(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0094588
(43) 공개일자 2021년07월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C07K 16/28* (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
*A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*C07K 16/2809* (2013.01)
*A61P 35/00* (2018.01)
(21) 출원번호 10-2021-7018825
(22) 출원일자(국제) 2019년12월19일
심사청구일자 2021년06월18일
(85) 번역문제출일자 2021년06월18일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2019/086144
(87) 국제공개번호 WO 2020/127619
국제공개일자 2020년06월25일
(30) 우선권주장
18214994.8 2018년12월21일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
**에프. 호프만-라 로슈 아게**
스위스 체하-4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124
(72) 발명자
**프라이모서-그룬트쇼버 안네**
스위스 8952 슐리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카트 아게
**호퍼 토마스**
스위스 8952 슐리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카트 아게
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**제일특허법인(유)**

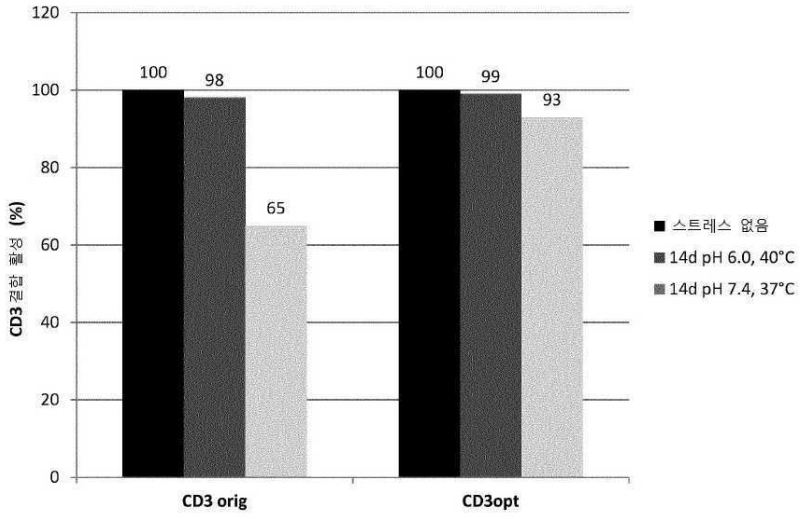
전체 청구항 수 : 총 36 항

(54) 발명의 명칭 **CD3에 결합하는 항체**

## (57) 요 약

본원 발명은 예를 들면 T 세포를 활성화시키기 위한, 다중특이적 항체를 비롯한, CD3에 결합하는 항체에 전반적으로 관계한다. 이에 더하여, 본원 발명은 이런 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 이런 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 숙주 세포에 관계한다. 본원 발명은 이런 항체를 생산하기 위한 방법, 및 질환의 치료에서 이들을 이용하는 방법에 더욱 관계한다.

*대 표 도* - 도2



(52) CPC특허분류
*A61K 2039/505* (2013.01)
*C07K 2317/31* (2013.01)
*C07K 2317/40* (2013.01)
*C07K 2317/55* (2013.01)
*C07K 2317/565* (2013.01)
*C07K 2317/62* (2013.01)
*C07K 2317/66* (2013.01)
*C07K 2317/92* (2013.01)
(72) 발명자
**호세 랄프**
스위스 8952 슐리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카트 아게
**뫼스너 에케하르트**
스위스 8952 슐리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카트 아게
**니콜리니 발레리아 지**
스위스 8952 슐리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카트 아게
**우마나 파블로**
스위스 8952 슐리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카트 아게
**발트하우어 인야**
스위스 8952 슐리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카트 아게
**리히터 볼프강**
스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게
**크나우프 알렉산더**
독일 82377 펜츠베르크 노넨발트 2 로슈 디아그노스틱스 게엠베하
**트로차노브스카 할리나**
스위스 8952 슐리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카트 아게

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

CD3에 결합하는 항체로서, 상기 항체는 서열 번호 2의 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR) 1, 서열 번호 3의 HCDR 2 및 서열 번호 5의 HCDR 3을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH), 및 서열 번호 8의 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR) 1, 서열 번호 9의 LCDR 2 및 서열 번호 10의 LCDR 3을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하는 첫 번째 항원 결합 도메인을 포함하는, 항체.

### 청구항 2

청구항 제1항에 있어서, VH는 서열 번호 7의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고/하거나 VL은 서열 번호 11의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 항체.

### 청구항 3

CD3에 결합하는 항체로서, 상기 항체는 서열 번호 7의 VH 서열 및 서열 번호 11의 VL 서열을 포함하는 첫 번째 항원 결합 도메인을 포함하는, 항체.

### 청구항 4

청구항 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 첫 번째 항원 결합 도메인은 Fab 분자인, 항체.

### 청구항 5

청구항 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 첫 번째와 두 번째 아단위로 구성되는 Fc 도메인을 포함하는, 항체.

### 청구항 6

청구항 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 두 번째 항원에 결합하는 두 번째 및 임의적으로 세 번째 항원 결합 도메인을 포함하는, 항체.

### 청구항 7

청구항 제6항에 있어서, 두 번째 및/또는 존재하는 경우에, 세 번째 항원 결합 도메인은 Fab 분자인, 항체.

### 청구항 8

청구항 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 첫 번째 항원 결합 도메인은 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL과 VH 또는 불변 도메인 CL과 CH1, 특히 가변 도메인 VL과 VH가 서로에 의해 대체되는 Fab 분자인, 항체.

### 청구항 9

청구항 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 두 번째 및 존재하는 경우에, 세 번째 항원 결합 도메인은 전통적인 Fab 분자인, 항체.

### 청구항 10

청구항 제6항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 두 번째 및 존재하는 경우에, 세 번째 항원 결합 도메인은 불변 도메인 CL 내에서 위치 124에서 아미노산이 리신 (K), 아르기닌 (R) 또는 히스티딘 (H) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 독립적으로 치환되고 위치 123에서 아미노산이 리신 (K), 아르기닌 (R) 또는 히스티딘 (H)에 의해 독립적으로 치환되고 (Kabat에 따른 넘버링), 불변 도메인 CH1 내에서 위치 147에서 아미노산이 글루타민산 (E) 또는 아스파르트산 (D) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 독립적으로 치환되고 위치 213에서 아미노산이

글루타민산 (E) 또는 아스파르트산 (D) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 독립적으로 치환되는 Fab 분자인, 항체.

**청구항 11**

청구항 제6항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 첫 번째와 두 번째 항원 결합 도메인은 임의적으로 펩티드 링커를 통해, 서로에 융합되는, 항체.

**청구항 12**

청구항 제6항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 첫 번째와 두 번째 항원 결합 도메인은 각각 Fab 분자이고, (i) 두 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 첫 번째 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합되거나, (ii) 첫 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 두 번째 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합되는, 항체.

**청구항 13**

청구항 제6항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 첫 번째, 두 번째 및 존재하는 경우에, 세 번째 항원 결합 도메인은 각각 Fab 분자이고, 항체는 첫 번째와 두 번째 아단위로 구성되는 Fc 도메인을 포함하고; 여기서 (i) 두 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 첫 번째 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합되고, 첫 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 첫 번째 아단위의 N 말단에 융합되거나, (ii) 첫 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 두 번째 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합되고, 두 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 첫 번째 아단위의 N 말단에 융합되고; 존재하는 경우에, 세 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 두 번째 아단위의 N 말단에 융합되는, 항체.

**청구항 14**

청구항 제5항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인은 IgG, 특히 $IgG_1$, Fc 도메인인, 항체.

**청구항 15**

청구항 제5항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인은 인간 Fc 도메인인, 항체.

**청구항 16**

청구항 제5항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, Fc는 Fc 도메인의 첫 번째와 두 번째 아단위의 연관을 증진하는 변형을 포함하는, 항체.

**청구항 17**

청구항 제5항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인은 Fc 수용체에 결합 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 항체.

**청구항 18**

청구항 제6항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 두 번째 항원은 표적 세포 항원, 특히 종양 세포 항원인, 항체.

**청구항 19**

청구항 제6항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 두 번째 항원은 TYRP-1인, 항체.

**청구항 20**

청구항 제19항에 있어서, 두 번째 및 존재하는 경우에, 세 번째 항원 결합 도메인은 서열 번호 15의 HCDR 1, 서열 번호 16의 HCDR 2 및 서열 번호 17의 HCDR 3을 포함하는 VH, 및 서열 번호 19의 LCDR 1, 서열 번호 20의 LCDR 2 및 서열 번호 21의 LCDR 3을 포함하는 VL을 포함하는, 항체.

**청구항 21**

청구항 제19항 또는 제20항에 있어서, 두 번째 및 존재하는 경우에, 세 번째 항원 결합 도메인은 서열 번호 18의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 및/또는 서열 번호 22의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는, 항체.

**청구항 22**

청구항 제6항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 두 번째 항원은 EGFRvIII인, 항체.

**청구항 23**

청구항 제22항에 있어서, 두 번째 및 존재하는 경우에, 세 번째 항원 결합 도메인은 서열 번호 85의 HCDR 1, 서열 번호 86의 HCDR 2 및 서열 번호 87의 HCDR 3을 포함하는 VH, 및 서열 번호 89의 LCDR 1, 서열 번호 90의 LCDR 2 및 서열 번호 91의 LCDR 3을 포함하는 VL을 포함하는, 방법.

**청구항 24**

청구항 제22항 또는 제23항에 있어서, 두 번째 및 존재하는 경우에, 세 번째 항원 결합 도메인은 서열 번호 88의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 및/또는 서열 번호 92의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는, 항체.

**청구항 25**

청구항 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 항체를 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

**청구항 26**

청구항 제25항의 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포.

**청구항 27**

CD3에 결합하는 항체를 생산하는 방법으로서, (a) 항체의 발현에 적합한 조건 하에 청구항 제26항의 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 임의적으로 (b) 항체를 회수하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 28**

청구항 제27항의 방법에 의해 생산된, CD3에 결합하는 항체.

**청구항 29**

청구항 제1항 내지 제24항 및 제28항 중 어느 한 항의 항체 및 제약학적으로 허용되는 운반체를 포함하는 제약학적 조성물.

**청구항 30**

약제로서 이용을 위한 청구항 제1항 내지 제24항 및 제28항 중 어느 한 항의 항체 또는 청구항 제29항의 제약학적 조성물.

**청구항 31**

암의 치료에서 이용을 위한 청구항 제1항 내지 제24항 및 제28항 중 어느 한 항의 항체 또는 청구항 제29항의 제약학적 조성물.

**청구항 32**

약제의 제조에서 청구항 제1항 내지 제24항 및 제28항 중 어느 한 항의 항체 또는 청구항 제29항의 제약학적 조성물의 용도.

**청구항 33**

암의 치료를 위한 약제의 제조에서 청구항 제1항 내지 제24항 및 제28항 중 어느 한 항의 항체 또는 청구항 제29항의 제약학적 조성물의 용도.

**청구항 34**

개체에서 질환을 치료하는 방법으로서, 청구항 제1항 내지 제24항 및 제28항 중 어느 한 항의 항체 또는 청구항 제29항의 제약학적 조성물의 효과량을 상기 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 35**

청구항 제34항에 있어서, 질환은 암인, 방법.

**청구항 36**

전술된 바와 같은 발명.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 본원 발명은 예를 들면 T 세포를 활성화시키기 위한, 다중특이적 항체를 비롯한, CD3에 결합하는 항체에 전반적으로 관계한다. 이에 더하여, 본원 발명은 이런 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 이런 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 숙주 세포에 관계한다. 본원 발명은 이런 항체를 생산하기 위한 방법, 및 질환의 치료에서 이들을 이용하는 방법에 더욱 관계한다.

### *배 경 기 술*

[0002] CD3 (분화 클러스터 3)은 4개의 아단위, CD3γ 사슬, CD3δ 사슬, 및 2개의 CD3ε 사슬로 구성되는 단백질 복합체이다. CD3은 T 세포 수용체 및 ζ 사슬과 연관하여 T 림프구에서 활성화 신호를 산출한다.

[0003] CD3은 약물 표적으로서 광범위하게 탐구되고 있다. CD3을 표적으로 하는 단일클론 항체는 자가면역 질환 예컨대 I형 당뇨병에서 면역억제제 요법으로서, 또는 이식 거부반응의 치료에서 이용되고 있다. CD3 항체 무로모납-cd3 (OKT3)은 1985년에 인간에서 임상적 이용을 위해 승인된 첫 번째 단일클론 항체이었다.

[0004] CD3 항체의 더욱 최근 적용은 한편으로 CD3 및 다른 한편으로 종양 세포 항원에 결합하는 이중특이적 항체의 형태이다. 이들 표적 둘 모두에 이런 항체의 동시적 결합은 표적 세포 및 T 세포 사이에 일시적인 상호작용을 강제하여, 임의의 세포독성 T 세포의 활성화 및 표적 세포의 차후 용해를 유발할 것이다.

[0005] 치료 목적을 위해, 항체가 충족해야 하는 중요한 요건은 시험관내 (약물의 보관 동안) 및 생체내 (환자에 투여 후) 둘 모두에서 충분한 안정성이다.

[0006] 아스파라긴 탈아미드화와 같은 변형은 재조합 항체에 대한 전형적인 분해이고, 시험관내 안정성 및 생체내 생물학적 기능 둘 모두에 영향을 줄 수 있다.

[0007] T 세포의 활성화를 위한 항체, 특히 이중특이적 항체의 엄청난 치료 잠재력을 고려할 때, 최적화된 특성을 갖는 CD3 항체가 요구된다.

### *발명의 내용*

[0008] 본원 발명은 CD3에 결합하고, 예를 들면 아스파라긴 탈아미드화에 의한 분해에 내성이고, 따라서 치료 목적을 위해 요구된 대로 특히 안정되는, 다중특이적 (예를 들면 이중특이적) 항체를 비롯한, 항체를 제공한다. 제공된 (다중특이적) 항체는 우수한 효능과 생산력을 낮은 독성 및 우호적인 약동학적 특성과 더욱 조합한다.

[0009] 본원에서 나타나 있는 바와 같이, 본원 발명에 의해 제공된, CD3에 결합하는, 다중특이적 항체를 비롯한, 항체는 표면 플라스몬 공명 (SPR)에 의해 결정될 때, pH 6, -80℃에서 2주 후 결합 활성에 비하여, pH 7.4, 37℃에서 2주 후 CD3에 대한 약 90% 이상의 결합 활성을 유지한다.

[0010] 한 양상에서, 본원 발명은 CD3에 결합하는 항체를 제공하고, 여기서 상기 항체는 서열 번호 2의 중쇄 상보성 결

정 영역 (HCDR) 1, 서열 번호 3의 HCDR 2 및 서열 번호 5의 HCDR 3을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH), 및 서열 번호 8의 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR) 1, 서열 번호 9의 LCDR 2 및 서열 번호 10의 LCDR 3을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하는 첫 번째 항원 결합 도메인을 포함한다. 한 양상에서, VH는 서열 번호 7의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고/하거나 VL은 서열 번호 11의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0011] 추가의 양상에서, 본원 발명은 CD3에 결합하는 항체를 제공하고, 여기서 상기 항체는 서열 번호 7의 VH 서열 및 서열 번호 11의 VL 서열을 포함하는 첫 번째 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0012] 한 양상에서, 첫 번째 항원 결합 도메인은 Fab 분자이다.

[0013] 한 양상에서, 항체는 첫 번째와 두 번째 아단위로 구성되는 Fc 도메인을 포함한다.

[0014] 한 양상에서, 항체는 두 번째 항원에 결합하는 두 번째 및 임의적으로 세 번째 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0015] 한 양상에서 두 번째 및/또는 존재하는 경우에, 세 번째 항원 결합 도메인은 Fab 분자이다.

[0016] 한 양상에서 첫 번째 항원 결합 도메인은 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL과 VH 또는 불변 도메인 CL과 CH1, 특히 가변 도메인 VL과 VH가 서로에 의해 대체되는 Fab 분자이다.

[0017] 한 양상에서 두 번째 및 존재하는 경우에, 세 번째 항원 결합 도메인은 전통적인 Fab 분자이다.

[0018] 한 양상에서, 두 번째 및 존재하는 경우에, 세 번째 항원 결합 도메인은 불변 도메인 CL 내에 위치 124에서 아미노산이 리신 (K), 아르기닌 (R) 또는 히스티딘 (H) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 독립적으로 치환되고 위치 123에서 아미노산이 리신 (K), 아르기닌 (R) 또는 히스티딘 (H) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 독립적으로 치환되고, 불변 도메인 CH1 내에 위치 147에서 아미노산이 글루타민산 (E) 또는 아스파르트산 (D) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 독립적으로 치환되고 위치 213에서 아미노산이 글루타민산 (E) 또는 아스파르트산 (D) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 독립적으로 치환되는 Fab 분자이다.

[0019] 한 양상에서, 첫 번째와 두 번째 항원 결합 도메인은 임의적으로 펩티드 링커를 통해, 서로에 융합된다.

[0020] 한 양상에서, 첫 번째와 두 번째 항원 결합 도메인은 각각 Fab 분자이고, (i) 두 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 첫 번째 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합되거나, (ii) 첫 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 두 번째 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합된다.

[0021] 한 양상에서, 첫 번째, 두 번째 및 존재하는 경우에, 세 번째 항원 결합 도메인은 각각 Fab 분자이고, 항체는 첫 번째와 두 번째 아단위로 구성되는 Fc 도메인을 포함하고; 여기서 (i) 두 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 첫 번째 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합되고, 첫 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 첫 번째 아단위의 N 말단에 융합되거나, (ii) 첫 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 두 번째 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합되고, 두 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 첫 번째 아단위의 N 말단에 융합되고; 존재하는 경우에, 세 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 두 번째 아단위의 N 말단에 융합된다.

[0022] 한 양상에서, Fc 도메인은 IgG, 특히 $IgG_1$, Fc 도메인이다. 한 양상에서 Fc 도메인은 인간 Fc 도메인이다. 한 양상에서, Fc는 Fc 도메인의 첫 번째와 두 번째 아단위의 연관을 증진하는 변형을 포함한다. 한 양상에서, Fc 도메인은 Fc 수용체에 결합 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다.

[0023] 한 양상에서, 두 번째 항원은 표적 세포 항원, 특히 종양 세포 항원이다.

[0024] 한 양상에서, 두 번째 항원은 TYRP-1이다. 한 양상에서, 두 번째 및 존재하는 경우에, 세 번째 항원 결합 도메인은 서열 번호 15의 HCDR 1, 서열 번호 16의 HCDR 2 및 서열 번호 17의 HCDR 3을 포함하는 VH, 및 서열 번호 19의 LCDR 1, 서열 번호 20의 LCDR 2 및 서열 번호 21의 LCDR 3을 포함하는 VL을 포함한다. 한 양상에서, 두 번째 및 존재하는 경우에, 세 번째 항원 결합 도메인은 서열 번호 18의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 및/또는 서열 번호 22의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함한다.

[0025] 한 양상에서, 두 번째 항원은 EGFRvIII이다. 한 양상에서, 두 번째 및 존재하는 경우에, 세 번째 항원 결합 도메인은 서열 번호 85의 HCDR 1, 서열 번호 86의 HCDR 2 및 서열 번호 87의 HCDR 3을 포함하는 VH, 및 서열 번호 89의 LCDR 1, 서열 번호 90의 LCDR 2 및 서열 번호 91의 LCDR 3을 포함하는 VL을 포함한다. 한 양상에서,

두 번째 및 존재하는 경우에, 세 번째 항원 결합 도메인은 서열 번호 88의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 및/또는 서열 번호 92의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함한다.

[0026] 본원 발명의 추가 양상에 따라서 본원 발명의 항체를 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드, 및 본원 발명의 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포가 제공된다.

[0027] 다른 양상에서 CD3에 결합하는 항체를 생산하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 (a) 항체의 발현에 적합한 조건 하에 본원 발명의 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 임의적으로 (b) 항체를 회수하는 단계를 포함한다. 본원 발명은 또한, 본원 발명의 방법에 의해 생산된, CD3에 결합하는 항체를 포괄한다.

[0028] 본원 발명은 본원 발명의 항체 및 제약학적으로 허용되는 운반체를 포함하는 제약학적 조성물을 더욱 제공한다.

[0029] 본원 발명의 항체 및 제약학적 조성물을 이용하는 방법 또한 본원 발명에 의해 포괄된다. 한 양상에서 본원 발명은 약제로서 이용을 위한, 본원 발명에 따른 항체 또는 제약학적 조성물을 제공한다. 한 양상에서 질환의 치료에서 이용을 위한, 본원 발명에 따른 항체 또는 제약학적 조성물이 제공된다. 특정한 양상에서 질환은 암이다.

[0030] 약제의 제조에서 본원 발명에 따른 항체 또는 제약학적 조성물의 용도, 질환, 특히 암의 치료를 위한 약제의 제조에서 본원 발명에 따른 항체 또는 제약학적 조성물의 용도 역시 제공된다. 본원 발명은 또한, 개체에서 질환을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원 발명에 따른 항체 또는 제약학적 조성물의 효과량을 상기 개체에게 투여하는 단계를 포함한다.

## *도면의 간단한 설명*

[0031] **도 1.** 본원 발명의 (다중특이적) 항체의 예시적인 형상. (A, D) "1+1 CrossMab" 분자의 예시. (B, E) Crossfab와 Fab 구성요소의 대안적 순서 ("반전됨")를 갖는 "2+1 IgG Crossfab" 분자의 예시. (C, F) "2+1 IgG Crossfab" 분자의 예시. (G, K) Crossfab와 Fab 구성요소의 대안적 순서 ("반전됨")를 갖는 "1+1 IgG Crossfab" 분자의 예시. (H, L) "1+1 IgG Crossfab" 분자의 예시. (I, M) 2개의 CrossFab를 갖는 "2+1 IgG Crossfab" 분자의 예시. (J, N) 2개의 CrossFab 및 Crossfab와 Fab 구성요소의 대안적 순서 ("반전된")를 갖는 "2+1 IgG Crossfab" 분자의 예시. (O, S) "Fab-Crossfab" 분자의 예시. (P, T) "Crossfab-Fab" 분자의 예시. (Q, U) "$(Fab)_2$-Crossfab" 분자의 예시. (R, V) "Crossfab-$(Fab)_2$" 분자의 예시. (W, Y) "Fab-$(Crossfab)_2$" 분자의 예시. (X, Z) "$(Crossfab)_2$-Fab" 분자의 예시. 검은색 반점: 이종이합체화를 증진하는, Fc 도메인 내에 임의적 변형. ++, --: 임의적으로 CH1과 CL 도메인에 도입된 반대 전하의 아미노산. Crossfab 분자는 VH와 VL 영역의 교환을 포함하는 것으로 묘사되지만, - 전하 변형이 CH1과 CL 도메인에 도입되지 않는 양상에서 - CH1과 CL 도메인의 교환을 대안적으로 포함할 수도 있다.

**도 2.** 40℃ pH 6에서 14 d 후, 또는 37℃ pH 7.4에서 14 d 후, 스트레스가 없는 조건에서 SPR에 의해 계측될 때, 재조합 CD3에 대한 본래 및 최적화된 CD3 결합체, $CD3_{orig}$ 및 $CD3_{opt}$ (IgG 형식)의 상대적 결합 활성.

**도 3.** 유세포분석법에 의해 계측될 때, Jurkat NFAT 세포에 대한 본래 및 최적화된 CD3 결합체, $CD3_{orig}$ 및 $CD3_{opt}$ (IgG 형식)의 결합. Jurkat NFAT 세포에 결합된 항체는 형광 표지화된 항인간 Fc 특이적 이차 항체로 검출되었다.

**도 4.** 실시예 3에서 이용된 CD3 활성화 검정의 개략적 도해.

**도 5.** 본래 및 최적화된 CD3 결합체, $CD3_{orig}$ 및 $CD3_{opt}$ (IgG 형식)로 Jurkat NFAT 활성화. Jurkat NFAT 리포터 세포는 $CD3_{orig}$ 또는 $CD3_{opt}$ IgG PGLALA, 또는 음성 대조로서 $CD3_{opt}$ IgG wt의 존재에서 항-PGLALA 발현 CHO (CHO-PGLALA) 세포와 공동배양되었다. 24 시간 후 발광을 계측함으로써, CD3 활성화가 정량되었다.

**도 6.** 실시예에서 제조된 T-세포 이중특이적 항체 (TCB) 분자의 개략적 도해. 모든 검사된 TCB 항체 분자는 전하 변형 (CD3 결합체에서 VH/VL 교환, 표적 항원 결합체에서 전하 변형, EE = 147E, 213E; RK = 123R, 124K)을 갖는 "2+1 IgG CrossFab, 반전됨"으로서 생산되었다.

**도 7.** 40℃ pH 6에서 14 d 후, 또는 37℃ pH 7.4에서 14 d 후, 스트레스가 없는 조건에서 SPR에 의해 계측될 때, 재조합 CD3에 대한, 본래 또는 최적화된 CD3 결합체, $CD3_{orig}$ 또는 $CD3_{opt}$를 포함하는 TYRP1 TCB의 상대적 결

합 활성.

**도 8.** 40℃ pH 6에서 14 d 후, 또는 37℃ pH 7.4에서 14 d 후, 스트레스가 없는 조건에서 SPR에 의해 계측될 때, 재조합 TYRP1에 대한, 본래 또는 최적화된 CD3 결합체, $CD3_{orig}$ 또는 $CD3_{opt}$를 포함하는 TYRP1 TCB, 또는 상응하는 TYRP1 IgG의 상대적 결합 활성.

**도 9.** 유세포분석법에 의해 계측될 때, Jurkat NFAT 세포에 대한, 본래 또는 최적화된 CD3 결합체, $CD3_{orig}$ 또는 $CD3_{opt}$를 포함하는 TYRP1 TCB의 결합. Jurkat NFAT 세포에 결합된 TCB는 형광 표지화된 항인간 Fc 특이적 이차 항체로 검출되었다.

**도 10.** 본래 또는 최적화된 CD3 결합체를 포함하는 TYRP1 TCB로 Jurkat NFAT 활성화. Jurkat NFAT 리포터 세포는 TYRP1 TCB $CD3_{orig}$ 또는 TYRP1 TCB $CD3_{opt}$의 존재에서 흑색종 세포주 M150543과 공동배양되었다. 24 시간 후 발광을 계측함으로써, TCB의 존재에서 CD3 활성화가 정량되었다.

**도 11.** 본래 또는 최적화된 CD3 결합체를 포함하는 TYRP1 TCB로 종양 세포 사멸 및 T 세포 활성화. 3명의 상이한 건강한 공여자 (A-F: 공여자 1, G-L: 공여자 2, M-R: 공여자 3)로부터 PBMC에 의한, TYRP1 TCB $CD3_{orig}$ 및 TYRP1 TCB $CD3_{opt}$로 처리 시에 흑색종 세포주 M150543의 사멸이 24 시간 후 (A, G, M) 및 48 시간 후 (B, H, N), LDH 방출에 의해 결정되었다. 병렬적으로, PBMC 내에 CD8 (E, F, K, L, Q, R) 및 CD4 (C, D, I, J, O, P) T 세포에서 CD25 (C, E, I, K, O, Q) 및 CD69 (D, F, J, L, P, R) 상향조절이 48 시간 후 T 세포 활성화에 대한 마커로서 유세포분석법에 의해 계측되었다.

**도 12.** EGFRvIII IgG PGLALA의 특이적 결합. EGFRwt에 대한 교차반응성 없이, EGFRvIII에 대한 EGFRvIII IgG PGLALA 항체의 특이적 결합이 CHO-EGFRvIII (A), EGFRvIII 양성 DK-MG (B) 및 EGFRwt 발현 MKN-45 (C)에서 유세포분석법에 의해 검사되었다. 세툭시맙이 EGFRwt 발현에 대한 양성 대조로서 포함되었다.

**도 13.** EGFRvIII IgG PGLALA로 CAR J 활성화. 항-PGLALA CAR을 발현하는 Jurkat NFAT 리포터 세포는 EGFRvIII 발현 DK-MG 세포 및 EGFRvIII IgG PGLALA 항체, 또는 음성 대조로서 DP47 IgG PGLALA와 공동배양되었다. 22 시간 후 발광을 계측함으로써, Jurkat NFAT 세포의 활성화가 정량되었다.

**도 14.** EGFRvIII에 대한 EGFRvIII IgG PGLALA 및 상응하는 TCB의 결합. CHO-EGFRvIII (A) 및 MKN-45 (B) 세포에 대한, IgG PGLALA로서 및 TCB로 전환된 EGFRvIII 결합체의 특이적 결합이 유세포분석법에 의해 계측되었다.

**도 15.** EGFRvIII TCB로 Jurkat NFAT 활성화. Jurkat NFAT 활성화는 EGFRvIII 양성 DK-MG 세포의 존재에서 EGFRvIII TCB와의 CD3 인게이지먼트에 대한 마커로서 결정되었다. DP47 TCB가 음성 대조로서 포함되었다.

**도 16.** EGFRvIII TCB로 종양 세포 용해. EGFRvIII TCB에 의한 특이적 종양 세포 용해의 유도는 24 시간 (A, C) 또는 48 시간 (B, D) 동안, 새로 단리된 PBMC 및 EGFRvIII 양성 DK-MG 세포 (A, B) 또는 EGFRwt 양성 MKN-45 세포 (C, D) 중에서 어느 한 가지와의 공동배양 시에 결정되었다.

**도 17.** EGFRvIII TCB로 T 세포 활성화. EGFRvIII TCB에 의한 T 세포 활성화의 유도는 CD4 T 세포 (A-D) 또는 CD8 T 세포 (E-H)에서 활성화 마커 CD25 (A, C, E, G) 또는 CD69 (B, D, F, H)를 이용하여, 새로 단리된 PBMC 및 EGFRvIII 양성 DK-MG 세포 (A, B, E, F) 또는 EGFRwt 양성 MKN-45 세포 (C, D, G, H) 중에서 어느 한 가지와의 공동배양 시에 결정되었다.

**도 18.** EGFRvIII TCB로 사이토킨 방출. EGFRvIII TCB에 의한 IFNγ (A, D), TNFα (B, E) 및 그랜자임 B (C, F)의 방출의 유도는 새로 단리된 PBMC 및 EGFRvIII 양성 DK-MG 세포 (A-C) 또는 EGFRwt 양성 MKN-45 세포 (D-F) 중에서 어느 한 가지와의 공동배양 시에 결정되었다.

**도 19.** 친화성 성숙된 EGFRvIII IgG PGLALA의 특이적 결합. EGFRvIII에 대한 친화성 성숙된 EGFRvIII 항체의 특이적 결합은 U87MG-EGFRvIII 세포 (A) 및 EGFRwt 양성 세포주 MKN-45 (B)에서 부모 EGFRvIII 결합체와 비교되었다.

**도 20.** EGFRvIII TCB에 의한 Jurkat NFAT 활성화. Jurkat NFAT 활성화는 EGFRvIII 양성 DK-MG 세포 (A), U87MG-EGFRvIII 세포 (B) 및 MKN-45 세포 (C)의 존재에서 EGFRvIII TCB와의 CD3 인게이지먼트에 대한 마커로서 결정되었다. DP47 TCB가 음성 대조로서 포함되었다.

**도 21.** 40℃ pH 6에서 14 d 후, 또는 37℃ pH 7.4에서 14 d 후, 스트레스가 없는 조건에서 SPR에 의해 계측될

때, 재조합 CD3에 대한, 본래 또는 최적화된 CD3 결합체, $CD3_{orig}$ 또는 $CD3_{opt}$를 포함하는 EGFRvIII TCB의 상대적 결합 활성.

**도 22.** 40℃ pH 6에서 14 d 후, 또는 37℃ pH 7.4에서 14 d 후, 스트레스가 없는 조건에서 SPR에 의해 계측될 때, 재조합 EGFRvIII에 대한 본래 또는 최적화된 CD3 결합체, $CD3_{orig}$ 또는 $CD3_{opt}$를 포함하는 EGFRvIII TCB의 상대적 결합 활성.

**도 23.** 유세포분석법에 의해 계측될 때, Jurkat NFAT 세포에 대한, 본래 또는 최적화된 CD3 결합체, $CD3_{orig}$ 또는 $CD3_{opt}$를 포함하는 EGFRvIII TCB의 결합. Jurkat NFAT 세포에 결합된 TCB는 형광 표지화된 항인간 Fc 특이적 이차 항체로 검출되었다.

**도 24.** 유세포분석법에 의해 계측될 때, U87MG-EGFRvIII 세포에 대한, P063.056 또는 P056.021 EGFRvIII 결합체를 포함하는 EGFRvIII TCB의 결합. U87MG-EGFRvIII 세포에 결합된 TCB는 형광 표지화된 항인간 Fc 특이적 이차 항체로 검출되었다.

**도 25.** EGFRvIII TCB로 종양 세포 용해 및 T 세포 활성화. EGFRvIII TCB에 의한 특이적 종양 세포 용해 (A, B) 및 T 세포 활성화 (C, D)의 유도는 24 시간 (A, C) 또는 48 시간 (B, D) 동안, 새로 단리된 PBMC 및 U87MG-EGFRvIII 세포와의 공동배양 시에 결정되었다. DP47 TCB가 음성 대조로서 포함되었다.

**도 26.** EGFRvIII TCB 2+1 형식 및 1+1 형식을 비교하는 Jurkat NFAT 활성화. Jurkat NFAT 활성화는 EGFRvIII 양성 U87MG-EGFRvIII 세포의 존재에서 2+1 반전된 형식에서 및 1+1 두미 형식에서 EGFRvIII TCB와의 CD3 인게이지먼트에 대한 마커로서 결정되었다.

**도 27.** EGFRvIII TCB 2+1 형식 및 1+1 형식을 비교하는 종양 세포 용해 및 T 세포 활성화. 2+1 반전된 형식에서 및 1+1 두미 형식에서 EGFRvIII TCB에 의한 특이적 종양 세포 용해 (A, B) 및 T 세포 활성화 (C, D)의 유도는 24 시간 (A, C) 또는 48 시간 (B, D) 동안, 새로 단리된 PBMC 및 U87MG-EGFRvIII 세포와의 공동배양 시에 결정되었다.

**도 28.** EGFRvIII TCB로 T 세포 활성화와 증식. EGFRvIII TCB에 의한 CD4 T 세포 (A, B) 및 CD8 T 세포 (C, D)의 T 세포 증식 (A, C) 및 T 세포 활성화의 유도는 건강한 공여자로부터 단리된 U87MG-EGFRvIII 및 PBMC의 공동배양 시에 결정되었다.

**도 29.** EGFRvIII TCB로 종양 세포 용해, T 세포 활성화 및 사이토킨 방출. EGFRvIII TCB에 의한 종양 세포 용해 (A, B), T 세포 활성화 (C, D) 및 IFNγ와 TNFα의 방출 (E, F)의 유도는 U87MG-EGFRvIII 세포의 PBMC와의 공동배양 시에 결정되었다. 종양 세포 용해가 24 시간 및 48 시간의 처리 후 계측되었고, T 세포 활성화 및 사이토킨 방출이 48 시간 후 계측되었다.

**도 30.** TYRP-1 TCB로 종양 세포 용해, T 세포 활성화 및 사이토킨 방출. TYRP-1 TCB에 의한 종양 세포 용해 (A, B), T 세포 활성화 (C, D) 및 IFNγ와 TNFα의 방출 (E, F)의 유도는 환자 유래된 흑색종 세포주 M150543의 PBMC와의 공동배양 시에 결정되었다. 종양 세포 용해가 24 시간 및 48 시간의 처리 후 계측되었고, T 세포 활성화 및 사이토킨 방출이 48 시간 후 계측되었다.

**도 31.** TYRP-1 TCB의 생체내 효능. 흑색종 피하 이종이식 모형에서 종양 성장 저해를 연구하기 위해, IGR-1 인간 흑색종 세포주가 인간화 NSG 생쥐에 피하 주입되었다. 유의미한 종양 성장 저해 (TGI)는 운반제 군과 비교하여 TYRP-1 TCB 군 (68% TGI, $p=0.0058^{*}$)에서 관찰되었다.

**도 32.** EGFRvIII TCB의 생체내 효능. 교모세포종 피하 이종이식 모형에서 종양 성장 저해를 연구하기 위해, U87-huEGFRvIII 인간 교모세포종 세포주가 인간화 NSG 생쥐에 피하 주입되었다. 유의미한 종양 제어는 EGFRvIII TCB 군에서 관찰되었는데, 모든 생쥐가 완전 관해를 달성하였다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0032] **I. 정의**

[0033] 용어는 하기에서 별도로 규정되지 않으면, 당해 분야에서 일반적으로 이용된 바와 같이 본원에서 이용된다.

[0034] 본원에서 이용된 바와 같이, 항원 결합 도메인 등에 대하여 용어 "첫 번째", "두 번째" 또는 "세 번째"는 하나 이상의 각 유형의 모이어티가 있을 때 편의상 식별에 이용된다. 이들 용어의 이용은 만약 명시적으로 진술되지

않으면, 모이어티의 특정한 순서 또는 배향정위를 부여하는 것으로 의도되지 않는다.

[0035] 용어 "항-CD3 항체" 및 "CD3에 결합하는 항체"는 항체가 CD3을 표적으로 하는데 있어서 진단 시약 및/또는 치료제로서 유용할 만큼 충분한 친화성으로 CD3에 결합할 수 있는 항체를 지칭한다. 한 양상에서, 관련 없는, 비-CD3 단백질에 대한 항-CD3 항체의 결합 정도는 예를 들면, 표면 플라스몬 공명 (SPR)에 의해 계측될 때 CD3에 대한 상기 항체의 결합의 약 10%보다 적다. 일정한 양상에서, CD3에 결합하는 항체는 ≤ 1 μM, ≤ 500 nM, ≤ 200 nM, 또는 ≤ 100 nM의 해리 상수 ($K_D$)를 갖는다. 항체는 예를 들면, SPR에 의해 계측될 때, 항체가 1 μM 또는 그 이하의 $K_D$를 가질 때, CD3"에 특이적으로 결합"하는 것으로 일컬어진다. 일정한 양상에서, 항-CD3 항체는 상이한 종으로부터 CD3 사이에서 보존되는 CD3의 에피토프에 결합한다.

[0036] 본원에서 용어 "항체"는 가장 넓은 의미에서 이용되고, 단일클론 항체, 다중클론 항체, 다중특이적 항체 (예를 들면, 이중특이적 항체), 및 항체 단편 (이들이 원하는 항원 결합 활성을 나타내기만 하면)을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 다양한 항체 구조를 포괄한다.

[0037] "항체 단편"은 무손상 항체가 결합하는 항원에 결합하는 무손상 항체의 부분을 포함하는, 무손상 항체 이외의 분자를 지칭한다. 항체 단편의 실례는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, 디아바디, 선형 항체, 단일 사슬 항체 분자 (예를 들면 scFv 및 scFab), 단일 도메인 항체, 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 일정한 항체 단편에 관한 리뷰를 위해, Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136 (2005)을 참조한다.

[0038] 용어 "전장 항체", "무손상 항체" 및 "전체 항체"는 선천적 항체 구조와 실제적으로 유사한 구조를 갖는 항체를 지칭하기 위해 본원에서 교체가능하게 이용된다.

[0039] 본원에서 이용된 바와 같이 용어 "단일클론 항체"는 실제적으로 균질한 항체의 개체군으로부터 획득된 항체를 지칭한다, 다시 말하면, 상기 개체군 내에 포함되는 개별 항체는 예를 들면, 자연 발생 돌연변이를 내포하거나 또는 단일클론 항체 제조물의 생산 동안 발생하는 가능한 변이체 항체 (이런 변이체는 일반적으로 미량으로 존재한다)를 제외하고, 동일하고/하거나, 동일한 에피토프에 결합한다. 상이한 결정인자 (에피토프)에 대해 지향된 상이한 항체를 전형적으로 포함하는 다중클론 항체 제조물과 대조적으로, 단일클론 항체 제조물의 각 단일클론 항체는 항원 상에서 단일 결정인자에 대해 지향된다. 따라서, 수식어 "단일클론"은 항체의 실제적으로 균질한 개체군으로부터 획득되는 것으로서 항체의 특징을 지시하고, 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생산을 필요로 하는 것으로 해석되지 않는다. 예를 들면, 단일클론 항체는 하이브리도마 방법, 재조합 DNA 방법, 파지 전시 방법, 및인간 면역글로불린 좌위 중에서 전부 또는 일부를 내포하는 유전자도입 동물을 활용하는 방법 및 본원에서 설명된 단일클론 항체를 만들기 위한 다른 예시적인 방법을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 다양한 기술에 의해 만들어질 수 있다.

[0040] "단리된" 항체는 이의 자연 환경의 구성요소로부터 분리된 것이다. 일부 양상에서, 항체는 예를 들면, 전기이동 (예를 들면, SDS-PAGE, 등전위 초점 (IEF), 모세관 전기이동) 또는 크로마토그래피 (예를 들면, 이온 교환 또는 역상 HPLC, 친화성 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피) 방법에 의해 결정될 때, 95% 또는 99% 이상의 순도로 정제된다. 항체 순도의 사정을 위한 방법에 관한 리뷰를 위해, 예를 들면, Flatman et al., *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007)을 참조한다. 일부 양상에서, 본원 발명에 의해 제공된 항체는 단리된 항체이다.

[0041] 용어 "키메라" 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부분이 특정 공급원 또는 종으로부터 유래되고, 반면 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지 부분이 상이한 공급원 또는 종으로부터 유래되는 항체를 지칭한다.

[0042] "인간화" 항체는 비인간 CDR로부터 아미노산 잔기 및 인간 FR로부터 아미노산 잔기를 포함하는 키메라 항체를 지칭한다. 일정한 양상에서, 인간화 항체는 적어도 하나, 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실제적으로 모두 포함할 것인데, 여기서 CDR의 전부 또는 실제적으로 전부가 비인간 항체의 것들에 상응하고, FR의 전부 또는 실제적으로 전부가 인간 항체의 것들에 상응한다. 이런 가변 도메인은 본원에서 "인간화 가변 영역"으로서 지칭된다. 인간화 항체는 임의적으로, 인간 항체로부터 유래된 항체 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 일부 양상에서, 인간화 항체에서 일부 FR 잔기는 예를 들면, 항체 특이성 또는 친화성을 복원하거나 또는 향상시키기 위해, 비인간 항체 (예를 들면, CDR 잔기가 유래되는 항체)로부터 상응하는 잔기로 치환된다. 항체, 예를 들면, 비인간 항체의 "인간화 형태"는 인간화를 겪은 항체를 지칭한다.

[0043] "인간 항체"는 인간 또는 인간 세포에 의해 생산되거나, 인간 항체 레퍼토리 또는 다른 인간 항체-인코딩 서열

을 활용하는 비인간 공급원으로부터 유래된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 소유하는 것이다. 인간 항체의 이러한 정의는 비인간 항원 결합 잔기를 포함하는 인간화 항체를 특정적으로 배제한다. 일정한 양상에서, 인간 항체는 비인간 유전자도입 포유동물, 예를 들면 생쥐, 쥐, 또는 토끼로부터 유래된다. 일정한 양상에서, 인간 항체는 하이브리도마 세포주로부터 유래된다. 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체 또는 항체 단편 역시 본원에서 인간 항체 또는 인간 항체 단편인 것으로 고려된다.

[0044] 용어 "항원 결합 도메인"은 항원의 일부 또는 전부에 결합하고 상보적인 구역을 포함하는, 항체의 부분을 지칭한다. 항원 결합 도메인은 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 항체 가변 도메인 (항체 가변 영역으로 또한 불림)에 의해 제공될 수 있다. 바람직한 양상에서, 항원 결합 도메인은 항체 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 항체 중쇄 가변 도메인 (VH)을 포함한다.

[0045] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체를 항원에 결합시키는 데 관련되는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 선천적 항체의 중쇄와 경쇄의 가변 도메인 (각각, VH와 VL)은 일반적으로 유사한 구조를 갖는데, 각 도메인이 4개의 보존된 프레임워크 영역 (FR) 및 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함한다. 참조: 예를 들면, Kindt et al., *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman & Co., page 91 (2007). 단일 VH 또는 VL 도메인이 항원 결합 특이성을 부여하는 데 충분할 수 있다. 게다가, 특정 항원에 결합하는 항체는 각각, 상보성 VL 또는 VH 도메인의 라이브러리를 선별검사하기 위해, 항원에 결합하는 항체로부터 VH 또는 VL 도메인을 이용하여 단리될 수 있다. 참조: 예를 들면, Portolano et al., *J. Immunol. 150*:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991). 가변 영역 서열과 관련하여 본원에서 이용된 바와 같이, "Kabat 넘버링"은 Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)에 의해 진술된 넘버링 시스템을 지칭한다.

[0046] 본원에서 이용된 바와 같이, 중쇄와 경쇄의 모든 불변 영역과 도메인의 아미노산 위치는 본원에서 "Kabat에 따른 넘버링" 또는 "Kabat 넘버링"으로서 지칭되는, Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)에서 설명된 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된다. 구체적으로 Kabat 넘버링 시스템 (Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)의 페이지 647-660을 참조한다)은 카파와 람다 아이소타입의 경쇄 불변 도메인 CL에 이용되고, Kabat EU 색인 넘버링 시스템 (페이지 661-723을 참조한다)은 중쇄 불변 도메인 (CH1, 힌지, CH2 및 CH3)에 이용되는데, 이것은 본원에서 이 경우에 있어서 "Kabat EU 색인에 따른 넘버링" 또는 "Kabat EU 색인 넘버링"을 참조함으로써 더욱 명료해진다.

[0047] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "초가변 영역" 또는 "HVR"은 서열에서 초가변성이고 항원 결합 특이성을 결정하는 항체 가변 도메인의 각 영역, 예를 들면 "상보성 결정 영역" ("CDR")을 지칭한다. 일반적으로, 항체는 6개의 CDR; VH에서 3개 (HCDR1, HCDR2, HCDR3), 및 VL에서 3개 (LCDR1, LCDR2, LCDR3)를 포함한다. 본원에서 예시적인 CDR은 하기를 포함한다:

[0048] (a) 아미노산 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), 및 96-101 (H3)에서 발생하는 초가변 루프 (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987));

[0049] (b) 아미노산 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2), 및 95-102 (H3)에서 발생하는 CDR (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)); 및

[0050] (c) 아미노산 잔기 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2), 및 93-101 (H3)에서 발생하는 항원 접촉 (MacCallum et al. *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)).

[0051] 별도로 지시되지 않으면, CDR은 Kabat et al., *위와 같음*에 따라서 결정된다. 당업자는 CDR 지정이 Chothia, *위와 같음*, McCallum, *위와 같음*, 또는 임의의 다른 과학적으로 용인된 명명법 시스템에 따라서 또한 결정될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0052] "프레임워크" 또는 "FR"은 상보성 결정 영역 (CDR) 이외에 가변 도메인 잔기를 지칭한다. 가변 도메인의 FR은 일반적으로 4개의 FR 도메인: FR1, FR2, FR3 및 FR4로 구성된다. 따라서, HVR 및 FR 서열은 일반적으로 VH (또는 VL)에서 하기 순서로 나타난다: FR1-HCDR1(LCDR1)-FR2-HCDR2(LCDR2)-FR3-HCDR3(LCDR3)-FR4.

[0053] 별도로 지시되지 않으면, CDR 잔기 및 가변 도메인에서 다른 잔기 (예를 들면, FR 잔기)는 본원에서 Kabat et

al., *위와 같음*에 따라서 넘버링된다.

[0054] 본원에서 목적으로 "수용자 인간 프레임워크"는 아래에 규정된 바와 같이, 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 공통 프레임워크로부터 유래된 경쇄 가변 도메인 (VL) 프레임워크 또는 중쇄 가변 도메인 (VH) 프레임워크의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크이다. 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 공통 프레임워크"로부터 유래된" 수용자 인간 프레임워크는 이의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 이것은 아미노산 서열 변화를 내포할 수 있다. 일부 양상에서, 아미노산 변화의 숫자는 10 또는 그 이하, 9 또는 그 이하, 8 또는 그 이하, 7 또는 그 이하, 6 또는 그 이하, 5 또는 그 이하, 4 또는 그 이하, 3 또는 그 이하, 또는 2 또는 그 이하이다. 일부 양상에서, VL 수용자 인간 프레임워크는 VL 인간 면역글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 공통 프레임워크 서열과 서열에서 동일하다.

[0055] "인간 공통 프레임워크"는 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선별에서 가장 흔히 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크이다. 일반적으로, 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 서열은 가변 도메인 서열의 하위군으로부터 선별된다. 일반적으로, 서열의 하위군은 Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest,* Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), Vols. 1-3의 경우에서와 같은 하위군이다.

[0056] 본원에서 용어 "면역글로불린 분자"는 자연 발생 항체의 구조를 갖는 단백질을 지칭한다. 예를 들면, IgG 부류의 면역글로불린은 이황화 결합되는 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄로 구성되는, 약 150,000 달톤의 이종삼합체성 당단백질이다. N 말단으로부터 C 말단으로, 각 중쇄는 가변 중쇄 도메인 또는 중쇄 가변 영역으로 또한 불리는 가변 도메인 (VH), 그 이후에 중쇄 불변 영역으로 또한 불리는 3개의 불변 도메인 (CH1, CH2 및 CH3)을 갖는다. 유사하게, N 말단으로부터 C 말단으로, 각 경쇄는 가변 경쇄 도메인 또는 경쇄 가변 영역으로 또한 불리는 가변 도메인 (VL), 그 이후에 경쇄 불변 영역으로 또한 불리는 불변 경쇄 (CL) 도메인을 갖는다. 면역글로불린의 중쇄는 α (IgA), δ (IgD), ε (IgE), γ (IgG), 또는 μ (IgM)으로 불리는 5가지 유형 중에서 한 가지에 배정될 수 있으며, 이들 중에서 일부는 아형, 예를 들면 $\gamma_1$ ($IgG_1$), $\gamma_2$ ($IgG_2$), $\gamma_3$ ($IgG_3$), $\gamma_4$ ($IgG_4$), $\alpha_1$ ($IgA_1$) 및 $\alpha_2$ ($IgA_2$)로 더욱 나눠질 수 있다. 면역글로불린의 경쇄는 이의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여, 카파 (κ) 및 람다 (λ)로 불리는 2가지 유형 중에서 한 가지에 배정될 수 있다. 면역글로불린은 본질적으로, 면역글로불린 힌지 영역을 통해 연결된, 2개의 Fab 분자 및 Fc 도메인으로 구성된다.

[0057] 항체 또는 면역글로불린의 "부류"는 이의 중쇄에 의해 소유된 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을 지칭한다. 항체의 5가지 주요 부류: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 있고, 이들 중에서 몇몇은 하위부류 (아이소타입), 예를 들면, $IgG_1$, $IgG_2$, $IgG_3$, $IgG_4$, $IgA_1$ 및 $IgA_2$로 더욱 나눠질 수 있다. 면역글로불린의 상이한 부류에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각, α, δ, ε, γ 및 μ로 불린다.

[0058] "Fab 분자"는 면역글로불린의 중쇄의 VH와 CH1 도메인 ("Fab 중쇄") 및 경쇄의 VL과 CL 도메인 ("Fab 경쇄")으로 구성되는 단백질을 지칭한다.

[0059] "교차" Fab 분자 ("Crossfab"로 또한 명명됨)는 Fab 중쇄와 경쇄의 가변 도메인 또는 불변 도메인이 교환되는 (다시 말하면, 서로에 의해 대체되는) Fab 분자인 것으로 의미된다, 다시 말하면, 교차 Fab 분자는 경쇄 가변 도메인 VL 및 중쇄 불변 도메인 1 CH1로 구성되는 펩티드 사슬 (VL-CH1, N에서 C 말단 방향으로), 중쇄 가변 도메인 VH 및 경쇄 불변 도메인 CL로 구성되는 펩티드 사슬 (VH-CL, N에서 C 말단 방향으로)을 포함한다. 명료함을 위해, Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인이 교환되는 교차 Fab 분자에서, 중쇄 불변 도메인 1 CH1을 포함하는 펩티드 사슬은 본원에서 (교차) Fab 분자의 "중쇄" 로서 지칭된다. 반대로, Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 불변 도메인이 교환되는 교차 Fab 분자에서, 중쇄 가변 도메인 VH를 포함하는 펩티드 사슬은 본원에서 (교차) Fab 분자의 "중쇄" 로서 지칭된다.

[0060] 그것과 대조적으로, "전통적인" Fab 분자는 이의 자연 형식에서, 다시 말하면, 중쇄 가변과 불변 도메인으로 구성되는 중쇄 (VH-CH1, N에서 C 말단 방향으로), 및 경쇄 가변과 불변 도메인으로 구성되는 경쇄 (VL-CL, N에서 C 말단 방향으로)를 포함하는 Fab 분자인 것으로 의미된다.

[0061] 본원에서 용어 "Fc 도메인" 또는 "Fc 영역"은 불변 영역의 적어도 일부를 내포하는, 면역글로불린 중쇄의 C 말단 영역을 규정하는 데 이용된다. 상기 용어는 선천적 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함한다. 한 양상에서, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 중쇄의 Cys226으로부터, 또는 Pro230으로부터 카르복실 말단까지 걸친다. 하지만, 숙주 세포에 의해 생산되는 항체는 중쇄의 C 말단으로부터 하나 또는 그 이상, 특히 1개 또는 2개의 아미노산의 번역후 개열을 겪을 수 있다. 이런 이유로, 전장 중쇄를 인코딩하는 특이적 핵산 분자의 발현에 의해 숙주 세포

에 의해 생산되는 항체는 전장 중쇄를 포함할 수 있거나, 이것은 전장 중쇄의 개열된 변이체를 포함할 수 있다. 이것은 중쇄의 최종 2개의 C 말단 아미노산이 글리신 (G446) 및 리신 (K447, Kabat EU 색인에 따른 넘버링)인 경우에 그러할 수 있다. 이런 이유로, Fc 영역의 C 말단 리신 (Lys447), 또는 C 말단 글리신 (Gly446) 및 리신 (Lys447)은 존재하거나 존재하지 않을 수 있다. Fc 영역 (또는 본원에서 규정된 바와 같은 Fc 도메인의 아단위)을 포함하는 중쇄의 아미노산 서열은 별도로 지시되지 않으면, C 말단 글리신-리신 디펩티드가 없이 표시된다. 한 양상에서, 본원 발명에 따른 항체 내에 포함된, 본원에서 특정된 바와 같은 Fc 영역 (아단위)을 포함하는 중쇄는 추가의 C 말단 글리신-리신 디펩티드 (G446 및 K447, Kabat EU 색인에 따른 넘버링)를 포함한다. 한 양상에서, 본원 발명에 따른 항체 내에 포함된, 본원에서 특정된 바와 같은 Fc 영역 (아단위)을 포함하는 중쇄는 추가의 C 말단 글리신 잔기 (G446, Kabat EU 색인에 따른 넘버링)를 포함한다. 본원에서 별도로 특정되지 않으면, Fc 영역 또는 불변 영역에서 아미노산 잔기의 넘버링은 Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991에서 설명된 바와 같이, EU 색인으로 또한 불리는 EU 넘버링 시스템에 따른다 (또한 상기 참조). 본원에서 이용된 바와 같이, Fc 도메인의 "아단위"는 이합체성 Fc 도메인을 형성하는 2개의 폴리펩티드 중에서 하나, 다시 말하면, 안정되게 자가 결합할 수 있는, 면역글로불린 중쇄의 C 말단 불변 영역을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 예를 들면, IgG Fc 도메인의 아단위는 IgG CH2 및 IgG CH3 불변 도메인을 포함한다.

[0062] "융합된"은 구성요소 (예를 들면 Fab 분자 및 Fc 도메인 아단위)가 직접적으로 또는 하나 또는 그 이상의 펩티드 링커를 통해, 펩티드 결합에 의해 연결되는 것으로 의미된다.

[0063] 용어 "다중특이적"은 항체가 적어도 2개의 구별되는 항원 결정인자에 특이적으로 결합할 수 있다는 것을 의미한다. 다중특이적 항체는 예를 들면, 이중특이적 항체일 수 있다. 전형적으로, 이중특이적 항체는 2개의 항원 결합 부위를 포함하고, 이들은 각각 상이한 항원 결정인자에 대해 특이적이다. 일정한 양상에서 다중특이적 (예를 들면 이중특이적) 항체는 2개의 항원 결정인자, 특히 2개의 구별되는 세포 상에서 발현되는 2개의 항원 결정인자에 동시에 결합할 수 있다.

[0064] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "결합가 (valent)"는 항원 결합 분자 내에 특정된 숫자의 결합 부위의 존재를 표시한다. 따라서, 용어 "항원에 일가 결합"은 항원 결합 분자 내에 항원에 대해 특이적인 하나 (및 하나보다 많지 않은) 항원 결합 부위의 존재를 표시한다.

[0065] "항원 결합 부위"는 항원과의 상호작용을 제공하는, 항원 결합 분자의 부위, 다시 말하면, 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기를 지칭한다. 예를 들면, 항체의 항원 결합 부위는 상보성 결정 영역 (CDR)으로부터 아미노산 잔기를 포함한다. 선천적 면역글로불린 분자는 전형적으로 2개의 항원 결합 부위를 갖고, Fab 분자는 전형적으로 단일 항원 결합 부위를 갖는다.

[0066] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "항원 결정인자" 또는 "항원"은 항원 결합 도메인이 결합하여 항원 결합 도메인-항원 복합체가 형성되는, 폴리펩티드 거대분자 상에 부위 (예를 들면 아미노산의 연속 스트레치 또는 비연속 아미노산의 상이한 영역으로 구성되는 입체형태적 형상)를 지칭한다. 유용한 항원 결정인자는 예를 들면 종양 세포의 표면 상에서, 바이러스-감염된 세포의 표면 상에서, 다른 병든 세포의 표면 상에서, 면역 세포의 표면 상에서, 혈청에서 자유롭게 및/또는 세포외 기질 (ECM)에서 발견될 수 있다. 바람직한 양상에서, 항원은 인간 단백질이다.

[0067] "CD3"은 별도로 지시되지 않으면, 포유동물, 예컨대 영장류 (예를 들면, 인간), 비인간 영장류 (예를 들면, 시노몰구스 원숭이) 및 설치류 (예를 들면, 생쥐 및 쥐)를 비롯한, 임의의 척추동물 공급원으로부터 임의의 선천적 CD3을 지칭한다. 상기 용어는 "전장"의 처리되지 않은 CD3뿐만 아니라 세포에서 처리로부터 발생하는 CD3의 임의의 형태를 포괄한다. 상기 용어는 또한, CD3의 자연 발생 변이체, 예를 들면, 스플라이스 변이체 또는 대립형질 변이체를 포괄한다. 한 양상에서, CD3은 인간 CD3, 특히 인간 CD3의 엡실론 아단위 (CD3ε)이다. 인간 CD3ε의 아미노산 서열은 서열 번호 112 (신호 펩티드가 없음)에서 도시된다. 또한 UniProt (www.uniprot.org) 수탁 번호 P07766 (버전 189), 또는 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_000724.1을 참조한다. 다른 양상에서, CD3은 시노몰구스 (마카카 파시쿨라리스 (Macaca fascicularis)) CD3, 특히 시노몰구스 CD3ε이다. 시노몰구스 CD3ε의 아미노산 서열은 서열 번호 113 (신호 펩티드가 없음)에서 도시된다. 또한 NCBI GenBank 번호 BAB71849.1을 참조한다. 일정한 양상에서 본원 발명의 항체는 상이한 종으로부터 CD3 항원, 특히 인간 및 시노몰구스 CD3 사이에서 보존되는 CD3의 에피토프에 결합한다. 바람직한 양상에서, 항체는 인간 CD3에 결합한다.

[0068] 본원에서 이용된 바와 같이 "표적 세포 항원"은 표적 세포, 예를 들면 종양에서 표적 세포 예컨대 암 세포 또는 종양 간질의 세포 (이 경우에 있어서 "종양 세포 항원")의 표면 상에서 제시된 항원 결정인자를 지칭한다. 바람

직하게는, 표적 세포 항원은 CD3이 아니고/아니거나, CD3과 상이한 세포 상에서 발현된다. 바람직한 양상에서, 표적 세포 항원은 TYRP-1, 특히 인간 TYRP-1이다. 다른 바람직한 양상에서, 표적 세포 항원은 EGFRvIII, 특히 인간 EGFRvIII이다.

