드는 상기 H 및 L 도메인 사이의 상호작용 및 상기 I 및 M 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되며; (g) 상기 제1 및 제3 폴리펩티드는 상기 결합 분자를 형성하기 위하여 상기 D 및 J 도메인 사이의 상호작용 및 상기 E 및 K 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되고; (h) 도메인 A 및 도메인 F는 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고; 및 (i) 도메인 H 및 도메인 L은 제2 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성한다.

[0217] 바람직한 구현 예에서, 상기 제1 폴리펩티드 사슬은 SEQ ID NO:8의 서열을 가지며, 상기 제2 폴리펩티드 사슬은 SEQ ID NO:9의 서열을 갖고, 상기 제3 폴리펩티드 사슬은 SEQ ID NO:10의 서열을 가지며, 상기 제4 폴리펩티드 사슬은 SEQ ID NO:11의 서열을 갖는다.

[0218] **6.4.2.2가 이중 특이성 B-바디 "BC6"**

[0219] **도 3** 및 **도 14**를 참조하면, 일련의 구현 예에서, 상기 결합 분자는 제1, 제2, 제3, 및 제4 폴리펩티드 사슬을 포함하고, 여기서 (a) 상기 제1 폴리펩티드 사슬은 도메인 A, 도메인 B, 도메인 D, 및 도메인 E를 포함하며, 상기 도메인들은, A-B-D-E 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 A는 제1 VL 아미노산 서열을 갖고, 도메인 B는 IgG1 힌지 영역의 DKTHT 모티프가 뒤따르는 KSC 트리펩티드 서열을 포함하는 C-말단 연장을 갖는 인간 IgG1 CH3 아미노산 서열을 가지며, 도메인 D는 인간 IgG1 CH2 아미노산 서열을 갖고, 도메인 E는 S354C 및 T366W 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 CH3 아미노산을 가지며; (b) 상기 제2 폴리펩티드 사슬은 도메인 F 및 도메인 G를 포함하고, 상기 도메인들은, F-G 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 F는 제1 VH 아미노산 서열을 갖고 도메인 G는 GEC 아미노산 이황화 모티프를 포함하는 C-말단 연장을 갖는 인간 IgG1 CH3 아미노산 서열을 가지며; (c) 상기 제3 폴리펩티드 사슬은 도메인 H, 도메인 I, 도메인 J, 및 도메인 K를 포함하고, 상기 도메인들은, H-I-J-K 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 H는 제2 VL 아미노산 서열을 갖고, 도메인 I는 인간 CL 카파 아미노산 서열을 가지며, 도메인 J는 인간 IgG1 CH2 아미노산 서열을 갖고, 및 K는 Y349C, D356E, L358M, T366S, L368A, 및 Y407V 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 CH3 아미노산 서열을 가지며; (d) 상기 제4 폴리펩티드 사슬은 도메인 L 및 도메인 M을 포함하고, 상기 도메인들은, L-M 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 L은 제2 VH 아미노산 서열을 갖고 도메인 M은 인간 IgG1 아미노산 서열을 가지며; (e) 상기 제1 및 제2 폴리펩티드는 상기 A 및 F 도메인 사이의 상호작용 및 상기 B 및 G 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되고; (f) 상기 제3 및 제4 폴리펩티드는 상기 H 및 L 도메인 사이의 상호작용 및 상기 I 및 M 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되며; (g) 상기 제1 및 제3 폴리펩티드는 상기 결합 분자를 형성하기 위하여 상기 D 및 J 도메인 사이의 상호작용 및 상기 E 및 K 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되고; (h) 도메인 A 및 도메인 F는 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고; 및 (i) 도메인 H 및 도메인 L은 제2 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성한다.

[0220] **6.4.3.2가 이중 특이성 B-바디 "BC28"**

[0221] **도 3** 및 **도 16**을 참조하면, 일련의 구현 예에서, 상기 결합 분자는 제1, 제2, 제3, 및 제4 폴리펩티드 사슬을

포함하고, 여기서 (a) 상기 제1 폴리펩티드 사슬은 도메인 A, 도메인 B, 도메인 D, 및 도메인 E를 포함하며, 상기 도메인들은, A-B-D-E 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 A는 제1 VL 아미노산 서열을 갖고, 도메인 B는 Y349C 돌연변이; 및 IgG1 힌지 영역의 DKTHT 모티프가 뒤따르는 PGK 트리펩티드 서열을 포함하는 C-말단 연장;을 갖는 인간 IgG1 CH3 아미노산 서열을 가지며, 도메인 D는 인간 IgG1 CH2 아미노산 서열을 갖고, 도메인 E는 S354C 및 T366W 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 CH3 아미노산을 가지며; (b) 상기 제2 폴리펩티드 사슬은 도메인 F 및 도메인 G를 포함하고, 상기 도메인들은, F-G 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 F는 제1 VH 아미노산 서열을 갖고 도메인 G는 S354C 돌연변이; 및 PGK 트리펩티드 서열을 포함하는 C-말단 연장;을 갖는 인간 IgG1 CH3 아미노산 서열을 가지며; (c) 상기 제3 폴리펩티드 사슬은 도메인 H, 도메인 I, 도메인 J, 및 도메인 K를 포함하고, 상기 도메인들은, H-I-J-K 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 H는 제2 VL 아미노산 서열을 갖고, 도메인 I는 인간 CL 카파 아미노산 서열을 가지며, 도메인 J는 인간 IgG1 CH2 아미노산 서열을 갖고, 및 K는 Y349C, D356E, L358M, T366S, L368A, 및 Y407V를 갖는 인간 IgG1 CH3 아미노산 서열을 가지며; (d) 상기 제4 폴리펩티드 사슬은 도메인 L 및 도메인 M을 포함하고, 상기 도메인들은, L-M 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 L은 제2 VH 아미노산 서열을 갖고 도메인 M은 인간 IgG1 CH1 아미노산 서열을 가지며; (e) 상기 제1 및 제2 폴리펩티드는 상기 A 및 F 도메인 사이의 상호작용 및 상기 B 및 G 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되고; (f) 상기 제3 및 제4 폴리펩티드는 상기 H 및 L 도메인 사이의 상호작용 및 상기 I 및 M 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되며; (g) 상기 제1 및 제3 폴리펩티드는 상기 결합 분자를 형성하기 위하여 상기 D 및 J 도메인 사이의 상호작용 및 상기 E 및 K 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되고; (h) 도메인 A 및 도메인 F는 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고; 및 (i) 도메인 H 및 도메인 L은 제2 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성한다.

[0222] 바람직한 구현 예에서, 상기 제1 폴리펩티드 사슬은 SEQ ID NO:24의 서열을 가지며, 상기 제2 폴리펩티드 사슬은 SEQ ID NO:25의 서열을 갖고, 상기 제3 폴리펩티드 사슬은 SEQ ID NO:10의 서열을 가지며, 상기 제4 폴리펩티드 사슬은 SEQ ID NO:11의 서열을 갖는다.

[0223] **6.4.4.2가 이중 특이성 B-바디 "BC44"**

[0224] **도 3** 및 **도 19**를 참조하면, 일련의 구현 예에서, 상기 결합 분자는 제1, 제2, 제3, 및 제4 폴리펩티드 사슬을 포함하고, 여기서 (a) 상기 제1 폴리펩티드 사슬은 도메인 A, 도메인 B, 도메인 D, 및 도메인 E를 포함하며, 상기 도메인들은, A-B-D-E 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 A는 제1 VL 아미노산 서열을 갖고, 도메인 B는 Y349C 돌연변이; P343V 돌연변이; 및 IgG1 힌지 영역의 DKTHT 모티프가 뒤따르는 PGK 트리펩티드 서열을 포함하는 C-말단 연장;을 갖는 인간 IgG1 CH3 아미노산 서열을 가지며, 도메인 D는 인간 IgG1 CH2 아미노산 서열을 갖고, 도메인 E는 S354C 및 T366W 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 CH3 아미노산을 가지며; (b) 상기 제2 폴리펩티드 사슬은 도메인 F 및 도메인 G를 포함하고, 상기 도메인들은, F-G 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 F는 제1 VH 아미노산 서열을 갖고 도메인 G는 S354C 돌연변이; 및 PGK 트리펩티드 서열을 포함하는 C-말단 연장;을 갖는 인간 IgG1 CH3 아미노산 서열을 가지며; (c) 상기 제3 폴리펩티드 사슬은 도메인 H, 도메인 I, 도메인 J, 및 도메인 K를 포함하고, 상기 도메인들은, H-I-J-K 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 H는 제2 VL 아미노산 서열을 갖고, 도메인 I는 인간 CL 카파 아미노산 서열을 가지며, 도메인 J는 인간 IgG1 CH2 아미노산 서열을 갖고, 및 K는 Y349C, T366S, L368A, 및 Y407V를 갖는 인간 IgG1 CH3 아미노산 서열을 가지며; (d) 상기 제4 폴리펩티드 사슬은 도메인 L 및 도메인 M을 포함하고, 상기 도메인들은, L-M 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 L은 제2 VH 아미노산 서열을 갖고 도메인 M은 인간 IgG1 아미노산 서열을 가지며; (e) 상기 제1 및 제2 폴리펩티드는 상기 A 및 F 도메인 사이의 상호작용 및 상기 B 및 G 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되고; (f) 상기 제3 및 제4 폴리펩티드는 상기 H 및 L 도메인 사이의 상호작용 및 상기 I 및 M 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되며; (g) 상기 제1 및 제3 폴리펩티드는 상기 결합 분자를 형성하기 위하여 상기 D 및 J 도메인 사이의 상호작용 및 상기 E 및 K 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되고; (h) 도메인 A 및 도메인 F는 제1 항원에 특이적인 제1 항원 결합 부위를 형성하고; 및 (i) 도메인 H 및 도메인 L은 제2 항원에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 형성한다.

[0225] 바람직한 구현 예에서, 상기 제1 폴리펩티드 사슬은 SEQ ID NO:32의 서열을 가지며, 상기 제2 폴리펩티드 사슬은 SEQ ID NO:25의 서열을 갖고, 상기 제3 폴리펩티드 사슬은 SEQ ID NO:10의 서열을 가지며, 상기 제4 폴리펩티드 사슬은 SEQ ID NO:11의 서열을 갖는다.

[0226] **6.5특이성 3가 결합 분자**

[0227] **6.5.1.3가 1x2 이중 특이성 B-바디 "BC28-1x2"**

[0228] 6.4.3. 절 및 **도 26**을 참조하면, 일련의 구현 예에서, 상기 결합 분자는 제6 폴리펩티드 사슬을 더 포함하고, 여기서 (a) 상기 제3 폴리펩티드 사슬은 도메인 R 및 도메인 S를 더 포함하고, 상기 도메인들은, R-S-H-I-J-K 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 R은 제1 VL 아미노산 서열을 갖고 도메인 S는 Y349C 돌연변이; 및 도메인 S를 도메인 H에 연결하는 GSGSGS 링커 펩티드가 뒤따르는 PGK 트리펩티드 서열을 포함하는 C-말단 연장;을 갖는 인간 IgG1 CH3 아미노산 서열을 가지며; (b) 상기 결합 분자는 도메인 T 및 도메인 U를 포함하는 제6 폴리펩티드 사슬을 더 포함하고, 상기 도메인들은, T-U 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 T는 제1 VH 아미노산 서열을 갖고 도메인 U는 S354C 돌연변이; 및 PGK 트리펩티드 서열을 포함하는 C-말단 연장;을 갖는 인간 IgG1 CH3 아미노산 서열을 가지며; (c) 상기 제3 및 제6 폴리펩티드는 상기 결합 분자를 형성하기 위하여 상기 R 및 T 도메인 사이의 상호작용 및 상기 S 및 U 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되고; 및 (d) 도메인 R 및 도메인 T는 상기 제1 항원에 특이적인 제3 항원 결합 부위를 형성한다.

[0229] 바람직한 구현 예에서, 상기 제1 폴리펩티드 사슬은 SEQ ID NO:24의 서열을 가지며, 상기 제2 폴리펩티드 사슬은 SEQ ID NO:25의 서열을 갖고, 상기 제3 폴리펩티드 사슬은 SEQ ID NO:37의 서열을 가지며, 상기 제4 폴리펩티드 사슬은 SEQ ID NO:11의 서열을 갖고, 상기 제6 폴리펩티드 사슬은 SEQ ID NO:25의 서열을 갖는다.

[0230] **6.5.2.3가 1x2 삼중 특이성 B-바디 "BC28-1x1x1a"**

[0231] 6.4.3. 절 및 **도 26** 및 **도 30**을 참조하면, 일련의 구현 예에서, 상기 결합 분자는 제6 폴리펩티드 사슬을 더 포함하고, 여기서 (a) 상기 제3 폴리펩티드 사슬은 도메인 R 및 도메인 S를 더 포함하고, 상기 도메인들은, R-S-H-I-J-K 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 R은 제3 VL 아미노산 서열을 갖고 도메인 S는 T366K 돌연변이; 및 도메인 S를 도메인 H에 연결하는 GSGSGS 링커 펩티드가 뒤따르는 KSC 트리펩티드 서열을 포함하는 C-말단 연장;을 갖는 인간 IgG1 CH3 아미노산 서열을 가지며; (b) 상기 결합 분자는 도메인 T 및 도메인 U를 포함하는 제6 폴리펩티드 사슬을 더 포함하고, 상기 도메인들은, T-U 배향으로, N-말단에서 C-말단으로 배열되며, 도메인 T는 제3 VH 아미노산 서열을 갖고 도메인 U는 L351D 돌연변이; 및 GEC 아미노산 이황화 모티프를 포함하는 C-말단 연장;을 갖는 인간 IgG1 CH3 아미노산 서열을 가지며; (c) 상기 제3 및 제6 폴리펩티드는 상기 결합 분자를 형성하기 위하여 상기 R 및 T 도메인 사이의 상호작용 및 상기 S 및 U 도메인 사이의 상호작용을 통해 결합되고; 및 (d) 도메인 R 및 도메인 T는 제3 항원에 특이적인 제3 항원 결합 부위를 형성한다.

[0232] 바람직한 구현 예에서, 상기 제1 폴리펩티드 사슬은 SEQ ID NO:24의 서열을 가지며, 상기 제2 폴리펩티드 사슬은 SEQ ID NO:25의 서열을 갖고, 상기 제3 폴리펩티드 사슬은 SEQ ID NO:45의 서열을 가지며, 상기 제4 폴리펩티드 사슬은 SEQ ID NO:11의 서열을 갖고, 상기 제6 폴리펩티드 사슬은 SEQ ID NO:53의 서열을 갖는다.

[0233] **6.6.항원 특이성**

[0234] 본 명세서에 기술된 상기 결합 분자의 항원 결합 부위는 매우 다양한 분자 표적에 특이적으로 결합하도록 선택될 수 있다. 예를 들어, 항원 결합 부위 또는 부위들은 이중 특이성 항체에 관한 구현 예에서, E-Cad, CLDN7, FGFR2b, N-Cad, Cad-11, FGFR2c, ERBB2, ERBB3, FGFR1, FOLR1, IGF-Ira, GLP1R, PDGFRa, PDGFRb, EPHB6, ABCG2, CXCR4, CXCR7, 인테그린-avb3(Integrin-avb3), SPARC, VCAM, ICAM, 아넥신(Annexin), ROR1, ROR2, TNF α, CD137, 안지오포이에틴 2(angiopoietin 2), 안지오포이에틴 3(angiopoietin 3), BAFF, 베타 아밀로이드(beta amyloid), C5, CA-125, CD147, CD125, CD147, CD152, CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD25, CD274, CD28, CD3, CD30, CD33, CD37, CD4, CD40, CD44, CD44v4, CD44v6, CD44v7, CD50, CD51, CD52, CEA, CSF1R, CTLA-2, DLL4, EGFR, EPCAM, HER3, GD2 강글리오시드(GD2 ganglioside), GDF-8, Her2/neu, CD2221, IL-17A, IL-12, IL-23, IL-13, IL-6, IL-23, 인테그린, CD11a, MUC1, 노치(Notch), TAG-72, TGFβ, TRAIL-R2, VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR2, VEGFc, 헤마토포이에틴(4개-나선 번들형)(hematopoietin, 4-helix bundles)(예를 들어, 에리스로포이에틴(erythropoietin, EPO), IL-2 (T-세포 생장 인자), IL-3 (멀티콜로니 CSF)(multi colony CSF), IL-4 (BCGF-1, BSF-1), IL-5 (BCGF-2), IL-6 IL-4 (IFN-β2, BSF-2, BCDF), IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-13 (P600), G-CSF, IL-15 (T-세포 생장 인자), GM-CSF (과립구 대식세포 콜로니 자극 인자)(granulocyte macrophage colony stimulating factor), OSM (OM, 온코스타틴 M), 및 LIF(백혈병 억제 인자)); 인터페론 (예를 들어, IFN-γ, IFN-α, 및 IFN-β); 이뮤노글로빈 상과(immunoglobin superfamily)(예를 들어, B7.1 (CD80), 및 B7.2 (B70, CD86)); TNF 과(family)(예를 들어, TNF-α (카켁틴)(cachectin), TNF-β (림포톡신(lymphotoxin), LT, LT-α), LT-β, Fas, CD27, CD30, 및 4-1BBL); 및 특정 과에 속하지 않는 것들 (예를 들어, TGF-β, IL 1α, IL-1β, IL-1 RA, IL-10 (사이토카인 합성 억제 인자), IL-12 (NK 세포 자극 인자), MIF, IL-16, IL-17 (mCTLA-8), 및/또는 IL-18 (IGIF, 인터페론-γ 유도 인자));에 특이적으로 결합할 수 있고, 상기 항체는 예를 들어 이들 표적 중 2개에 결합할 수 있다. 또한, 항체의 중쇄의 Fc 부분은 비만세포 및 호염

기성 세포(basophils)를 표적으로 하기 위한 IgE 항체의 Fc 부분의 사용과 같이 Fc 수용체-발현 세포를 표적으로 하는데 사용될 수 있다.

[0235] TNFR1 (또한 CD120a 및 TNFRSF1A라고 알려짐), TNFR2 (또한 CD120b 및 TNFRSF1B라고 알려짐), TNFRSF3 (또한 LTβR라고 알려짐), TNFRSF4 (또한 OX40 및 CD134라고 알려짐), TNFRSF5 (또한 CD40라고 알려짐), TNFRSF6 (또한 FAS 및 CD95라고 알려짐), TNFRSF6B (또한 DCR3라고 알려짐), TNFRSF7 (또한 CD27이라고 알려짐), TNFRSF8 (또한 CD30라고 알려짐), TNFRSF9 (또한 4-1BB라고 알려짐), TNFRSF10A (또한 TRAILR1, DR4, 및 CD26라고 알려짐), TNFRSF10B (또한 TRAILR2, DR5, 및 CD262라고 알려짐), TNFRSF10C (또한 TRAILR3, DCR1, CD263라고 알려짐), TNFRSF10D (또한 TRAILR4, DCR2, 및 CD264라고 알려짐), TNFRSF11A (또한 RANK 및 CD265라고 알려짐), TNFRSF11B (또한 OPG라고 알려짐), TNFRSF12A (또한 FN14, TWEAKR, 및 CD266라고 알려짐), TNFRSF13B (또한 TACI 및 CD267이라고 알려짐), TNFRSF13C (또한 BAFFR, BR3, 및 CD268이라고 알려짐), TNFRSF14 (또한 HVEM 및 CD270라고 알려짐), TNFRSF16 (또한 NGFR, p75NTR, 및 CD271이라고 알려짐), 또는 TNFRSF17 (또한 BCMA 및 CD269이라고 알려짐), TNFRSF18 (또한 GITR 및 CD357이라고 알려짐), TNFRSF19 (또한 TROY, TAJ, 및 TRADE라고 알려짐), TNFRSF21 (또한 CD358이라고 알려짐), TNFRSF25 (또한 Apo-3, TRAMP, LARD, 또는 WS-1이라고 알려짐), EDA2R (또한 XEDAR이라고 알려짐)을 포함하나, 이에 한정되지는 않는, 수용체의 TNF 과(family)에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위 또는 부위들이 선택될 수 있다.

[0236] PD1, PDL1, CTLA-4, PDL2, B7-H3, B7-H4, BTLA, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, BY55, 및 CGEN-15049과 같은 체크포인트 억제제(checkpoint inhibitor) 표적들을 포함하나, 이에 한정되지는 않는, 면역-종양학(immune-oncology) 표적들에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위 또는 부위들이 선택될 수 있다.

[0237] 일련의 구현 예에서, 종양-관련 세포를 특이적으로 표적으로 하는 항원 결합 부위 또는 부위들이 선택될 수 있다. 다양한 구현 예에서, 상기 항원 결합 부위 또는 부위들은 종양 관련 면역 세포를 특이적으로 표적으로 한다. 특정 구현 예에서, 상기 항원 결합 부위 또는 부위들은 종양 관련 조절 T 세포(Tregs)를 특이적으로 표적으로 한다. 특정 구현 예에서, 결합 분자는 CD25, OX40, CTLA-4, 및 NRP1의 하나 이상으로부터 선택되는 항원에 특이적인 항원 결합 부위를 가지며, 상기 결합 분자는 종양 관련 조절 T 세포를 특이적으로 표적으로 한다. 특정 구현 예에서, 결합 분자는 CD25와 OX40, CD25와 CTLA-4, CD25와 NRP1, OX40와 CTLA-4, OX40와 NRP1, 또는 CTLA-4와 NRP1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 가지며, 상기 결합 분자는 종양 관련 조절 T 세포를 특이적으로 표적으로 한다. 바람직한 구현 예에서, 이중 특이성 2가 결합 분자는 CD25와 OX40, CD25와 CTLA-4, CD25와 NRP1, OX40와 CTLA-4, OX40와 NRP1, 또는 CTLA-4와 NRP1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 가지며, 상기 결합 분자는 종양 관련 조절 T 세포를 특이적으로 표적으로 한다. 특정 구현 예에서, 상기 종양 관련 조절 T 세포의 특이적 표적화는 상기 조절 T 세포의 결핍 (예를 들어, 사멸)을 초래한다. 바람직한 구현 예에서, 상기 조절 T 세포의 결핍은 항체-약물 콘쥬게이트 (ADC) 변형, 예를 들어, 하기 6.7.1. 절에서 보다 상세히 기술되는 바와 같이, 독소에 콘쥬게이트된 항체에 의해 조정된다.

[0238] 일련의 구현 예에서, 결합 분자는 CD3, ROR1, 및 ROR2 중 하나 이상으로부터 선택되는 항원 결합 부위를 갖는다. 특정 구현 예에서, 이중 특이성 2가는 CD3 및 ROR1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위들을 갖는다. 특정 구현 예에서, 이중 특이성 2가는 CD3 및 ROR2에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위들을 갖는다. 특정 구현 예에서, 삼중 특이성 3가는 CD3, ROR1, 및 ROR2에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위들을 갖는다.

[0239] **6.7.추가적 변형**

[0240] 추가적인 일련의 구현 예에서, 상기 결합 분자는 추가적인 변형을 갖는다.

[0241] **6.7.1.결합 분자-약물 콘쥬게이트(Conjugates)**

[0242] 다양한 구현 예에서, 상기 결합 분자는 결합 분자-약물 콘쥬게이트를 형성하기 위하여 치료제(즉, 약물)에 콘쥬게이트된다. 치료제는, 화학 치료제, 조영제(imaging agents)(예를 들어, 방사성 동위 원소), 면역 조절제(예를 들어, 사이토카인, 케모카인, 또는 체크포인트 억제제), 및 독소(예를 들어, 세포독성제)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 특정 구현 예에서, 상기 치료제는 하기 6.7.3. 절에서 보다 상세히 기술되는 바와 같이, 링커 펩티드를 통해 상기 결합 분자에 부착된다.

[0243] 본 명세서에 기술된 결합 분자에 약물을 콘쥬게이트 시키기에 적합할 수 있는 항체-약물 콘쥬게이트(ADC)의 제조 방법은, 예를 들어, 미국 특허 제8,624,003호 (팟(pot) 방법), 미국 특허 제8,163,888호 (1 단계(one-step)), 미국 특허 제5,208,020호 (2 단계(two-step) 방법), 미국 특허 제8,337,856호, 미국 특허 제5,773,001호, 미국 특허 제7,829,531호, 미국 특허 제5,208,020호, 미국 특허 제7,745,394호, 국제특허공개 제

2017/136623호, 국제특허공개 제2017/015502호, 국제특허공개 제2017/015496호, 국제특허공개 제2017/015495호, 국제특허공개 제2004/010957호, 국제특허공개 제2005/077090호, 국제특허공개 제2005/082023호, 국제특허공개 제2006/065533호, 국제특허공개 제2007/030642호, 국제특허공개 제2007/103288호, 국제특허공개 제2013/173337호, 국제특허공개 제2015/057699호, 국제특허공개 제2015/095755호, 국제특허공개 제2015/123679호, 국제특허공개 제2015/157286호, 국제특허공개 제2017/165851호, 국제특허공개 제2009/073445호, 국제특허공개 제2010/068759호, 국제특허공개 제2010/138719호, 국제특허공개 제2012/171020호, 국제특허공개 제2014/008375호, 국제특허공개 제2014/093394호, 국제특허공개 제2014/093640호, 국제특허공개 제2014/160360호, 국제특허공개 제2015/054659호, 국제특허공개 제2015/195925호, 국제특허공개 제2017/160754호, Storz (*MAbs*. 2015 Nov-Dec; 7(6): 989-1009), Lambert *et al.* (*Adv Ther*, 2017 34: 1015), Diamantis *et al.* (*British Journal of Cancer*, 2016, 114, 362-367), Carrico *et al.* (*Nat Chem Biol*, 2007. 3: 321-2), We *et al.* (*Proc Natl Acad Sci USA*, 2009. 106: 3000-5), Rabuka *et al.* (*Curr Opin Chem Biol.*, 2011 14: 790-6), Hudak *et al.* (*Angew Chem Int Ed Engl.*, 2012: 4161-5), Rabuka *et al.* (*Nat Protoc.*, 2012 7:1052-67), Agarwal *et al.* (*Proc Natl Acad Sci USA.*, 2013, 110: 46-51), Agarwal *et al.* (*Bioconjugate Chem.*, 2013, 24: 846-851), Barfield *et al.* (*Drug Dev. and D.*, 2014, 14:34-41), Drake *et al.* (*Bioconjugate Chem.*, 2014, 25:1331-41), Liang *et al.* (*J Am Chem Soc.*, 2014, 136:10850-3), Drake *et al.* (*Curr Opin Chem Biol.*, 2015, 28:174-80), 및 York *et al.* (*BMC Biotechnology*, 2016, 16(1):23)에 기술되어 있으며, 이들 각각은 모든 교시 내용이 전체로서 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0244] **6.7.2.추가적인 결합 모이어티(Moieties)**

[0245] 다양한 구현 예에서, 상기 결합 분자는 하나 이상의 추가적인 결합 모이어티를 포함하는 변형을 갖는다. 특정 구현 예에서, 상기 결합 모이어티는 전장(full-length) 항체, Fab 단편(fragments), Fvs, scFvs, 텐덤(tandem) scFvs, 다이어바디(Diabodies), sc다이어바디(scDiabodies), DARTs, tandAbs, 미니바디(minibodies), 카멜리드(camelid) VHH, 및 당업자에게 알려진 다른 항체 단편 또는 포맷(formats)을 포함하나, 이에 한정되지는 않는, 항체 단편 또는 항체 포맷이다. 예시적인 항체 및 항체 단편 포맷은 그의 모든 교시 내용이 본 명세서에 참조로 포함되는, Brinkmann *et al.* (*MABS,* 2017, Vol. 9, No. 2, 182-212)에 상세히 기술되어 있다.

[0246] 특정 구현 예에서, 상기 하나 이상의 추가적인 결합 모이어티는 제1 또는 제3 폴리펩티드 사슬의 C-말단에 부착된다. 특정 구현 예에서, 상기 하나 이상의 추가적인 결합 모이어티는 제1 및 제3 폴리펩티드 사슬 둘 다의 C-말단에 부착된다. 특정 구현 예에서, 상기 하나 이상의 추가적인 결합 모이어티는 제1 및 제3 폴리펩티드 사슬 둘 다의 C-말단에 부착된다. 특정 구현 예에서, 상기 하나 이상의 추가적인 결합 모이어티 각각의 부분은 상기 제1 및 제3 폴리펩티드 사슬의 C-말단에 개별적으로 부착되어, 상기 부분이 기능적 결합 모이어티를 형성한다.