[0069] "TYRP1" 또는 "TYRP-1"은 멜라닌 합성에 관련된 효소인 티로신-관련된 단백질 1을 의미한다. 본래 gp75로 또한 불리는, TYRP1의 성숙 형태는 75 kDa 막경유 당단백질이다. 인간 TYRP1의 서열은 서열 번호 114 (신호 펩티드가 없음)에서 도시된다. 또한 UniProt 엔트리 번호 P17643 (버전 185)을 참조한다. 본원에서 이용된 바와 같이, "TYRP1"은 별도로 지시되지 않으면, 포유동물, 예컨대 영장류 (예를 들면, 인간), 비인간 영장류 (예를 들면, 시노몰구스 원숭이) 및 설치류 (예를 들면, 생쥐 및 쥐)를 비롯한, 임의의 척추동물 공급원으로부터 임의의 선천적 TYRP1을 지칭한다. 상기 용어는 "전장"의 처리되지 않은 TYRP1뿐만 아니라 세포에서 처리로부터 발생하는 TYRP1의 임의의 형태를 포괄한다. 상기 용어는 또한, TYRP1의 자연 발생 변이체, 예를 들면, 스플라이스 변이체 또는 대립형질 변이체를 포괄한다. 한 양상에서, TYRP1은 인간 TYRP1이다.

[0070] "EGFRvIII"은 접합부에서 글리신 치환으로 267개 아미노산의 결실을 야기하는, 엑손 2-7의 인프레임 결실에 의해 형성된, EGFR의 돌연변이체인 표피 성장 인자 수용체 변이체 III을 의미한다. 인간 EGFRvIII의 서열은 서열 번호 115 (신호 펩티드가 없음)에서 도시된다. 야생형 인간 EGFR의 서열은 서열 번호 116 (신호 펩티드가 없음)에서 도시된다. 또한 UniProt 엔트리 번호 P00533 (버전 258)을 참조한다. 본원에서 이용된 바와 같이, "EGFRvIII"은 별도로 지시되지 않으면, 포유동물, 예컨대 영장류 (예를 들면, 인간), 비인간 영장류 (예를 들면, 시노몰구스 원숭이) 및 설치류 (예를 들면, 생쥐 및 쥐)를 비롯한, 임의의 척추동물 공급원으로부터 임의의 선천적 EGFRvIII을 지칭한다. 상기 용어는 "전장"의 처리되지 않은 EGFRvIII (그러나, 야생형 EGFR이 아님) 뿐만 아니라 세포에서 처리로부터 발생하는 EGFRvIII의 임의의 형태 (예를 들면 신호 펩티드가 없는 EGFRvIII)를 포괄한다. 한 양상에서, EGFRvIII은 인간 EGFRvIII이다.

[0071] "친화성"은 분자 (예를 들면, 항체)의 단일 결합 부위 및 이의 결합 파트너 (예를 들면, 항원) 사이에 비공유 상호작용의 총계의 강도를 지칭한다. 별도로 지시되지 않으면, 본원에서 이용된 바와 같이, "결합 친화성"은 결합 쌍의 구성원 (예를 들면, 항체와 항원) 사이에 1:1 상호작용을 반영하는 내재성 결합 친화성을 지칭한다. 파트너 Y에 대한 분자 X의 친화성은 일반적으로, 해리 상수 ($K_D$)에 의해 표현될 수 있다. 친화성은 본원에서 설명된 것들을 비롯한, 당해 분야에서 공지된 충분히 확립된 방법에 의해 계측될 수 있다. 친화성을 계측하기 위한 바람직한 방법은 표면 플라스몬 공명 (SPR)이다.

[0072] "친화성 성숙된" 항체는 변경을 갖지 않는 부모 항체와 비교하여, 하나 또는 그 이상의 상보성 결정 영역 (CDR)에서 한 가지 또는 그 이상의 변경을 갖는 항체를 지칭하는데, 이런 변경은 항원에 대한 항체의 친화성에서 향상을 유발한다.

[0073] "감소된 결합", 예를 들면 Fc 수용체에 감소된 결합은 예를 들면 SPR에 의해 계측될 때, 개별 상호작용에 대한 친화성에서 감소를 지칭한다. 명료함을 위해, 상기 용어는 또한, 제로 (또는 분석 방법의 검출 한계 미만)까지 친화성의 감소, 다시 말하면, 상호작용의 완전한 소멸을 포함한다. 반대로, "증가된 결합"은 개별 상호작용에 대한 결합 친화성에서 증가를 지칭한다.

[0074] 본원에서 이용된 바와 같이, "T 세포 활성화"는 증식, 분화, 사이토킨 분비, 세포독성 효과기 분자 방출, 세포독성 활성, 및 활성화 마커의 발현에서 선택되는, T 림프구, 특히 세포독성 T 림프구의 한 가지 또는 그 이상의 세포 반응을 지칭한다. T 세포 활성화를 계측하기 위한 적합한 검정은 당해 분야에서 공지되고 본원에서 설명된다.

[0075] "Fc 도메인의 첫 번째와 두 번째 아단위의 연관을 증진하는 변형"은 동종이합체를 형성하는, Fc 도메인 아단위를 포함하는 폴리펩티드의 동일한 폴리펩티드와의 연관을 감소시키거나 또는 예방하는 펩티드 중추의 조작 또는 Fc 도메인 아단위의 번역후 변형이다. 본원에서 이용된 바와 같이, 연관을 증진하는 변형은 바람직하게는, 연관하기 원하는 2개의 Fc 도메인 아단위 각각 (다시 말하면, Fc 도메인의 첫 번째와 두 번째 아단위)에 만들어진 별개의 변형을 포함하고, 여기서 이들 변형은 2개의 Fc 도메인 아단위의 연관을 증진하기 위해 서로에 상보적이다. 예를 들면, 연관을 증진하는 변형은 Fc 도메인 아단위의 연관을 각각, 입체적으로 또는 정전으로 우호적으로 만들기 위해, 이들 중에서 하나 또는 둘 모두의 구조 또는 전하를 변경할 수 있다. 따라서, 각각의 아단위 (예를 들면 항원 결합 도메인)에 융합된 추가 구성요소가 동일하지 않다는 의미에서 비동일할 수 있는, 첫 번째 Fc 도메인 아단위를 포함하는 폴리펩티드 및 두 번째 Fc 도메인 아단위를 포함하는 폴리펩티드 사이에서 (이종)이합체화가 일어난다. 일부 양상에서, Fc 도메인의 첫 번째와 두 번째 아단위의 연관을 증진하는 변형은 Fc 도메인에서 아미노산 돌연변이, 특이적으로 아미노산 치환을 포함한다. 바람직한 양상에서, Fc 도메인의 첫 번

째와 두 번째 아단위의 연관을 증진하는 변형은 Fc 도메인의 2개 아단위 각각에서 별개의 아미노산 돌연변이, 특이적으로 아미노산 치환을 포함한다.

[0076] 용어 "효과기 기능"은 항체의 Fc 영역에 기인한 생물학적 활성을 지칭하는데, 이들은 항체 아이소타입에 따라서 변한다. 항체 효과기 기능의 실례는 하기를 포함한다: C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성 (CDC), Fc 수용체 결합, 항체 의존성 세포 매개된 세포독성 (ADCC), 항체-의존성 세포 식균작용 (ADCP), 사이토킨 분비, 항원 제시 세포에 의한 면역 복합체-매개된 항원 흡수, 세포 표면 수용체 (예를 들면 B 세포 수용체)의 하향조절, 및 B 세포 활성화.

[0077] "활성화 Fc 수용체"는 항체의 Fc 도메인에 의한 인게이지먼트 이후에, 수용체-보유 세포가 효과기 기능을 수행하도록 자극하는 신호전달 사건을 이끌어 내는 Fc 수용체이다. 인간 활성화 Fc 수용체는 FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) 및 FcαRI (CD89)를 포함한다.

[0078] 항체 의존성 세포 매개된 세포독성 (ADCC)은 면역 효과기 세포에 의한 항체-코팅된 표적 세포의 용해를 야기하는 면역 기전이다. 표적 세포는 항체 또는 Fc 영역을 포함하는 이들의 유도체가 일반적으로, Fc 영역의 N 말단인 단백질 부분을 통해 특이적으로 결합하는 세포이다. 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "감소된 ADCC"는 앞서 규정된 ADCC의 기전에 의해, 표적 세포를 둘러싸는 배지에서 소정의 항체 농도에서 소정의 시점에 용해되는 표적 세포의 숫자에서 감소 및/또는 ADCC의 기전에 의해, 소정의 시점에 소정의 숫자의 표적 세포의 용해를 달성하는 데 필요한, 표적 세포를 둘러싸는 배지에서 항체의 농도에서 증가 중에서 어느 한 가지로서 규정된다. ADCC에서 감소는 동일한 표준 생산, 정제, 조제 및 저장 방법 (이들은 당업자에게 공지된다)을 이용하여 동일한 유형의 숙주 세포에 의해 생산되지만 가공되지 않은 동일한 항체에 의해 매개된 ADCC에 상대적이다. 예를 들면, ADCC를 감소시키는 아미노산 치환을 Fc 도메인 내에 포함하는 항체에 의해 매개된 ADCC에서 감소는 Fc 도메인 내에 이러한 아미노산 치환이 없는 동일한 항체에 의해 매개된 ADCC에 상대적이다. ADCC를 계측하기 위한 적합한 검정은 당해 분야에서 널리 공지된다 (참조: 예를 들면 PCT 공개 번호 WO 2006/082515 또는 PCT 공개 번호 WO 2012/130831).

[0079] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "가공한다, 가공된, 가공"은 펩티드 중추의 임의의 조작, 또는 자연 발생 또는 재조합 폴리펩티드 또는 이의 단편의 번역후 변형을 포함하는 것으로 고려된다. 가공은 아미노산 서열의 변형, 글리코실화 패턴의 변형, 또는 개별 아미노산의 측쇄 기의 변형뿐만 아니라 이들 접근법의 조합을 포함한다.

[0080] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "아미노산 돌연변이"는 아미노산 치환, 결실, 삽입 및 변형을 포괄하는 것으로 의미된다. 최종 작제물이 원하는 특징, 예를 들면, Fc 수용체에 감소된 결합, 또는 다른 펩티드와의 증가된 연관을 소유한다면, 최종 작제물에 도달하기 위해 치환, 결실, 삽입 및 변형의 임의의 조합이 만들어질 수 있다. 아미노산 서열 결실과 삽입은 아미노산의 아미노 및/또는 카르복시 말단 결실과 삽입을 포함한다. 바람직한 아미노산 돌연변이는 아미노산 치환이다. 예를 들면 Fc 영역의 결합 특징을 변경하는 목적으로, 비보존성 아미노산 치환, 다시 말하면, 한 가지 아미노산을 상이한 구조적 및/또는 화학적 특성을 갖는 다른 아미노산으로 대체하는 것이 특히 바람직하다. 아미노산 치환은 비-자연 발생 아미노산에 의한, 또는 20개의 표준 아미노산의 자연 발생 아미노산 유도체 (예를 들면 4-히드록시프롤린, 3-메틸히스티딘, 오르니틴, 호모세린, 5-히드록실리신)에 의한 대체를 포함한다. 아미노산 돌연변이는 당해 분야에서 널리 공지된 유전학적 또는 화학적 방법을 이용하여 산출될 수 있다. 유전학적 방법은 특정 부위 돌연변이유발, PCR, 유전자 합성 등을 포함할 수 있다. 유전공학 이외의 방법, 예컨대 화학적 변형에 의해 아미노산의 측쇄 기를 변경하는 방법 또한 유용할 수 있는 것으로 예기된다. 다양한 지정이 동일한 아미노산 돌연변이를 지시하기 위해 본원에서 이용될 수 있다. 예를 들면, Fc 도메인의 위치 329에서 프롤린으로부터 글리신으로의 치환은 329G, G329, $G_{329}$, P329G, 또는 Pro329Gly로서 표시될 수 있다.

[0081] 참조 폴리펩티드 서열에 대하여 "퍼센트 (%) 아미노산 서열 동일성"은 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해 서열을 정렬하고 필요하면, 갭을 도입한 후에, 임의의 보존성 치환을 서열 동일성의 일부로서 고려하지 않고, 참조 폴리펩티드 서열 내에 아미노산 잔기와 동일한, 후보 서열 내에 아미노산 잔기의 백분율로서 규정된다. 퍼센트 아미노산 서열 동일성을 결정하는 목적을 위한 정렬은 당해 분야의 기술 범위 안에 있는 다양한 방식으로, 예를 들면, 공개적으로 가용한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, Clustal W, Megalign (DNASTAR) 소프트웨어 또는 FASTA 프로그램 패키지를 이용하여 달성될 수 있다. 당업자는 비교되는 서열의 전장에 걸쳐 최대 정렬을 달성하기 위해 필요한 임의의 알고리즘을 비롯하여, 서열을 정렬하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 대안으로, 동일성 퍼센트 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 이용하여 산출될 수

있다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 Genentech, Inc.에 의해 저술되었고, 소스 코드가 사용자 문서로 U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559에 제출되었는데, 여기서 이것은 U.S. Copyright 등록 번호 TXU510087 하에 등록되고 WO 2001/007611에서 설명된다.

[0082] 별도로 지시되지 않으면, 본원에서 목적을 위해, % 아미노산 서열 동일성 값은 BLOSUM50 비교 매트릭스를 갖는 FASTA 패키지 버전 36.3.8c 또는 후속 버전의 ggsearch 프로그램을 이용하여 산출된다. FASTA 프로그램 패키지는 W. R. Pearson and D. J. Lipman ("Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85 (1988) 2444-2448), W. R. Pearson ("Effective protein sequence comparison" Meth. Enzymol. 266 (1996) 227- 258) 및 Pearson et. al. (Genomics 46 (1997) 24-36)에 의해 저술되었고, www.fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_down.shtml 또는 www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta로부터 공개적으로 가용하다. 대안으로, 국부보다는 전역 정렬이 수행되도록 담보하기 위해 ggsearch (global protein:protein) 프로그램 및 디폴트 옵션 (BLOSUM50; 개방: -10; ext: -2; Ktup = 2)을 이용하여, fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/index.cgi에서 접근가능한 공개 서버가 서열을 비교하는 데 이용될 수 있다. 퍼센트 아미노산 동일성은 출력 정렬 헤더에서 제공된다.

[0083] 용어 "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산 분자"는 뉴클레오티드의 중합체를 포함하는 임의의 화합물 및/또는 물질을 포함한다. 각 뉴클레오티드는 염기, 특이적으로 퓨린- 또는 피리미딘 염기 (다시 말하면, 시토신 (C), 구아닌 (G), 아데닌 (A), 티민 (T) 또는 우라실 (U)), 당 (다시 말하면, 데옥시리보오스 또는 리보오스), 및 인산염 기로 구성된다. 종종, 핵산 분자는 염기의 서열에 의해 설명되는데, 여기서 상기 염기는 핵산 분자의 일차 구조 (선형 구조)를 나타낸다. 염기의 서열은 전형적으로 5'에서 3'로 나타내진다. 본원에서, 용어 핵산 분자는 예를 들면, 상보성 DNA (cDNA) 및 유전체 DNA를 비롯한 데옥시리보핵산 (DNA), 리보핵산 (RNA), 특히 전령 RNA (mRNA), DNA 또는 RNA의 합성 형태, 및 이들 분자 중에서 2가지 또는 그 이상을 포함하는 혼성 중합체를 포괄한다. 핵산 분자는 선형 또는 환상일 수 있다. 이에 더하여, 용어 핵산 분자는 센스와 안티센스 가닥뿐만 아니라 단일 가닥과 이중 가닥 형태 둘 모두를 포함한다. 게다가, 본원에서 설명된 핵산 분자는 자연 발생 또는 비-자연 발생 뉴클레오티드를 내포할 수 있다. 비-자연 발생 뉴클레오티드의 실례는 유도체화된 당 또는 인산염 중추 연쇄 또는 화학적으로 변형된 잔기를 갖는 변형된 뉴클레오티드 염기를 포함한다. 핵산 분자는 또한, 시험관내에서 및/또는 생체내에서, 예를 들면, 숙주 또는 환자에서 본원 발명의 항체의 직접적인 발현을 위한 벡터로서 적합한 DNA와 RNA 분자를 포괄한다. 이런 DNA (예를 들면, cDNA) 또는 RNA (예를 들면, mRNA) 벡터는 변형되지 않거나 또는 변형될 수 있다. 예를 들면, mRNA는 mRNA가 개체 내로 주입되어 항체가 생체내에서 산출될 있도록, RNA 벡터의 안정성 및/또는 인코딩된 분자의 발현을 증강하기 위해 화학적으로 변형될 수 있다 (참조: 예를 들면, Stadler et al. (2017) Nature Medicine 23:815-817, 또는 EP 2 101 823 B1).

[0084] "단리된" 핵산 분자는 이의 자연 환경의 구성요소로부터 분리된 핵산 분자를 지칭한다. 단리된 핵산 분자에는 핵산 분자를 통상적으로 내포하는 세포에 내포된 핵산 분자가 포함되지만, 상기 핵산 분자는 염색체외에 또는 자연 염색체 위치와 상이한 염색체 위치에 존재한다.

[0085] "항체를 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드 (또는 핵산)"은 항체 중쇄와 경쇄 (또는 이들의 단편)를 인코딩하는 하나 또는 그 이상의 폴리뉴클레오티드 분자, 단일 벡터 또는 별개의 벡터에서 이런 폴리뉴클레오티드 분자(들), 및 숙주 세포 내에 하나 또는 그 이상의 위치에서 존재하는 이런 폴리뉴클레오티드 분자(들)를 지칭한다.

[0086] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "벡터"는 자신이 연관되는 다른 핵산을 증식할 수 있는 핵산 분자를 포함한다. 상기 용어는 자기 복제 핵산 구조로서 벡터뿐만 아니라 이것이 도입된 숙주 세포의 게놈 내로 통합된 벡터를 포함한다. 일정한 벡터는 그들이 작동가능하게 연결되는 핵산의 발현을 주동할 수 있다. 이런 벡터는 본원에서 "발현 벡터"로서 지칭된다.

[0087] 용어 "숙주 세포", "숙주 세포주" 및 "숙주 세포 배양액"은 교체가능하게 이용되고, 외인성 핵산이 도입된 세포 및 이런 세포의 자손을 지칭한다. 숙주 세포에는 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"가 포함되는데, 이들은 계대 (passage)의 횟수에 상관없이, 일차 형질전환된 세포 및 이로부터 유래된 자손을 포함한다. 자손은 핵산 함량에서 부모 세포와 완전히 동일하지는 않을 수 있으며, 돌연변이를 내포할 수도 있다. 최초 형질전환된 세포에 대해 선별검사되거나 또는 선별된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이체 자손은 본원에 포함된다. 숙주 세포는 본원 발명의 항체를 산출하는 데 이용될 수 있는 임의의 유형의 세포 시스템이다. 숙주 세포는 배양된 세포, 예를 들면 포유류 배양된 세포, 예컨대 몇몇 예를 들면 HEK 세포, CHO 세포, BHK 세포, NS0 세포, SP2/0 세포, YO 골수종 세포, P3X63 생쥐 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포 또는 하이브리도마 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 및 식물 세포, 그러나 또한 유전자도입 동물, 유전자도입 식물 또는 배양된 식물 또는 동

물 조직 내에 포함된 세포를 포함한다. 한 양상에서, 본원 발명의 숙주 세포는 진핵 세포, 특히 포유류 세포이다. 한 양상에서, 숙주 세포는 인체 내에 세포가 아니다.

[0088] 용어 "제약학적 조성물" 또는 "제약학적 제제"는 그 안에 내포된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적이도록 허용하는 그런 형태이고, 이러한 조성물이 투여될 개체에게 받아들이기 어려울 정도로 독성인 추가 성분을 내포하지 않는 제조물을 지칭한다.

[0089] "제약학적으로 허용되는 운반체"는 개체에게 비독성인, 제약학적 조성물 또는 제제에서 활성 성분 이외의 성분을 지칭한다. 제약학적으로 허용되는 운반체는 완충액, 부형제, 안정제 또는 보존제를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0090] 본원에서 이용된 바와 같이, "치료" (및 이의 문법적 변이, 예컨대 "치료한다" 또는 "치료하는")는 치료되는 개체에서 질환의 자연 코스를 변경하려는 시도에서 임상적 개입을 지칭하고, 임상 병리의 예방을 위해 또는 임상 병리의 코스 동안 수행될 수 있다. 바람직한 치료 효과는 질환의 발생 또는 재발의 예방, 증상의 경감, 질환의 임의의 직접적인 또는 간접적인 병리학적 결과의 축소, 전이 예방, 질환 진행의 속도 감소, 질환 상태의 개선 또는 완화, 및 관해 또는 향상된 예후를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 일부 양상에서, 본원 발명의 항체는 질환의 발달을 지연시키거나 또는 질환의 진행을 늦추는 데 이용된다.

[0091] "개체" 또는 "피험자"는 포유동물이다. 포유동물은 순치된 동물 (예를 들면, 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류 (예를 들면, 인간 및 비인간 영장류, 예컨대 원숭이), 토끼, 및 설치류 (예를 들면, 생쥐 및 쥐)를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 일정한 양상에서, 개체 또는 피험자는 인간이다.

[0092] 작용제, 예를 들면, 제약학적 조성물의 "효과량"은 원하는 치료적 또는 방지적 결과를 달성하는 데 필요한 용량에서 및 기간 동안 효과적인 양을 지칭한다.

[0093] 용어 "포장 삽입물"은 치료적 산물의 상업적인 패키지 내에 관례적으로 포함되는 사용설명서를 지칭하는 데 이용되는데, 이것은 이런 치료적 산물의 이용에 관련된 징후, 용법, 용량, 투여, 병용 요법, 금기 및/또는 주의사항에 관한 정보를 내포한다.

[0094] **II. 조성물 및 방법**

[0095] 본원 발명은 CD3 및 두 번째 항원에 결합하는 다중특이적 항체를 비롯한, CD3에 결합하는 항체를 제공한다. 이들 항체는 예를 들면 효능과 안전성, 약물동력학뿐만 아니라 생산력에 대하여, 치료적 적용을 위한 다른 우호적인 특성과 함께 우수한 안정성을 보여준다. 본원 발명의 항체는 예를 들면, 질환 예컨대 암의 치료에 유용하다.

[0096] **A. 항-CD3 항체**

[0097] 한 양상에서, 본원 발명은 CD3에 결합하는 항체를 제공한다. 한 양상에서, CD3에 결합하는 단리된 항체가 제공된다. 한 양상에서, 본원 발명은 CD3에 특이적으로 결합하는 항체를 제공한다. 일정한 양상에서, 항-CD3 항체는 표면 플라스몬 공명 (SPR)에 의해 결정될 때, pH 6, -80℃에서 2주 후 결합 활성에 비하여, pH 7.4, 37℃에서 2주 후 CD3에 대한 약 90% 이상의 결합 활성을 유지한다.

[0098] 한 양상에서, 본원 발명은 CD3에 결합하는 항체를 제공하고, 여기서 상기 항체는 서열 번호 2의 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR) 1, 서열 번호 3의 HCDR 2 및 서열 번호 5의 HCDR 3을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH), 및 서열 번호 8의 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR) 1, 서열 번호 9의 LCDR 2 및 서열 번호 10의 LCDR 3을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하는 첫 번째 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0099] 한 양상에서, 항체는 인간화 항체이다. 한 양상에서, 항원 결합 도메인은 인간화 항원 결합 도메인 (다시 말하면, 인간화 항체의 항원 결합 도메인)이다. 한 양상에서, VH 및/또는 VL은 인간화 가변 영역이다.

[0100] 한 양상에서, VH 및/또는 VL은 수용자 인간 프레임워크, 예를 들면 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 공통 프레임워크를 포함한다.

[0101] 한 양상에서, VH는 서열 번호 7의 중쇄 가변 영역 서열의 하나 또는 그 이상의 중쇄 프레임워크 서열 (다시 말하면, FR1, FR2, FR3 및/또는 FR4 서열)을 포함한다. 한 양상에서, VH는 서열 번호 7의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 한 양상에서, VH는 서열 번호 7의 아미노산 서열과 적어도 약 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 한 양상에서, VH는 서열 번호 7의 아미노산 서열과 적어도 약 98% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일정한 양상에서, 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 VH 서열은 참조 서열에 비하여 치환 (예를 들면, 보존성 치환), 삽입 또는 결실을 내포하지만, 상기 서

열을 포함하는 항체는 CD3에 결합하는 능력을 유지한다. 일정한 양상에서, 총 1개 내지 10개의 아미노산이 서열 번호 7의 아미노산 서열에서 치환되고, 삽입되고/되거나 결실되었다. 일정한 양상에서, 치환, 삽입 또는 결실은 CDR 외부의 영역에서 (다시 말하면, FR에서) 일어난다. 한 양상에서, VH는 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함한다. 임의적으로, VH는 서열 번호 7의 번역후 변형을 포함하는, 상기 서열의 아미노산 서열을 포함한다.

[0102] 한 양상에서, VL은 서열 번호 11의 경쇄 가변 영역 서열의 하나 또는 그 이상의 경쇄 프레임워크 서열 (다시 말하면, FR1, FR2, FR3 및/또는 FR4 서열)을 포함한다. 한 양상에서, VL은 서열 번호 11의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 한 양상에서, VL은 서열 번호 11의 아미노산 서열과 적어도 약 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 한 양상에서, VL은 서열 번호 11의 아미노산 서열과 적어도 약 98% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일정한 양상에서, 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 VL 서열은 참조 서열에 비하여 치환 (예를 들면, 보존성 치환), 삽입 또는 결실을 내포하지만, 상기 서열을 포함하는 항체는 CD3에 결합하는 능력을 유지한다. 일정한 양상에서, 총 1개 내지 10개의 아미노산이 서열 번호 11의 아미노산 서열에서 치환되고, 삽입되고/되거나 결실되었다. 일정한 양상에서, 치환, 삽입 또는 결실은 CDR 외부의 영역에서 (다시 말하면, FR에서) 일어난다. 한 양상에서, VL은 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함한다. 임의적으로, VL은 서열 번호 11의 번역후 변형을 포함하는, 상기 서열의 아미노산 서열을 포함한다.

[0103] 한 양상에서, VH는 서열 번호 7의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, VL은 서열 번호 11의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 한 양상에서, VH는 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하고, VL은 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함한다.

[0104] 추가의 양상에서, 본원 발명은 CD3에 결합하는 항체를 제공하고, 여기서 상기 항체는 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 첫 번째 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0105] 추가의 양상에서, 본원 발명은 CD3에 결합하는 항체를 제공하고, 여기서 상기 항체는 서열 번호 7의 VH 서열 및 서열 번호 11의 VL 서열을 포함하는 첫 번째 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0106] 다른 양상에서, 본원 발명은 CD3에 결합하는 항체를 제공하고, 여기서 상기 항체는 서열 번호 7의 VH의 중쇄 CDR 서열을 포함하는 VH, 및 서열 번호 11의 VL의 경쇄 CDR 서열을 포함하는 VL을 포함하는 첫 번째 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0107] 추가의 양상에서, 첫 번째 항원 결합 도메인은 서열 번호 7의 VH의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 아미노산 서열, 및 서열 번호 11의 VL의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 아미노산 서열을 포함한다.

[0108] 한 양상에서, VH는 서열 번호 7의 VH의 중쇄 CDR 서열, 및 서열 번호 7의 VH의 프레임워크 서열에 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성의 프레임워크를 포함한다. 한 양상에서, VH는 서열 번호 7의 VH의 중쇄 CDR 서열, 및 서열 번호 7의 VH의 프레임워크 서열에 적어도 95% 서열 동일성의 프레임워크를 포함한다. 다른 양상에서, VH는 서열 번호 7의 VH의 중쇄 CDR 서열, 및 서열 번호 7의 VH의 프레임워크 서열에 적어도 98% 서열 동일성의 프레임워크를 포함한다.

[0109] 한 양상에서, VL은 서열 번호 11의 VL의 경쇄 CDR 서열, 및 서열 번호 11의 VL의 프레임워크 서열에 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성의 프레임워크를 포함한다. 한 양상에서, VL은 서열 번호 11의 VL의 경쇄 CDR 서열, 및 서열 번호 11의 VL의 프레임워크 서열에 적어도 95% 서열 동일성의 프레임워크를 포함한다. 다른 양상에서, VL은 서열 번호 11의 VL의 경쇄 CDR 서열, 및 서열 번호 11의 VL의 프레임워크 서열에 적어도 98% 서열 동일성의 프레임워크를 포함한다.

[0110] 한 양상에서, 본원 발명은 CD3에 결합하는 항체를 제공하고, 여기서 상기 항체는 앞서 제공된 임의의 양상의 경우에서와 같은 VH 서열, 및 앞서 제공된 임의의 양상의 경우에서와 같은 VL 서열을 포함하는 첫 번째 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0111] 한 양상에서, 항체는 인간 불변 영역을 포함한다. 한 양상에서, 항체는 인간 불변 영역을 포함하는 면역글로불린 분자, 특히 인간 CH1, CH2, CH3 및/또는 CL 도메인을 포함하는 IgG 부류 면역글로불린 분자이다. 인간 불변 도메인의 예시적인 서열은 서열 번호 120 및 121 (각각, 인간 카파 및 람다 CL 도메인), 및 서열 번호 122 (인간 IgG1 중쇄 불변 도메인 CH1-CH2-CH3)에서 제공된다. 한 양상에서, 항체는 서열 번호 120 또는 서열 번호 121의 아미노산 서열, 특히 서열 번호 120의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일

한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 불변 영역을 포함한다. 한 양상에서, 항체는 서열 번호 122의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역을 포함한다. 특히, 중쇄 불변 영역은 본원에서 설명된 바와 같이 Fc 도메인에서 아미노산 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0112] 한 양상에서, 첫 번째 항원 결합 도메인은 인간 불변 영역을 포함한다. 한 양상에서, 첫 번째 항원 결합 모이어티는 인간 불변 영역, 특히 인간 CH1 및/또는 CL 도메인을 포함하는 Fab 분자이다. 한 양상에서, 첫 번째 항원 결합 도메인은 서열 번호 120 또는 서열 번호 121의 아미노산 서열, 특히 서열 번호 120의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 불변 영역을 포함한다. 특히, 경쇄 불변 영역은 "전하 변형" 하에 본원에서 설명된 바와 같은 아미노산 돌연변이를 포함할 수 있고/있거나 만약 교차 Fab 분자 내에 있으면 하나 또는 그 이상 (특히 2개)의 N 말단 아미노산의 결실 또는 치환을 포함할 수 있다. 일부 양상에서, 첫 번째 항원 결합 도메인은 서열 번호 122의 아미노산 서열 내에 포함된 CH1 도메인 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역을 포함한다. 특히, 중쇄 불변 영역 (특이적으로 CH1 도메인)은 "전하 변형" 하에 본원에서 설명된 바와 같은 아미노산 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0113] 한 양상에서, 항체는 단일클론 항체이다.

[0114] 한 양상에서, 항체는 IgG, 특히 $IgG_1$, 항체이다. 한 양상에서, 항체는 전장 항체이다.

[0115] 다른 양상에서, 항체는 Fv 분자, scFv 분자, Fab 분자 및 $F(ab')_2$ 분자의 군에서 선택되는 항체 단편; 특히 Fab 분자이다. 다른 양상에서, 항체 단편은 디아바디, 트리아바디 또는 테트라바디이다.

[0116] 한 양상에서, 첫 번째 항원 결합 도메인은 Fab 분자이다. 바람직한 양상에서 첫 번째 항원 결합 도메인은 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL과 VH 또는 불변 도메인 CL과 CH1, 특히 가변 도메인 VL과 VH가 서로에 의해 대체되는 Fab 분자이다 (다시 말하면, 첫 번째 항원 결합 도메인은 교차 Fab 분자이다).

[0117] 추가의 양상에서, 임의의 상기 양상에 따른 항체는 아래의 섹션 II. A. 1.-8.에서 설명된 바와 같은 임의의 특질을 단독적으로 또는 조합으로 통합할 수 있다.

[0118] 바람직한 양상에서, 항체는 Fc 도메인, 특히 IgG Fc 도메인, 더욱 특히 IgG1 Fc 도메인을 포함한다. 한 양상에서 Fc 도메인은 인간 Fc 도메인이다. 한 양상에서, Fc 도메인은 인간 $IgG_1$ Fc 도메인이다. Fc 도메인은 첫 번째와 두 번째 아단위로 구성되고, Fc 도메인 변이체와 관련하여 아래 (섹션 II. A. 8.)에서 설명된 임의의 특질을 단독적으로 또는 조합으로 통합할 수 있다.

[0119] 다른 바람직한 양상에서, 항체는 두 번째 항원에 결합하는 두 번째 및 임의적으로 세 번째 항원 결합 도메인을 포함한다 (다시 말하면, 항체는 아래 (섹션 II. A. 7.)에서 더욱 설명된 바와 같이 다중특이적 항체이다).

[0120] ***1. 항체 단편***

[0121] 일정한 양상에서, 본원에서 제공된 항체는 항체 단편이다.

[0122] 한 양상에서, 항체 단편은 Fab, Fab', Fab'-SH, 또는 $F(ab')_2$ 분자, 특히 본원에서 설명된 바와 같은 Fab 분자이다. "Fab' 분자"는 항체 힌지 영역으로부터 하나 또는 그 이상의 시스테인을 포함하는 CH1 도메인의 카르복시 말단에서 잔기의 부가에 의해 Fab 분자와 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 자유 티올기를 보유하는 Fab' 분자이다. 펩신 처리는 2개의 항원 결합 부위 (2개의 Fab 분자) 및 Fc 영역의 일부를 갖는 $F(ab')_2$ 분자를 산출한다.

[0123] 다른 양상에서, 항체 단편은 디아바디, 트리아바디 또는 테트라바디이다. "디아바디"는 이가 또는 이중특이적일 수 있는 2개의 항원 결합 부위를 갖는 항체 단편이다. 참조: 예를 들면, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); 및 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993). 트리아바디 및 테트라바디 역시 Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)에서 설명된다.

[0124] 추가의 양상에서, 항체 단편은 단일 사슬 Fab 분자이다. "단일 사슬 Fab 분자" 또는 "scFab"는 항체 중쇄 가변 도메인 (VH), 항체 중쇄 불변 도메인 1 (CH1), 항체 경쇄 가변 도메인 (VL), 항체 경쇄 불변 도메인 (CL) 및 링커로 구성되는 폴리펩티드이고, 여기서 상기 항체 도메인 및 상기 링커는 N 말단에서 C 말단 방향으로 하기 순서 중에서 한 가지를 갖는다: a) VH-CH1-링커-VL-CL, b) VL-CL-링커-VH-CH1, c) VH-CL-링커-VL-CH1 또는 d)

VL-CH1-링커-VH-CL. 특히, 상기 링커는 적어도 30개 아미노산, 바람직하게는 32개 및 50개 사이의 아미노산의 폴리펩티드이다. 상기 단일 사슬 Fab 분자는 CL 도메인 및 CH1 도메인 사이에 자연 이황화 결합을 통해 안정화된다. 이에 더하여, 이들 단일 사슬 Fab 분자는 시스테인 잔기 (예를 들면 Kabat 넘버링에 따른 가변 중쇄에서 위치 44 및 가변 경쇄에서 위치 100)의 삽입을 통한 사슬간 이황화 결합의 산출에 의해 더욱 안정화될지도 모른다.

[0125] 다른 양상에서, 항체 단편은 단일 사슬 가변 단편 (scFv)이다. "단일 사슬 가변 단편" 또는 "scFv"는 링커에 의해 연결된, 항체의 중쇄 (VH)와 경쇄 (VL)의 가변 도메인의 융합 단백질이다. 특히, 링커는 10 내지 25개 아미노산의 짧은 폴리펩티드이고, 통상적으로, 유연성을 위한 글리신뿐만 아니라 용해도를 위한 세린 또는 트레오닌이 풍부하고, VH의 N 말단을 VL의 C 말단과 연결하거나 또는 그 반대일 수 있다. 이러한 단백질은 불변 영역의 제거 및 링커의 도입에도 불구하고, 본래 항체의 특이성을 유지한다. ScFv 단편에 관한 리뷰를 위해, 예를 들면, Plückthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994)를 참조한다; 또한, WO 93/16185; 및 U.S. 특허 번호 5,571,894와 5,587,458을 참조한다.

[0126] 다른 양상에서, 항체 단편은 단일 도메인 항체이다. "단일 도메인 항체"는 항체의 중쇄 가변 도메인 중에서 전부 또는 일부, 또는 항체의 경쇄 가변 도메인 중에서 전부 또는 일부를 포함하는 항체 단편이다. 일정한 양상에서, 단일 도메인 항체는 인간 단일 도메인 항체이다 (Domantis, Inc., Waltham, MA; 참조: 예를 들면, U.S. 특허 번호 6,248,516 B1).

[0127] 항체 단편은 본원에서 설명된 바와 같이, 무손상 항체의 단백질분해 소화뿐만 아니라 재조합 숙주 세포 (예를 들면 대장균 (*E. coli*))에 의한 재조합 생산을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 다양한 기술에 의해 만들어질 수 있다.

[0128] ***2. 인간화 항체***

[0129] 일정한 양상에서, 본원에서 제공된 항체는 인간화 항체이다. 전형적으로, 비인간 항체는 부모 비인간 항체의 특이성 및 친화성을 유지하면서, 인간에 대한 면역원성을 감소시키기 위해 인간화된다. 일반적으로, 인간화 항체는 CDR (또는 이들의 부분)이 비인간 항체로부터 유래되고, FR (또는 이들의 부분)이 인간 항체 서열로부터 유래되는 하나 또는 그 이상의 가변 도메인을 포함한다. 인간화 항체는 임의선택적으로, 인간 불변 영역의 적어도 일부를 또한 포함할 것이다. 일부 양상에서, 인간화 항체에서 일부 FR 잔기는 예를 들면, 항체 특이성 또는 친화성을 복원하거나 또는 향상시키기 위해, 비인간 항체 (예를 들면, CDR 잔기가 유래되는 항체)로부터 상응하는 잔기로 치환된다.

[0130] 인간화 항체 및 이들을 만드는 방법은 예를 들면, Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)에서 리뷰되고, 예를 들면, Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); US 특허 번호 5, 821,337, 7,527,791, 6,982,321 및 7,087,409; Kashmiri *et al.*, *Methods* 36:25-34 (2005) (특이성 결정 영역 (SDR) 합체를 설명); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) ("표면치환"을 설명); Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43-60 (2005) ("FR 셔플링"을 설명); 및 Osbourn et al., *Methods* 36:61-68 (2005) 및 Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (FR 셔플링에 대한 "보도된 선별" 접근법을 설명)에서 더욱 설명된다.

[0131] 인간화에 이용될 수 있는 인간 프레임워크 영역은 다음을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다: "최고 적합" 방법을 이용하여 선별된 프레임워크 영역 (참조: 예를 들면, Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); 경쇄 또는 중쇄 가변 영역의 특정 하위군의 인간 항체의 공통 서열로부터 유래된 프레임워크 영역 (참조: 예를 들면, Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); 및 Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); 인간 성숙 (체성으로 돌연변이된) 프레임워크 영역 또는 인간 생식계열 프레임워크 영역 (참조: 예를 들면, Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); 및 선별검사 FR 라이브러리로부터 유래된 프레임워크 영역 (참조: 예를 들면, Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) 및 Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

[0132] ***3. 글리코실화 변이체***

[0133] 일정한 양상에서, 본원에서 제공된 항체는 항체가 글리코실화되는 정도를 증가시키거나 또는 감소시키기 위해 변경된다. 항체에 글리코실화 부위의 부가 또는 결실은 하나 또는 그 이상의 글리코실화 부위가 창출되거나 또

는 제거되도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편의하게 달성될 수 있다.

[0134] 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우에, 거기에 부착된 올리고당류는 변경될 수 있다. 포유류 세포에 의해 생산된 선천적 항체는 전형적으로, Fc 영역의 CH2 도메인의 Asn297에 N-연쇄에 의해 일반적으로 부착되는 분지된, 바이안테나리 올리고당류를 포함한다. 참조: 예를 들면, Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997). 올리고당류는 다양한 탄수화물, 예를 들면, 만노오스, N-아세틸 글루코사민 (GlcNAc), 갈락토오스 및 시알산뿐만 아니라 바이안테나리 올리고당류 구조의 "줄기"에서 GlcNAc에 부착된 푸코오스를 포함할 수 있다. 일부 양상에서, 본원 발명의 항체에서 올리고당류의 변형은 일정한 향상된 특성을 갖는 항체 변이체를 창출하기 위해 만들어질 수 있다.

[0135] 한 양상에서, Fc 영역에 부착된 (직접적으로 또는 간접적으로) 푸코오스를 결여하는 비-푸코실화된 올리고당류, 다시 말하면 올리고당류 구조를 갖는 항체 변이체가 제공된다. 이런 비-푸코실화된 올리고당류 ("비푸코실화된" 올리고당류로서 또한 지칭됨)는 특히 N-연결된 올리고당류인데, 이것은 바이안테나리 올리고당류 구조의 줄기에서 첫 번째 GlcNAc에 부착된 푸코오스 잔기를 결여한다. 한 양상에서, 선천적 또는 부모 항체와 비교하여 Fc 영역에서 증가된 비율의 비-푸코실화된 올리고당류를 갖는 항체 변이체가 제공된다. 예를 들면, 비-푸코실화된 올리고당류의 비율은 적어도 약 20%, 적어도 약 40%, 적어도 약 60%, 적어도 약 80%, 또는 심지어 약 100% (다시 말하면, 푸코실화된 올리고당류가 존재하지 않는다)일 수 있다. 비-푸코실화된 올리고당류의 백분율은 예를 들면 WO 2006/082515에서 설명된 바와 같이, MALDI-TOF 질량 분광분석법에 의해 계측될 때, Asn 297에 부착된 모든 올리고당류의 합계 (예를 들면 복합체, 하이브리드 및 높은 만노오스 구조)에 비하여, 푸코오스 잔기를 결여하는 올리고당류의 (평균) 양이다. Asn297은 Fc 영역 내에 대략 위치 297 (Fc 영역 잔기의 EU 넘버링)에서 위치된 아스파라긴 잔기를 지칭한다; 하지만, Asn297은 또한, 항체에서 경미한 서열 변이로 인해, 위치 297의 대략 ± 3개 아미노산 상류 또는 하류에, 다시 말하면, 위치 294 및 300 사이에 위치될 수 있다. Fc 영역에서 증가된 비율의 비-푸코실화된 올리고당류를 갖는 이런 항체는 향상된 FcγRIIIa 수용체 결합 및/또는 향상된 효과기 기능, 특히 향상된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 참조: 예를 들면, US 2003/0157108; US 2004/0093621.

[0136] 감소된 푸코실화를 갖는 항체를 생산할 수 있는 세포주의 실례는 단백질 푸코실화에서 결함되는 Lec13 CHO 세포 (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys*. 249:533-545 (1986); US 2003/0157108; 및 WO 2004/056312, 특히 실시예 11), 및 녹아웃 세포주, 예컨대 알파-1,6-푸코실전달효소 유전자, *FUT8*, 녹아웃 CHO 세포 (참조: 예를 들면, Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng*. 87:614-622 (2004); Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng*., 94(4):680-688 (2006); 및 WO 2003/085107), 또는 GDP-푸코오스 합성 또는 전달체 단백질의 감소된 또는 전폐된 활성을 갖는 세포 (참조: 예를 들면, US2004259150, US2005031613, US2004132140, US2004110282)를 포함한다.

[0137] 추가의 양상에서, 항체 변이체는 양분된 올리고당류가 제공되는데, 예를 들면, 여기서 항체의 Fc 영역에 부착된 바이안테나리 올리고당류는 GlcNAc에 의해 양분된다. 이런 항체 변이체는 전술된 바와 같이 감소된 푸코실화 및/또는 향상된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 이런 항체 변이체의 실례는 예를 들면 Umana et al., Nat Biotechnol 17, 176-180 (1999); Ferrara et al., Biotechn Bioeng 93, 851-861 (2006); WO 99/54342; WO 2004/065540, WO 2003/011878에서 설명된다.

[0138] 올리고당류 내에 적어도 하나의 갈락토오스 잔기가 Fc 영역에 부착되는 항체 변이체 역시 제공된다. 이런 항체 변이체는 향상된 CDC 기능을 가질 수 있다. 이런 항체 변이체는 예를 들면, WO 1997/30087; WO 1998/58964; 및 WO 1999/22764에서 설명된다.

[0139] ***4. 시스테인 가공된 항체 변이체***

[0140] 일정한 양상에서, 시스테인 가공된 항체, 예컨대 THIOMAB™ 항체를 창출하는 것이 바람직할 수 있는데, 여기서 항체의 하나 또는 그 이상의 잔기가 시스테인 잔기로 치환된다. 바람직한 양상에서, 치환된 잔기는 항체의 접근가능한 부위에서 발생한다. 이들 잔기를 시스테인으로 치환함으로써, 반응성 티올 기는 따라서, 항체의 접근가능한 부위에서 위치되고, 상기 항체를 다른 모이어티, 예컨대 약물 모이어티 또는 링커-약물 모이어티에 접합하여 본원에서 더욱 설명된 바와 같은 면역접합체를 창출하는 데 이용될 수 있다. 시스테인 가공된 항체는 예를 들면, U.S. 특허 번호 7,521,541, 8,30,930, 7,855,275, 9,000,130, 또는 WO 2016040856에서 설명된 바와 같이 산출될 수 있다.

[0141] ***5. 항체 유도체***

[0142] 일정한 양상에서, 본원에서 제공된 항체는 당해 분야에서 공지되고 쉽게 가용한 추가 비단백질성 모이어티를 내포하도록 더욱 변형될 수 있다. 항체의 유도체화에 적합한 모이어티는 수용성 중합체를 포함하지만 이들에 한정

되지 않는다. 수용성 중합체의 무제한적 실례는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로오스, 덱스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1, 3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산 (동종중합체 또는 무작위 공중합체), 및 덱스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 동종중합체, 프롤릴프로필렌 산화물/에틸렌 산화물 공중합체, 폴리옥시에틸화된 폴리올 (예를 들면, 글리세롤), 폴리비닐 알코올, 및 이들의 혼합물을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드는 물에서 안정성으로 인해, 제조 시에 이점을 가질 수 있다. 중합체는 임의의 분자량일 수 있고, 분지되거나 또는 분지되지 않을 수 있다. 항체에 부착된 중합체의 숫자는 변할 수 있고, 하나 이상의 중합체가 부착되면, 이들은 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 이용되는 중합체의 숫자 및/또는 유형은 향상되는 항체의 특정 특성 또는 기능, 항체 유도체가 규정된 조건 하에 요법에서 이용될 것인지의 여부 등을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 고려사항에 근거하여 결정될 수 있다.

[0143] ***6. 면역접합체***

[0144] 본원 발명은 또한, 한 가지 또는 그 이상의 치료제, 예컨대 세포독성 작용제, 화학요법 작용제, 약물, 성장 저해제, 독소 (예를 들면, 단백질 독소, 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적으로 활성 독소, 또는 이들의 단편), 또는 방사성 동위원소에 접합된 (화학적으로 접합된) 본원에서 항-CD3 항체를 포함하는 면역접합체를 제공한다.

[0145] 한 양상에서, 면역접합체는 항체-약물 접합체 (ADC)인데, 여기서 항체는 전술된 치료제 중에서 한 가지 또는 그 이상에 접합된다. 항체는 전형적으로, 링커를 이용하여 치료제 중에서 한 가지 또는 그 이상에 연결된다. 치료제 및 약물 및 링커의 실례를 포함하는 ADC 기술의 개요는 *Pharmacol Review* 68:3-19 (2016)에서 진술된다.

[0146] 다른 양상에서, 면역접합체는 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 사슬 (녹농균 (Pseudomonas aeruginosa)으로부터), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디 (Aleurites fordii) 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 아메리카나 (Phytolaca americana) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모디카 차란티아 (momordica charantia) 저해제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 (sapaonaria officinalis) 저해제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 효소적으로 활성 독소 또는 이의 단편에 접합된 본원 발명의 항체를 포함한다.

[0147] 다른 양상에서, 면역접합체는 방사접합체를 형성하기 위해 방사성 원자에 접합된 본원 발명의 항체를 포함한다. 다양한 방사성 동위원소가 방사접합체의 생산에 가용하다. 실례는 $At^{211}$, $I^{131}$, $I^{125}$, $Y^{90}$, $Re^{186}$, $Re^{188}$, $Sm^{153}$, $Bi^{212}$, $P^{32}$, $Pb^{212}$ 및 Lu의 방사성 동위원소를 포함한다. 방사접합체가 검출에 이용될 때, 이것은 신티그래피 연구를 위한 방사성 원자, 예를 들면, $tc^{99m}$ 또는 $I^{123}$, 또는 핵 자기 공명 (NMR) 영상화 (자기 공명 영상법, MRI로서 또한 알려져 있음)를 위한 스핀 표지, 예컨대 $I^{123}$, $I^{131}$, $In^{111}$, $F^{19}$, $C^{13}$, $N^{15}$, $O^{17}$, 가돌리늄, 망간 또는 철을 포함할 수 있다.

[0148] 항체 및 세포독성 작용제의 접합체는 다양한 이중기능성 단백질 연계 작용제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피온산염 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실산염 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이중기능성 유도체 (예를 들면, 디메틸 아디피미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예를 들면, 디숙신이미딜 수베르산염), 알데히드 (예를 들면, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예를 들면, 비스 (p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예를 들면, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예를 들면, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트) 및 비스-활성 플루오르 화합물 (예를 들면, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 이용하여 만들어질 수 있다. 예를 들면, 리신 면역독소는 Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987)에서 설명된 바와 같이 제조될 수 있다. 탄소-14-표지화된 1-이소티오시아나토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 항체에 방사성뉴클레오티드의 접합을 위한 예시적인 킬레이트화제이다. 참조: WO 94/11026. 링커는 세포에서 세포독성 약물의 방출을 용이하게 하는 "개열가능한 링커"일 수 있다. 예를 들면, 산-불안정 링커, 펩티드분해효소-민감성 링커, 광불안정 링커, 디메틸 링커 또는 이황화물-내포 링커 (Chari et al., *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); U.S. 특허 번호 5,208,020)가 이용될 수 있다.

[0149] 본원에서 면역접합체 또는 ADCs는 상업적으로 가용한 (예를 들면, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford,

IL., U.S.A로부터) BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 술포-EMCS, 술포-GMBS, 술포-KMUS, 술포-MBS, 술포-SIAB, 술포-SMCC 및 술포-SMPB, 및 SVSB (숙신이미딜-(4-비닐술폰)벤조에이트)를 포함하지만 이들에 한정되지 않는 교차연결제 시약으로 제조된 이와 같은 접합체를 명시적으로 예기하지만, 이들에 한정되지 않는다.

[0150] ***7. 다중특이적 항체***

[0151] 일정한 양상에서, 본원에서 제공된 항체는 다중특이적 항체, 특히 이중특이적 항체이다. 다중특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 항원 결정인자 (예를 들면, 2개의 상이한 단백질, 또는 동일한 단백질 상에서 2개의 상이한 에피토프)에 대한 결합 특이성을 갖는 단일클론 항체이다. 일정한 양상에서, 다중특이적 항체는 3개 또는 그 이상의 결합 특이성을 갖는다. 일정한 양상에서, 결합 특이성 중에서 하나는 CD3에 대한 것이고, 다른 특이성은 임의의 다른 항원에 대한 것이다. 일정한 양상에서, 다중특이적 항체는 CD3의 2개 (또는 그 이상)의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 다중특이적 (예를 들면, 이중특이적) 항체는 또한, 세포독성 작용제 또는 세포를, CD3을 발현하는 세포로 국부화하는 데 이용될 수 있다. 다중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편으로서 제조될 수 있다.

[0152] 다중특이적 항체를 만들기 위한 기술은 상이한 특이성을 갖는 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 재조합 공동발현 (참조: Milstein and Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)) 및 "노브-인-홀" 가공 (참조: 예를 들면, U.S. 특허 번호 5,731,168 및 Atwell et al., J. Mol. Biol. 270:26 (1997))을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 다중특이적 항체는 또한, 항체 Fc-이종이합체성 분자를 만들기 위해 정전 스티어링 효과를 가공함으로써 (참조: 예를 들면, WO 2009/089004); 2개 또는 그 이상의 항체 또는 단편을 교차연결함으로써 (참조: 예를 들면, US 특허 번호 4,676,980 및 Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)); 류신 지퍼를 이용하여 이중특이적 항체를 생산함으로써 (참조: 예를 들면, Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992) 및 WO 2011/034605); 경쇄 오대합 문제를 회피하기 위해 공통 경쇄 기술을 이용함으로써 (참조: 예를 들면, WO 98/50431); 이중특이적 항체 단편을 만들기 위해 "디아바디" 기술을 이용함으로써 (참조: 예를 들면, Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); 및 단일 사슬 Fv (sFv) 이합체를 이용함으로써 (참조: 예를 들면, Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); 및 예를 들면, Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991)에서 설명된 바와 같이 삼중특이적 항체를 제조함으로써 만들어질 수 있다.

[0153] 예를 들면, "문어 항체", 또는 DVD-Ig를 비롯한, 3개 또는 그 이상의 항원 결합 부위를 갖는 가공된 항체 또한 본원에 포함된다 (참조: 예를 들면, WO 2001/77342 및 WO 2008/024715). 3개 또는 그 이상의 항원 결합 부위를 갖는 다중특이적 항체의 다른 실례는 WO 2010/115589, WO 2010/112193, WO 2010/136172, WO 2010/145792 및 WO 2013/026831에서 발견될 수 있다. 다중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 또한, CD3뿐만 아니라 다른 상이한 항원, 또는 CD3의 2개의 상이한 에피토프에 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 "이중 작용 FAb" 또는 "DAF"를 포함한다 (참조: 예를 들면, US 2008/0069820 및 WO 2015/095539).

[0154] 다중특이적 항체는 또한, 동일한 항원 특이성의 하나 또는 그 이상의 결합 팔에서 도메인 교차 (이른바 "CrossMab" 기술)로, 다시 말하면, VH/VL 도메인 (참조: 예를 들면, WO 2009/080252 및 WO 2015/150447), CH1/CL 도메인 (참조: 예를 들면, WO 2009/080253) 또는 완전한 Fab 팔 (참조: 예를 들면, WO 2009/080251, WO 2016/016299, 또한 Schaefer et al, PNAS, 108 (2011) 1187-1191 및 Klein at al., MAbs 8 (2016) 1010-20 참조)을 교환함으로써 비대칭적 형태로 제공될 수 있다. 비대칭적 Fab 팔은 또한, 정확한 Fab 대합을 주도하기 위해 하전된 또는 비-하전된 아미노산 돌연변이를 도메인 인터페이스 내로 도입함으로써 가공될 수 있다. 참조: 예를 들면, WO 2016/172485.

[0155] 다중특이적 항체에 대한 다양한 추가의 분자 형식은 당해 분야에서 공지되고 본원에 포함된다 (참조: 예를 들면, Spiess et al., Mol Immunol 67 (2015) 95-106).

[0156] 본원에 또한 포함되는 다중특이적 항체의 특정 유형은 표적 세포를 사멸시키기 위한 T 세포의 재표적화를 위해, 표적 세포, 예를 들면, 종양 세포 상에서 표면 항원에, 및 T 세포 수용체 (TCR) 복합체의 활성화, 불변 구성요소, 예컨대 CD3에 동시에 결합하도록 설계된 이중특이적 항체이다. 따라서, 바람직한 양상에서, 본원에서 제공된 항체는 다중특이적 항체, 특히 이중특이적 항체이고, 여기서 결합 특이성 중에서 하나는 CD3에 대한 것이고 다른 하나는 표적 세포 항원에 대한 것이다.

[0157] 이러한 목적에 유용할 수 있는 이중특이적 항체 형식의 실례는 2개의 scFv 분자가 유연한 링커에 의해 융합되는 이른바 "BiTE" (이중특이적 T 세포 인게이저) 분자 (참조: 예를 들면, WO 2004/106381, WO 2005/061547, WO

2007/042261 및 WO 2008/119567, Nagorsen and Bäuerle, Exp Cell Res 317, 1255-1260 (2011)); 디아바디 (Holliger et al., Prot Eng 9, 299-305 (1996)) 및 이들의 유도체, 예컨대 탠덤 디아바디 ("TandAb"; Kipriyanov et al., J Mol Biol 293, 41-56 (1999)); 디아바디 형식에 기초되지만 추가 안정화를 위한 C 말단 이황화 다리를 특징으로 하는 "DART" (이중 친화성 재표적화) 분자 (Johnson et al., J Mol Biol 399, 436-449 (2010)), 및 전체 하이브리드 생쥐/쥐 IgG 분자인 이른바 트리오맙 (Seimetz et al., Cancer Treat Rev 36, 458-467 (2010)에서 리뷰됨)을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 본원에 포함된 특정 T 세포 이중특이적 항체 형식은 WO 2013/026833, WO 2013/026839, WO 2016/020309; Bacac et al., Oncoimmunology 5(8) (2016) e1203498에서 설명된다.

[0158] 본원 발명의 다중특이적 항체의 바람직한 양상이 하기에서 설명된다.

[0159] 한 양상에서, 본원 발명은 본원에서 설명된 바와 같은, CD3에 결합하는 첫 번째 항원 결합 도메인을 포함하고, 두 번째 항원에 결합하는 두 번째 및 임의적으로 세 번째 항원 결합 도메인을 포함하는, CD3에 결합하는 항체를 제공한다.

[0160] 본원 발명의 바람직한 양상에 따라서, 항체 내에 포함된 항원 결합 도메인은 Fab 분자 (다시 말하면, 가변 도메인 및 불변 도메인을 각각 포함하는, 중쇄 및 경쇄로 구성되는 항원 결합 도메인)이다. 한 양상에서, 첫 번째, 두 번째 및/또는 존재하는 경우에, 세 번째 항원 결합 도메인은 Fab 분자이다. 한 양상에서, 상기 Fab 분자는 인간이다. 바람직한 양상에서, 상기 Fab 분자는 인간화이다. 또 다른 양상에서, 상기 Fab 분자는 인간 중쇄와 경쇄 불변 도메인을 포함한다.

[0161] 바람직하게는, 항원 결합 도메인 중에서 적어도 하나는 교차 Fab 분자이다. 이런 변형은 상이한 Fab 분자로부터 중쇄와 경쇄의 오대합을 감소시켜, 재조합 생산에서 본원 발명의 (다중특이적) 항체의 수율과 순도를 향상시킨다. 본원 발명의 (다중특이적) 항체에 유용한 바람직한 교차 Fab 분자에서, Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인 (각각, VL 및 VH)이 교환된다. 하지만, 심지어 이러한 도메인 교환에서도, (다중특이적) 항체의 제조물은 오대합된 중쇄와 경쇄 사이에 이른바 Bence Jones-유형 상호작용으로 인한 일정한 부산물을 포함할 수 있다 (참조: Schaefer et al, PNAS, 108 (2011) 11187-11191). 상이한 Fab 분자로부터 중쇄와 경쇄의 오대합을 더욱 감소시키고, 따라서 원하는 (다중특이적) 항체의 순도와 수율을 증가시키기 위해, 반대 전하를 갖는 하전된 아미노산이 본원에서 더욱 설명된 바와 같이, 첫 번째 항원 (CD3)에 결합하는 Fab 분자, 또는 두 번째 항원 (예를 들면 표적 세포 항원 예컨대 TYRP-1 또는 EGFRvIII)에 결합하는 Fab 분자(들) 중에서 어느 한 가지의 CH1과 CL 도메인 내에 특정한 아미노산 위치에서 도입될 수 있다. (다중특이적) 항체 내에 포함된 전통적인 Fab 분자(들) (예컨대 예를 들면 도 1 A-C, G-J에서 도시됨), 또는 (다중특이적) 항체 내에 포함된 VH/VL 교차 Fab 분자(들) (예컨대 예를 들면 도 1 D-F, K-N에서 도시됨) 중 어느 한 가지에서 전하 변형이 만들어진다 (그러나 둘 모두에서 그러하지는 않음). 바람직한 양상에서, 전하 변형은 (다중특이적) 항체 내에 포함된 전통적인 Fab 분자(들)에서 만들어진다 (이것은 바람직한 양상에서 두 번째 항원, 예를 들면 표적 세포 항원 예컨대 TYRP-1 또는 EGFRvIII에 결합한다).

[0162] 본원 발명에 따른 바람직한 양상에서, (다중특이적) 항체는 첫 번째 항원 (다시 말하면, CD3) 및 두 번째 항원 (예를 들면 표적 항원 예컨대 TYRP-1 또는 EGFRvIII)에 동시에 결합할 수 있다. 한 양상에서, (다중특이적) 항체는 CD3 및 표적 세포 항원에 동시적 결합에 의해 T 세포 및 표적 세포를 교차연결할 수 있다. 훨씬 바람직한 양상에서, 이런 동시적 결합은 표적 세포, 특히 표적 세포 항원 (예를 들면 TYRP-1 또는 EGFRvIII)-발현 종양 세포의 용해를 유발한다. 한 양상에서, 이런 동시적 결합은 T 세포의 활성화를 유발한다. 다른 양상에서, 이런 동시적 결합은 증식, 분화, 사이토킨 분비, 세포독성 효과기 분자 방출, 세포독성 활성, 및 활성화 마커의 발현의 군에서 선택되는, T 림프구, 특히 세포독성 T 림프구의 세포 반응을 유발한다. 한 양상에서, 표적 세포 항원에 동시적 결합 없이 CD3에 대한 (다중특이적) 항체의 결합은 T 세포 활성화를 유발하지 않는다.

[0163] 한 양상에서, (다중특이적) 항체는 T 세포의 세포독성 활성을 표적 세포로 전향시킬 수 있다. 바람직한 양상에서, 상기 전향은 표적 세포에 의한 MHC-매개된 펩티드 항원 제시 및/또는 T 세포의 특이성과 무관하다.

[0164] 바람직하게는, 본원 발명의 임의의 양상에 따른 T 세포는 세포독성 T 세포이다. 일부 양상에서 T 세포는 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ T 세포, 특히 $CD8^+$ T 세포이다.

[0165] **a) 첫 번째 항원 결합 도메인**

[0166] 본원 발명의 (다중특이적) 항체는 CD3에 결합하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인 (첫 번째 항원 결합 도메

인)을 포함한다. 바람직한 양상에서, CD3은 인간 CD3 (서열 번호 112) 또는 시노몰구스 CD3 (서열 번호 113), 가장 특히 인간 CD3이다. 한 양상에서 첫 번째 항원 결합 도메인은 인간 및 시노몰구스 CD3에 대해 교차반응성이다 (다시 말하면, 이것에 특이적으로 결합한다). 일부 양상에서, CD3은 CD3의 엡실론 아단위 (CD3 엡실론)이다.

[0167] 바람직한 양상에서, (다중특이적) 항체는 CD3에 결합하는 하나보다 많지 않은 항원 결합 도메인을 포함한다. 한 양상에서 (다중특이적) 항체는 CD3에 대한 일가 결합을 제공한다.

[0168] 한 양상에서, CD3에 결합하는 항원 결합 도메인은 Fv 분자, scFv 분자, Fab 분자, 및 $F(ab')_2$ 분자의 군에서 선택되는 항체 단편이다. 바람직한 양상에서, CD3에 결합하는 항원 결합 도메인은 Fab 분자이다.

[0169] 바람직한 양상에서, CD3에 결합하는 항원 결합 도메인은 본원에서 설명된 바와 같은 교차 Fab 분자, 다시 말하면, Fab 중쇄와 경쇄의 가변 도메인 VH와 VL 또는 불변 도메인 CH1과 CL이 서로에 의해 교환/대체되는 Fab 분자이다. 이런 양상에서, 두 번째 항원 (예를 들면 표적 세포 항원 예컨대 TYRP-1 또는 EGFRvIII)에 결합하는 항원 결합 도메인(들)은 바람직하게는 전통적인 Fab 분자이다. (다중특이적) 항체 내에 포함된, 두 번째 항원에 결합하는 하나 이상의 항원 결합 도메인, 특히 Fab 분자가 있는 양상에서, CD3에 결합하는 항원 결합 도메인은 바람직하게는 교차 Fab 분자이고, 두 번째 항원에 결합하는 항원 결합 도메인은 전통적인 Fab 분자이다.

[0170] 대안적 양상에서, CD3에 결합하는 항원 결합 도메인은 전통적인 Fab 분자이다. 이런 양상에서, 두 번째 항원 (예를 들면 표적 세포 항원 예컨대 TYRP-1 또는 EGFRvIII)에 결합하는 항원 결합 도메인(들)은 본원에서 설명된 바와 같은 교차 Fab 분자, 다시 말하면, Fab 중쇄와 경쇄의 가변 도메인 VH와 VL 또는 불변 도메인 CH1과 CL이 서로에 의해 교환/대체되는 Fab 분자이다. (다중특이적) 항체 내에 포함된, CD3에 결합하는 하나 이상의 항원 결합 도메인, 특히 Fab 분자가 있는 양상에서, 두 번째 항원에 결합하는 항원 결합 도메인은 바람직하게는 교차 Fab 분자이고, CD3에 결합하는 항원 결합 도메인은 전통적인 Fab 분자이다.

[0171] 바람직한 양상에서, 첫 번째 항원 결합 도메인은 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL과 VH 또는 불변 도메인 CL과 CH1, 특히 가변 도메인 VL과 VH가 서로에 의해 대체되는 Fab 분자이다 (다시 말하면, 이런 양상에 따라서, 첫 번째 항원 결합 도메인은 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 또는 불변 도메인이 교환되는 교차 Fab 분자이다). 이와 같은 한 가지 양상에서, 두 번째 (및 만약 있다면, 세 번째) 항원 결합 도메인은 전통적인 Fab 분자이다.

[0172] 한 양상에서, CD3에 결합하는 하나보다 많지 않은 항원 결합 도메인이 (다중특이적) 항체 내에 존재한다 (다시 말하면, 상기 항체는 CD3에 대한 일가 결합을 제공한다).

[0173] **b) 두 번째 (및 세 번째) 항원 결합 도메인**

[0174] 일정한 양상에서, 본원 발명의 (다중특이적) 항체는 두 번째 항원에 결합하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인, 특히 Fab 분자를 포함한다. 두 번째 항원은 바람직하게는 CD3이 아니다, 다시 말하면, CD3과 상이하다. 한 양상에서, 두 번째 항원은 CD3과 상이한 세포 상에서 발현되는 (예를 들면 T 세포 이외의 세포 상에서 발현되는) 항원이다. 한 양상에서, 두 번째 항원은 표적 세포 항원, 특히 종양 세포 항원이다. 특정한 양상에서, 두 번째 항원은 TYRP-1이다. 다른 특정한 양상에서, 두 번째 항원은 EGFRvIII이다. 두 번째 항원 결합 도메인은 (다중특이적) 항체를, 표적 부위, 예를 들면, 두 번째 항원을 발현하는 특이적 유형의 종양 세포로 지향시킬 수 있다.

[0175] 한 양상에서, 두 번째 항원에 결합하는 항원 결합 도메인은 Fv 분자, scFv 분자, Fab 분자, 및 $F(ab')_2$ 분자의 군에서 선택되는 항체 단편이다. 바람직한 양상에서, 두 번째 항원에 결합하는 항원 결합 도메인은 Fab 분자이다.

[0176] 일정한 양상에서, (다중특이적) 항체는 두 번째 항원에 결합하는 2개의 항원 결합 도메인, 특히 Fab 분자를 포함한다. 바람직한 이런 양상에서, 이들 항원 결합 도메인 각각은 동일한 항원 결정인자에 결합한다. 훨씬 바람직한 양상에서, 이들 모든 항원 결합 도메인은 동일하다, 다시 말하면, 이들은 동일한 분자 형식 (예를 들면 전통적인 또는 교차 Fab 분자)을 갖고, 본원에서 설명된 바와 같은, CH1과 CL 도메인 내에 동일한 아미노산 치환 (만약 있다면)을 포함하는 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 한 양상에서, (다중특이적) 항체는 두 번째 항원에 결합하는 2개보다 많지 않은 항원 결합 도메인, 특히 Fab 분자를 포함한다.

[0177] 바람직한 양상에서, 두 번째 항원에 결합하는 항원 결합 도메인(들)은 전통적인 Fab 분자이다. 이런 양상에서, CD3에 결합하는 항원 결합 도메인(들)은 본원에서 설명된 바와 같은 교차 Fab 분자, 다시 말하면, Fab 중쇄와

경쇄의 가변 도메인 VH와 VL 또는 불변 도메인 CH1과 CL이 서로에 의해 교환/대체되는 Fab 분자이다.

[0178] 대안적 양상에서, 두 번째 항원에 결합하는 항원 결합 도메인(들)은 본원에서 설명된 바와 같은 교차 Fab 분자, 다시 말하면, Fab 중쇄와 경쇄의 가변 도메인 VH와 VL 또는 불변 도메인 CH1과 CL이 서로에 의해 교환/대체되는 Fab 분자이다. 이런 양상에서, CD3에 결합하는 항원 결합 도메인(들)은 전통적인 Fab 분자이다.

[0179] 한 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인은 인간 불변 영역을 포함한다. 한 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인은 인간 불변 영역, 특히 인간 CH1 및/또는 CL 도메인을 포함하는 Fab 분자이다. 인간 불변 도메인의 예시적인 서열은 서열 번호 120 및 121 (각각, 인간 카파 및 람다 CL 도메인), 및 서열 번호 122 (인간 IgG1 중쇄 불변 도메인 CH1-CH2-CH3)에서 제공된다. 한 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인은 서열 번호 120 또는 서열 번호 121의 아미노산 서열, 특히 서열 번호 120의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 불변 영역을 포함한다. 특히, 경쇄 불변 영역은 "전하 변형" 하에 본원에서 설명된 바와 같은 아미노산 돌연변이를 포함할 수 있고/있거나 만약 교차 Fab 분자 내에 있으면 하나 또는 그 이상 (특히 2개)의 N 말단 아미노산의 결실 또는 치환을 포함할 수 있다. 일부 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인은 서열 번호 122의 아미노산 서열 내에 포함된 CH1 도메인 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역을 포함한다. 특히, 중쇄 불변 영역 (특이적으로 CH1 도메인)은 "전하 변형" 하에 본원에서 설명된 바와 같은 아미노산 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0180] *TYRP-1*

[0181] 바람직한 양상에서, 두 번째 항원은 TYRP-1, 특히 인간 TYRP-1 (서열 번호 114)이다.

[0182] 한 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인은 서열 번호 15의 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR) 1, 서열 번호 16의 HCDR 2 및 서열 번호 17의 HCDR 3을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH), 및 서열 번호 19의 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR) 1, 서열 번호 20의 LCDR 2 및 서열 번호 21의 LCDR 3을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다.

[0183] 한 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인은 인간화 항체이다 (이것으로부터 유래된다). 한 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인은 인간화 항원 결합 도메인 (다시 말하면, 인간화 항체의 항원 결합 도메인)이다. 한 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 VH 및/또는 VL은 인간화 가변 영역이다.

[0184] 한 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 VH 및/또는 VL은 수용자 인간 프레임워크, 예를 들면 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 공통 프레임워크를 포함한다.

[0185] 한 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 VH는 서열 번호 18의 하나 또는 그 이상의 중쇄 프레임워크 서열 (다시 말하면, FR1, FR2, FR3 및/또는 FR4 서열)을 포함한다. 한 양상에서, VH는 서열 번호 18의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 한 양상에서, VH는 서열 번호 18의 아미노산 서열과 적어도 약 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 한 양상에서, VH는 서열 번호 18의 아미노산 서열과 적어도 약 98% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일정한 양상에서, 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 VH 서열은 참조 서열에 비하여 치환 (예를 들면, 보존성 치환), 삽입 또는 결실을 내포하지만, 상기 서열을 포함하는 항체는 TYRP-1에 결합하는 능력을 유지한다. 일정한 양상에서, 총 1개 내지 10개의 아미노산이 서열 번호 18의 아미노산 서열에서 치환되고, 삽입되고/되거나 결실되었다. 일정한 양상에서, 치환, 삽입 또는 결실은 CDR 외부의 영역에서 (다시 말하면, FR에서) 일어난다. 한 양상에서, VH는 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함한다. 임의적으로, VH는 서열 번호 18의 번역후 변형을 포함하는, 상기 서열의 아미노산 서열을 포함한다.

[0186] 한 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 VL은 서열 번호 22의 하나 또는 그 이상의 경쇄 프레임워크 서열 (다시 말하면, FR1, FR2, FR3 및/또는 FR4 서열)을 포함한다. 한 양상에서, VL은 서열 번호 22의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 한 양상에서, VL은 서열 번호 22의 아미노산 서열과 적어도 약 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 한 양상에서, VL은 서열 번호 22의 아미노산 서열과 적어도 약 98% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일정한 양상에서, 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 VL 서열은 참조 서열에 비하여 치환 (예를 들면, 보존성 치환), 삽입 또는 결실을 내포하지만, 상기 서열을 포함하는 항체는 TYRP-1에 결합하는 능력을 유지한다. 일정한 양상에서, 총 1개 내지 10개의 아미노산이 서열 번호 22의 아미노산 서열에서 치환되고, 삽입되고/되거

나 결실되었다. 일정한 양상에서, 치환, 삽입 또는 결실은 CDR 외부의 영역에서 (다시 말하면, FR에서) 일어난다. 한 양상에서, VL은 서열 번호 22의 아미노산 서열을 포함한다. 임의적으로, VL은 서열 번호 22의 번역후 변형을 포함하는, 상기 서열의 아미노산 서열을 포함한다.

[0187] 한 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 VH는 서열 번호 18의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 VL은 서열 번호 22의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 한 양상에서, VH는 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하고, VL은 서열 번호 22의 아미노산 서열을 포함한다.

[0188] 추가의 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인은 서열 번호 18의 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 22의 서열을 포함하는 VL을 포함한다.

[0189] 추가의 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인은 서열 번호 18의 VH 서열 및 서열 번호 22의 VL 서열을 포함한다.

[0190] 다른 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인은 서열 번호 18의 VH의 중쇄 CDR 서열을 포함하는 VH, 및 서열 번호 22의 VL의 경쇄 CDR 서열을 포함하는 VL을 포함한다.

[0191] 추가의 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인은 서열 번호 18의 VH의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 아미노산 서열, 및 서열 번호 22의 VL의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 아미노산 서열을 포함한다.

[0192] 한 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 VH는 서열 번호 18의 VH의 중쇄 CDR 서열, 및 서열 번호 18의 VH의 프레임워크 서열에 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성의 프레임워크를 포함한다. 한 양상에서, VH는 서열 번호 18의 VH의 중쇄 CDR 서열, 및 서열 번호 18의 VH의 프레임워크 서열에 적어도 95% 서열 동일성의 프레임워크를 포함한다. 다른 양상에서, VH는 서열 번호 18의 VH의 중쇄 CDR 서열, 및 서열 번호 18의 VH의 프레임워크 서열에 적어도 98% 서열 동일성의 프레임워크를 포함한다.

[0193] 한 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 VL은 서열 번호 22의 VL의 경쇄 CDR 서열, 및 서열 번호 22의 VL의 프레임워크 서열에 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성의 프레임워크를 포함한다. 한 양상에서, VL은 서열 번호 22의 VL의 경쇄 CDR 서열, 및 서열 번호 22의 VL의 프레임워크 서열에 적어도 95% 서열 동일성의 프레임워크를 포함한다. 다른 양상에서, VL은 서열 번호 22의 VL의 경쇄 CDR 서열, 및 서열 번호 22의 VL의 프레임워크 서열에 적어도 98% 서열 동일성의 프레임워크를 포함한다.

[0194] *EGFRvIII*

[0195] 바람직한 양상에서, 두 번째 항원은 EGFRvIII, 특히 인간 EGFRvIII (서열 번호 115)이다.

[0196] 한 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인은 서열 번호 85의 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR) 1, 서열 번호 86의 HCDR 2 및 서열 번호 87의 HCDR 3을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH), 및 서열 번호 89의 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR) 1, 서열 번호 90의 LCDR 2 및 서열 번호 91의 LCDR 3을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다.

[0197] 한 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인은 인간화 항체이다 (이것으로부터 유래된다). 한 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인은 인간화 항원 결합 도메인 (다시 말하면, 인간화 항체의 항원 결합 도메인)이다. 한 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 VH 및/또는 VL은 인간화 가변 영역이다.

[0198] 한 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 VH 및/또는 VL은 수용자 인간 프레임워크, 예를 들면 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 공통 프레임워크를 포함한다.

[0199] 한 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 VH는 서열 번호 88의 하나 또는 그 이상의 중쇄 프레임워크 서열 (다시 말하면, FR1, FR2, FR3 및/또는 FR4 서열)을 포함한다. 한 양상에서, VH는 서열 번호 88의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 한 양상에서, VH는 서열 번호 88의 아미노산 서열과 적어도 약 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 한 양상에서, VH는 서열 번호 88의 아미노산 서열과 적어도 약 98% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일정한 양상에서, 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 VH 서열은 참조 서열에 비하여 치환 (예를 들면, 보존성 치환), 삽입 또는 결실을 내포하지만, 상기 서열을 포함하는 항체는 EGFRvIII에 결합하는 능력을

유지한다. 일정한 양상에서, 총 1개 내지 10개의 아미노산이 서열 번호 88의 아미노산 서열에서 치환되고, 삽입되고/되거나 결실되었다. 일정한 양상에서, 치환, 삽입 또는 결실은 CDR 외부의 영역에서 (다시 말하면, FR에서) 일어난다. 한 양상에서, VH는 서열 번호 88의 아미노산 서열을 포함한다. 임의적으로, VH는 서열 번호 88의 번역후 변형을 포함하는, 상기 서열의 아미노산 서열을 포함한다.

[0200] 한 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 VL은 서열 번호 92의 하나 또는 그 이상의 경쇄 프레임워크 서열 (다시 말하면, FR1, FR2, FR3 및/또는 FR4 서열)을 포함한다. 한 양상에서, VL은 서열 번호 92의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 한 양상에서, VL은 서열 번호 92의 아미노산 서열과 적어도 약 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 한 양상에서, VL은 서열 번호 92의 아미노산 서열과 적어도 약 98% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일정한 양상에서, 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 VL 서열은 참조 서열에 비하여 치환 (예를 들면, 보존성 치환), 삽입 또는 결실을 내포하지만, 상기 서열을 포함하는 항체는 EGFRvIII에 결합하는 능력을 유지한다. 일정한 양상에서, 총 1개 내지 10개의 아미노산이 서열 번호 92의 아미노산 서열에서 치환되고, 삽입되고/되거나 결실되었다. 일정한 양상에서, 치환, 삽입 또는 결실은 CDR 외부의 영역에서 (다시 말하면, FR에서) 일어난다. 한 양상에서, VL은 서열 번호 92의 아미노산 서열을 포함한다. 임의적으로, VL은 서열 번호 92의 번역후 변형을 포함하는, 상기 서열의 아미노산 서열을 포함한다.

[0201] 한 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 VH는 서열 번호 88의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 VL은 서열 번호 92의 아미노산 서열과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 한 양상에서, VH는 서열 번호 88의 아미노산 서열을 포함하고, VL은 서열 번호 92의 아미노산 서열을 포함한다.

[0202] 추가의 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인은 서열 번호 88의 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 92의 서열을 포함하는 VL을 포함한다.

[0203] 추가의 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인은 서열 번호 88의 VH 서열 및 서열 번호 92의 VL 서열을 포함한다.

[0204] 다른 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인은 서열 번호 88의 VH의 중쇄 CDR 서열을 포함하는 VH, 및 서열 번호 92의 VL의 경쇄 CDR 서열을 포함하는 VL을 포함한다.

[0205] 추가의 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인은 서열 번호 88의 VH의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 아미노산 서열, 및 서열 번호 92의 VL의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 아미노산 서열을 포함한다.

[0206] 한 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 VH는 서열 번호 88의 VH의 중쇄 CDR 서열, 및 서열 번호 88의 VH의 프레임워크 서열에 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성의 프레임워크를 포함한다. 한 양상에서, VH는 서열 번호 88의 VH의 중쇄 CDR 서열, 및 서열 번호 88의 VH의 프레임워크 서열에 적어도 95% 서열 동일성의 프레임워크를 포함한다. 다른 양상에서, VH는 서열 번호 88의 VH의 중쇄 CDR 서열, 및 서열 번호 88의 VH의 프레임워크 서열에 적어도 98% 서열 동일성의 프레임워크를 포함한다.

[0207] 한 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 VL은 서열 번호 92의 VL의 경쇄 CDR 서열, 및 서열 번호 92의 VL의 프레임워크 서열에 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성의 프레임워크를 포함한다. 한 양상에서, VL은 서열 번호 92의 VL의 경쇄 CDR 서열, 및 서열 번호 92의 VL의 프레임워크 서열에 적어도 95% 서열 동일성의 프레임워크를 포함한다. 다른 양상에서, VL은 서열 번호 92의 VL의 경쇄 CDR 서열, 및 서열 번호 92의 VL의 프레임워크 서열에 적어도 98% 서열 동일성의 프레임워크를 포함한다.

[0208] 대안적 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인은 EGFRvIII와 관련하여 상기 섹션에서 제공된 임의의 양상의 경우에서와 같은 VH 서열, 및 EGFRvIII와 관련하여 상기 섹션에서 제공된 임의의 양상의 경우에서와 같은 VL 서열을 포함하지만, 서열 번호 85 (HCDR1), 86 (HCDR2), 87 (HCDR3), 88 (VH), 89 (LCDR1), 90 (LCDR2), 91 (LCDR3) 및 92 (VL) 대신에 하기 서열 (열의 순서로)에 기초된다:

| HCDR1 | HCDR2 | HCDR3 | VH | LCDR1 | LCDR2 | LCDR3 | VL |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 서열 번호: 37 | 서열 번호: 38 | 서열 번호: 39 | 서열 번호: 40 | 서열 번호: 41 | 서열 번호: 42 | 서열 번호: 43 | 서열 번호: 44 |
| 서열 번호: 45 | 서열 번호: 46 | 서열 번호: 47 | 서열 번호: 48 | 서열 번호: 49 | 서열 번호: 50 | 서열 번호: 51 | 서열 번호: 52 |
| 서열 번호: 53 | 서열 번호: 54 | 서열 번호: 55 | 서열 번호: 56 | 서열 번호: 57 | 서열 번호: 58 | 서열 번호: 59 | 서열 번호: 60 |
| 서열 번호: 61 | 서열 번호: 62 | 서열 번호: 63 | 서열 번호: 64 | 서열 번호: 65 | 서열 번호: 66 | 서열 번호: 67 | 서열 번호: 68 |
| 서열 번호: 69 | 서열 번호: 70 | 서열 번호: 71 | 서열 번호: 72 | 서열 번호: 73 | 서열 번호: 74 | 서열 번호: 75 | 서열 번호: 76 |
| 서열 번호: 77 | 서열 번호: 78 | 서열 번호: 79 | 서열 번호: 80 | 서열 번호: 81 | 서열 번호: 82 | 서열 번호: 83 | 서열 번호: 84 |
| 서열 번호: 93 | 서열 번호: 94 | 서열 번호: 95 | 서열 번호: 96 | 서열 번호: 97 | 서열 번호: 98 | 서열 번호: 99 | 서열 번호: 100 |
| 서열 번호: 101 | 서열 번호: 102 | 서열 번호: 103 | 서열 번호: 104 | 서열 번호: 105 | 서열 번호: 106 | 서열 번호: 107 | 서열 번호: 108 |

[0209]

[0210] 한 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인은 상기 섹션에서 제공된 임의의 양상의 경우에서와 같은 VH 서열, 및 상기 섹션에서 제공된 임의의 양상의 경우에서와 같은 VL 서열을 포함한다.

[0211] *항-TYRP-1 및 항-EGFRvIII 항체*

[0212] 본원 발명은 또한, TYRP-1과 관련하여 상기 섹션에서 제공된 임의의 양상의 경우에서와 같은 VH 서열, 및 TYRP-1과 관련하여 상기 섹션에서 제공된 임의의 양상의 경우에서와 같은 VL 서열을 포함하는, TYRP-1에 결합하는 항체 (예를 들면, 서열 번호 15의 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR) 1, 서열 번호 16의 HCDR 2 및 서열 번호 17의 HCDR 3을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH), 및 서열 번호 19의 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR) 1, 서열 번호 20의 LCDR 2 및 서열 번호 21의 LCDR 3을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하는, TYRP-1에 결합하는 항체; 또는 서열 번호 18의 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 22의 서열을 포함하는 VL을 포함하는, TYRP-1에 결합하는 항체)를 제공한다.

[0213] 본원 발명은 또한, EGFRvIII과 관련하여 상기 섹션에서 제공된 임의의 양상의 경우에서와 같은 VH 서열, 및 EGFRvIII과 관련하여 상기 섹션에서 제공된 임의의 양상의 경우에서와 같은 VL 서열을 포함하는, EGFRvIII에 결합하는 항체 (예를 들면, 서열 번호 85의 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR) 1, 서열 번호 86의 HCDR 2 및 서열 번호 87의 HCDR 3을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH), 및 서열 번호 89의 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR) 1, 서열 번호 90의 LCDR 2 및 서열 번호 91의 LCDR 3을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하는, EGFRvIII에 결합하는 항체; 또는 서열 번호 88의 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 92의 서열을 포함하는 VL을 포함하는, TYRP-1에 결합하는 항체)를 제공한다.

[0214] 추가의 양상에서, 임의의 상기 양상에 따른 TYRP-1 또는 EGFRvIII에 결합하는 항체는 CD3에 결합하는 항체와 관련하여 설명된 바와 같은 임의의 특질을 단독적으로 또는 조합으로 통합할 수 있다 (만약 항-CD3 항체, 예컨대 결합 서열에 대해 명백히 특이적이지 않으면).

[0215] **c) 전하 변형**

[0216] 본원 발명의 (다중특이적) 항체는 그 안에 포함된 Fab 분자 내에 아미노산 치환을 포함할 수 있는데, 이들 치환은 그들의 결합 팔 중 하나 (또는 2개 이상의 항원 결합 Fab 분자를 포함하는 분자의 경우에는, 그 이상)에서 VH/VL 교환을 갖는 Fab-기초된 다중특이적 항체의 생산에서 일어날 수 있는, 경쇄의 비-정합 중쇄와의 오대합 (Bence-Jones-유형 부산물)을 감소시키는 데 특히 효율적이다 (또한, 본원에서 전체적으로 참조로서 편입되는 PCT 공개 번호 WO 2015/150447, 특히 그 안에 실시예를 참조한다). 결합 팔 중 하나에서 VH/VL 도메인 교환을 갖는 다중특이적 항체에서 발생하는 바람직하지 않은 부산물, 특히 Bence Jones-유형 부산물과 비교하여 원하는 (다중특이적) 항체의 비율은 CH1과 CL 도메인 내에 특이적 아미노산 위치에서 반대 전하를 갖는 하전된 아미노산의 도입 (때때로 본원에서 "전하 변형"으로서 지칭됨)에 의해 향상될 수 있다.

[0217] 따라서, (다중특이적) 항체의 첫 번째와 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인이 둘 모두 Fab 분자이고, 이들 항원 결합 도메인 중 하나 (특히 첫 번째 항원 결합 도메인)에서 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL과 VH이 서로에 의해 대체되는 일부 양상에서,

[0218] i) 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL 내에 위치 124에서 아미노산이 양으로 하전된 아미노산 (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 치환되고, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1 내에 위치 147에서 아미노산 또는 위치 213에서 아미노산이 음으로 하전된 아미노산 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 치환되거나;

[0219] ii) 첫 번째 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL 내에 위치 124에서 아미노산이 양으로 하전된 아미노산 (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 치환되고, 첫 번째 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1 내에 위치 147에서 아미노산 또는 위치 213에서 아미노산이 음으로 하전된 아미노산 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 치환된다.

[0220] (다중특이적) 항체는 i) 및 ii) 하에 언급된 변형 둘 모두를 포함하지는 않는다. VH/VL 교환을 갖는 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL과 CH1은 서로에 의해 대체되지 않는다 (다시 말하면, 교환되지 않은 상태로 남아있다).

[0221] 더욱 특정한 양상에서,

[0222] i) 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL 내에 위치 124에서 아미노산이 리신 (K), 아르기닌 (R) 또는 히스티딘 (H) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 독립적으로 치환되고, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1 내에 위치 147에서 아미노산 또는 위치 213에서 아미노산이 글루타민산 (E) 또는 아스파르트산 (D) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 독립적으로 치환되거나;

[0223] ii) 첫 번째 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL 내에 위치 124에서 아미노산이 리신 (K), 아르기닌 (R) 또는 히스티딘 (H) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 독립적으로 치환되고, 첫 번째 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1 내에 위치 147에서 아미노산 또는 위치 213에서 아미노산이 글루타민산 (E) 또는 아스파르트산 (D) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 독립적으로 치환된다.

[0224] 이와 같은 한 가지 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL 내에 위치 124에서 아미노산이 리신 (K), 아르기닌 (R) 또는 히스티딘 (H) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 독립적으로 치환되고, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1 내에 위치 147에서 아미노산 또는 위치 213에서 아미노산이 글루타민산 (E) 또는 아스파르트산 (D) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 독립적으로 치환된다.

[0225] 추가의 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL 내에 위치 124에서 아미노산이 리신 (K), 아르기닌 (R) 또는 히스티딘 (H) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 독립적으로 치환되고, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1 내에 위치 147에서 아미노산이 글루타민산 (E) 또는 아스파르트산 (D) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 독립적으로 치환된다.

[0226] 바람직한 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL 내에 위치 124에서 아미노산이 리신 (K), 아르기닌 (R) 또는 히스티딘 (H) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 독립적으로 치환되고, 위치 123에서 아미노산이 리신 (K), 아르기닌 (R) 또는 히스티딘 (H) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 독립적으로 치환되고, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1 내에 위치 147에서 아미노산이 글루타민산 (E) 또는 아스파르트산 (D) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 독립적으로 치환되고, 위치 213에서 아미노산이 글루타민산 (E) 또는 아스파르트산 (D) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 독립적으로 치환된다.

[0227] 더욱 바람직한 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL 내에 위치 124에서 아미노산이 리신 (K) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 치환되고, 위치 123에서 아미노산이 리신 (K) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 치환되고, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1 내에 위치 147에서 아미노산이 글루타민산 (E) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 치환되고, 위치 213에서 아미노산이 글루타민산 (E) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 치환된다.

[0228] 훨씬 바람직한 양상에서, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL 내에 위치 124에서 아미노산이 리신 (K) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 치환되고, 위치 123에서 아미노산이 아르기닌

(R) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 치환되고, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1 내에 위치 147에서 아미노산이 글루타민산 (E) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 치환되고, 위치 213에서 아미노산이 글루타민산 (E) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 치환된다.

[0229] 바람직한 양상에서, 만약 상기 양상에 따른 아미노산 치환이 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL 및 불변 도메인 CH1에서 만들어지면, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL은 카파 아이소타입이다.

[0230] 대안으로, 상기 양상에 따른 아미노산 치환은 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL 및 불변 도메인 CH1 대신에 첫 번째 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL 및 불변 도메인 CH1에서 만들어질 수 있다. 바람직한 이런 양상에서, 첫 번째 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL은 카파 아이소타입이다.

[0231] 따라서, 한 양상에서, 첫 번째 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL 내에 위치 124에서 아미노산이 리신 (K), 아르기닌 (R) 또는 히스티딘 (H) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 독립적으로 치환되고, 첫 번째 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1 내에 위치 147에서 아미노산 또는 위치 213에서 아미노산이 글루타민산 (E) 또는 아스파르트산 (D) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 독립적으로 치환된다.

[0232] 추가의 양상에서, 첫 번째 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL 내에 위치 124에서 아미노산이 리신 (K), 아르기닌 (R) 또는 히스티딘 (H) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 독립적으로 치환되고, 첫 번째 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1 내에 위치 147에서 아미노산이 글루타민산 (E) 또는 아스파르트산 (D) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 독립적으로 치환된다.

[0233] 또 다른 양상에서, 첫 번째 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL 내에 위치 124에서 아미노산이 리신 (K), 아르기닌 (R) 또는 히스티딘 (H) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 독립적으로 치환되고, 위치 123에서 아미노산이 리신 (K), 아르기닌 (R) 또는 히스티딘 (H) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 독립적으로 치환되고, 첫 번째 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1 내에 위치 147에서 아미노산이 글루타민산 (E) 또는 아스파르트산 (D) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 독립적으로 치환되고, 위치 213에서 아미노산이 글루타민산 (E) 또는 아스파르트산 (D) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 독립적으로 치환된다.

[0234] 한 양상에서, 첫 번째 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL 내에 위치 124에서 아미노산이 리신 (K) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 치환되고, 위치 123에서 아미노산이 리신 (K) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 치환되고, 첫 번째 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1 내에 위치 147에서 아미노산이 글루타민산 (E) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 치환되고, 위치 213에서 아미노산이 글루타민산 (E) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 치환된다.

[0235] 다른 양상에서, 첫 번째 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL 내에 위치 124에서 아미노산이 리신 (K) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 치환되고, 위치 123에서 아미노산이 아르기닌 (R) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 치환되고, 첫 번째 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1 내에 위치 147에서 아미노산이 글루타민산 (E) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 치환되고, 위치 213에서 아미노산이 글루타민산 (E) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 치환된다.

[0236] 바람직한 양상에서, 본원 발명의 (다중특이적) 항체는 하기를 포함한다:

[0237] (a) CD3에 결합하는 첫 번째 항원 결합 도메인, 여기서 첫 번째 항원 결합 도메인은 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL과 VH가 서로에 의해 대체되는 Fab 분자이고, 서열 번호 2의 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR) 1, 서열 번호 3의 HCDR 2 및 서열 번호 5의 HCDR 3을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH), 및 서열 번호 8의 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR) 1, 서열 번호 9의 LCDR 2 및 서열 번호 10의 LCDR 3을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하며,

[0238] (b) 두 번째 항원에 결합하는 두 번째 및 임의적으로 세 번째 항원 결합 도메인;

[0239] 여기서 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL 내에 위치 124에서 아미노산이 리신 (K), 아르기닌 (R) 또는 히스티딘 (H) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 독립적으로 (바람직한 양상에서 리신 (K) 또는 아르기닌 (R)에 의해 독립적으로) 치환되고, 위치 123에서 아미노산이 리신 (K), 아르기닌 (R) 또는 히스티딘 (H) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 독립적으로 (바람직한 양상에서 리신 (K) 또는 아르기닌 (R)에 의해 독립적으로) 치환되고, 두 번째 (및 존재하는 경우에, 세 번째) 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1 내에 위치 147에서 아미노산이 글루타민산 (E) 또는 아스파르트산 (D) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해

독립적으로 치환되고, 위치 213에서 아미노산이 글루타민산 (E) 또는 아스파르트산 (D) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 독립적으로 치환된다.

[0240] **d) 다중특이적 항체 형식**

[0241] 본원 발명에 따른 (다중특이적) 항체는 다양한 형상을 가질 수 있다. 예시적인 형상은 **도 1**에서 묘사된다.

[0242] 바람직한 양상에서, (다중특이적) 항체 내에 포함된 항원 결합 도메인은 Fab 분자이다. 이런 양상에서, 첫 번째, 두 번째, 세 번째 등의 항원 결합 도메인은 각각, 본원에서 첫 번째, 두 번째, 세 번째 등의 Fab 분자로서 지칭될 수 있다.

[0243] 한 양상에서, (다중특이적) 항체의 첫 번째와 두 번째 항원 결합 도메인은 임의적으로 펩티드 링커를 통해, 서로에 융합된다. 바람직한 양상에서, 첫 번째와 두 번째 항원 결합 도메인은 각각 Fab 분자이다. 이와 같은 한 가지 양상에서, 첫 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 두 번째 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합된다. 다른 이런 양상에서, 두 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 첫 번째 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합된다. (i) 첫 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 두 번째 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합되거나, (ii) 두 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 첫 번째 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합되는 양상에서, 추가적으로 첫 번째 항원 결합 도메인의 Fab 경쇄 및 두 번째 항원 결합 도메인의 Fab 경쇄가 임의적으로 펩티드 링커를 통해, 서로에 융합될 수 있다.

[0244] 두 번째 항원, 예를 들면 표적 세포 항원 예컨대 TYRP-1 또는 EGFRvIII에 특이적으로 결합할 수 있는 단일 항원 결합 도메인 (예컨대 Fab 분자)을 갖는 (다중특이적) 항체 (예를 들면 **도 1A, D, G, H, K, L**에서 도시된 바와 같은)는 높은 친화성 항원 결합 도메인의 결합 이후에 두 번째 항원의 내재화가 예상되는 경우에 특히 유용하다. 이런 사례에서, 두 번째 항원에 대해 특이적인 하나 이상의 항원 결합 도메인의 존재는 두 번째 항원의 내재화를 증강하여, 이의 이용가능성을 감소시킬 수 있다.

[0245] 다른 사례에서, 하지만, 예를 들면 표적 부위로의 표적화를 최적화하거나 또는 표적 세포 항원의 교차연결을 허용하기 위해 두 번째 항원, 예를 들면 표적 세포 항원에 대해 특이적인 2개 또는 그 이상의 항원 결합 도메인 (예컨대 Fab 분자)을 포함하는 (다중특이적) 항체 (**도 1B, 1C, 1E, 1F, 1I, 1J, 1M** 또는 **1N**에서 도시된 실례를 참조한다)를 갖는 것이 유리할 것이다.

[0246] 따라서, 바람직한 양상에서, 본원 발명에 따른 (다중특이적) 항체는 세 번째 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0247] 한 양상에서, 세 번째 항원 결합 도메인은 두 번째 항원, 예를 들면 표적 세포 항원 예컨대 TYRP-1 또는 EGFRvIII에 결합한다. 한 양상에서, 세 번째 항원 결합 도메인은 Fab 분자이다.

[0248] 한 양상에서, 세 번째 항원 도메인은 두 번째 항원 결합 도메인과 동일하다.

[0249] 일부 양상에서, 세 번째와 두 번째 항원 결합 도메인은 각각 Fab 분자이고, 세 번째 항원 결합 도메인은 두 번째 항원 결합 도메인과 동일하다. 따라서, 이들 양상에서, 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인은 동일한 중쇄와 경쇄 아미노산 서열을 포함하고, 도메인의 동일한 배열 (다시 말하면, 전통적인 또는 교차)을 갖는다. 게다가, 이들 양상에서, 세 번째 항원 결합 도메인은 두 번째 항원 결합 도메인과 동일한 아미노산 치환 (만약 있으면)을 포함한다. 예를 들면, 본원에서 "전하 변형"으로서 설명된 아미노산 치환이 두 번째 항원 결합 도메인 및 세 번째 항원 결합 도메인 각각의 불변 도메인 CL 및 불변 도메인 CH1에서 만들어질 것이다. 대안으로, 상기 아미노산 치환이 첫 번째 항원 결합 도메인 (이것 또한 바람직한 양상에서 Fab 분자이다)의 불변 도메인 CL 및 불변 도메인 CH1에서 만들어질 수 있지만, 두 번째 항원 결합 도메인 및 세 번째 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL 및 불변 도메인 CH1에서는 그렇지 않다.

[0250] 두 번째 항원 결합 도메인과 유사하게, 세 번째 항원 결합 도메인은 바람직하게는 전통적인 Fab 분자이다. 하지만, 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인이 교차 Fab 분자인 (그리고 첫 번째 항원 결합 도메인이 전통적인 Fab 분자인) 양상 또한 예기된다. 따라서, 바람직한 양상에서, 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인은 각각 전통적인 Fab 분자이고, 첫 번째 항원 결합 도메인은 본원에서 설명된 바와 같은 교차 Fab 분자, 다시 말하면, Fab 중쇄와 경쇄의 가변 도메인 VH와 VL 또는 불변 도메인 CL과 CH1이 서로에 의해 교환/대체되는 Fab 분자이다. 다른 양상에서, 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인은 각각 교차 Fab 분자이고, 첫 번째 항원 결합 도메인은 전통적인 Fab 분자이다.

[0251] 만약 세 번째 항원 결합 도메인이 존재하면, 바람직한 양상에서 첫 번째 항원 도메인은 CD3에 결합하고, 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인은 두 번째 항원, 특히 표적 세포 항원, 예컨대 TYRP-1 또는 EGFRvIII에 결합한

다.

[0252] 바람직한 양상에서, 본원 발명의 (다중특이적) 항체는 첫 번째와 두 번째 아단위로 구성되는 Fc 도메인을 포함한다. Fc 도메인의 첫 번째와 두 번째 아단위는 안정되게 연관될 수 있다.

[0253] 본원 발명에 따른 (다중특이적) 항체는 상이한 형상을 가질 수 있다, 다시 말하면, 첫 번째, 두 번째 (및 임의적으로 세 번째) 항원 결합 도메인은 상이한 방식으로 서로에 및 Fc 도메인에 융합될 수 있다. 이들 구성요소는 직접적으로, 또는 바람직하게는, 하나 또는 그 이상의 적합한 펩티드 링커를 통해 서로에 융합될 수 있다. Fab 분자가 Fc 도메인의 아단위의 N 말단에 융합되는 경우에, 이것은 전형적으로 면역글로불린 힌지 영역을 통해서이다.

[0254] 일부 양상에서, 첫 번째와 두 번째 항원 결합 도메인은 각각 Fab 분자이고, 첫 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 첫 번째 또는 두 번째 아단위의 N 말단에 융합된다. 이런 양상에서, 두 번째 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C 말단에서 첫 번째 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단에 또는 Fc 도메인의 아단위 중에서 다른 하나의 N 말단에 융합될 수 있다. 바람직한 이런 양상에서, 두 번째 항원 결합 도메인은 전통적인 Fab 분자이고, 첫 번째 항원 결합 도메인은 본원에서 설명된 바와 같은 교차 Fab 분자, 다시 말하면, Fab 중쇄와 경쇄의 가변 도메인 VH와 VL 또는 불변 도메인 CL과 CH1이 서로에 의해 교환/대체되는 Fab 분자이다. 다른 이런 양상에서, 두 번째 항원 결합 도메인은 교차 Fab 분자이고, 첫 번째 항원 결합 도메인은 전통적인 Fab 분자이다.

[0255] 한 양상에서, 첫 번째와 두 번째 항원 결합 도메인은 각각 Fab 분자이고, 첫 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 첫 번째 또는 두 번째 아단위의 N 말단에 융합되고, 두 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 첫 번째 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합된다. 특정한 양상에서, (다중특이적) 항체는 첫 번째와 두 번째 Fab 분자, 첫 번째와 두 번째 아단위로 구성되는 Fc 도메인, 및 임의적으로 하나 또는 그 이상의 펩티드 링커로 본질적으로 구성되고, 여기서 두 번째 Fab 분자가 Fab 중쇄의 C 말단에서 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합되고, 첫 번째 Fab 분자가 Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 첫 번째 또는 두 번째 아단위의 N 말단에 융합된다. 이런 형상은 **도 1G** 및 **1K** (이들 실례에서 첫 번째 항원 결합 도메인은 VH/VL 교차 Fab 분자이다)에서 개략적으로 묘사된다. 임의적으로, 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 및 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄가 추가적으로 서로에 융합될 수 있다.

[0256] 다른 양상에서, 첫 번째와 두 번째 항원 결합 도메인은 각각 Fab 분자이고, 첫 번째와 두 번째 항원 결합 도메인은 각각, Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 아단위 중에서 하나의 N 말단에 융합된다. 특정한 양상에서, (다중특이적) 항체는 첫 번째와 두 번째 Fab 분자, 첫 번째와 두 번째 아단위로 구성되는 Fc 도메인, 및 임의적으로 하나 또는 그 이상의 펩티드 링커로 본질적으로 구성되고, 여기서 첫 번째와 두 번째 Fab 분자는 각각, Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 아단위 중에서 하나의 N 말단에 융합된다. 이런 형상은 도 **1A** 및 **1D** (이들 실례에서 첫 번째 항원 결합 도메인은 VH/VL 교차 Fab 분자이고, 두 번째 항원 결합 도메인은 전통적인 Fab 분자이다)에서 개략적으로 묘사된다. 첫 번째와 두 번째 Fab 분자는 직접적으로 또는 펩티드 링커를 통해 Fc 도메인에 융합될 수 있다. 바람직한 양상에서 첫 번째와 두 번째 Fab 분자는 각각, 면역글로불린 힌지 영역을 통해 Fc 도메인에 융합된다. 특정한 양상에서, 면역글로불린 힌지 영역은 인간 $IgG_1$ 힌지 영역이고, 특히 여기서 Fc 도메인은 $IgG_1$ Fc 도메인이다.

[0257] 일부 양상에서, 첫 번째와 두 번째 항원 결합 도메인은 각각 Fab 분자이고, 두 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 첫 번째 또는 두 번째 아단위의 N 말단에 융합된다. 이런 양상에서, 첫 번째 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C 말단에서 첫 번째 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단에 또는 (전술된 바와 같이) Fc 도메인의 아단위 중에서 다른 하나의 N 말단에 융합될 수 있다. 바람직한 이런 양상에서, 상기 두 번째 항원 결합 도메인은 전통적인 Fab 분자이고, 첫 번째 항원 결합 도메인은 본원에서 설명된 바와 같은 교차 Fab 분자, 다시 말하면, Fab 중쇄와 경쇄의 가변 도메인 VH와 VL 또는 불변 도메인 CL과 CH1이 서로에 의해 교환/대체되는 Fab 분자이다. 다른 이런 양상에서, 상기 두 번째 항원 결합 도메인은 교차 Fab 분자이고, 첫 번째 항원 결합 도메인은 전통적인 Fab 분자이다.

[0258] 한 양상에서, 첫 번째와 두 번째 항원 결합 도메인은 각각 Fab 분자이고, 두 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 첫 번째 또는 두 번째 아단위의 N 말단에 융합되고, 첫 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 두 번째 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합된다. 특정한 양상에서, (다중특이적) 항체는 첫 번째와 두 번째 Fab 분자, 첫 번째와 두 번째 아단위로 구성되는 Fc 도메인, 및 임의적으로 하

나 또는 그 이상의 펩티드 링커로 본질적으로 구성되고, 여기서 첫 번째 Fab 분자가 Fab 중쇄의 C 말단에서 두 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합되고, 두 번째 Fab 분자가 Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 첫 번째 또는 두 번째 아단위의 N 말단에 융합된다. 이런 형상은 **도 1H** 및 **1L** (이들 실례에서 첫 번째 항원 결합 도메인은 VH/VL 교차 Fab 분자이고, 두 번째 항원 결합 도메인은 전통적인 Fab 분자이다)에서 개략적으로 묘사된다. 임의적으로, 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 및 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄가 추가적으로 서로에 융합될 수 있다.

[0259] 일부 양상에서, 세 번째 항원 결합 도메인, 특히 세 번째 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 첫 번째 또는 두 번째 아단위의 N 말단에 융합된다. 바람직한 이런 양상에서, 상기 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인은 각각 전통적인 Fab 분자이고, 첫 번째 항원 결합 도메인은 본원에서 설명된 바와 같은 교차 Fab 분자, 다시 말하면, Fab 중쇄와 경쇄의 가변 도메인 VH와 VL 또는 불변 도메인 CL과 CH1이 서로에 의해 교환/대체되는 Fab 분자이다. 다른 이런 양상에서, 상기 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인은 각각 교차 Fab 분자이고, 첫 번째 항원 결합 도메인은 전통적인 Fab 분자이다.

[0260] 바람직한 이런 양상에서, 첫 번째와 세 번째 항원 결합 도메인이 각각, Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 아단위 중에서 하나의 N 말단에 융합되고, 두 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합된다. 특정한 양상에서, (다중특이적) 항체는 첫 번째, 두 번째와 세 번째 Fab 분자, 첫 번째와 두 번째 아단위로 구성되는 Fc 도메인, 및 임의적으로 하나 또는 그 이상의 펩티드 링커로 본질적으로 구성되고, 여기서 두 번째 Fab 분자가 Fab 중쇄의 C 말단에서 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합되고, 첫 번째 Fab 분자가 Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 첫 번째 아단위의 N 말단에 융합되고, 세 번째 Fab 분자가 Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 두 번째 아단위의 N 말단에 융합된다. 이런 형상은 **도 1B** 및 **1E** (이들 실례에서 첫 번째 항원 결합 도메인은 VH/VL 교차 Fab 분자이고, 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인은 전통적인 Fab 분자이다)에서, 및 **도 1J** 및 **1N** (이들 실례에서 첫 번째 항원 결합 도메인은 전통적인 Fab 분자이고, 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인은 VH/VL 교차 Fab 분자이다)에서 개략적으로 묘사된다. 첫 번째와 세 번째 Fab 분자는 직접적으로 또는 펩티드 링커를 통해 Fc 도메인에 융합될 수 있다. 바람직한 양상에서, 첫 번째와 세 번째 Fab 분자는 각각, 면역글로불린 힌지 영역을 통해 Fc 도메인에 융합된다. 특정한 양상에서, 면역글로불린 힌지 영역은 인간 $IgG_1$ 힌지 영역이고, 특히 여기서 Fc 도메인은 $IgG_1$ Fc 도메인이다. 임의적으로, 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 및 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄가 추가적으로 서로에 융합될 수 있다.

[0261] 다른 이런 양상에서, 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인이 각각, Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 아단위 중에서 하나의 N 말단에 융합되고, 첫 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 두 번째 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합된다. 특정한 양상에서, (다중특이적) 항체는 첫 번째, 두 번째와 세 번째 Fab 분자, 첫 번째와 두 번째 아단위로 구성되는 Fc 도메인, 및 임의적으로 하나 또는 그 이상의 펩티드 링커로 본질적으로 구성되고, 여기서 첫 번째 Fab 분자가 Fab 중쇄의 C 말단에서 두 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합되고, 두 번째 Fab 분자가 Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 첫 번째 아단위의 N 말단에 융합되고, 세 번째 Fab 분자가 Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 두 번째 아단위의 N 말단에 융합된다. 이런 형상은 **도 1C** 및 **1F** (이들 실례에서 첫 번째 항원 결합 도메인은 VH/VL 교차 Fab 분자이고, 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인은 전통적인 Fab 분자이다)에서 및 **도 1I** 및 **1M** (이들 실례에서 첫 번째 항원 결합 도메인은 전통적인 Fab 분자이고, 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인은 VH/VL 교차 Fab 분자이다)에서 개략적으로 묘사된다. 두 번째와 세 번째 Fab 분자는 직접적으로 또는 펩티드 링커를 통해 Fc 도메인에 융합될 수 있다. 바람직한 양상에서 두 번째와 세 번째 Fab 분자는 각각, 면역글로불린 힌지 영역을 통해 Fc 도메인에 융합된다. 특정한 양상에서, 면역글로불린 힌지 영역은 인간 $IgG_1$ 힌지 영역이고, 특히 여기서 Fc 도메인은 $IgG_1$ Fc 도메인이다. 임의적으로, 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 및 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄가 추가적으로 서로에 융합될 수 있다.

[0262] Fab 분자가 Fab 중쇄의 C 말단에서 면역글로불린 힌지 영역을 통해 Fc 도메인의 각각의 아단위의 N 말단에 융합되는 (다중특이적) 항체의 형상에서, 2개의 Fab 분자, 힌지 영역 및 Fc 도메인은 본질적으로 면역글로불린 분자를 형성한다. 바람직한 양상에서 면역글로불린 분자는 IgG 부류 면역글로불린이다. 훨씬 바람직한 양상에서 면역글로불린은 $IgG_1$ 하위부류 면역글로불린이다. 다른 양상에서 면역글로불린은 $IgG_4$ 하위부류 면역글로불린이다.

추가의 바람직한 양상에서 면역글로불린은 인간 면역글로불린이다. 다른 양상에서 면역글로불린은 키메라 면역글로불린 또는 인간화 면역글로불린이다. 한 양상에서, 면역글로불린은 인간 불변 영역, 특히 인간 Fc 영역을 포함한다.

[0263] 본원 발명의 (다중특이적) 항체 중 일부에서, 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 및 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄가

임의적으로 펩티드 링커를 통해 서로에 융합된다. 첫 번째와 두 번째 Fab 분자의 형상에 따라서, 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄가 자신의 C 말단에서 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄의 N 말단에 융합될 수 있거나, 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄가 자신의 C 말단에서 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄의 N 말단에 융합될 수 있다. 첫 번째와 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄의 융합은 정합되지 않은 Fab 중쇄와 경쇄의 오대합을 더욱 감소시키고, 또한, 본원 발명의 (다중특이적) 항체 중에서 일부의 발현을 위해 필요한 플라스미드의 숫자를 감소시킨다.

[0264] 항원 결합 도메인은 직접적으로, 또는 하나 또는 그 이상의 아미노산, 전형적으로 약 2-20개의 아미노산을 포함하는 펩티드 링커를 통해 Fc 도메인에 또는 서로에 융합될 수 있다. 펩티드 링커는 당해 분야에서 공지되고 본원에서 설명된다. 적합한, 비면역원성 펩티드 링커는 예를 들면, $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$, $(G_4S)_n$ 또는 $G_4(SG_4)_n$ 펩티드 링커를 포함한다. "n"은 일반적으로 1 내지 10, 전형적으로 2 내지 4의 정수이다. 한 양상에서 상기 펩티드 링커는 적어도 5개 아미노산의 길이, 한 양상에서 5 내지 100개, 추가의 양상에서 10 내지 50개 아미노산의 길이를 갖는다. 한 양상에서 상기 펩티드 링커는 $(GxS)_n$ 또는 $(GxS)_nG_m$이며, G=글리신, S=세린, 및 (x=3, n= 3, 4, 5 또는 6 및 m=0, 1, 2 또는 3) 또는 (x=4, n=2, 3, 4 또는 5 및 m= 0, 1, 2 또는 3), 한 양상에서 x=4 및 n=2 또는 3, 추가의 양상에서 x=4 및 n=2이다. 한 양상에서 상기 펩티드 링커는 $(G_4S)_2$이다. 첫 번째와 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄를 서로에 융합하기 위한 특히 적합한 펩티드 링커는 $(G_4S)_2$이다. 첫 번째와 두 번째 Fab 단편의 Fab 중쇄를 연결하는 데 적합한 예시적인 펩티드 링커는 서열 (D)-$(G_4S)_2$ (서열 번호 118 및 119)를 포함한다. 다른 적합한 이런 링커는 서열 $(G_4S)_4$를 포함한다. 추가적으로, 링커는 면역글로불린 힌지 영역 (이의 부분)을 포함할 수 있다. 특히 Fab 분자가 Fc 도메인 아단위의 N 말단에 융합되는 경우에, 이것은 추가 펩티드 링커와 함께 또는 이것 없이, 면역글로불린 힌지 영역 또는 이의 부분을 통해 융합될 수 있다.

[0265] 일정한 양상에서 본원 발명에 따른 (다중특이적) 항체는 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역이 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고 (다시 말하면, 첫 번째 Fab 분자가 중쇄 가변 영역이 경쇄 가변 영역에 의해 대체되는 교차 Fab 중쇄를 포함하고), 차례로 Fc 도메인 아단위와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드 ($VL_{(1)}$-$CH1_{(1)}$-CH2-CH3(-CH4)), 및 두 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄가 Fc 도메인 아단위와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드 ($VH_{(2)}$-$CH1_{(2)}$-CH2-CH3(-CH4))를 포함한다. 일부 양상에서 (다중특이적) 항체는 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역이 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역 ($VH_{(1)}$-$CL_{(1)}$) 및 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드 ($VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$)와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드를 더욱 포함한다. 일정한 양상에서 폴리펩티드는 예를 들면, 이황화 결합에 의해 공유 연결된다.

[0266] 일정한 양상에서 본원 발명에 따른 (다중특이적) 항체는 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역이 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고 (다시 말하면, 첫 번째 Fab 분자가 중쇄 불변 영역이 경쇄 불변 영역에 의해 대체되는 교차 Fab 중쇄를 포함하고), 차례로 Fc 도메인 아단위와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드 ($VH_{(1)}$-$CL_{(1)}$-CH2-CH3(-CH4)), 및 두 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄가 Fc 도메인 아단위와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드 ($VH_{(2)}$-$CH1_{(2)}$-CH2-CH3(-CH4))를 포함한다. 일부 양상에서 (다중특이적) 항체는 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역이 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역 ($VL_{(1)}$-$CH1_{(1)}$) 및 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드 ($VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$)와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드를 더욱 포함한다. 일정한 양상에서 폴리펩티드는 예를 들면, 이황화 결합에 의해 공유 연결된다.

[0267] 일부 양상에서, (다중특이적) 항체는 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역이 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고 (다시 말하면, 첫 번째 Fab 분자가 중쇄 가변 영역이 경쇄 가변 영역에 의해 대체되는 교차 Fab 중쇄를 포함하고), 차례로 두 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고, 차례로 Fc 도메인 아단위와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드 ($VL_{(1)}$-$CH1_{(1)}$-$VH_{(2)}$-$CH1_{(2)}$-CH2-CH3(-CH4))를 포함한다. 다른 양상에서, (다중특이적) 항체는 두 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄가 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고, 차례로 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고 (다시 말하면, 첫 번째 Fab 분자가 중쇄 가변 영역이 경쇄 가변 영역에 의해 대체되는 교차 Fab 중쇄를 포함하고), 차례로 Fc 도메인 아단위와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드 ($VH_{(2)}$-$CH1_{(2)}$-$VL_{(1)}$-$CH1_{(1)}$-CH2-CH3(-CH4))를 포함한다. 이들 양상 중 일

부에서 (다중특이적) 항체는 첫 번째 Fab 분자의 교차 Fab 경쇄 폴리펩티드를 더욱 포함하는데, 여기서 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역이 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역 ($VH_{(1)}$-$CL_{(1)}$) 및 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드 ($VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$)와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유한다. 이들 양상 중 다른 것들에서 (다중특이적) 항체는 적합하면, 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역이 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고, 차례로 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드 ($VH_{(1)}$-$CL_{(1)}$-$VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$), 또는 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드가 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고, 차례로 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드 ($VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$-$VH_{(1)}$-$CL_{(1)}$)를 더욱 포함한다. 이들 양상에 따른 (다중특이적) 항체는 (i) Fc 도메인 아단위 폴리펩티드 (CH2-CH3(-CH4)), 또는 (ii) 세 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄가 Fc 도메인 아단위 ($VH_{(3)}$-$CH1_{(3)}$-CH2-CH3(-CH4)) 및 세 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드 ($VL_{(3)}$-$CL_{(3)}$)와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드를 더욱 포함할 수 있다. 일정한 양상에서 폴리펩티드는 예를 들면, 이황화 결합에 의해 공유 연결된다.

[0268] 일부 양상에서, (다중특이적) 항체는 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역이 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고 (다시 말하면, 첫 번째 Fab 분자가 중쇄 불변 영역이 경쇄 불변 영역에 의해 대체되는 교차 Fab 중쇄를 포함하고), 차례로 두 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고, 차례로 Fc 도메인 아단위와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드 ($VH_{(1)}$-$CL_{(1)}$-$VH_{(2)}$-$CH1_{(2)}$-CH2-CH3(-CH4))를 포함한다. 다른 양상에서, (다중특이적) 항체는 두 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄가 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고, 차례로 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고 (다시 말하면, 첫 번째 Fab 분자가 중쇄 불변 영역이 경쇄 불변 영역에 의해 대체되는 교차 Fab 중쇄를 포함하고), 차례로 Fc 도메인 아단위와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드 ($VH_{(2)}$-$CH1_{(2)}$-$VH_{(1)}$-$CL_{(1)}$-CH2-CH3(-CH4))를 포함한다. 이들 양상 중 일부에서 (다중특이적) 항체는 첫 번째 Fab 분자의 교차 Fab 경쇄 폴리펩티드를 더욱 포함하는데, 여기서 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역이 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역 ($VL_{(1)}$-$CH1_{(1)}$) 및 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드 ($VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$)와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유한다. 이들 양상 중 다른 것들에서 (다중특이적) 항체는 적절하면, 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역이 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고, 차례로 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드 ($VL_{(1)}$-$CH1_{(1)}$-$VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$), 또는 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드가 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고, 차례로 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드 ($VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$-$VH_{(1)}$-$CL_{(1)}$)를 더욱 포함한다. 이들 양상에 따른 (다중특이적) 항체는 (i) Fc 도메인 아단위 폴리펩티드 (CH2-CH3(-CH4)), 또는 (ii) 세 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄가 Fc 도메인 아단위 ($VH_{(3)}$-$CH1_{(3)}$-CH2-CH3(-CH4)) 및 세 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드 ($VL_{(3)}$-$CL_{(3)}$)와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드를 더욱 포함할 수 있다. 일정한 양상에서 폴리펩티드는 예를 들면, 이황화 결합에 의해 공유 연결된다.

[0269] 일정한 양상에서, (다중특이적) 항체는 Fc 도메인을 포함하지 않는다. 바람직한 이런 양상에서, 상기 두 번째 및 존재하면, 세 번째 항원 결합 도메인은 각각 전통적인 Fab 분자이고, 첫 번째 항원 결합 도메인은 본원에서 설명된 바와 같은 교차 Fab 분자, 다시 말하면, Fab 중쇄와 경쇄의 가변 도메인 VH와 VL 또는 불변 도메인 CL과 CH1이 서로에 의해 교환/대체되는 Fab 분자이다. 다른 이런 양상에서, 상기 두 번째 및 존재하면, 세 번째 항원 결합 도메인은 각각 교차 Fab 분자이고, 첫 번째 항원 결합 도메인은 전통적인 Fab 분자이다.

[0270] 이와 같은 한 가지 양상에서, (다중특이적) 항체는 첫 번째와 두 번째 항원 결합 도메인, 및 임의적으로 하나 또는 그 이상의 펩티드 링커로 본질적으로 구성되고, 여기서 첫 번째와 두 번째 항원 결합 도메인은 둘 모두 Fab 분자이고, 두 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 첫 번째 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합된다. 이런 형상은 **도 10** 및 **1S** (이들 실례에서 첫 번째 항원 결합 도메인은 VH/VL 교차 Fab 분자이고, 두 번째 항원 결합 도메인은 전통적인 Fab 분자이다)에서 개략적으로 묘사된다.