[0247] 특정 구현 예에서, 상기 하나 이상의 추가적인 결합 모이어티는 임의의 폴리펩티드 사슬 (예를 들어, 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 또는 제6 폴리펩티드 사슬)의 N-말단에 부착된다. 특정 구현 예에서, 상기 추가적인 결합 모이어티 각각의 부분은 상이한 폴리펩티드 사슬의 N-말단에 개별적으로 부착되어, 상기 부분이 기능적 결합 모이어티를 형성한다.

[0248] 특정 구현 예에서, 상기 하나 이상의 추가적인 결합 모이어티는 상기 결합 분자 내의 ABS의 상이한 항원 또는 에피토프에 대하여 특이적이다. 특정 구현 예에서, 상기 하나 이상의 추가적인 결합 모이어티는 상기 결합 분자 내의 ABS의 동일한 항원 또는 에피토프에 대하여 특이적이다. 상기 변형이 둘 이상의 추가적인 결합 모이어티인 특정 구현 예에서, 상기 추가적인 결합 모이어티는 동일한 항원 또는 에피토프에 대하여 특이적이다. 상기 변형이 둘 이상의 추가적인 결합 모이어티인 특정 구현 예에서, 상기 추가적인 결합 모이어티는 상이한 항원 또는 에피토프에 대하여 특이적이다.

[0249] 특정 구현 예에서, 상기 하나 이상의 추가적인 결합 모이어티는, 하기 6.7.3. 절에서 보다 상세히 논의되는 바와 같이, 반응성 화학(reactive chemistry) 및 친화성 태깅 시스템(affinity tagging systems)를 포함하나, 이에 한정되지 않는, 시험관 내(*in vitro*) 방법을 사용하여 결합 분자에 부착된다. 특정 구현 예에서, 상기 하나 이상의 추가적인 결합 모이어티는 Fc-매개 결합(예를 들어, 단백질 A/G)을 통해 상기 결합 분자에 부착된다. 특정 구현 예에서, 상기 하나 이상의 추가적인 결합 모이어티는 예를 들어, 상기 결합 분자 및 이와 동일한 발현 벡터(예를 들어, 플라스미드) 상의 추가적인 결합 모이어티 사이의 융합 생성물의 뉴클레오티드 서열을 인코딩하는 것과 같은, 재조합 DNA 기술을 사용하여 상기 결합 분자에 부착된다.

[0250] **6.7.3.작용/반응 기**

[0251] 다양한 구현 예에서, 상기 결합 분자는 추가적인 모이어티로의 연결(예를 들어, 상기 6.7.1. 및 6.7.2. 절에서 보다 상세히 기술된 바와 같은, 약물 콘쥬게이트 및 추가적인 결합 모이어티) 및 후속 정제 공정과 같은 후속 공정에서 사용될 수 있는 작용기(functional groups) 또는 화학적으로 반응기(reactive groups)를 포함하는 변형을 갖는다.

[0252] 특정 구현 예에서, 상기 변형은, 반응성 티올(예를 들어, 반응기에 기초한 말레이미드(maleimide)), 반응성 아민(예를 들어, 반응기에 기초한 N-하이드록시숙신이미드(*N*-hydroxysuccinimide)), "클릭 화학(click chemistry)" 기(예를 들어, 반응성 알카인 기), 및 포르밀글리신(formylglycine, FGly)을 갖는 알데하이드를 포함하나, 이에 한정되지 않는, 화학적으로 반응기이다. 특정 구현 예에서, 상기 변형은, 친화성 펩티드 서열(예를 들어, HA, HIS, FLAG, GST, MBP, 및 스트렙(Strep) 시스템 등)을 포함하나, 이에 한정되지 않는 작용기이다. 특정 구현 예에서, 상기 작용기 또는 화학적으로 반응기는 절단 가능한 펩티드 서열을 갖는다. 특정 구현 예에서, 상기 절단 가능한 펩티드는 광절단, 화학적 절단, 프로테아제(protease) 절단, 환원 조건, 및 pH 조건을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 수단에 의해 절단된다. 특정 구현 예에서, 프로테아제 절단은 세포 내 프로테아제에 의해 수행된다. 특정 구현 예에서, 프로테아제 절단은 세포 외 또는 막 관련 프로테아제에 의해 수행된다. 프로테아제 절단 방식을 쓴 ADC 치료법은, 본 명세서에 그의 모든 교시 내용이 참조로서 포함되는, Choi *et al.* (*Theranostics*, 2012; 2(2): 156-178.)에 보다 상세히 기술되어 있다.

[0253] **6.8.약학 조성물**

[0254] 또 다른 측면에서, 본 명세서에 기술된 결합 분자 및 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 약학 조성물이 제공된다. 일반적인 구현 예에서, 상기 약학 조성물은 무균이다.

[0255] 다양한 구현 예에서, 상기 약학 조성물은 상기 결합 분자를 0.1 mg/ml 내지 100 mg/ml의 농도로 포함한다. 특정 구현 예에서, 상기 약학 조성물은 상기 결합 분자를 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 1.5 mg/ml, 2 mg/ml, 2.5 mg/ml, 5 mg/ml, 7.5 mg/ml, 또는 10 mg/ml의 농도로 포함한다. 일부 구현 예에서, 상기 약학 조성물은 상기 결합 분자를 10 mg/ml 초과의 농도로 포함한다. 특정 구현 예에서, 상기 결합 분자는 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 35 mg/ml, 40 mg/ml, 45 mg/ml, 또는 50 mg/ml 또는 그 이상의 농도로 존재한다. 특정 구현 예에서, 상기 결합 분자는 50 mg/ml 초과의 농도로 존재한다.

[0256] 다양한 구현 예에서, 상기 약학 조성물은 미국 특허 제8,961,964호, 미국 특허 제8,945,865호, 미국 특허 제8,420,081호, 미국 특허 제6,685,940호, 미국 특허 제6,171,586호, 미국 특허 제8,821,865호, 미국 특허 제9,216,219호, 미국 출원 제10/813,483호, 국제특허공개 제2014/066468호, 국제특허공개 제2011/104381호, 및 국제특허공개 제2016/180941호에 보다 상세히 기술되어 있으며, 이들 각각은 전체로서 본 명세서에 포함된다.

[0257] **6.9.제조 방법**

[0258] 본 명세서에 기술된 상기 결합 분자는 항체 제조에 현재 사용되는 표준 무세포 번역, 일시적 트랜스펙션, 및 안정된 트랜스펙션 접근법을 사용한 발현에 의해 용이하게 제조될 수 있다. 특정 구현 예에서, Expi293 세포(ThermoFisher)는 Expi펙타민(ExpiFectamine)과 같은 써모피셔(ThermoFisher)로부터의 프로토콜 및 시약, 또는 본 명세서에 그의 모든 교시 내용이 참조로서 포함되는, Fang *et al.* (*Biological Procedures Online*, 2017, 19:11)에 상세히 기술된 바와 같이 폴리에틸렌이민(polyethylenimine)과 같은 당업자에게 공지된 다른 시약을 사용한 상기 결합 분자의 제조에 사용될 수 있다.

[0259] 하기 실시예에서 추가로 기술되는 바와 같이, 상기 발현된 단백질은 캡쳐셀렉트(CaptureSelect) CH1 수지 및 써모피셔(ThermoFisher)로부터 제공된 프로토콜과 같은, CH1 친화성 수지를 사용하여 용이하게 정제될 수 있다. 추가 정제는 당 업계에서 일상적으로 사용되는 이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 수행될 수 있다.

[0260] **6.10.치료 방법**

[0261] 또 다른 측면에서, 본 명세서에 기술된 결합 분자를 환자를 치료하기에 유효한 양으로 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 치료 방법이 제공된다.

[0262] 일부 구현 예에서, 본 개시의 항체는 암을 치료하는데 사용될 수 있다. 상기 암은 방광, 혈액, 뼈, 골수, 뇌, 유방, 결장, 식도, 위장(gastrointestine), 잇몸, 두부(head), 신장, 간, 폐, 비인두, 목, 난소, 전립선, 피부, 위, 정소, 혀, 또는 자궁에서 발생하는 암일 수 있다. 일부 구현 예에서, 상기 암은, 악성 신생 종양(neoplasm, malignant); 암종(carcinoma); 미분화(undifferentiated) 암종; 거대(giant) 및 방추(spindle) 세포 암종; 소세포암종; 유두 암종(papillary carcinoma); 편평세포암종(squamous cell carcinoma); 림프상피성

암종(lymphoepithelial carcinoma); 기저세포암종(basal cell carcinoma); 모기질 암종(pilomatrix carcinoma); 이행세포암종(transitional cell carcinoma); 유두상 이행세포암종(papillary transitional cell carcinoma); 선암종(adenocarcinoma); 악성 가스트린종(gastrinoma, malignant); 담관암종(cholangiocarcinoma); 간세포암종(hepatocellular carcinoma); 간세포암종-담관암종 혼합형; 섬유주 선암종(trabecular adenocarcinoma); 선양낭포암(adenoid cystic carcinoma); 선종폴립(adenomatous polyp) 내 선암종; 가족성 대장 폴립증 선암종(adenocarcinoma, familial polyposis coli); 고형 암종(solid carcinoma); 악성 유암종(carcinoid tumor, malignant); 기관세지-폐포성 선암종(branchiolo-alveolar adenocarcinoma); 유두상 선암종(papillary adenocarcinoma); 혐색소 암종(chromophobe carcinoma); 호산세포 암종(acidophil carcinoma); 호산세포 선암종(oxyphilic adenocarcinoma); 호염구 암종(basophil carcinoma); 투명세포 선암종(clear cell adenocarcinoma); 과립 세포 암종(granular cell carcinoma); 여포성 선암종(follicular adenocarcinoma); 유두상 및 여포성 선암종; 비캡슐화 경화성 암종(nonencapsulating sclerosing carcinoma); 부신 외피 암종(adrenal cortical carcinoma); 자궁내막양 난소암(endometroid carcinoma); 피부 부속물 암종(skin appendage carcinoma); 아포크린 선암종(apocrine adenocarcinoma); 피지선암종(sebaceous adenocarcinoma); 귀지선암종(ceruminous adenocarcinoma); 점액표피양 암종(mucoepidermoid carcinoma); 낭선암종(cystadenocarcinoma); 유두상 낭선암종(papillary cystadenocarcinoma); 유두상 장액 낭선암종(papillary serous cystadenocarcinoma); 점소양 낭선암종(mucinous cystadenocarcinoma); 점소양 선암종(mucinous adenocarcinoma); 반지세포암종(signet ring cell carcinoma); 침윤성 도관 암종(infiltrating duct carcinoma); 수질암종(medullary carcinoma); 소엽암종(lobular carcinoma); 염증형 암종(inflammatory carcinoma); 포유동물의 파제트병(paget's disease); 세엽 세포 암종(acinar cell carcinoma); 선편평세포 암종(adenosquamous carcinoma); 편평상피화생을 동반한 선암종(adenocarcinoma w/squamous metaplasia); 악성 흉선종(thymoma, malignant); 악성 난소 기질 종양(ovarian stromal tumor, malignant); 악성 난포막세포종(thecoma, malignant); 악성 과립막세포종(granulosa cell tumor, malignant); 악성 남성모세포종(androblastoma, malignant); 세르톨리세포 암종(sertoli cell carcinoma); 악성 라이디히 세포종양(leydig cell tumor, malignant); 악성 지질 세포 종양(lipid cell tumor, malignant); 악성 부신경절종(paraganglioma, malignant); 비포유류의 악성 부신경절종(extra-mammary paraganglioma, malignant); 크롬친화세포종(pheochromocytoma); 사구맥관육종(glomangiosarcoma); 악성 흑색종(malignant melanoma); 무색소성 흑색종(amelanotic melanoma); 표재 확산성 흑색종(superficial spreading melanoma); 거대색소 모반 내 악성 흑색종(malig melanoma in giant pigmented nevus); 상피모양 세포 흑색종(epithelioid cell melanoma); 악성 청색모반(blue nevus, malignant); 육종(sarcoma); 섬유육종(fibrosarcoma); 악성 섬유성 조직구증(fibrous histiocytoma, malignant); 점액육종(myxosarcoma); 지방육종(liposarcoma); 평활근육종(leiomyosarcoma); 횡문근육종(rhabdomyosarcoma); 배아형 횡문근육종(embryonal rhabdomyosarcoma); 포상횡문근육종(alveolar rhabdomyosarcoma); 기질 암종(stromal sarcoma); 악성 혼합 종양(mixed tumor, malignant); 뮬러관 혼합 종양(mullerian mixed tumor); 빌름스종양(nephroblastoma); 간모세포종(hepatoblastoma); 암육종증(carcinosarcoma); 악성 간엽세포종(mesenchymoma, malignant); 악성 브레너 종양(brenner tumor, malignant); 악성 엽상종양(phyllodes tumor, malignant); 활막육종(synovial sarcoma); 악성 중피종(mesothelioma, malignant); 미분화배세포종(dysgerminoma); 배아암종(embryonal carcinoma); 악성 기형종(teratoma, malignant); 악성 난소 갑상선종(struma ovarii, malignant); 융모막암종(choriocarcinoma); 악성 중신종(mesonephroma, malignant); 혈관육종(hemangiosarcoma); 악성 혈관내피종(hemangioendothelioma, malignant); 카포시육종(kaposi's sarcoma); 악성 혈관주위세포종(hemangiopericytoma, malignant); 림프관육종(lymphangiosarcoma); 골육종(osteosarcoma); 측피질 골육종(juxtacortical osteosarcoma); 연골육종(chondrosarcoma); 악성 연골모세포종(chondroblastoma, malignant); 중간엽연골육종(mesenchymal chondrosarcoma); 골 거대 세포종(giant cell tumor of bone); 유잉육종(ewing's sarcoma); 악성 치원성종양(odontogenic tumor, malignant); 사기질모세포 치육종(ameloblastic odontosarcoma); 악성 사기질모세포종(ameloblastoma, malignant); 사기질모세포 섬유육종(ameloblastic fibrosarcoma); 악성 송과체종(pinealoma, malignant); 척색종(chordoma); 악성 신경교종(glioma, malignant); 뇌실막세포종(ependymoma); 별아교세포종(astrocytoma); 원형질 별아교세포종(protoplasmic astrocytoma); 원섬유성 별아교세포종(fibrillary astrocytoma); 별아교모세포종(astroblastoma); 교모세포종(glioblastoma); 핍돌기신경교종(oligodendroglioma); 핍돌기교아세포종(oligodendroblastoma); 원시 신경외배엽종(primitive neuroectodermal); 소뇌 육종(cerebellar sarcoma); 신경절아세포종(ganglioneuroblastoma); 신경모세포종(neuroblastoma); 망막모세포종(retinoblastoma); 후각 신경성 종양(olfactory neurogenic tumor); 악성 뇌수막종(meningioma, malignant); 신경섬유육종(neurofibrosarcoma); 악성 신경초종(neurilemmoma, malignant);

악성 과립 세포 종양(granular cell tumor, malignant); 악성 림프종(malignant lymphoma); 호지킨병(hodgkin's disease); 호지킨병(hodgkin's); 파라육아종(paragranuloma); 소림프구 악성 림프종(malignant lymphoma, small lymphocytic); 미만성 거대 세포 악성 림프종(malignant lymphoma, large cell, diffuse); 여포성 악성 림프종(malignant lymphoma, follicular); 균상 식육종(mycosis fungoides); 다른 특정 비-호지킨 림프종(non-hodgkin's lymphomas); 악성 조직구증(malignant histiocytosis); 다발성 골수종(multiple myeloma); 비만 세포 육종(mast cell sarcoma); 면역증식성 소장 질환(immunoproliferative small intestinal disease); 백혈병(leukemia); 림프성 백혈병(lymphoid leukemia); 형질세포성 백혈병(plasma cell leukemia); 적백혈병(erythroleukemia); 림프 육종세포 백혈병(lymphosarcoma cell leukemia); 골수성 백혈병(myeloid leukemia); 호염기성 백혈병(basophilic leukemia); 호산구성 백혈병(eosinophilic leukemia); 단핵구성 백혈병(monocytic leukemia); 비만세포성 백혈병(mast cell leukemia); 거대핵세포성 백혈병(megakaryoblastic leukemia); 골수성 육종(myeloid sarcoma); 및 모발상세포 백혈병일 수 있다..

[0263] 본 개시의 항체는 예를 들어, 암, 자가면역(autoimmunity), 이식 거부(transplantation rejection), 외상-후 면역 반응(post-traumatic immune responses), 이식편-대-숙주 병(graft-versus-host disease), 허혈(ischemia), 뇌졸중(stroke), 및 감염성 질환의 치료를 위하여, 예를 들어, HIV의 gp120과 같은 바이러스성 항원을 표적으로 함으로써 그 자체로 또는 약학 조성물의 형태로 대상체에 투여될 수 있다.

[0264] **6.11.추가적인 측면들 및 구현 예들**

[0265] 다른 측면들 및 구현 예들이 다음의 번호 매겨진 항목들에 제공된다.

[0266] 1. VH-CH3로 구성되는 중쇄(HC), 및 VL-CH3-CH2-CH3를 포함하는 경쇄(LC)를 포함하는 도메인-교환된(domain-exchanged) 항체로서, 여기서 상기 HC의 VH-CH3는 LC의 VL-CH3와 이량화되어 CH3LC/CH3HC 도메인 쌍을 포함하는 제1 도메인-교환된 LC/HC 이량체를 형성한다.

[0267] 2. 항목 1의 항체로서, 여기서 상기 경쇄는 VL-CH3(노브)-CH2-CH3로 추가로 정의되고, 상기 중쇄는 VH-CH3(홀)로 추가로 정의된다.

[0268] 3. 항목 1의 항체로서, 여기서 상기 경쇄는 VL-CH3(홀)-CH2-CH3로 추가로 정의되고, 상기 중쇄는 VH-CH3(노브)로 추가로 정의된다.

[0269] 4. 항목 1 내지 3 중 임의의 항체로서, 여기서 상기 경쇄는 제2 LC/HC 이량체를 더 포함하고, 상기 경쇄는 VL-CH3-CH2-CH3-VX1-CHX로 추가로 정의되고 상기 경쇄는 VX2-CHX2와 추가로 이량화된다.

[0270] 5. 항목 4의 항체로서, 여기서 VX1은 제2 VH 영역이고 VX2는 제2 VL 영역이다.

[0271] 6. 항목 4의 항체로서, 여기서 VX1은 제2 VL 영역이고 VX2는 제2 VH 영역이다.

[0272] 7. 항목 4 내지 6 중 임의의 항체로서, 여기서 CHX 및 CHX2는 CH3/CH3 이량체를 형성한다.

[0273] 8. 항목 4 내지 6 중 임의의 항체로서, 여기서 CHX 및 CHX2는 CH1/CL 이량체를 형성한다.

[0274] 9. 항목 4의 항체로서, 여기서 경쇄는 VL-CH3-CH2-CH3-VH1-CH1으로 추가로 정의되고 상기 VX2-CHX2는 VL1-CL이다.

[0275] 10. 항목 1 내지 3 중 임의의 항체로서, 여기서 상기 항체는 두 개의 경쇄를 포함하고, 제1 경쇄는 VL-CH3-CH2-CH3-VH1-CH1으로 추가로 정의되며, 제2 경쇄는 VL-CH3-CH2-CH3-VL1-CL로 추가로 정의되고, 상기 VH1-CL1은 VL1-CL과 이량화된다.

[0276] 11. 항목 1 내지 3 중 임의의 항체로서, 여기서 상기 항체는 2 개의 경쇄를 포함하고, 제1 경쇄는 VL-CH3-CH2-CH3-VH1-CH3로 추가로 정의되며, 제2 경쇄는 VL-CH3-CH2-CH3-VL1-CH3로 추가로 정의되고, 상기 VH1-CH3는 VL1-CH3와 이량화된다.

[0277] 12. 항목 11의 항체로서, 여기서 상기 VL1-CH3는 VL1-CH3(노브)로 추가로 정의되고, 상기 VH1-CH3는 VH1-CH3(홀)로 추가로 정의된다.

[0278] 13. 항목 1 내지 3의 항체로서, 여기서 상기 중쇄는 제2 LC/HC 이량체를 더 포함하고, 상기 중쇄는 VX1-CHX-VH-CH3로 추가로 정의되며 상기 중쇄는 VX2-CHX2와 추가로 이량화된다.

[0279] 14. 항목 13의 항체로서, 여기서 VX1은 제2 VH 영역이고 VX2는 제2 VL 영역이다.

[0280] 15. 항목 13의 항체로서, 여기서 VX1은 제2 VL 영역이고 VX2는 제2 VH 영역이다.

[0281] 16. 항목 13 내지 15 중 임의의 항체로서, 여기서 CHX 및 CHX2는 CH3/CH3 이량체를 형성한다.

[0282] 17. 항목 13 내지 15 중 임의의 항체로서, 여기서 CHX 및 CHX2는 CH1/CL 이량체를 형성한다.

[0283] 18. 항목 4의 항체로서, 여기서 상기 중쇄는 VH1-CH1-VH-CH3로 추가로 정의되고 상기 VX2-CHX2는 VL1-CL이다.

[0284] 19. 항목 4 내지 18 중 임의의 항체로서, 상기 제1 LC/HC 이량체는 제1 에피토프를 인식하는 제1 결합 부위를 포함하고, 상기 제2 LC/HC 이량체는 상기 제1 에피토프와 상이하거나 다른 항원으로부터 유래되는 제2 에피토프를 인식하는 제2 결합 부위를 포함하고, 상기 제1 LC/HC 이량체 또는 제2 LC/HC 이량체는 도메인-교환된 것이다.

[0285] 20. 항목 19의 항체로서, 여기서 상기 항체는 두 개의 제1 LC/HC 이량체 및 하나의 제2 LC/HC 이량체를 포함하는 이중 특이성 항체이다.

[0286] 21. 항목 19의 항체로서, 여기서 상기 항체는 두 개의 제1 LC/HC 이량체 및 두 개의 제2 LC/HC 이량체를 포함하는 이중 특이성 항체이다.

[0287] 22. 항목 1 내지 21 중 임의의 항체로서, 상기 HC 또는 LC는 하기 표 A에 나타낸 바와 같은 돌연변이를 포함한다.

[0288]

표 A – HC 및 LC 돌연변이

| HC | LC |
|---|---|
| G166D | N138K |
| G166D | N138D |
| G166K | N138K |
| G166K | N138D |
| P127E | E123K |
| P127E | WT |
| P127K | E123K |
| P127K | WT |
| A141C | F118C |
| H168C | T164C |
| L128C | F118C |
| P171C | S162C |

[0289] 23. 항목 1 내지 22 중 임의의 항체로서, 여기서 상기 항체는 IgG 항체이다.

[0290] 24. 항목 1 내지 23 중 임의의 항체로서, 여기서 상기 LC는 VL-CH3-CH2-CH3로 구성되고, 선택적으로 하나 이상의 링커/접합부 또는 힌지 영역을 더 포함한다.

[0291] 25. 항목 1 내지 24 중 임의의 항체로서, 여기서 상기 제1 LC/HC 이량체는 CH3(노브)/CH3(홀) 이량체, CH3Hc/CH3Hc 이량체를 특징으로 하거나, 또는 CH3LC/CH3LC 도메인의 동족(cognate) 쌍을 생성할 수 있는 조작된 CH3 도메인을 포함하며; 상기 경쇄는 CH2-CH3를 포함하는 Fc 사슬과 추가로 이량화되어 Fc 영역을 형성한다.

[0292] 26. 항목 1 내지 25 중 임의의 항체로서, 여기서 상기 경쇄는 CH2-CH3를 포함하는 Fc 사슬과 추가로 이량화되어 Fc 영역을 형성하고; 상기 Fc 영역은 CH3(노브)/CH3(홀) 이량체, CH3Hc/CH3Hc 이량체를 특징으로 하거나, 또는 CH3LC/CH3LC 도메인의 동족 쌍을 생성할 수 있는 조작된 CH3 도메인을 포함한다.

[0293] 27. 항목 25 내지 26 중 임의의 항체로서, 여기서 상기 조작된 CH3 도메인은 인간 IgG1의 CH3의 아미노산 서열 또는 인간 IgG1의 CH3와 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 이의 기능적 변이체를 포함하고, 상기 조작된 CH3 도메인은 다음 중 하나 이상을 포함한다:

[0294] a) 하나 이상의 노브 또는 홀 돌연변이, 바람직하게는 T366Y/Y407T, F405A/T394'W, T366Y:F405A/T394'W:Y407T, T366W/Y407'A 및 S354C:T366W/Y349'C:T366'S:L368'A:Y407V 중 임의의 노브 또는

홀 돌연변이;

[0295] b) 다른 동족 CH3 도메인의 시스테인 잔기에 공유 결합되는 시스테인 잔기로서, 이에 따라 도메인 간 이황화 결합을 도입하고, 바람직하게는 두 CH3 도메인의 C-말단을 연결하는 시스테인 잔기;

[0296] c) 인간 IgA 및 IgG CH3 서열의 교대성 분절(alternating segments)로 이루어지는 SEED CH3 이종이량체(heterodimers); 및/또는

[0297] d) 반발성(repulsive) 전하가 이종이량체 형성을 억제하는 하나 이상의 돌연변이로서, 바람직하게는 다음 중 임의의 돌연변이: K409D/D399, K409D/D399'R, K409E/D399, K409E/D399'R, K409D:K392D/D399'K:E356'K 또는 K409D:K392D:K370D/ D399'K:E356'K:E357'K; 및/또는

[0298] e) 이종이량체 형성 및/또는 열안정성(thermostability)을 위해 선택되는 하나 이상의 돌연변이로서, 바람직하게는 다음 중 임의의 돌연변이이고: T350V:L351Y:F405A:Y407V/T350V:T366L:K392L:T394W, T350V:L351Y:F405A:Y407V/T350V:T366L:K392M:T394W, L351Y:F405A:Y407V/T366L:K392M:T394W, F405A:Y407V/T366L:K392M:T394W, 또는 F405A:Y407V/T366L:T394W, 여기서 넘버링은 Eu 지수에 따른 것이다.

[0299] 28. 항목 1 내지 25 중 임의의 항체로서, 여기서 임의의 VH 또는 VL 도메인 및 CH 도메인 사이의 접합부는,

[0300] a) 인간 IgG 항체의 CH2 및 CH3 도메인 사이의 접합부의 적어도 일부, 및/또는

[0301] b) 인간 IgG 항체의 VL 및 CL 도메인 사이의 접합부의 적어도 일부; 및/또는

[0302] c) 인간 IgG 항체의 VH 및 CH1 도메인 사이의 접합부의 적어도 일부; 및/또는

[0303] d) 5 내지 20 아미노산, 바람직하게는 8 내지 15 아미노산 길이를 갖는 인공 연결 서열

[0304] 인 아미노산 서열을 포함한다.

[0305] 29. 항목 1 내지 28 중 어느 하나의 항체로서, 여기서 상기 항체는:

[0306] a) 임의의 CH2 및/또는 CH3 도메인에 위치하는 Fc 감마 수용체 결합 부위 및/또는 C1 q 결합 부위를 포함하는 반응기-기능성 항체(effector-function competent antibody)이거나;

[0307] b) Fc 감마 수용체 및/또는 C1 q와의 결합이 결핍된 Fc 영역을 포함하는 반응기-음성 항체(effector-negative antibody)이거나; 또는

[0308] c) 임의의 CH2 및/또는 CH3 도메인에 위치하는 pH-의존성 FcRn 결합 부위를 포함한다.

[0309] 30. 항목 1 내지 29 중 임의의 항체로서, 여기서 상기 항체는 표적을 인식하는 결합 부위를 포함하는 중쇄 및 경쇄 쌍을 포함하는, 1가 결합 부위에 의해 제1 표적을 특이적으로 인식하며, 상기 경쇄는 불변 영역으로 구성되는 또 다른 경쇄에 결합되어 Fc 영역을 형성한다.

[0310] 31. 항목 30의 항체로서, 여기서 상기 항체는 제2 표적을 특이적으로 인식하는 이중 특이성 항체이며, 상기 제1 표적은 TNF-α, CD3, CD16, CD47, 또는 PD-1이고, 상기 제2 표적은 EGFR, ROR1 또는 HER2, HER3, Lag-3이다.

[0311] 32. 항목 1 내지 31 중 임의의 항체로서, 여기서 상기 항체의 불변 도메인은 각각의 인간 IgG1 항체 도메인과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 인간 유래의 것이거나 인간화된 것이거나 또는 이의 기능적으로 활성인 변이체이다.

[0312] 33. 항목 1 내지 32 중 임의의 항체를 인코딩하는 분리된 핵산.

[0313] **6.12.실시예**

[0314] 하기 실시예는 제한이 아닌 예시의 방법으로 제공된다.