[0271] 다른 이런 양상에서, (다중특이적) 항체는 첫 번째와 두 번째 항원 결합 도메인, 및 임의적으로 하나 또는 그 이상의 펩티드 링커로 본질적으로 구성되고, 여기서 첫 번째와 두 번째 항원 결합 도메인은 둘 모두 Fab 분자이

고, 첫 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 두 번째 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합된다. 이런 형상은 **도 1P** 및 **1T** (이들 실례에서 첫 번째 항원 결합 도메인은 VH/VL 교차 Fab 분자이고, 두 번째 항원 결합 도메인은 전통적인 Fab 분자이다)에서 개략적으로 묘사된다.

[0272] 일부 양상에서, 두 번째 Fab 분자가 Fab 중쇄의 C 말단에서 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합되고, (다중특이적) 항체는 세 번째 항원 결합 도메인, 특히 세 번째 Fab 분자를 더욱 포함하고, 여기서 상기 세 번째 Fab 분자가 Fab 중쇄의 C 말단에서 두 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합된다. 일정한 이런 양상에서, (다중특이적) 항체는 첫 번째, 두 번째와 세 번째 Fab 분자, 및 임의적으로 하나 또는 그 이상의 펩티드 링커로 본질적으로 구성되고, 여기서 두 번째 Fab 분자가 Fab 중쇄의 C 말단에서 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합되고, 세 번째 Fab 분자가 Fab 중쇄의 C 말단에서 두 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합된다. 이런 형상은 **도 1Q** 및 **1U** (이들 실례에서 첫 번째 항원 결합 도메인은 VH/VL 교차 Fab 분자이고, 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인은 각각 전통적인 Fab 분자이다), 또는 **도 1X** 및 **1Z** (이들 실례에서 첫 번째 항원 결합 도메인은 전통적인 Fab 분자이고, 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인은 각각 VH/VL 교차 Fab 분자이다)에서 개략적으로 묘사된다.

[0273] 일부 양상에서, 첫 번째 Fab 분자가 Fab 중쇄의 C 말단에서 두 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합되고, (다중특이적) 항체는 세 번째 항원 결합 도메인, 특히 세 번째 Fab 분자를 더욱 포함하고, 여기서 상기 세 번째 Fab 분자가 Fab 중쇄의 N 말단에서 두 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄의 C 말단에 융합된다. 일정한 이런 양상에서, (다중특이적) 항체는 첫 번째, 두 번째와 세 번째 Fab 분자, 및 임의적으로 하나 또는 그 이상의 펩티드 링커로 본질적으로 구성되고, 여기서 첫 번째 Fab 분자가 Fab 중쇄의 C 말단에서 두 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합되고, 세 번째 Fab 분자가 Fab 중쇄의 N 말단에서 두 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄의 C 말단에 융합된다. 이런 형상은 **도 1R** 및 **1V** (이들 실례에서 첫 번째 항원 결합 도메인은 VH/VL 교차 Fab 분자이고, 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인은 각각 전통적인 Fab 분자이다), 또는 **도 1W** 및 **1Y** (이들 실례에서 첫 번째 항원 결합 도메인은 전통적인 Fab 분자이고, 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인은 각각 VH/VL 교차 Fab 분자이다)에서 개략적으로 묘사된다.

[0274] 일정한 양상에서 본원 발명에 따른 (다중특이적) 항체는 두 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄가 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고, 차례로 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 (다시 말하면, 첫 번째 Fab 분자가 중쇄 가변 영역이 경쇄 가변 영역에 의해 대체되는 교차 Fab 중쇄를 포함하는) 폴리펩티드 ($VH_{(2)}$-$CH1_{(2)}$-$VL_{(1)}$-$CH1_{(1)}$)를 포함한다. 일부 양상에서 (다중특이적) 항체는 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역이 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역 ($VH_{(1)}$-$CL_{(1)}$) 및 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드 ($VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$)와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드를 더욱 포함한다.

[0275] 일정한 양상에서 본원 발명에 따른 (다중특이적) 항체는 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역이 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고 (다시 말하면, 첫 번째 Fab 분자가 중쇄 가변 영역이 경쇄 가변 영역에 의해 대체되는 교차 Fab 중쇄를 포함하고), 차례로 두 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드 ($VL_{(1)}$-$CH1_{(1)}$-$VH_{(2)}$-$CH1_{(2)}$)를 포함한다. 일부 양상에서 (다중특이적) 항체는 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역이 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역 ($VH_{(1)}$-$CL_{(1)}$) 및 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드 ($VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$)와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드를 더욱 포함한다.

[0276] 일정한 양상에서 본원 발명에 따른 (다중특이적) 항체는 두 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄가 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고, 차례로 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 (다시 말하면, 첫 번째 Fab 분자가 중쇄 불변 영역이 경쇄 불변 영역에 의해 대체되는 교차 Fab 중쇄를 포함하는) 폴리펩티드 ($VH_{(2)}$-$CH1_{(2)}$-$VH_{(1)}$-$CL_{(1)}$)을 포함한다. 일부 양상에서 (다중특이적) 항체는 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역이 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역 ($VL_{(1)}$-$CH1_{(1)}$) 및 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드 ($VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$)와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드를 더욱 포함한다.

[0277] 일정한 양상에서 본원 발명에 따른 (다중특이적) 항체는 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역이 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고 (다시 말하면, 첫 번째 Fab 분자가 중쇄

불변 영역이 경쇄 불변 영역에 의해 대체되는 교차 Fab 중쇄를 포함하고), 차례로 두 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드 ($VH_{(1)}$-$CL_{(1)}$-$VH_{(2)}$-$CH1_{(2)}$)를 포함한다. 일부 양상에서 (다중특이적) 항체는 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역이 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역 ($VL_{(1)}$-$CH1_{(1)}$) 및 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드 ($VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$)와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드를 더욱 포함한다.

[0278] 일정한 양상에서 본원 발명에 따른 (다중특이적) 항체는 세 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄가 두 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고, 차례로 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고, 차례로 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 (다시 말하면, 첫 번째 Fab 분자가 중쇄 가변 영역이 경쇄 가변 영역에 의해 대체되는 교차 Fab 중쇄를 포함하는) 폴리펩티드 ($VH_{(3)}$-$CH1_{(3)}$-$VH_{(2)}$-$CH1_{(2)}$-$VL_{(1)}$-$CH1_{(1)}$)를 포함한다. 일부 양상에서 (다중특이적) 항체는 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역이 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역 ($VH_{(1)}$-$CL_{(1)}$) 및 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드 ($VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$)와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드를 더욱 포함한다. 일부 양상에서 (다중특이적) 항체는 세 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드 ($VL_{(3)}$-$CL_{(3)}$)를 더욱 포함한다.

[0279] 일정한 양상에서 본원 발명에 따른 (다중특이적) 항체는 세 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄가 두 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고, 차례로 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고, 차례로 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 (다시 말하면, 첫 번째 Fab 분자가 중쇄 불변 영역이 경쇄 불변 영역에 의해 대체되는 교차 Fab 중쇄를 포함하는) 폴리펩티드 ($VH_{(3)}$-$CH1_{(3)}$-$VH_{(2)}$-$CH1_{(2)}$-$VH_{(1)}$-$CL_{(1)}$)를 포함한다. 일부 양상에서 (다중특이적) 항체는 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역이 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역 ($VL_{(1)}$-$CH1_{(1)}$) 및 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드 ($VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$)와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드를 더욱 포함한다. 일부 양상에서 (다중특이적) 항체는 세 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드 ($VL_{(3)}$-$CL_{(3)}$)를 더욱 포함한다.

[0280] 일정한 양상에서 본원 발명에 따른 (다중특이적) 항체는 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역이 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고 (다시 말하면, 첫 번째 Fab 분자가 중쇄 가변 영역이 경쇄 가변 영역에 의해 대체되는 교차 Fab 중쇄를 포함하고), 차례로 두 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고, 차례로 세 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드 ($VL_{(1)}$-$CH1_{(1)}$-$VH_{(2)}$-$CH1_{(2)}$-$VH_{(3)}$-$CH1_{(3)}$)를 포함한다. 일부 양상에서 (다중특이적) 항체는 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역이 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역 ($VH_{(1)}$-$CL_{(1)}$) 및 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드 ($VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$)와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드를 더욱 포함한다. 일부 양상에서 (다중특이적) 항체는 세 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드 ($VL_{(3)}$-$CL_{(3)}$)를 더욱 포함한다.

[0281] 일정한 양상에서 본원 발명에 따른 (다중특이적) 항체는 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역이 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고 (다시 말하면, 첫 번째 Fab 분자가 중쇄 불변 영역이 경쇄 불변 영역에 의해 대체되는 교차 Fab 중쇄를 포함하고), 차례로 두 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고, 차례로 세 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드 ($VH_{(1)}$-$CL_{(1)}$-$VH_{(2)}$-$CH1_{(2)}$-$VH_{(3)}$-$CH1_{(3)}$)를 포함한다. 일부 양상에서 (다중특이적) 항체는 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역이 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역 ($VL_{(1)}$-$CH1_{(1)}$) 및 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드 ($VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$)와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드를 더욱 포함한다. 일부 양상에서 (다중특이적) 항체는 세 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드 ($VL_{(3)}$-$CL_{(3)}$)를 더욱 포함한다.

[0282] 일정한 양상에서 본원 발명에 따른 (다중특이적) 항체는 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄가 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고, 차례로 두 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고 (다시 말하면, 두 번째 Fab 분자가 중쇄 가변 영역이 경쇄 가변 영역

에 의해 대체되는 교차 Fab 중쇄를 포함하고), 차례로 세 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고, 차례로 세 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 (다시 말하면, 세 번째 Fab 분자가 중쇄 가변 영역이 경쇄 가변 영역에 의해 대체되는 교차 Fab 중쇄를 포함하는) 폴리펩티드 ($VH_{(1)}$-$CH1_{(1)}$-$VL_{(2)}$-$CH1_{(2)}$-$VL_{(3)}$-$CH1_{(3)}$)를 포함한다. 일부 양상에서 (다중특이적) 항체는 두 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역이 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역 ($VH_{(2)}$-$CL_{(2)}$) 및 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드 ($VL_{(1)}$-$CL_{(1)}$)와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드를 더욱 포함한다. 일부 양상에서 (다중특이적) 항체는 세 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역이 세 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역 ($VH_{(3)}$-$CL_{(3)}$)과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드를 더욱 포함한다.

[0283] 일정한 양상에서 본원 발명에 따른 (다중특이적) 항체는 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄가 두 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고, 차례로 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고 (다시 말하면, 두 번째 Fab 분자가 중쇄 불변 영역이 경쇄 불변 영역에 의해 대체되는 교차 Fab 중쇄를 포함하고), 차례로 세 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고, 차례로 세 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 (다시 말하면, 세 번째 Fab 분자가 중쇄 불변 영역이 경쇄 불변 영역에 의해 대체되는 교차 Fab 중쇄를 포함하는) 폴리펩티드 ($VH_{(1)}$-$CH1_{(1)}$-$VH_{(2)}$-$CL_{(2)}$-$VH_{(3)}$-$CL_{(3)}$)를 포함한다. 일부 양상에서 (다중특이적) 항체는 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역이 두 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역 ($VL_{(2)}$-$CH1_{(2)}$) 및 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드 ($VL_{(1)}$-$CL_{(1)}$)와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드를 더욱 포함한다. 일부 양상에서 (다중특이적) 항체는 세 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역이 세 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역 ($VL_{(3)}$-$CH1_{(3)}$)과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드를 더욱 포함한다.

[0284] 일정한 양상에서 본원 발명에 따른 (다중특이적) 항체는 세 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역이 세 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고 (다시 말하면, 세 번째 Fab 분자가 중쇄 가변 영역이 경쇄 가변 영역에 의해 대체되는 교차 Fab 중쇄를 포함하고), 차례로 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고, 차례로 두 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고 (다시 말하면, 두 번째 Fab 분자가 중쇄 가변 영역이 경쇄 가변 영역에 의해 대체되는 교차 Fab 중쇄를 포함하고), 차례로 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드 ($VL_{(3)}$-$CH1_{(3)}$-$VL_{(2)}$-$CH1_{(2)}$-$VH_{(1)}$-$CH1_{(1)}$)를 포함한다. 일부 양상에서 (다중특이적) 항체는 두 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역이 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역 ($VH_{(2)}$-$CL_{(2)}$) 및 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드 ($VL_{(1)}$-$CL_{(1)}$)와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드를 더욱 포함한다. 일부 양상에서 (다중특이적) 항체는 세 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역이 세 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역 ($VH_{(3)}$-$CL_{(3)}$)과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드를 더욱 포함한다.

[0285] 일정한 양상에서 본원 발명에 따른 (다중특이적) 항체는 세 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역이 세 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고 (다시 말하면, 세 번째 Fab 분자가 중쇄 불변 영역이 경쇄 불변 영역에 의해 대체되는 교차 Fab 중쇄를 포함하고), 차례로 두 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고, 차례로 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고 (다시 말하면, 두 번째 Fab 분자가 중쇄 불변 영역이 경쇄 불변 영역에 의해 대체되는 교차 Fab 중쇄를 포함하고), 차례로 첫 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드 ($VH_{(3)}$-$CL_{(3)}$-$VH_{(2)}$-$CL_{(2)}$-$VH_{(1)}$-$CH1_{(1)}$)를 포함한다. 일부 양상에서 (다중특이적) 항체는 두 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역이 두 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역 ($VL_{(2)}$-$CH1_{(2)}$) 및 첫 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드 ($VL_{(1)}$-$CL_{(1)}$)와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드를 더욱 포함한다. 일부 양상에서 (다중특이적) 항체는 세 번째 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역이 세 번째 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역 ($VL_{(3)}$-$CH1_{(3)}$)과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드를 더욱 포함한다.

[0286] 한 양상에서, 본원 발명은 하기를 포함하는 (다중특이적) 항체를 제공한다:

[0287] a) CD3에 결합하는 첫 번째 항원 결합 도메인, 여기서 첫 번째 항원 결합 도메인은 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL과 VH 또는 불변 도메인 CL과 CH1이 서로에 의해 대체되는 Fab 분자이고, 서열 번호 2의 중쇄 상보

성 결정 영역 (HCDR) 1, 서열 번호 3의 HCDR 2 및 서열 번호 5의 HCDR 3을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH), 및 서열 번호 8의 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR) 1, 서열 번호 9의 LCDR 2 및 서열 번호 10의 LCDR 3을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하며;

[0288] b) 두 번째 항원, 특히 표적 세포 항원, 더욱 특히 TYRP-1 또는 EGFRvIII에 결합하는 두 번째 항원 결합 도메인, 여기서 두 번째 항원 결합 도메인은 (전통적인) Fab 분자이고;

[0289] c) 첫 번째와 두 번째 아단위로 구성되는 Fc 도메인;

[0290] 여기서,

[0291] (i) a) 하에 첫 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 b) 하에 두 번째 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합되고, b) 하에 두 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 c) 하에 Fc 도메인의 아단위 중에서 하나의 N 말단에 융합되거나,

[0292] (ii) b) 하에 두 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 a) 하에 첫 번째 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합되고, a) 하에 첫 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 c) 하에 Fc 도메인의 아단위 중에서 하나의 N 말단에 융합된다.

[0293] 바람직한 양상에서, 본원 발명은 하기를 포함하는 (다중특이적) 항체를 제공한다:

[0294] a) CD3에 결합하는 첫 번째 항원 결합 도메인, 여기서 첫 번째 항원 결합 도메인은 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL과 VH 또는 불변 도메인 CL과 CH1이 서로에 의해 대체되는 Fab 분자이고, 서열 번호 2의 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR) 1, 서열 번호 3의 HCDR 2 및 서열 번호 5의 HCDR 3을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH), 및 서열 번호 8의 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR) 1, 서열 번호 9의 LCDR 2 및 서열 번호 10의 LCDR 3을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하며;

[0295] b) 두 번째 항원, 특히 표적 세포 항원, 더욱 특히 TYRP-1 또는 EGFRvIII에 결합하는 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인, 여기서 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인은 각각 (전통적인) Fab 분자이고;

[0296] c) 첫 번째와 두 번째 아단위로 구성되는 Fc 도메인;

[0297] 여기서,

[0298] (i) a) 하에 첫 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 b) 하에 두 번째 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합되고, b) 하에 두 번째 항원 결합 도메인 및 b) 하에 세 번째 항원 결합 도메인이 각각 Fab 중쇄의 C 말단에서 c) 하에 Fc 도메인의 아단위 중에서 하나의 N 말단에 융합되거나,

[0299] (ii) b) 하에 두 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 a) 하에 첫 번째 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합되고, a) 하에 첫 번째 항원 결합 도메인 및 b) 하에 세 번째 항원 결합 도메인이 각각 Fab 중쇄의 C 말단에서 c) 하에 Fc 도메인의 아단위 중에서 하나의 N 말단에 융합된다.

[0300] 다른 양상에서, 본원 발명은 하기를 포함하는 (다중특이적) 항체를 제공한다:

[0301] a) CD3에 결합하는 첫 번째 항원 결합 도메인, 여기서 첫 번째 항원 결합 도메인은 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL과 VH 또는 불변 도메인 CL과 CH1이 서로에 의해 대체되는 Fab 분자이고, 서열 번호 2의 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR) 1, 서열 번호 3의 HCDR 2 및 서열 번호 5의 HCDR 3을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH), 및 서열 번호 8의 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR) 1, 서열 번호 9의 LCDR 2 및 서열 번호 10의 LCDR 3을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하며;

[0302] b) 두 번째 항원, 특히 표적 세포 항원, 더욱 특히 TYRP-1 또는 EGFRvIII에 결합하는 두 번째 항원 결합 도메인, 여기서 두 번째 항원 결합 도메인은 (전통적인) Fab 분자이고;

[0303] c) 첫 번째와 두 번째 아단위로 구성되는 Fc 도메인;

[0304] 여기서,

[0305] (i) a) 하에 첫 번째 항원 결합 도메인 및 b) 하에 두 번째 항원 결합 도메인이 각각 Fab 중쇄의 C 말단에서 c) 하에 Fc 도메인의 아단위 중에서 하나의 N 말단에 융합된다.

[0306] 본원 발명에 따른 (다중특이적) 항체의 모든 상이한 형상에서, 본원에서 설명된 아미노산 치환 ("전하 변형")은 존재하면, 두 번째 및 (존재하면) 세 번째 항원 결합 도메인/Fab 분자의 CH1과 CL 도메인 내에, 또는 첫 번째

항원 결합 도메인/Fab 분자의 CH1과 CL 도메인 내에 있을 수 있다. 바람직하게는, 이들은 두 번째 및 (존재하면) 세 번째 항원 결합 도메인/Fab 분자의 CH1과 CL 도메인 내에 있다. 본원 발명의 개념에 따라서, 만약 본원에서 설명된 바와 같은 아미노산 치환이 두 번째 (및 존재하면, 세 번째) 항원 결합 도메인/Fab 분자에서 만들어지면, 첫 번째 항원 결합 도메인/Fab 분자에서는 이런 아미노산 치환이 만들어지지 않는다. 반대로, 만약 본원에서 설명된 바와 같은 아미노산 치환이 첫 번째 항원 결합 도메인/Fab 분자에서 만들어지면, 두 번째 (및 존재하면, 세 번째) 항원 결합 도메인/Fab 분자에서는 이런 아미노산 치환이 만들어지지 않는다. 아미노산 치환은 바람직하게는 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL과 VH1이 서로에 의해 대체되는 Fab 분자를 포함하는 (다중특이적) 항체에서 만들어진다.

[0307] 본원 발명에 따른 (다중특이적) 항체의 바람직한 양상에서, 특히 본원에서 설명된 바와 같은 아미노산 치환이 두 번째 (및 존재하면, 세 번째) 항원 결합 도메인/Fab 분자에서 만들어지는 양상에서, 두 번째 (및 존재하면, 세 번째) Fab 분자의 불변 도메인 CL은 카파 아이소타입이다. 본원 발명에 따른 (다중특이적) 항체의 다른 양상에서, 특히 본원에서 설명된 바와 같은 아미노산 치환이 첫 번째 항원 결합 도메인/Fab 분자에서 만들어지는 양상에서, 첫 번째 항원 결합 도메인/Fab 분자의 불변 도메인 CL은 카파 아이소타입이다. 일부 양상에서, 두 번째 (및 존재하면, 세 번째) 항원 결합 도메인/Fab 분자의 불변 도메인 CL 및 첫 번째 항원 결합 도메인/Fab 분자의 불변 도메인 CL은 카파 아이소타입이다.

[0308] 한 양상에서, 본원 발명은 하기를 포함하는 (다중특이적) 항체를 제공한다:

[0309] a) CD3에 결합하는 첫 번째 항원 결합 도메인, 여기서 첫 번째 항원 결합 도메인은 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL과 VH가 서로에 의해 대체되는 Fab 분자이고, 서열 번호 2의 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR) 1, 서열 번호 3의 HCDR 2 및 서열 번호 5의 HCDR 3을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH), 및 서열 번호 8의 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR) 1, 서열 번호 9의 LCDR 2 및 서열 번호 10의 LCDR 3을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하며;

[0310] b) 두 번째 항원, 특히 표적 세포 항원, 더욱 특히 TYRP-1 또는 EGFRvIII에 결합하는 두 번째 항원 결합 도메인, 여기서 두 번째 항원 결합 도메인은 (전통적인) Fab 분자이고;

[0311] c) 첫 번째와 두 번째 아단위로 구성되는 Fc 도메인;

[0312] 여기서 b) 하에 두 번째 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL 내에 위치 124에서 아미노산이 리신 (K) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 치환되고 위치 123에서 아미노산이 리신 (K) 또는 아르기닌 (R) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 (가장 바람직하게는 아르기닌 (R)에 의해) 치환되고, 여기서 b) 하에 두 번째 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1 내에 위치 147에서 아미노산이 글루타민산 (E) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 치환되고 위치 213에서 아미노산이 글루타민산 (E) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 치환되고;

[0313] 여기서,

[0314] (i) a) 하에 첫 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 b) 하에 두 번째 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합되고, b) 하에 두 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 c) 하에 Fc 도메인의 아단위 중에서 하나의 N 말단에 융합되거나,

[0315] (ii) b) 하에 두 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 a) 하에 첫 번째 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합되고, a) 하에 첫 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 c) 하에 Fc 도메인의 아단위 중에서 하나의 N 말단에 융합된다.

[0316] 바람직한 양상에서, 본원 발명은 하기를 포함하는 (다중특이적) 항체를 제공한다:

[0317] a) CD3에 결합하는 첫 번째 항원 결합 도메인, 여기서 첫 번째 항원 결합 도메인은 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL과 VH가 서로에 의해 대체되는 Fab 분자이고, 서열 번호 2의 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR) 1, 서열 번호 3의 HCDR 2 및 서열 번호 5의 HCDR 3을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH), 및 서열 번호 8의 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR) 1, 서열 번호 9의 LCDR 2 및 서열 번호 10의 LCDR 3을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하며;

[0318] b) 두 번째 항원, 특히 표적 세포 항원, 더욱 특히 TYRP-1 또는 EGFRvIII에 결합하는 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인, 여기서 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인은 각각 (전통적인) Fab 분자이고;

[0319] c) 첫 번째와 두 번째 아단위로 구성되는 Fc 도메인;

[0320] 여기서 b) 하에 두 번째 항원 결합 도메인 및 b) 하에 세 번째 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL 내에 위치 124에서 아미노산이 리신 (K) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 치환되고 위치 123에서 아미노산이 리신 (K) 또는 아르기닌 (R) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 (가장 바람직하게는 아르기닌 (R)에 의해) 치환되고, 여기서 b) 하에 두 번째 항원 결합 도메인 및 b) 하에 세 번째 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1 내에 위치 147에서 아미노산이 글루타민산 (E) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 치환되고 위치 213에서 아미노산이 글루타민산 (E) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 치환되고;

[0321] 여기서,

[0322] (i) a) 하에 첫 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 b) 하에 두 번째 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합되고, b) 하에 두 번째 항원 결합 도메인 및 b) 하에 세 번째 항원 결합 도메인이 각각 Fab 중쇄의 C 말단에서 c) 하에 Fc 도메인의 아단위 중에서 하나의 N 말단에 융합되거나,

[0323] (ii) b) 하에 두 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 a) 하에 첫 번째 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합되고, a) 하에 첫 번째 항원 결합 도메인 및 b) 하에 세 번째 항원 결합 도메인이 각각 Fab 중쇄의 C 말단에서 c) 하에 Fc 도메인의 아단위 중에서 하나의 N 말단에 융합된다.

[0324] 다른 양상에서, 본원 발명은 하기를 포함하는 (다중특이적) 항체를 제공한다:

[0325] a) CD3에 결합하는 첫 번째 항원 결합 도메인, 여기서 첫 번째 항원 결합 도메인은 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL과 VH가 서로에 의해 대체되는 Fab 분자이고, 서열 번호 2의 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR) 1, 서열 번호 3의 HCDR 2 및 서열 번호 5의 HCDR 3을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH), 및 서열 번호 8의 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR) 1, 서열 번호 9의 LCDR 2 및 서열 번호 10의 LCDR 3을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하며;

[0326] b) 두 번째 항원, 특히 표적 세포 항원, 더욱 특히 TYRP-1 또는 EGFRvIII에 결합하는 두 번째 항원 결합 도메인, 여기서 두 번째 항원 결합 도메인은 (전통적인) Fab 분자이고;

[0327] c) 첫 번째와 두 번째 아단위로 구성되는 Fc 도메인;

[0328] 여기서 b) 하에 두 번째 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL 내에 위치 124에서 아미노산이 리신 (K) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 치환되고 위치 123에서 아미노산이 리신 (K) 또는 아르기닌 (R) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 (가장 바람직하게는 아르기닌 (R)에 의해) 치환되고, 여기서 b) 하에 두 번째 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1 내에 위치 147에서 아미노산이 글루타민산 (E) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 치환되고 위치 213에서 아미노산이 글루타민산 (E) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 치환되고;

[0329] 여기서 a) 하에 첫 번째 항원 결합 도메인 및 b) 하에 두 번째 항원 결합 도메인이 각각 Fab 중쇄의 C 말단에서 c) 하에 Fc 도메인의 아단위 중에서 하나의 N 말단에 융합된다.

[0330] 임의의 상기 양상에 따라서, (다중특이적) 항체의 구성요소 (예를 들면 Fab 분자, Fc 도메인)는 직접적으로, 또는 본원에서 설명되거나 또는 당해 분야에서 공지되는 다양한 링커, 특히 하나 또는 그 이상의 아미노산, 전형적으로 약 2-20개 아미노산을 포함하는 펩티드 링커를 통해 융합될 수 있다. 적합한, 비면역원성 펩티드 링커는 예를 들면, $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$, $(G_4S)_n$ 또는 $G_4(SG_4)_n$ 펩티드 링커를 포함하는데, 여기서 n은 일반적으로 1 내지 10, 전형적으로 2 내지 4의 정수이다.

[0331] 바람직한 양상에서, 본원 발명은 하기를 포함하는 (다중특이적) 항체를 제공한다:

[0332] a) CD3에 결합하는 첫 번째 항원 결합 도메인, 여기서 첫 번째 항원 결합 도메인은 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL과 VH가 서로에 의해 대체되는 Fab 분자이고, 서열 번호 2의 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR) 1, 서열 번호 3의 HCDR 2 및 서열 번호 5의 HCDR 3을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH), 및 서열 번호 8의 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR) 1, 서열 번호 9의 LCDR 2 및 서열 번호 10의 LCDR 3을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하며;

[0333] b) TYRP-1에 결합하는 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인, 여기서 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인은 각각 (전통적인) Fab 분자이고, 서열 번호 15의 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR) 1, 서열 번호 16의 HCDR 2 및 서열 번호 17의 HCDR 3을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH), 및 서열 번호 19의 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR) 1, 서열 번호 20의 LCDR 2 및 서열 번호 21의 LCDR 3을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하며;

[0334] c) 첫 번째와 두 번째 아단위로 구성되는 Fc 도메인;

[0335] 여기서,

[0336] b) 하에 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL 내에 위치 124에서 아미노산이 리신 (K) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 치환되고 위치 123에서 아미노산이 리신 (K) 또는 아르기닌 (R) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 (가장 바람직하게는 아르기닌 (R)에 의해) 치환되고, 여기서 b) 하에 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1 내에 위치 147에서 아미노산이 글루타민산 (E) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 치환되고 위치 213에서 아미노산이 글루타민산 (E) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 치환되고;

[0337] 여기서 게다가

[0338] b) 하에 두 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 a) 하에 첫 번째 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합되고, a) 하에 첫 번째 항원 결합 도메인 및 b) 하에 세 번째 항원 결합 도메인이 각각 Fab 중쇄의 C 말단에서 c) 하에 Fc 도메인의 아단위 중에서 하나의 N 말단에 융합된다.

[0339] 추가의 바람직한 양상에서, 본원 발명은 하기를 포함하는 (다중특이적) 항체를 제공한다:

[0340] a) CD3에 결합하는 첫 번째 항원 결합 도메인, 여기서 첫 번째 항원 결합 도메인은 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL과 VH가 서로에 의해 대체되는 Fab 분자이고, 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하며;

[0341] b) TYRP-1에 결합하는 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인, 여기서 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인은 각각 (전통적인) Fab 분자이고, 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하며;

[0342] c) 첫 번째와 두 번째 아단위로 구성되는 Fc 도메인;

[0343] 여기서,

[0344] b) 하에 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL 내에 위치 124에서 아미노산이 리신 (K) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 치환되고 위치 123에서 아미노산이 리신 (K) 또는 아르기닌 (R) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 (가장 바람직하게는 아르기닌 (R)에 의해) 치환되고, 여기서 b) 하에 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1 내에 위치 147에서 아미노산이 글루타민산 (E) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 치환되고 위치 213에서 아미노산이 글루타민산 (E) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 치환되고;

[0345] 여기서 게다가

[0346] b) 하에 두 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 a) 하에 첫 번째 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합되고, a) 하에 첫 번째 항원 결합 도메인 및 b) 하에 세 번째 항원 결합 도메인이 각각 Fab 중쇄의 C 말단에서 c) 하에 Fc 도메인의 아단위 중에서 하나의 N 말단에 융합된다.

[0347] 바람직한 양상에서, 본원 발명은 하기를 포함하는 (다중특이적) 항체를 제공한다:

[0348] a) CD3에 결합하는 첫 번째 항원 결합 도메인, 여기서 첫 번째 항원 결합 도메인은 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL과 VH가 서로에 의해 대체되는 Fab 분자이고, 서열 번호 2의 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR) 1, 서열 번호 3의 HCDR 2 및 서열 번호 5의 HCDR 3을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH), 및 서열 번호 8의 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR) 1, 서열 번호 9의 LCDR 2 및 서열 번호 10의 LCDR 3을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하며;

[0349] b) EGFRvIII에 결합하는 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인, 여기서 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인은 각각 (전통적인) Fab 분자이고, 서열 번호 85의 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR) 1, 서열 번호 86의 HCDR 2 및 서열 번호 87의 HCDR 3을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH), 및 서열 번호 89의 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR) 1, 서열 번호 90의 LCDR 2 및 서열 번호 91의 LCDR 3을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하며;

[0350] c) 첫 번째와 두 번째 아단위로 구성되는 Fc 도메인;

[0351] 여기서,

[0352] b) 하에 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL 내에 위치 124에서 아미노산이 리신 (K) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 치환되고 위치 123에서 아미노산이 리신 (K) 또는 아르기닌 (R) (Kabat에 따른 넘버

링)에 의해 (가장 바람직하게는 아르기닌 (R)에 의해) 치환되고, 여기서 b) 하에 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1 내에 위치 147에서 아미노산이 글루타민산 (E) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 치환되고 위치 213에서 아미노산이 글루타민산 (E) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 치환되고;

[0353] 여기서 게다가

[0354] b) 하에 두 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 a) 하에 첫 번째 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합되고, a) 하에 첫 번째 항원 결합 도메인 및 b) 하에 세 번째 항원 결합 도메인이 각각 Fab 중쇄의 C 말단에서 c) 하에 Fc 도메인의 아단위 중에서 하나의 N 말단에 융합된다.

[0355] 추가의 바람직한 양상에서, 본원 발명은 하기를 포함하는 (다중특이적) 항체를 제공한다:

[0356] a) CD3에 결합하는 첫 번째 항원 결합 도메인, 여기서 첫 번째 항원 결합 도메인은 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL과 VH가 서로에 의해 대체되는 Fab 분자이고, 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하며;

[0357] b) EGFRvIII에 결합하는 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인, 여기서 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인은 각각 (전통적인) Fab 분자이고, 서열 번호 88의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 92의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하며;

[0358] c) 첫 번째와 두 번째 아단위로 구성되는 Fc 도메인;

[0359] 여기서,

[0360] b) 하에 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CL 내에 위치 124에서 아미노산이 리신 (K) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 치환되고 위치 123에서 아미노산이 리신 (K) 또는 아르기닌 (R) (Kabat에 따른 넘버링)에 의해 (가장 바람직하게는 아르기닌 (R)에 의해) 치환되고, 여기서 b) 하에 두 번째와 세 번째 항원 결합 도메인의 불변 도메인 CH1 내에 위치 147에서 아미노산이 글루타민산 (E) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 치환되고 위치 213에서 아미노산이 글루타민산 (E) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에 의해 치환되고;

[0361] 여기서 게다가

[0362] b) 하에 두 번째 항원 결합 도메인이 Fab 중쇄의 C 말단에서 a) 하에 첫 번째 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단에 융합되고, a) 하에 첫 번째 항원 결합 도메인 및 b) 하에 세 번째 항원 결합 도메인이 각각 Fab 중쇄의 C 말단에서 c) 하에 Fc 도메인의 아단위 중에서 하나의 N 말단에 융합된다.

[0363] 본원 발명의 이들 양상에 따른 한 양상에서, Fc 도메인의 첫 번째 아단위 내에 위치 366에서 트레오닌 잔기가 트립토판 잔기 (T366W)로 대체되고, Fc 도메인의 두 번째 아단위 내에 위치 407에서 티로신 잔기가 발린 잔기 (Y407V)로 대체되고, 임의적으로 위치 366에서 트레오닌 잔기가 세린 잔기 (T366S)로 대체되고 위치 368에서 류신 잔기가 알라닌 잔기 (L368A)로 대체된다 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링).

[0364] 본원 발명의 이들 양상에 따른 추가의 양상에서, Fc 도메인의 첫 번째 아단위 내에서 추가적으로 위치 354에서 세린 잔기가 시스테인 잔기 (S354C)로 대체되거나 또는 위치 356에서 글루타민산 잔기가 시스테인 잔기 (E356C)로 대체되고 (특히 위치 354에서 세린 잔기가 시스테인 잔기로 대체되고), Fc 도메인의 두 번째 아단위 내에서 추가적으로 위치 349에서 티로신 잔기가 시스테인 잔기 (Y349C)에 의해 대체된다 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링).

[0365] 본원 발명의 이들 양상에 따른 다른 추가의 양상에서, Fc 도메인의 첫 번째와 두 번째 아단위 각각에서 위치 234에서 류신 잔기가 알라닌 잔기 (L234A)로 대체되고, 위치 235에서 류신 잔기가 알라닌 잔기 (L235A)로 대체되고, 위치 329에서 프롤린 잔기가 글리신 잔기 (P329G)에 의해 대체된다 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링).

[0366] 본원 발명의 이들 양상에 따른 다른 추가의 양상에서, Fc 도메인은 인간 $IgG_1$ Fc 도메인이다.

[0367] 바람직한 특정한 양상에서, (다중특이적) 항체는 서열 번호 23의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 서열 번호 24의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 서열 번호 25의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 (특히 2개의 폴리펩티드), 및 서열 번호 27의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 추가의 바람직한 특정한 양상에서, (다중특이적) 항체는 서열 번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 서열 번호 24의 아미노산

서열을 포함하는 폴리펩티드, 서열 번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 (특히 2개의 폴리펩티드), 및 서열 번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.

[0368] 한 양상에서 본원 발명은 서열 번호 23의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 서열 번호 24의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 서열 번호 25의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 (특히 2개의 폴리펩티드), 및 서열 번호 27의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는, CD3 및 TYRP-1에 결합하는 (다중특이적) 항체를 제공한다. 한 양상에서 본원 발명은 서열 번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 서열 번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 서열 번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 (특히 2개의 폴리펩티드), 및 서열 번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는, CD3 및 TYRP-1에 결합하는 (다중특이적) 항체를 제공한다.

[0369] 추가의 바람직한 특정한 양상에서, (다중특이적) 항체는 서열 번호 109의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 서열 번호 110의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 서열 번호 111의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 (특히 2개의 폴리펩티드), 및 서열 번호 27의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 추가의 특히 특정한 양상에서, (다중특이적) 항체는 서열 번호 109의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 서열 번호 110의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 서열 번호 111의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 (특히 2개의 폴리펩티드), 및 서열 번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.

[0370] 한 양상에서 본원 발명은 서열 번호 109의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 서열 번호 110의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 서열 번호 111의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 (특히 2개의 폴리펩티드), 및 서열 번호 27의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는, CD3 및 EGFRvIII에 결합하는 (다중특이적) 항체를 제공한다. 한 양상에서 본원 발명은 서열 번호 109의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 서열 번호 110의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 서열 번호 111의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 (특히 2개의 폴리펩티드), 및 서열 번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는, CD3 및 EGFRvIII에 결합하는 (다중특이적) 항체를 제공한다.

[0371] ***8. Fc 도메인 변이체***

[0372] 바람직한 양상에서, 본원 발명의 (다중특이적) 항체는 첫 번째와 두 번째 아단위로 구성되는 Fc 도메인을 포함한다.

[0373] (다중특이적) 항체의 Fc 도메인은 면역글로불린 분자의 중쇄 도메인을 포함하는 한 쌍의 폴리펩티드 사슬로 구성된다. 예를 들면, 면역글로불린 G (IgG) 분자의 Fc 도메인은 이합체이며, 이것의 각 아단위는 CH2 및 CH3 IgG 중쇄 불변 도메인을 포함한다. Fc 도메인의 2개 아단위는 서로 안정되게 연관될 수 있다. 한 양상에서, 본원 발명의 (다중특이적) 항체는 하나보다 많지 않은 Fc 도메인을 포함한다.

[0374] 한 양상에서, (다중특이적) 항체의 Fc 도메인은 IgG Fc 도메인이다. 바람직한 양상에서, Fc 도메인은 $IgG_1$ Fc 도메인이다. 다른 양상에서 Fc 도메인은 $IgG_4$ Fc 도메인이다. 더욱 특정한 양상에서, Fc 도메인은 위치 S228 (Kabat EU 색인 넘버링)에서 아미노산 치환, 특히 아미노산 치환 S228P를 포함하는 $IgG_4$ Fc 도메인이다. 이러한 아미노산 치환은 $IgG_4$ 항체의 생체내 Fab 팔 교환을 감소시킨다 (참조: Stubenrauch et al., Drug Metabolism and Disposition 38, 84-91 (2010)). 더욱 바람직한 양상에서, Fc 도메인은 인간 Fc 도메인이다. 훨씬 바람직한 양상에서, Fc 도메인은 인간 $IgG_1$ Fc 도메인이다. 인간 $IgG_1$ Fc 영역의 예시적인 서열은 서열 번호 117에서 제공된다.

[0375] **a) 이종이합체화를 증진하는 Fc 도메인 변형**

[0376] 본원 발명에 따른 (다중특이적) 항체는 Fc 도메인의 2개 아단위 중 하나 또는 다른 하나에 융합될 수 있는 상이한 항원 결합 도메인을 포함하고, 따라서 Fc 도메인의 이들 2개의 아단위는 전형적으로 2개의 비동일한 폴리펩티드 사슬 내에 포함된다. 이들 폴리펩티드의 재조합 공동발현 및 차후 이합체화는 이들 2개의 폴리펩티드의 여

러 가능한 조합을 야기한다. 재조합 생산에서 (다중특이적) 항체의 수율과 순도를 향상시키기 위해, 원하는 폴리펩티드의 연관을 증진하는 변형을 (다중특이적) 항체의 Fc 도메인에 도입하는 것이 유리할 것이다.

[0377] 따라서, 바람직한 양상에서, 본원 발명에 따른 (다중특이적) 항체의 Fc 도메인은 Fc 도메인의 첫 번째와 두 번째 아단위의 연관을 증진하는 변형을 포함한다. 인간 IgG Fc 도메인의 2개 아단위 사이에서 가장 광범위한 단백질-단백질 상호작용의 부위는 Fc 도메인의 CH3 도메인 내에 있다. 따라서, 한 양상에서 상기 변형은 Fc 도메인의 CH3 도메인 내에 있다.

[0378] 이종이합체화를 시행하기 위한 Fc 도메인의 CH3 도메인에서 변형을 위한 여러 접근법이 존재하는데, 이들은 예를 들면 WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012058768, WO 2013157954, WO 2013096291에서 충분히 설명된다. 전형적으로, 이와 같은 모든 접근법에서 Fc 도메인의 첫 번째 아단위의 CH3 도메인 및 Fc 도메인의 두 번째 아단위의 CH3 도메인은 각 CH3 도메인 (또는 이것을 포함하는 중쇄)이 그 자체로는 더 이상 동종이합체를 형성할 수 없지만, 상보적으로 가공된 다른 CH3 도메인과 이종이합체를 형성하도록 강제되도록 (첫 번째와 두 번째 CH3 도메인이 이종이합체를 형성하고, 2개의 첫 번째 또는 2개의 두 번째 CH3 도메인 사이에 어떤 동종이합체도 형성되지 않도록), 둘 모두 상보성 방식으로 가공된다. 향상된 중쇄 이종이합체화를 위한 이들 상이한 접근법은 중쇄/경쇄 오대합 및 Bence Jones-유형 부산물을 감소시키는, (다중특이적) 항체에서 중쇄-경쇄 변형 (예를 들면, 하나의 결합 팔에서 VH와 VL 교환/대체 및 CH1/CL 인터페이스에서 반대 전하를 갖는 하전된 아미노산의 치환의 도입)과 조합으로 상이한 대안으로서 예기된다.

[0379] 특정한 양상에서 Fc 도메인의 첫 번째와 두 번째 아단위의 연관을 증진하는 상기 변형은 Fc 도메인의 2개 아단위 중 하나에서 "노브" 변형 및 Fc 도메인의 2개 아단위 중 다른 하나에서 "홀" 변형을 포함하는, 이른바 "노브 인투 홀" 변형이다.

[0380] 노브 인투 홀 기술은 예를 들면 US 5,731,168; US 7,695,936; Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996) 및 Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001)에서 설명된다. 일반적으로, 상기 방법은 이종이합체 형성을 증진하고 동종이합체 형성을 방해하기 위해 융기가 공동 내에 배치될 수 있도록, 융기 ("노브")를 첫 번째 폴리펩티드의 인터페이스에서, 및 상응하는 공동 ("홀")을 두 번째 폴리펩티드의 인터페이스 내에 도입하는 것을 수반한다. 융기는 첫 번째 폴리펩티드의 인터페이스로부터 작은 아미노산 측쇄를 더욱 큰 측쇄 (예를 들면 티로신 또는 트립토판)로 대체함으로써 구축된다. 융기와 동일한 또는 유사한 크기의 보상성 공동은 큰 아미노산 측쇄를 더욱 작은 아미노산 측쇄 (예를 들면, 알라닌 또는 트레오닌)로 대체함으로써 두 번째 폴리펩티드의 인터페이스 내에 창출된다.

[0381] 따라서, 바람직한 양상에서, (다중특이적) 항체의 Fc 도메인의 첫 번째 아단위의 CH3 도메인에서 아미노산 잔기가 더욱 큰 측쇄 용적을 갖는 아미노산 잔기로 대체되어, 두 번째 아단위의 CH3 도메인 내에 공동에서 위치가능한 첫 번째 아단위의 CH3 도메인 내에 융기가 산출되고, Fc 도메인의 두 번째 아단위의 CH3 도메인에서 아미노산 잔기가 더욱 작은 측쇄 용적을 갖는 아미노산 잔기로 대체되어, 첫 번째 아단위의 CH3 도메인 내에 융기가 위치가능한 두 번째 아단위의 CH3 도메인 내에 공동이 산출된다.

[0382] 바람직하게는 더욱 큰 측쇄 용적을 갖는 상기 아미노산 잔기는 아르기닌 (R), 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y) 및 트립토판 (W)으로 구성된 군에서 선택된다.

[0383] 바람직하게는 더욱 작은 측쇄 용적을 갖는 상기 아미노산 잔기는 알라닌 (A), 세린 (S), 트레오닌 (T) 및 발린 (V)으로 구성된 군에서 선택된다.

[0384] 융기 및 공동은 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을, 예를 들면 부위 특이적 돌연변이유발에 의해, 또는 펩티드 합성에 의해 변경함으로써 만들어질 수 있다.

[0385] 특정한 양상에서, Fc 도메인의 첫 번째 아단위 ("노브" 아단위) (이것의 CH3 도메인)에서 위치 366에서 트레오닌 잔기가 트립토판 잔기 (T366W)로 대체되고, Fc 도메인의 두 번째 아단위 ("홀" 아단위) (이것의 CH3 도메인)에서 위치 407에서 티로신 잔기가 발린 잔기 (Y407V)로 대체된다. 한 양상에서, Fc 도메인의 두 번째 아단위에서 추가적으로 위치 366에서 트레오닌 잔기가 세린 잔기 (T366S)로 대체되고 위치 368에서 류신 잔기가 알라닌 잔기 (L368A)로 대체된다 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링).

[0386] 다른 추가 양상에서, Fc 도메인의 첫 번째 아단위에서 추가적으로 위치 354에서 세린 잔기가 시스테인 잔기 (S354C)로 대체되거나 또는 위치 356에서 글루타민산 잔기가 시스테인 잔기 (E356C)로 대체되고 (특히 위치 354에서 세린 잔기가 시스테인 잔기로 대체되고), Fc 도메인의 두 번째 아단위에서 추가적으로 위치 349에서 티로

신 잔기가 시스테인 잔기 (Y349C)에 의해 대체된다 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링). 이들 2개의 시스테인 잔기의 도입은 Fc 도메인의 2개 아단위 사이에 이황화 다리의 형성을 유발하여, 이합체를 더욱 안정시킨다 (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).

[0387] 바람직한 양상에서, Fc 도메인의 첫 번째 아단위는 아미노산 치환 S354C 및 T366W를 포함하고, Fc 도메인의 두 번째 아단위는 아미노산 치환 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)를 포함한다.

[0388] 바람직한 양상에서 CD3에 결합하는 항원 결합 도메인은 Fc 도메인의 첫 번째 아단위 ("노브" 변형을 포함)에 융합된다 (임의적으로, 두 번째 항원에 결합하는 두 번째 항원 결합 도메인 및/또는 펩티드 링커를 통해). 이론에 한정됨 없이, Fc 도메인의 노브-내포 아단위에, CD3에 결합하는 항원 결합 도메인의 융합은 CD3에 결합하는 2개의 항원 결합 도메인을 포함하는 항체의 산출 (2개의 노브-내포 폴리펩티드의 입체 충돌)을 (더욱) 최소화 것이다.

[0389] 이종이합체화를 시행하기 위한 CH3-변형의 다른 기술이 본원 발명에 따른 대안으로서 예기되고, 예를 들면 WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954, WO 2013/096291에서 설명된다.

[0390] 한 양상에서, EP 1870459에서 설명된 이종이합체화 접근법이 대안적으로 이용된다. 이러한 접근법은 Fc 도메인의 2개 아단위 사이에서 CH3/CH3 도메인 인터페이스 내에 특정한 아미노산 위치에서 반대 전하를 갖는 하전된 아미노산의 도입에 기초된다. 본원 발명의 (다중특이적) 항체에 대한 특정한 양상은 아미노산 돌연변이 R409D; 2개의 CH3 도메인 (Fc 도메인의) 중 하나에서 K370E 및 아미노산 돌연변이 D399K; Fc 도메인의 CH3 도메인 중 다른 하나에서 E357K이다 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링).

[0391] 다른 양상에서, 본원 발명의 (다중특이적) 항체는 Fc 도메인의 첫 번째 아단위의 CH3 도메인에서 아미노산 돌연변이 T366W 및 Fc 도메인의 두 번째 아단위의 CH3 도메인에서 아미노산 돌연변이 T366S, L368A, Y407V, 및 부가적으로 아미노산 돌연변이 R409D; Fc 도메인의 첫 번째 아단위의 CH3 도메인에서 K370E 및 아미노산 돌연변이 D399K; Fc 도메인의 두 번째 아단위의 CH3 도메인에서 E357K을 포함한다 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링).

[0392] 다른 양상에서, 본원 발명의 (다중특이적) 항체는 Fc 도메인의 첫 번째 아단위의 CH3 도메인에서 아미노산 돌연변이 S354C, T366W 및 Fc 도메인의 두 번째 아단위의 CH3 도메인에서 아미노산 돌연변이 Y349C, T366S, L368A, Y407V를 포함하거나, 상기 (다중특이적) 항체는 Fc 도메인의 첫 번째 아단위의 CH3 도메인에서 아미노산 돌연변이 Y349C, T366W 및 Fc 도메인의 두 번째 아단위의 CH3 도메인에서 아미노산 돌연변이 S354C, T366S, L368A, Y407V, 및 부가적으로 아미노산 돌연변이 R409D; Fc 도메인의 첫 번째 아단위의 CH3 도메인에서 K370E 및 아미노산 돌연변이 D399K; Fc 도메인의 두 번째 아단위의 CH3 도메인에서 E357K를 포함한다 (이들 모두 Kabat EU 색인에 따른 넘버링).

[0393] 한 양상에서, WO 2013/157953에서 설명된 이종이합체화 접근법이 대안적으로 이용된다. 한 양상에서, 첫 번째 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 T366K를 포함하고, 두 번째 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 L351D를 포함한다 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링). 추가의 양상에서, 첫 번째 CH3 도메인은 추가 아미노산 돌연변이 L351K를 포함한다. 추가의 양상에서, 두 번째 CH3 도메인은 Y349E, Y349D 및 L368E에서 선택되는 아미노산 돌연변이 (특히 L368E)를 더욱 포함한다 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링).

[0394] 한 양상에서, WO 2012/058768에서 설명된 이종이합체화 접근법이 대안적으로 이용된다. 한 양상에서 첫 번째 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 L351Y, Y407A를 포함하고, 두 번째 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 T366A, K409F를 포함한다. 추가의 양상에서 두 번째 CH3 도메인은 위치 T411, D399, S400, F405, N390 또는 K392에서, 예를 들면, a) T411N, T411R, T411Q, T411K, T411D, T411E 또는 T411W, b) D399R, D399W, D399Y 또는 D399K, c) S400E, S400D, S400R 또는 S400K, d) F405I, F405M, F405T, F405S, F405V 또는 F405W, e) N390R, N390K 또는 N390D, f) K392V, K392M, K392R, K392L, K392F 또는 K392E에서 선택되는 추가 아미노산 돌연변이를 포함한다 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링). 추가의 양상에서 첫 번째 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 L351Y, Y407A를 포함하고, 두 번째 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 T366V, K409F를 포함한다. 추가의 양상에서 첫 번째 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 Y407A를 포함하고, 두 번째 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 T366A, K409F를 포함한다. 추가의 양상에서, 두 번째 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 K392E, T411E, D399R 및 S400R을 더욱 포함한다 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링).

[0395] 한 양상에서, WO 2011/143545에서 설명된 이종이합체화 접근법이 예를 들면, 368 및 409 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)로 구성된 군에서 선택되는 위치에서 아미노산 변형으로, 대안적으로 이용된다.

[0396] 한 양상에서, 전술된 노브 인투 홀 기술을 또한 이용하는, WO 2011/090762에서 설명된 이종이합체화 접근법이 대안적으로 이용된다. 한 양상에서 첫 번째 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 T366W를 포함하고, 두 번째 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 Y407A를 포함한다. 한 양상에서, 첫 번째 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 T366Y를 포함하고, 두 번째 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 Y407T를 포함한다 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링).

[0397] 한 양상에서, (다중특이적) 항체 또는 이의 Fc 도메인은 $IgG_2$ 하위부류의 것이고, WO 2010/129304에서 설명된 이종이합체화 접근법이 대안적으로 이용된다.

[0398] 대안적 양상에서, Fc 도메인의 첫 번째와 두 번째 아단위의 연관을 증진하는 변형은 예를 들면 PCT 공개 WO 2009/089004에서 설명된 바와 같이, 정전 스티어링 효과를 매개하는 변형을 포함한다. 일반적으로, 이러한 방법은 동종이합체 형성이 정전적으로 불리하지만 이종이합체화가 정전적으로 유리하게 되도록, 하전된 아미노산 잔기에 의한 2개의 Fc 도메인 아단위의 인터페이스에서 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기의 대체를 수반한다. 이와 같은 한 가지 양상에서, 첫 번째 CH3 도메인은 음으로 하전된 아미노산 (예를 들면 글루타민산 (E) 또는 아스파르트산 (D), 특히 K392D 또는 N392D)으로 K392 또는 N392의 아미노산 치환을 포함하고, 두 번째 CH3 도메인은 양으로 하전된 아미노산 (예를 들면 리신 (K) 또는 아르기닌 (R), 특히 D399K, E356K, D356K 또는 E357K, 더욱 특히 D399K 및 E356K)으로 D399, E356, D356 또는 E357의 아미노산 치환을 포함한다. 추가의 양상에서, 첫 번째 CH3 도메인은 음으로 하전된 아미노산 (예를 들면, 글루타민산 (E) 또는 아스파르트산 (D), 특히 K409D 또는 R409D)으로 K409 또는 R409의 아미노산 치환을 더욱 포함한다. 추가의 양상에서 첫 번째 CH3 도메인은 음으로 하전된 아미노산 (예를 들면, 글루타민산 (E) 또는 아스파르트산 (D))으로 K439 및/또는 K370의 아미노산 치환 (이들 모두 Kabat EU 색인에 따른 넘버링)을 추가로 또는 대안으로 포함한다.

[0399] 다른 추가 양상에서, WO 2007/147901에서 설명된 이종이합체화 접근법이 대안적으로 이용된다. 한 양상에서, 첫 번째 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 K253E, D282K 및 K322D를 포함하고, 두 번째 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 D239K, E240K 및 K292D를 포함한다 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링).

[0400] 또 다른 양상에서, WO 2007/110205에서 설명된 이종이합체화 접근법이 대안적으로 이용될 수 있다.

[0401] 한 양상에서, Fc 도메인의 첫 번째 아단위는 아미노산 치환 K392D 및 K409D를 포함하고, Fc 도메인의 두 번째 아단위는 아미노산 치환 D356K 및 D399K를 포함한다 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링).

[0402] **b) Fc 수용체 결합 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 Fc 도메인 변형**

[0403] Fc 도메인은 표적 조직에서 우수한 축적에 기여하는 긴 혈청 반감기 및 우호적인 조직-혈액 분포 비율을 비롯한, 우호적인 약동학적 특성을 (다중특이적) 항체에 부여한다. 이와 동시에 이것은 하지만, 바람직한 항원-보유 세포보다는 Fc 수용체를 발현하는 세포로, (다중특이적) 항체의 바람직하지 않은 표적화를 야기할 수 있다. 게다가, Fc 수용체 신호전달 경로의 공동활성화는 사이토킨 방출을 야기할 수 있는데, 이것은 (다중특이적) 항체의 T 세포 활성화 특성 및 긴 반감기와 함께, 전신 투여 시에 사이토킨 수용체의 과도한 활성화 및 중증 부작용을 유발한다. T 세포 이외에 (Fc 수용체-보유) 면역 세포의 활성화는 예를 들면, NK 세포에 의한 T 세포의 잠재적인 파괴로 인해, (다중특이적) 항체의 효능을 심지어 감소시킬 수 있다.

[0404] 따라서, 바람직한 양상에서, 본원 발명에 따른 (다중특이적) 항체의 Fc 도메인은 선천적 $IgG_1$ Fc 도메인과 비교하여, Fc 수용체에 대한 감소된 결합 친화성 및/또는 감소된 효과기 기능을 나타낸다. 이와 같은 한 가지 양상에서 Fc 도메인 (또는 상기 Fc 도메인을 포함하는 (다중특이적) 항체)는 선천적 $IgG_1$ Fc 도메인 (또는 선천적 $IgG_1$ Fc 도메인을 포함하는 (다중특이적) 항체)과 비교하여, 50% 이하, 특히 20% 이하, 더욱 특히 10% 이하 및 가장 특히 5% 이하의 Fc 수용체에 대한 결합 친화성 및/또는 선천적 $IgG_1$ Fc 도메인 (또는 선천적 $IgG_1$ Fc 도메인을 포함하는 (다중특이적) 항체)과 비교하여, 50% 이하, 특히 20% 이하, 더욱 특히 10% 이하 및 가장 특히 5% 이하의 효과기 기능을 나타낸다. 한 양상에서, 이러한 Fc 도메인 (또는 상기 Fc 도메인을 포함하는 (다중특이적) 항체)는 Fc 수용체에 실질적으로 결합하지 않고/않거나 효과기 기능을 유도하지 않는다. 바람직한 양상에서 Fc 수용체는 Fcγ 수용체이다. 한 양상에서 Fc 수용체는 인간 Fc 수용체이다. 한 양상에서 Fc 수용체는 활성화 Fc 수용체. 특정한 양상에서 Fc 수용체는 활성화 인간 Fcγ 수용체, 더욱 특정하게는 인간 FcγRIIIa, FcγRI 또는 FcγRIIa, 가장 특정하게는 인간 FcγRIIIa이다. 한 양상에서 효과기 기능은 CDC, ADCC, ADCP 및 사이토킨 분비의 군에서 선택되는 한 가지 또는 그 이상이다. 바람직한 양상에서, 효과기 기능은 ADCC이다. 한 양상에서, 이러한 Fc 도메인 도메인은 선천적 $IgG_1$ Fc 도메인과 비교하여, 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 실제적으로 유사한 결합 친화성을 나타낸다. FcRn에 대한 실제적으로 유사한 결합은 이러한 Fc 도메인 (또

는 상기 Fc 도메인을 포함하는 (다중특이적) 항체)이 FcRn에 대한 선천적 $IgG_1$ Fc 도메인 (또는 선천적 $IgG_1$ Fc 도메인을 포함하는 (다중특이적) 항체)의 결합 친화성의 약 70% 이상, 특히 약 80% 이상, 더욱 특히 약 90% 이상을 나타낼 때 달성된다.

[0405] 일정한 양상에서, Fc 도메인은 비-가공된 Fc 도메인과 비교하여, Fc 수용체에 대한 감소된 결합 친화성 및/또는 감소된 효과기 기능을 갖도록 가공된다. 바람직한 양상에서, (다중특이적) 항체의 Fc 도메인은 Fc 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합 친화성 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 돌연변이를 포함한다. 전형적으로, 동일한 하나 또는 그 이상의 아미노산 돌연변이가 Fc 도메인의 2개 아단위 각각에서 존재한다. 한 양상에서, 아미노산 돌연변이는 Fc 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합 친화성을 감소시킨다. 한 양상에서, 아미노산 돌연변이는 Fc 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합 친화성을 적어도 2배, 적어도 5배, 또는 적어도 10배 감소시킨다. Fc 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합 친화성을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 돌연변이가 있는 양상에서, 이들 아미노산 돌연변이의 조합은 Fc 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합 친화성을 적어도 10배, 적어도 20-배, 또는 심지어 적어도 50-배 감소시킬 수 있다. 한 양상에서, 가공된 Fc 도메인을 포함하는 (다중특이적) 항체는 비-가공된 Fc 도메인을 포함하는 (다중특이적) 항체와 비교하여, Fc 수용체에 대한 결합 친화성의 20% 이하, 특히 10% 이하, 더욱 특히 5% 이하를 나타낸다. 바람직한 양상에서, Fc 수용체는 Fcɣ 수용체이다. 일부 양상에서, Fc 수용체는 인간 Fc 수용체이다. 일부 양상에서, Fc 수용체는 활성화 Fc 수용체이다. 특정한 양상에서, Fc 수용체는 활성화 인간 Fcɣ 수용체, 더욱 특정하게는 인간 FcɣRIIIa, FcɣRI 또는 FcɣRIIa, 가장 특정하게는 인간 FcɣRIIIa이다. 바람직하게는, 이들 수용체 각각에 대한 결합이 감소된다. 일부 양상에서, 보체 성분에 대한 결합 친화성, 특정하게는 C1q에 대한 결합 친화성 역시 감소된다. 한 양상에서, 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 결합 친화성은 감소되지 않는다. FcRn에 대한 실제적으로 유사한 결합, 다시 말하면, 상기 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합 친화성의 보존은 이러한 Fc 도메인 (또는 상기 Fc 도메인을 포함하는 (다중특이적) 항체)이 FcRn에 대한 비-가공된 형태의 Fc 도메인 (또는 상기 비-가공된 형태의 Fc 도메인을 포함하는 (다중특이적) 항체)의 결합 친화성의 약 70% 이상을 나타낼 때 달성된다. 본원 발명의 Fc 도메인, 또는 상기 Fc 도메인을 포함하는 본원 발명의 (다중특이적) 항체는 이런 친화성의 약 80% 이상 및 심지어 약 90% 이상을 나타낼 수 있다. 일정한 양상에서, (다중특이적) 항체의 Fc 도메인은 비-가공된 Fc 도메인과 비교하여, 감소된 효과기 기능을 갖도록 가공된다. 감소된 효과기 기능은 하기 중에서 한 가지 또는 그 이상을 포함할 수 있지만 이들에 한정되지 않는다: 감소된 보체 의존성 세포독성 (CDC), 감소된 항체 의존성 세포 매개된 세포독성 (ADCC), 감소된 항체-의존성 세포 식균작용 (ADCP), 감소된 사이토킨 분비, 항원-제시 세포에 의한 감소된 면역 복합체-매개된 항원 흡수, NK 세포에 감소된 결합, 대식세포에 감소된 결합, 단핵구에 감소된 결합, 다형핵 세포에 감소된 결합, 감소된 직접적인 신호전달 유도 아폽토시스, 표적-결합된 항체의 감소된 교차연결, 감소된 수지상 세포 성숙, 또는 감소된 T 세포 초회감작. 한 양상에서, 감소된 효과기 기능은 감소된 CDC, 감소된 ADCC, 감소된 ADCP, 및 감소된 사이토킨 분비의 군에서 선택되는 한 가지 또는 그 이상이다. 바람직한 양상에서, 감소된 효과기 기능은 감소된 ADCC이다. 한 양상에서 감소된 ADCC는 비가공된 Fc 도메인 (또는 비가공된 Fc 도메인을 포함하는 (다중특이적) 항체)에 의해 유도된 ADCC의 20% 이하이다.

[0406] 한 양상에서, Fc 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합 친화성 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 아미노산 돌연변이는 아미노산 치환이다. 한 양상에서, Fc 도메인은 E233, L234, L235, N297, P331 및 P329 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)의 군에서 선택되는 위치에서 아미노산 치환을 포함한다. 더욱 특정한 양상에서, Fc 도메인은 L234, L235 및 P329 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)의 군에서 선택되는 위치에서 아미노산 치환을 포함한다. 일부 양상에서, Fc 도메인은 아미노산 치환 L234A 및 L235A (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)를 포함한다. 이와 같은 한 가지 양상에서, Fc 도메인은 $IgG_1$ Fc 도메인, 특히 인간 $IgG_1$ Fc 도메인이다. 한 양상에서, Fc 도메인은 위치 P329에서 아미노산 치환을 포함한다. 더욱 특정한 양상에서, 아미노산 치환은 P329A 또는 P329G, 특히 P329G (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)이다. 한 양상에서, Fc 도메인은 위치 P329에서 아미노산 치환, 및 E233, L234, L235, N297 및 P331 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에서 선택되는 위치에서 추가 아미노산 치환을 포함한다. 더욱 특정한 양상에서, 추가 아미노산 치환은 E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D 또는 P331S이다. 바람직한 양상에서, Fc 도메인은 위치 P329, L234 및 L235 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)에서 아미노산 치환을 포함한다. 더욱 바람직한 양상에서, Fc 도메인은 아미노산 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G ("P329G LALA", "PGLALA" 또는 "LALAPG")를 포함한다. 구체적으로, 바람직한 양상에서, Fc 도메인의 각 아단위는 아미노산 치환 L234A, L235A 및 P329G (Kabat EU 색인 넘버링)를 포함한다, 다시 말하면, Fc 도메인의 첫 번째와 두 번째 아단위 각각에서 위치 234에서 류신 잔기가 알라닌 잔기로 대체되고 (L234A), 위치 235에서 류신 잔기가 알라닌 잔기로 대체되고 (L235A), 위치 329에서 프롤린 잔기가 글리신 잔기에 의해 대체된다 (P329G) (Kabat EU 색인에

따른 넘버링).

[0407] 이와 같은 한 가지 양상에서, Fc 도메인은 $IgG_1$ Fc 도메인, 특히 인간 $IgG_1$ Fc 도메인이다. 아미노산 치환의 "P329G LALA" 조합은 본원에서 전체적으로 참조로서 편입되는 PCT 공개 번호 WO 2012/130831에서 설명된 바와 같이, 인간 $IgG_1$ Fc 도메인의 Fcɣ 수용체 (뿐만 아니라 보체) 결합을 거의 완전히 전폐한다. WO 2012/130831은 또한, 이런 돌연변이체 Fc 도메인을 제조하는 방법, 및 이의 특성 예컨대 Fc 수용체 결합 또는 효과기 기능을 결정하기 위한 방법을 설명한다.

[0408] $IgG_4$ 항체는 $IgG_1$ 항체와 비교하여, Fc 수용체에 대한 감소된 결합 친화성 및 감소된 효과기 기능을 나타낸다. 따라서, 일부 양상에서, 본원 발명의 (다중특이적) 항체의 Fc 도메인은 $IgG_4$ Fc 도메인, 특히 인간 $IgG_4$ Fc 도메인이다. 한 양상에서, $IgG_4$ Fc 도메인은 위치 S228에서 아미노산 치환, 특이적으로 아미노산 치환 S228P (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)을 포함한다. Fc 수용체에 대한 결합 친화성 및/또는 효과기 기능을 더욱 감소시키기 위해, 한 양상에서, $IgG_4$ Fc 도메인은 위치 L235에서 아미노산 치환, 특이적으로 아미노산 치환 L235E (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)을 포함한다. 다른 양상에서, $IgG_4$ Fc 도메인은 위치 P329에서 아미노산 치환, 특이적으로 아미노산 치환 P329G (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)을 포함한다. 바람직한 양상에서, $IgG_4$ Fc 도메인은 위치 S228, L235 및 P329에서 아미노산 치환, 특이적으로 아미노산 치환 S228P, L235E 및 P329G (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)를 포함한다. 이런 $IgG_4$ Fc 도메인 돌연변이체 및 이들의 Fcɣ 수용체 결합 특성은 본원에서 전체적으로 참조로서 편입되는 PCT 공개 번호 WO 2012/130831에서 설명된다.

[0409] 바람직한 양상에서, 선천적 $IgG_1$ Fc 도메인과 비교하여, Fc 수용체에 대한 감소된 결합 친화성 및/또는 감소된 효과기 기능을 나타내는 Fc 도메인은 아미노산 치환 L234A, L235A 및 임의적으로 P329G를 포함하는 인간 $IgG_1$ Fc 도메인, 또는 아미노산 치환 S228P, L235E 및 임의적으로 P329G를 포함하는 인간 $IgG_4$ Fc 도메인 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)이다.

[0410] 일정한 양상에서, Fc 도메인의 N-글리코실화가 제거되었다. 이와 같은 한 가지 양상에서, Fc 도메인은 위치 N297에서 아미노산 돌연변이, 특히 아스파라긴을 알라닌 (N297A) 또는 아스파르트산 (N297D)에 의해 대체하는 아미노산 치환 (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)을 포함한다.

[0411] 상기에서 및 PCT 공개 번호 WO 2012/130831에서 설명된 Fc 도메인에 더하여, 감소된 Fc 수용체 결합 및/또는 효과기 기능을 갖는 Fc 도메인은 또한, Fc 도메인 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329 중에서 하나 또는 그 이상의 치환을 갖는 것들 (U.S. 특허 번호 6,737,056) (Kabat EU 색인에 따른 넘버링)을 포함한다. 이런 Fc 돌연변이체는 잔기 265 및 297의 알라닌으로의 치환을 갖는 이른바 "DANA" Fc 돌연변이체를 비롯하여, 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327 중 2개 또는 그 이상에서 치환을 갖는 Fc 돌연변이체를 포함한다 (US 특허 번호 7,332,581).

[0412] 돌연변이체 Fc 도메인은 당해 분야에서 널리 공지된 유전적 또는 화학적 방법을 이용한 아미노산 결실, 치환, 삽입 또는 변형에 의해 제조될 수 있다. 유전학적 방법은 인코딩 DNA 서열의 부위 특이적 돌연변이유발, PCR, 유전자 합성, 기타 등등을 포함할 수 있다. 정확한 뉴클레오티드 변화는 예를 들면 염기서열분석에 의해 실증될 수 있다.

[0413] Fc 수용체에 결합은 예를 들면 ELISA에 의해, 또는 표준 기계장치 예컨대 BIAcore 기기 (GE Healthcare)를 이용한 표면 플라스몬 공명 (SPR)에 의해 쉽게 결정될 수 있고, Fc 수용체는 예컨대 재조합 발현에 의해 획득될 수 있다. 대안으로, Fc 수용체에 대한 Fc 도메인, 또는 Fc 도메인을 포함하는 (다중특이적) 항체의 결합 친화성은 특정 Fc 수용체를 발현하는 것으로 알려진 세포주, 예컨대 FcɣIIIa 수용체를 발현하는 인간 NK 세포를 이용하여 평가될 수 있다.

[0414] Fc 도메인, 또는 Fc 도메인을 포함하는 (다중특이적) 항체의 효과기 기능은 당해 분야에서 공지된 방법에 의해 계측될 수 있다. 관심되는 분자의 ADCC 활성을 사정하기 위한 시험관내 검정의 실례는 U.S. 특허 번호 5,500,362; Hellstrom et al. Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) 및 Hellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); U.S. 특허 번호 5,821,337; Bruggemann et al., J Exp Med 166, 1351-1361 (1987)에서 설명된다. 대안으로, 비방사성 검정이 이용될 수 있다 (참조: 예를 들면, 유세포분석법의 경우에 ACTI™ 비방사성 세포독성 검정 (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); 및 CytoTox 96® 비방사성 세포

독성 검정 (Promega, Madison, WI)). 이런 검정을 위한 유용한 효과기 세포는 말초혈 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 대안으로, 또는 부가적으로, 관심되는 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예를 들면, 동물 모형, 예컨대 Clynes et al., Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998)에서 개시된 것에서 사정될 수 있다.

[0415] 일부 양상에서, 보체 성분, 특이적으로 C1q에 대한 Fc 도메인의 결합이 감소된다. 따라서, Fc 도메인이 감소된 효과기 기능을 갖도록 가공되는 일부 양상에서, 상기 감소된 효과기 기능은 감소된 CDC를 포함한다. C1q 결합 검정은 Fc 도메인, 또는 Fc 도메인을 포함하는 (다중특이적) 항체가 C1q에 결합할 수 있고, 따라서 CDC 활성을 갖는 지를 결정하기 위해 실행될 수 있다. 참조: 예를 들면, WO 2006/029879 및 WO 2005/100402에서 C1q와 C3c 결합 ELISA. 보체 활성화를 사정하기 위해, CDC 검정이 수행될 수 있다 (참조: 예를 들면, Gazzano-Santoro et al., J Immunol Methods 202, 163 (1996); Cragg et al., Blood 101, 1045-1052 (2003); 및 Cragg and Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004)).

[0416] FcRn 결합 및 생체내 소실/반감기 결정이 또한, 당해 분야에서 공지된 방법을 이용하여 수행될 수 있다 (참조: 예를 들면, Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006); WO 2013/120929).

[0417] **B. 폴리뉴클레오티드**

[0418] 본원 발명은 본원 발명의 항체를 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 더욱 제공한다. 상기 단리된 폴리뉴클레오티드는 단일 폴리뉴클레오티드 또는 복수의 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0419] 본원 발명의 (다중특이적) 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 전체 항체를 인코딩하는 단일 폴리뉴클레오티드로서, 또는 공동발현되는 복수 (예를 들면, 2개 또는 그 이상)의 폴리뉴클레오티드로서 발현될 수 있다. 공동발현되는 폴리뉴클레오티드에 의해 인코딩된 폴리펩티드는 예를 들면, 이황화 결합 또는 다른 수단을 통해 연관되어, 기능적 항체를 형성할 수 있다. 예를 들면, 항체의 경쇄 부분은 항체의 중쇄를 포함하는 항체의 부분으로부터 별개의 폴리뉴클레오티드에 의해 인코딩될 수 있다. 공동발현될 때, 중쇄 폴리펩티드는 경쇄 폴리펩티드와 연관되어 항체를 형성할 것이다. 다른 실례에서, 2개의 Fc 도메인 아단위 중에서 하나 및 임의적으로 하나 또는 그 이상의 Fab 분자 (이의 일부)를 포함하는 항체의 부분은 2개의 Fc 도메인 아단위 중에서 다른 것 및 임의적으로 Fab 분자 (이의 일부)를 포함하는 항체의 부분으로부터 별개의 폴리뉴클레오티드에 의해 인코딩될 수 있었다. 공동발현될 때, Fc 도메인 아단위는 연관하여 Fc 도메인을 형성할 것이다.

[0420] 일부 양상에서, 단리된 폴리뉴클레오티드는 본원에서 설명된 바와 같은 발명에 따른 전체 항체 분자를 인코딩한다. 다른 양상에서, 단리된 폴리뉴클레오티드는 본원에서 설명된 바와 같은 발명에 따른 항체 내에 포함된 폴리펩티드를 인코딩한다.

[0421] 일정한 양상에서 폴리뉴클레오티드 또는 핵산은 DNA이다. 다른 양상에서, 본원 발명의 폴리뉴클레오티드는 예를 들면, 전령 RNA (mRNA)의 형태에서 RNA이다. 본원 발명의 RNA는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다.

[0422] **C. 재조합 방법**

[0423] 본원 발명의 항체는 예를 들면, 고체-상태 펩티드 합성 (예를 들면 Merrifield 고체상 합성) 또는 재조합 생산에 의해 획득될 수 있다. 재조합 생산의 경우에, 예를 들면, 전술된 바와 같은 항체를 인코딩하는 하나 또는 그 이상의 폴리뉴클레오티드가 단리되고, 숙주 세포에서 추가 클로닝 및/또는 발현을 위해 하나 또는 그 이상의 벡터 내로 삽입된다. 이런 폴리뉴클레오티드는 전통적인 절차를 이용하여 쉽게 단리되고 염기서열분석될 수 있다. 한 양상에서, 본원 발명의 폴리뉴클레오티드 (다시 말하면, 단일 폴리뉴클레오티드 또는 복수의 폴리뉴클레오티드)를 포함하는 벡터, 바람직하게는 발현 벡터가 제공된다. 당업자에게 널리 공지된 방법이 적합한 전사/번역 제어 신호와 함께 항체의 코딩 서열을 내포하는 발현 벡터를 작제하는 데 이용될 수 있다. 이들 방법은 시험관내 재조합 DNA 기술, 합성 기술 및 생체내 재조합/유전자 재조합을 포함한다. 예를 들면, Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989); and Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y (1989)에서 설명된 기술을 참조한다. 발현 벡터는 플라스미드, 바이러스의 부분일 수 있거나, 핵산 단편일 수 있다. 발현 벡터는 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 (다시 말하면, 코딩 영역)가 프로모터 및/또는 다른 전사 또는 번역 제어 요소와 작동가능하게 연관되어 클로닝되는 발현 카세트를 포함한다. 본원에서 이용된 바와 같이, "코딩 영역"은 아미노산으로 번역되는 코돈으로 구성되는 핵산의 부분이다. "종결 코돈" (TAG, TGA 또는 TAA)은 아미노산으로 번역되지는 않지만, 만약 존재하면 코딩 영역의 일부인 것으로 고려될 수 있으며, 임의의 측접 서열, 예를 들면 프로모터, 리보솜 결합 부위, 전사 종결인자, 인트론, 5'와 3' 비번역 영역 등은 코딩 영

역의 일부가 아니다. 2개 또는 그 이상의 코딩 영역이 단일 폴리뉴클레오티드 작제물 내에, 예를 들면 단일 벡터 상에, 또는 별개의 폴리뉴클레오티드 작제물 내에, 예를 들면 별개의 (상이한) 벡터 상에 존재할 수 있다. 게다가, 임의의 벡터는 단일 코딩 영역을 내포할 수 있거나, 2개 또는 그 이상의 코딩 영역을 포함할 수 있다, 예를 들면 본원 발명의 벡터는 단백질분해 개열을 통해 최종 단백질로 번역후 또는 공동번역에서 분리되는 하나 또는 그 이상의 폴리펩티드를 인코딩할 수 있다. 이에 더하여, 본원 발명의 벡터, 폴리뉴클레오티드 또는 핵산은 본원 발명의 항체, 또는 이의 변이체 또는 유도체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 융합되거나 또는 융합되지 않은 이종성 코딩 영역을 인코딩할 수 있다. 이종성 코딩 영역은 특수한 요소 또는 모티프, 예컨대 분비 신호 펩티드 또는 이종성 기능적 도메인을 제한 없이 포함한다. 작동가능한 연관은 유전자 산물의 발현이 조절 서열(들)의 영향 또는 제어 하에 놓이도록 하는 그와 같은 방식으로, 유전자 산물, 예를 들면 폴리펩티드에 대한 코딩 영역이 하나 또는 그 이상의 조절 서열과 연관될 때이다. 2개의 DNA 단편 (예컨대 폴리펩티드 코딩 영역 및 그것과 연관된 프로모터)은 만약 프로모터 기능의 유도가 원하는 유전자 산물을 인코딩하는 mRNA의 전사를 유발하고, 만약 이들 2개의 DNA 단편 사이에 연관의 성격이 유전자 산물의 발현을 주동하는 발현 조절 서열의 능력을 간섭하지 않거나 또는 전사되는 DNA 주형의 능력을 간섭하지 않으면 "작동가능하게 연관"된다. 따라서, 프로모터 영역은 만약 이러한 프로모터가 핵산의 전사를 달성할 수 있다면, 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산과 작동가능하게 연관될 것이다. 프로모터는 미리 결정된 세포에서만 DNA의 실제적인 전사를 주동하는 세포 특이적 프로모터일 수 있다. 프로모터 이외에 다른 전사 제어 요소, 예를 들면 인핸서, 오퍼레이터, 억제인자, 및 전사 종결 신호가 세포 특이적 전사를 주동하기 위해 폴리뉴클레오티드와 작동가능하게 연관될 수 있다. 적합한 프로모터 및 다른 전사 제어 영역이 본원에서 개시된다. 다양한 전사 제어 영역이 당업자에게 알려져 있다. 이들은 척추동물 세포에서 기능하는 전사 제어 영역, 예컨대 하지만 제한 없이, 시토메갈로바이러스로부터 프로모터와 인핸서 분절 (예를 들면 인트론-A와 함께 극초기 프로모터), 유인원 바이러스 40 (예를 들면 초기 프로모터), 및 레트로바이러스 (예컨대 예를 들면 라우스 육종 바이러스)를 제한 없이 포함한다. 다른 전사 제어 영역은 척추동물 유전자로부터 유래된 것들 예컨대 액틴, 열 충격 단백질, 소 성장 호르몬 및 토끼 β-글로빈뿐만 아니라 진핵 세포에서 유전자 발현을 제어할 수 있는 다른 서열을 포함한다. 추가의 적합한 전사 제어 영역은 조직 특이적 프로모터와 인핸서뿐만 아니라 유도성 프로모터 (예를 들면 테트라사이클린에 의해 유도가능한 프로모터)를 포함한다. 유사하게, 다양한 번역 제어 요소가 당업자에게 알려져 있다. 이들은 리보솜 결합 부위, 번역 개시와 종결 코돈, 및 바이러스 시스템으로부터 유래된 요소 (특히 내부 리보솜 유입 부위 또는 IRES, CITE 서열로서 또한 지칭됨)를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 발현 카세트는 또한, 다른 특질 예컨대 복제 기점 및/또는 염색체 통합 요소 예컨대 레트로바이러스 긴 말단 반복 (LTR) 또는 아데노 연관된 바이러스 (AAV) 반전 말단 반복 (ITR)을 포함할 수 있다.

[0424] 본원 발명의 폴리뉴클레오티드 및 핵산 코딩 영역은 본원 발명의 폴리뉴클레오티드에 의해 인코딩된 폴리펩티드의 분비를 주동하는 분비 또는 신호 펩티드를 인코딩하는 추가 코딩 영역과 연관될 수 있다. 예를 들면, 만약 항체의 분비가 요망되면, 신호 서열을 인코딩하는 DNA가 본원 발명의 항체 또는 이의 단편을 인코딩하는 핵산의 상류에 배치될 수 있다. 신호 가설에 따르면, 포유류 세포에 의해 분비된 단백질은 일단 조면소포체의 전역에서 성장 단백질 사슬의 이출이 시작되면, 성숙 단백질로부터 개열되는 신호 펩티드 또는 분비 리더 서열을 갖는다. 당업자는 척추동물 세포에 의해 분비되는 폴리펩티드가 일반적으로, 이러한 폴리펩티드의 N 말단에 융합된 신호 펩티드를 갖는다는 것을 인식하는데, 신호 펩티드는 번역되는 폴리펩티드로부터 개열되어 폴리펩티드의 분비된 또는 "성숙" 형태가 생산된다. 일정한 양상에서, 선천적 신호 펩티드, 예를 들면 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄 신호 펩티드, 또는 자신과 작동가능하게 연관되는 폴리펩티드의 분비를 주동하는 능력을 유지하는 상기 서열의 기능적 유도체가 이용된다. 대안으로, 이종성 포유류 신호 펩티드, 또는 이의 기능적 유도체가 이용될 수 있다. 예를 들면, 야생형 리더 서열이 인간 조직 플라스미노겐 활성인자 (TPA) 또는 생쥐 β-글루쿠론산분해효소의 리더 서열로 치환될 수 있다.

[0425] 추후 정제를 가능하게 하거나 (예를 들면 히스티딘 태그) 또는 항체의 표지화를 보조하는 데 이용될 수 있었던 짧은 단백질 서열을 인코딩하는 DNA가 상기 항체 (단편) 인코딩 폴리뉴클레오티드 내에 또는 이의 단부에서 포함될 수 있다.

[0426] 추가 양상에서, 본원 발명의 폴리뉴클레오티드 (다시 말하면, 단일 폴리뉴클레오티드 또는 복수의 폴리뉴클레오티드)를 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 일정한 양상에서, 본원 발명의 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 이들 폴리뉴클레오티드와 벡터는 각각, 폴리뉴클레오티드 및 벡터와 관련하여 본원에서 설명된 임의의 특질을 단독적으로 또는 조합으로 통합할 수 있다. 이와 같은 한 가지 양상에서 숙주 세포는 본원 발명의 항체 (이의 부분)를 인코딩하는 하나 또는 그 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 또는 그 이상의 벡터를 포함한다 (예를 들면, 이것으로 형질전환되거나 또는 형질감염되었다). 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "숙주

세포"는 본원 발명의 항체 또는 이의 단편을 산출하도록 가공될 수 있는 임의의 종류의 세포 시스템을 지칭한다. 항체를 복제하고 이들의 발현을 뒷받침하는 데 적합한 숙주 세포는 당해 분야에서 널리 알려져 있다. 이런 세포는 타당하면, 특정 발현 벡터로 형질감염되거나 또는 형질도입될 수 있고, 대량의 벡터 내포 세포는 대규모 발효기에 파종되어 임상적 적용을 위한 충분한 양의 항체를 획득하기 위해 성장될 수 있다. 적합한 숙주 세포는 원핵 미생물, 예컨대 대장균 (*E. coli*), 또는 다양한 진핵 세포, 예컨대 중국 햄스터 난소 세포 (CHO), 곤충 세포, 또는 기타 유사한 것을 포함한다. 예를 들면, 폴리펩티드는 특히 글리코실화가 필요하지 않을 때 세균에서 생산될 수 있다. 발현 후, 폴리펩티드는 가용성 분획물에서 세균 세포 페이스트로부터 단리될 수 있고 더욱 정제될 수 있다. 원핵생물에 더하여, 진핵 미생물, 예컨대 글리코실화 경로가 "인간화"되어, 부분적으로 또는 완전 인간 글리코실화 패턴을 갖는 폴리펩티드의 생산을 유발하는 균류 및 효모 균주를 비롯한, 실모양 균류 또는 효모가 폴리펩티드-인코딩 벡터에 대한 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 참조: Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004) 및 Li et al., Nat Biotech 24, 210-215 (2006). (글리코실화된) 폴리펩티드의 발현을 위한 적합한 숙주 세포는 또한, 다세포 생물체 (무척추동물 및 척추동물)로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 실례는 식물과 곤충 세포를 포함한다. 특히, 스포도프테라 프루기페르다 (*Spodoptera frugiperda*) 세포의 형질감염을 위해, 곤충 세포와 함께 이용될 수 있는 다양한 바쿨로바이러스 계통이 확인되었다. 식물 세포 배양액 또한, 숙주로서 활용될 수 있다. 참조: 예를 들면, US 특허 번호 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978 및 6,417,429 (유전자도입 식물에서 항체를 생산하기 위한 PLANTIBODIES™ 기술을 설명). 척추동물 세포 또한, 숙주로서 이용될 수 있다. 예를 들면, 현탁 상태에서 성장하도록 적응되는 포유류 세포주가 유용할 수 있다. 유용한 포유류 숙주 세포주의 다른 실례는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7); 인간 배아 신장 세포주 (예를 들면, Graham et al., J Gen Virol 36, 59 (1977)에서 설명된 바와 같은 293 또는 293T 세포), 아기 햄스터 신장 세포 (BHK), 생쥐 세르톨리 세포 (예를 들면, Mather, Biol Reprod 23, 243-251 (1980)에서 설명된 바와 같은 TM4 세포), 원숭이 신장 세포 (CV1), 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76), 인간 경부 암종 세포 (HELA), 개 신장 세포 (MDCK), 버팔로 쥐 간 세포 (BRL 3A), 인간 폐 세포 (W138), 인간 간 세포 (Hep G2), 생쥐 유방 종양 세포 (MMT 060562), TRI 세포 (예를 들면, Mather et al., Annals N.Y. Acad Sci 383, 44-68 (1982)에서 설명된 바와 같이), MRC 5 세포, 및 FS4 세포이다. 다른 유용한 포유류 숙주 세포주는 dhfr$^-$ CHO 세포를 비롯한, 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포 (Urlaub et al., Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980)); 및 골수종 세포주, 예컨대 Y0, NS0, P3X63 및 Sp2/0을 포함한다. 단백질 생산에 적합한 일정한 포유류 숙주 세포주에 관한 리뷰를 위해, 예를 들면, Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)을 참조한다. 숙주 세포는 배양된 세포, 예컨대 몇몇 예를 들면, 포유류 배양된 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 세균 세포 및 식물 세포를 포함하지만, 그러나 또한 유전자도입 동물, 유전자도입 식물 또는 배양된 식물 또는 동물 조직 내에 포함된 세포를 포함한다. 한 양상에서, 숙주 세포는 진핵 세포, 특히 포유류 세포, 예컨대 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포, 인간 배아 신장 (HEK) 세포 또는 림프구양 세포 (예를 들면, Y0, NS0, Sp20 세포)이다. 한 양상에서, 숙주 세포는 인체 내에 세포가 아니다.

[0427] 이들 시스템에서 외래 유전자를 발현하는 표준 기술은 당해 분야에서 공지된다. 항원 결합 도메인의 중쇄 또는 경쇄 중에서 어느 한 가지를 포함하는 폴리펩티드를 발현하는 세포는 발현된 산물이 중쇄와 경쇄 둘 모두를 갖는 항체이도록, 이러한 항체 사슬 중에서 다른 것을 또한 발현하도록 가공될 수 있다.

[0428] 한 양상에서, 본원 발명에 따른 항체를 생산하는 방법이 제공되는데, 여기서 상기 방법은 본원에서 제시된 바와 같은 항체의 발현에 적합한 조건 하에, 상기 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포를 배양하고, 임의적으로, 상기 항체를 숙주 세포 (또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 회수하는 것을 포함한다.

[0429] 본원 발명의 (다중특이적) 항체의 구성요소는 서로에 유전적으로 융합될 수 있다. (다중특이적) 항체는 이의 구성요소가 서로에 직접적으로 또는 링커 서열을 통해 간접적으로 융합되도록 설계될 수 있다. 링커의 조성과 길이는 당해 분야에서 널리 공지된 방법에 따라서 결정될 수 있고 효능에 대해 검사될 수 있다. (다중특이적) 항체의 상이한 구성요소 사이에 링커 서열의 실례는 본원에서 제공된다. 원하는 경우에, 융합의 개별 구성요소를 분리하기 위한 개열 부위를 통합하기 위해 추가 서열, 예를 들면 엔도펩티다아제 인식 서열이 또한 포함될 수 있다.

[0430] 본원에서 설명된 바와 같이 제조된 항체는 공지된 기술 예컨대 고성능 액체 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 겔 전기이동, 친화성 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 기타 등등에 의해 정제될 수 있다. 특정 단백질을 정제하는 데 이용되는 실제 조건은 순전하, 소수성, 친수성 등과 같은 인자에 부분적으로 의존할

것이고, 당업자에게 명백할 것이다. 친화성 크로마토그래피 정제의 경우, 항체, 리간드, 수용체, 또는 상기 항체가 결합하는 항원이 이용될 수 있다. 예를 들면, 본원 발명의 항체의 친화성 크로마토그래피 정제를 위해, 단백질 A 또는 단백질 G를 갖는 매트릭스가 이용될 수 있다. 순차적 단백질 A 또는 G 친화성 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토그래피가 본질적으로 실시예에서 설명된 바와 같이 항체를 단리하는 데 이용될 수 있다. 항체의 순도는 겔 전기이동, 고압 액체 크로마토그래피 등을 비롯한 임의의 다양한 널리 공지된 분석법에 의해 결정될 수 있다.

[0431] **D. 검정**

[0432] 본원에서 제공된 항체는 당해 분야에서 공지된 다양한 검정에 의해, 그들의 물리적/화학적 성질 및/또는 생물학적 활성에 대해 확인되거나, 선별검사되거나, 특징화될 수 있다.

[0433] ***1. 결합 검정***

[0434] Fc 수용체 또는 표적 항원에 대한 항체의 결합 (친화성)은 표준 기계장치 예컨대 BIAcore 기기 (GE Healthcare)를 이용하여, 예를 들면 표면 플라스몬 공명 (SPR)에 의해 결정될 수 있고, 수용체 또는 표적 단백질은 예컨대 재조합 발현에 의해 획득될 수 있다. 대안으로, 상이한 수용체 또는 표적 항원에 대한 항체의 결합은 예를 들면 유세포분석법 (FACS)에 의해, 특정 수용체 또는 표적 항원을 발현하는 세포주를 이용하여 평가될 수 있다. CD3에 대한 결합 활성을 계측하기 위한 특정한 예시적이고 모범적인 양상이 하기에서 설명된다.

[0435] 한 양상에서, CD3에 대한 결합 활성은 하기와 같이 SPR에 의해 결정된다:

[0436] SPR은 Biacore T200 기기 (GE Healthcare)에서 수행된다. 항-Fab 포획 항체 (GE Healthcare, #28958325)가 4000 - 6000 공명 단위 (RU)의 표면 밀도에서, 표준 아민 연계 화학을 이용하여 시리즈 S 센서 칩 CM5 (GE Healthcare) 위에 고정된다. 작업 및 희석 완충액으로서, HBS-P+ (10 mM HEPES, 150 mM NaCl pH 7.4, 0.05% 계면활성제 P20)가 이용된다. 2 μg/ml (20 mM His, 140 mM NaCl, pH 6.0에서)의 농도를 갖는 CD3 항체가 5 μl/분의 유속에서 약 60 s 동안 주입된다. 이용된 CD3 항원은 노브 인투 홀 변형 및 C 말단 Avi-태그를 갖는 인간 Fc 도메인에 융합된 CD3 델타 및 CD3 엡실론 엑토도메인의 이종이합체이다 (참조: 서열 번호 28 및 29). CD3 항원이 120 s 동안 10 μg/ml의 농도로 주입되고, 해리가 5 μl/분의 유속에서 약 120 s 동안 모니터링된다. 각각 약 60 s 동안 10 mM 글리신 pH 2.1의 2번 연속 주입에 의해 칩 표면이 재생된다. 블랭크 주입을 차감함으로써, 및 블랭크 대조 흐름 셀로부터 획득된 반응을 차감함으로써 벌크 굴절률 차이가 교정된다. 평가를 위해, 결합 반응이 주입 종결 5 초 후에 취해진다. 결합 신호를 정규화하기 위해, CD3 결합이 항-Fab 반응 (고정된 항-Fab 항체 상에서 CD3 항체의 포획 시에 획득된 신호 (RU))에 의해 나눠진다. 상이한 처리 후 항체의 CD3에 대한 결합 활성에 비하여, 일정한 처리 후 항체의 CD3에 대한 결합 활성 (상대적 활성 농도 (RAC)로서 또한 지칭됨)은 일정한 처리 후 항체의 표본의 결합 활성을 상이한 처리 후 항체의 상응하는 표본의 결합 활성에 참조함으로써 계산된다.

[0437] ***2. 활성 검정***

[0438] 본원 발명의 (다중특이적) 항체의 생물학적 활성은 실시예에서 설명된 바와 같은 다양한 검정에 의해 계측될 수 있다. 생물학적 활성은 예를 들면, T 세포의 증식의 유도, T 세포에서 신호전달의 유도, T 세포에서 활성화 마커의 발현의 유도, T 세포에 의한 사이토킨 분비의 유도, 표적 세포 예컨대 종양 세포의 용해의 유도, 및 종양 퇴화의 유도 및/또는 생존의 향상을 포함할 수 있다.

[0439] **E. 조성물, 제제 및 투여 루트**

[0440] 추가의 양상에서, 본원 발명은 예를 들면, 임의의 하기 치료 방법에서 이용을 위한 본원에서 제공된 임의의 항체를 포함하는 제약학적 조성물을 제공한다. 한 양상에서, 제약학적 조성물은 본원 발명에 따른 항체 및 제약학적으로 허용되는 운반체를 포함한다. 다른 양상에서, 제약학적 조성물은 본원 발명에 따른 항체, 및 예를 들면, 아래에 설명된 바와 같은 적어도 한 가지 추가 치료제를 포함한다.

[0441] 생체내 투여에 적합한 형태에서 본원 발명의 항체를 생산하는 방법이 더욱 제공되고, 상기 방법은 (a) 본원 발명에 따른 항체를 획득하는 단계, 및 (b) 상기 항체를 적어도 하나의 제약학적으로 허용되는 운반체로 조제하는 단계를 포함하고, 여기서 항체의 제조물은 생체내 투여용으로 조제된다.

[0442] 본원 발명의 제약학적 조성물은 제약학적으로 허용되는 운반체에서 용해되거나 또는 분산된 항체의 효과량을 포함한다. 관용구 "제약학적으로 허용되는"은 일반적으로 이용된 용량과 농도에서 수용자에게 비독성인, 다시 말하면, 적절하면 동물, 예컨대 예를 들면, 인간에게 투여될 때 불리한 반응, 알레르기 반응 또는 다른 부반응을

발생시키지 않는 분자 실체 및 조성물을 지칭한다. 항체 및 임의적으로 추가 활성 성분을 내포하는 제약학적 조성물의 제조는 본원에서 참조로서 편입되는 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990에 의해 예시된 바와 같이, 본원 발명에 비추어 당업자에게 알려져 있을 것이다. 게다가, 동물 (예를 들면, 인간) 투여의 경우에, 제조물은 FDA 생물 표준 사무국 또는 다른 국가에서 해당 정부 당국에 의해 요구되는 바와 같은 무균, 발열원성, 일반적인 안전성 및 순도 기준에 부합해야 하는 것으로 이해될 것이다. 바람직한 조성물은 동결 건조된 제제 또는 수성 용액이다. 본원에서 이용된 바와 같이, "제약학적으로 허용되는 운반체"는 당업자에게 공지된 바와 같은, 임의의 모든 용매, 완충액, 분산 매질, 코팅, 계면활성제, 항산화제, 보존제 (예를 들면, 항세균제, 항진균제), 등장화제, 흡수 지연 작용제, 염, 보존제, 항산화제, 단백질, 약물, 약물 안정제, 중합체, 겔, 결합제, 부형제, 붕해제, 윤활제, 감미제, 풍미제, 염료, 이들과 유사한 물질 및 이들의 조합을 포함한다 (예를 들면, 본원에서 참조로서 편입되는 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329를 참조한다). 임의의 전통적인 운반체가 활성 성분과 양립하지 않는 경우가 아닌 한에 있어서, 치료 조성물에서 이의 이용이 예기된다.

[0443] 본원 발명의 항체 (및 임의의 추가 치료제)는 비경구, 폐내 및 비내를 비롯한 임의의 적절한 수단에 의해, 및 국소 치료를 위해 원하는 경우에, 병소내 투여에 의해 투여될 수 있다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복막내, 또는 피하 투여를 포함한다. 투약은 임의의 적합한 루트에 의할 수 있다, 예를 들면, 부분적으로 투여가 단기 또는 장기인지에 따라서, 주사, 예컨대 정맥내 또는 피하 주사에 의할 수 있다.

[0444] 비경구 조성물은 주사, 예를 들면 피하, 피내, 병소내, 정맥내, 동맥내, 근육내, 척수강내 또는 복막내 주사에 의한 투여용으로 설계된 것들을 포함한다. 주사를 위해, 본원 발명의 항체는 특히 생리학적으로 양립성 완충액 예컨대 행크 용액, 링거액, 또는 생리식염수 완충액에서 수성 용액으로 조제될 수 있다. 용액은 조제 작용제 예컨대 현탁제, 안정제 및/또는 분산제를 내포할 수 있다. 대안으로, 항체는 이용 전, 적합한 운반제, 예를 들면, 무균 발열원 없는 물로 구성을 위한 분말 형태일 수 있다. 무균 주사가능 용액은 적합한 용매에서 필요한 양의 본원 발명의 항체를, 필요에 따라, 아래에 열거된 다양한 다른 성분과 통합함으로써 제조된다. 살균은 예를 들면, 무균 여과 막을 통한 여과에 의해 쉽게 달성될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 다양한 살균된 활성 성분을 기본 분산 매질 및/또는 다른 성분을 내포하는 무균 운반제 내로 통합함으로써 제조된다. 무균 주사가능 용액, 현탁액 또는 유제의 제조를 위한 무균 분말의 경우에, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 또는 동결 건조 기술인데, 이들 기술은 이전에 무균 여과된 액체 배지로부터 활성 성분 플러스 임의의 추가적인 원하는 성분의 분말을 산출한다. 액체 매질은 필요하면 적절하게 완충되어야 하고, 액체 희석제는 주사에 앞서, 충분한 식염수 또는 글루코오스로 먼저 등장성이 되도록 만들어져야 한다. 조성물은 제조와 보관의 조건 하에 안정되어야 하고, 미생물, 예컨대 세균 및 균류의 오염 작용에 대항하여 보존되어야 한다. 내독소 오염은 안전한 수준, 예를 들면, 0.5 ng/mg 단백질 이하에서 최소한도로 유지되어야 하는 것으로 인지될 것이다. 적합한 제약학적으로 허용되는 운반체는 하기를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다: 완충액, 예컨대 인산염, 구연산염, 및 다른 유기 산; 아스코르빈산 및 메티오닌을 비롯한 항산화제; 보존제 (예컨대 옥타데실디메틸벤질 염화암모늄; 염화헥사메토늄; 염화벤잘코늄; 염화벤제토늄; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 이하의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 글루코오스, 만노오스 또는 덱스트린을 비롯한 단당류, 이당류 및 다른 탄수화물; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로오스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대 이온, 예컨대 나트륨; 금속 착물 (예를 들면, Zn-단백질 복합체); 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG). 수성 주사 현탁액은 현탁액의 점도를 증가시키는 화합물, 예컨대 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스, 소르비톨, 덱스트란, 또는 기타 유사한 것을 내포할 수 있다. 임의적으로, 현탁액은 또한, 화합물의 용해도를 증가시켜 고도로 농축된 용액의 제조를 가능하게 하는 데 적합한 안정제 또는 작용제를 내포할 수 있다. 추가적으로, 활성 화합물의 현탁액은 적합한 유성 주사 현탁액으로서 제조될 수 있다. 적합한 친유성 용매 또는 운반제는 지방유 예컨대 호마유, 또는 합성 지방산 에스테르, 예컨대 에틸 클리트 또는 트리글리세리드, 또는 리포솜을 포함한다.

[0445] 활성 성분은 예를 들면, 액적형성 기술에 의해 또는 계면 중합화에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들면 각각, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들면, 리포솜, 알부민 마이크로스피어, 마이크로유제, 나노입자 및 나노캡슐)에서 또는 마크로유제에서 히드록시메틸셀룰로오스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에 포획될 수 있다. 이런 기술은 Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Ed. Mack Printing Company, 1990)에서 개시된다. 지속된 방출 제조물이 제조될 수 있다. 지속된 방출 제조물의 적합한 실례는 폴리펩티드를 내포하는 고체 소수성 중합체의 반투성 매트릭스를 포함하는데, 이들 매트릭스는 성형된

물품, 예를 들면, 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 특정한 양상에서, 주사가능 조성물의 연장된 흡수는 이들 조성물에서 흡수를 지연시키는 작용제, 예컨대 예를 들면, 알루미늄 모노스테아레이트, 젤라틴 또는 이들의 조합의 이용에 의해 달성될 수 있다.

[0446] 전술된 조성물에 더하여, 항체는 또한 저장소 제조물로서 조제될 수 있다. 이런 지속성 제제는 이식 (예를 들면, 피하 또는 근육내)에 의해 또는 근육내 주사에 의해 투여될 수 있다. 따라서, 예를 들면, 항체는 적합한 중합성 또는 소수성 물질 (예를 들면, 허용되는 오일에서 유제로서) 또는 이온 교환 수지로, 또는 난용성 유도체로서, 예를 들면, 난용성 염으로서 조제될 수 있다.

[0447] 본원 발명의 항체를 포함하는 제약학적 조성물은 전통적인 혼합, 용해, 유화, 캡슐화, 포획 또는 동결 건조 과정에 의하여 제조될 수 있다. 제약학적 조성물은 이들 단백질의 제약학적으로 이용될 수 있는 제조물로의 처리를 가능하게 하는 한 가지 또는 그 이상의 생리학적으로 허용가능 운반체, 희석제, 부형제 또는 보조제를 이용하여 전통적인 방식으로 조제될 수 있다. 적절한 제제는 선택된 투여 루트에 의존한다.

[0448] 항체는 유리 산 또는 염기, 중성 또는 염 형태에서 조성물로 조제될 수 있다. 제약학적으로 허용되는 염은 유리 산 또는 염기의 생물학적 활성을 실제적으로 유지하는 염이다. 이들은 산 부가염, 예를 들면, 단백질성 조성물의 자유 아미노 기로 형성된 것들, 또는 무기 산 예컨대 예를 들면, 염화수소산 또는 인산, 또는 유기 산 예컨대 아세트산, 옥살산, 주석산 또는 만델산으로 형성된 것들을 포함한다. 자유 카르복실 기로 형성된 염은 또한, 무기 염기 예컨대 예를 들면, 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘 또는 수산화제2철; 또는 유기 염기 예컨대 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘 또는 프로카인으로부터 유래될 수 있다. 제약학적 염은 상응하는 유리 염기 형태보다 수성 및 다른 양성자성 용매에서 더욱 가용성인 경향이 있다.

[0449] **F. 치료 방법 및 조성물**

[0450] 본원에서 제공된 임의의 항체는 치료 방법에서 이용될 수 있다. 본원 발명의 항체는 예를 들면 암의 치료에서 면역치료제로서 이용될 수 있다.

[0451] 치료 방법에서 이용을 위해, 본원 발명의 항체는 모범 의료행위 지침과 일치하는 방식으로 조제되고, 투약되고, 투여될 것이다. 이러한 문맥에서 고려되는 인자는 치료되는 특정 장애, 치료되는 특정 포유동물, 개별 환자의 임상적 상태, 장애의 원인, 작용제의 전달 부위, 투여 방법, 투여의 일정, 및 개업 의사에게 공지된 다른 인자를 포함한다.

[0452] 한 양상에서, 약제로서 이용을 위한 본원 발명의 항체가 제공된다. 추가의 양상에서, 질환을 치료하는 데 이용을 위한 본원 발명의 항체가 제공된다. 일정한 양상에서, 치료 방법에서 이용을 위한 본원 발명의 항체가 제공된다. 한 양상에서, 본원 발명은 치료가 필요한 개체에서 질환의 치료에서 이용을 위한 본원 발명의 항체를 제공한다. 일정한 양상에서, 본원 발명은 질환을 앓는 개체를 치료하는 방법에서 이용을 위한 항체를 제공하고, 상기 방법은 상기 항체의 치료 효과량을 상기 개체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일정한 양상에서 치료되는 질환은 증식성 장애이다. 바람직한 양상에서 질환은 암이다. 일정한 양상에서 상기 방법은 적어도 한 가지 추가 치료제, 예를 들면, 만약 치료되는 질환이 암이면 항암제의 효과량을 개체에게 투여하는 단계를 더욱 포함한다. 추가의 양상에서, 본원 발명은 표적 세포, 특히 종양 세포의 용해를 유도하는 데 이용을 위한 본원 발명의 항체를 제공한다. 일정한 양상에서, 본원 발명은 표적 세포의 용해를 유도하기 위한 항체의 효과량을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 표적 세포, 특히 종양 세포의 용해를 유도하는 방법에서 이용을 위한 본원 발명의 항체를 제공한다. 임의의 상기 양상에 따른 "개체"는 포유동물, 바람직하게는 인간이다.

[0453] 추가의 양상에서, 본원 발명은 약제의 제조 또는 준비에서 본원 발명의 항체의 용도를 제공한다. 한 양상에서 약제는 치료가 필요한 개체에서 질환의 치료를 위한 것이다. 추가의 양상에서, 약제는 질환을 치료하는 방법에서 이용을 위한 것이고, 상기 방법은 상기 약제의 효과량을 질환을 앓는 개체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일정한 양상에서 치료되는 질환은 증식성 장애이다. 바람직한 양상에서 질환은 암이다. 한 양상에서, 상기 방법은 적어도 한 가지 추가 치료제, 예를 들면, 만약 치료되는 질환이 암이면 항암제의 효과량을 개체에게 투여하는 단계를 더욱 포함한다. 추가의 양상에서, 약제는 표적 세포, 특히 종양 세포의 용해를 유도하기 위한 것이다. 다른 추가의 양상에서, 약제는 표적 세포의 용해를 유도하기 위한 약제의 효과량을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 표적 세포, 특히 종양 세포의 용해를 유도하는 방법에서 이용을 위한 것이다. 임의의 상기 양상에 따른 "개체"는 포유동물, 바람직하게는 인간일 수 있다.

[0454] 추가의 양상에서, 본원 발명은 질환을 치료하기 위한 방법을 제공한다. 한 양상에서, 상기 방법은 이런 질환을 앓는 개체에게 본원 발명의 항체의 효과량을 투여하는 단계를 포함한다. 한 양상에서 제약학적으로 허용되는 형

태에서 본원 발명의 항체를 포함하는 조성물이 상기 개체에게 투여된다. 일정한 양상에서 치료되는 질환은 증식성 장애이다. 바람직한 양상에서 질환은 암이다. 일정한 양상에서 상기 방법은 적어도 한 가지 추가 치료제, 예를 들면, 만약 치료되는 질환이 암이면 항암제의 효과량을 개체에게 투여하는 단계를 더욱 포함한다. 임의의 상기 양상에 따른 "개체"는 포유동물, 바람직하게는 인간일 수 있다.

[0455] 추가의 양상에서, 본원 발명은 표적 세포, 특히 종양 세포의 용해를 유도하기 위한 방법을 제공한다. 한 양상에서 상기 방법은 T 세포, 특히 세포독성 T 세포의 존재에서, 표적 세포를 본원 발명의 항체와 접촉시키는 단계를 포함한다. 추가의 양상에서, 개체에서 표적 세포, 특히 종양 세포의 용해를 유도하기 위한 방법이 제공된다. 이와 같은 한 가지 양상에서, 상기 방법은 표적 세포의 용해를 유도하기 위한 본원 발명의 항체의 효과량을 개체에게 투여하는 단계를 포함한다. 한 양상에서, "개체"는 인간이다.

[0456] 일정한 양상에서, 치료되는 질환은 증식성 장애, 특히 암이다. 암의 무제한적 실례는 방광암, 뇌암, 두경부암, 췌장암, 폐암, 유방암, 난소암, 자궁암, 자궁경부암, 자궁내막암, 식도암, 결장암, 결장직장암, 직장암, 위암, 전립선암, 혈액암, 피부암, 편평상피 세포 암종, 골암, 및 신장암을 포함한다. 본원 발명의 항체를 이용하여 치료될 수 있는 다른 세포 증식 장애는 복부, 뼈, 유방, 소화계, 간, 췌장, 복막, 내분비 샘 (부신, 부갑상선, 뇌하수체, 고환, 난소, 흉선, 갑상선), 눈, 두경부, 신경계 (중추 및 말초), 림프계, 골반, 피부, 연조직, 비장, 흉부 영역, 및 비뇨생식기계에서 위치된 신생물을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 전암성 상태 또는 병변 및 암 전이 또한 포함된다. 일정한 양상에서 암은 신장암, 방광암, 피부암, 폐암, 결장직장암, 유방암, 뇌암, 두경부암 및 전립선암으로 구성된 군에서 선택된다. 한 양상에서, 특히 항체가 두 번째 항원으로서 TYRP-1에 결합하는 다중특이적 항체이면, 암은 TYRP-1을 발현하는 암이다. 한 양상에서, 특히 항체가 두 번째 항원으로서 TYRP-1에 결합하는 다중특이적 항체이면, 암은 피부암, 특히 흑색종이다. 한 양상에서, 특히 항체가 두 번째 항원으로서 EGFRvIII에 결합하는 다중특이적 항체이면, 암은 EGFRvIII을 발현하는 암이다. 한 양상에서, 특히 항체가 두 번째 항원으로서 EGFRvIII에 결합하는 다중특이적 항체이면, 암은 뇌암, 특히 교모세포종이다. 당업자는 많은 경우에 항체가 치유를 제공할 수 없을 수도 있으며 단지 부분적인 유익성만을 제공할 수도 있다는 것을 쉽게 인식한다. 일부 양상에서, 일부 유익성을 갖는 생리학적 변화 또한 치료적으로 유익한 것으로 고려된다. 따라서, 일부 양상에서, 생리학적 변화를 제공하는 항체의 양은 "효과량"인 것으로 고려된다. 치료가 필요한 개체, 환자, 또는 피험자는 전형적으로 포유동물, 더욱 특정하게는 인간이다.

[0457] 일부 양상에서, 본원 발명의 항체의 효과량은 질환의 치료를 위해 개체에게 투여된다.

[0458] 질환의 예방 또는 치료를 위한, 본원 발명의 항체의 적절한 용량 (단독으로 또는 한 가지 또는 그 이상의 다른 추가 치료제와 조합으로 이용될 때)은 치료되는 질환의 유형, 투여 루트, 환자의 체중, 항체의 유형, 질환의 중증도와 코스, 항체가 예방적 또는 치료적 목적으로 투여되는 지, 이전 또는 동시 치료적 개입, 환자의 임상 병력 및 항체에 대한 반응, 및 주치의의 재량에 의존할 것이다. 어떤 상황에서든, 투여에 대한 책임이 있는 의사가 조성물에서 활성 성분(들)의 농도 및 개별 개체에 대한 적합한 용량(들)을 결정할 것이다. 단회 투여 또는 다양한 시점에 걸쳐 복수 투여, 일시 투여, 및 펄스 주입을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 다양한 투약 일정이 본원에서 예기된다.

[0459] 상기 항체는 적합하게는, 한꺼번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 투여된다. 질환의 유형과 중증도에 따라서, 약 1 μg/kg 내지 15 mg/kg (예를 들면, 0.1 mg/kg - 10mg/kg)의 항체가 예를 들면, 1회 또는 그 이상의 별개 투여에 의한, 또는 연속 주입에 의한 것인지에 상관없이, 환자에게 투여를 위한 초기 후보 용량일 수 있다. 한 가지 전형적인 일일량은 전술된 인자에 따라서, 약 1 μg/kg 내지 100 mg/kg 또는 그 이상의 범위일 수도 있다. 수 일 또는 그 이상에 걸쳐 반복된 투여의 경우에, 상태에 따라서, 치료는 일반적으로, 질환 증상의 원하는 억제가 발생할 때까지 지속될 것이다. 항체의 한 가지 예시적인 용량은 약 0.005 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 범위 안에 있을 것이다. 다른 무제한적 실례에서, 용량은 또한, 투여마다 약 1 마이크로그램/체중 kg, 약 5 마이크로그램/체중 kg, 약 10 마이크로그램/체중 kg, 약 50 마이크로그램/체중 kg, 약 100 마이크로그램/체중 kg, 약 200 마이크로그램/체중 kg, 약 350 마이크로그램/체중 kg, 약 500 마이크로그램/체중 kg, 약 1 밀리그램/체중 kg, 약 5 밀리그램/체중 kg, 약 10 밀리그램/체중 kg, 약 50 밀리그램/체중 kg, 약 100 밀리그램/체중 kg, 약 200 밀리그램/체중 kg, 약 350 밀리그램/체중 kg, 약 500 밀리그램/체중 kg으로부터 약 1000 mg/체중 kg 또는 그 이상까지, 및 그 안에서 도출가능한 임의의 범위를 포함할 수 있다. 본원에서 열거된 숫자로부터 도출가능한 범위의 무제한적 실례에서, 약 5 mg/체중 kg 내지 약 100 mg/체중 kg, 약 5 마이크로그램/체중 kg 내지 약 500 mg/체중 kg, 기타 등등의 범위가 전술된 숫자에 근거하여 투여될 수 있다. 따라서, 약 0.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 5.0 mg/kg 또는 10 mg/kg (또는 이들의 임의의 조합) 중에서 한 가지 또는 그 이상의 용량이 환자에게 투여될 수 있다. 이런 용량은 간헐적으로, 예를 들면, 매주 또는 3 주마다 (예를 들면, 환자가 약

2 내지 약 20회, 또는 예를 들면, 약 6회 복용량의 상기 항체를 제공받도록) 투여될 수 있다. 초기 더욱 높은 부하 용량, 그 이후에 1회 또는 그 이상의 더욱 낮은 용량이 투여될 수 있다. 하지만, 다른 투약 섭생이 유용할 수도 있다. 이러한 요법의 진행은 전통적인 기술과 검정에 의해 쉽게 모니터링된다.

[0460] 본원 발명의 항체는 일반적으로, 의도된 목적을 달성하는 데 효과적인 양으로 이용될 것이다. 질환 상태를 치료하거나 예방하는 데 이용을 위해, 본원 발명의 항체, 또는 이들의 제약학적 조성물은 효과량으로 투여되거나 또는 적용된다.

[0461] 전신 투여의 경우, 유효 용량은 시험관내 검정, 예컨대 세포 배양 검정으로부터 초기에 추정될 수 있다. 용량은 이후, 세포 배양액에서 결정된 대로의 $IC_{50}$을 포함하는 순환 농도 범위를 달성하기 위해 동물 모형에서 공식화될 수 있다. 이런 정보는 인간에서 유용한 용량을 더욱 정확하게 결정하는 데 이용될 수 있다.

[0462] 초기 용량은 또한, 당해 분야에서 널리 공지된 기술을 이용하여 생체내 데이터, 예를 들면, 동물 모형으로부터 추정될 수 있다.

[0463] 복용량 및 간격은 치료 효과를 유지하는 데 충분한, 항체의 혈장 수준을 제공하기 위해 개별적으로 조정될 수 있다. 주사에 의한 투여를 위한 통상의 환자 용량은 약 0.1 내지 50 mg/kg/일, 전형적으로 약 0.5 내지 1 mg/kg/일의 범위 안에 있다. 치료적으로 효과적인 혈장 수준은 매일 복수 용량을 투여함으로써 달성될 수 있다. 혈장에서 수준은 예를 들면, HPLC에 의해 계측될 수 있다.

[0464] 본원 발명의 항체의 유효 용량은 일반적으로, 실제적인 독성을 유발하지 않으면서 치료적 유익성을 제공할 것이다. 항체의 독성 및 치료 효능은 세포 배양액 또는 실험 동물에서 표준 제약학적 절차에 의해 결정될 수 있다. 세포 배양액 검정 및 동물 연구가 $LD_{50}$ (개체군의 50%에 치명적인 용량) 및 $ED_{50}$ (개체군의 50%에서 치료적으로 효과적인 용량)을 결정하는 데 이용될 수 있다. 독성 및 치료 효과 사이에 용량 비율은 치료 지수인데, 이것은 비율 $LD_{50}/ED_{50}$으로서 표현될 수 있다. 높은 치료 지수를 나타내는 항체가 선호된다. 한 양상에서, 본원 발명에 따른 항체는 높은 치료 지수를 나타낸다. 세포 배양액 검정 및 동물 연구로부터 획득된 데이터는 인간에서 이용에 적합한 용량의 범위를 공식화하는 데 이용될 수 있다. 용량은 바람직하게는, 독성이 거의 또는 전혀 없는 $ED_{50}$을 포함하는 순환 농도의 범위 안에 있다. 용량은 다양한 인자, 예를 들면, 이용된 약형, 활용된 투여 루트, 개체의 상태 등에 따라서 이러한 범위 내에서 변할 수 있다. 정확한 제제, 투여 루트 및 용량은 환자의 상태에 비추어 개별 의사에 의해 선택될 수 있다 (예를 들면, 본원에서 전체적으로 참조로서 편입되는 Fingl et al., 1975, in: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch. 1, p. 1을 참조한다).

[0465] 본원 발명의 항체로 치료되는 환자에 대한 주치의는 독성, 장기 기능장애 등으로 인해 투여를 언제 및 어떻게 종결하거나, 중단하거나, 조정할 지를 알고 있을 것이다. 반대로, 주치의는 또한, 만약 임상적 반응이 적절하지 않으면 (독성 배제) 치료를 더욱 높은 수준으로 조정하는 것을 알고 있을 것이다. 관심되는 장애의 관리에서 투여된 용량의 크기는 치료되는 질환의 중증도, 투여 루트 등에 따라서 변할 것이다. 질환의 중증도는 예를 들면 부분적으로, 표준 예후적 평가 방법에 의해 평가될 수 있다. 게다가, 용량 및 아마도 투약 빈도 또한 개별 환자의 연령, 체중 및 반응에 따라서 변할 것이다.

[0466] 본원 발명의 항체는 치료 동안 한 가지 또는 그 이상의 다른 작용제와 병용으로 투여될 수 있다. 예를 들면, 본원 발명의 항체는 적어도 한 가지 추가 치료제와 공동투여될 수 있다. 용어 "치료제"는 이런 치료가 필요한 개체에서 증상 또는 질환을 치료하기 위해 투여되는 임의의 작용제를 포괄한다. 이런 추가 치료제는 치료되는 특정 질환에 적합한 임의의 활성 성분, 바람직하게는 서로에 부정적으로 영향을 주지 않는 상보성 활성을 갖는 것들을 포함할 수 있다. 일정한 양상에서, 추가 치료제는 면역조정제, 정균제, 세포 부착의 저해제, 세포독성제, 세포 아폽토시스의 활성인자, 또는 아폽토시스성 유도인자에 대한 세포의 민감도를 증가시키는 작용제이다. 바람직한 양상에서, 추가 치료제는 다른 항암제, 예를 들면 미소관 교란물질, 대사길항물질, 국소이성화효소 저해제, DNA 삽입제, 알킬화제, 호르몬 요법, 키나아제 저해제, 수용체 길항제, 종양 세포 아폽토시스의 활성인자, 또는 항신생혈관제이다.

[0467] 이런 다른 작용제는 적절하게는 의도된 목적에 효과적인 양에서 조합으로 존재한다. 이런 다른 작용제의 효과량은 이용된 항체의 양, 장애 또는 치료의 유형, 및 상기 논의된 다른 인자에 의존한다. 이들 항체는 일반적으로, 본원에서 설명된 바와 동일한 용량에서 및 투여 루트로, 또는 본원에서 설명된 용량의 약 1 내지 99%에서, 또는 경험적으로/임상적으로 적합한 것으로 결정되는 임의의 용량에서 및 임의의 루트에 의해 이용된다.

[0468] 전술된 이런 병용 요법은 병용 투여 (여기서 2가지 또는 그 이상의 치료제가 동일한 또는 별개의 조성물 내에

포함된다) 및 별개 투여를 포괄하고, 이러한 사례에서, 본원 발명의 항체의 투여는 추가 치료제 및/또는 어쥬번트의 투여에 앞서, 투여와 동시에 및/또는 투여 이후에 발생할 수 있다. 본원 발명의 항체는 또한, 방사선요법과 병용될 수 있다.