[0315] **6.12.1.실시예 1: 2가 단일 특이성 구조물 및 2가 이중 특이성 구조물**

[0316] 표준 분자 생물학 절차를 사용하여 TNFa를 인식하는 2가 단일 특이성 B-바디를 하기 구조 (VL(세톨리주맙)(certolizumab)-CH3(노브)-CH2-CH3/VH(세톨리주맙)-CH3(홀))로 구축하였다. 본 구조물에서,

[0317] 제1 폴리펩티드 사슬 (SEQ ID NO:1)

[0318] 도메인 A = VL (세톨리주맙)

[0319] 도메인 B = CH3 (IgG1) (노브: S354C+T366W)

[0320] 도메인 D = CH2 (IgG1)

[0321] 도메인 E = CH3 (IgG1)

[0322] 제2 폴리펩티드 사슬 (SEQ ID NO:2)

[0323] 도메인 F = VH (세톨리주맙)

[0324] 도메인 G = CH3 (IgG1) (홀:Y349C, T366S, L368A, Y407V)

[0325] 제3 폴리펩티드 사슬:

[0326] 제1 폴리펩티드 사슬과 동일

[0327] 제4 폴리펩티드 사슬:

[0328] 제2 폴리펩티드 사슬과 동일

[0329] 이다.

[0331] *도메인 및 폴리펩티드 사슬 참조는 도 3에 따른다. 전체적인 구조물 구조는 도 4에 도시된다. "(VL)"로 약칭되는 도메인 A를 갖는 상기 제1 폴리펩티드 사슬의 서열은 SEQ ID NO:1에 제공된다. "(VH)"로 약칭되는 도메인 F를 갖는 상기 제2 폴리펩티드 사슬의 서열은 SEQ ID NO:2에 제공된다.

[0332] 상기 전장(full-length) 구조물을 대장균(E.coli) 무세포 단백질 합성 발현 시스템 내에서 26℃에서 약 18시간 동안 서서히 교반하면서 발현시켰다. 발현 후, 상기 무세포 추출물을 원심분리하여 불용성 물질을 펠릿(pellet)화 하고 상층액을 10배 운동 완충액(10x Kinetic Buffer, Forte Bio)으로 2배 희석하여 바이오 층 간섭계를 위한 피분석물로 사용하였다.

[0333] 비오틴화된(biotinylated) TNFα를 스트렙타비딘(streptavidin) 센서 상에 고정시켜 약 1.5nm의 파동 시프트 반응(wave shift response)을 나타내도록 하였다. 10배 운동 버퍼로 기준선을 확립한 후에, 상기 센서를 항체 구조물 피분석물 용액에 침지시켰다. 상기 구조물은, 세톨리주맙의 종래의 IgG 포맷과 비교하여, 약 3nm의 반응을 나타냈으며, 이는 2가 단일 특이성 구조물의 기능적, 전장 항체로의 조립 능력을 입증하였다. 결과는 도 5에 나타내었다.

[0334] 본 발명자들은 또한 하기의 도메인 구조를 갖는 2가 이중 특이성 항체를 구축하였다:

[0335] 제1 폴리펩티드 사슬: VL-CH3-CH2-CH3(노브)

[0336] 제2 폴리펩티드 사슬: VH-CH3

[0337] 제3 폴리펩티드 사슬: VL-CL-CH2-CH3(홀)

[0338] 제4 폴리펩티드 사슬 VH-CH1.

[0339] 상기 서열들 (가변 영역 서열은 제외)은 SEQ ID NO:3 (제1 폴리펩티드 사슬), SEQ ID NO:4 (제2 폴리펩티드 사슬), SEQ ID NO:5 (제3 폴리펩티드 사슬), SEQ ID NO:6 (제4 폴리펩티드 사슬)에 각각 제공된다.

[0340] **6.12.2.실시예 2: 2가 이중 특이성 B-바디 "BC1"**

[0341] 본 발명자들은 PD1 및 제2 항원인 "항원 A"에 특이적인, "BC1"이라 명명된, 2가 이중 특이성 구조물을 구축하였다. "BC1"의 핵심적인 특징은 도 6에 도시된다.

[0342] 보다 상세하게는, 도 3에 따른 도메인 및 폴리펩티드 사슬을 참조로, 천연 서열로부터의 변형이 괄호 안에 표시되어 있는, 상기 구조는 다음과 같다:

[0343] 제1 폴리펩티드 사슬 (SEQ ID NO:8)

[0344] 도메인 A = VL ("항원 A")

[0345] 도메인 B = CH3 (T366K; 445K, 446S, 447C 트리펩티드 삽입)

[0346] 도메인 D = CH2

[0347] 도메인 E = CH3 (T366W, S354C)

[0348] 제2 폴리펩티드 사슬 (SEQ ID NO:9):

[0349] 도메인 F = VH ( “항원 A” )

[0350] 도메인 G = CH3 (L351D; 445G, 446E, 447C 트리펩티드 삽입)

[0351] 제3 폴리펩티드 사슬 (SEQ ID NO:10):

[0352] 도메인 H = VL ( “Nivo” )

[0353] 도메인 I = CL (카파)

[0354] 도메인 J = CH2

[0355] 도메인 K = CH3 (Y349C, D356E, L358M, T366S, L368A, Y407V)

[0356] 제4 폴리펩티드 사슬 (SEQ ID NO:11):

[0357] 도메인 L = VH ( “Nivo” )

[0358] 도메인 M = CH1.

[0359] 상기 A 도메인 (SEQ ID NO: 12) 및 F 도메인 (SEQ ID NO: 16)은 “항원 A”에 특이적인 항원 결합 부위(A:F)를 형성한다. 상기 H 도메인은 니볼루맙(nivolumab)으로부터의 VH 서열을 갖고 상기 L 도메인은 니볼루맙으로부터의 VL 서열을 가지며; H 및 L은 인간 PD1에 특이적인 항원 결합 부위(H:L)을 형성하도록 결합한다.

[0360] 상기 B 도메인 (SEQ ID NO: 13)은 수 개의 돌연변이(T366K, 445K, 446S, 및 447C 삽입)를 갖는 인간 IgG1 CH3의 서열을 갖는다. 상기 T366K 돌연변이는 도메인 G 내의 L351D 잔기의 전하 쌍 동족체(cognate)이다. 도메인 B 상의 상기 “447C” 잔기는 C-말단 KSC 트리펩티드 삽입으로부터 유래한다.

[0361] 도메인 D (SEQ ID NO: 14)는 인간 IgG1 CH2의 서열을 갖는다.

[0362] 도메인 E (SEQ ID NO: 15)는 돌연변이 T366W 및 S354C를 갖는 인간 IgG1 CH3의 서열을 갖는다. 상기 366W는 “노브” 돌연변이이다. 상기 354C는 도메인 K 내에서 동족 349C 돌연변이와 이황화 결합을 형성할 수 있는 시스테인을 도입한다.

[0363] 도메인 G (SEQ ID NO: 17)는 다음의 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 CH3의 서열을 갖는다: L351D, 및 445G, 446E, 447C 트리펩티드 삽입. 상기 L351D 돌연변이는 도메인 B T366K 돌연변이와 동족인 전하 쌍을 도입한다. 도메인 G 상의 상기 “447C” 잔기는 C-말단 GEC 트리펩티드 삽입으로부터 유래한다.

[0364] 도메인 I (SEQ ID NO: 19)는 인간 C 카파 경쇄 (Cκ)의 서열을 갖는다.

[0365] 도메인 J (SEQ ID NO: 20)는 인간 IgG1 CH2 도메인의 서열을 갖고, 도메인 D의 서열과 동일하다.

[0367] *도메인 K (SEQ ID NO: 21)는 다음의 변형을 갖는 인간 IgG1 CH3의 서열을 갖는다: Y349C, D356E, L358M, T366S, L368A, Y407V. 상기 349C 돌연변이는 도메인 E 내에서 동족 354C 돌연변이와 이황화 결합을 형성할 수 있는 시스테인을 도입한다. 상기 356E 및 L358M은 면역원성을 감소시키는 동종동질이형체 아미노산을 도입한다. 상기 366S, 368A, 및 407V는 “홀” 돌연변이이다.

[0368] 도메인 M (SEQ ID NO: 23)은 인간 IgG1 CH1 영역의 서열을 갖는다.

[0369] “BC1”은 100μg/ml 초과 농도에서의 포유류 발현을 사용하여 높은 수준으로 용이하게 발현될 수 있다.

[0370] 본 발명자들은 2가 이중 특이성 “BC1” 단백질이 써모피셔(ThermoFisher)의 CH1-특이성 CaptureSelect™ 친화성 수지를 사용하여 단일 단계로 쉽게 정제될 수 있음을 발견하였다.

[0371] 도 7a에 도시된 바와 같이, SEC 분석은 단일 단계의 CH1 친화성 정제 단계가 >98%가 단량체인 겔 여과를 통해 단일의 단분산 피크를 산출함을 입증한다. 도 7b는 CrossMab 2가 항체 구조물의 SEC 분석의 비교 문헌 데이터를 나타낸다.

[0372] 도 8a는 CaptureSelect™ CH1 친화성 수지를 사용한 일-단계 정제 후의 "BC1"의 양이온 교환 크로마토그래피 용리 프로파일로서, 단일의 단단한 피크를 나타낸다. 도 8b는 표준 단백질 A 정제를 사용한 정제 후의 "BC1"의 양이온 교환 크로마토그래피 용리 프라포일로서, 불완전한 조립(assembly) 산물의 공동-정제(co-purification)와 일치하는 추가적인 용리 피크를 나타낸다.

[0373] 도 9는 비-환원 조건 하에서의 SDS-PAGE 겔을 나타낸다. 레인 3에서 볼 수 있듯이, CH1 친화성 수지를 이용한 "BC1"의 단일 단계 정제는 거의 균질한 단일 띠(band)를 제공하고, 레인 4는 후속 양이온 폴리싱(polishing) 단계를 갖는 최소한의 추가적인 정제를 나타낸다. 대조적으로, 레인 7은 표준 단백질 A 정제를 사용한 덜 실질적인 정제를 나타내며, 레인 8-10은 양이온 교환 크로마토그래피를 사용한 단백질 A 정제 물질의 추가적인 정제를 나타낸다.

[0374] 도 10은 비-환원 조건 및 환원 조건 둘 다 하에서의 단일 단계 CH1-친화성 정제 후의 "BC1"의 SDS-PAGE 겔(패널 a)과 참고 문헌에 공개된 바와 같은 비-환원 및 환원 조건 하에서의 CrossMab 이중 특이성 항체의 SDS-PAGE 겔(패널 b)을 비교한다.

[0375] 도 11은 환원 조건 하에서 두 개의 뚜렷한 중쇄(도 11a) 및 두 개의 뚜렷한 경쇄(도 11b)를 나타내는 "BC1"의 질량 분광 분석을 나타낸다. 도 12의 질량 분광분석 데이터는 정제 후 불완전한 페어링이 없음을 보여준다.

[0376] "BC1" B-바디 설계의 장기간 안정성을 평가하기 위해 가속 안정성 시험을 수행하였다. 정제된 B-바디를 PBS 완충액 내에 8.6mg/ml로 농축시키고 40℃에서 배양하였다. 구조적 완전성은 Shodex KW-803 컬럼을 갖는 분석적 크기 배제 크로마토그래피 (size exclusion chromatography, SEC)를 사용하여 매주 측정하였다. 상기 구조적 완전성은 집합체(aggregates) 형성과 관련하여 손상되지 않은(intact) 단량체(% 단량체)의 비율을 측정하여 결정되었다. 데이터는 도 13에 나타내었다. IgG 대조군 1은 우수한 안정성 특성을 갖는 양성 대조군이다. IgG 대조군 2는 배양 조건 하에서 응집되는 것으로 알려진 음성 대조군이다. 상기 "BC1" B-바디는 분석적 SEC에 의해 측정된 구조적 완전성의 어떠한 소실도 없이 8주 동안 배양되었다.

[0377] 본 발명자들은 또한 "BC1"이 약 72℃의 2가 구조물의 TM을 갖는, 높은 열안정성을 가짐을 알아냈다.

[0378] 표 1은 핵심적인 발전가능성(developability) 특성들에 있어서 "BC1"과 CrossMab을 비교한 것이다:

표 1

[0379]

**표 1**

| **파라미터** | **단위** | **로슈(Roche) CrossMab*** | **"BC1"** |
|---|---|---|---|
| 단백질 A/SEC 후의 정제 수율 | mg/L | 58.5 | 300 |
| 정제 후의 균질성(Homogeneity) | % SEC 영역(Area) | 50-85 | 98 |
| 변성(Denaturation) 온도 (Tm) | ℃ (섭씨 ~도) | 69.2 | 72 |

[0380] *출처: Schaefer *et al.* (*Proc Natl Acad Sci USA*. 2011 Jul 5;108(27):11187-92)

[0381] **6.12.3.실시예 3: 2가 이중 특이성 B-바디 "BC6"**

[0382] 본 발명자들은 "BC1"과 동일하지만 잔기 366 상의 도메인 B 및 잔기 351 상의 도메인 G 내의 야생형 잔기를 보유하는, "BC6"로 명명되는, 2가 이중 특이성 B-바디를 구축하였다. 따라서 "BC6"는 "BC1"에서 도메인 B 및 도메인 G의 올바른 페어링을 용이하게 하기 위해 설계된 전하-쌍 동족 T366K 및 L351D가 결여되어 있다. 상기 "BC6" 구조의 핵심적인 특징은 도 14에 도시되어 있다.

[0383] "BC1"에 존재하는 전하-쌍 잔기의 부재에도 불구하고, 본 발명자들은 CH1 친화성 수지를 사용한 "BC6"의 단일 단계 정제가 고도로 균질한 샘플을 생성한다는 것을 발견하였다. 도 15a는 CaptureSelect™ CH1 친화성 수지를 사용한 일-단계 정제 후의 "BC6"의 SEC 분석을 나타낸다. 상기 데이터는 단일 단계 CH1 친화성 정제가 "BC1"에서 관찰된 것과 유사한 단일의 단분산 피크를 산출함을 나타내며, 이는 폴리펩티드 사슬 1과 2 및 폴리펩티드 사슬 3과 4 사이의 이황화 결합이 손상되지 않음을 입증한다. 상기 크로마토그램은 또한 비-공유 집합체가 없음을 나타낸다.

[0384] 도 15b는 단일-단계 CH1 친화성 정제 후의 "BC6"의 제1 로트(lot)가 로딩된 레인 1, 단일-단계 CH1 친화성 정제 후의 "BC6"의 제2 로트가 로딩된 레인 2와 함께 비-환원 조건 하에서의 SDS-PAGE 겔을 나타낸다. 레인 3

및 4는 추가적인 정제가 CH1 친화성 정제에 이은 이온 교환 크로마토그래피로 달성될 수 있음을 나타낸다.

[0385] **6.12.4.실시예 4: 2가 이중 특이성 B-바디 "BC28", "BC29", "BC30", "BC31"**

[0386] 본 발명자들은 "BC1" 및 "BC6"에 존재하는 C-말단 이황화물(disulfide)에 대하여 대체 가능한 S-S 결합으로서 도메인 B 및 G 내의 CH3 인터페이스 내에서 조작된 이황화물을 갖는 2가 1x1 이중 특이성 B-바디 "BC28", "BC29", "BC30" 및 "BC31"를 구축하였다. 문헌(literature)은 CH3 인터페이스 이황화 결합이 Fc CH3 도메인의 문맥 상에서 직교성(orthogonality)을 강화하기에 불충분함을 나타낸다. 이들 B-바디 구조물의 일반적인 구조는 아래에 요약된 "BC28"의 핵심적인 특징과 함께 도 16에 개략적으로 도시된다:

[0387] 폴리펩티드 사슬 1: "BC28" 사슬 1 (SEQ ID NO:24)

[0388] 도메인 A = VL (항원 "A")

[0389] 도메인 B = CH3 (Y349C; 445P, 446G, 447K 삽입)

[0390] 도메인 D = CH2

[0391] 도메인 E= CH3 (S354C, K366W)

[0392] 폴리펩티드 사슬 2: "BC28" 사슬 2 (SEQ ID NO:25)

[0393] 도메인 F = VH (항원 "A")

[0394] 도메인 G = CH3 (S354C; 445P, 446G, 447K 삽입)

[0395] 폴리펩티드 사슬 3: "BC1" 사슬 3 (SEQ ID NO:10)

[0396] 도메인 H = VL ("Nivo")

[0397] 도메인 I = CL (카파)

[0398] 도메인 J = CH2

[0399] 도메인 K = CH3 (Y349C, D356E, L358M, T366S, L368A, Y407V)

[0400] 폴리펩티드 사슬 4: "BC1" 사슬 4 (SEQ ID NO:11)

[0401] 도메인 L = VH ("Nivo")

[0402] 도메인 M = CH1

[0403] "BC28" A:F 항원 결합 부위는 "항원 A"에 특이적이다. "BC28" H:L 항원 결합 부위는 PD1(니볼루맙 서열)에 특이적이다. "BC28" 도메인 B는 야생형 CH3와 비교하여 다음의 변형을 갖는다: Y349C; 445P, 446G, 447K 삽입. "BC28" 도메인 E는 야생형 CH3와 비교하여 다음의 변형을 갖는다: S354C, K366W. "BC28" 도메인 G는 야생형과 비교하여 다음의 변형을 갖는다: S354C; 445P, 446G, 447K 삽입.

[0404] 따라서 "BC28"은 도메인 B의 잔기 349C 상의 조작된 시스테인 및 도메인 G의 잔기 354C 상의 조작된 시스테인("349C-354C")을 갖는다.

[0405] "BC29"는 도메인 B의 잔기 351C 및 도메인 G의 351C 상에 조작된 시스테인("351C-351C"을 갖는다. "BC30"은 도메인 B의 잔기 354C 및 도메인 G의 349C 상에 조작된 시스테인("354C-349C")을 갖는다. BC31은 잔기 394C 상의 조작된 시스테인 및 도메인 G의 394C 상의 조작된 시스테인("394C-394C")을 갖는다. BC32는 도메인 B의 잔기 407C 및 도메인 G의 407C 상에 조작된 시스테인("407C-407C")을 갖는다.

[0406] 도 17은 CaptureSelect™ CH1 친화성 수지를 사용한 일-단계 정제 후 비-환원 조건 하에서의 SDS-PAGE 분석을 나타낸다. 레인 1 및 3은 손상되지 않은 "BC28" (레인 1) 및 "BC30" (레인 3)의 높은 수준의 발현 및 실질적인 균질성을 나타낸다. 레인 2는 BC29의 올리고머화를 나타낸다. 레인 4 및 5는, 각각 BC31 및 BC32의 빈약한 발현, 및 BC32에서의 불충분한 결합을 나타낸다. Genentech에 의해 보고된 이황화 페어링인, 도메인 B 내의 잔기 392 및 도메인 G 내의 399 상에 도입된 시스테인("392C-399C")을 갖는 또 다른 구조물, BC9는, SDS PAGE 상에서 올리고머화를 나타냈다 (데이터 미도시).

[0407] 도 18은 CaptureSelect™ CH1 친화성 수지를 사용한 일-단계 정제 후의 "BC28" 및 "BC30"의 SEC 분석을 나타낸다. 본 발명자들은 또한 "BC28"이 단백질 A 수지를 사용한 단일 단계 정제를 사용하여 쉽게 정제될 수 있

음을 확인하였다 (결과 미도시).

[0408] **6.12.5.실시예 5: 2가 이중 특이성 B-바디 "BC44"**

[0409] **도 19**는 현재 바람직한 2가 이중 특이성 1x1 구조물인, 2가 이중 특이성 1x1 B-바디 "BC44"의 일반적인 구조를 나타낸다.

[0410] 제1 폴리펩티드 사슬 ("BC44" 사슬 1) (SEQ ID NO: 32)

[0411] 도메인 A = VL (항원 "A")

[0412] 도메인 B = CH3 (P343V; Y349C; 445P, 446G, 447K 삽입)

[0413] 도메인 E = CH2

[0414] 도메인 E = CH3 (S354C, K366W)

[0415] 제2 폴리펩티드 사슬 (= "BC28" 폴리펩티드 사슬 2) (SEQ NO: 25)

[0416] 도메인 F= VH (항원 "A")

[0417] 도메인 G = CH3 (S354C; 445P, 446G, 447K 삽입)

[0418] 제3 폴리펩티드 사슬 (="BC1" 폴리펩티드 사슬 3) (SEQ ID NO: 10)

[0419] 도메인 H = VL ("Nivo")

[0420] 도메인 I = CL (카파)

[0421] 도메인 J = CH2

[0422] 도메인 K = CH3 (Y349C, D356E, L358M, T366S, L368A, Y407V)

[0423] 제4 폴리펩티드 사슬 (="BC1" 폴리펩티드 사슬 4) (SEQ ID NO: 11)

[0424] 도메인 L = VH ("Nivo")

[0425] 도메인 M = CH1.

[0426] **6.12.6.실시예 6: 가변-CH3 접합부 공학(engineering)**

[0427] 본 발명자들은 2가 1x1 B-바디 구조물의 발현 수준, 조립 및 안정성을 평가하기 위해, 도메인 A 및 B 사이의 VL-CH3 접합부와 도메인 F 및 G 사이의 VH-CH3 접합부를 돌연변이시킨 일련의 변이체들을 제조하였다. T 세포 에피토프의 도입을 감소시키기 위한 많은 해결책들이 있을 수 있지만, 본 발명자들은 VL, VH 및 CH3 도메인 내에 자연적으로 존재하는 잔기만을 사용하기로 하였다. 상기 도메인 구조의 구조적 평가는 바람직한 서열 조합을 더욱 제한한다. 하기의 표 2 및 표 3은 "BC1" 및 다른 2가 구조물을 기반으로 하는 몇몇 접합 지점의 변형들(junctional variants)에 대한 접합부(junctions)를 나타낸다.

*표 2*

[0428] 표 2 - 제1 폴리펩티드 사슬에 대한 가변 도메인/불변 도메인 접합부의 변이체

| | VL | | | | | | CH3 | | | | 서열 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 변이체 | 106 | 107 | 108 | 109 | 110 | 111 | 343 | 344 | 345 | 346 | |
| BC1 | I | K | R | T | | | P | R | E | P | IKRTPREP (SEQ ID NO: 57) |
| BC13 | I | K | R | T | | | P | R | E | P | IKRTPREP(SEQ ID NO: 57) |
| BC14 | I | K | R | T | | | P | R | E | P | IKRTPREP(SEQ ID NO: 57) |
| BC15 | I | K | R | T | V | | | R | E | P | IKRTVREP(SEQ ID NO: 58) |
| BC16 | I | K | R | T | | | | R | E | P | IKRTREP(SEQ ID NO: 59) |
| BC17 | I | K | R | T | V | | P | R | E | P | IKRTVPREP(SEQ ID NO: 60) |
| BC24 | I | K | R | T | | | P | R | E | P | IKRTPREP(SEQ ID NO: 57) |
| BC25 | I | K | R | T | | | P | R | E | P | IKRTPREP(SEQ ID NO: 57) |
| BC26 | I | K | R | T | V | A | | | E | P | IKRTVAEP(SEQ ID NO: 61) |
| BC27 | I | K | R | T | V | A | P | R | E | P | IKRTVAPREP(SEQ ID NO: 62) |
| BC44 | I | K | R | T | | | | R | E | P | IKRTREP(SEQ ID NO: 59) |

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| BC45 | I | K | R | T | | | P | R | E | P | IKRTPREP(SEQ ID NO: 57) |
| BC5 | I | K | R | T | | | P | R | E | P | IKRTPREP(SEQ ID NO: 57) |
| BC6 | I | K | R | T | | | P | R | E | P | IKRTPREP(SEQ ID NO: 57) |
| BC28 | I | K | R | T | | | P | R | E | P | IKRTPREP(SEQ ID NO: 57) |
| BC30 | I | K | R | T | | | P | R | E | P | IKRTPREP(SEQ ID NO: 57) |

*표 3*

[0429] 표 3 - 제2 폴리펩티드 사슬에 대한 가변 도메인/불변 도메인 접합부의 변이체

| | VH | | | | | | | CH3 | | | | 서열 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 변이체 | 112 | 113 | 114 | 115 | 116 | 117 | 118 | 343 | 344 | 345 | 346 | |
| BC1 | S | S | A | S | | | | P | R | E | P | SSASPREP (SEQ ID NO: 63) |
| BC13 | S | S | A | S | T | | | | R | E | P | SSASTREP(SEQ ID NO: 64) |
| BC14 | S | S | A | S | T | | | P | R | E | P | SSASTPREP(SEQ ID NO: 65) |
| BC15 | S | S | A | S | | | | P | R | E | P | SSASPREP(SEQ ID NO: 63) |
| BC16 | S | S | A | S | | | | P | R | E | P | SSASPREP(SEQ ID NO: 63) |
| BC17 | S | S | A | S | | | | P | R | E | P | SSASPREP(SEQ ID NO: 63) |
| BC24 | S | S | A | S | T | K | G | | | E | P | SSASTKGEP (SEQ ID NO: 66) |
| BC25 | S | S | A | S | T | K | G | | R | E | P | SSASTKGREP(SEQ ID NO: 67) |
| BC26 | S | S | A | S | | | | P | R | E | P | SSASPREP(SEQ ID NO: 63) |
| BC27 | S | S | A | S | | | | P | R | E | P | SSASPREP(SEQ ID NO: 63) |
| BC44 | S | S | A | S | | | | P | R | E | P | SSASPREP(SEQ ID NO: 63) |
| BC45 | S | S | A | S | | | | P | R | E | P | SSASPREP(SEQ ID NO: 63) |
| BC5 | S | S | A | S | | | | P | R | E | P | SSASPREP(SEQ ID NO: 63) |
| BC6 | S | S | A | S | | | | P | R | E | P | SSASPREP(SEQ ID NO: 63) |
| BC28 | S | S | A | S | | | | P | R | E | P | SSASPREP(SEQ ID NO: 63) |
| BC30 | S | S | A | S | | | | P | R | E | P | SSASPREP(SEQ ID NO: 63) |

[0430] 도 20은 40℃에서의 가속 안정성 시험 프로토콜의 표시된 주(indicated week)에서의 “BC15” 및 “BC16” 샘플의 크기 배제 크로마토그래피를 나타낸다. “BC15”는 안정한 상태로 유지되었으며; “BC16”은 시간이 지남에 따라 불안정한 것으로 드러났다. **6.12.7.실시예 7: 3가 2x1 이중 특이성 B-바디 구조물 (“BC1-2x1”)**

[0431] 본 발명자들은 “BC1”에 기초하여 3가 2x1 이중 특이성 B-바디 “BC1-2x1”을 구축하였다. 상기 구조의 핵심적인 특징은 도 22에 도시된다.

[0432] 보다 상세하게는, 도 21에 요약된 도메인 및 폴리펩티드 사슬 참조를 사용하여,

[0433] 제1 폴리펩티드 사슬

[0434] 도메인 N = VL (“항원 A”)

[0435] 도메인 O = CH3 (T366K, 447C)

[0436] 도메인 A = VL (“항원 A”)

[0437] 도메인 B = CH3 (T366K, 477C)

[0438] 도메인 D = CH2

[0439] 도메인 E = CH3 (노브, 354C)

[0440] 제5 폴리펩티드 사슬 (= “BC1” 사슬 2)

[0441] 도메인 P = VH (“항원 A”)

[0442] 도메인 Q = CH3 (L351D, 447C)

[0443] 제2 폴리펩티드 사슬 (= “BC1” 사슬 2)

[0444] 도메인 F = VH (“항원 A”)

[0445] 도메인 G = CH3 (L351D, 447C)

[0446] 제3 폴리펩티드 사슬 (= “BC1” 사슬 3)

[0447] 도메인 H = VL (“Nivo”)

[0448] 도메인 I = CL (카파)

[0449] 도메인 J = CH2

[0450] 도메인 K = CH3 (홀, 349C)

[0451] 제4 폴리펩티드 사슬 (= “BC1” 사슬 4)

[0452] 도메인 L = VH (“Nivo”)

[0453] 도메인 M = CH1

[0454] 이다.

[0455] 도 23은 써모피셔(ThermoFisher) Expi293 일시적 트랜스펙션 시스템을 사용하여 발현된 단백질의 비-환원 SDS-PAGE를 나타낸다.

[0456] 레인 1은 CaptureSelect™ CH1 친화성 수지를 사용한 일-단계 정제 후의 3가 2x1 “BC1-2X1” 단백질의 용리액을 나타낸다. 레인 2는 CaptureSelect™ CH1 친화성 수지를 사용한 일-단계 정제 후의 저분자량의, 더 빠르게 이동하는, 2가 “BC1” 단백질을 나타낸다. 레인 3-5는 단백질 A를 사용한 “BC1-2x1”의 정제를 나타낸다. 레인 6 및 7은 CH1 친화성 수지를 사용한 “BC1-2x1”의 정제를 나타낸다.