[0469] **G. 제조 물품**

[0470] 본원 발명의 다른 양상에서, 전술된 장애의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용한 물질을 내포하는 제조 물품이 제공된다. 제조 물품은 용기 및 용기 상에 또는 용기와 결합된 표지 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적합한 용기는 예를 들면, 병, 바이알, 주사기, IV 용액 백 등을 포함한다. 이들 용기는 다양한 물질, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 용기는 단독으로, 또는 질환을 치료하고, 예방하고/하거나 진단하는 데 효과적인 다른 조성물과 조합으로 조성물을 보유하고, 무균 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들면, 용기는 정맥내 용액 백, 또는 피하 주사 바늘에 의해 관통가능한 마개를 갖는 바이알일 수 있다). 조성물에서 적어도 한 가지 활성제는 본원 발명의 항체이다. 표지 또는 포장 삽입물은 조성물이 선택 질환을 치료하는 데 이용된다는 것을 지시한다. 게다가, 제조 물품은 (a) 조성물이 그 안에 내포된 첫 번째 용기 (여기서 상기 조성물은 본원 발명의 항체를 포함한다); 및 (b) 조성물이 그 안에 내포된 두 번째 용기 (여기서 상기 조성물은 추가 세포독성제 또는 만약 그렇지 않으면 치료제를 포함한다)를 포함할 수 있다. 본원 발명의 이러한 양상에서 제조 물품은 조성물이 특정 질환을 치료하는 데 이용될 수 있다는 것을 지시하는 포장 삽입물을 더욱 포함할 수 있다. 대안으로 또는 부가적으로, 제조 물품은 제약학적으로 허용되는 완충액, 예컨대 정균성 주사용수 (BWFI), 인산염-완충된 염수, 링거액 및 덱스트로스 용액을 포함하는 두 번째 (또는 세 번째) 용기를 더욱 포함할 수도 있다. 이것은 다른 완충액, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기를 비롯하여, 상업적 관점 및 이용자 관점으로부터 바람직한 다른 물질을 더욱 포함할 수도 있다.

[0471] **H. 진단 및 검출을 위한 방법 및 조성물**

[0472] 일정한 양상에서, 본원에서 제공된 임의의 항체는 생물학적 표본 내에서 표적 (예를 들면, CD3, TYRP-1, EGFRvIII)의 존재를 검출하는 데 유용하다. 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "검출하는"은 정량적 또는 정성적 검출을 포괄한다. 일정한 양상에서, 생물학적 표본은 세포 또는 조직, 예컨대 전립선 조직을 포함한다.

[0473] 한 양상에서, 진단 또는 검출의 방법에서 이용을 위한 본원 발명에 따른 항체가 제공된다. 추가의 양상에서, 생물학적 표본 내에서 CD3, TYRP-1 또는 EGFRvIII의 존재를 검출하는 방법이 제공된다. 일정한 양상에서, 상기 방법은 CD3, TYRP-1 또는 EGFRvIII에 항체의 결합을 허용하는 조건 하에 생물학적 표본을 본원 발명의 항체와 접촉시키는 단계, 및 복합체가 항체 및 CD3, TYRP-1 또는 EGFRvIII 사이에 형성되는 지를 검출하는 단계를 포함한다. 이런 방법은 시험관내 또는 생체내 방법일 수 있다. 한 양상에서, 본원 발명의 항체는 예를 들면, CD3, TYRP-1 및/또는 EGFRvIII이 환자의 선별을 위한 바이오마커인 경우에, CD3, TYRP-1 및/또는 EGFRvIII에 결합하는 항체를 이용한 요법에 적격인 개체를 선별하는 데 이용된다.

[0474] 본원 발명의 항체를 이용하여 진단될 수 있는 예시적인 장애는 암, 특히 피부암 또는 뇌암을 포함한다.

[0475] 일정한 양상에서, 본원 발명에 따른 항체가 제공되고, 여기서 상기 항체는 표지화된다. 표지는 직접적으로 검출되는 표지 또는 모이어티 (예컨대, 형광, 색소생산, 전자 밀도, 화학발광 및 방사성 표지)뿐만 아니라 예를 들면, 효소 반응 또는 분자 상호작용을 통해 간접적으로 검출되는 모이어티, 예컨대 효소 또는 리간드를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 예시적인 표지는 염료 전구체를 산화시키는 과산화수소를 이용하는 효소, 예컨대 HRP, 락토페록시다아제 또는 마이크로페록시다아제, 비오틴/아비딘, 스핀 표지, 박테리오파지 표지, 안정된 유리 라디칼 등과 연계된 방사성 동위원소 $^{32}P$, $^{14}C$, $^{125}I$, $^{3}H$ 및 $^{131}I$, 형광단, 예컨대 희토류 킬레이트 또는 플루오레세인 및 이의 유도체, 로다민 및 이의 유도체, 단실, 움벨리페론, 루시페라아제, 예를 들면, 개똥벌레 루시페라아제 및 세균 루시페라아제 (U.S. 특허 번호 4,737,456), 루시페린, 2,3-디히드로프타라진디온, 양고추냉이 과산화효소 (HRP), 알칼리 인산분해효소, β-갈락토시다아제, 글루코아밀라아제, 라이소자임, 사카라이드 옥시다아제, 예를 들면, 글루코오스 옥시다아제, 갈락토오스 옥시다아제 및 글루코오스-6-인산염 탈수소효소, 헤테로환상 옥시다아제, 예컨대 요산분해효소 및 크산틴 옥시다아제를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0476] III. 서열

| | 아미노산 서열 | 서 열 번호 |
|---|---|---|
| $CD3_{orig}$ HCDR1 | TYAMN | 1 |
| $CD3_{opt}$ HCDR1 | SYAMN | 2 |
| $CD3_{orig}$ / $CD3_{opt}$ HCDR2 | RIRSKYNNYATYYADSVKG | 3 |
| $CD3_{orig}$ HCDR3 | HGNFGNSYVSWFAY | 4 |
| $CD3_{opt}$ HCDR3 | HTTFPSSYVSYYGY | 5 |
| $CD3_{orig}$ VH | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYAD SVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS | 6 |
| $CD3_{opt}$ VH | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFQFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYAD SVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHTTFPSSYVSYYGYWGQGTLVTVSS | 7 |
| $CD3_{orig}$ / $CD3_{opt}$ LCDR1 | GSSTGAVTTSNYAN | 8 |
| $CD3_{orig}$ / $CD3_{opt}$ LCDR2 | GTNKRAP | 9 |
| $CD3_{orig}$ / $CD3_{opt}$ LCDR3 | ALWYSNLWV | 10 |
| $CD3_{orig}$ / $CD3_{opt}$ VL | QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARF SGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL | 11 |
| $CD3_{orig}$ IgG HC | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYAD SVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSP | 12 |
| $CD3_{opt}$ IgG HC | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFQFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYAD SVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHTTFPSSYVSYYGYWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSP | 13 |
| $CD3_{orig}$ / $CD3_{opt}$ IgG LC | QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARF SGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 14 |
| TYRP1 HCDR1 | DYFLH | 15 |
| TYRP1 HCDR2 | WINPDNGNTVYAQKFQG | 16 |
| TYRP1 HCDR3 | RDYTYEKAALDY | 17 |
| TYRP1 VH | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYFLHWVRQAPGQGLEWMGWINPDNGNTVYAQKF QGRVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRRDYTYEKAALDYWGQGTLVTVSS | 18 |
| TYRP1 LCDR1 | RASGNIYNYLA | 19 |
| TYRP1 LCDR2 | DAKTLAD | 20 |

[0477]

| | | |
|---|---|---|
| TYRP1 LCDR3 | QHFWSLPFT | 21 |
| TYRP1 VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASGNIYNYLAWYQQKPGKVPKLLIYDAKTLADGVPSRFSG<br>SGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQHFWSLPFTFGQGTKLEIK | 22 |
| TYRP1 VH-CH1(BE) - $CD3_{orig}$/$CD3_{opt}$ VL-CH1 - Fc (노브, PGLALA) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYFLHWVRQAPGQGLEWMGWINPDNGNTVYAQKF<br>QGRVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRRDYTYEKAALDYWGQGTLVTVSSASTKGPS<br>VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV<br>PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLT<br>CGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDE<br>AEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT<br>VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS<br>CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE<br>VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ<br>VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT<br>VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP | 23 |
| TYRP1 VH-CH1(BE)-Fc (홀, PGLALA) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYFLHWVRQAPGQGLEWMGWINPDNGNTVYAQKF<br>QGRVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRRDYTYEKAALDYWGQGTLVTVSSASTKGPS<br>VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV<br>PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG<br>KEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS<br>P | 24 |
| TYRP1 VL-CL(RK) | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASGNIYNYLAWYQQKPGKVPKLLIYDAKTLADGVPSRFSG<br>SGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQHFWSLPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSG<br>TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY<br>ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 25 |
| $CD3_{orig}$ VH-CL | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYAD<br>SVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASV<br>AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS<br>LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 26 |
| $CD3_{opt}$ VH-CL | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFQFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYAD<br>SVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHTTPFSSYVSYYGYWGQGTLVTVSSASV<br>AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS<br>LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 27 |
| 인간 CD3 엡실론 스토크 - Fc(노브) - Avi | QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLK<br>EFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVSENCVDEQLYFQGGSPKSADKTHTCPPCPAP<br>ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY<br>NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTK<br>NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS<br>CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE | 28 |
| 인간 CD3 델타 스토크 - Fc (홀) - Avi | FKIPIEELEDRVFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKEST<br>VQVHYRMCRSEQLYFQGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS<br>HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP<br>IEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP<br>PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQK | 29 |

[0478]

| | | |
|---|---|---|
| | IEWHE | |
| 시노몰구스 CD3 엡실론 스토크 - Fc (노브) - Avi | QDGNEEMGSITQTPYQVSISGTTVILTCSQHLGSEAQWQHNGKNKEDSGDRLFLPEFSEMEQSG<br>YYVCYPRGSNPEDASHHLYLKARVSENCVDEQLYFQGGSPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVF<br>LPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV<br>LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV<br>KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSPFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH<br>NHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE | 30 |
| 시노몰구스 CD3 델타 스토크 - Fc (홀) - Avi | PKIPVEELEDRVFVKCNTSVTWVEGTVGTLLTNNTRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESA<br>VQVHYRMSQNCVDEQLYFQGGSPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPPKPKDTLMISRTPE<br>VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK<br>VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGG<br>LNDIFEAQKIEWHE | 31 |
| 인간 TYRP1 BCD - Fc (노브) - Avi | QFPRQCATVEALRSGMCCPDLSPVSGPGTDRCGSSSGRGRCEAVTADSRPHSPQYPHDGRDDRE<br>VWPLRFPNRTCHCNGNFSGHNCGTCRPGWRGAACDQRVLIVRRNLLDLSKEEKNHFVRALDMAK<br>RTTHPLFVIATRRSEEILGPDGNTPQFENISIYNYFVWTHYYSVEKTFLGVGQESFGEVDFSHE<br>GPAFLTWHRYHLLRLEKDMQEMLQEPSFSLPYWNFATGKNVCDICTDDLMGSRSNFDSTLISPN<br>SVFSQWRVVCDSLEDYDTLGTLCNSTEDGPIRRNPAGNVARPMVQRLPEPQDVAQCLEVGLFDT<br>PPFYSNSTNSFRNTVEGYSDPTGKYDPAVRSLHNLAHLFLNGTGGQTHLSPNDPIFVLLHTFTD<br>AVFDEWLRRYNADISTFPLENAPIGHNRQYNMVPFWPPVTNTEMFVTAPDNLGYTYEIQWPSRE<br>FSVPEGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW<br>YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKG<br>QPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF<br>LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE | 32 |
| 시노몰구스 TYRP1 BCD - Fc (노브) - Avi | QFPRECATVEALRSGMCCPDLSPMSGPGTDRCGSSSGRGRCEAVTADSRPHSPRYPHDGRDDRE<br>VWPLRFPNRTCHCNGNFSGHNCGTCRPGWRGAACDQRVLVVRRNLLDLSKEEKNHFVRALDMAK<br>RTTHPLFVIATRRSEEILGPDGNTPQFENISIYNYFVWTHYYSVEKTFLGAGQESFGEVDFSHE<br>GPAFLTWHRYHLLRLEKDMQEMLQEPSFSLPYWNFATGKNVCDICTDDLMGSRSNFDSTLISPN<br>SVFSQWRVVCDSLEDYDTLGTLCNSTESGPIRRNPAGNVARPMVQRLPEPQDVAQCLEVGLFDT<br>PPFYSNSTNSFRNTVEGYSDPTGKYDPAVRSLHNLAHLFLNGTGGQTHLSPNDPIFVLLHTFTD<br>AVFDEWLRRYNADISTFPLENAPIGHNRQYNMVPFWPPVTNTEMFVTAPDNLGYTYEVQWPSRE<br>FSVPGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY<br>VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ<br>PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL<br>YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE | 33 |
| 생쥐 TYRP1 BCD - Fc (노브) - Avi | QFPRECANIEALRRGVCCPDLLPSSGPGTDPCGSSSGRGRCVAVIADSRPHSRHYPHDGKDDRE<br>AWPLRFPNRTCQCNDNFSGHNCGTCRPGWRGAACNQKILTVRRNLLDLSPEEKSHFVRALDMAK<br>RTTHPQFVIATRRLEDILGPDGNTPQFENISVYNYFVWTHYYSVEKTFLGTGQESFGDVDFSHE<br>GPAFLTWHRYHLLQLERDMQEMLQEPSFSLPYWNFATGKNVCDVCTDDLMGSRSNFDSTLISPN<br>SVFSQWRVVCESLEEYDTLGTLCNSTEGGPIRRNPAGNVGRPAVQRLPEPQDVTQCLEVRVFDT<br>PPFYSNSTDSFRNTVEGYSAPTGKYDPAVRSLHNLAHLFLNGTGGQTHLSPNDPIFVLLHTFTD<br>AVFDEWLRRYNADISTFPLENAPIGHNRQYNMVPFWPPVTNTEMFVTAPDNLGYAYEVQWPGQE<br>FTVSEGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW<br>YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKG | 34 |

[0479]

| | | |
|---|---|---|
| | QPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF<br>LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE | |
| Fc (홀) | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV<br>HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQV<br>CTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTV<br>DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSP | 35 |
| EGFRvIII ECD - Avi - His | LEEKKGNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATN<br>IKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHA<br>FENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGT<br>SGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPR<br>EFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYA<br>DAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSVDGGSPTPPTPGGGSGLNDIFEAQKIEWHE<br>ARAHHHHHH | 36 |
| EGFRvIII P056.021 HCDR1 | SYWIA | 37 |
| EGFRvIII P056.021 HCDR2 | VIHPYDSDTRYSPSFQG | 38 |
| EGFRvIII P056.021 HCDR3 | VSRSSYAFDY | 39 |
| EGFRvIII P056.021 VH | EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFDSYWIAWVRQMPGKGLEWMGVIHPYDSDTRYSPSF<br>QGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARVSRSSYAFDYWGQGTLVTVSS | 40 |
| EGFRvIII P056.021 LCDR1 | KSSQSVLYSSNNKNYLA | 41 |
| EGFRvIII P056.021 LCDR2 | WASTRES | 42 |
| EGFRvIII P056.021 LCDR3 | QQVHSGPPVT | 43 |
| EGFRvIII P056.021 VL | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGV<br>PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQVHSGPPVTFGQGTKVEIK | 44 |
| EGFRvIII P056.052 HCDR1 | NYWIG | 45 |
| EGFRvIII P056.052 HCDR2 | TIYPGDSDRRYSPSFQG | 46 |
| EGFRvIII P056.052 HCDR3 | VSRSSYAFDY | 47 |
| EGFRvIII P056.052 VH | EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFMNYWIGWVRQMPGKGLEWMGTIYPGDSDRRYSPSF<br>QGQVTLSADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARVSRSSYAFDYWGQGTLVTVSS | 48 |

[0480]

| | | |
|---|---|---|
| EGFRvIII P056.052 LCDR1 | KSSQSVLYSSNNKNYLA | 49 |
| EGFRvIII P056.052 LCDR2 | WASTRES | 50 |
| EGFRvIII P056.052 LCDR3 | QQVHSGPPVT | 51 |
| EGFRvIII P056.052 VL | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGV PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQVHSGPPVTFGQGTKVEIK | 52 |
| EGFRvIII P047.019 HCDR1 | SIWIH | 53 |
| EGFRvIII P047.019 HCDR2 | TIYPGDSDTRYSPSFQG | 54 |
| EGFRvIII P047.019 HCDR3 | TGPGLAFDY | 55 |
| EGFRvIII P047.019 VH | EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFPSIWIHWVRQMPGKGLEWMGTIYPGDSDTRYSPSF QGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARTGPGLAFDYWGQGTLVTVSS | 56 |
| EGFRvIII P047.019 LCDR1 | KSSQSVLYSSNNKNYLA | 57 |
| EGFRvIII P047.019 LCDR2 | WASTRES | 58 |
| EGFRvIII P047.019 LCDR3 | QQSYSTPIT | 59 |
| EGFRvIII P047.019 VL | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGV PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSYSTPITFGQGTKVEIK | 60 |
| EGFRvIII P057.012 HCDR1 | NYWIA | 61 |
| EGFRvIII P057.012 HCDR2 | IIYPDDSDTRYSPSFQG | 62 |
| EGFRvIII P057.012 HCDR3 | ATNIASGGYFDY | 63 |
| EGFRvIII P057.012 VH | EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFANYWIAWVRQMPGKGLEWMGIIYPDDSDTRYSPSF QGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARATNIASGGYFDYWGQGTLVTVSS | 64 |
| EGFRvIII P057.012 | KSSQSVLWNSNNKNYLA | 65 |

[0481]

| | | |
|---|---|---|
| LCDR1 | | |
| EGFRvIII P057.012 LCDR2 | WASKRES | 66 |
| EGFRvIII P057.012 LCDR3 | QQSYSAPIT | 67 |
| EGFRvIII P057.012 VL | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLWNSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASKRESGV PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSYSAPITFGQGTKVEIK | 68 |
| EGFRvIII P057.011 HCDR1 | RRWIA | 69 |
| EGFRvIII P057.011 HCDR2 | IIYPGDSDTRYSPSFQG | 70 |
| EGFRvIII P057.011 HCDR3 | ATNIASGGYFDY | 71 |
| EGFRvIII P057.011 VH | EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYNFGRRWIAWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSF QGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARATNIASGGYFDYWGQGTLVTVSS | 72 |
| EGFRvIII P057.011 LCDR1 | KSSQSVLWNSNNKNYLA | 73 |
| EGFRvIII P057.011 LCDR2 | WASKRES | 74 |
| EGFRvIII P057.011 LCDR3 | QQSYSAPIT | 75 |
| EGFRvIII P057.011 VL | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLWNSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASKRESGV PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSYSAPITFGQGTKVEIK | 76 |
| EGFRvIII P056.027 HCDR1 | NNWIA | 77 |
| EGFRvIII P056.027 HCDR2 | VIYPGDSDKRYSPSFQG | 78 |
| EGFRvIII P056.027 HCDR3 | VSRSSYAFDY | 79 |
| EGFRvIII P056.027 VH | EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFGNNWIAWVRQMPGKGLEWMGVIYPGDSDKRYSPSF QGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARVSRSSYAFDYWGQGTLVTVSS | 80 |
| EGFRvIII P056.027 LCDR1 | KSSQSVLYSSNNKNYLA | 81 |
| EGFRvIII P056.027 | WASTRES | 82 |

[0482]

| | | |
|---|---|---|
| LCDR2 | | |
| EGFRvIII P056.027 LCDR3 | QQVHSGPPVT | 83 |
| EGFRvIII P056.027 VL | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGV PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQVHSGPPVTFGQGTKVEIK | 84 |
| EGFRvIII P063.056 HCDR1 | SYWIA | 85 |
| EGFRvIII P063.056 HCDR2 | VIHPYDSDTRYSPSFQG | 86 |
| EGFRvIII P063.056 HCDR3 | VSRSSYAFDY | 87 |
| EGFRvIII P063.056 VH | EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFDSYWIAWVRQMPGKGLEWMGVIHPYDSDTRYSPSF QGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARVSRSSYAFDYWGQGTLVTVSS | 88 |
| EGFRvIII P063.056 LCDR1 | KSSQSVLYSSNNKNYLA | 89 |
| EGFRvIII P063.056 LCDR2 | WASTRES | 90 |
| EGFRvIII P063.056 LCDR3 | QQQRDGPPVT | 91 |
| EGFRvIII P063.056 VL | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGV PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQQRDGPPVTFGQGTKVEIK | 92 |
| EGFRvIII P064.078 HCDR1 | SYWIA | 93 |
| EGFRvIII P064.078 HCDR2 | VIHPYDSDTRYSPSFQG | 94 |
| EGFRvIII P064.078 HCDR3 | VSRLSYALDY | 95 |
| EGFRvIII P064.078 VH | EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFDSYWIAWVRQMPGKGLEWMGVIHPYDSDTRYSPSF QGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARVSRLSYALDYWGQGTLVTVSS | 96 |
| EGFRvIII P064.078 LCDR1 | KSSQSVLYSSNNKNYLA | 97 |
| EGFRvIII P064.078 LCDR2 | WASTRES | 98 |
| EGFRvIII P064.078 | QQVHSGPPVT | 99 |

[0483]

| | | |
|---|---|---|
| LCDR3 | | |
| EGFRvIII P064.078 VL | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGV PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQVHSGPPVTFGQGTKVEIK | 100 |
| EGFRvIII P065.036 HCDR1 | SYWIA | 101 |
| EGFRvIII P065.036 HCDR2 | VIHPYDSDTRYSPSFQG | 102 |
| EGFRvIII P065.036 HCDR3 | VSRSSYALDY | 103 |
| EGFRvIII P065.036 VH | EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFDSYWIAWVRQMPGKGLEWMGVIHPYDSDTRYSPSF QGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARVSRSSYALDYWGQGTLVTVSS | 104 |
| EGFRvIII P065.036 LCDR1 | KSSQSVLYSSNNKNYLA | 105 |
| EGFRvIII P065.036 LCDR2 | WASTRES | 106 |
| EGFRvIII P065.036 LCDR3 | QQVYSGPPVT | 107 |
| EGFRvIII P065.036 VL | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGV PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQVYSGPPVTFGQGTKVEIK | 108 |
| EGFRvIII VH-CH1(EE) - $CD3_{orig}$/$CD3_{opt}$ VL-CH1 - Fc (노브, PGLALA) | EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFDSYWIAWVRQMPGKGLEWMGVIHPYDSDTRYSPSF QGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARVSRSSYAPDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAE YYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP | 109 |
| EGFRvIII VH-CH1(EE)-Fc (홀, PGLALA) | EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFDSYWIAWVRQMPGKGLEWMGVIHPYDSDTRYSPSF QGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARVSRSSYAPDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP | 110 |
| EGFRvIII VL-CL(RK) | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGV PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQQRDGPPVTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD | 111 |

[0484]

| | | |
|---|---|---|
| | YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | |
| $CD3_{orig}$ VH-CL | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYAD<br>SVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASV<br>AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS<br>LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 26 |
| $CD3_{opt}$ VH-CL | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFQFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYAD<br>SVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHTTPFSSYVSYYGYWGQGTLVTVSSASV<br>AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS<br>LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 27 |
| 인간 CD3 | QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLK<br>EFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLLVY<br>YWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRI | 112 |
| 시노몰구스 CD3 | QDGNEEMGSITQTPYQVSISGTTVILTCSQHLGSEAQWQHNGKNKEDSGDRLFLPEFSEMEQSG<br>YYVCYPRGSNPEDASHHLYLKARVCENCMEMDVMAVATIVIVDICITLGLLLLVYYWSKNRKAK<br>AKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQQDLYSGLNQRRI | 113 |
| 인간 TYRP1 | QFPRQCATVEALRSGMCCPDLSPVSGPGTDRCGSSSGRGRCEAVTADSRPHSPQYPHDGRDDRE<br>VWPLRPFNRTCHCNGNFSGHNCGTCRPGWRGAACDQRVLIVRRNLLDLSKEEKNHFVRALDMAK<br>RTTHPLFVIATRRSEEILGPDGNTPQPENISIYNYPVWTHYYSVKKTPLGVGQESFGEVDFSHE<br>GPAFLTWHRYHLLRLEKDMQEMLQEPSFSLPYWNFATGKNVCDICTDDLMGSRSNFDSTLISPN<br>SVFSQWRVVCDSLEDYDTLGTLCNSTEDGPIRRNPAGNVARPMVQRLPEPQDVAQCLEVGLFDT<br>PPFYSNSTNSFRNTVEGYSDPTGKYDPAVRSLHNLAHLFLNGTGGQTHLSPNDPIFVLLHTFTD<br>AVFDEWLRRYNADISTFPLENAPIGHNRQYNMVPFWPPVTNTEMFVTAPDNLGYTYEIQWPSRE<br>FSVPEIIAIAVVGALLLVALIFGTASYLIRARRSMDEANQPLLTDQYQCYAEEYEKLQNPNQSV<br>V | 114 |
| 인간 EGFRvIII | LEEKKGNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEPKDSLSINATN<br>IKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHA<br>FENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGT<br>SGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPR<br>EFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYA<br>DAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLVVALGIGLFMRRRHIVR<br>KRTLRRLLQERELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEGEKVK<br>IPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLLGICLTSTVQLITQLMPFGCLLDYVR<br>EHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLVKTPQHVKITDFGLAKLLGAEEK<br>EYHAEGGKVPIKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGSKPYDGIPASEISSILEKGE<br>RLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMARDPQRYLVIQGDERMHLPSPTDS<br>NFYRALMDEEDMDDVVDADEYLIPQQGFFSSPSTSRTPLLSSLSATSNNSTVACIDRNGLQSCP<br>IKEDSFLQRYSSDPTGALTEDSIDDTFLPVPEYINQSVPKRPAGSVQNPVYHNQPLNPAPSRDP<br>HYQDPHSTAVGNPEYLNTVQPTCVNSTFDSPAHWAQKGSHQISLDNPDYQQDFFPKEAKPNGIF<br>KGSTAENAEYLRVAPQSSEFIGA | 115 |
| 인간 EGFR | LEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEVAGY<br>VLIALNTVERIPLENLQIIRGNMYYENSYALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEILHGAVRFSN<br>NPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNHLGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQKLTKIICA<br>QQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTCPPLMLYNPTTYQMDVN<br>PEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGE<br>FKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQ<br>AWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYA<br>NTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECV<br>DKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVM<br>GENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGI<br>GLFMRRRHIVRKRTLRRLLQERELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYK<br>GLWIPEGEKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLLGICLTSTVQLITQL<br>MPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLVKTPQHVKITDF<br>GLAKLLGAEEKEYHAEGGKVPIKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGSKPYDGIPA<br>SEISSILEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEPSKMARDPQRYLVIQGD<br>ERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVDADEYLIPQQGFFSSPSTSRTPLLSSLSATSNNSTVA<br>CIDRNGLQSCPIKEDSFLQRYSSDPTGALTEDSIDDTFLPVPEYINQSVPKRPAGSVQNPVYHN | 116 |

[0485]

| | | |
|---|---|---|
| | QPLNPAPSRDPHYQDPHSTAVGNPEYLNTVQPTCVNSTFDSPAHWAQKGSHQISLDNPDYQQDF<br>FPKEAKPNGIFKGSTAENAEYLRVAPQSSEFIGA | |
| hIgG1 Fc 영역 | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV<br>HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV<br>YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV<br>DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP | 117 |
| 링커 | GGGGSGGGGS | 118 |
| 링커 | DGGGGSGGGGS | 119 |
| 인간 카파 CL 도메인 | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS<br>TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 120 |
| 인간 람다 CL 도메인 | QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNK<br>YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS | 121 |
| 인간 IgG1 중쇄 불변 영역 (CH1-CH2-CH3) | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS<br>LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP<br>KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL<br>HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY<br>PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT<br>QKSLSLSP | 122 |

[0486]

[0487] **IV. 실시예**

[0488] 다음은 본원 발명의 방법과 조성물의 실시예이다. 앞서 제공된 일반적인 설명을 고려하여, 다양한 다른 양상이 실시될 수 있는 것으로 이해된다.

[0489] **실시예 1 - 최적화된 CD3 결합체의 산출**

[0490] 본원에서 "$CD3_{orig}$"로 명명되고 각각, 서열 번호 6 및 11의 VH와 VL 서열을 포함하는 전술된 (예를 들면 본원에서 참조로서 편입되는 WO 2014/131712를 참조한다) CD3 결합체로부터 시작하여, 우리는 중쇄 CDR3의 Kabat 위치

97 및 100에서 2개의 아스파라긴 탈아미드화 서열 모티프의 제거에 의해 이러한 결합체의 특성을 최적화하는 것을 목표로 하였다.

[0491] 이러한 목표를 위해, 우리는 파지 전시에 적합한, Kabat 위치 97 및 100에서 아스파라긴 둘 모두가 제거되고, 이에 더하여 친화성-성숙 과정을 통해 Asn97 및 Asn100을 대체함으로써 유발된 친화성의 상실을 보상하기 위해 CDR H1, H2 및 H3이 무작위화된 중쇄의 항체 라이브러리를 산출하였다.

[0492] 이러한 라이브러리는 소수 외피 단백질 p3에 융합을 통해 실모양 파지 위에 놓이고 (Marks et al. (1991) *J Mol Biol* **222**, 581-597), 재조합 CD3ε에 결합에 대해 선별되었다.

[0493] 초기 선별검사에서, Fab 단편 (대장균 (E. coli)에서 생산됨)으로서 SPR에 의해 계측될 때 재조합 항원 상에서 허용가능 결합을 보여주는 10개의 후보 클론이 확인되었다.

[0494] 하지만, 이들 클론 중에서 단지 하나만 IgG 형식으로의 전환 후 유세포분석법에 의해 계측될 때 CD3 발현 세포에 대한 허용가능 결합 활성을 보여주었다.

[0495] 본원에서 "$CD3_{opt}$"로 명명되고 각각, 서열 번호 7 및 11의 VH와 VL 서열을 포함하는 선별된 클론은 추가로 평가되고, 하기에서 설명된 바와 같이 이중특이적 형식으로 전환되었다.

[0496] **실시예 2 - CD3에 대한, 최적화된 CD3 결합체의 결합**

[0497] 재조합 CD3에 결합

[0498] 재조합 CD3에 결합은 Fc 영역 내에 P329G L234A L235A ("PGLALA", EU 넘버링) 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 형식의 최적화된 CD3 결합체 "$CD3_{opt}$" 및 본래 CD3 결합체 "$CD3_{orig}$" (서열 번호 12와 14 ($CD3_{orig}$) 및 서열 번호 13과 14 ($CD3_{opt}$)) 둘 모두에 대한 표면 플라스몬 공명 (SPR)에 의해 결정되었다.

[0499] 탈아미드화 부위 제거의 효과 및 항체의 안정성에 대한 이의 효과를 사정하기 위해, 재조합 CD3에 대한 본래 및 최적화된 CD3 결합체의 결합이 37℃ 또는 40℃에서 14 일 동안 온도 스트레스 후 검사되었다. -80℃에서 보관된 표본이 참조로서 이용되었다. 참조 표본 및 40℃에서 스트레스 부하된 표본은 20 mM His, 140 mM NaCl, pH 6.0에서, 및 37℃에서 스트레스 부하된 표본은 PBS, pH 7.4에서, 1.2-1.3 mg/ml의 농도로 존재하였다. 스트레스 기간 (14 일) 후, PBS에서 표본이 추가 분석을 위해 20 mM His, 140 mM NaCl, pH 6.0에 다시 투석되었다.

[0500] 표본의 상대적 활성 농도 (RAC)가 하기와 같이 SPR에 의해 결정되었다.

[0501] SPR은 Biacore T200 기기 (GE Healthcare)에서 수행되었다. 항-Fab 포획 항체 (GE Healthcare, #28958325)가 표준 아민 연계 화학을 이용하여 시리즈 S 센서 칩 CM5 (GE Healthcare) 위에 고정되어, 4000 - 6000 공명 단위 (RU)의 표면 밀도가 유발되었다. 작업 및 희석 완충액으로서, HBS-P+ (10 mM HEPES, 150 mM NaCl pH 7.4, 0.05% 계면활성제 P20)가 이용되었다. 2 μg/ml의 농도를 갖는 CD3 항체가 5 μl/분의 유속에서 60 s 동안 주입되었다. CD3 항원 (하기 참조)이 120 s 동안 10 μg/ml의 농도로 주입되었고, 해리가 5 μl/분의 유속에서 120 s 동안 모니터링되었다. 각각 60 s 동안 10 mM 글리신 pH 2.1의 2번 연속 주입에 의해 칩 표면이 재생되었다. 블랭크 주입을 차감함으로써, 및 블랭크 대조 흐름 셀로부터 획득된 반응을 차감함으로써 벌크 굴절률 차이가 교정되었다. 평가를 위해, 결합 반응이 주입 종결 5 초 후에 취해졌다. 결합 신호를 정규화하기 위해, CD3 결합이 항-Fab 반응 (고정된 항-Fab 항체 상에서 CD3 항체의 포획 시에 획득된 신호 (RU))에 의해 나눠졌다. 상대적 활성 농도가 각각의 온도 스트레스 부하된 표본을 상응하는 스트레스 부하되지 않은 표본에 참조함으로써 계산되었다.

[0502] 이용된 항원은 노브 인투 홀 변형 및 C 말단 Avi-태그를 갖는 인간 Fc 도메인에 융합된 CD3 델타 및 CD3 엡실론 엑토도메인의 이종이합체이었다 (참조: 서열 번호 28 및 29).

[0503] 이러한 실험의 결과는 도 2에서 도시된다. 목격될 수 있는 바와 같이, 최적화된 CD3 결합체 $CD3_{opt}$는 본래 CD3 결합체 $CD3_{orig}$와 비교하여, 온도 스트레스 (37℃, pH 7.4에서 2 주) 후 CD3에 대한 강하게 향상된 결합을 보여주었다. 이러한 결과는 탈아미드화 부위 제거가 성공적이었고, 생체내 반감기뿐만 아니라 중성 pH에서 항체의 조제에 유관한 우수한 안정성 특성을 갖는 항체를 산출하였다는 것을 증명한다.

[0504] Jurkat 세포 상에서 CD3에 결합

[0505] 인간 리포터 T 세포주 Jurkat NFAT 상에서 CD3에 결합은 Fc 영역 내에 P329G L234A L235A ("PGLALA", EU 넘버

링) 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 형식의 최적화된 CD3 결합체 "$CD3_{opt}$" 및 본래 CD3 결합체 "$CD3_{orig}$" (서열 번호 12와 14 ($CD3_{orig}$) 및 서열 번호 13과 14 ($CD3_{opt}$)) 둘 모두에 대해 FACS에 의해 결정되었다.

[0506] Jurkat-NFAT 리포터 세포 (GloResponse Jurkat NFAT-RE-luc2P; Promega #CS176501)는 인간 CD3을 발현하는, NFAT 프로모터를 갖는 인간 급성 림프성 백혈병 리포터 세포주이다. 이들 세포는 ml당 0.1-0.5 mio 세포로 RPMI1640, 2g/l 글루코오스, 2 g/l $NaHCO_3$, 10% FCS, 25 mM HEPES, 2 mM L-글루타민, 1 x NEAA, 1 x 나트륨-피루브산염에서 배양되었다. 세포가 계대될 때는 언제든지, ml당 200 μg 최종 농도의 히그로마이신 B가 첨가되었다.

[0507] 결합 검정을 위해, Jurkat NFAT 세포가 수확되고, PBS로 세척되고, FACS 완충액에서 재현탁되었다. 항체 염색이 96 웰 둥근 바닥 평판에서 수행되었다. 이런 이유로 100,000 내지 200,000개 세포가 웰마다 파종되었다. 평판이 400 x g에서 4 분 동안 원심분리되었고, 상층액이 제거되었다. 검사 항체가 FACS 완충액에서 희석되었고, 20 μl의 항체 용액이 4 ℃에서 30 분 동안 이들 세포에 첨가되었다. 결합되지 않은 항체를 제거하기 위해, 이들 세포는 희석된 이차 항체 (PE-접합된 AffiniPure F(ab')2 단편 염소 항인간 IgG Fcg 단편 특이적; Jackson ImmunoResearch #109-116-170)의 첨가 전 FACS 완충액으로 2회 세척되었다. 4 ℃에서 30 분 배양 후, 결합되지 않은 이차 항체가 씻겨 나갔다. 계측 전, 이들 세포는 200 μl FACS 완충액에서 재현탁되고, 이후, BD Canto II 장치를 이용하여 유세포분석법에 의해 분석되었다.

[0508] 도 3에서 도시된 바와 같이, 최적화된 CD3 결합체 "$CD3_{opt}$" 및 본래 CD3 결합체 "$CD3_{orig}$"는 Jurkat 세포 상에서 CD3에 동등하게 잘 결합하였다.

[0509] **실시예 3 - 최적화된 CD3 결합체의 기능적 활성**

[0510] 최적화된 CD3 결합체 "$CD3_{opt}$"의 기능적 활성은 Jurkat 리포터 세포 검정에서 검사되고, 본래 CD3 결합체 "$CD3_{orig}$"의 활성과 비교되었다. 이들 IgG의 기능적 활성을 검사하기 위해, 증가하는 농도의 $CD3_{opt}$ 인간 IgG1 PGLALA 또는 $CD3_{orig}$ 인간 IgG1 PGLALA의 존재에서 항-PGLALA 발현 CHO 세포가 Jurkat NFAT 리포터 세포와 공동 배양되었다. T 세포 교차연결 시에 Jurkat NFAT 리포터 세포 상에서 CD3의 활성화는 루시페라아제의 생산을 유도하고, 발광이 활성화 마커로서 계측될 수 있다. 항-PGLALA 발현 CHO 세포에 결합할 수 없고, 이런 이유로 Jurkat NFAT 세포 상에서 교차연결될 수 없는 $CD3_{orig}$ 인간 IgG1 wt가 음성 대조로서 포함되었다. 검정의 개략적 도해는 도 4에서 제공된다.

[0511] 항-PGLALA 발현 CHO 세포는 인간 $IgG_1$ Fc(PGLALA)에 특이적으로 결합하는 항체를 표면 상에서 발현하도록 가공된 CHO-K1 세포이다 (본원에서 참조로서 편입되는 WO 2017/072210을 참조한다). 이들 세포는 5% FCS + 1% GluMax를 내포하는 DMEM/F12 배지에서 배양되었다. Jurkat NFAT 리포터 세포는 실시예 2에서 설명된 바와 같다.

[0512] CHO 상에서 발현되는 항-PGLALA 및 Jurkat-NFAT 리포터 세포 상에서 발현되는 CD3에 대한 CD3 huIgG1 PGLALA의 동시적 결합 시에, NFAT 프로모터가 활성화되고 활성 개똥벌레 루시페라아제의 발현을 야기한다. 발광 신호 (루시페라아제 기질의 첨가 시에 획득됨)의 강도는 CD3 활성화 및 신호전달의 강도에 비례한다. Jurkat-NFAT 리포터 세포는 현탁 상태에서 성장하고, ml당 0.1-0.5 mio 세포로 RPMI1640, 2g/l 글루코오스, 2 g/l NaHCO3, 10 % FCS, 25 mM HEPES, 2 mM L-글루타민, 1 x NEAA, 1 x 나트륨-피루브산염, ml당 200 μg 히그로마이신에서 배양되었다. 검정을 위해, CHO 세포가 수확되었고, ViCell을 이용하여 생존력이 결정되었다. 30,000개 표적 세포/웰이 편평 바닥, 백색-벽 96 웰-평판 (Greiner bio-one #655098) 내에 100 μl 배지에 도말되었고, 50 μl/웰의 희석된 항체 또는 배지 (대조를 위해)가 이들 CHO 세포에 첨가되었다. 차후에, Jurkat-NFAT 리포터 세포가 수확되었고, ViCell을 이용하여 생존력이 사정되었다. 히그로마이신 B가 없는 세포 배양 배지에서 세포가 1.2 mio 세포/ml로 재현탁되고, 2:1의 최종 효과기-대-표적 (E:T) 비율 및 웰마다 200 μl의 최종 용적을 획득하기 위해 60,000개 세포/웰 (50 μl/웰)로 CHO 세포에 첨가되었다. 이후, 4 μl의 GloSensor (Promega #E1291)가 각 웰에 첨가되었다 (최종 용적의 2%). 세포가 가습된 인큐베이터에서 37℃에서 24 시간 동안 배양되었다. 배양 시간의 종결 시점에서, TECAN Spark 10M을 이용하여 발광이 검출되었다.

[0513] 도 5에서 도시된 바와 같이, 최적화된 CD3 결합체 $CD3_{opt}$는 교차연결 시에 Jurkat NFAT 세포 상에서 $CD3_{orig}$와 유사한 활성을 가졌다.

[0514] **실시예 4 - 최적화된 CD3 결합체를 포함하는 T-세포 이중특이적 항체의 산출**

[0515] TYRP1 TCB

[0516] 실시예 1에서 확인된 최적화된 CD3 결합체 ("$CD3_{opt}$", 서열 번호 7 (VH) 및 11 (VL))가 CD3 및 TYRP1을 표적으로 하는 T-세포 이중특이적 항체 (TCB) ("TYRP1 TCB")를 산출하는 데 이용되었다.

[0517] 이러한 TCB 내에 포함된 TYRP1 결합체는 TYRP1 결합체 "TA99" (중쇄와 경쇄 각각에 대해 GenBank 엔트리 AXQ57811 및 AXQ57813을 참조한다)의 인간화에 의해 산출되었고, 각각, 서열 번호 18 및 22에서 도시된 중쇄와 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0518] TCB 분자의 개략적 도해는 도 6에서 제공되고, 이의 전체 서열은 서열 번호 23, 24, 25 및 27에서 제공된다.

[0519] 본래 CD3 결합 서열을 갖는 유사한 분자 역시 제조되었다 (서열 번호 23, 24, 25 및 26).

[0520] HEK293 EBNA 세포의 일시적인 형질감염에 의해 이중특이적 분자가 산출되었다. 이들 세포는 1:2:1:1 비율 ("벡터 중쇄 (VH-CH1-VL-CH1-CH2-CH3)" : "벡터 경쇄 (VL-CL)" : "벡터 중쇄 (VH-CH1-CH2-CH3)" : "벡터 경쇄 (VH-CL)")에서 상응하는 발현 벡터로 형질감염되었다. 세포가 원심분리되었고, 배지가 미리 가온된 CD CHO 배지 (Thermo Fisher, #10743029)에 의해 대체되었다. 발현 벡터가 CD CHO 배지에서 혼합되었고, PEI (폴리에틸렌이민, Polysciences, #23966-1)가 첨가되었고, 용액이 와동되고 실온에서 10 분 동안 배양되었다. 그 후에, 세포 (2 mio/ml)가 벡터/PEI 용액과 혼합되고, 플라스크로 이전되고, 5% $CO_2$ 공기를 갖는 진탕 인큐베이터에서 37℃에서 3 시간 동안 배양되었다. 배양 후, 보충물 (총 용적의 80%)을 포함하는 Excell 배지가 첨가되었다. 형질감염 후 1 일에, 보충물 (피드, 총 용적의 12%)이 첨가되었다. 세포 상층액이 7 일 후 원심분리 및 차후 여과 (0.2 μm 필터)에 의해 수확되었다.

[0521] 여과된 세포 배양 상층액으로부터 단백질이 표준 방법에 의해 정제되었다. 간단히 말하면, Fc 내포 단백질이 단백질 A-친화성 크로마토그래피 (MabSelect Sure, GE Healthcare: 평형화 완충액: 20 mM 구연산나트륨, 20 mM 인산나트륨, pH 7.5; 용리 완충액: 20 mM 구연산나트륨, 100 mM NaCl, 100 mM 글리신 pH 3.0)에 의해 세포 배양 상층액으로부터 정제되었다. pH 3.0에서 용리가 달성되었고, 그 이후에 표본의 즉각적인 pH 중화가 뒤따랐다. 단백질이 원심분리 (Millipore Amicon® ULTRA-15 (#UFC903096))에 의해 농축되었고, 응집된 단백질이 20 mM 히스티딘, 140 mM 염화나트륨, pH 6.0에서 크기 배제 크로마토그래피 (Superdex 200, GE Healthcare)에 의해 단량체성 단백질로부터 분리되었다.

[0522] 정제된 단백질의 농도는 Pace et al. (1995), Protein Science 4, 2411-23에 따라서 아미노산 서열에 기초하여 계산된 질량 흡광 계수를 이용하여 280 nm에서 흡수를 계측함으로써 결정되었다. 단백질의 순도 및 분자량은 LabChipGXII (Perkin Elmer)를 이용하여 환원제의 존재와 부재에서 CE-SDS에 의해 분석되었다 (표 1). 응집체 함량의 결정은 작업 완충액 (각각, 25 mM $K_2HPO_4$, 125 mM NaCl, 200 mM L-아르기닌 모노수화염화물, pH 6.7 또는 200 mM $KH_2PO_4$, 250 mM KCl pH 6.2)에서 평형화된 분석적 크기 배제 칼럼 (TSKgel G3000 SW XL 또는 UP-SW3000)을 이용하여 25 ℃에서 HPLC 크로마토그래피에 의해 수행되었다 (표 2).

*표 1*

[0523] TYRP1 TCB의 CE-SDS 분석 (비-환원됨)

| 분자 | 피크 # | 크기 [kDa] | 순도 [%] |
|---|---|---|---|
| TYRP1 TCB $CD3_{opt}$ | 1 | 221 | 100 |
| TYRP1 TCB $CD3_{orig}$ | 1 | 206 | 100 |

*표 2*

[0524] TYRP1 TCB의 생산 및 정제 요약

| 분자 | 역가 [mg/l] | 회수 [%] | 수율 [mg/l] | 분석적 SEC (HMW/단량체/LMW) [%] |
|---|---|---|---|---|
| TYRP1 TCB $CD3_{opt}$ | 114 | 20 | 22.8 | 0.5/**98.6**/0.9 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| TYRP1 TCB $CD3_{orig}$ | 72 | 12 | 8.7 | 0/**97.5**/2.5 |

[0525] **실시예 5 - CD3 및 TYRP1에 대한, 최적화된 CD3 결합체를 포함하는 T-세포 이중특이적 항체의 결합**

[0526] 재조합 CD3에 결합

[0527] 재조합 CD3에 대한 TYRP1 TCB의 결합은 최적화된 (TYRP1 TCB $CD3_{opt}$) 또는 본래 (TYRP1 TCB $CD3_{orig}$) CD3 결합 서열 중에서 어느 한 가지를 포함하는 TCB를 이용하여, SPR에 의해 사정되었다.

[0528] SPR 실험은 HBS-EP를 작업 완충액 (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.05% (v/v) 계면활성제 P20 (GE Healthcare))으로서 이용하여, Biacore T200에서 수행되었다.

[0529] TYRP1 TCB는 인간 $IgG_1$ Fc(PGLALA)에 특이적으로 결합하는 고정된 항체로, CM5 센서칩 표면 상에서 포획되었다 (본원에서 참조로서 편입되는 WO 2017/072210을 참조한다). 포획 항체는 표준 아민 연계 키트 (GE Healthcare)를 이용한, pH 5.0에서 대략 8700 공명 단위 (RU)의 직접적인 고정화에 의해 센서칩 표면에 연계되었다. TCB 분자는 10 μl/분의 유속으로 5 nM에서 30 s 동안 포획되었다.

[0530] 이들 인간 및 시노몰구스 항원 (하기 참조)은 240 s에 걸쳐 흐름 셀을 통해 30 μl/분의 유속으로 12.35 - 3000 nM의 농도에서 통과되었다. 해리 단계가 240 s 동안 모니터링되고, 표본 용액으로부터 HBS-EP로 전환함에 의해 촉발되었다. 모든 주기 후, 30 s 동안 10 mM 글리신 pH 2.0의 1회 주입을 이용하여, 칩 표면이 재생되었다.

[0531] 이용된 항원은 노브 인투 홀 변형 및 C 말단 Avi-태그를 갖는 인간 Fc 도메인에 융합된 인간 또는 시노몰구스 CD3 델타 및 CD3 엡실론 엑토도메인 중에서 어느 한 가지의 이종이합체이었다 (참조: 서열 번호 28과 29 (인간 CD3) 및 서열 번호 30과 31 (시노몰구스 CD3)).

[0532] 참조 흐름 셀 (포획된 TCB 없음)에서 획득된 반응을 차감함으로써 벌크 굴절률 차이가 교정되었다. BIAeval 소프트웨어 (GE Healthcare)를 이용하여 1:1 랭뮤어 결합에 적합시킴으로써, 친화성 상수가 동력학 속도 상수로부터 도출되었다.

[0533] 인간 및 시노몰구스 CD3에 결합에 대한 $K_D$ 값은 각각, TYRP1 TCB $CD3_{opt}$에 대해 50 nM 및 20 nM로서 결정되었고, TYRP1 TCB $CD3_{orig}$에 대한 것들 (각각, 50 nM 및 40 nM)과 유사하였다.

[0534] 이것은 스트레스가 없는 조건에서, $CD3_{opt}$ 또는 $CD3_{orig}$ 중에서 어느 한 가지를 포함하는 TCB 둘 모두가 재조합 CD3에 동등하게 잘 결합하였다는 것을 보여준다.

[0535] 재조합 인간 CD3에 대한 TYRP1 TCB의 결합은 또한, 최적화된 또는 본래 CD3 결합 서열 중에서 어느 한 가지를 포함하는 TCB를 이용하여, 37℃ 또는 40℃에서 14 일 동안 온도 스트레스 후 사정되었다. 실험은 IgG 분자 대신에 TCB를 이용하여, 상기 실시예 2에서 설명된 바와 같이 수행되었다.

[0536] 이러한 실험의 결과는 도 7에서 도시된다.

[0537] 도 7에서 목격될 수 있는 바와 같이, 최적화된 CD3 결합체 $CD3_{opt}$를 포함하는 TCB는 본래 CD3 결합체 $CD3_{orig}$를 포함하는 TCB와 비교하여, 스트레스 (37℃, pH 7.4에서 2 주) 후 CD3에 대한 강하게 향상된 결합을 보여주었다. 이러한 결과는 최적화된 CD3 결합체의 향상된 특성 (실시예 2 참조)이 TCB 수준에서 유지된다는 것을 확증한다.

[0538] 재조합 TYRP1에 결합

[0539] 재조합 TYRP1에 결합은 상응하는 항체의 플라스민 소화에 의해 제조된 TYRP1 Fab 단편을 이용하여, SPR에 의해 사정되었다.

[0540] SPR 실험은 HBS-EP를 작업 완충액 (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.05% (v/v) 계면활성제 P20 (GE Healthcare))으로서 이용하여, Biacore T200에서 수행되었다.

[0541] 인간 $IgG_1$ Fc(PGLALA)에 특이적으로 결합하는 항체 (본원에서 참조로서 편입되는 WO 2017/072210을 참조한다)는 표준 아민 연계 키트 (GE Healthcare)를 이용하여 pH 5.0에서 CM5 센서 칩 상에 직접적으로 연계되었다. 항원 (하기 참조)이 10 μl/분의 유속에서 30 s 동안 포획되었다. 연관 단계를 기록하기 위해, TYRP1 Fab 단편의 3-

배 연속 희석액이 30 μl/분에서 180 s 동안 흐름 셀에 통과되었다. 해리 단계가 180 s 또는 1200 s 동안 모니터링되고, 표본 용액으로부터 HBS-EP로 전환함에 의해 촉발되었다. 모든 주기 후, 30 μl/분에서 30 s 동안 10 mM 글리신 pH 2의 1회 주입을 이용하여, 칩 표면이 재생되었다.

[0542] 이용된 항원은 노브 인투 홀 (및 PG LALA) 변형 및 C 말단 Avi-태그를 갖는 인간 Fc-도메인에 인간, 시노몰구스 또는 생쥐 TYRP1 세포외 도메인 (ECD)의 단량체성 융합이었다 (참조: 서열 번호 32와 35 (인간 TYRP1), 서열 번호 33과 35 (시노몰구스 TYRP1) 또는 서열 번호 34와 35 (생쥐 TYRP1)).

[0543] 참조 흐름 셀 (포획된 항원 없음)에서 획득된 반응을 차감함으로써 벌크 굴절률 차이가 교정되었다. BIAeval 소프트웨어 (GE Healthcare)를 이용하여 1:1 랭뮤어 결합에 적합시킴으로써, 친화성 상수 ($K_D$)가 동력학 속도 상수로부터 도출되었다.

[0544] 인간, 시노몰구스 및 생쥐 TYRP1에 결합에 대한 $K_D$ 값은 각각, 130 pM, 180 pM 및 530 pM으로서 결정되었고, 부모 TA99 항체에 대한 것들 (각각, 90 pM, 120 pM 및 310 pM)과 유사하였다.

[0545] 재조합 TYRP1에 대한 TYRP1 TCB의 결합은 또한, 최적화된 또는 본래 CD3 결합 서열 중에서 어느 한 가지를 포함하는 TCB를 이용하여, 37℃ 또는 40℃에서 14 일 동안 온도 스트레스 후 사정되었다.

[0546] 실험은 재조합 TYRP1 (Sino Biologicals)을 항원으로서 이용하여, CD3에 결합에 대해 전술된 바와 같이 수행되었다.

[0547] 이러한 실험의 결과는 도 8에서 도시된다. 이들은 양쪽 TCB (뿐만 아니라 IgG 형식에서 상응하는 TYRP1 결합체)의 경우에, 인간 TYRP1에 대한 결합이 스트레스 조건에 의해 영향을 받지 않는다는 것을 확증한다.

[0548] Jurkat 세포 상에서 CD3에 결합

[0549] 인간 리포터 T 세포주 Jurkat NFAT 상에서 CD3에 결합은 실시예 2에서 전술된 바와 같이, 최적화된 CD3 결합체 "$CD3_{opt}$" 또는 본래 CD3 결합체 "$CD3_{orig}$"를 포함하는 TYRP1 TCB에 대해 FACS에 의해 결정되었다.

[0550] 도 9에서 도시된 바와 같이, 최적화된 CD3 결합체 "$CD3_{opt}$"를 포함하는 TCB는 Jurkat 세포 상에서 CD3에, 본래 CD3 결합체 "$CD3_{orig}$"를 포함하는 TCB와 적어도 동등하게 잘 결합한다.

[0551] **실시예 6 - 최적화된 CD3 결합체를 포함하는 T-세포 이중특이적 항체의 기능적 활성**

[0552] CD3 활성화

[0553] 최적화된 CD3 결합체 $CD3_{opt}$ 또는 본래 CD3 결합체 $CD3_{orig}$ 중에서 어느 한 가지를 내포하는 TYRP1 TCB (실시예 4)는 TYRP1 양성 흑색종 세포 M150543 (University of Zurich의 dermatology cell bank로부터 획득된 원발성 흑색종 세포주)의 존재에서 Jurkat NFAT 리포터 세포 검정 (실시예 3 참조)에서 검사되었다.

[0554] TYRP1 양성 표적 세포 및 CD3 항원 (Jurkat-NFAT 리포터 세포 상에서 발현됨)에 대한 TYRP1 TCB의 동시적 결합 시에, NFAT 프로모터가 활성화되어 활성 개똥벌레 루시페라아제의 발현을 야기한다. 발광 신호 (루시페라아제 기질의 첨가 시에 획득됨)의 강도는 CD3 활성화 및 신호전달의 강도에 비례한다. 검정은 항-PGLALA 발현 CHO 세포 대신에 M150543을 이용하여, 실시예 3에서 설명된 바와 같이 수행되었다.

[0555] 이들 IgG (실시예 3)에 대해 목격되는 바와 같이, $CD3_{opt}$ 또는 $CD3_{orig}$ 중에서 어느 한 가지를 내포하는 TCB 둘 모두 Jurkat NFAT 리포터 세포에서 유사한 기능적 활성을 갖고, CD3 활성화를 농도 의존성 방식으로 유도하였다 (도 10).

[0556] 표적 세포 사멸

[0557] 그 다음 단계에서, 인간 흑색종 세포주 M150543과 공동배양된, 3명의 상이한 공여자로부터 새로 단리된 인간 PBMC를 이용한 종양 세포 사멸 검정에서 양쪽 TCB 분자가 검사되었다. 종양 세포 용해는 24 시간 및 48 시간 후 LDH 방출에 의해 결정되었다. CD4와 CD8 T 세포의 활성화는 48 시간 후 양쪽 세포 부분집합에서 CD69 및 CD25의 상향조절에 의해 분석되었다.

[0558] 간단히 말하면, 표적 세포가 트립신/EDTA로 수확되고, 세척되고, 편평 바닥 96 웰 평판을 이용하여 30,000개 세포/웰의 밀도로 도말되었다. 세포가 부착하도록 하룻밤 동안 방치되었다. 말초혈 단핵 세포 (PBMC)가 건강한 인간 공여자로부터 획득된 신선한 혈액의 Histopaque 밀도 원심분리에 의해 준비되었다. 신선한 혈액이 무균 PBS

로 희석되고 Histopaque 구배 (Sigma #H8889) 위에 적층되었다. 원심분리 (450 x g, 30 분, 실온) 후, PBMC-내포 간기를 초과하는 혈장이 폐기되었고, 50 ml의 PBS로 차후에 채워지는 새로운 Falcon 튜브 내로 PBMC가 이전되었다. 혼합물이 원심분리되었고 (400 x g, 10 분, 실온), 상층액이 폐기되었고, PBMC 펠렛이 무균 PBS (원심분리 단계 350 x g, 10 분)로 2회 세척되었다. 결과의 PBMC 개체군이 자동적으로 (ViCell) 계수되고, 추가 이용 때까지 (24 시간보다 길지 않음) 세포 인큐베이터에서 37℃, 5% $CO_2$에서 10% FCS 및 1% L-알라닐-L-글루타민 (Biochrom #K0302)을 내포하는 RPMI1640 배지에서 보관되었다. 사멸 검정을 위해, 항체가 지시된 농도에서 삼중으로 첨가되었다. PBMC가 10:1의 최종 효과기-대-표적 (E:T) 비율에서 표적 세포에 첨가되었다. 표적 세포 사멸이 37℃, 5% $CO_2$에서 24 시간의 배양 후, 아폽토시스성/괴사성 세포에 의해 세포 상층액 내로 방출된 LDH의 정량 (LDH 검출 키트, Roche Applied Science #11 644 793 001)에 의해 사정되었다. 표적 세포의 최대 용해 (= 100%)는 1% 트리톤 X-100과 함께 표적 세포의 배양에 의해 달성되었다. 최소 용해 (= 0%)는 이중특이적 작제물 없이 효과기 세포와 공동배양된 표적 세포를 지칭한다.

[0559] TCB에 의해 매개된 표적 세포의 T 세포 사멸 시에 CD8과 CD4 T 세포의 활성화가 T 세포 활성화 마커 CD25 (후기 활성화 마커) 및 CD69 (초기 활성화 마커)를 인식하는 항체를 이용하여 유세포분석법에 의해 사정되었다. 48 시간 배양 후, PBMC가 둥근 바닥 96 웰 평판으로 이전되고, 350 x g에서 5 분 동안 원심분리되고, FACS 완충액으로 2회 세척되었다. CD4 APC (BioLegend #300514), CD8 FITC (BioLegend #344704), CD25 BV421 (BioLegend #302630) 및 CD69 PE (BioLegend #310906)에 대한 표면 염색이 공급업체의 사용설명서에 따라서 수행되었다. 세포가 150 μl/웰 FACS 완충액으로 2회 세척되고, 100 μl/웰 고정 완충액 (BD #554655)을 이용하여 4 ℃에서 15 분 동안 고정되었다. 원심분리 후, 표본이 200 μl/웰 FACS 완충액에서 재현탁되었다. 표본이 BD FACS Fortessa에서 분석되었다.

[0560] 3명의 공여자 모두에서, 최적화된 또는 본래 CD3 결합체 중에서 어느 한 가지를 포함하는 TCB 둘 모두가 T 세포 활성화 및 종양 세포 용해를 비슷한 방식으로 유도하였다 (도 11). 48 시간 후 3명의 공여자 모두에 대한 종양 세포 용해의 EC50 값은 표 3에서 요약된다.