[0457] 도 24는 옥텟(Octet, Pall ForteBio) 분석을 사용하여 2가 “BC1” 구조물의 결합 활성을 3가 2x1 “BC1-2x1” 구조물의 결합 활성과 비교한다. 비오틴화된 항원 “A”는 표면 상에 고정되고, 상기 항체 구조물은 결합 분석을 위해 상기 표면 상을 통과한다.

[0458] **6.12.8.실시예 8: 3가 2x1 삼중 특이성 B-바디 구조물 (“TB111”)**

[0459] 본 발명자들은 **도 25**에 개략적으로 도시된 구조를 갖는 3가 2x1 삼중 특이성 분자인 “TB111”을 설계하였다. 도 21에 도시된 도메인 네이밍(naming) 협약(conventions)을 참조하여, TB111은 다음의 구조를 갖는다 (“Ada”는 아달리무맙(adalimumab)으로부터의 V 영역을 나타낸다):

[0460] 폴리펩티드 사슬 1

[0461] 도메인 N: VH (“Ada”)

[0462] 도메인 O: CH3 (T366K, 394C)

[0463] 도메인 A: VL (“항원 A”)

[0464] 도메인 B: CH3 (T366K, 349C)

[0465] 도메인 D: CH2

[0466] 도메인 E: CH3 (노브, 354C)

[0467] 폴리펩티드 사슬 5

[0468] 도메인 P: VL (“Ada”)

[0469] 도메인 Q: CH3 (L351D, 394C)

[0470] 폴리펩티드 사슬 2

[0471] 도메인 F: VH (“항원 A”)

[0472] 도메인 G: CH3 (L351D, 351C)

[0473] 폴리펩티드 사슬 3

[0474] 도메인 H: VL ( “Nivo” )

[0475] 도메인 I: CL (카파)

[0476] 도메인 J: CH2

[0477] 도메인 K: CH3 (홀, 349C)

[0478] 폴리펩티드 사슬 4 (= “BC1” 사슬 4)

[0479] 도메인 L: VH ( “Nivo” )

[0480] 도메인 M: CH1

[0481] 본 구조물은 발현하지 않았다.

[0482] **6.12.9.실시예 9: 3가 1x2 이중 특이성 구조물 ( “BC28-1x2” )**

[0483] 본 발명자들은 하기의 도메인 구조를 갖는 3가 1x2 이중 특이성 B-바디를 구축하였다:

[0485] *제1 폴리펩티드 사슬 (= “BC28” 사슬 1) (SEQ ID NO: 24)

[0486] 도메인 A = VL (항원 “A” )

[0487] 도메인 B = CH3 (Y349C; 445P, 446G, 447K 삽입)

[0488] 도메인 D = CH2

[0489] 도메인 E=CH3 (S354C, K366W)

[0490] 제$^{d}$ 폴리펩티드 사슬 (= “BC28” 사슬 2) (SEQ ID NO: 25)

[0491] 도메인 F = VH (항원 “A” )

[0492] 도메인 G = CH3 (S354C; 445P, 446G, 447K 삽입)

[0493] 제3 폴리펩티드 사슬 (SEQ ID NO: 37)

[0494] 도메인 R = VL (항원 “A” )

[0495] 도메인 S = CH3 (Y349C; 445P, 446G, 447K 삽입)

[0496] 링커 = GSGSGS

[0497] 도메인 H = VL ( “Nivo” )

[0498] 도메인 I = CL

[0499] 도메인 J = CH2

[0500] 도메인 K = CH3 (Y349C, D356E, L358M, T366S, L368A, Y407V)

[0501] 제4 폴리펩티드 사슬 (= “BC1” 사슬 4) (SEQ ID NO: 11):

[0502] 도메인 L = VH ( “Nivo” )

[0503] 도메인 M = CH1

[0504] 제6 폴리펩티드 사슬 (= “BC28” 사슬 2) (SEQ ID NO: 25)

[0505] 도메인 T = VH (항원 “A” )

[0506] 도메인 U = CH3 (S354C; 445P, 446G, 447K 삽입)

[0507] A:F 항원 결합 부위는, H:L 결합 항원 결합 부위와 마찬가지로, “항원 A”에 특이적이다. R:T 항원 결합 부위는 PD에 특이적이다. 본 구조물의 특이성은 따라서 항원 “A” x (PD1-항원 “A)이다.

[0508] **6.12.10.실시예 10: 3가 1x2 이중 특이성 구조물 (“CTLA4-4 x Nivo x CTLA4-4”)**

[0509] 본 발명자들은 **도 27**에 개략적으로 도시된 일반적인 구조를 갖는 3가 1x2 이중 특이성 분자 (“CTLA4-4 x Nivo x CTLA4-4”)를 구축하였다. 도메인 명명법은 도 26에 도시되어 있다.

[0510] 도 28은 비-환원 및 환원 조건 하에서의 “CTLA4-4 x Nivo x CTLA4-4” 구조물을 나타내는 레인들이 네모 칸으로 표시된 SDS-PAGE 겔을 나타낸다.

[0511] 도 29는 다음의 두 항체들의 항원 결합을 비교한다: “CTLA4-4 x OX40-8” 및 “CTLA4-4 x Nivo x CTLA4-4”. “CTLA4-4 x OX40-8”은 CTLA4에 1가로 결합하고; 반면 “CTLA4-4 x Nivo x CTLA4-4”는 CTLA4에 2가로 결합한다.

[0512] **6.12.11.실시예 11: 3가 1x2 삼중 특이성 구조물 “BC28-1x1x1a”**

[0513] 본 발명자들은 **도 30**에 개략적으로 도시된 일반적인 구조를 갖는 3가 1x2 삼중 특이성 분자를 구축하였다. **도 26**에 도시된 도메인 명명법을 참조하여,

[0514] 제1 폴리펩티드 사슬 (=“BC28” 사슬1) [SEQ ID NO: 24]

[0515] 도메인 A = VL (항원 “A”)

[0516] 도메인 B = CH3 (Y349C; 445P, 446G, 447K 삽입)

[0517] 도메인 D = CH2

[0518] 도메인 E = CH3 (S354C, K366W)

[0519] 제2 폴리펩티드 사슬 (=“BC28” 사슬 2) (SEQ ID NO: 25)

[0520] 도메인 F = VH (항원 “A”)

[0521] 도메인 G = CH3 (S354C; 445P, 446G, 447K 삽입)

[0523] *제3 폴리펩티드 사슬 (SEQ ID NO: 45)

[0524] 도메인 R = VL (CTLA4-4)

[0526] *도메인 S = CH3 (T366K; 445K, 446S, 447C 삽입)

[0527] 링커 = GSGSGS

[0529] *도메인 H = VL (“Nivo”)

[0530] 도메인 I = CL

[0531] 도메인 J = CH2

[0532] 도메인 K = CH3 (Y349C, D356E, L358M, T366S, L368A, Y407V)

[0533] 제4 폴리펩티드 사슬 (=“BC1” 사슬 4) (SEQ ID NO: 11)

[0534] 도메인 L = VH (“Nivo”)

[0535] 도메인 M = CH1

[0536] 제6 폴리펩티드 사슬 (=hCTLA4-4 사슬2) (SEQ ID NO: 53)

[0537] 도메인 T = VH (CTLA4)

[0538] 도메인 U = CH3 (L351D, 445G, 446E, 447C 삽입)

[0539] 이다.

[0540] 본 삼중 특이성 구조물의 항원 결합 부위는 다음과 같다:

[0541] 항원 결합 부위 A:F는 "항원 A"에 특이적이고

[0542] 항원 결합 부위 H:L은 PD1 (니볼루맙 서열)에 특이적이며

[0543] 항원 결합 부위 R:T는 CTLA4에 특이적이다.

[0544] 도 31은 일시적 발현 및 CaptureSelect™ CH1 친화성 수지를 사용한 일-단계 정제 후의 "BC28-1x1x1a"의 크기 배제 크로마토그래피를 나타내며, 이는 단일의 뚜렷한 피크를 나타낸다.

[0545] **6.12.12.실시예 12: 2가 및 3가 구조물의 SDS-PAGE 분석**

[0546] 도 32는 비-환원 및 환원 조건 하에서, 각각 일시적 발현 및 CaptureSelect™ CH1 친화성 수지를 사용한 일-단계 정제 후의 다양한 구조물의 SDS-PAGE 겔을 나타낸다.

[0547] 레인 1 (비환원 조건) 및 2 (환원 조건, +DTT)는 2가 1x1 이중 특이성 구조물 "BC1"이다. 레인 3 (비환원) 및 4 (환원)는 3가 이중 특이성 2x1 구조물 "BC1-2x1" (실시예 7 참조)이다. 레인 5 (비환원) 및 6 (환원)는 3가 1x2 이중 특이성 구조물 "CTLA4-4 x Nivo x CTLA4-4" (실시예 10 참조)이다. 레인 7 (비환원) 및 8 (환원)은 실시예 11에 기술된 3가 1x2 삼중 특이성 "BC28-1x1x1a" 구조물이다.

[0548] 상기 SDS-PAGE 겔은 각각의 구조물의 예상되는 분자량으로 나타나는 비-환원 겔의 우수한 띠(band)와 함께, 각각의 구조물의 완전한 조립을 입증한다.

[0549] **6.12.13.실시예 13: 결합 분석**

[0550] 도 33은 다음의 3 개의 항원에 대한 옥텟(Octet) 결합 분석을 나타낸다: PD1, 항원 "A", 및 CTLA-4. 각각의 경우에, 상기 항원은 고정되고 상기 B-바디는 피분석물이다. 참고로, 1x1 B-바디가 항원 결합 부위가 선택된 항원에만 특이적으로 결합함을 입증하기 위해 1x1 이중 특이성 "BC1" 및 "CTLA4-4 x OX40-8"이 또한 비교되었다.

[0551] 도 33a는 "BC1"의 PD1 및 항원 "A"에 대한 결합을 도시하지만, CTLA4에 대한 결합은 도시하지 않는다. 도 33b는 2가 이중 특이성 1x1 구조물 "CTLA4-4 x OX40-8"의 CTLA4로의 결합을 도시하지만, 항원 "A" 또는 PD1에 대한 결합은 도시하지 않는다. 도 33c는 3가 삼중 특이성 1x2 구조물, "BC28-1x1x1a"의 PD1, 항원 "A", 및 CTLA4에 대한 결합을 도시한다.

[0552] **6.12.14.실시예 14: 4가 구조물**

[0553] 도 35는 2x2 4가 이중 특이성 구조물 "BC22-2x2"의 전체적인 구조를 도시한다. 상기 2x2 4가 이중 특이성은 각 가변 도메인-불변 도메인 분절(segment)을 복제함으로써 "BC1" 스캐폴드(scaffold)로 구성되었다. 도메인 명명법은 도 34에 개략적으로 도시되어 있다.

[0554] 도 36은 SDS-PAGE 겔이다. 레인 7-9는 각각 CaptureSelect™ CH1 친화성 수지 ("CH1 용리액")를 사용한 일-단계 정제 후, 및 추가적인 이온 교환 크로마토그래피 정제 (레인 8, "IEX 후의 pk 1"; 레인 9, "IEX 후의 pk 2") 후의 "BC22-2x2" 4가 구조물을 나타낸다. 레인 1-3은 CH1 친화성 정제 (레인 1) 후, 및 레인 2 및 3에서는 후속 이온 교환 크로마토그래피 후의 3가 2x1 구조물 "BC21-2x1"이다. 레인 4-6은 1x2 3가 구조물 "BC12-1x2"이다.

[0555] 도 37은 2x2 4가 구조물의 전체적인 구조를 도시한다.

[0556] 도 39 및 40은 대안적인 구조를 갖는 4가 구조물을 개략적으로 도시한다. 도메인 명명법은 도 38에 제시되어 있다.

[0557] **6.12.15.실시예 15: B-바디에 의한 이중 특이성 항원 결합(engagement)**

[0558] 4가 이중 특이성 2x2 B-바디 "B-바디-IgG 2x2"를 구축하였다. 보다 상세하게는, 도 38에 요약된 도메인 및 폴리펩티드 사슬 참조를 사용하여,

[0559] 제1 폴리펩티드 사슬

[0560] 도메인 A = VL (세톨리주맙)

[0561] 도메인 B = CH3 (IgG1, 노브)

[0562] 도메인 D = CH2 (IgG1)

[0563] 도메인 E = CH3 (IgG1)

[0564] 도메인 W = VH (항원 "A")

[0565] 도메인 X = CH1 (IgG1)

[0566] 제3 폴리펩티드 사슬 (제1 폴리펩티드 사슬과 동일)

[0567] 도메인 H = VL (세톨리주맙)

[0568] 도메인 I = CH3 (IgG1, 노브)

[0569] 도메인 J = CH2 (IgG1)

[0570] 도메인 K = CH3 (IgG1)

[0571] 도메인 WW = VH (항원 "A")

[0572] 도메인 XX = CH1 (IgG1)

[0573] 제2 폴리펩티드 사슬

[0574] 도메인 F = VH (세톨리주맙)

[0575] 도메인 G = CH3 (IgG1, 홀)

[0576] 제4 폴리펩티드 사슬 (제3 폴리펩티드 사슬과 동일)

[0577] 도메인 F = VH (세톨리주맙)

[0578] 도메인 G = CH3 (IgG1, 홀)

[0579] 제7 폴리펩티드 사슬

[0580] 도메인 Y = VH ("항원 A")

[0581] 도메인 Z = CL 카파

[0582] 제8 폴리펩티드 사슬 (제7 폴리펩티드 사슬과 동일)

[0583] 도메인 YY = VH ("항원 A")

[0584] 도메인 ZZ = CL 카파

[0585] 이다.

[0586] 이를 실시예 1에 기술된 바와 같이 클로닝하고 발현시켰다. 여기서, BLI 실험은 스트렙타비딘 센서 상에 비오틴화된 항원 "A"를 고정시킨 후에 10배 운동 완충액으로 기준선을 확립하는 것으로 구성된다. 그 다음, 상기 센서를 무세포 발현된 "B-바디-IgG 2x2" 내에 침지시킨 후 새로운 기준선을 확립하였다. 마지막으로, 상기 센서를 단일 "B-바디-IgG 2x2"에 의한 두 항원 모두의 이중 특이성 결합을 입증하는 제2 결합 이벤트가 관찰되는 100 nM TNFα에 침지시켰다. 결과는 도 41에 나타내었다.

[0587] **6.12.16.실시예 16: "BB-IgG 2x2"의 항원-특이성 세포 결합**

[0588] Expi-293 세포를 모의 트랜스펙션시키거나 또는 Expi-293 트랜스펙션 키트 (Life Technologies)를 사용하여 항원 "B"로 일시적으로 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션 48시간 후, 상기 Expi-293 세포를 수확하고 실온에서 15분 동안 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde) 내에서 고정시켰다. 상기 세포를 PBS에서 2회 세척하였다. 200,000 개의 항원 B로 또는 모의 트랜스펙션된 Expi-293 세포를 100 μL의 PBS 내의 V-바닥 96 웰 플레이트 내에 위치시켰다. 상기 세포를 실온에서 1.5시간 동안 3μg/mL의 농도로 "B-Body-IgG 2x2"와 함께 배양하였다. 상기 세포를 300xG에서 7분 동안 원심분리하고, PBS로 세척한 후, 실온에서 1시간 동안 8μg/mL의 농도로 FITC로 라벨링된 염소-항 인간 2차 항체 100μL와 함께 배양하였다. 상기 세포를 300xG에서 7분 동안 원심분리

하고, PBS로 세척한 후, Guava easyCyte를 사용한 유세포계측을 통해 세포 결합을 확인하였다. 그 결과는 도 42에 나타내었다.

[0589] **6.12.17.실시예 17: 2가 및 3가 구조물의 SDS-PAGE 분석**

[0590] 도 45는 비-환원 및 환원 조건 하에서, 각각 일시적 발현 및 CaptureSelect™ CH1 친화성 수지를 사용한 일-단계 정제 후의 다양한 구조물의 SDS-PAGE 겔을 나타낸다.

[0591] 레인 1 (비환원 조건) 및 2 (환원 조건, +DTT)는 2가 1x1 이중 특이성 구조물 "BC1"이다. 레인 3 (비환원) 및 4 (환원)는 2가 1x1 이중 특이성 구조물 "BC28" (실시예 4 참조)이다. 레인 5 (비환원) 및 6 (환원)는 2가 1x1 이중 특이성 구조물 "BC44" (실시예 5 참조)이다. 레인 7 (비환원) 및 8 (환원)은 3가 1x2 이중 특이성 "BC28-1x2" 구조물 (실시예 9 참조)이다. 레인 9 (비환원) 및 10 (환원)은 실시예 11에 기술된 3가 1x2 삼중 특이성 "BC28-1x1x1a" 구조물이다.

[0592] 상기 SDS-PAGE 겔은 각각의 구조물의 예상되는 분자량으로 나타나는 비-환원 겔의 우세한 띠(band)와 함께, 각각의 구조물의 완전한 조립을 입증한다.

[0593] **6.12.18.실시예 18: 가변-CH3 접합부 공학의 안정성 분석**

[0594] 다양한 접합 지점 변이체 조합들 사이의 페어링 안정성을 평가하였다. 사슬 1(도메인 A 및 B)로부터의 VL-CH3 폴리펩티드 및 2(도메인 F 및 G)로부터의 VH-CH3 폴리펩티드 사이의 다양한 접합 지점 변이체 페어링의 용융 온도를 결정하기 위하여 차등 스캐닝 형광 측정법(Differential scanning fluorimetry)을 수행하였다. 상기 표 2 및 표 3에 제시된 "BC6", "BC28", "BC30", "BC44", 및 "BC45"의 상응하는 접합 지점 서열을 각각 갖는 접합 지점 변이체 BC6jv", "BC28jv", "BC30jv", "BC44jv", 및 "BC45jv"는 76-77도 범위 내의 변성 온도(Tm)와의 증가된 페어링 안정성을 나타낸다 (표 4 참조). 도 46은 "BC24jv", "BC26jv", 및 "BC28jv"에 대한 열 전이의 차이를 보여주며, "BC28jv"는 상기 세 가지 중 가장 뛰어난 안정성을 나타낸다. 도면의 x 축은 온도이고 y 축은 형광 변화를 온도 변화로 나눈 값(-dFluor/dTemp)이다. 실험은 본 명세서에 그의 모든 교시 내용이 참조로 포함되는, Niesen *et al.* (*Nature Protocols*, (2007) 2, 2212 - 2221)에 기술된 바에 따라 수행하였다.

*표 4*

[0595]

| 표 4 - 접합 지점 변이체 쌍의 용융 온도 | | |
|---|---|---|
| 접합 지점 변이체 쌍 | 용융 온도 #1 (℃) | 용융 온도 #2 (℃) |
| BC1jv | 69.7 | 55.6 |
| BC5jv | 71.6 | |
| BC6jv | 77 | |
| BC15jv | 68.2 | 54 |
| BC16jv | 65.9 | |
| BC17jv | 68 | |
| BC24jv | 69.7 | |
| BC26jv | 70.3 | |
| BC28jv | 76.7 | |
| BC30jv | 76.8 | |
| BC44jv | 76.2 | |
| BC45jv | 76 | |

[0596] **6.13.서열**

[0597] > 실시예 1, 2가 단일 특이성 구조물 사슬 1 **[SEQ ID NO:1]**

[0598] (VL)~VEIKRTPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0599] >실시예 1, 2가 단일 특이성 구조물 사슬 2 **[SEQ ID NO:2]**

[0600] (VH)~VTVSSASPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL

HNHYTQKSLSLSPGK

[0601] > 실시예 1, 2가, 이중 특이성 구조물 사슬 1 **[SEQ ID NO:3]**

[0602] (VL)~VEIKRTPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*DKTHTCPP***CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ***PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK***

[0603] VL- CH3-*힌지*- **CH2-** *CH3(노브)*

[0604] > 실시예 1, 2가, 이중 특이성 구조물 사슬 2 **[SEQ ID NO:4]**

[0605] (VH)~VTVSSASPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0606] VH- CH3

[0607] > 실시예 1, 2가, 이중 특이성 구조물 사슬 3_ **[SEQ ID NO:5]**

[0608] (VL)~VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*DKTHTCPP***CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ***PREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK***

[0609] VL- CL-*힌지*- **CH2-** *CH3(홀)*

[0610] > 실시예 1, 2가, 이중 특이성 구조물 사슬 4 **[SEQ ID NO:6]**

[0611] (VH)~VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPPKSC

[0612] VH- CH1

[0613] > 인간 IgG1의 Fc 단편(fragment) **[SEQ ID NO:7]**

[0614] GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

[0615] >BC1 사슬 1 **[SEQ ID NO:8]**

[0616] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLKCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSKSC*DKTHTCPPCP***APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK***

[0617] 도메인 배열:

[0618] A- B- 힌지- D- E

[0619] VL- CH3- *힌지*- **CH2-** *CH3(노브)*

[0620] 제1 CH3 (도메인 B) 내 돌연변이:

[0621] T366K; 445K, 446S, 447C 삽입

[0622] 제2 CH3 (도메인 E) 내 돌연변이:

[0623] S354C, K366W

[0624] >BC1 사슬 2 **[SEQ ID NO:9]**

[0625] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYDIHWVRQAPGKGLEWVGDITPYDGTTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARLVGEIATGFDYWGQGTLVTVSSASPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS

CSVMHEALHNHYTQKSLSLSGEC

[0626] 도메인 배열:

[0627] F- G

[0628] VH- CH3

[0629] CH3 (도메인 G) 내 돌연변이:

[0630] L351D; 445G, 446E, 447C 삽입

[0631] >BC1 사슬 3 **[SEQ ID NO:10]**

[0632] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*DKTHTCPPCP***APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK***

[0633] 도메인 배열:

[0634] H- I- 힌지- J- K

[0635] VL- CL-*힌지*- **CH2**- *CH3(홀)*

[0636] CH3 (도메인 K) 내 돌연변이:

[0637] Y349C, D356E, L358M, T366S, L368A, Y407V

[0638] >BC1 사슬 4 **[SEQ ID NO:11]**

[0639] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPPKSC

[0640] 도메인 배열:

[0641] L- M

[0642] VH- CH1

[0643] > BC1 도메인 A **[SEQ ID NO:12]**

[0644] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRT

[0645] > BC1 도메인 B **[SEQ ID NO:13]**

[0646] PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLKCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSKSC

[0647] > BC1 도메인 D **[SEQ ID NO:14]**

[0648] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

[0649] > BC1 도메인 E **[SEQ ID NO:15]**

[0650] GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0651] > BC1 도메인 F **[SEQ ID NO:16]**

[0652] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYDIHWVRQAPGKGLEWVGDITPYDGTTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARLVGEIATGFDYWGQGTLVTVSSAS

[0653] > BC1 도메인 G **[SEQ ID NO:17]**

[0654] PREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
GEC

[0655] > BC1 도메인 H **[SEQ ID NO:18]**

[0656] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGT
KVEIK

[0657] > BC1 도메인 I **[SEQ ID NO:19]**

[0658] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC

[0659] > BC1 도메인 J **[SEQ ID NO:20]**

[0660] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAK

[0661] > BC1 도메인 K **[SEQ ID NO:21]**

[0662] GQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

[0663] > BC1 도메인 L **[SEQ ID NO:22]**

[0664] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDY
WGQGTLVTVSS

[0665] > BC1 도메인 M [**SEQ ID NO:23**]

[0666] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPPK
SC

[0667] >BC28 사슬 1 **[SEQ ID NO:24]**

[0668] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGT
KVEIKRTPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK*DKTHTCPPCP***APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK***

[0669] 도메인 배열:

[0670] A- B- 힌지- D- E

[0671] VL- CH3- *힌지*- **CH2**- *CH3(노브)*

[0672] 도메인 B 내 돌연변이:

[0673] Y349C; 445P, 446G, 447K 삽입

[0674] 도메인 E 내 돌연변이:

[0675] S354C, K366W

[0676] >BC28 도메인 A **[SEQ ID NO:26]**

[0677] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGT
KVEIKRT

[0678] >BC28 도메인 B **[SEQ ID NO:27]**

[0679] PREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS

PGK

[0680] >BC28 도메인 D **[SEQ ID NO:28]**

[0681] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

[0682] >BC28 도메인 E **[SEQ ID NO:29]**

[0683] GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0684] >BC28 도메인 F **[SEQ ID NO:30]**

[0685] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYDIHWVRQAPGKGLEWVGDITPYDGTTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARLVGEIATGFDYWGQGTLVTVSSAS

[0686] >BC28 도메인 G **[SEQ ID NO:31]**

[0687] PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0688] >BC44 사슬 1 **[SEQ ID NO:32]**

[0689] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*DKTHTCPPCP***APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK***

[0690] 도메인 배열:

[0691] A- B- 힌지- D- E

[0692] VL- CH3- *힌지*- **CH2**- *CH3(노브)*

[0693] 도메인 B 내 돌연변이:

[0694] P343V; Y349C; 445P, 446G, 447K 삽입

[0695] 도메인 E 내 돌연변이:

[0696] S354C, K366W

[0697] >BC44 도메인 A **[SEQ ID NO:33]**

[0698] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRT

[0699] >BC44 도메인 B **[SEQ ID NO:34]**

[0700] VREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0701] >BC44 도메인 D **[SEQ ID NO:35]**

[0702] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

[0703] >BC44 도메인 E **[SEQ ID NO:36]**

[0704] GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0705] >BC28 2가 사슬 3 SEQ ID NO:10의 등가물

[0706] >BC28 2가 사슬 4 SEQ ID NO:11의 등가물

[0707] >BC28 1x2 사슬 3 **[SEQ ID NO:37]**

[0708] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GSGSGS****EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIK***RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*DKTHTCPPCP***APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK****GQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK***

[0709] 도메인 배열:

[0710] R- S- 링커- H- I- 힌지- J- K-

[0711] VL- CH3-*링커*-***VL-CL-****힌지*- **CH2-** *CH3(홀)*

[0712] 도메인 S 내 돌연변이:

[0713] Y349C; 445P, 446G, 447K 삽입

[0715] *6 아미노산 링커 삽입: GSGSGS

[0716] 도메인 K 내 돌연변이:

[0717] Y349C, D356E, L358M, T366S, L368A, Y407V

[0718] >BC28 1x2 도메인 R **[SEQ ID NO:38]**

[0719] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRT

[0720] >BC28 1x2 도메인 S **[SEQ ID NO:39]**

[0721] PREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0722] >BC28 1x2 링커 **[SEQ ID NO:40]**

[0723] GSGSGS

[0724] >BC28 1x2 도메인 H **[SEQ ID NO:41]**

[0725] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIK

[0726] >BC28 1x2 도메인 I **[SEQ ID NO:42]**

[0727] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0728] >BC28 1x2 도메인 J **[SEQ ID NO:43]**

[0729] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

[0730] >BC28 1x2 도메인 K **[SEQ ID NO:44]**

[0731] GQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0732] >BC28-1x1x1a chain 3 **[SEQ ID NO:45]**

[0733] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQRDSYLWTFGQGTKVEIKRTPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLKCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSKSC*GSGSGS**EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIK**RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*DKTHTCPPCP**APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK***

[0734] 도메인 배열:

[0735] R- S- 링커- H- I- 힌지- J- K-

[0736] VL- CH3-*링커*-***VL-CL-***힌지- **CH2-** *CH3(홀)*

[0737] 도메인 S 내 돌연변이:

[0738] T366K; 445K, 446S, 447C 삽입

[0739] 6 아미노산 링커 삽입: GSGSGS

[0740] 도메인 K 내 돌연변이:

[0741] Y349C, D356E, L358M, T366S, L368A, Y407V

[0742] >BC28-1x1x1a 도메인 R **[SEQ ID NO:46]**

[0743] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQRDSYLWTFGQGTKVEIKRT

[0745] *>BC28-1x1x1a 도메인 S **[SEQ ID NO:47]**

[0746] PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLKCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSKSC

[0747] >BC28-1x1x1a 링커 **[SEQ ID NO:48]**

[0748] GSGSGS

[0749] >BC28-1x1x1a 도메인 H **[SEQ ID NO:49]**

[0750] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIK

[0751] >BC28-1x1x1a 도메인 I **[SEQ ID NO:50]**

[0752] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0753] >BC28-1x1x1a 도메인 J **[SEQ ID NO:51]**

[0754] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

[0755] >BC28-1x1x1a 도메인 K **[SEQ ID NO:52]**

[0756] GQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0757] >hCTLA4-4.사슬 2 **[SEQ ID NO:53]**

[0758] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYYIHWVRQAPGKGLEWVAVIYPYTGFTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEYTVLDYWGQGTLVTVSSASPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSGEC

[0759] 도메인 배열:

[0760] F- G

[0761] VH- CH3

[0762] 도메인 G 내 돌연변이

[0763] L351D, 445G, 446E, 447C 삽입

[0764] >hCTLA4-4 도메인 F **[SEQ ID NO:54]**

[0765] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYYIHWVRQAPGKGLEWVAVIYPYTGFTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEYT VLDYWGQGTLVTVSSAS

[0766] >hCTLA4-4 도메인 G **[SEQ ID NO:55]**

[0767] PREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS GEC

[0768] 다른 서열:

[0769] **>힌지:** DKTHTCPPCP **[SEQ ID NO:56]**

[0770] **>BC1-폴리펩티드 1 도메인 접합부:** IKRTPREP **[SEQ ID NO:57]**

[0771] **>BC15-폴리펩티드 1 도메인 접합부:** IKRTVREP **[SEQ ID NO:58]**

[0772] **>BC16-폴리펩티드 1 도메인 접합부:** IKRTREP **[SEQ ID NO:59]**

[0773] **>BC17-폴리펩티드 1 도메인 접합부:** IKRTVPREP **[SEQ ID NO:60]**

[0774] **>BC26-폴리펩티드 1 도메인 접합부:** IKRTVAEP **[SEQ ID NO:61]**

[0775] **>BC27-폴리펩티드 1 도메인 접합부:** IKRTVAPREP **[SEQ ID NO:62]**

[0776] **>BC1-폴리펩티드 2 도메인 접합부:** SSASPREP **[SEQ ID NO:63]**

[0777] **>BC13-폴리펩티드 2 도메인 접합부:** SSASTREP **[SEQ ID NO:64]**

[0778] **>BC14-폴리펩티드 2 도메인 접합부:** SSASTPREP **[SEQ ID NO:65]**

[0779] **>BC24-폴리펩티드 2 도메인 접합부:** SSASTKGEP **[SEQ ID NO:66]**

[0780] **>BC25-폴리펩티드 2 도메인 접합부:** SSASTKGREP **[SEQ ID NO:67]**

[0781] **7.참조에 의한 통합**

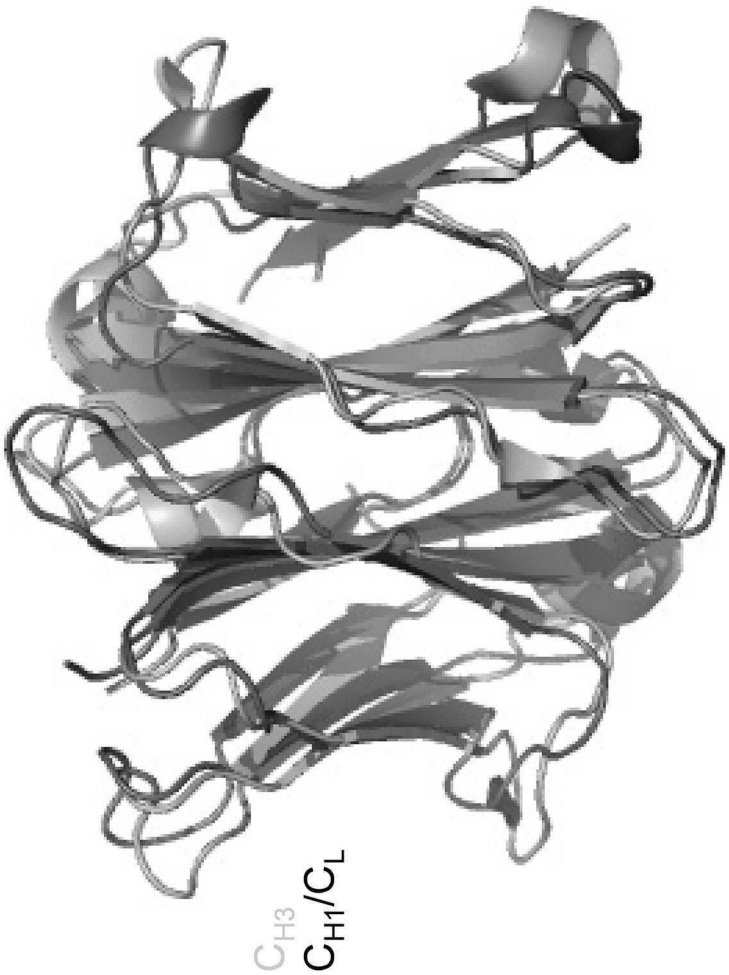
[0782] 본 명세서에 인용된 모든 간행물, 특허, 특허 출원 및 기타 문헌들은 각각의 개별 간행물, 특허, 특허 출원 또는 다른 문헌이 모든 목적을 위해 참조로 통합되도록 개별적으로 명시된 경우와 동일한 정도로 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로 본 명세서에 통합된다.

[0783] **8.등가물**

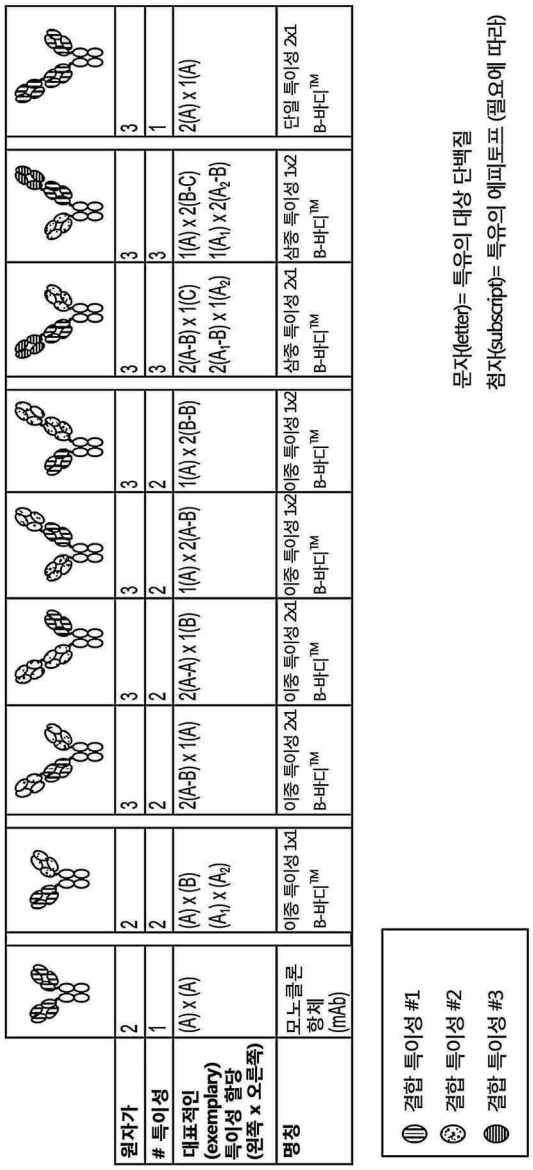
[0784] 다양한 특정 구현 예가 도시되고 기술되었으나, 상기 명세서는 제한적이지 않다. 본 발명(들)의 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서 다양한 변경이 이루어질 수 있는 것으로 이해될 것이다. 많은 변형이 본 명세서의 검토 시 당업자에게 명백할 것이다.

도면

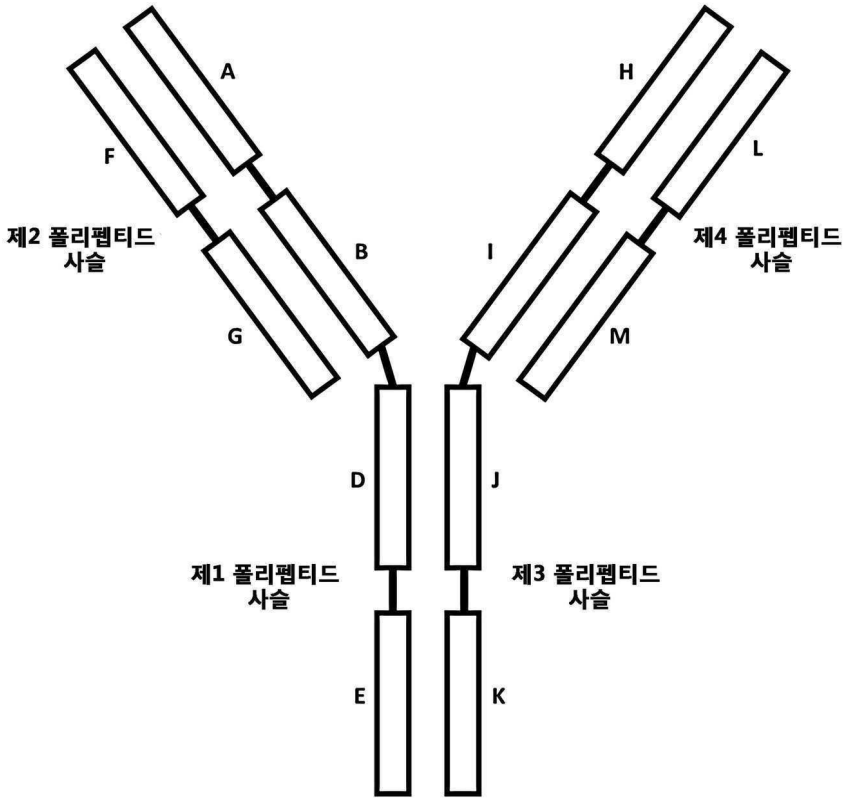
도면1



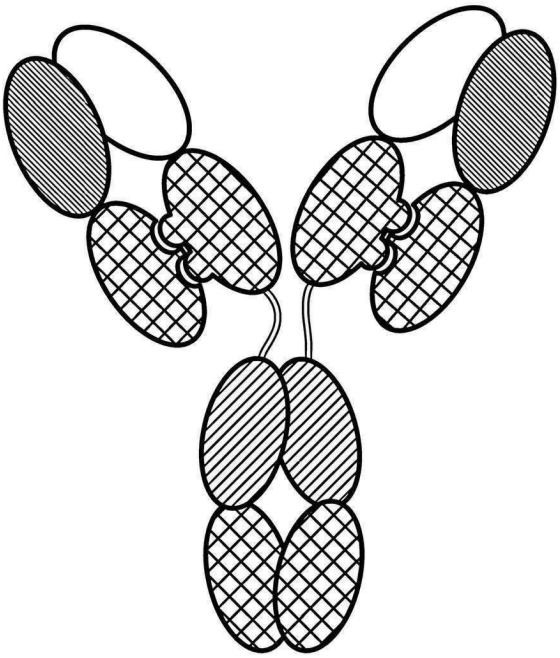
도면2

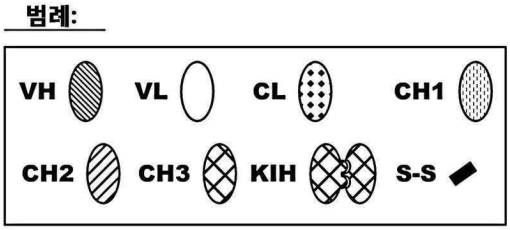

원자가
# 특이성
대표적인 (exemplary) 특이성 할당 (왼쪽 x 오른쪽)
명칭
2
1
(A) x (A)
모노클론 항체 (mAb)
2
2
(A) x (B)
(A1) x (A2)
이중 특이성 1x1 B-바디™
2
2
2(A-B) x 1(A)
이중 특이성 2x1 B-바디™
3
2
2(A-A) x 1(B)
이중 특이성 2x1 B-바디™
3
2
1(A) x 2(A-B)
이중 특이성 1x2 B-바디™
3
2
1(A) x 2(B-B)
이중 특이성 1x2 B-바디™
3
3
2(A-B) x 1(C)
2(A1-B) x 1(A2)
삼중 특이성 2x1 B-바디™
3
3
1(A) x 2(B-C)
1(A1) x 2(A2-B)
삼중 특이성 1x2 B-바디™
3
1
2(A) x 1(A)
단일 특이성 2x1 B-바디™
결합 특이성 #1
결합 특이성 #2
결합 특이성 #3
문자(letter)= 특유의 대상 단백질
첨자(subscript)= 특유의 에피토프 (필요에 따라)

도면3

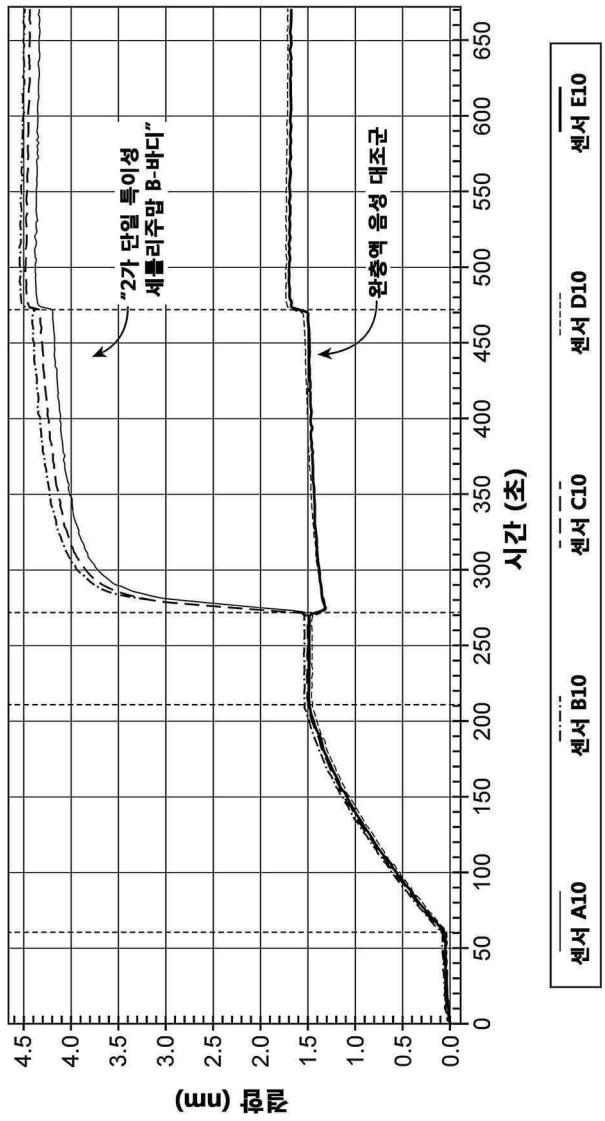


도면4

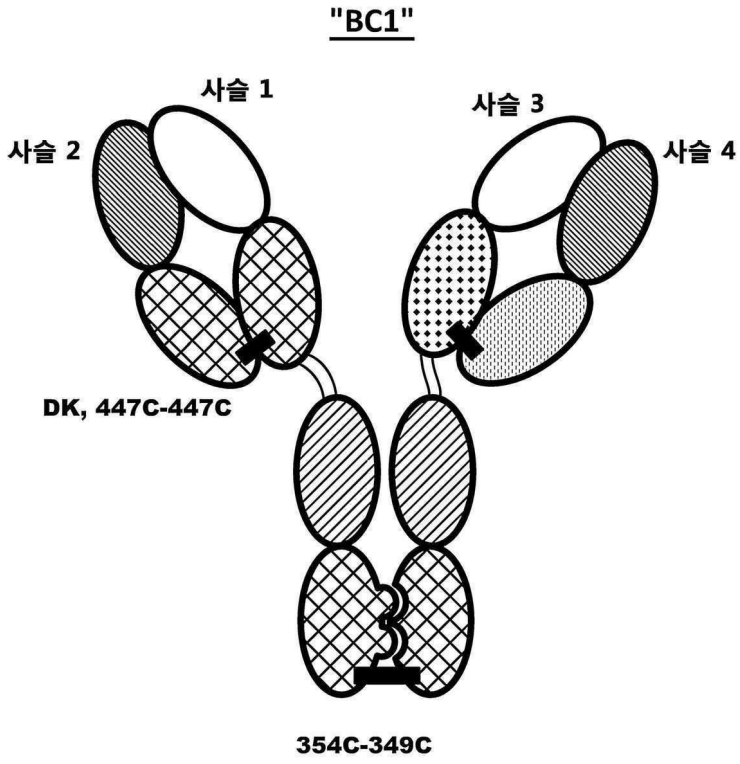




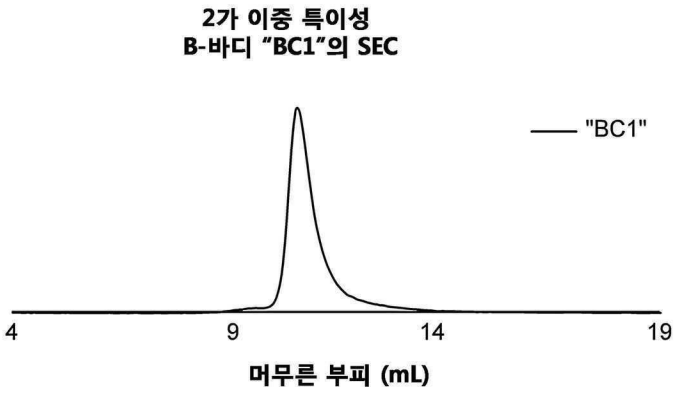
도면5


"2가 단일 특이성 세틀리주맙 B-바디"
완충액 음성 대조군
결합 (nm)
시간 (초)
센서 A10
센서 B10
센서 C10
센서 D10
센서 E10

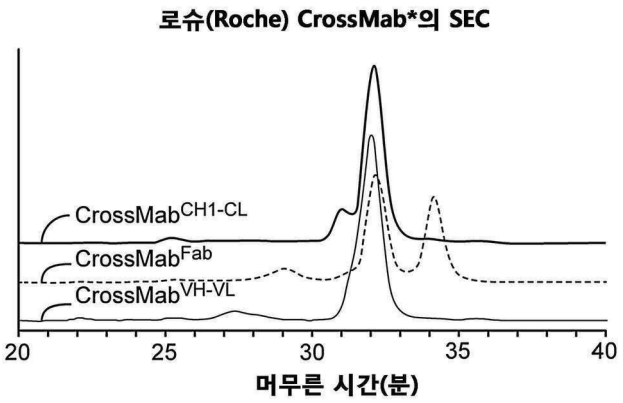
도면6


"BC1"
사슬 1
사슬 2
사슬 3
사슬 4
DK, 447C-447C
354C-349C
범례:
VH
VL
CL
CH1
CH2
CH3
KIH
S-S

도면7a

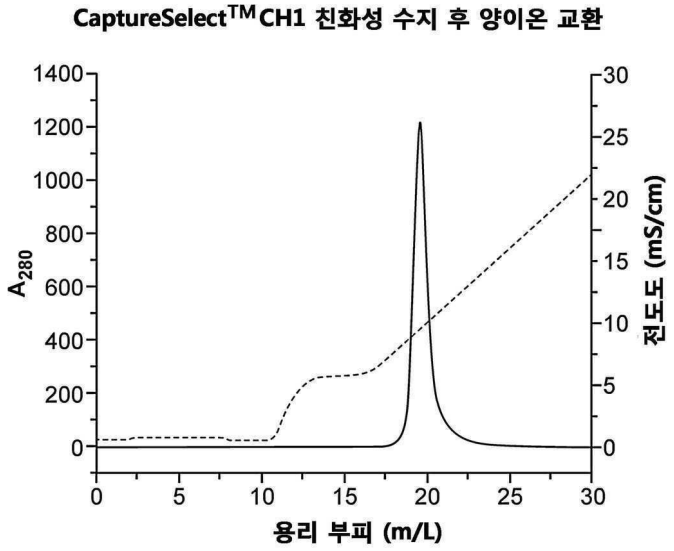

2가 이중 특이성
B-바디 "BC1"의 SEC
"BC1"
4
9
14
19
머무른 부피 (mL)

도면7b

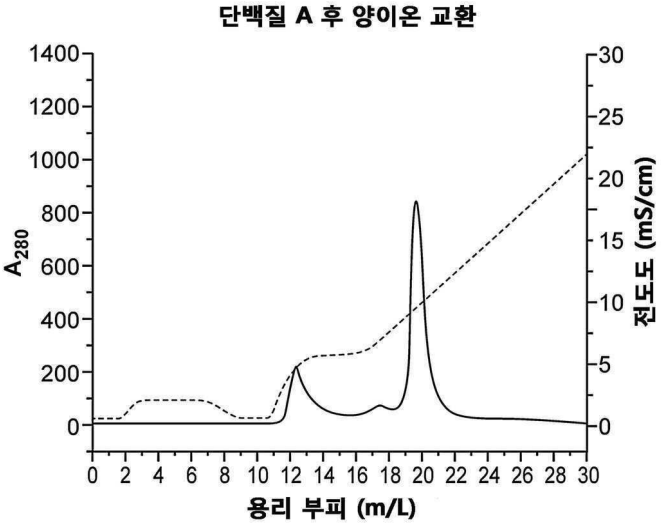



* 출처: Schaefer *et al.* (Proc Natl Acad Sci USA. 2011 Jul 5;108(27):11187-92)

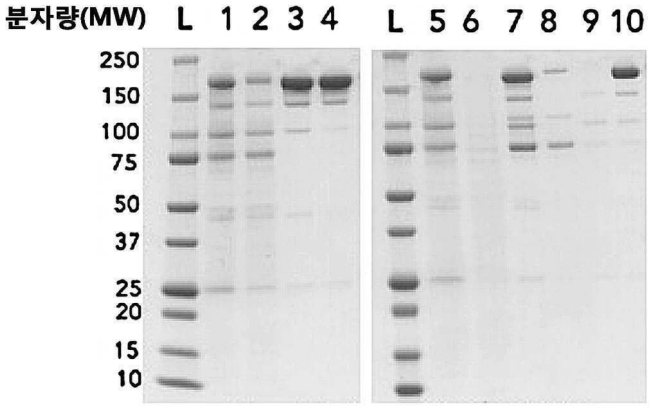
도면8a




도면8b



도면9



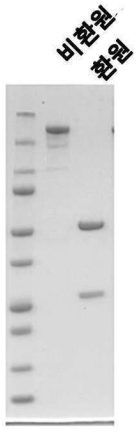

비-환원 SDS-PAGE

L: 단계(Ladder)
1: B-바디 "BC1" 상층액
2: 친화성 수지 1로부터의 흐름
3: 친화성 수지 1로부터의 용리액
4: 양이온 교환으로부터의 피크 용리액

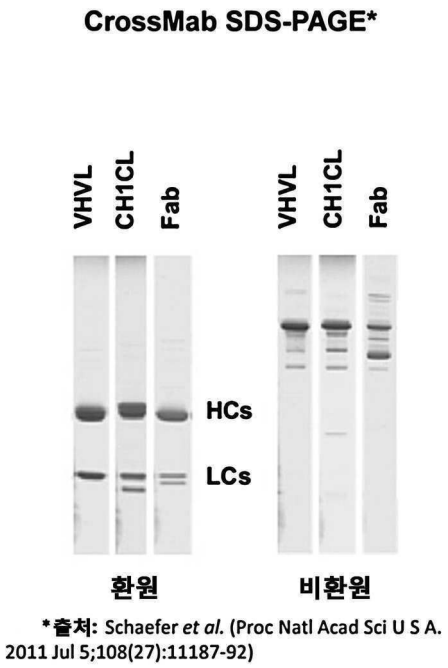
5: B-바디 "BC1" 상층액
6: 단백질 A 수지로부터의 흐름
7: 단백질 A 수지로부터의 용리액
8: 양이온 교환으로부터의 용리액 1
9: 양이온 교환으로부터의 용리액 2
10: 양이온 교환으로부터의 용리액 3

도면10a

"BC1" B-바디™ SDS-PAGE

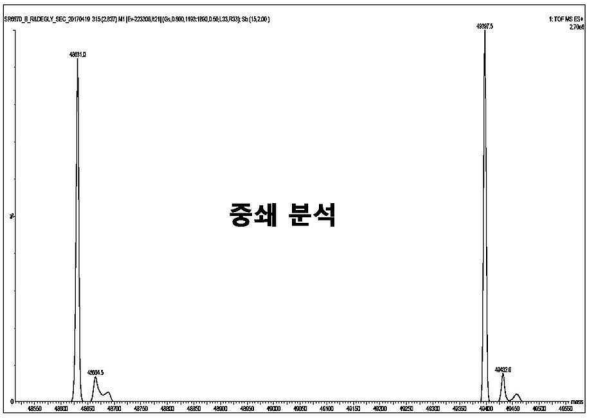


도면10b

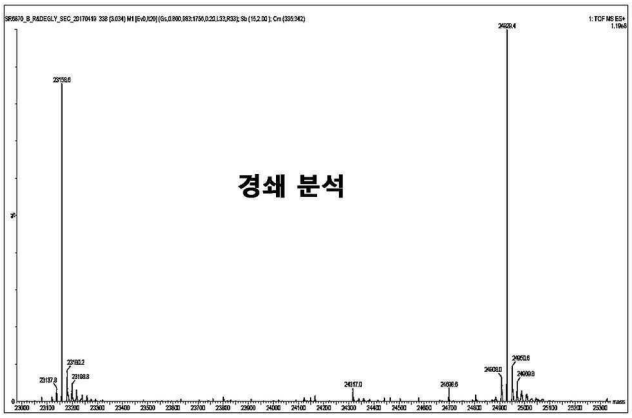



*출처: Schaefer *et al.* (Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jul 5;108(27):11187-92)