*표 3*

[0561] 48 시간에서 TYRP1 TCB를 이용한 종양 세포 사멸의 EC50 값의 요약

| PBMC 공여자 | TYRP1 TCB ($CD3_{opt}$)<br>EC50 (95% 신뢰 구간) | TYRP1 TCB ($CD3_{orig}$)<br>EC50 (95% 신뢰 구간) |
|---|---|---|
| 공여자 1 | 0.31 nM (0.17 내지 0.55) | 0.44 nM (0.28 내지 0.70) |
| 공여자 2 | 0.03 nM (0.02 내지 0.06) | 0.05 nM (0.02 내지 0.09) |
| 공여자 3 | 0.08 nM (0.07 내지 0.1) | 0.14 nM (0.11 내지 0.18) |

[0562] **실시예 7 - 생쥐에서 T-세포 이중특이적 항체를 이용한 PK 연구**

[0563] 인간 FcRn 유전자도입 (line32, 동형접합성) 및 FcRn 녹아웃 생쥐 (Jackson Laboratory 계통 번호 003982 및 014565) (n=3/계통/검사 화합물)에게 1 mg/kg에서 정맥내 일시 주사 투여 이후에, 상이한 CD3 결합체 ($CD3_{orig}$ 및 $CD3_{opt}$)를 포함하는 TYRP1 TCB의 약물동력학 (PK)이 연구되었다. 연속 혈액 극소표본이 인간 FcRn 유전자도입 (tg) 생쥐에서 672 시간까지 (투약후 5 분으로부터 672 시간까지 생쥐마다 9개 표본) 및 FcRn 녹아웃 (ko) 생쥐에서 96 시간까지 (투약후 5 분으로부터 96 시간까지 생쥐마다 8개 표본) 채취되었다. 혈청이 준비되고 분석 때까지 동결 보관되었다. 비-GLP 조건 하에 cobas® e411 (Roche) 기기를 이용하여, 인간 Ig/Fab CH1/카파 도메인에 대해 특이적인 일반 ECLIA 방법으로 생쥐 혈청 표본이 분석되었다. 약동학적 평가가 표준 비구획 분석을 이용하여 수행되었다.

[0564] 본 연구의 결과는 표 4에서 도시된다. 이것은 CDR의 가공이 항체 소실에 영향을 줄 다른 서열 결점을 발생시키지 않았다는 것을 지시한다. $CD3_{opt}$는 증가된 CDR 안정성의 추가 유익성을 가지면서, 혈청 반감기의 관점에서 $CD3_{orig}$와 동등하게 우수하다.

*표 4*

[0565] huFcRn tg 생쥐 및 FcRn ko 생쥐에서 소실 데이터 (ml/일/kg; 평균 및 (CV))

| 생쥐 계통 | TYRP1 TCB ($CD3_{orig}$) | TYRP1 TCB ($CD3_{opt}$) |
|---|---|---|
| hFcRn tg32 | 8.82 (10.0) | 6.68 (12.5) |
| FcRn ko | 66.4 (16.2) | 65.0 (6.5) |

[0566] **실시예 8 - 최적화된 CD3 결합체를 포함하는 추가 T-세포 이중특이적 항체의 산출**

[0567] 실시예 1에서 확인된 최적화된 CD3 결합체 ("$CD3_{opt}$", 서열 번호 7 (VH) 및 11 (VL))가 CD3 및 EGFRvIII을 표적으로 하는 T-세포 이중특이적 항체 (TCB) ("EGFRvIII TCB")를 산출하는 데 이용되었다.

[0568] 이러한 TCB (P063.056) 내에 포함된 EGFRvIII 결합체는 파지 전시로부터 유래되고, 그 이후에 친화성 성숙이 뒤따랐고 (하기 참조), 각각, 서열 번호 88 및 92에서 도시된 중쇄와 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0569] TCB 분자의 개략적 도해는 도 6에서 제공되고, 이의 전체 서열은 서열 번호 109, 110, 111 및 27에서 제공된다.

[0570] 본래 CD3 결합 서열을 갖는 유사한 분자 역시 제조되었다 (서열 번호 109, 110, 111 및 26).

[0571] 이중특이적 분자가 HEK293 EBNA 세포의 일시적인 형질감염에 의해 산출되고, 정제되고, 실시예 4에서 전술된 바와 같이 분석되었다.

[0572] 게다가, 파지 전시로부터 유래된 EGFRvIII 항체가 아래에 설명된 바와 같은 용도를 위해, 인간 $IgG_1$ 형식에서 유사한 방식으로 (HEK EBNA 세포를 IgG 중쇄와 경쇄에 대한 발현 벡터로 1:1 비율에서 형질감염시킴) 생산되었다.

[0573] 모든 IgG 및 TCB 작제물이 크기 배제 크로마토그래피에 의해 결정될 때 95%를 초과하는 단량체 함량으로, 동등한 품질로 정제되었다.

[0574] EGFRvIII 항체의 선별

[0575] EGFRvIII 항체가 파지 전시로부터 유래되고 친화성 성숙되었다. EGFRvIII에 대한 높은 친화성 결합 및 특이성을 보여주는 항체 (P056.021 (서열 번호 40과 44), P056.052 (서열 번호 48과 52), P047.019 (서열 번호 56과 60), P057.012 (서열 번호 64와 68), P057.011 (서열 번호 72와 76), P056.027 (서열 번호 80과 84))는 EGFRvIII를 안정되게 발현하는 CHO 세포 및 EGFRvIII 양성 인간 교모세포종 세포주 DK-MG를 이용하여 세포 표면 상에서 발현되는 EGFRvIII에 결합에 대해 검사되었다. 특이성을 확증하고 야생형 EGFR (EGFRwt)에 대한 교차반응성을 배제하기 위해, 이들 선별된 항체는 EGFRwt 양성 인간 종양 세포주 MKN-45에 결합에 대해 검사되었다 (도 12). 세툭시맙이 EGFRwt에 결합에 대한 양성 대조로서 포함되었고, 표적화되지 않은 DP47 IgG가 음성 대조로서 포함되었다. 모든 선별된 항체는 EGFRwt에 대한 교차반응성 없이 EGFRvIII에 특이적으로 결합하였고 추가 특성화가 고려되었다.

[0576] 그 다음 단계에서, 발광을 계측함으로써, 항-PGLALA 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하는 Jurkat NFAT 리포터 세포와 공동배양된 DK-MG 세포에서, IgG1 PGLALA (Fc 영역 내에 P329G L234A L235A ("PGLALA", EU 넘버링) 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 형식)로서 이들 EGFRvIII 항체의 기능적 활성이 사정되었다 (CAR J 검정, 본원에서 전체적으로 참조로서 편입되는 PCT 출원 번호 PCT/EP2018/086038을 참조한다). DP47 IgG1 PGLALA가 음성 대조로서 포함되었다. 모든 검사된 EGFRvIII 항체는 CAR-발현 Jurkat NFAT 리포터 세포의 강한 활성화를 유도하였다 (도 13). 가장 약한 결합 및 활성화를 보인 P047.019를 제외하고, 모든 검사된 EGFRvIII 항체가 TCB 형식 (CD3 결합체로서 $CD_{orig}$ 포함)으로의 전환을 위해 선택되었다.

[0577] TCB 형식으로 전환된 선별된 EGFRvIII 항체의 CHO-EGFRvIII 세포에 대한 결합이 상응하는 IgG의 결합 (도 14)과 비교되어, TCB 형식으로의 전환이 EGFRvIII 항체의 결합능에 어떤 영향도 주지 않는다는 것이 확증되었다. 검사된 EGFRvIII 클론 중에서 대부분은 TCB 형식으로의 전환 시에 EGFRvIII에 결합하는 능력을 유지하였다; 단지 클론 P057.011만 상응하는 IgG와 비교하여 TCB 형식에서 EGFRvIII에 대한 약간 감소된 결합을 보여주었다 (표 5).

*표 5*

[0578] CHO-EGFRvIII에 대한 EGFRvIII IgG 및 TCB의 결합 (EC50)

| EGFRvIII 클론 | EC50 IgG (nM) | EC50 TCB (nM) |
|---|---|---|
| P056.021 | 16.5 | 13.0 |
| P056.027 | 13.1 | 15.9 |
| P056.052 | 18.2 | 19.5 |
| P057.012 | 3.0 | 5.5 |
| P057.011 | 5.3 | 12.8 |

[0579] 차후에 EGFRvIII TCB의 기능적 활성이 EGFRvIII 양성 DK-MG 세포에 대한 Jurkat NFAT 리포터 세포 검정에서 검사되었다 (도 15). 모든 검사된 EGFRvIII TCB가 Jurkat NFAT 리포터 세포 검정에서 활성을 가졌는데, P056.021이 가장 강력하고, 유사한 활성을 갖는 P056.027, P056.052 및 P057.012가 그 뒤를 잇고, P057.011이 가장 낮은 활성을 가졌다. 그 다음, 이들 EGFRvIII TCB는 EGFRwt에 대한 EGFRvIII TCB의 교차반응성을 배제하기 위해 DK-MG 또는 MKN-45 세포 중에서 어느 한 가지와 공동배양된 PBMC를 이용한 종양 세포 용해 검정에서 검사되었다 (도 16). 이러한 검정에서, 종양 세포 용해와는 별개로, T 세포 활성화 (도 17) 및 사이토킨 방출 (도 18)이 추가 판독으로서 계측되었다. 앞선 리포터 세포 검정에서 목격되는 바와 같이, EGFRvIII TCB P056.021은 EGFRwt 양성 세포에 대한 어떤 활성도 없이, EGFRvIII 양성 세포에 대한 가장 높은 활성을 가졌다. EGFRvIII TCB P057.011은 EGFRwt 세포에 대한 비특이적 활성을 나타냈고, 이런 이유로 배제되었다. EGFRvIII TCB P056.027, P056.052 및 P057.012는 비슷한 활성을 가졌다. 이들 결과에 근거하여, EGFRvIII 결합체 P056.021 및 P057.012가 추가 라운드의 친화성 성숙을 위해 선택되었다.

[0580] P057.012로부터는 우수한 결합체가 유래될 수 없었다 (결과는 도시되지 않음). SPR에 의해 결정된 바와 같은, P056.021로부터 유래된 선별된 EGFRvIII 결합체의 EGFRvIII에 대한 친화성과 특이성은 표 6에서 도시된다.

*표 6*

[0581] SPR에 의해 결정된 바와 같은, 선별된 EGFRvIII 결합체의 EGFRvIII에 대한 친화성과 특이성

| 결합체 | 특이성 (EGFRwt에 결합하지 않음) | EGFRvIII에 결합 (KD [nM]) |
|---|---|---|
| P056.021 (부모) | 예 | 35 |
| P063.056 | 예 | 10 |
| P064.078 | 아니요 | 15 |
| P065.036 | 아니요 | 10 |

[0582] 친화성 성숙된 EGFRvIII 결합체 (P063.056 (서열 번호 88과 92), P064.078 (서열 번호 96과 100), P065.036 (서열 번호 104와 108))는 또한, U87MG-EGFRvIII 및 MKN-45 세포 상에서 EGFRvIII에 특이적 결합에 대해 부모 결합체와 비교되었다 (도 19). EGFRvIII에 대한 친화성과 특이성의 관점으로부터 최고 EGFRvIII 결합체, P063.056이 $CD3_{orig}$ 또는 $CD3_{opt}$ 중에서 어느 한 가지를 CD3 결합체로서 포함하는 TCB 형식으로의 전환을 위해 선택되었다.

[0583] EGFRvIII TCB P063.056 ($CD3_{opt}$ 또는 $CD3_{orig}$를 포함)의 기능적 활성이 U87MG-EGFRvIII, DK-MG 및 MKN-45 세포에 대한 Jurkat NFAT 리포터 세포 검정에서 부모 EGFRvIII TCB P056.021과 비교되었다 (도 20). 3가지 TCB 모두 EGFRvIII 양성 세포의 존재에서만 특이적 Jurkat NFAT 활성화를 유도한다. EGFRvIII TCB P063.056은 부모 EGFRvIII TCB P056.021보다 약간 더 높은 활성을 가졌다.

[0584] *방법*

[0585] *표면 플라스몬 공명*

[0586] EGFRvIII에 대한 EGFRvIII 항체의 친화성이 25 ℃에서, HBS-EP를 작업 완충액 (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.005 % (v/v) 계면활성제 P20; GE Healthcare)로서 이용하여 Biacore T200에서 표면 플라스몬 공명에 의해 결정되었다. 항-EGFRvIII PGLALA IgG가 CM5 칩 위에 고정된, 인간 $IgG_1$ Fc(PGLALA)에 특이적으로 결합하는 항체로 25 nM에서 30 s 동안 포획되었다 (본원에서 참조로서 편입되는 WO 2017/072210을 참조한다). EGFRvIII-

ECD avi his 항원 (하기 참조, 실시예 9)이 200 s에 걸쳐 모든 흐름 셀을 통해 30 μl/분의 유속으로 12.4-1000 nM의 농도에서 통과되었다. 해리 단계가 300 s 동안 모니터링되고, 표본 용액으로부터 HBS-EP로 전환함에 의해 촉발되었다. 모든 주기 후, 30 s 동안 10 mM 글리신 pH 2.0의 2회 주입을 이용하여, 칩 표면이 재생되었다. 참조 흐름 셀에서 획득된 반응을 차감함으로써 벌크 굴절률 차이가 교정되었다. BIAeval 소프트웨어 (GE Healthcare)를 이용하여 1:1 랭뮤어 결합에 적합시킴으로써, 친화성 상수가 동력학 속도 상수로부터 도출되었다.

[0587] 특이성 결정을 위해, 100 nM에서 40 s 동안 CM5 칩 위에 고정된 항-his (Penta His, Qiagen)로 EGFRvIII 및 EGFRwt ECD 항원이 포획되었다. 60 s 동안 10 mM 글리신 pH 2.0으로 재생 전, 500 nM에서 60 s 동안 항-EGFRvIII 항체의 단일 주입이 수행되었다. 50을 초과하는 반응 단위가 EGFRvIII 결합에 대해 관찰되었다. 5 반응 단위 (RU)를 초과하는 반응은 EGFRwt 결합에 대해 양성인 것으로 고려되었고, EGFRwt에 대해 5 RU 미만의 반응에서 IgG는 특이적인 것으로 분류되었다.

[0588] *세포주*

[0589] Jurkat-NFAT 리포터 세포 (GloResponse Jurkat NFAT-RE-luc2P; Promega #CS176501)는 인간 CD3을 발현하는, NFAT 프로모터를 갖는 인간 급성 림프성 백혈병 리포터 세포주이다. 이들 세포는 ml당 0.1-0.5 mio 세포로 RPMI1640, 2g/l 글루코오스, 2 g/l $NaHCO_3$, 10 % FCS, 25 mM HEPES, 1 % GlutaMAX, 1 x NEAA, 1 x 나트륨-피루브산염에서 배양되었다. 세포가 계대될 때는 언제든지, ml당 200 μg 최종 농도의 히그로마이신 B가 첨가되었다.

[0590] PGLALA CAR를 갖는 Jurkat NFAT 세포는 인하우스 산출되었다. 본래 세포주 (Jurkat NFAT; Signosis)는 인간 CD3을 통한 활성화 시에 루시페라아제 발현을 야기하는 NFAT 프로모터를 갖는 인간 급성 림프성 백혈병 리포터 세포주이다. 이들은 P293G LALA 돌연변이를 인식할 수 있는 키메라 항원 수용체를 발현하도록 가공되었다. 배양될 때, 이들 세포는 10% FCS 및 1% 글루타민으로 보충되고 ml당 0.4-1.5 mio 세포 사이에 유지된 RPMI1640에서 현탁 상태에서 성장한다.

[0591] CHO-EGFRvIII 세포는 인하우스 산출되었다. CHO-K1 세포는 EGFRvIII으로 안정되게 형질도입되었다. 세포는 5% FCS, 1% GlutaMAX 및 6 μg/ml 푸로마이신을 내포하는 DMEM/F12 배지에서 배양되었다.

[0592] DK-MG (DSMZ #ACC 277)는 인간 교모세포종 세포주이다. DK-MG 세포는 EGFRvIII 발현에 대한 세포 분류에 의해 농축되었다. 이들 세포는 RPMI 1860, 10% FCS 및 1% GlutaMAX에서 배양되었다.

[0593] U87MG-EGFRvIII (ATCC HTB-14)은 EGFRvIII으로 안정되게 형질도입된 인간 교모세포종 세포주이다. 이들 세포는 DMEM, 10% FCS 및 1% GlutaMAX에서 배양되었다.

[0594] MKN-45 (DSMZ ACC 409)는 높은 수준의 EGFRwt를 발현하는 인간 위 선암종 세포이다. 이들 세포는 2% FCS 및 1% GlutaMAX를 내포하는 진전된 RPMI1640에서 배양되었다.

[0595] *유세포분석법에 의한 표적 결합*

[0596] 결합 실험에 이용되는 세포가 수확되고, PBS로 세척되고, FACS 완충액에서 재현탁되었다. 항체 염색이 96 웰 둥근 바닥 평판에서 수행되었다. 세포가 수확되고, 계수되고, 웰마다 100,000 내지 200,000개 세포가 파종되었다. 평판이 400 x g에서 4 분 동안 원심분리되었고, 상층액이 제거되었다. 검사 항체가 FACS 완충액에서 희석되었고, 20 μl의 항체 용액이 4 ℃에서 30 분 동안 이들 세포에 첨가되었다. 결합되지 않은 항체를 제거하기 위해, 이들 세포는 희석된 이차 항체 PE-접합된 AffiniPure F(ab')2 단편 염소 항인간 IgG Fcg 단편 특이적 (Jackson ImmunoResearch, #109-116-170 또는 #109-116-098)의 첨가 전 FACS 완충액으로 2회 세척되었다. 4 ℃에서 30 분 배양 후, 결합되지 않은 이차 항체가 씻겨 나갔다. 계측 전, 이들 세포는 200 μl FACS 완충액에서 재현탁되고, BD Canto II 또는 BD FACS Fortessa를 이용하여 유세포분석법에 의해 분석되었다.

[0597] *EGFRvIII PGLALA IgG를 이용한 CAR J NFAT 리포터 세포 검정*

[0598] T 세포 활성화를 유도하는 EGFRvIII PGLALA IgG의 효능이 CAR J NFAT 리포터 세포 검정을 이용하여 사정되었다. 상기 검정의 원리는 Jurkat-NFAT 가공된 효과기 세포를, 종양 항원을 발현하는 암 세포와 공동배양하는 것이다. PGLALA 돌연변이를 통한 CAR 및 표적 항원 EGFRvIII에 대한 IgG의 동시적 결합 시에만, NFAT 프로모터가 활성화되고, Jurkat 효과기 세포에서 증가하는 루시페라아제 발현을 야기한다. 적절한 기질의 첨가 시에, 활성 개똥벌레 루시페라아제가 발광의 방출을 야기하는데, 이것은 CAR-매개된 활성화의 신호로서 계측될 수 있다. 간단히

말하면, 표적 세포가 수확되고 생존력이 결정되었다. 검정이 시작되기 전날에, 30,000개 표적 세포/웰이 편평 바닥, 백색-벽 96 웰-평판 (Greiner bio-one, #655098) 내에 100 μl 배지에 도말되었다. 그 다음 날, 배지가 제거되었고, 25 μl/웰의 희석된 항체 또는 배지 (대조를 위해)가 표적 세포에 첨가되었다. 차후에, Jurkat-NFAT 리포터 세포가 수확되었고, ViCell을 이용하여 생존력이 사정되었다. 세포가 세포 배양 배지에서 1.5 mio 세포/ml로 재현탁되고, 2.5:1의 최종 효과기-대-표적 (E:T) 비율 및 웰마다 75 μl의 최종 용적을 획득하기 위해 75,000개 세포/웰 (50 μl/웰)로 종양 세포에 첨가되었다. 이후, 4 μl의 GloSensor (Promega, #E1291)가 각 웰에 첨가되었다 (최종 용적의 2%). 세포가 가습된 인큐베이터에서 37℃에서 24 시간 동안 배양되었다. 배양 시간의 종결 시점에서, 평판이 실온으로 조정되었다 (약 15 분). 이후, 25 μl/웰의 One-Glo 루시페라아제 (Promega, #E6120)가 첨가되었고, TECAN Spark를 이용하여 발광이 검출되기 전, 어둠 하에 15 분 동안 평판이 배양되었다.

[0599] *EGFRvIII TCB를 이용한 Jurkat NFAT 리포터 세포 검정*

[0600] T 세포 교차연결 및 차후에 T 세포 활성화를 유도하는 향상된 CD3 또는 본래 CD3 결합체 중에서 어느 한 가지를 포함하는 EGFRvIII TCB의 능력이 EGFRvIII 양성 세포 및 Jurkat-NFAT 리포터 세포를 이용하여 사정되었다. EGFRvIII 양성 표적 세포 및 CD3 항원 (Jurkat-NFAT 리포터 세포 상에서 발현됨)에 대한 EGFRvIII TCB의 동시적 결합 시에, NFAT 프로모터가 활성화되고, 활성 개똥벌레 루시페라아제의 발현을 야기한다. 발광 신호 (루시페라아제 기질의 첨가 시에 획득됨)의 강도는 CD3 활성화 및 신호전달의 강도에 비례한다. 검정을 위해, 표적 세포가 수확되고 생존력이 결정되었다. 30,000 표적 세포/웰이 편평 바닥, 백색-벽 96 웰-평판 (Greiner bio-one, #655098) 내에 100 μl 배지에 도말되었고, 50 μl/웰의 희석된 항체 또는 배지 (대조를 위해)가 표적 세포에 첨가되었다. 차후에, Jurkat-NFAT 리포터 세포가 수확되었고, ViCell을 이용하여 생존력이 사정되었다. 히그로마이신 B가 없는 세포 배양 배지에서 세포가 1.2 mio 세포/ml로 재현탁되고, 2:1의 최종 효과기-대-표적 (E:T) 비율 및 웰마다 200 μl의 최종 용적을 획득하기 위해 60,000개 세포/웰 (50 μl/웰)로 종양 세포에 첨가되었다. 이후, 4 μl의 GloSensor (Promega, #E1291)가 각 웰에 첨가되었다 (최종 용적의 2%). 세포가 가습된 인큐베이터에서 37℃에서 24 시간 동안 배양되었다. 배양 시간의 종결 시점에서, TECAN Spark를 이용하여 발광이 검출되었다.

[0601] *T-세포 매개된 종양 세포 사멸*

[0602] 표적 세포가 트립신/EDTA로 수확되고, 세척되고, 편평 바닥 96 웰 평판을 이용하여 30,000개 세포/웰의 밀도로 도말되었다. 세포가 부착하도록 하룻밤 동안 방치되었다. 말초혈 단핵 세포 (PBMC)가 건강한 인간 공여자로부터 획득된 신선한 혈액의 Histopaque 밀도 원심분리에 의해 준비되었다. 신선한 혈액이 무균 PBS로 희석되고 Histopaque 구배 (Sigma, #H8889) 위에 적층되었다. 원심분리 (450 x g, 30 분, 실온) 후, PBMC-내포 간기를 초과하는 혈장이 폐기되었고, 50 ml의 PBS로 차후에 채워지는 새로운 falcon 튜브 내로 PBMC가 이전되었다. 혼합물이 원심분리되었고 (400 x g, 10 분, 실온), 상층액이 폐기되었고, PBMC 펠렛이 무균 PBS (원심분리 단계 350 x g, 10 분)로 2회 세척되었다. 결과의 PBMC 개체군이 자동적으로 (ViCell) 계수되고, 추가 이용 때까지 (24 시간보다 길지 않음) 세포 인큐베이터에서 37℃, 5% $CO_2$에서 10% FCS 및 1% GlutaMAX을 내포하는 RPMI1640 배지에서 보관되었다. 사멸 검정을 위해, 항체가 지시된 농도에서 삼중으로 첨가되었다. PBMC가 10:1의 최종 효과기 대 표적 (E:T) 비율에서 표적 세포에 첨가되었다. 표적 세포 사멸이 37℃, 5% $CO_2$에서 24 시간의 배양 후, 아폽토시스성/괴사성 세포에 의해 세포 상층액 내로 방출된 LDH의 정량 (LDH 검출 키트, Roche Applied Science #11 644 793 001)에 의해 사정되었다. 표적 세포의 최대 용해 (= 100%)는 1% 트리톤 X-100과 함께 표적 세포의 배양에 의해 달성되었다. 최소 용해 (= 0%)는 이중특이적 작제물 없이 효과기 세포와 공동배양된 표적 세포를 지칭한다.

[0603] TCB에 의해 매개된 표적 세포의 T 세포 사멸 시에 CD8과 CD4 T 세포의 활성화가 T 세포 활성화 마커 CD25 (후기 활성화 마커) 및 CD69 (초기 활성화 마커)를 인식하는 항체를 이용하여 유세포분석법에 의해 사정되었다. 48 시간 배양 후, PBMC가 둥근 바닥 96 웰 평판으로 이전되고, 350 x g에서 5 분 동안 원심분리되고, FACS 완충액으로 2회 세척되었다. CD4 APC (BioLegend, #300514), CD8 FITC (BioLegend, #344704), CD25 BV421 (BioLegend, #302630) 및 CD69 PE (BioLegend, #310906)에 대한 표면 염색이 공급업체의 사용설명서에 따라서 수행되었다. 세포가 150 μl/웰 FACS 완충액으로 2회 세척되고, 100 μl/웰 고정 완충액 (BD, #554655)을 이용하여 4 ℃에서 15 분 동안 고정되었다. 원심분리 후, 표본이 200 μl/웰 FACS 완충액에서 재현탁되었다. 표본이 BD FACS Fortessa에서 분석되었다.

[0604] 상층액에서 사이토킨 분비가 혈구계산 비드 어레이 (CBA)를 제조업체의 사용설명서에 따라서 이용하여, 유세포

분석법에 의해 계측되었지만, 50 μl 비드 및 표본 대신에 단지 25 μl의 상층액 및 비드가 이용되었다. 하기의 CBA 키트 (BD Biosciences)가 이용되었다: CBA 인간 인터페론 감마 (IFNγ) Flex 세트, CBA 인간 그랜자임 β Flex 세트 및 CBA 인간 TNF Flex 세트. 표본이 BD FACS Canto II 또는 BD FACS Fortessa를 이용하여 계측되었고, Diva 소프트웨어 (BD Biosciences)를 이용하여 분석이 수행되었다.

[0605] **실시예 9 - CD3 및 EGFRvIII에 대한, 최적화된 CD3 결합체를 포함하는 T-세포 이중특이적 항체의 결합**

[0606] 재조합 CD3에 결합

[0607] 재조합 CD3에 대한 EGFRvIII TCB의 결합은 상기 실시예 5에서 TYRP1 TCB에 대해 설명된 바와 같이, 최적화된 (EGFRvIII TCB $CD3_{opt}$) 또는 본래 (EGFRvIII TCB $CD3_{orig}$) CD3 결합 서열 중에서 어느 한 가지를 포함하는 TCB를 이용하여, SPR에 의해 사정되었다. 포획 항체가 표준 아민 연계 키트 (GE Healthcare)를 이용한 pH 5.0에서 대략 5200 공명 단위 (RU)의 직접적인 고정화에 의해 센서칩 표면에 연계되었고, TCB 분자가 10 μl/분의 유속으로 20 nM에서 30 s 동안 포획되었다.

[0608] 인간 및 시노몰구스 CD3에 결합에 대한 $K_D$ 값은 TYRP1 TCB $CD3_{opt}$에 대해 각각, 30 nM 및 20 nM로서 결정되었고, TYRP1 TCB $CD3_{orig}$에 대한 것들 (각각, 40 nM 및 30 nM)과 유사하였다.

[0609] 이것은 스트레스가 없는 조건에서 $CD3_{opt}$ 또는 $CD3_{orig}$ 중에서 어느 한 가지를 포함하는 TCB 둘 모두가 재조합 CD3에 동등하게 잘 결합하였다는 것을 보여준다.

[0610] 재조합 인간 CD3에 대한 EGFRvIII TCB의 결합은 또한, 최적화된 또는 본래 CD3 결합 서열 중에서 어느 한 가지를 포함하는 TCB를 이용하여, 37℃ 또는 40℃에서 14 일 동안 온도 스트레스 후 사정되었다. 실험은 IgG 분자 대신에 TCB를 이용하여, 상기 실시예 2에서 설명된 바와 같이 수행되었다.

[0611] 이러한 실험의 결과는 도 21에서 도시된다.

[0612] 도 21에서 목격될 수 있는 바와 같이, 최적화된 CD3 결합체 $CD3_{opt}$를 포함하는 TCB는 본래 CD3 결합체 $CD3_{orig}$를 포함하는 TCB와 비교하여, 스트레스 (37℃, pH 7.4에서 2 주) 후 CD3에 대한 강하게 향상된 결합을 보여주었다. 이러한 결과는 최적화된 CD3 결합체의 향상된 특성 (실시예 2 참조)이 TCB 수준에서 유지된다는 것을 다시 한 번 확증한다.

[0613] 재조합 EGFRvIII에 결합

[0614] 재조합 EGFRvIII에 대한 EGFRvIII TCB의 결합은 SPR에 의해 사정되었다.

[0615] SPR 실험은 HBS-EP를 작업 완충액 (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.05% (v/v) 계면활성제 P20 (GE Healthcare))으로서 이용하여, Biacore T200에서 수행되었다.

[0616] 항-Fc 항체 (GE Healthcare)가 표준 아민 연계 키트 (GE Healthcare)를 이용하여 pH 5.0에서 CM5 센서 칩 상에 직접적으로 연계되었다. EGFRvIII TCB (5 nM)가 10 μl/분의 유속에서 30 s 동안 포획되었다. 연관 단계를 기록하기 위해, EGFRvIII 항원의 3-배 연속 희석액이 30 μl/분에서 200 s 동안 흐름 셀에 통과되었다. 해리 단계가 300 s 동안 모니터링되고, 표본 용액으로부터 HBS-EP로 전환함에 의해 촉발되었다. 모든 주기 후, 20 μl/분에서 30 s 동안 3 M $MgCL_2$의 1회 주입을 이용하여, 칩 표면이 재생되었다.

[0617] 이용된 항원은 C 말단 상에서 Avi-태그 및 His-태그에 융합된 인간 EGFRvIII의 세포외 도메인을 내포한다 (EGFRvIII-ECD avi his; 서열 번호 36).

[0618] 참조 흐름 셀 (포획된 TCB 없음)에서 획득된 반응을 차감함으로써 벌크 굴절률 차이가 교정되었다. BIAeval 소프트웨어 (GE Healthcare)를 이용하여 1:1 랭뮤어 결합에 적합시킴으로써, 친화성 상수 ($K_D$)가 동력학 속도 상수로부터 도출되었다. 겉보기 결합능 상수 $K_D$는 이러한 2:1 상호작용에서 1:1 결합 적합을 이용한, 속도 상수를 통한 동역학적 분석에 의해 근사되었다.

[0619] 인간 EGFRvIII에 결합에 대한 $K_D$ 값 (친화성)은 $CD3_{opt}$ 또는 $CD3_{orig}$ 중에서 어느 한 가지를 포함하는 EGFRvIII TCB 둘 모두에 대해 6 nM로서 결정되었다.

[0620] 재조합 EGFRvIII에 대한 EGFRvIII TCB의 결합은 또한, 최적화된 또는 본래 CD3 결합 서열 중에서 어느 한 가지를 포함하는 TCB를 이용하여, 37℃ 또는 40℃에서 14 일 동안 온도 스트레스 후 사정되었다. 실험은 EGFRvIII-

ECD avi his를 항원으로서 이용하여, 실시예 5에서 전술된 바와 같이 수행되었다 (상기 참조).

[0621] 이러한 실험의 결과는 도 22에서 도시된다. 이들은 양쪽 TCB의 경우에, 인간 EGFRvIII에 대한 결합이 스트레스 조건에 의해 영향을 받지 않는다는 것을 확증한다.

[0622] Jurkat 세포 상에서 CD3에 결합

[0623] 인간 리포터 T 세포주 Jurkat NFAT 상에서 CD3에 결합은 실시예 2에서 전술된 바와 같이, 최적화된 CD3 결합체 "$CD3_{opt}$" 또는 본래 CD3 결합체 "$CD3_{orig}$"를 포함하는 EGFRvIII TCB에 대해 FACS에 의해 결정되었다.

[0624] 도 23에서 도시된 바와 같이, 최적화된 CD3 결합체 "$CD3_{opt}$" 또는 본래 CD3 결합체 "$CD3_{orig}$" 중에서 어느 한 가지를 포함하는 TCB는 Jurkat 세포 상에서 CD3에 동등하게 잘 결합하였다.

[0625] U87MG-EGFRvIII 세포 상에서 EGFRvIII에 결합

[0626] 인간 교모세포종 세포주 U87MG-EGFRvIII 상에서 EGFRvIII에 결합은 $CD3_{opt}$ 또는 $CD3_{orig}$ 중에서 어느 한 가지를 갖는 EGFRvIII 결합체 P063.056, 또는 $CD3_{orig}$를 갖는 EGFRvIII 클론 P056.021을 포함하는 EGFRvIII TCB에 대해 FACS에 의해 결정되었다. EGFRvIII 결합체 P063.056 또한, IgG 형식에 포함되었다.

[0627] 도 24에서 도시된 바와 같이, 3가지 TCB 모두 U87MG-EGFRvIII 세포 상에서 발현되는 EGFRvIII에 높은 친화성으로 결합하고, 결합이 TCB 형식으로의 전환에 의해 약화되지 않는다.

[0628] **실시예 10 - 최적화된 CD3 결합체를 포함하는 T-세포 이중특이적 항체의 기능적 활성**

[0629] CD3 활성화

[0630] 실시예 8에서 전술된 바와 같이, EGFRvIII 양성 교모세포종 세포 DK-MG, U87MG-huEGFRvIII 및 EGFRwt 양성 MKN45 세포의 존재에서 Jurkat NFAT 리포터 세포 검정에서, 선별된 EGFRvIII 결합체 (P063.056) 및 최적화된 CD3 결합체 $CD3_{opt}$ 또는 본래 CD3 결합체 $CD3_{orig}$ 중에서 어느 한 가지를 내포하는 EGFRvIII TCB가 검사되었다.

[0631] 이들 IgG (실시예 3)에 대해 목격되는 바와 같이, $CD3_{opt}$ 또는 $CD3_{orig}$ 중에서 어느 한 가지를 내포하는 TCB 둘 모두 Jurkat NFAT 리포터 세포에 대한 유사한 기능적 활성을 갖고, CD3 활성화를 농도 의존성 방식으로 유도하였다 (도 20).

[0632] 표적 세포 사멸

[0633] 선별된 EGFRvIII 결합체 (P063.056) 및 최적화된 CD3 결합체 $CD3_{opt}$ 또는 본래 CD3 결합체 $CD3_{orig}$ 중에서 어느 한 가지를 내포하는 EGFRvIII TCB는 실시예 8에서 전술된 바와 같이, 교모세포종 세포주 U87MG-EGFRvIII 및 PBMC의 존재에서 종양 세포 사멸 실험에서, 부모 EGFRvIII 결합체 P056.021 및 CD3 결합체 $CD3_{orig}$를 내포하는 EGFRvIII TCB와 비교되었다. Jurkat NFAT 리포터 세포에서 목격되는 바와 같이, $CD3_{opt}$ 또는 $CD3_{orig}$ 중에서 어느 한 가지를 포함하는 TCB의 기능적 활성은 CD69 상향조절에 의해 계측될 때, 종양 세포 용해의 유도 및 CD4와 CD8 T 세포의 활성화에 대하여 유사하다 (도 25).

[0634] 이에 더하여, "2+1 형식" (도 6에서 도해된 바와 같음)에서 EGFRvIII 결합체 P063.056 및 최적화된 CD3 결합체 $CD3_{opt}$를 포함하는 EGFRvIII TCB의 기능적 활성이 "1+1 두미 형식" (도 1G에서 개략적으로 묘사됨)에서 동일한 EGFRvIII 및 CD3 결합체를 포함하는 EGFRvIII TCB와 비교되었다. 이들 2가지 EGFRvIII TCB는 실시예 8에서 설명된 바와 같이, Jurkat NFAT 리포터 세포 검정에서 및 교모세포종 세포주 U87MG-EGFRvIII을 이용한 종양 세포 사멸 검정에서 검사되었다. 2+1 형식에서 EGFRvIII TCB는 Jurkat NFAT 리포터 세포 검정에서 계측된 CD3 활성화 (도 26)에서, 및 PBMC를 이용한 사멸 검정에서 종양 세포 사멸 및 T 세포 활성화의 유도 (도 27)에서 우수한 기능적 활성을 나타냈다.

[0635] **실시예 11 - 최적화된 CD3 결합체를 포함하는 T-세포 이중특이적 항체의 기능적 특징화**

[0636] EGFRvIII TCB에 의한 T 세포 증식과 활성화

[0637] 선별된 EGFR 결합체 (P063.056) 및 최적화된 CD3 결합체 $CD3_{opt}$ 또는 본래 CD3 결합체 $CD3_{orig}$ 중에서 어느 한 가지를 내포하는 EGFRvIII TCB의 기능적 활성은 U87MG-EGFRvIII 세포에 대한 T 세포 증식 검정에서, 부모

EGFRvIII 결합체 P056.021 및 CD3 결합체 $CD3_{orig}$를 내포하는 EGFRvIII TCB와 비교되었다 (도 28). 3가지 TCB 모두 CD4 T 세포 및 CD8 T 세포의 강한 증식과 활성화를 유도하였다. $CD3_{opt}$를 포함하는 P063.056 EGFRvIII TCB는 다른 2가지 EGFRvIII TCB보다 더욱 높은 활성을 가졌다.

[0638] EGFRvIII TCB에 의한 종양 세포 용해

[0639] 그 다음, 선별된 EGFR 결합체 (P063.056) 및 최적화된 CD3 결합체 $CD3_{opt}$를 내포하는 EGFRvIII TCB, 및 부모 EGFRvIII 결합체 P056.021 및 CD3 결합체 $CD3_{orig}$를 내포하는 EGFRvIII TCB는 DK-MG 세포와 공동배양된 PBMC를 이용한 종양 세포 용해 검정에서 검사되었다 (도 29). 이러한 검정에서, 종양 세포 용해와는 별개로, T 세포 활성화 및 사이토킨 방출이 추가 판독으로서 계측되었다. 앞서 목격된 바와 같이, $CD3_{opt}$를 포함하는 P063.056 EGFRvIII TCB는 종양 세포 용해, T 세포 활성화 및 IFNγ와 TNFα의 방출에 대하여, $CD3_{orig}$를 포함하는 P056.021 EGFRvIII TCB보다 더욱 높은 활성을 가졌다.

[0640] TYRP1 TCB에 의한 T 세포 활성화 및 종양 세포 용해

[0641] 사이토킨 방출을 유도하는 TYRP1 TCB의 기능적 특성이 건강한 공여자로부터 단리된 PBMC와 함께 원발성 흑색종 세포주 M150543의 공동배양에 의해 검사되었다. TYRP1 TCB를 통해 T 세포에 의해 매개된 종양 세포 용해가 24 시간 및 48 시간의 처리 후 분석되었다 (도 30). 48 시간의 처리 후, IFNγ 및 TNFα의 상층액 내로의 방출뿐만 아니라 CD4와 CD8 T 세포 활성화가 분석되었다. TYRP1 TCB는 24 시간 후에 이미, 강력한 종양 세포 용해를 유도할 수 있었다. 이것은 CD25의 상향조절에 의해 결정된 CD4와 CD8 T 세포의 강한 활성화뿐만 아니라 IFNγ와 TNFα의 유의미한 방출을 동반하였다.

[0642] *방법*

[0643] *PBMC 단리*

[0644] 말초혈 단핵 세포 (PBMC)가 건강한 인간 공여자로부터 획득된 신선한 혈액의 Histopaque 밀도 원심분리에 의해 준비되었다. 신선한 혈액이 무균 PBS로 희석되고 Histopaque 구배 (Sigma, #H8889) 위에 적층되었다. 원심분리 (450 x g, 30 분, 실온) 후, PBMC-내포 간기를 초과하는 혈장이 폐기되었고, 50 ml의 PBS로 차후에 채워지는 새로운 falcon 튜브 내로 PBMC가 이전되었다. 혼합물이 원심분리되었고 (400 x g, 10 분, 실온), 상층액이 폐기되었고, PBMC 펠렛이 무균 PBS (원심분리 단계 350 x g, 10 분)로 2회 세척되었다. 결과의 PBMC 개체군이 자동적으로 (ViCell) 계수되고, 추가 이용 때까지 (24 시간보다 길지 않음) 세포 인큐베이터에서 37℃, 5% $CO_2$에서 10% FCS 및 1% GlutaMAX을 내포하는 RPMI1640 배지에서 보관되거나, 추가 이용 때까지 액체 질소에서 동결되고 보관되었다. 이용 전날에, 동결된 PBMC가 해동되고 37℃에서 배지에서 하룻밤 동안 배양되었다.

[0645] *T 세포 증식*

[0646] 간단히 말하면, 표적 세포가 수확되고, 계수되고, PBS로 2회 세척되었다. 세포가 PBS에서 ml당 5 mio 세포로 재현탁되었다. 세포가 37℃에서 10 분 동안 5 μM의 최종 농도에서 세포 증식 염료 eFluor 670 (eBioscience, #65-0840-85)로 염색되었다. 염색 반응을 중단시키기 위해, 4 볼륨의 차가운 완전한 세포 배양 배지가 세포 현탁액에 첨가되고, 4 ℃에서 5 분 동안 배양되고, 이후, 배지로 3회 세척되었다. 표지화된 표적 세포가 계수되고, RPMI1640, 10% FCS 및 1% GlutaMax에서 ml당 0.1 mio 세포로 조정되었다. 웰마다 10,000개 표적 세포가 96 웰 평판 내로 파종되었다. 이후 처리가 지시된 농도에서 첨가되었고, 종말에는 건강한 공여자로부터 단리된 100,000개 PBMC가 웰마다 첨가되었다. 이들 세포는 37℃에서 5 일 동안 배양되었고, 이후 PBMC가 수확되고 CD3 BUV395 (BioLegend, #563548), CD4 PE (BioLegend, #300508), CD8 APC (BioLegend, #344722), CD25 PE/Cy7 (BioLegend, #302612)로 염색되었다. 유세포분석법 (FACS Fortessa, BD Bioscience)에 의해 계측된 CD4 T 세포 및 CD8 T 세포에서 eFluor 670 염료의 희석에 의해 증식이 결정되었고, CD25 상향조절을 계측함으로써 CD4와 CD8 T 세포의 활성화가 결정되었다.

[0647] *T 세포 매개된 종양 세포 사멸*

[0648] 표적 세포가 트립신/EDTA로 수확되고, 세척되고, 편평 바닥 96 웰 평판을 이용하여 30,000개 세포/웰의 밀도로 도말되었다. 세포가 부착하도록 하룻밤 동안 방치되었다. 사멸 검정을 위해, 항체가 지시된 농도에서 삼중으로 첨가되었다. PBMC가 10:1의 최종 효과기 대 표적 (E:T) 비율에서 표적 세포에 첨가되었다. 표적 세포 사멸이 37℃, 5% $CO_2$에서 24 시간의 배양 후, 아폽토시스성/괴사성 세포에 의해 세포 상층액 내로 방출된 LDH의 정량

(LDH 검출 키트, Roche Applied Science, #11 644 793 001)에 의해 사정되었다. 표적 세포의 최대 용해 (= 100%)는 1% 트리톤 X-100과 함께 표적 세포의 배양에 의해 달성되었다. 최소 용해 (= 0%)는 이중특이적 작제물 없이 효과기 세포와 공동배양된 표적 세포를 지칭한다.

[0649] *T 세포 활성화*

[0650] TCB에 의해 매개된 표적 세포의 T 세포 사멸 시에 CD8과 CD4 T 세포의 활성화가 T 세포 활성화 마커 CD25 (후기 활성화 마커) 및 CD69 (초기 활성화 마커)를 인식하는 항체를 이용하여 유세포분석법에 의해 사정되었다. 48 시간 배양 후, PBMC가 둥근 바닥 96 웰 평판으로 이전되고, 350 x g에서 5 분 동안 원심분리되고, FACS 완충액으로 2회 세척되었다. CD4 APC (BioLegend, #300514), CD8 FITC (#344704, BioLegend), CD25 BV421 (BioLegend, #302630) 및 CD69 PE (BioLegend, #310906)에 대한 표면 염색이 공급업체의 사용설명서에 따라서 수행되었다. 세포가 150 μl/웰 FACS 완충액으로 2회 세척되고, 100 μl/웰 고정 완충액 (BD, #554655)을 이용하여 4 ℃에서 15 분 동안 고정되었다. 원심분리 후, 표본이 200 μl/웰 FACS 완충액에서 재현탁되었다. 표본이 BD FACS Fortessa에서 분석되었다.

[0651] *사이토킨 분비*

[0652] 상층액에서 사이토킨 분비가 혈구계산 비드 어레이 (CBA)를 제조업체의 사용설명서에 따라서 이용하여, 유세포분석법에 의해 계측되었지만, 50 μl 비드 및 표본 대신에 단지 25 μl의 상층액 및 비드가 이용되었다. 하기의 CBA 키트 (BD Biosciences)가 이용되었다: CBA 인간 인터페론 감마 (IFNγ) Flex 세트 및 CBA 인간 TNF Flex 세트. 표본이 BD FACS Canto II 또는 BD FACS Fortessa를 이용하여 계측되었고, Diva 소프트웨어 (BD Biosciences)를 이용하여 분석이 수행되었다.

[0653] **실시예 13 - 최적화된 CD3 결합체를 포함하는 T-세포 이중특이적 항체의 생체내 효능**

[0654] TYRP1 TCB (실시예 1에서 확인된 최적화된 CD3 결합체를 포함)가 인간 종양 세포주의 이종이식 생쥐 모형인 IGR-1 흑색종 이종이식 모형에서 항종양 효능에 대해 검사되었다.

[0655] IGR-1 세포 (인간 흑색종)가 10% FCS (Sigma)를 내포하는 DMEM 배지에서 배양되었다. 이들 세포는 물 포화된 공기 하에 5% $CO_2$에서 37℃에서 배양되었다. 이식을 위해 계대 6이 이용되었다. 세포 생존력은 96.7%이었다. 동물마다 $2x10^6$개 세포가 1 ml 투베르쿨린 주입기 (BD Biosciences, Germany)를 이용하여 생쥐의 옆구리 내로 100 μl의 RPMI 세포 배양 배지 (Gibco)에 담겨 피하 주입되었다.

[0656] 완전 인간화 NSG 암컷 생쥐 (Roche Glycart AG, Switzerland)는 약속된 지침 (GV-Solas; Felasa; TierschG)에 따라서 12 시간 밝음 / 12 시간 어둠의 매일 주기에서 특정 병원체 부재 조건 하에 유지되었다. 실험 연구 프로토콜은 지방 정부 (ZH223/2017)에 의해 리뷰되고 승인되었다. 연속 건강 모니터링이 규칙적인 기초에서 실행되었다.

[0657] 생쥐는 연구 0일 자에 $2x10^6$의 IGR-1 세포가 피하 주입되고, 무작위배정되고, 칭량되었다. 종양 세포 주입 20일 후 (종양 용적 > 200 $mm^3$), 생쥐는 5주 동안 주 2회 10 μg (0.5 mg/kg) TYRP1 TCB가 i.v. 주사되었다. 모든 생쥐는 200 μl의 적합한 용액이 i.v. 주사되었다. 운반제 군에서 생쥐는 히스티딘 완충액이 주사되었고, 치료군은 TYRP1 TCB 작제물이 주사되었다. 200 μl당 합당한 양의 항체를 획득하기 위해, 필요할 때 원액이 히스티딘 완충액으로 희석되었다. 종양 크기가 캘리퍼스로 주 3회 계측되고, GrahPad Prism 소프트웨어로 용적 ($mm^3$ +/- SEM)으로서 플롯팅되었다. 통계학적 분석이 JMP12 소프트웨어로 수행되었다.

[0658] 도 31은 TYRP1 TCB가 운반제 군과 비교하여, 종양 성장 저해의 관점에서 유의미한 효능을 매개하였다는 것을 보여준다 (68% TGI, $p=0.0058^*$).

[0659] EGFRvIII TCB (실시예 1에서 확인된 최적화된 CD3 결합체를 포함)가 인간 종양 세포주의 이종이식 생쥐 모형인 U87-EGFRvIII 교모세포종 이종이식 모형에서 항종양 효능에 대해 유사하게 검사되었다.

[0660] U87 세포 (인간 교모세포종)는 ATCC (Manassas, USA)로부터 최초 획득되었고, 인간 EGFRvIII 단백질을 발현하도록 안정되게 형질감염되었다 (Roche Glycart AG, Switzerland). 확대 후 이들 세포는 Roche Glycart 내부 세포은행에 기탁되었다. U87-EGFRvIII 세포주는 10% FCS (Sigma) 및 0.5 μg/ml 푸로마이신 (Invitrogen)을 내포하는 DMEM 배지에서 배양되었다. 이들 세포는 물 포화된 공기 하에 5% $CO_2$에서 37℃에서 배양되었다. 이식을 위해

계대 8이 이용되었다. 세포 생존력은 94.7%이었다. 동물마다 $5x10^5$개 세포가 1 ml 투베르쿨린 주입기 (BD Biosciences, Germany)를 이용하여 생쥐의 옆구리 내로 100 μl의 RPMI 세포 배양 배지 (Gibco)에 담겨 피하 주입되었다.

[0661] 완전 인간화 NSG 암컷 생쥐 (Roche Glycart AG, Switzerland)는 약속된 지침 (GV-Solas; Felasa; TierschG)에 따라서 12 시간 밝음 / 12 시간 어둠의 매일 주기에서 특정 병원체 부재 조건 하에 유지되었다. 실험 연구 프로토콜은 지방 정부 (ZH223/2017)에 의해 리뷰되고 승인되었다. 연속 건강 모니터링이 규칙적인 기초에서 실행되었다.

[0662] 생쥐는 연구 0일 자에 $5x10^5$의 U87-EGFRvIII 세포가 피하 주입되고, 무작위배정되고, 칭량되었다. 종양 세포 주입 2주 후 (종양 용적 > 200 $mm^3$), 생쥐는 3주 동안 주 2회 10 μg (0.5 mg/kg) EGFRvIII TCB가 i.v. 주사되었다. 모든 생쥐는 200 μl의 적합한 용액이 i.v. 주사되었다. 운반제 군에서 생쥐는 히스티딘 완충액이 주사되었고, 치료군은 EGFRvIII TCB 작제물이 주사되었다. 200 μl당 합당한 양의 항체를 획득하기 위해, 필요할 때 원액이 히스티딘 완충액으로 희석되었다. 종양 크기가 캘리퍼스로 주 3회 계측되고, GrahPad Prism 소프트웨어로 용적 ($mm^3$ +/- SEM)으로서 플롯팅되었다.

[0663] 도 32는 EGFRvIII TCB가 종양 성장 조절의 관점에서 유의미한 효능을 매개하며, 모든 생쥐가 완전 관해를 달성하였다는 것을 보여준다.

[0664] **실시예 12 - 생쥐에서 EGFRvIII TCB를 이용한 PK 연구**

[0665] 최적화된 CD3 결합체, $CD3_{opt}$를 포함하는 EGFRvIII TCB의 약물동력학 (PK)은 인간 FcRn 유전자도입 (line32, 동형접합성) 및 NOD-SCID 생쥐에게 1 mg/kg에서 정맥내 일시 주사 투여 이후에 연구되었다. 연속 혈액 극소표본이 인간 FcRn 유전자도입 (tg) 생쥐 및 NOD-SCID 생쥐로부터 672 시간까지 (투약후 5 분으로부터 672 시간까지 생쥐마다 9개 표본) 채취되었다. EGFRvIII TCB로 처리된 생쥐 혈청의 표본은 비-GLP 조건 하에 특이적 효소 결합 면역흡착 검정 (ELISA)을 이용하여 분석되었다. EGFRvIII TCB의 포획은 스트렙타비딘-코팅된 마이크로-역가 평판 (SA-MTP) 상에서, 비오틴화된 EGFRvIII 항원 (huEGFRvIII his 비오틴)으로 행위되었다. 결합된 EGFRvIII TCB는 인간 IgG1 Fc(PGLALA)에 대한 디곡시제닌-표지화된 단일클론 항체로 검출되고 (실시예 3 참조), 그 이후에 항디곡시제닌-POD 이차 검출 항체의 첨가가 뒤따랐다. 신호는 퍼옥시다아제 기질 (ABTS)의 첨가에 의해 산출되었다. 보정 범위는 2.35 ng/ml 내지 150 ng/ml이며, 2.5 ng/ml가 최저 정량 한계 (LLOQ)이었다.

[0666] 본 연구의 결과는 표 7에서 도시된다. EGFRvIII TCB의 PK 프로필은 검사된 생쥐 계통 둘 모두에 대한 예상된 범위 내에 있다. 이것은 CD3 결합체의 CDR의 가공이 항체 소실에 영향을 줄 다른 서열 결점을 발생시키지 않았다는 것을 지시한다.

*표 7*

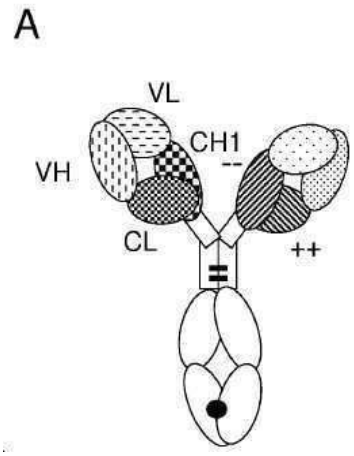
[0667] huFcRn tg 생쥐 및 NOD-SCID 생쥐에서 소실 데이터 (ml/일/kg; 평균)

| 생쥐 계통 | EGFRvIII TCB ($CD3_{opt}$) |
|---|---|
| hFcRn tg32 | 12.4 |
| NOD-SCID | 10.1 |

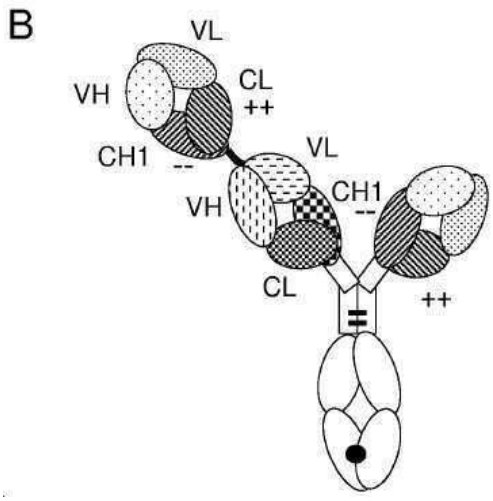
[0668] 비록 전술된 발명이 이해의 명료함을 위해 예시와 실례로서 일부 상세하게 설명되긴 했지만, 이들 설명과 실례는 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 본원에서 인용된 모든 특허와 과학 문헌의 개시는 명시적으로 전체적으로 참조로서 편입된다.