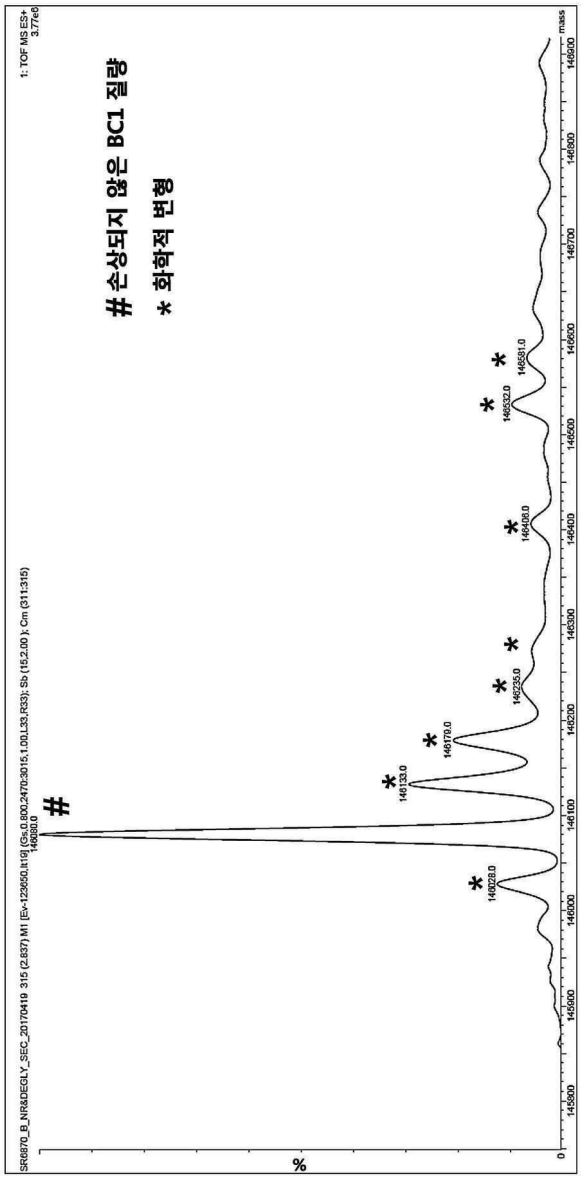
도면11a



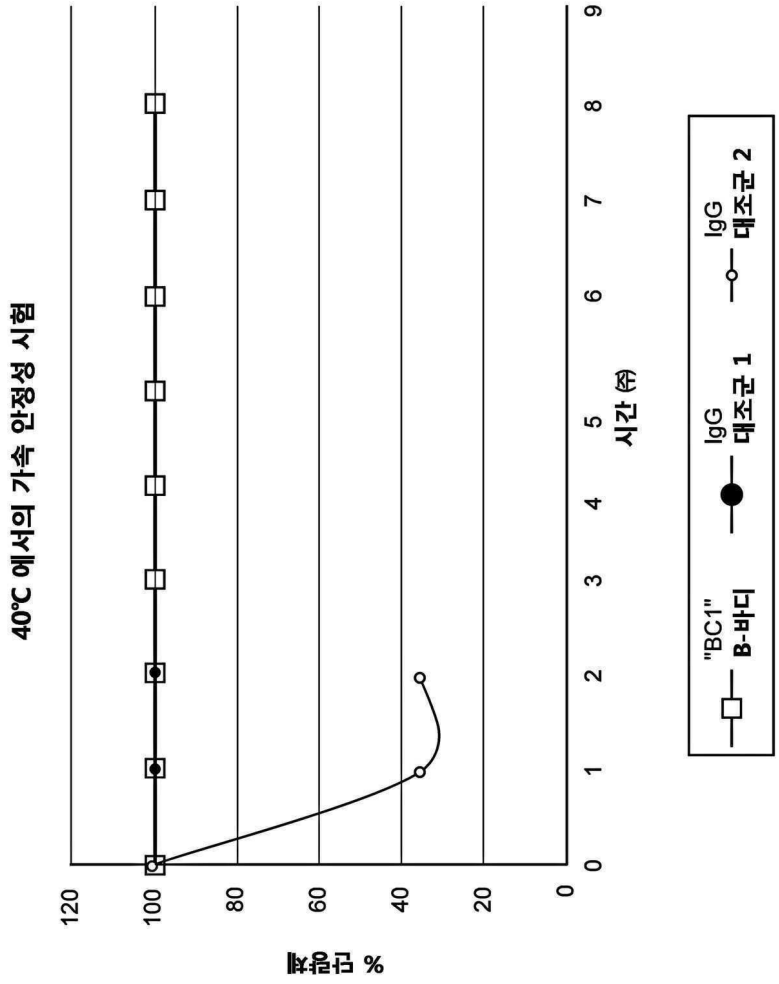

도면11b



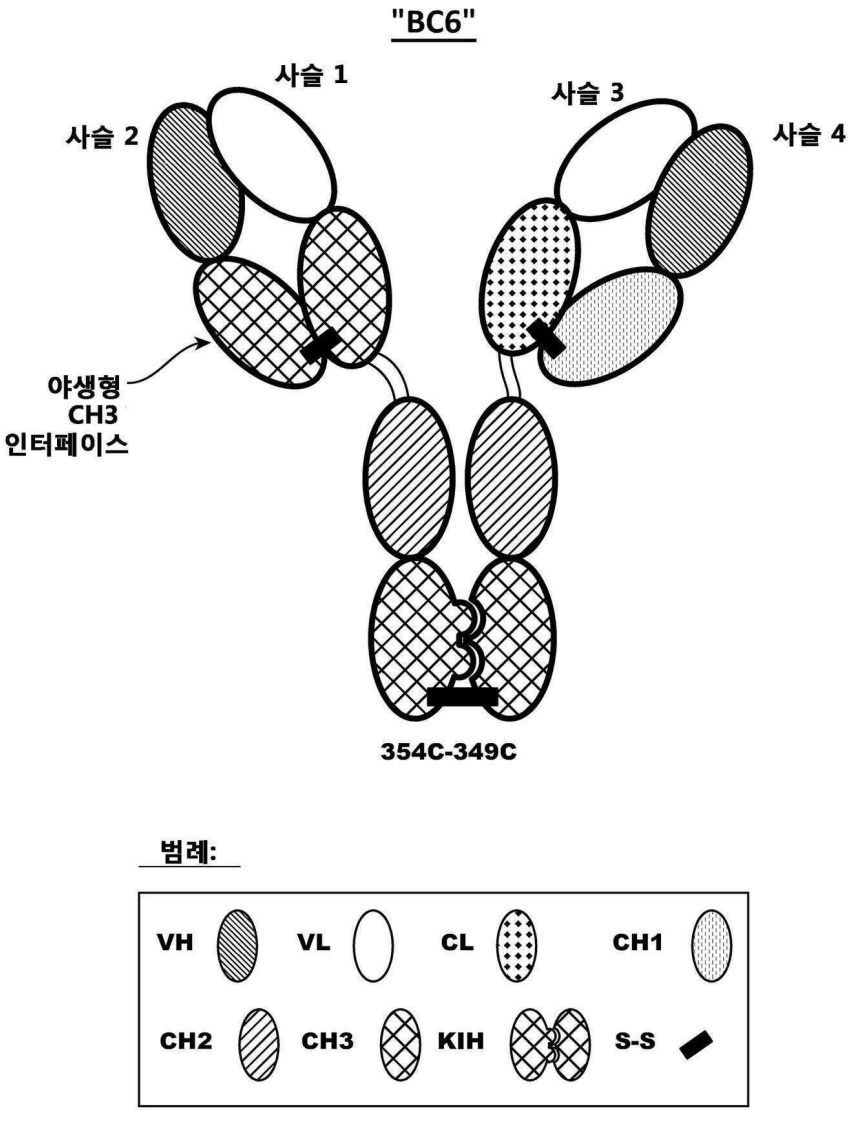
도면12


1: TOF MS ES+
3.77e6
SR6870_B_NR&DEGLY_SEC_20170419 315 (2.837) M1 [Ev-123650,It19] (Gs,0.800,2470:3015,1.00,L33,R33); Sb (15,2.00 ); Cm (311:315)
146028.0
146133.0
146179.0
146235.0
146400.0
146532.0
146581.0
#
*
#손상되지 않은 BC1 질량
* 화학적 변형
%
mass

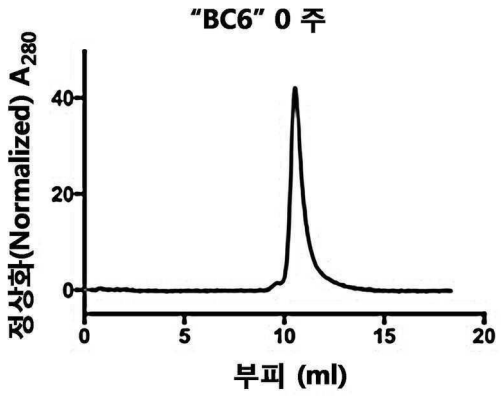
도면13


40℃ 에서의 가속 안정성 시험
% 단량체
120
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
시간 (주)
"BC1"
B-바디
IgG
대조군 1
IgG
대조군 2

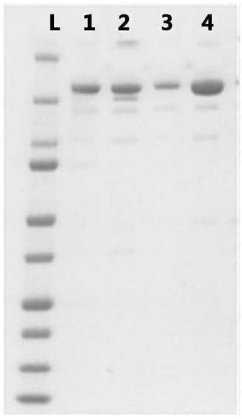
도면14


"BC6"
사슬 1
사슬 2
사슬 3
사슬 4
야생형
CH3
인터페이스
354C-349C
범례:
VH
VL
CL
CH1
CH2
CH3
KIH
S-S

도면15a

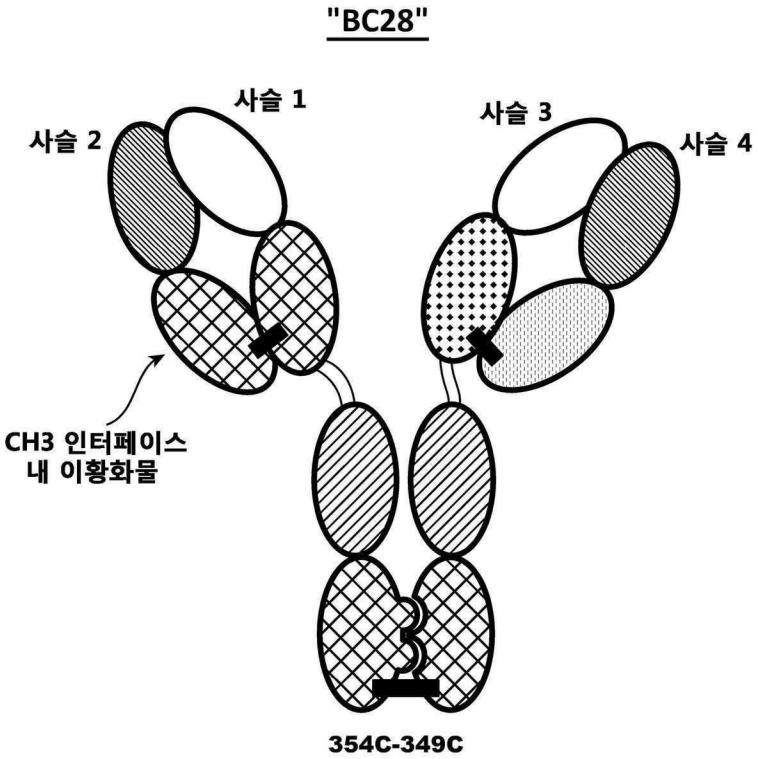

"BC6" 0 주
정상화(Normalized) A280
40
20
0
0
5
10
15
20
부피 (ml)

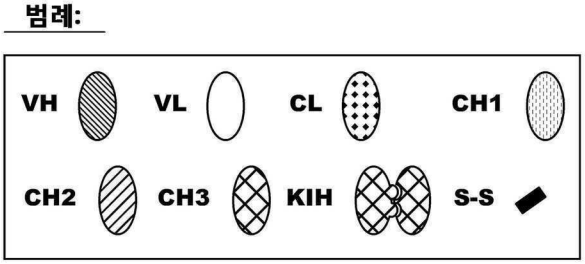
도면15b



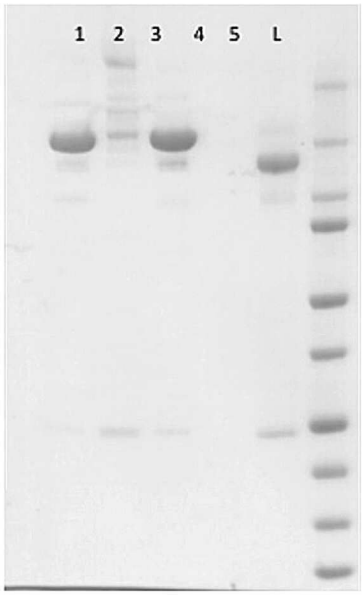

L: 단계(Ladder)
1:"BC6"CH1 용리액 4/25
2:"BC6"CH1 용리액 4/5
3:"BC6" 단일S(MonoS) 피크 C12
4:"BC6" 단일S(MonoS) 피크 D9

도면16



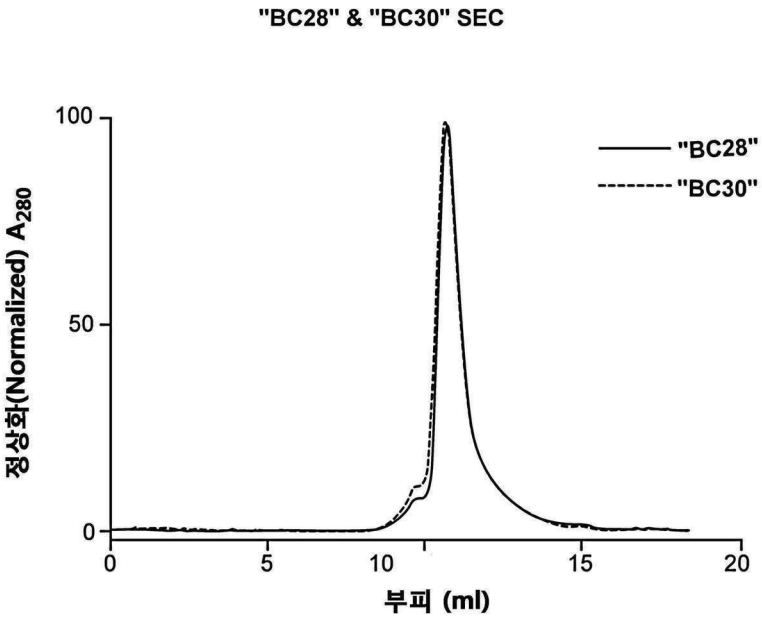



도면17

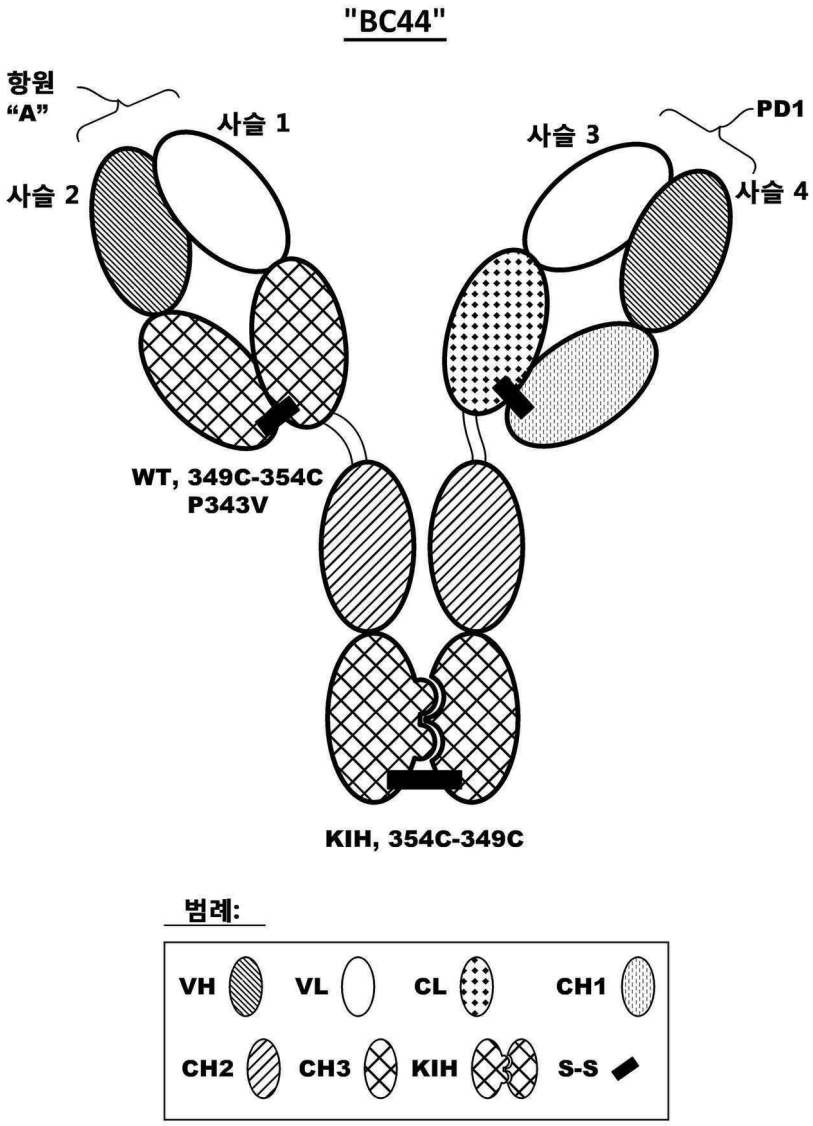



L: 단계(Ladder)
1: “BC28” 349C-354C
2: “BC29” 351C-351C
3: “BC30” 354C-349C
4: “BC31” 394C-394C
5: “BC32” 407C-407C

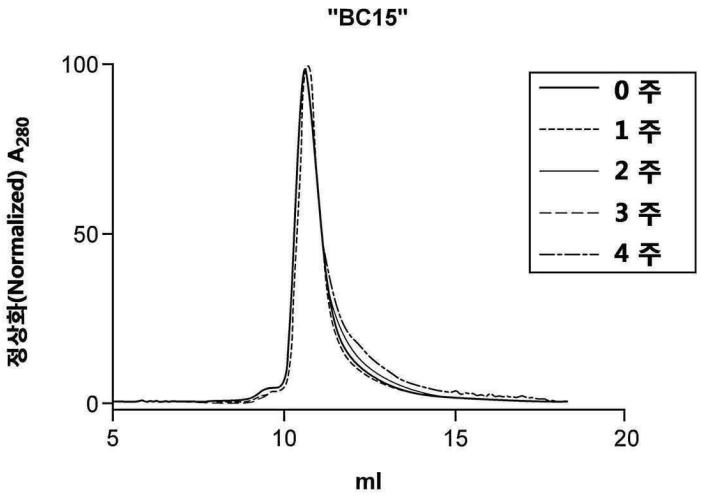
도면18



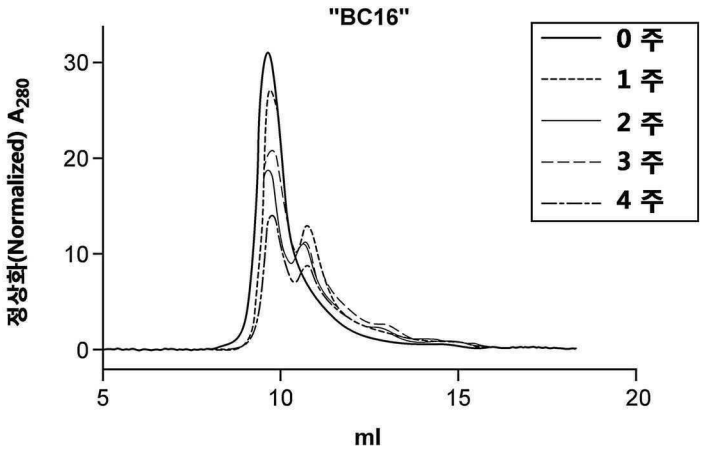
도면19


"BC44"
항원
"A"
사슬 1
사슬 2
사슬 3
PD1
사슬 4
WT, 349C-354C
P343V
KIH, 354C-349C
범례:
VH
VL
CL
CH1
CH2
CH3
KIH
S-S

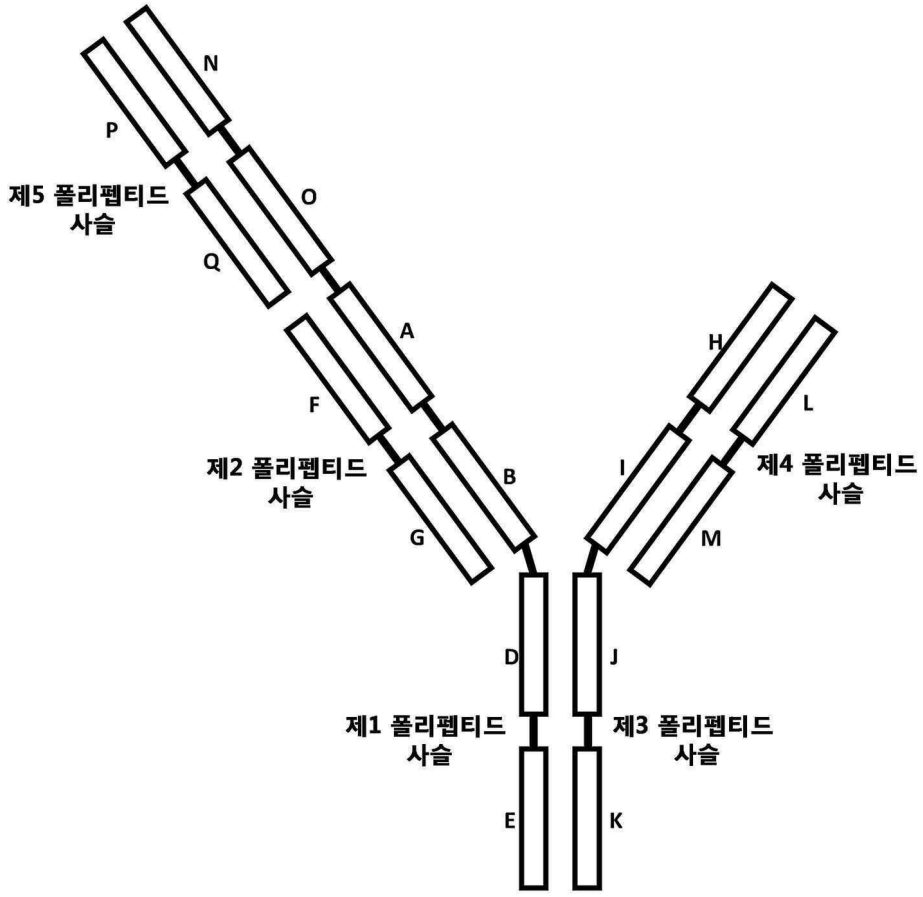
도면20a


"BC15"
정상화(Normalized) A280
100
50
0
5
10
15
20
ml
0 주
1 주
2 주
3 주
4 주

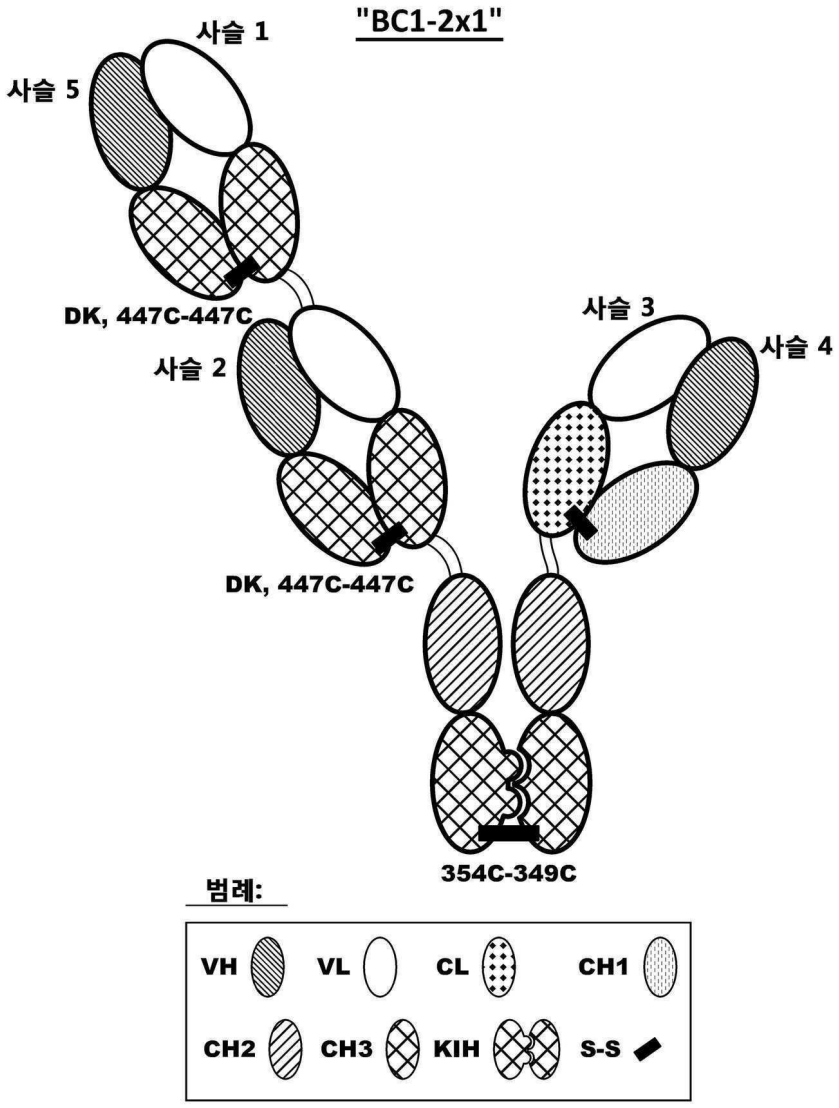
도면20b


"BC16"
0 주
1 주
2 주
3 주
4 주
정상화(Normalized) A280
30
20
10
0
5
10
15
20
ml

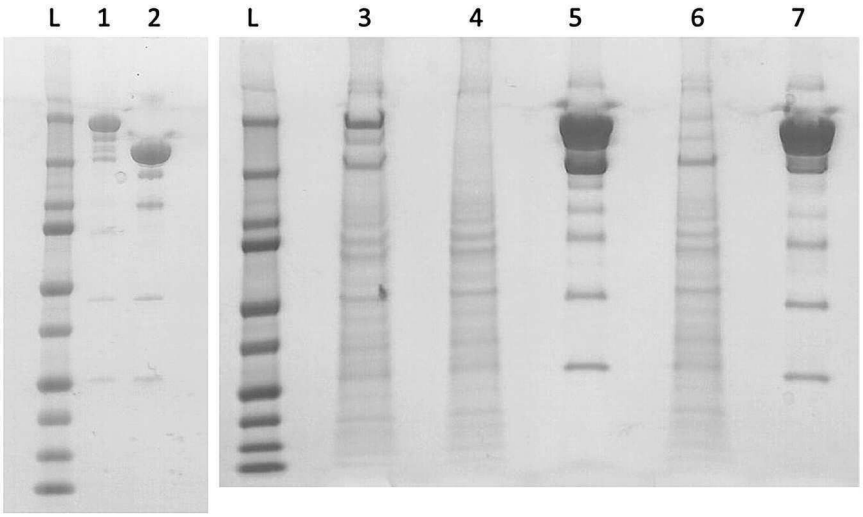
도면21


N
P
제5 폴리펩티드
사슬
O
Q
A
F
제2 폴리펩티드
사슬
B
G
H
L
I
제4 폴리펩티드
사슬
M
D
J
제1 폴리펩티드
사슬
제3 폴리펩티드
사슬
E
K

도면22


"BC1-2x1"
사슬 1
사슬 5
DK, 447C-447C
사슬 2
사슬 3
사슬 4
DK, 447C-447C
354C-349C
범례:
VH
VL
CL
CH1
CH2
CH3
KIH
S-S

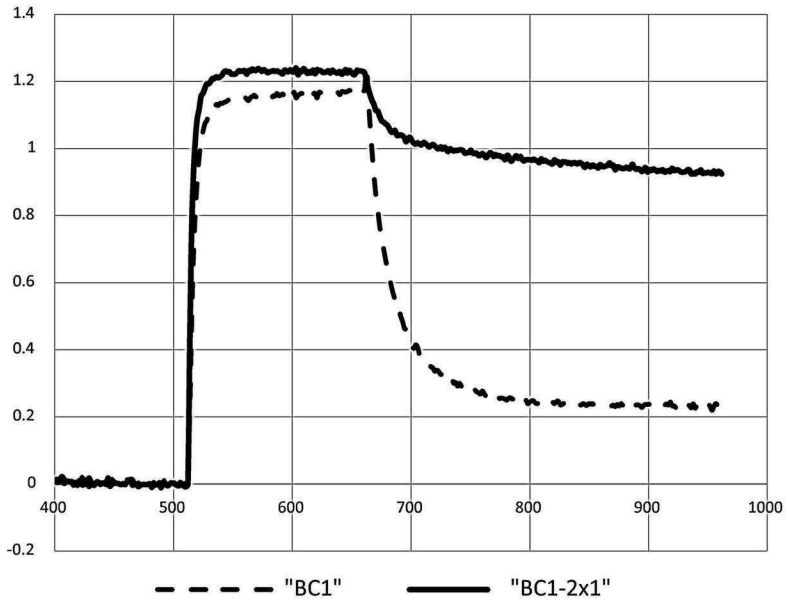
도면23



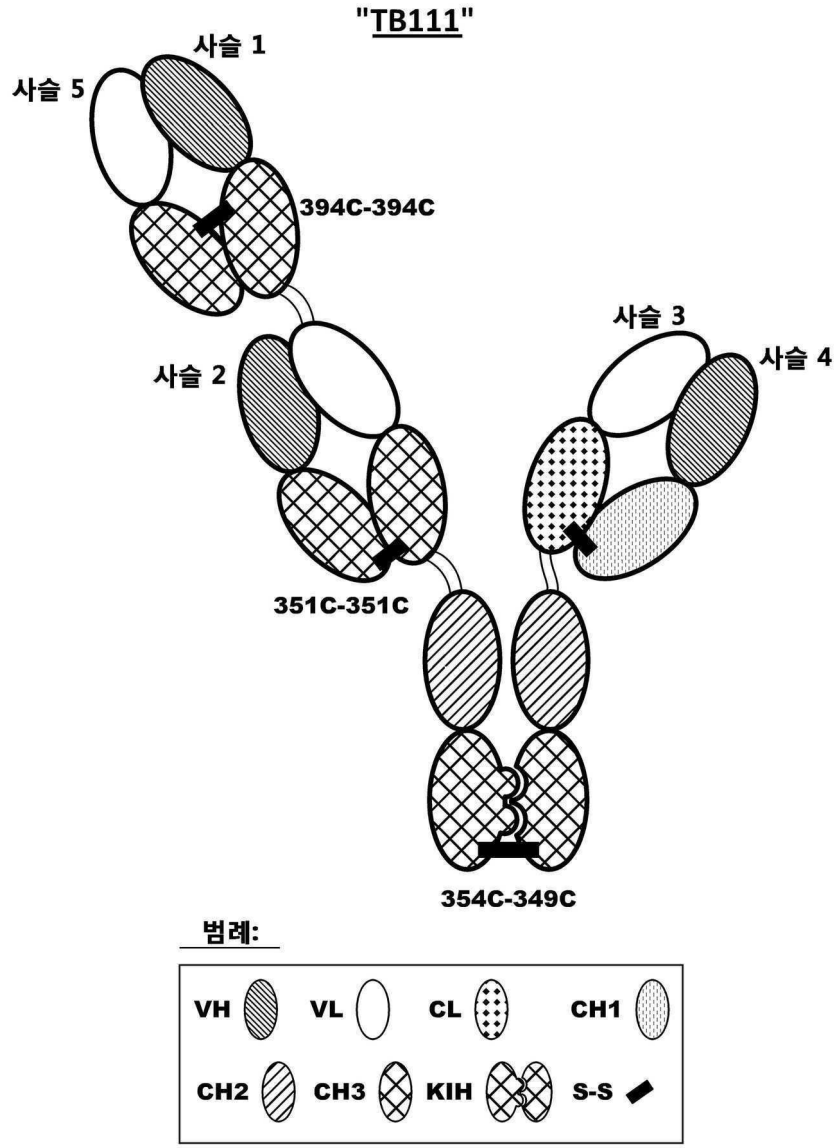

L: 단계(Ladder)
1: "BC1-2X1" CH1 용리액
2: "BC1" CH1 용리액

3: Expi 293 으로부터의 "BC1-2X1" 상층액
4: 단백질 A 후의 "BC1-2X1" 흐름
5: "BC1-2X1" 단백질 A 용리액
6: CH1 수지 후의 "BC1-2X1" 흐름
7: "BC1-2X1" CH1 용리액

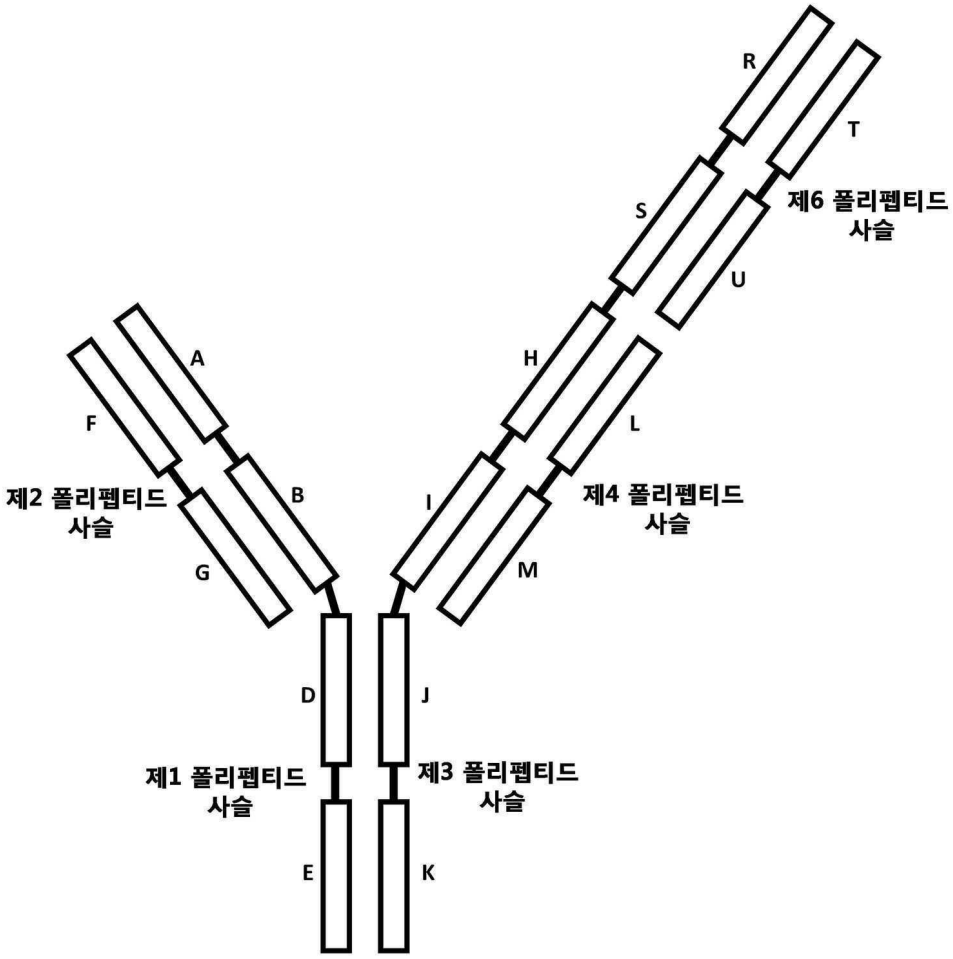
도면24



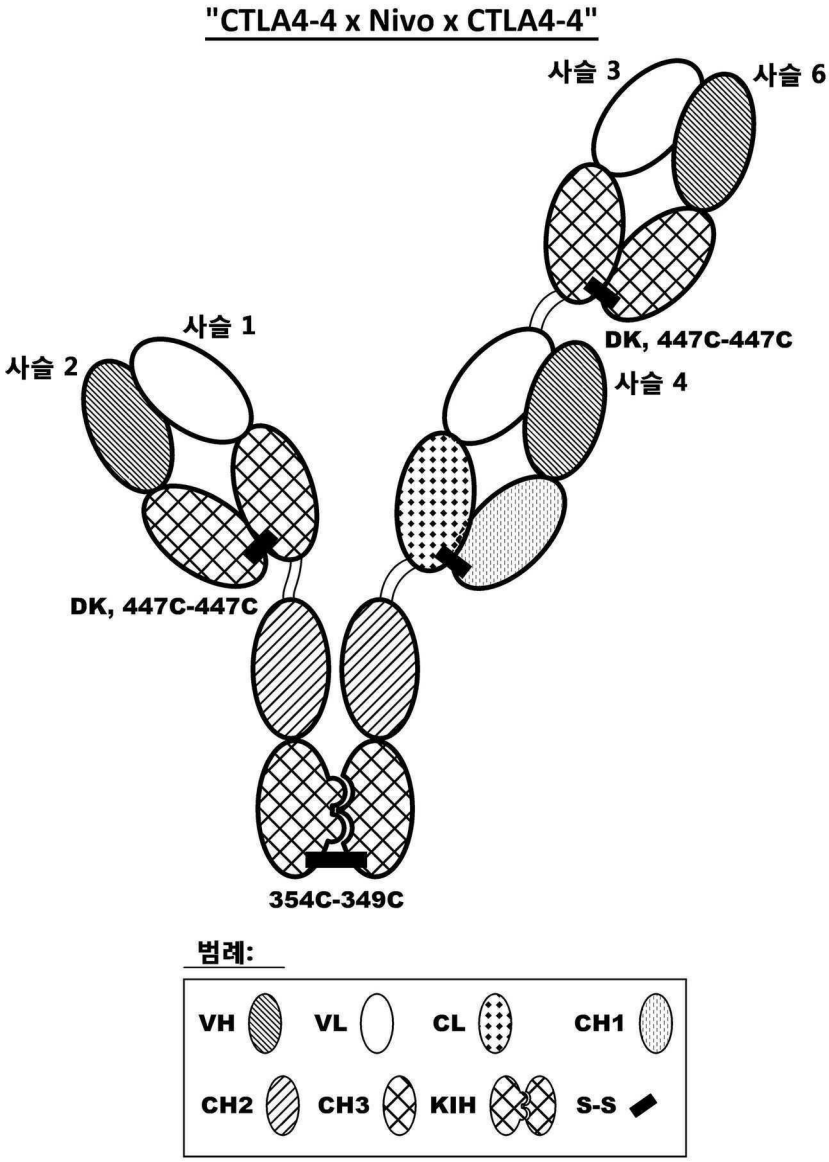
도면25


"TB111"
사슬 1
사슬 5
394C-394C
사슬 2
사슬 3
사슬 4
351C-351C
354C-349C
범례:
VH
VL
CL
CH1
CH2
CH3
KIH
S-S

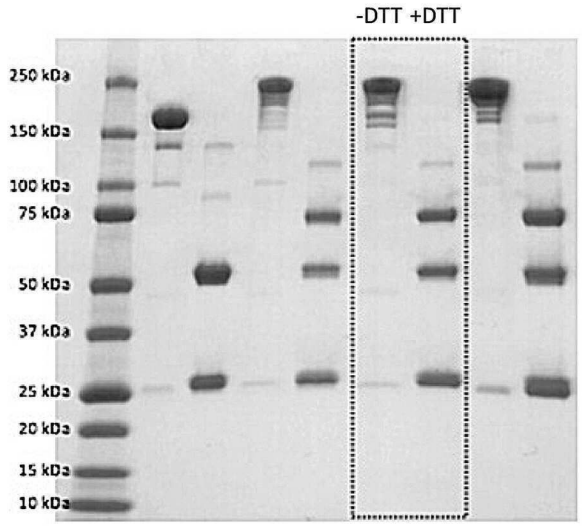
도면26


R
T
S
제6 폴리펩티드
사슬
U
A
H
F
L
제2 폴리펩티드
사슬
B
I
제4 폴리펩티드
사슬
G
M
D
J
제1 폴리펩티드
사슬
제3 폴리펩티드
사슬
E
K

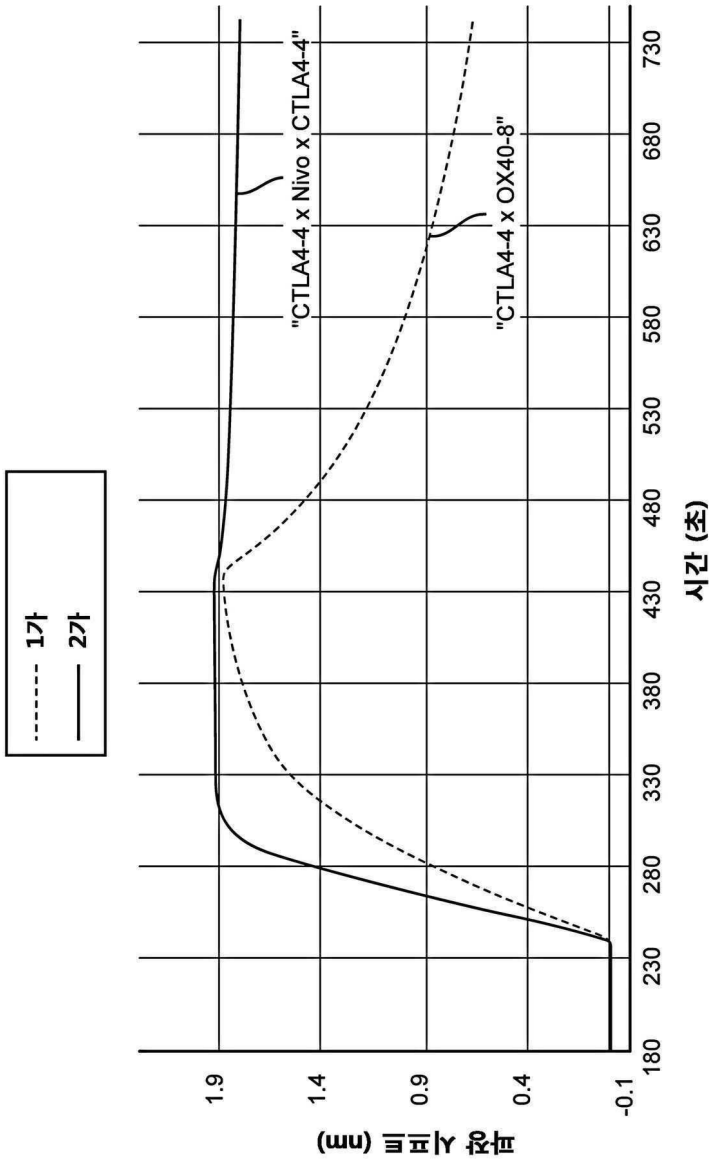
도면27


"CTLA4-4 x Nivo x CTLA4-4"
사슬 3
사슬 6
사슬 1
사슬 2
DK, 447C-447C
사슬 4
DK, 447C-447C
354C-349C
범례:
VH
VL
CL
CH1
CH2
CH3
KIH
S-S

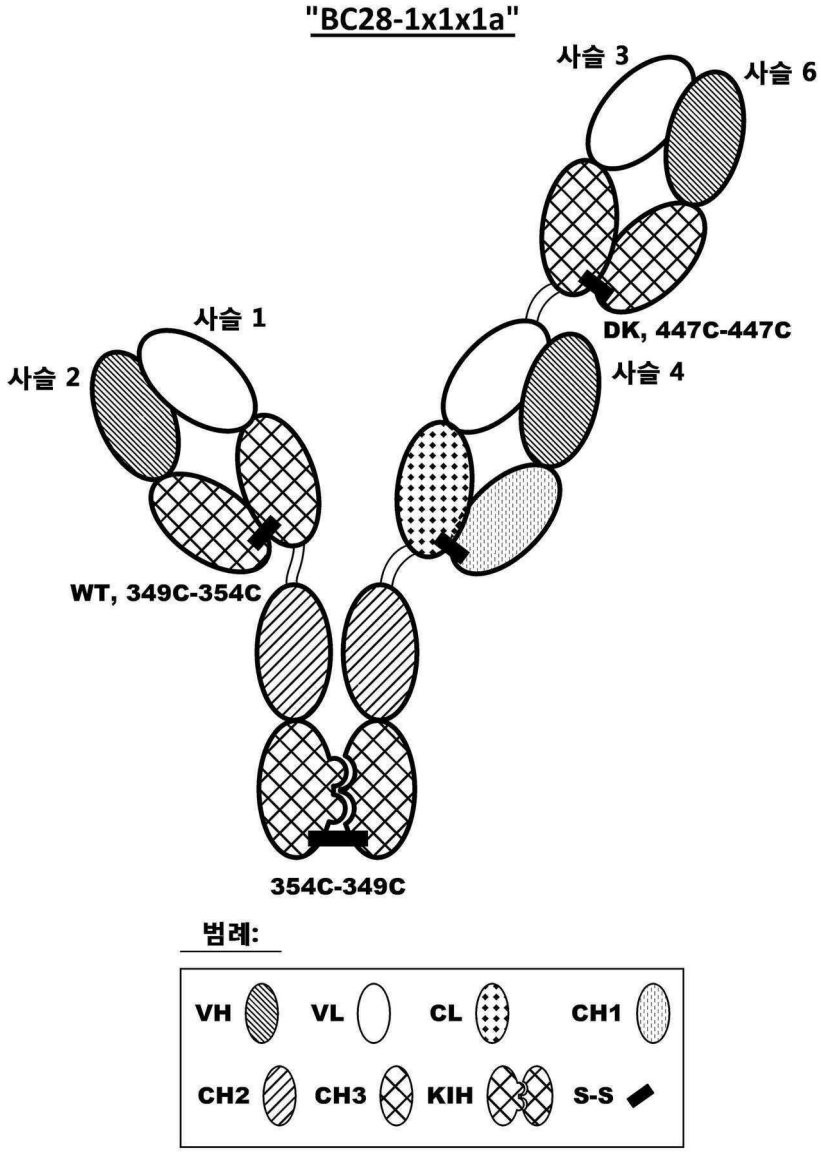
도면28


-DTT +DTT
250 kDa
150 kDa
100 kDa
75 kDa
50 kDa
37 kDa
25 kDa
20 kDa
15 kDa
10 kDa

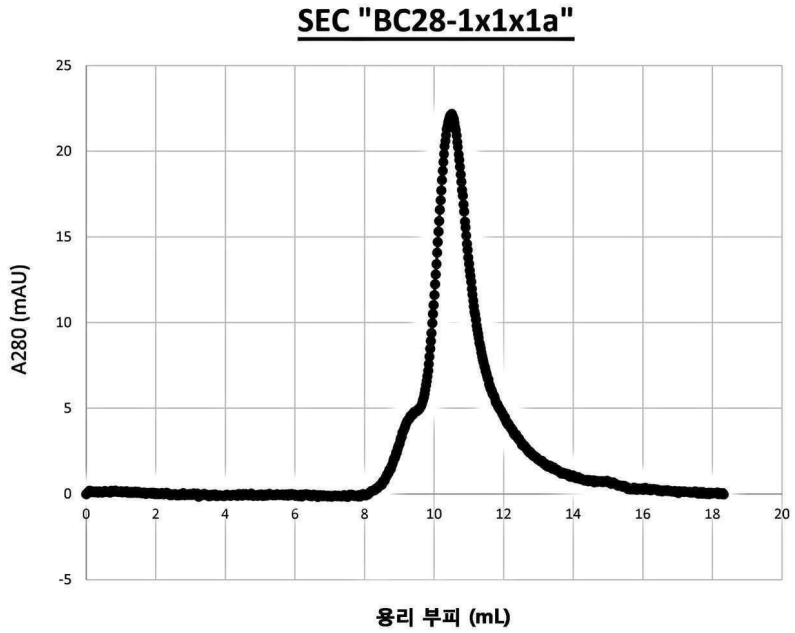
도면29


1가
2가
"CTLA4-4 x Nivo x CTLA4-4"
"CTLA4-4 x OX40-8"
파장 시프트 (nm)
1.9
1.4
0.9
0.4
-0.1
시간 (초)
180
230
280
330
380
430
480
530
580
630
680
730

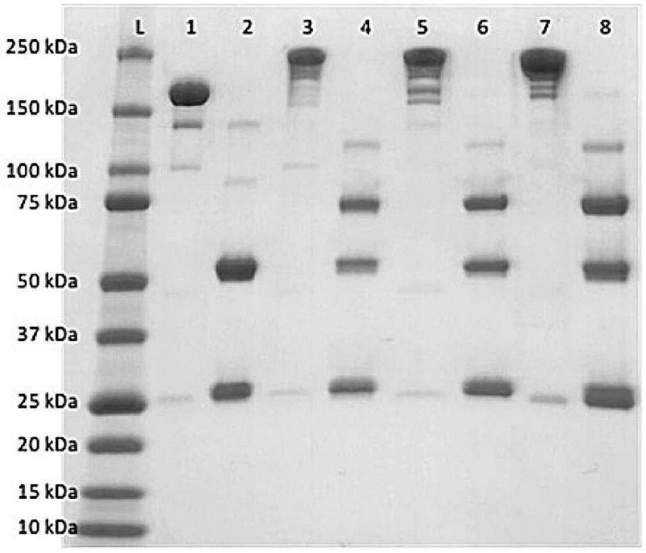
도면30


"BC28-1x1x1a"
사슬 3
사슬 6
사슬 1
사슬 2
DK, 447C-447C
사슬 4
WT, 349C-354C
354C-349C
범례:
VH
VL
CL
CH1
CH2
CH3
KIH
S-S

도면31

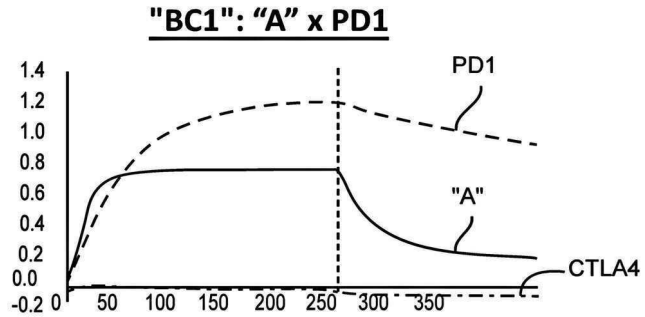



도면32

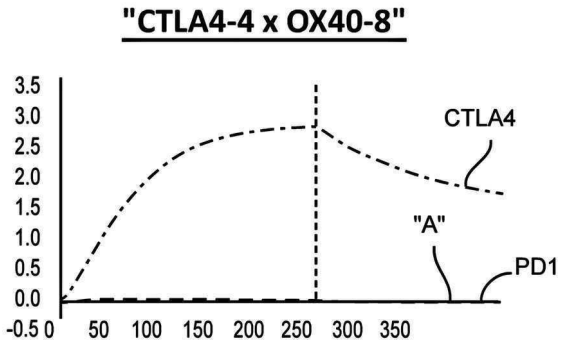



L: 단계(Ladder)
1: "BC1"
2: "BC1" + DTT
3: "BC1-2X1"
4: "BC1-2X1" + DTT
5: "CTLA4-4 x Nivo x CTLA4-4"
6: "CTLA4-4 x Nivo x CTLA4-4" + DTT
7: "BC28-1X1X1a"
8: "BC28-1X1X1a" + DTT

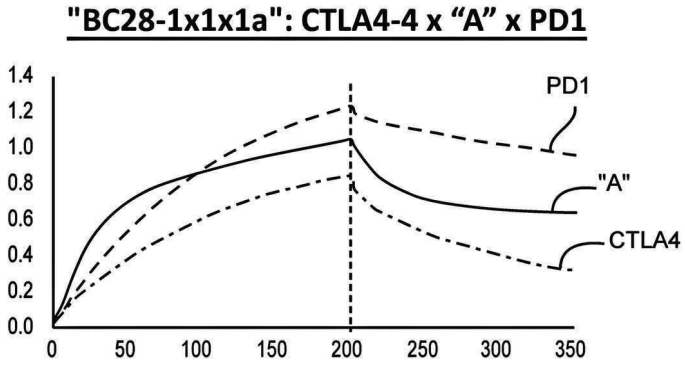
도면33a



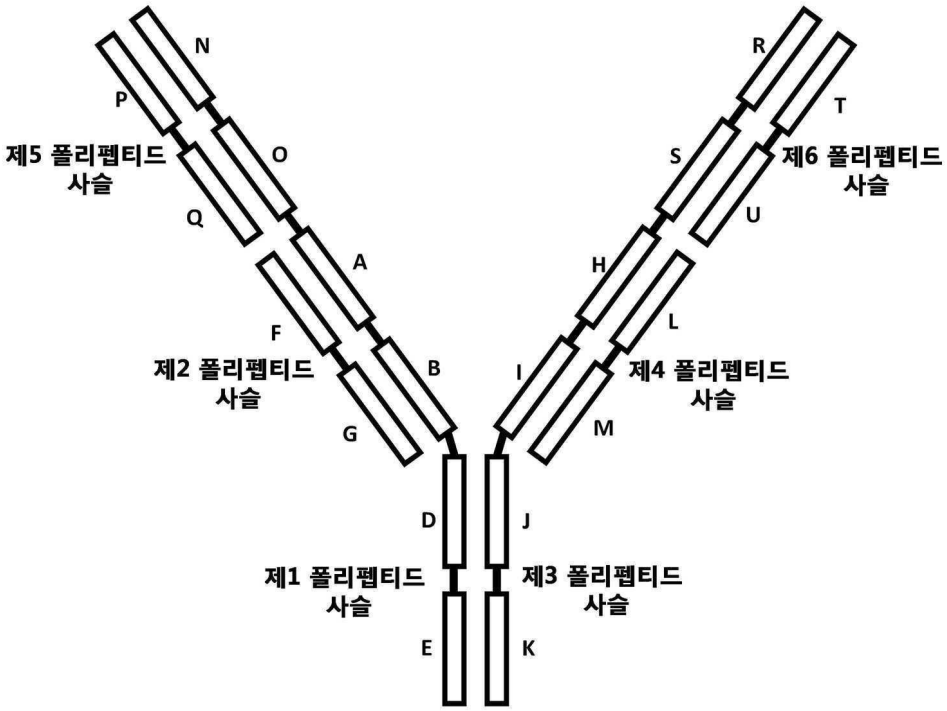

도면33b



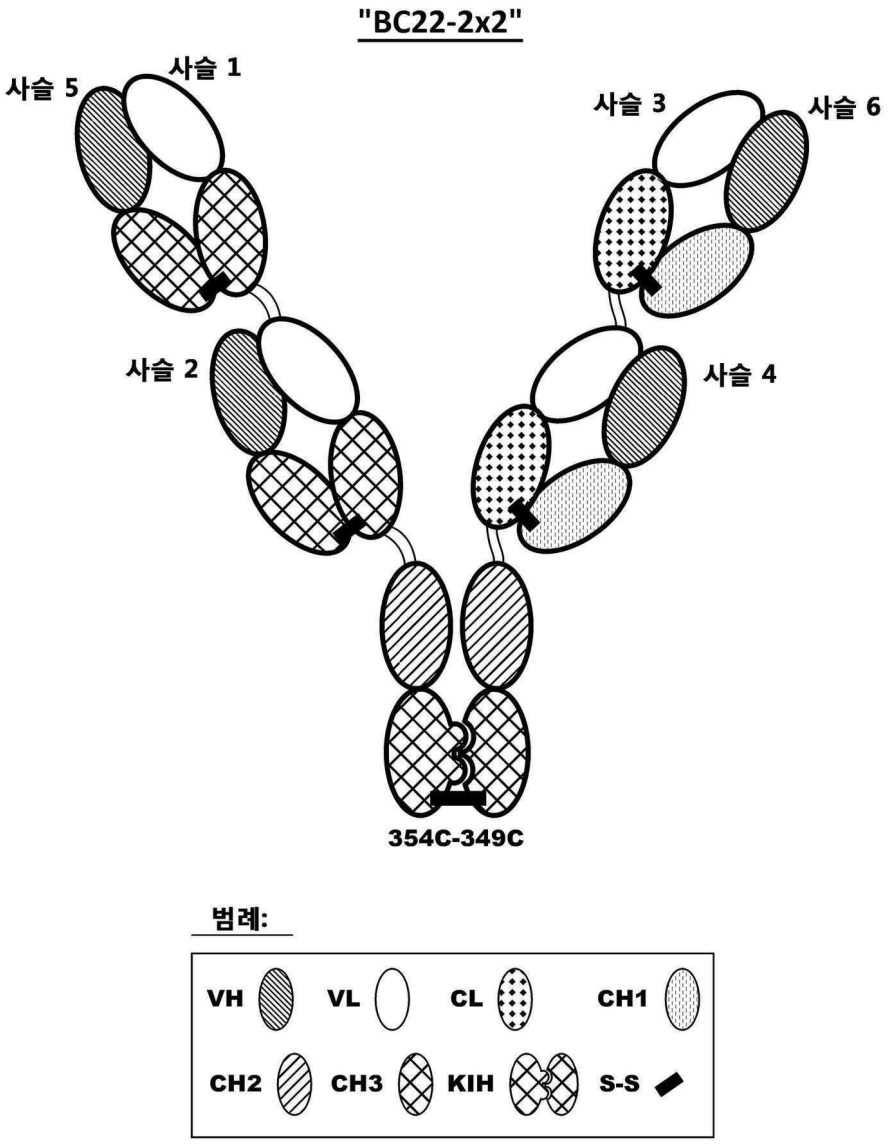

도면33c



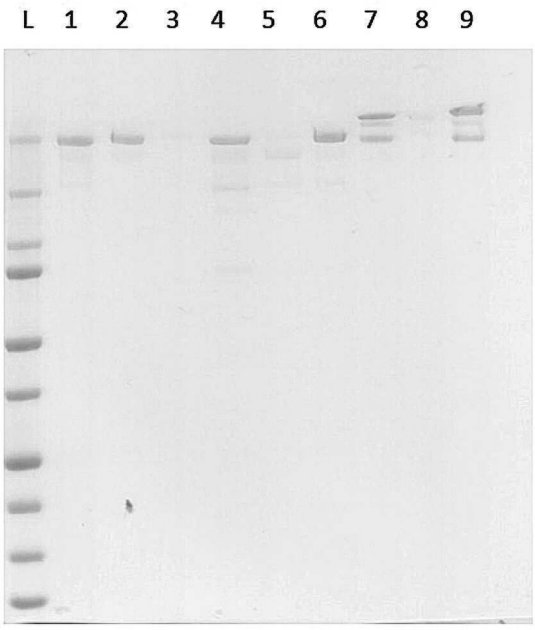
도면34


N
P
제5 폴리펩티드
사슬
O
Q
A
F
제2 폴리펩티드
사슬
B
G
R
T
S
제6 폴리펩티드
사슬
U
H
L
I
제4 폴리펩티드
사슬
M
D
J
제1 폴리펩티드
사슬
제3 폴리펩티드
사슬
E
K

도면35

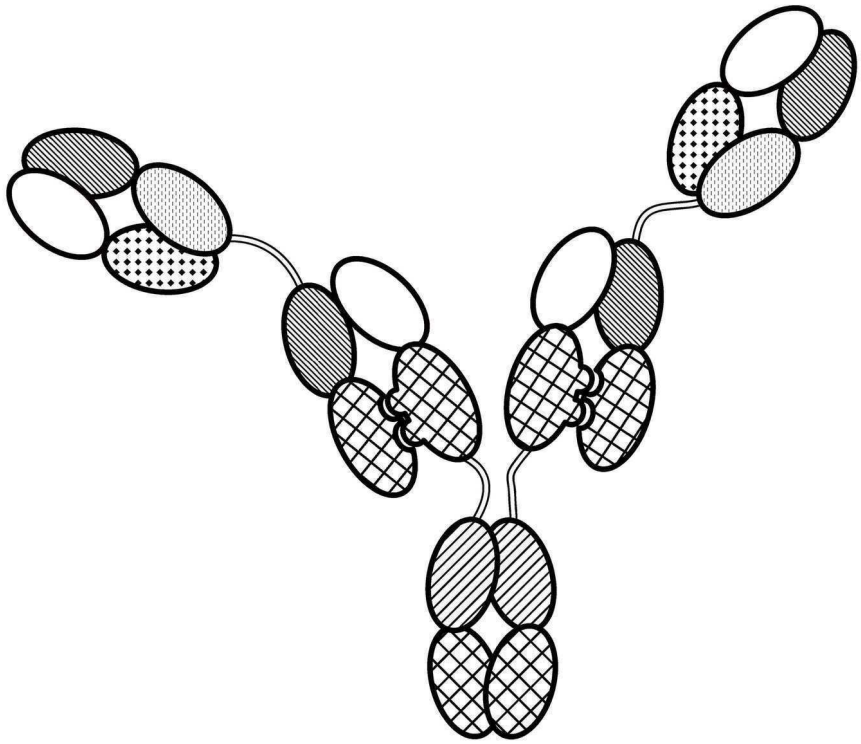

"BC22-2x2"
사슬 1
사슬 5
사슬 3
사슬 6
사슬 2
사슬 4
354C-349C
범례:
VH
VL
CL
CH1
CH2
CH3
KIH
S-S

도면36

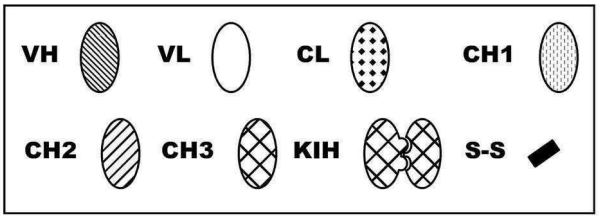



L: 단계(Ladder)
1: "BC21-2X1", CH1 용리액
2: "BC21-2X1", IEX 후 pk 1
3: "BC21-2X1", IEX 후 pk 2
4: "BC12-1X2", CH1 용리액
5: "BC12-1X2", IEX 후 pk 1
6: "BC12-1X2", IEX 후 pk 2
7: "BC22-2X2", CH1 용리액
8: "BC22-2X2", IEX 후 pk 1
9: "BC22-2X2", IEX 후 pk 2

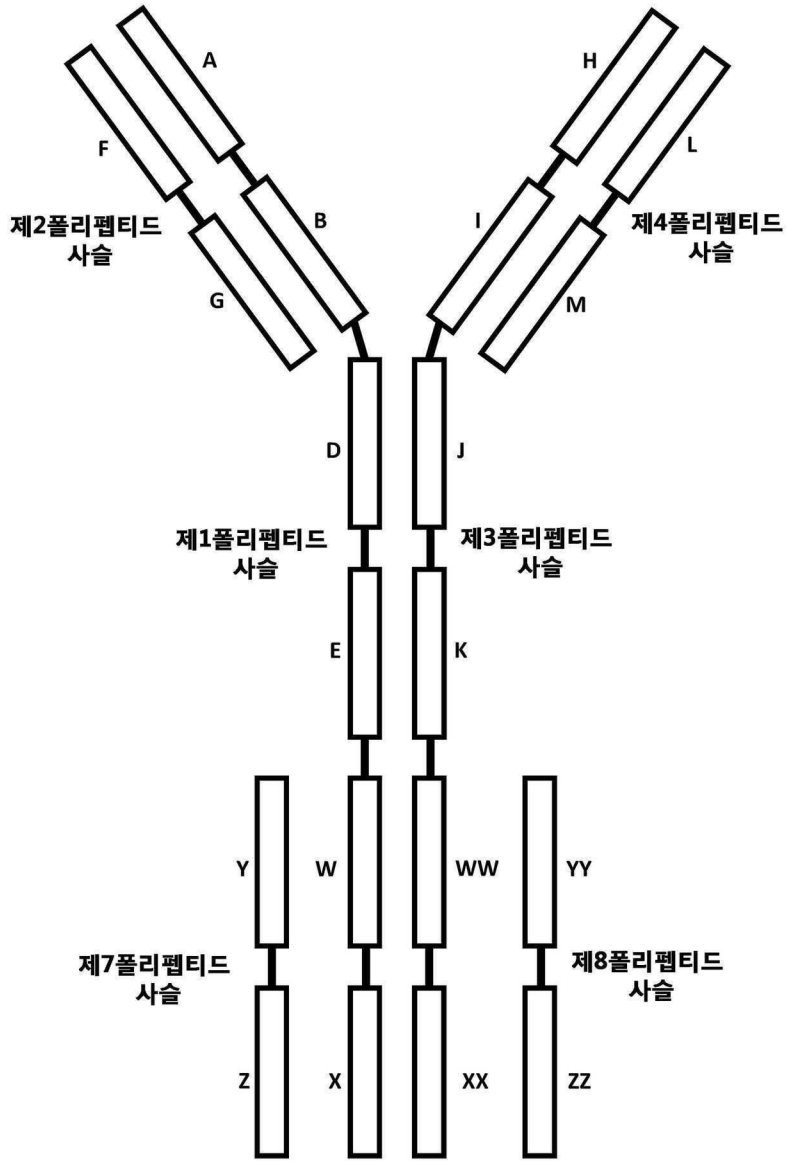
도면37



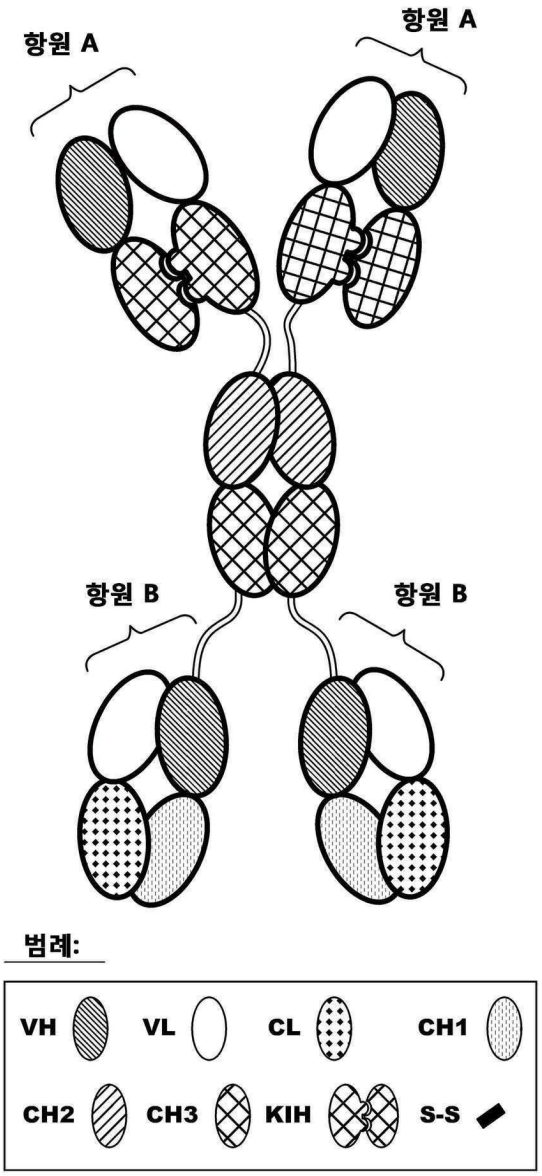
범례:



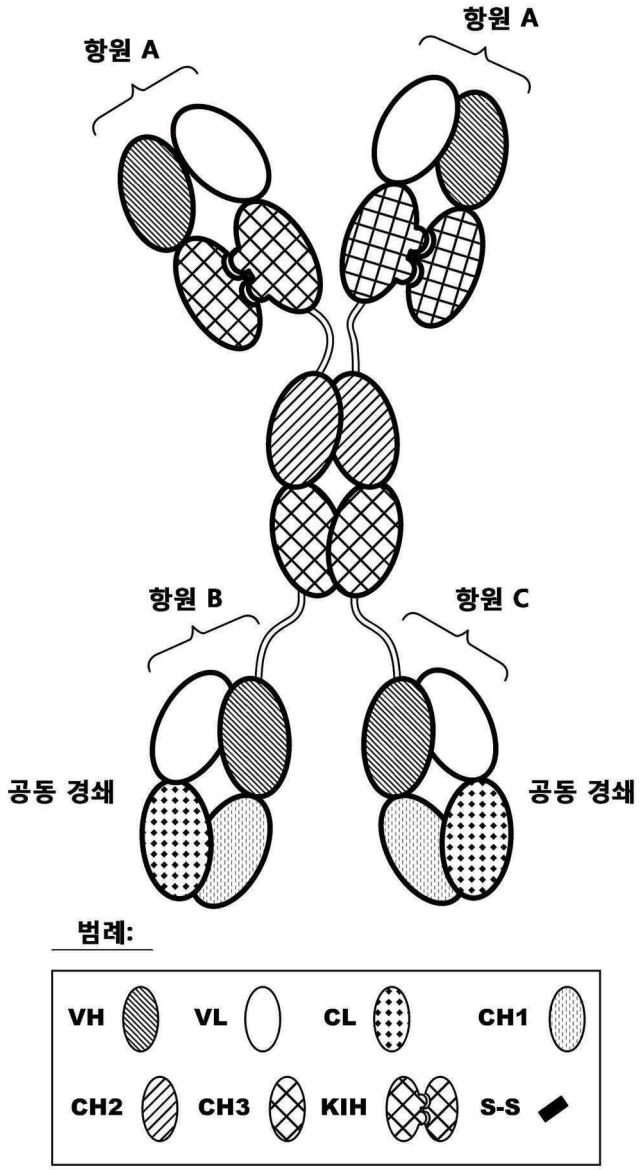
도면38


A
F
B
G
제2폴리펩티드
사슬
H
L
I
M
제4폴리펩티드
사슬
D
J
제1폴리펩티드
사슬
제3폴리펩티드
사슬
E
K
Y
W
WW
YY
제7폴리펩티드
사슬
제8폴리펩티드
사슬
Z
X
XX
ZZ

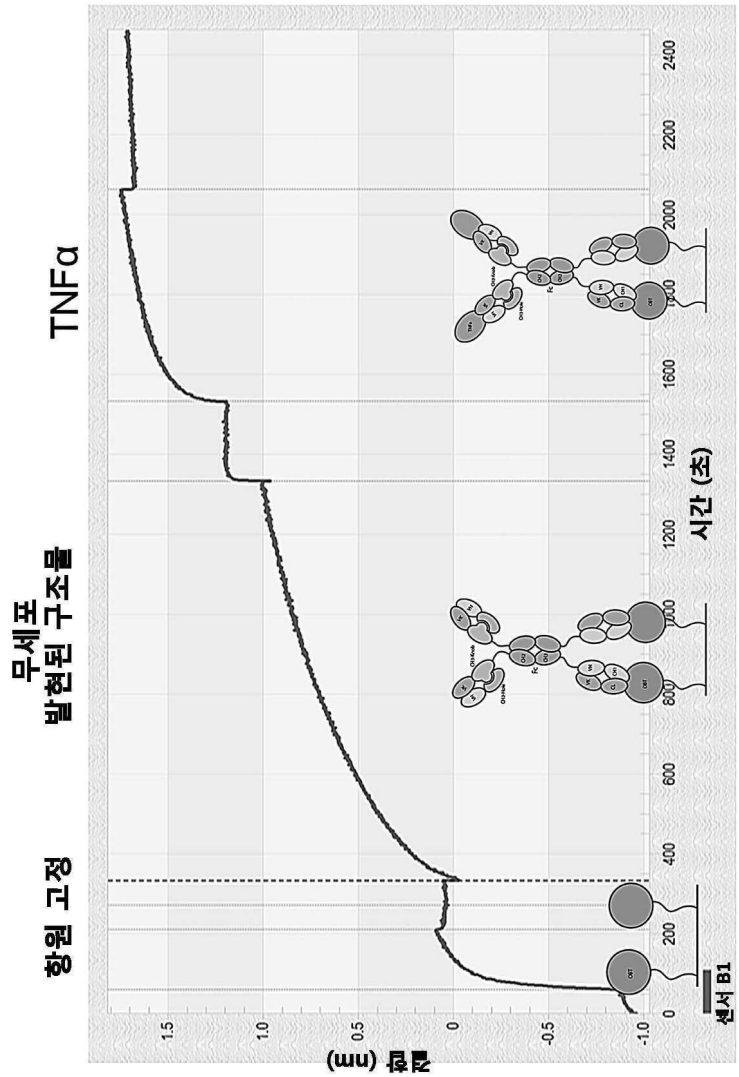
도면39



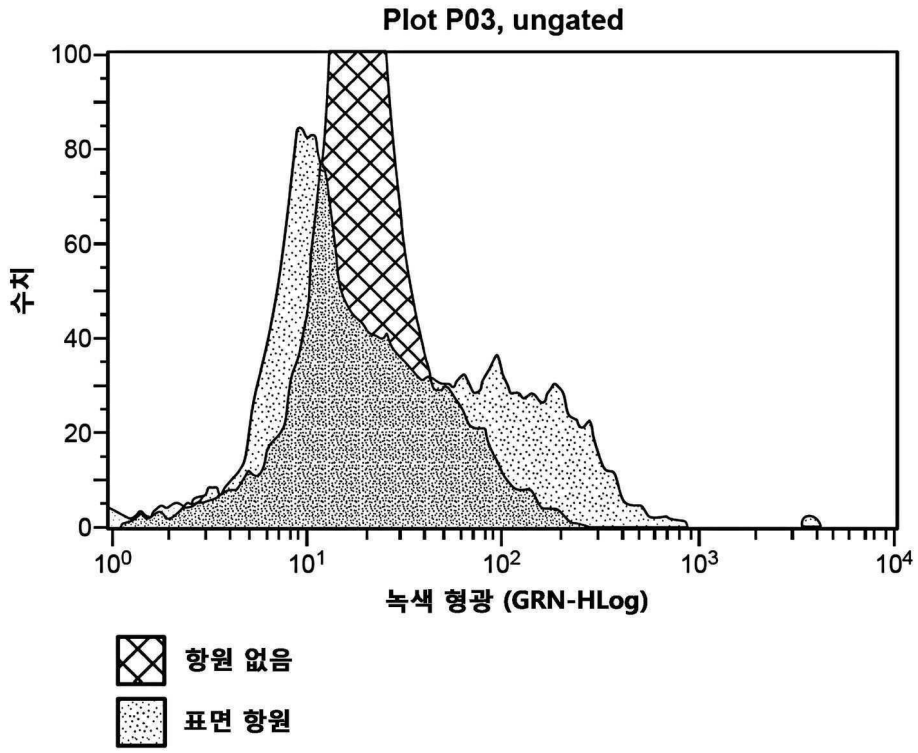
도면40



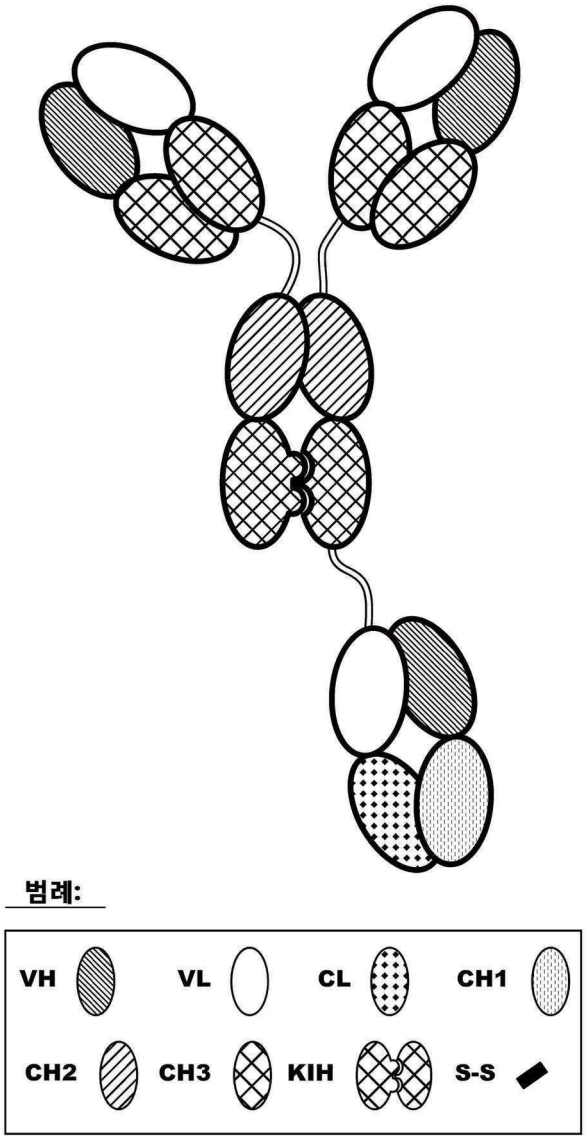
도면41



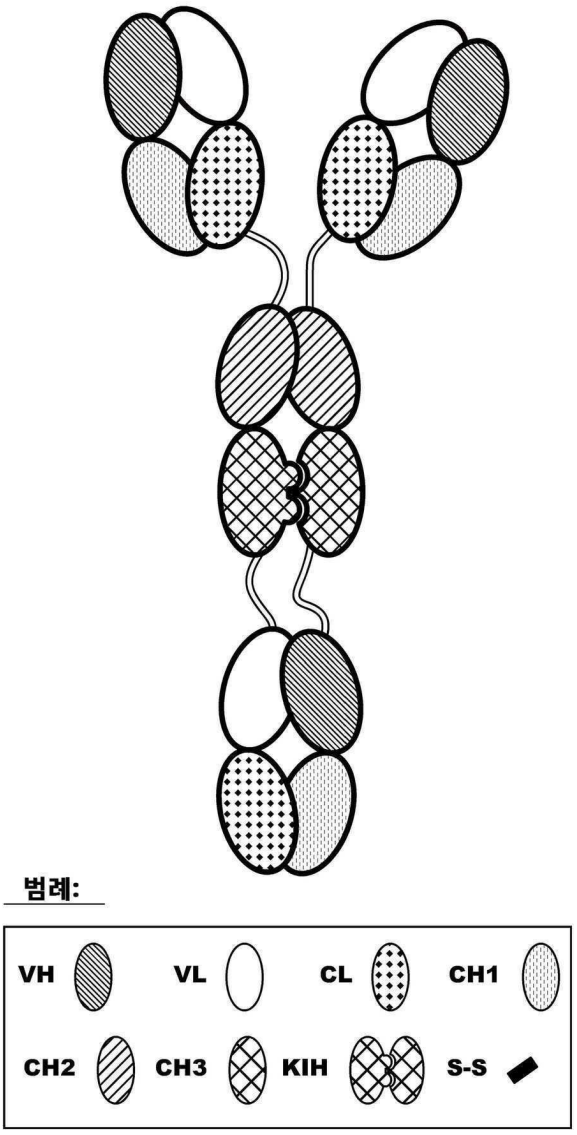
도면42


Plot P03, ungated
100
80
60
40
20
0
수치
$10^0$
$10^1$
$10^2$
$10^3$
$10^4$
녹색 형광 (GRN-HLog)
항원 없음
표면 항원

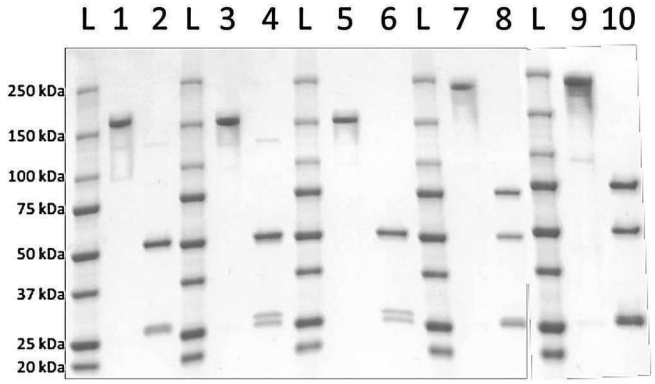
도면43



도면44

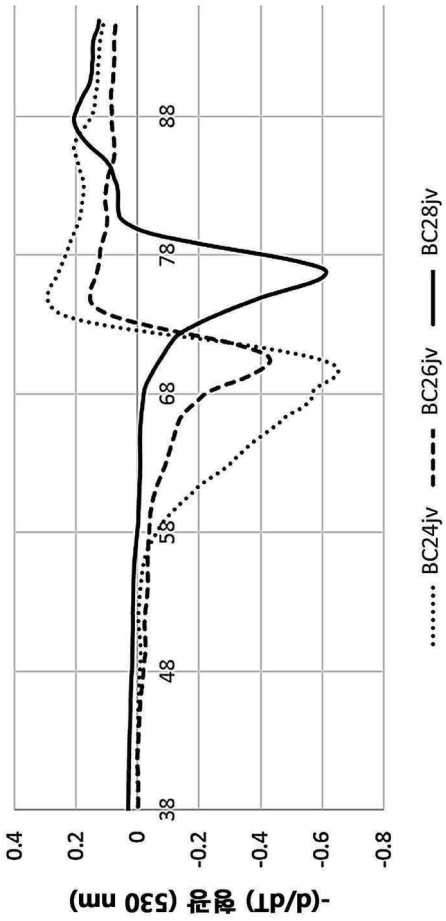


도면45




L: 단계(Ladder)
1: "BC1"
2: "BC1" + DTT
3: "BC28"
4: "BC28" + DTT
5: "BC44"
6: "BC44" + DTT
7: "BC28-1x2"
8: "BC28-1x2" + DTT
9: "BC28-1x1x1a"
10: "BC28-1x1x1a" + DTT

도면46




## 서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> INVENRA INC.

<120> ANTIBODY CONSTRUCTS

<130> 34034-37489/PCT

<140> PCT/US2017/057268

<141> 2017-10-18

<150> 62/555,498

<151> 2017-09-07

<150> 62/549,894

<151> 2017-08-24

<150> 62/410,054

<151> 2016-10-19

<160> 68

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 338

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 1

Val Glu Ile Lys Arg Thr Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

1 5 10 15

Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu

20 25 30

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

85 90 95

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Asp

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

Gly Lys

<210> 2

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 2

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

1 5 10 15

Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys

20 25 30

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

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105 110

<210> 3
<211> 338
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 3
Val Glu Ile Lys Arg Thr Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
1 5 10 15
Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 4

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
1 5 10 15

Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
20 25 30

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
35 40 45

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
50 55 60

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
65 70 75 80

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
85 90 95

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105 110

<210> 5

<211> 338

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 5

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

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

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

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

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
195 200 205
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
210 215 220
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
225 230 235 240
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

Gly Lys

<210> 6

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 6

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

1 5 10 15

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys

20 25 30

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Pro Lys Ser Cys

100 105

<210> 7

<211> 105

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

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

<210> 8

<211> 441

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 8

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

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Arg 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 His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Pro Arg Glu
100 105 110

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

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
180 185 190
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
195 200 205
Ser Leu Ser Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
210 215 220
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
225 230 235 240

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
245 250 255
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
260 265 270
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
275 280 285

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

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
305 310 315 320
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
325 330 335
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu
340 345 350
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
355 360 365

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 9
<211> 227
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 9
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 Asp Tyr

20 25 30

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

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

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

Gly Glu Cys
225

<210> 10
<211> 441
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 10

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

290 295 300

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

305 310 315 320

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

325 330 335

Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met

340 345 350

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

355 360 365

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

420 425 430

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440

<210> 11

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 11

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

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

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

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

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

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205

Lys Lys Val Glu Pro Pro Lys Ser Cys

210 215

<210> 12
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 12

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Arg 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 His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

<210>
13
<211> 105
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 13

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

1 5 10 15

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

20 25 30

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

35 40 45

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

50 55 60

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

65 70 75 80

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

85 90 95

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Lys Ser Cys

100 105

<210> 14

<211> 110

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys

100 105 110

<210> 15

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 15

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

1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 16

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 16

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 Asp Tyr
20 25 30
Asp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

<210> 17

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 17

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
35 40 45
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

50 55 60

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
65 70 75 80
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
85 90 95

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Gly Glu Cys
100 105

<210> 18
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 18
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

<210> 19
<211> 107
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 19

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

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

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

<210> 20

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 20

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

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

65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys

100 105 110

<210> 21

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 21

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 22

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 22

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 23

<211> 104

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 23

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Val Glu Pro Pro Lys Ser Cys

100

<210> 24

<211> 441

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 24

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Arg 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 His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

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

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

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

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

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

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

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
420 425 430
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 25
<211> 227
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 25
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 Asp Tyr
20 25 30
Asp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Asp Ile Thr Pro Tyr Asp Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Leu Val Gly Glu Ile Ala Thr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser 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 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220
Pro Gly Lys
225

<210> 26
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 26
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Arg 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 His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

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

100 105

<210> 27

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 27

Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu

1 5 10 15

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

20 25 30

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

35 40 45

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

50 55 60

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

65 70 75 80

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

85 90 95

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 28

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys

100 105 110

<210> 29

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 29

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
1 5 10 15
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe

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

85 90 95
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

<210> 30
<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 30
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 Asp Tyr

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

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

85 90 95

Ala Arg Leu Val Gly Glu Ile Ala Thr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115 120

<210> 31

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 31

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu

1 5 10 15

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

20 25 30

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

35 40 45

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

50 55 60

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

65 70 75 80

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

85 90 95

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 32

<211> 441

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 32

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Arg 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 His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

290 295 300

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

305 310 315 320

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

325 330 335

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu

340 345 350

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

355 360 365

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

370 375 380

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

385 390 395 400

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

405 410 415

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

420 425 430

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440

<210> 33

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 33

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg 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 His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

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

<210> 34

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 34

Val Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
1 5 10 15

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
20 25 30

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

35 40 45

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
50 55 60

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

<210> 35
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 35

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys 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 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100 105 110

<210> 36

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 36

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

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

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

<210> 37

<211> 661

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 37

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

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

```
            20                  25                  30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

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

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
        195                 200                 205
Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ile Val Leu
    210                 215                 220
Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
225                 230                 235                 240
Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr
                245                 250                 255

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser
            260                 265                 270
```

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

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
325 330 335
Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
340 345 350
Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
355 360 365
Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
370 375 380

Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
385 390 395 400
Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
405 410 415
Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly
420 425 430
Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
435 440 445

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
450 455 460
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
465 470 475 480
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
485 490 495
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

Leu Ser Pro Gly Lys

660

<210> 38

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 38

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Arg 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 His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

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

100 105

<210> 39

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 39

Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu

1 5 10 15

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

20 25 30

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

35 40 45

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

50 55 60

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

65 70 75 80

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

85 90 95

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 40

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 40

Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5

<210> 41

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 41

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

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

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 42

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

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

<210> 43

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 43

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

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

<210> 44
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 44
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
1 5 10 15
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
20 25 30
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

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

<210> 45

<211> 661

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 45

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg 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 Arg Asp Ser Tyr Leu Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Pro Arg Glu
100 105 110

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
115 120 125

Gln Val Ser Leu Lys Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
130 135 140

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
145 150 155 160

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

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

180 185 190

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
195 200 205
Ser Leu Ser Lys Ser Cys Gly Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ile Val Leu
210 215 220
Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
225 230 235 240
Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr
245 250 255

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

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
325 330 335
Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
340 345 350
Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
355 360 365
Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
370 375 380

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

Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
435 440 445

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
450 455 460
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
465 470 475 480
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
485 490 495
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
500 505 510

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

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

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
645 650 655
Leu Ser Pro Gly Lys
660

<210> 46

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 46

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

20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Arg 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 Arg Asp Ser Tyr Leu Trp

85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

<210> 47

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 47

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
1 5 10 15
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

20 25 30

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

35 40 45

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

50 55 60

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

65 70 75 80

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

85 90 95

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Lys Ser Cys

100 105

<210> 48

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 48

Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5

<210> 49

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 49

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

<210> 50
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 50
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

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

<210> 51

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 51

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys 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 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100 105 110

<210> 52

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 52

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
1 5 10 15

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

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

<210> 53
<211> 224
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 53
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
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Tyr Pro Tyr Thr Gly Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Glu Tyr Thr Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Asp
115 120 125

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr 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 Gly Glu Cys
210 215 220
<210> 54
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 54
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
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Tyr Pro Tyr Thr Gly Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Glu Tyr Thr Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115

<210> 55
<211> 105
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 55
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Asp Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu

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

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

<210> 56
<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 56

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 57

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 57

Ile Lys Arg Thr Pro Arg Glu Pro

1 5

<210> 58

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 58

Ile Lys Arg Thr Val Arg Glu Pro

1 5

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 59

Ile Lys Arg Thr Arg Glu Pro

1 5

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 60

Ile Lys Arg Thr Val Pro Arg Glu Pro

1 5

<210> 61

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 61

Ile Lys Arg Thr Val Ala Glu Pro

1 5

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 62

Ile Lys Arg Thr Val Ala Pro Arg Glu Pro

1 5 10

<210> 63

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 63

Ser Ser Ala Ser Pro Arg Glu Pro

1 5

<210> 64

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 64

Ser Ser Ala Ser Thr Arg Glu Pro

1 5

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 65

Ser Ser Ala Ser Thr Pro Arg Glu Pro

1 5

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 66

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Glu Pro
1 5

<210> 67

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 67

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Arg Glu Pro
1 5 10

<210> 68

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 68

Asp Lys Thr His Thr
1 5