도면

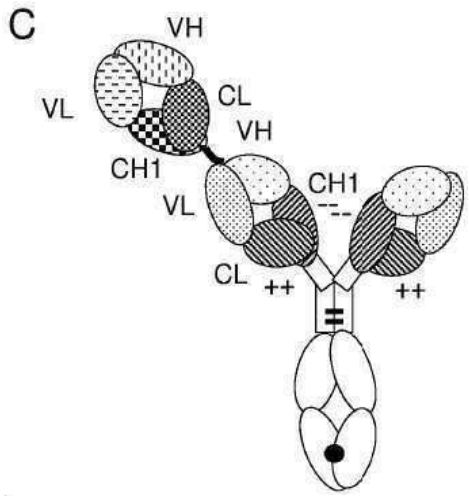
도면1a



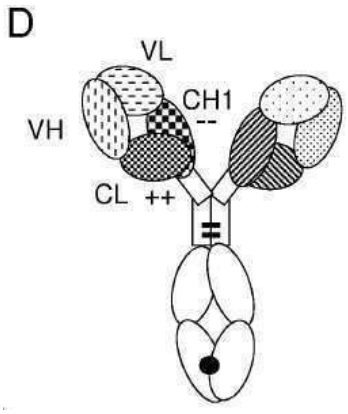

도면1b



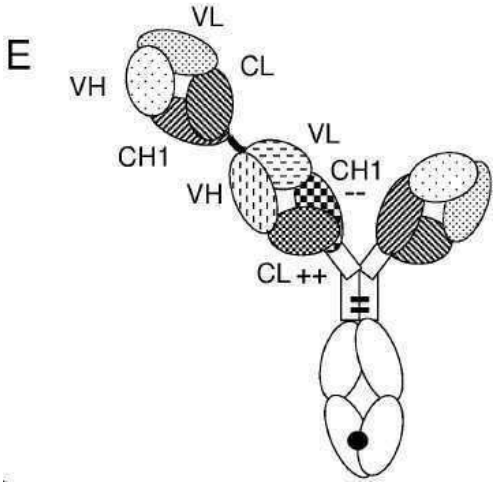

도면1c



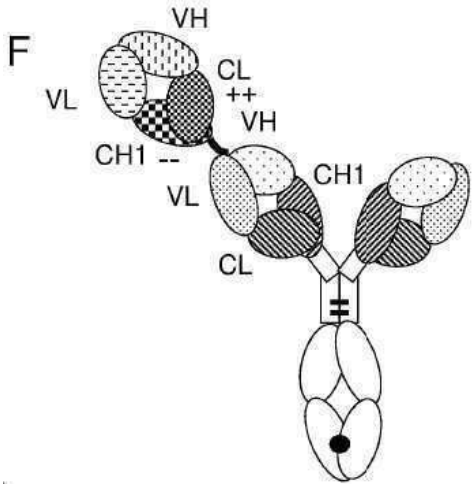
도면1d



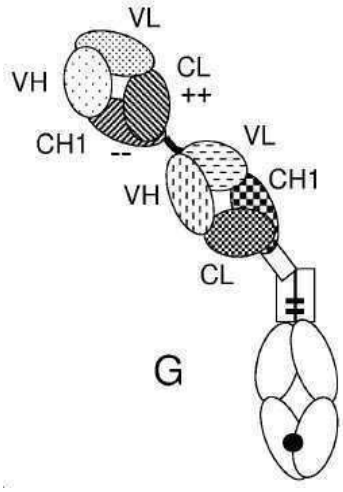

도면1e



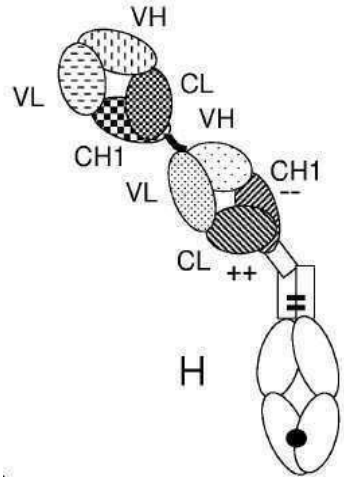

도면1f



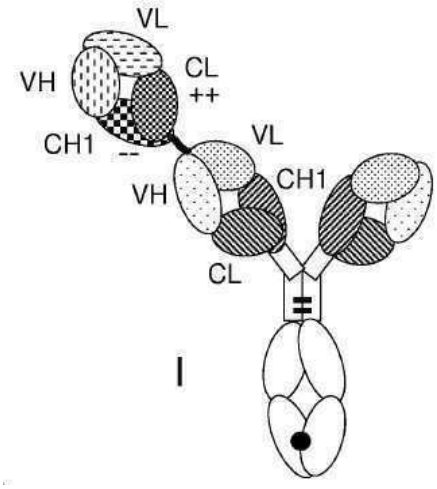
도면1g



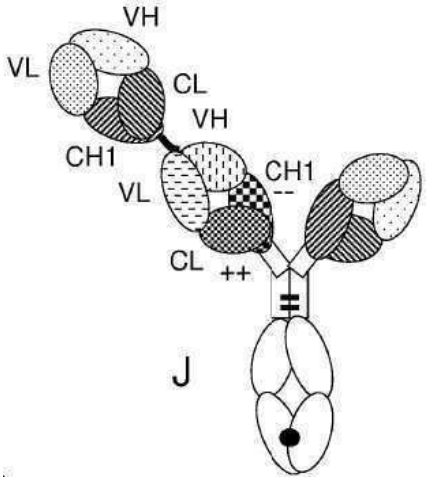

도면1h



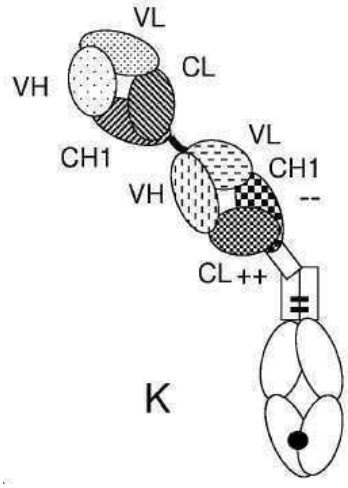

도면1i



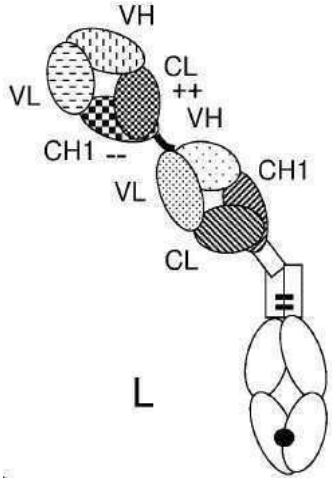
도면1j



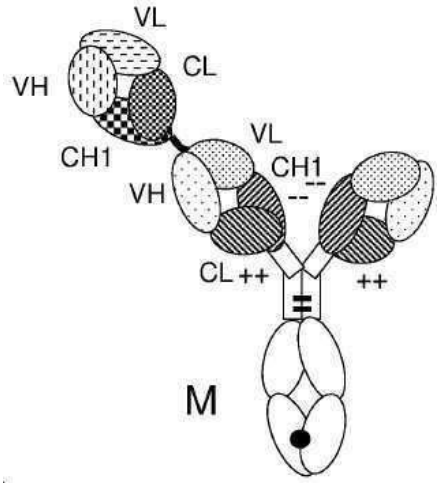

도면1k



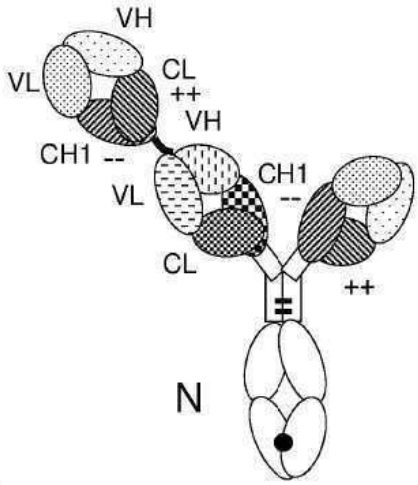

도면1l



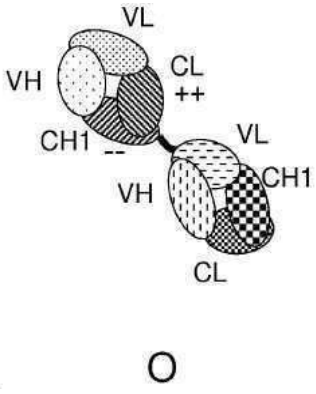
도면1m



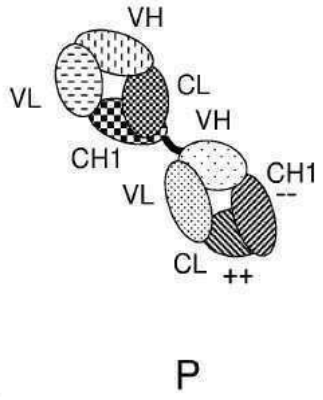

도면1n



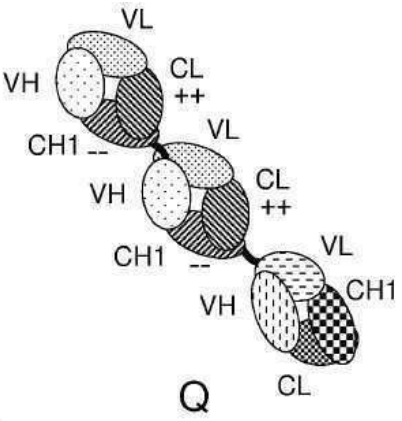

도면1o



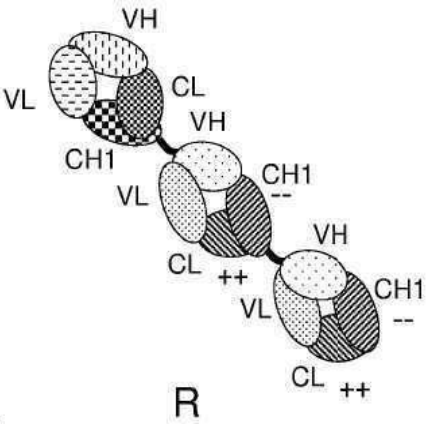
도면1p



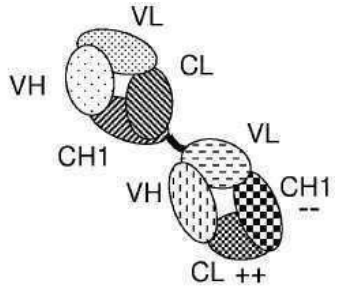

도면1q




도면1r

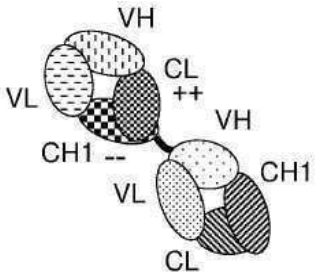


도면1s



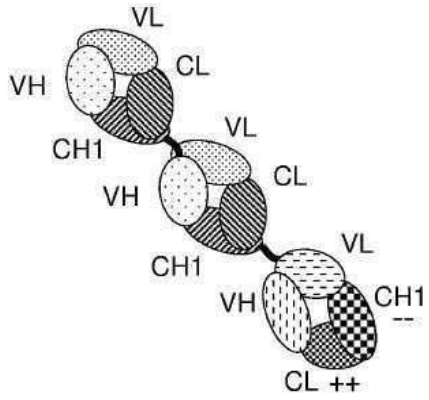

S

도면1t



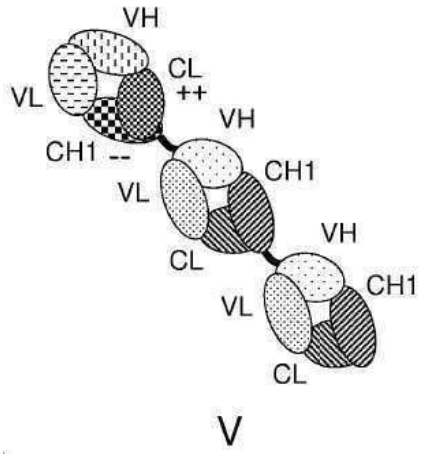

T

도면1u

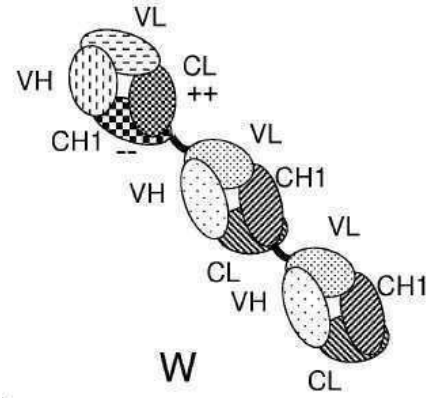



U

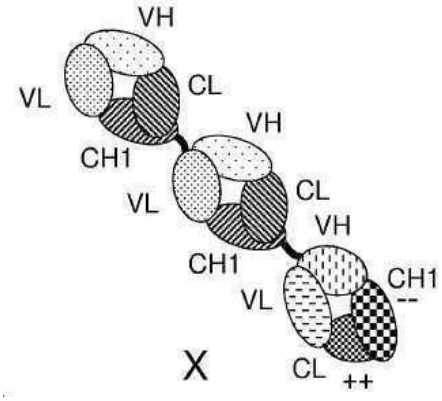
도면1v



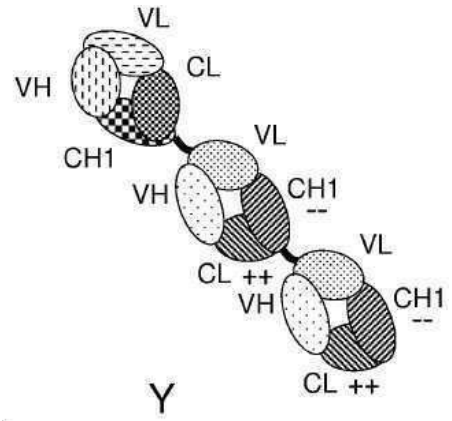

도면1w



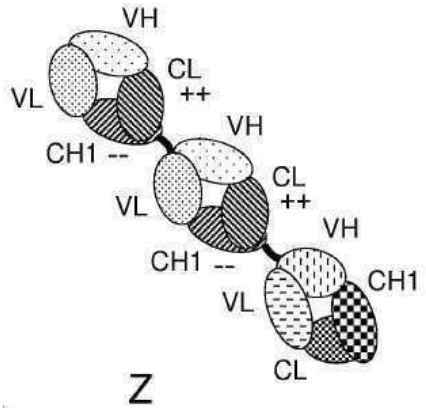

도면1x



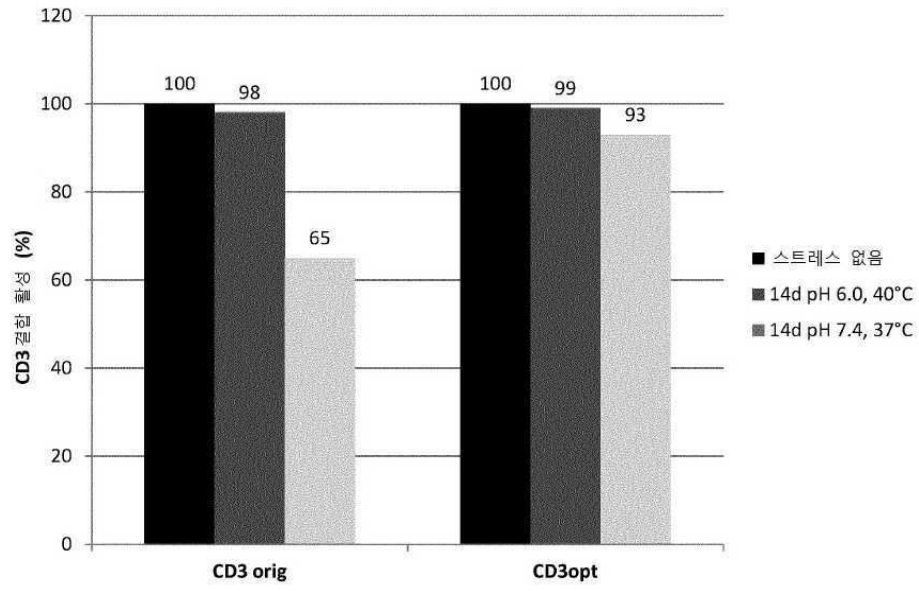
도면1y



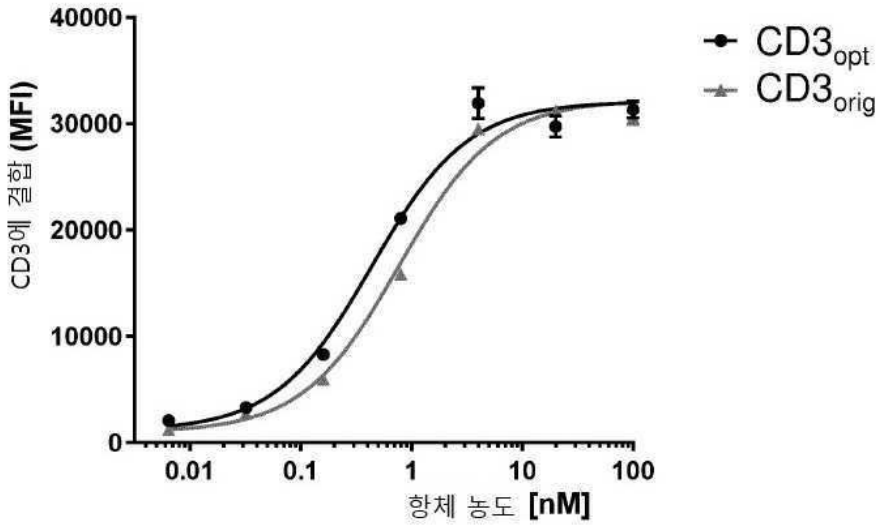

도면1z



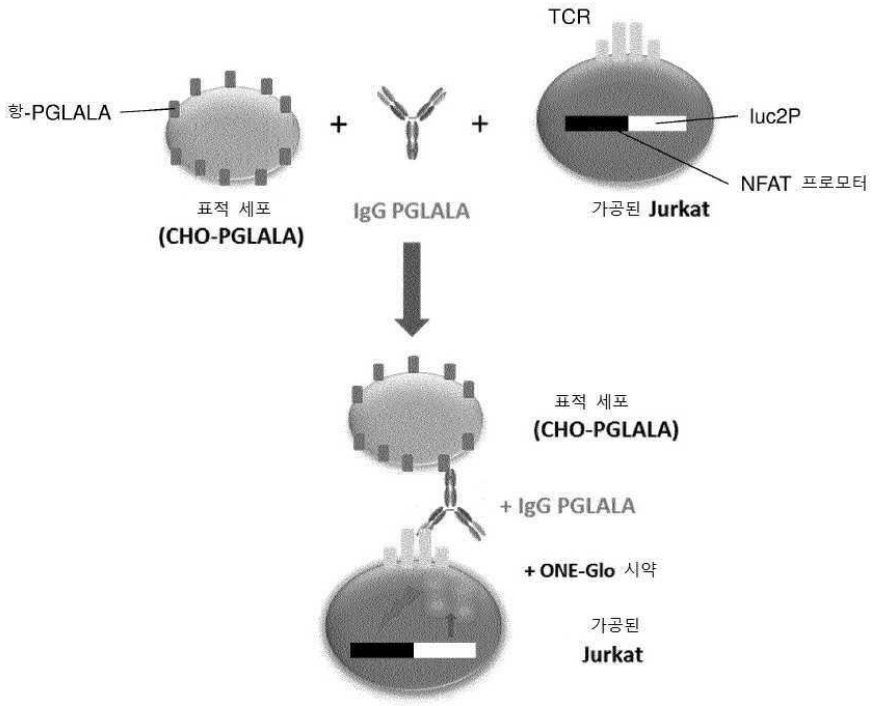

도면2



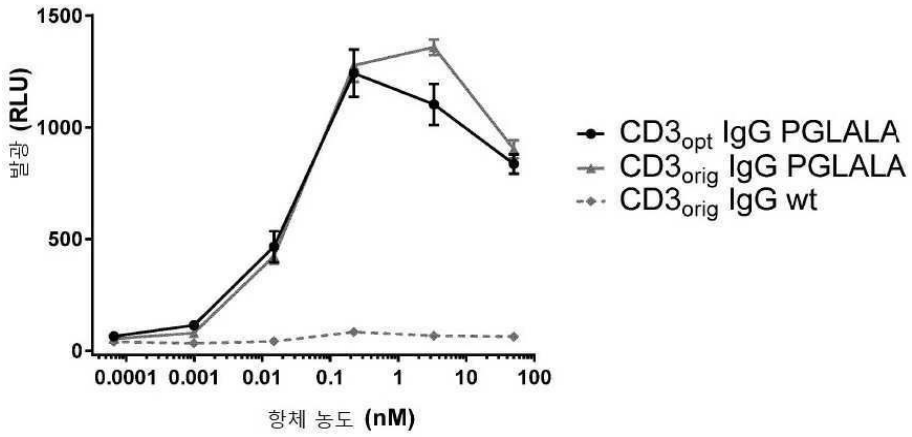
도면3


40000
30000
20000
10000
0
CD3에 결합 (MFI)
0.01
0.1
1
10
100
항체 농도 [nM]
CD3opt
CD3orig

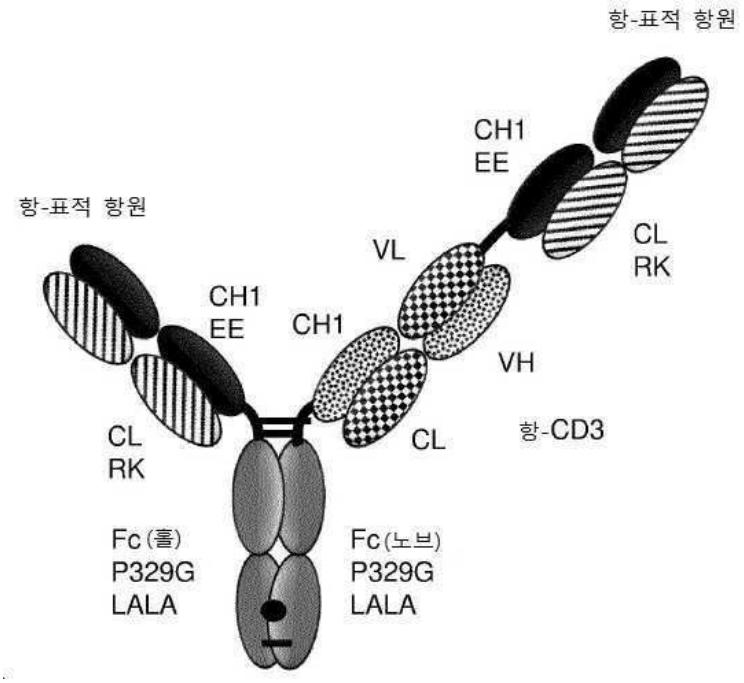
도면4


TCR
항-PGLALA
luc2P
NFAT 프로모터
표적 세포
(CHO-PGLALA)
IgG PGLALA
가공된 Jurkat
표적 세포
(CHO-PGLALA)
+ IgG PGLALA
+ ONE-Glo 시약
가공된
Jurkat

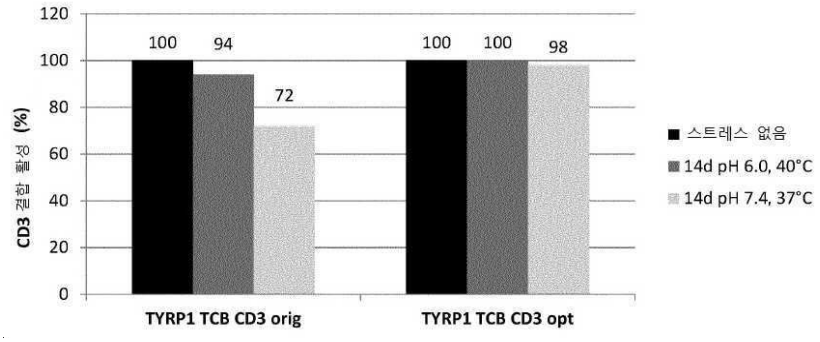
도면5


1500
1000
500
0
발광 (RLU)
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
항체 농도 (nM)
CD3opt IgG PGLALA
CD3orig IgG PGLALA
CD3orig IgG wt

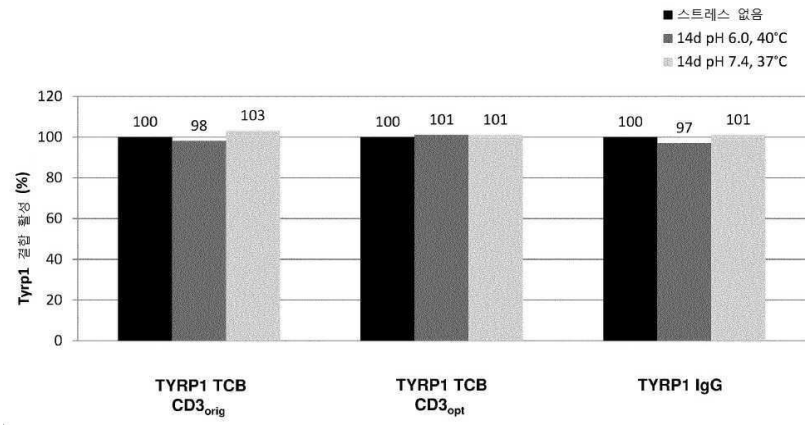
도면6


항-표적 항원
CH1
EE
CL
RK
VL
CH1
EE
CH1
VH
항-표적 항원
CL
RK
CL
항-CD3
Fc(홀)
P329G
LALA
Fc(노브)
P329G
LALA

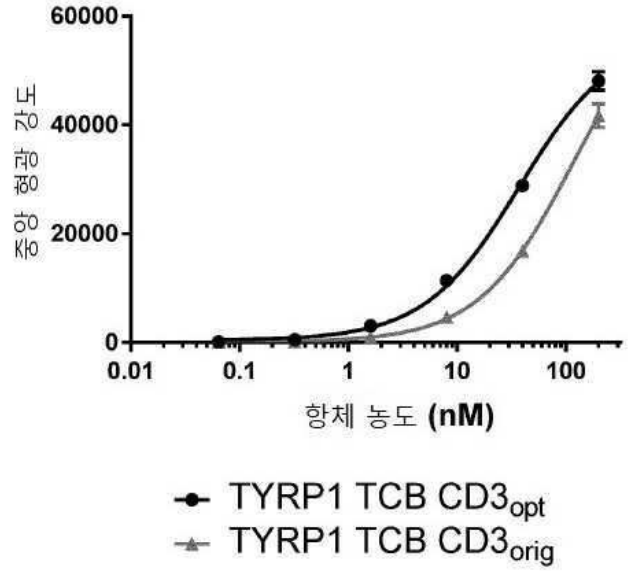
도면7


120
100
80
60
40
20
0
CD3 결합 활성 (%)
100
94
72
100
100
98
TYRP1 TCB CD3 orig
TYRP1 TCB CD3 opt
스트레스 없음
14d pH 6.0, 40°C
14d pH 7.4, 37°C

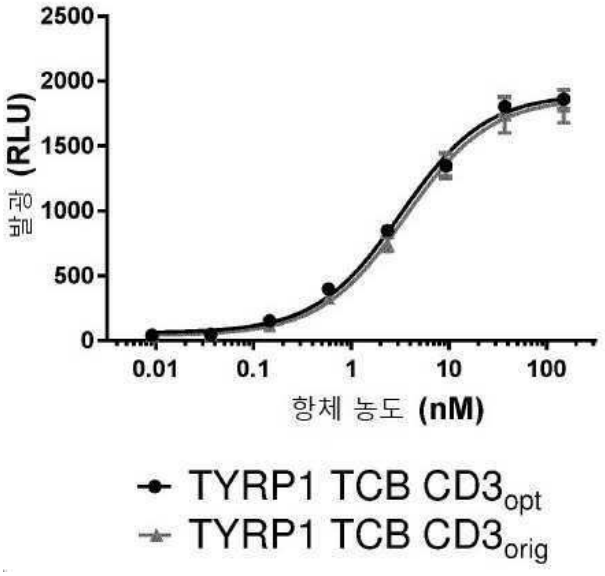
도면8


스트레스 없음
14d pH 6.0, 40°C
14d pH 7.4, 37°C
Tyrp1 결합 활성 (%)
120
100
80
60
40
20
0
100
98
103
100
101
101
100
97
101
TYRP1 TCB CD3orig
TYRP1 TCB CD3opt
TYRP1 IgG

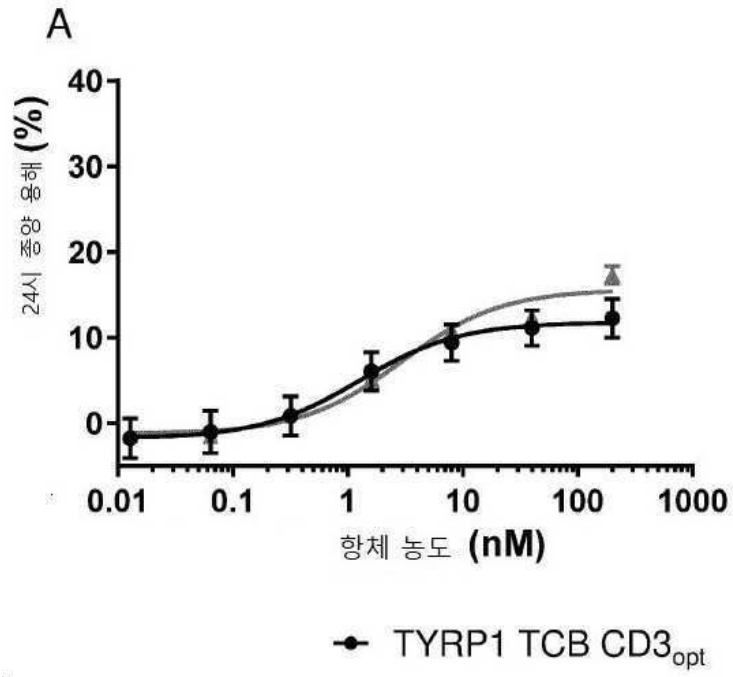
도면9


중앙 형광 강도
60000
40000
20000
0
0.01
0.1
1
10
100
항체 농도 (nM)
TYRP1 TCB CD3opt
TYRP1 TCB CD3orig

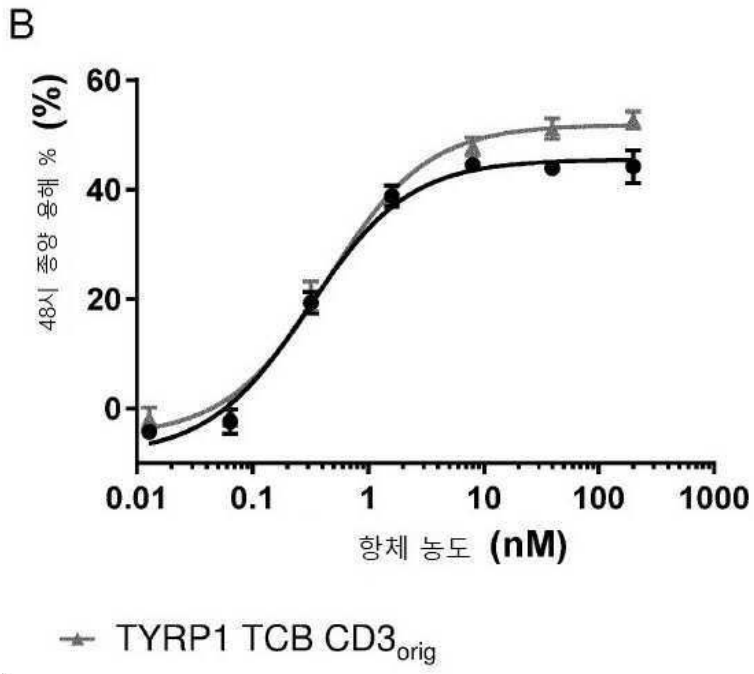
도면10


발광 (RLU)
2500
2000
1500
1000
500
0
0.01
0.1
1
10
100
항체 농도 (nM)
TYRP1 TCB CD3opt
TYRP1 TCB CD3orig

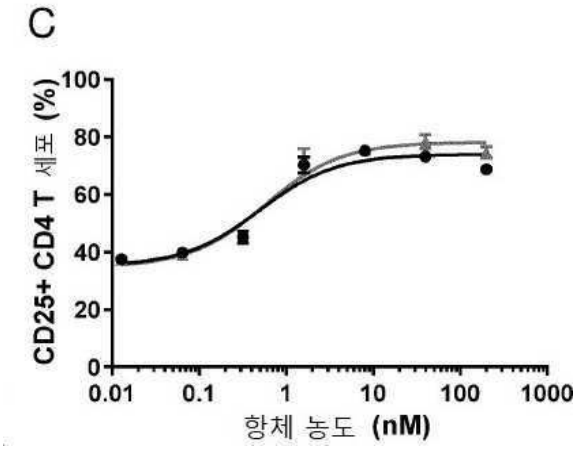
도면11a


A
24시 종양 용해 (%)
40
30
20
10
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
항체 농도 (nM)
TYRP1 TCB CD3opt

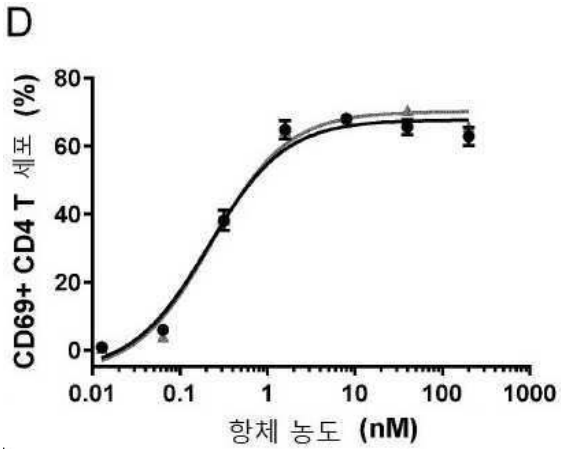
도면11b


B
48시 종양 용해 % (%)
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
항체 농도 (nM)
TYRP1 TCB CD3orig

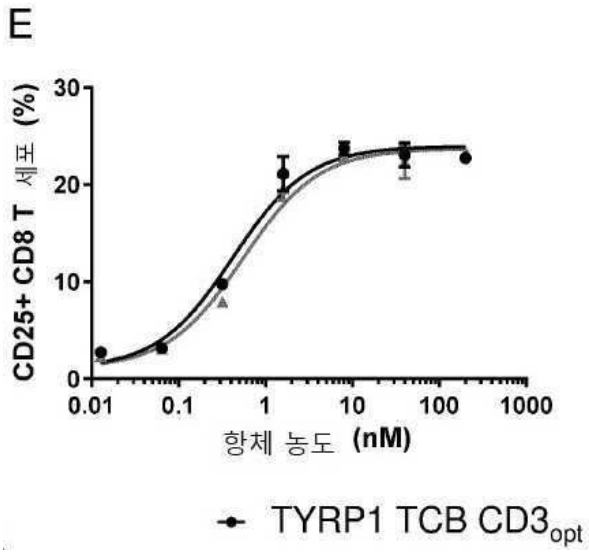
도면11c



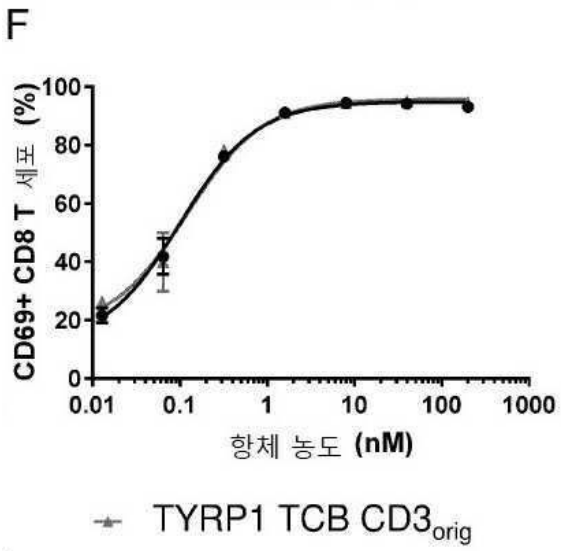

도면11d



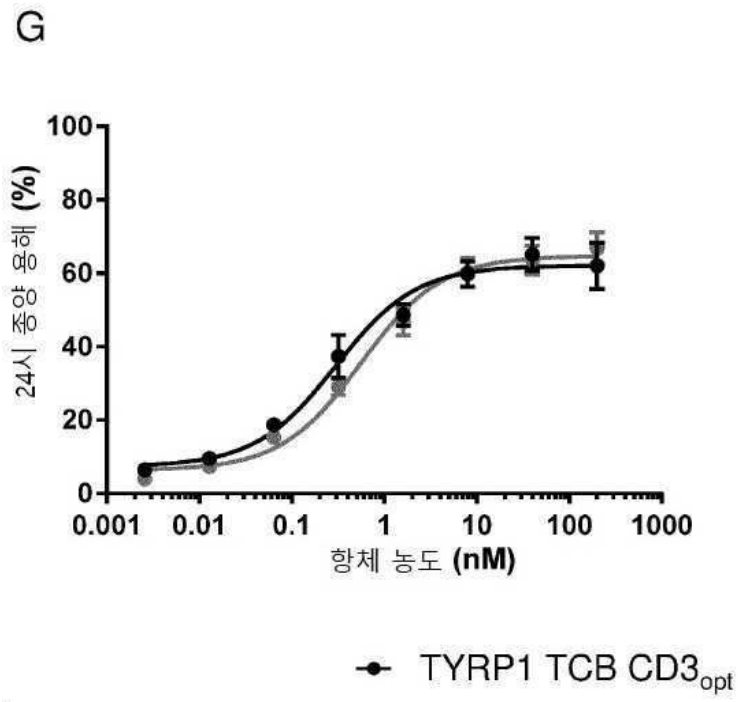

도면11e



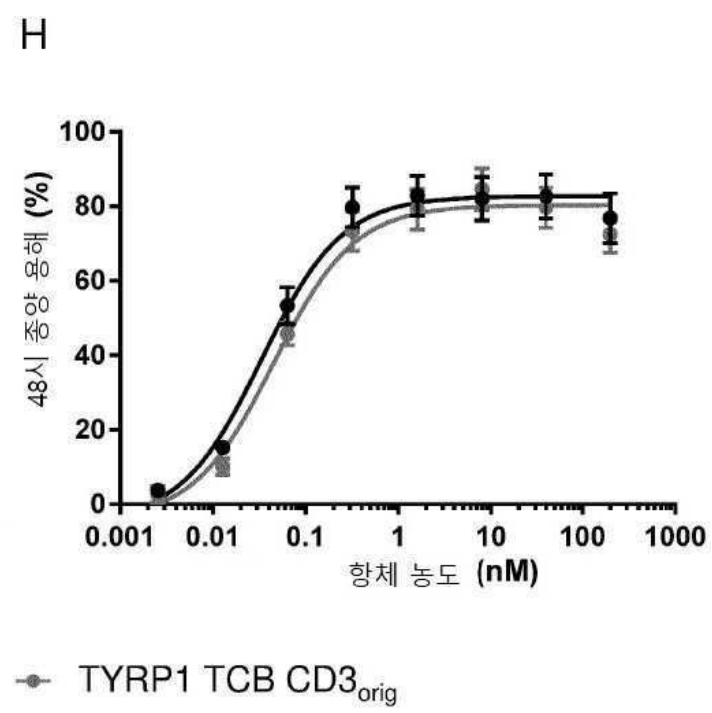
도면11f


F
CD69+ CD8 T 세포 (%)
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
항체 농도 (nM)
TYRP1 TCB CD3orig

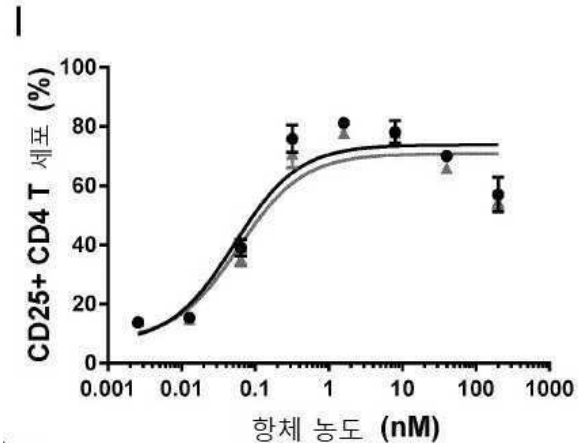
도면11g


G
24시 종양 용해 (%)
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
항체 농도 (nM)
TYRP1 TCB CD3opt

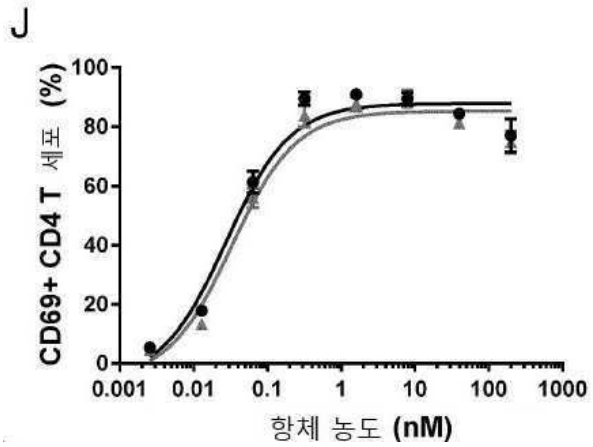
도면11h



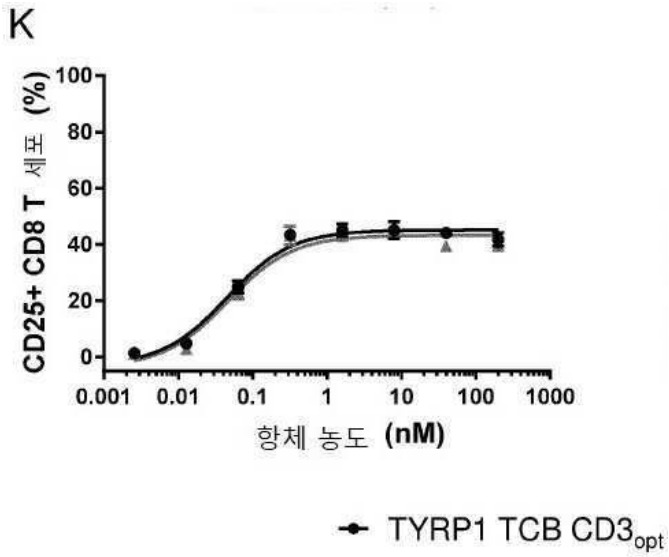

도면11i



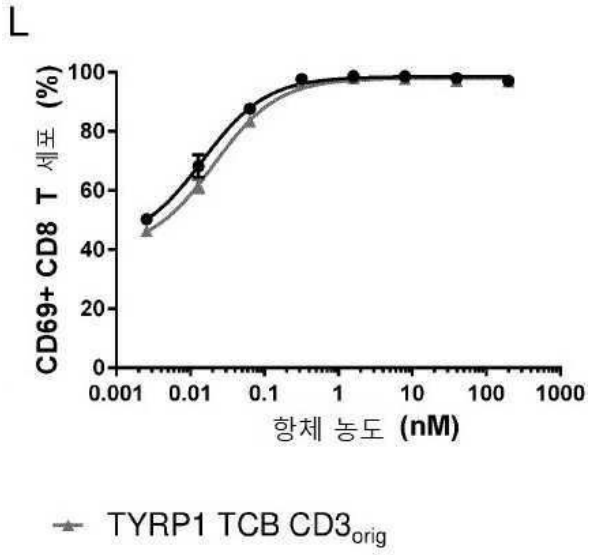

도면11j



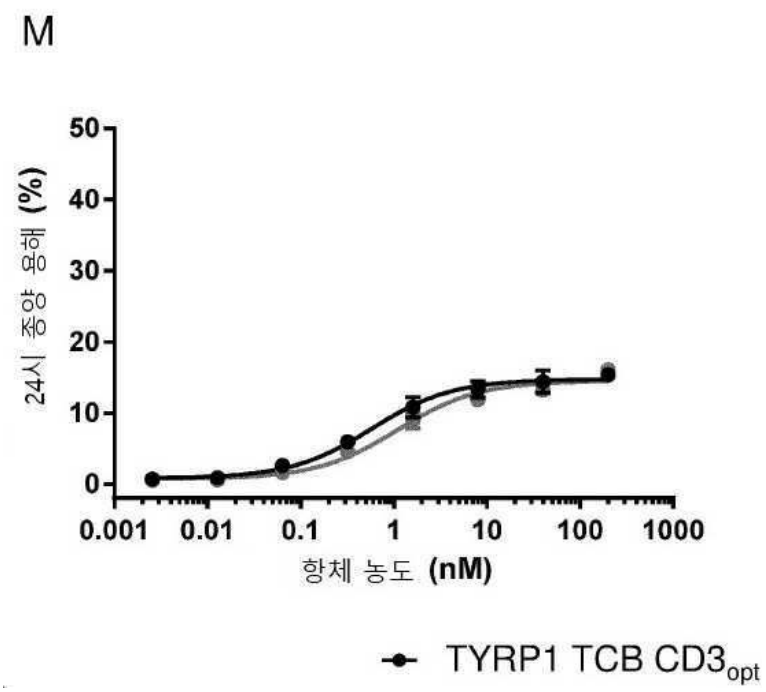
도면11k


K
CD25+ CD8 T 세포 (%)
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
항체 농도 (nM)
TYRP1 TCB CD3opt

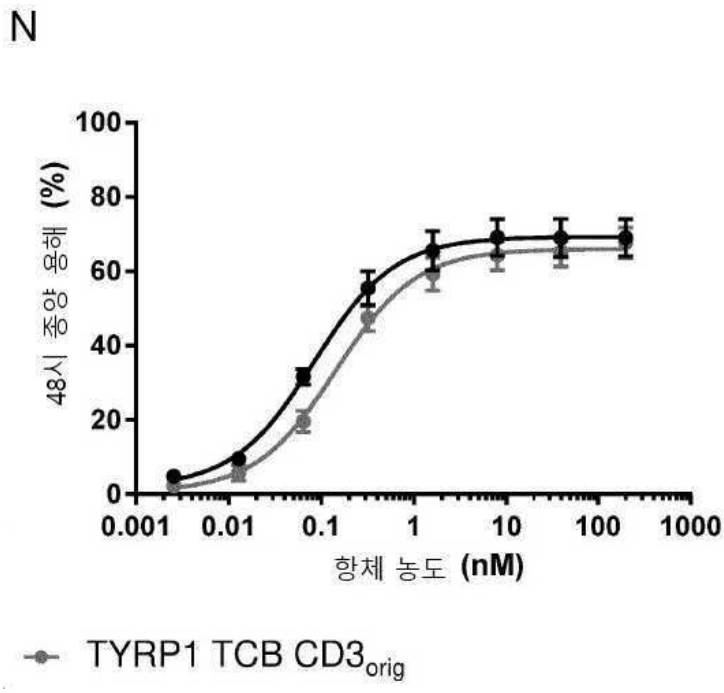
도면11l


L
CD69+ CD8 T 세포 (%)
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
항체 농도 (nM)
TYRP1 TCB CD3orig

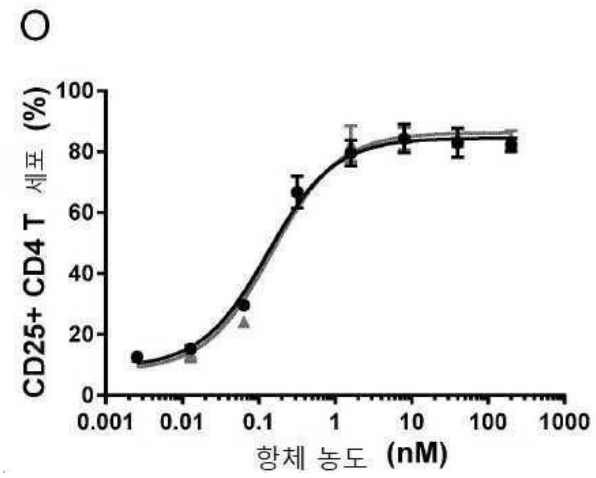
도면11m


M
24시 종양 용해 (%)
50
40
30
20
10
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
항체 농도 (nM)
TYRP1 TCB CD3opt

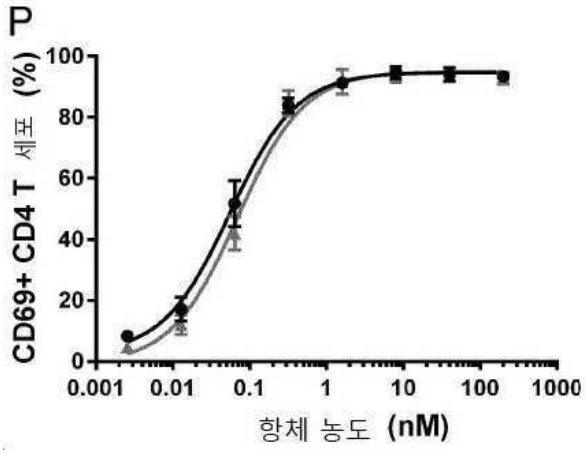
도면11n


N
48시 종양 용해 (%)
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
항체 농도 (nM)
TYRP1 TCB CD3orig

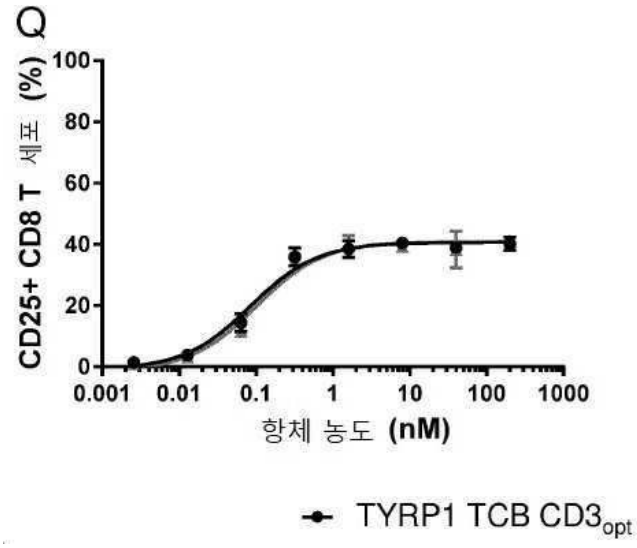
도면11o



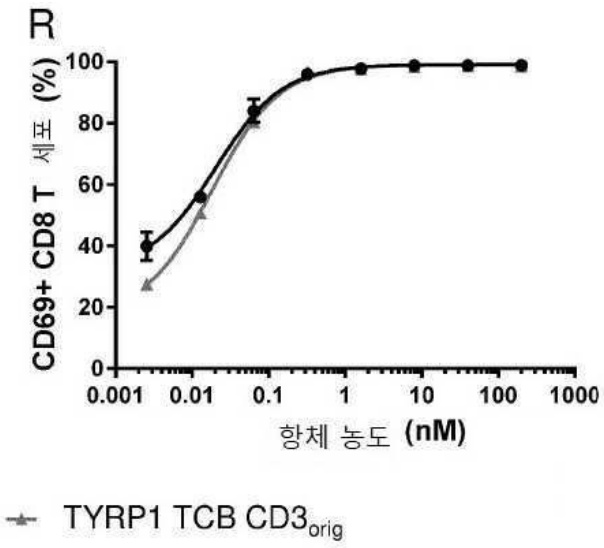

도면11p



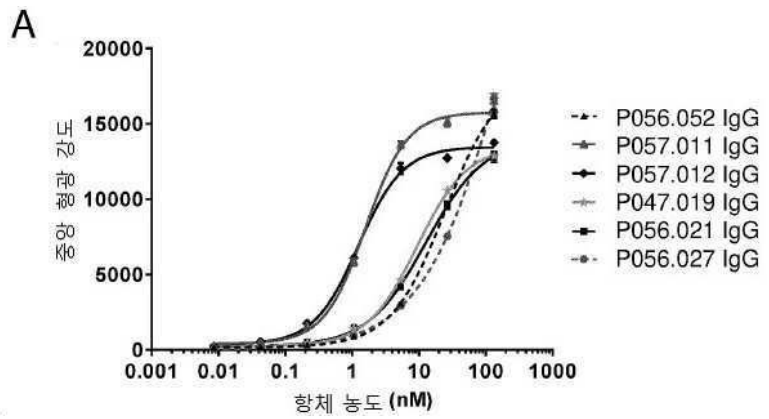

도면11q



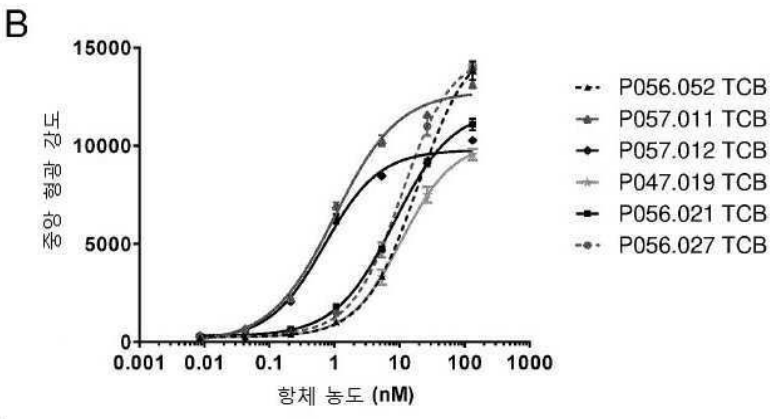
도면11r



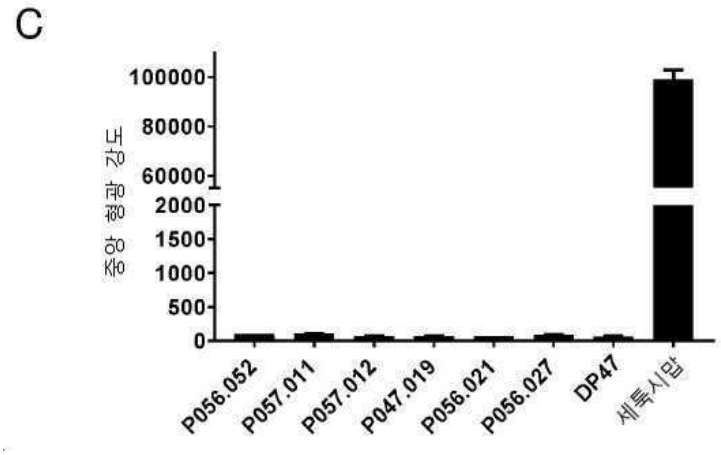

도면12a



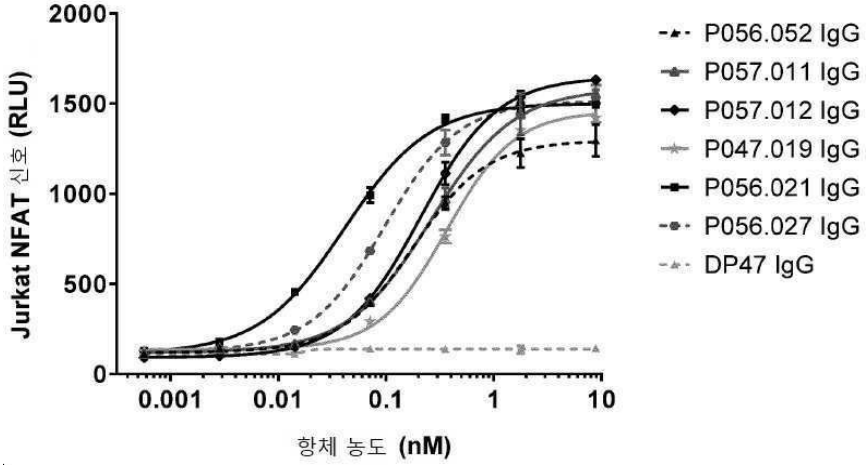

도면12b



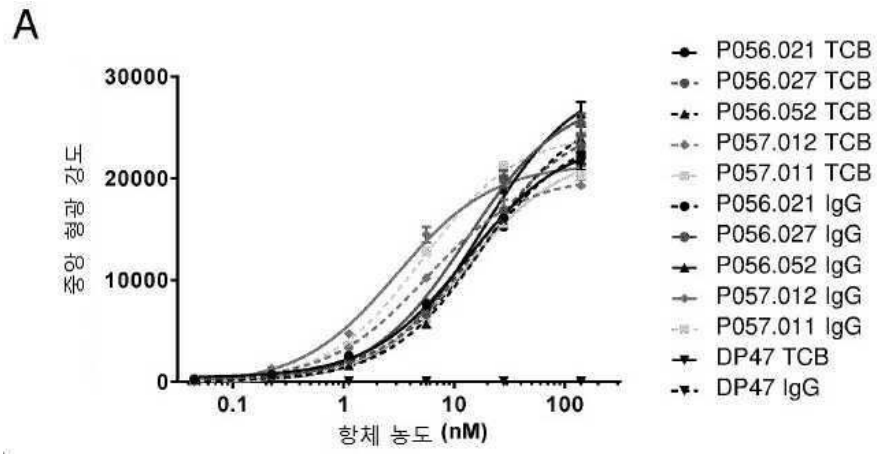
도면12c



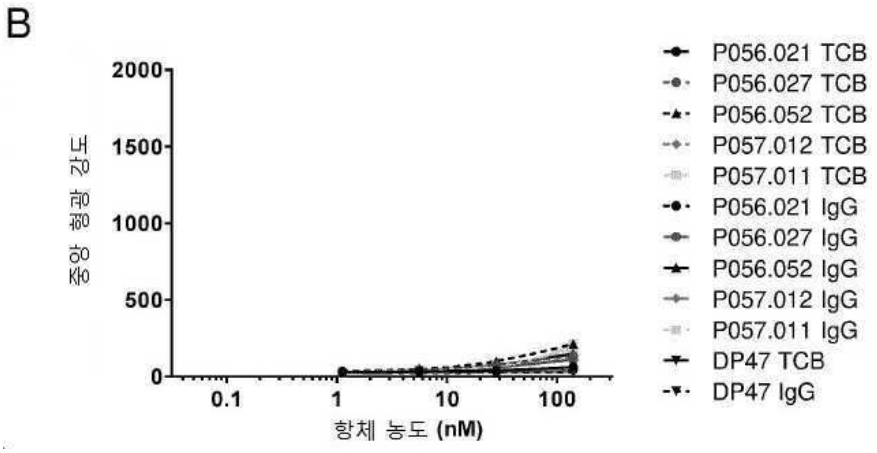

도면13



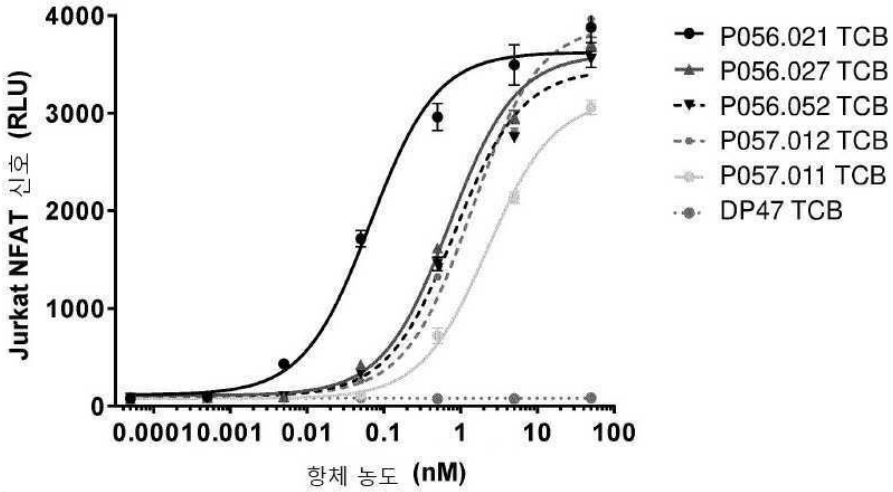

도면14a



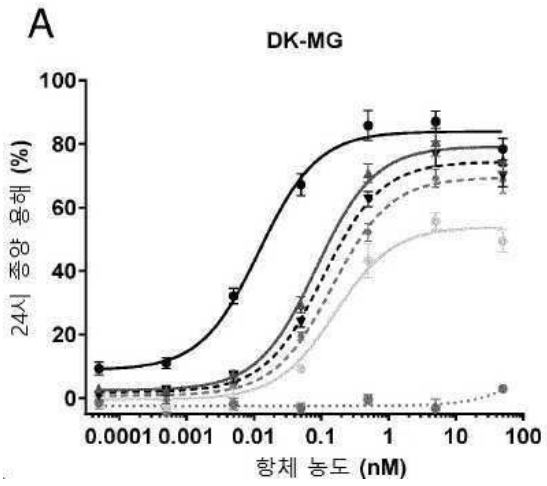
도면14b



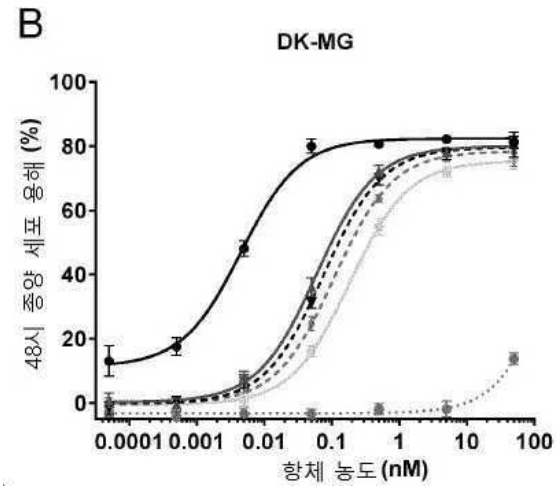

도면15



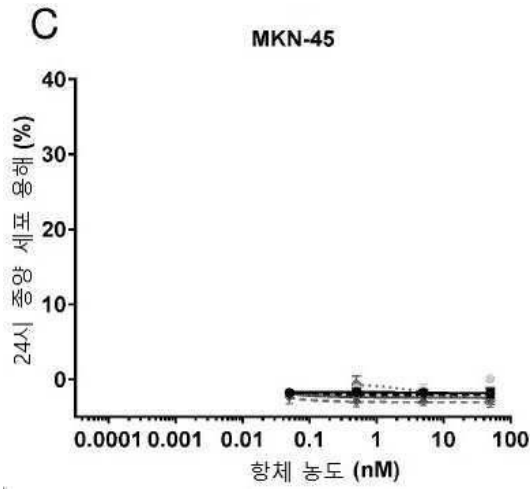

도면16a



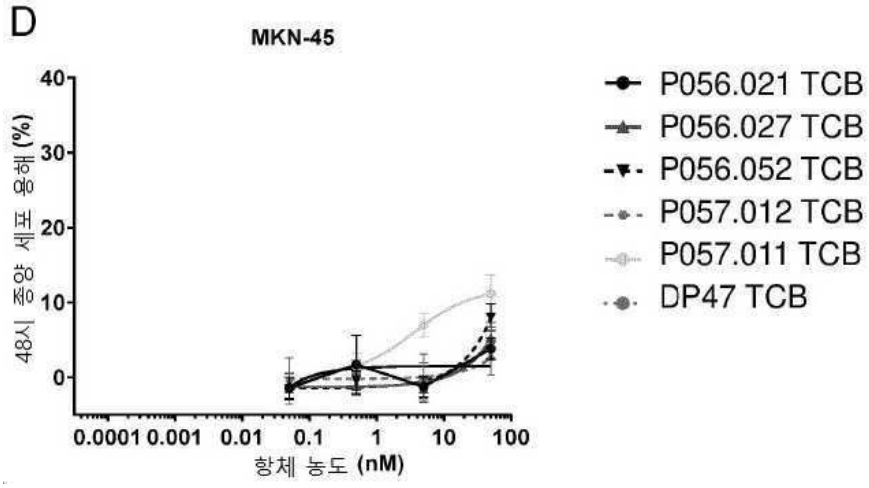
도면16b



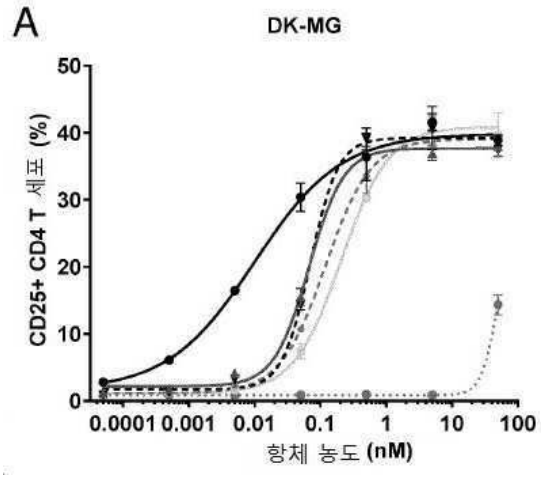

도면16c



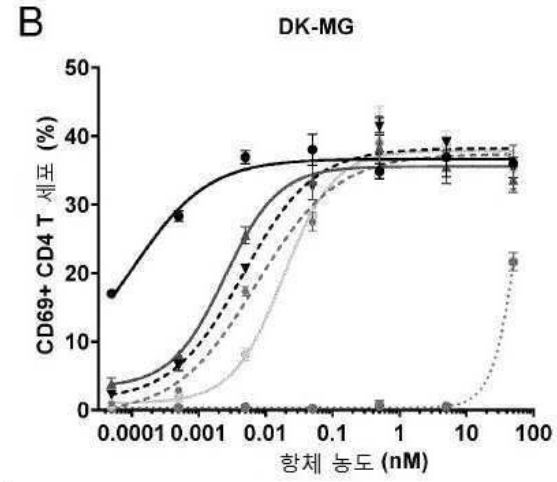

도면16d



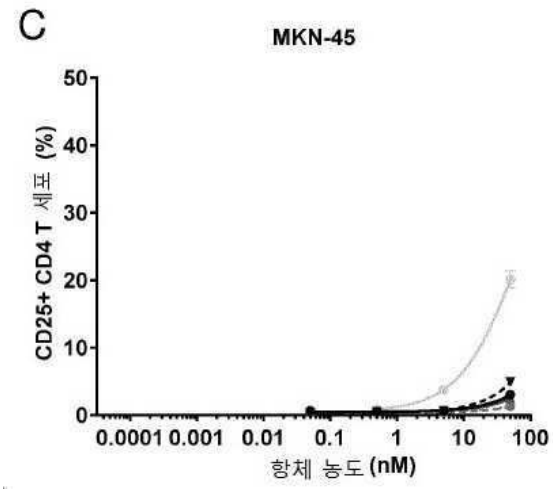
도면17a



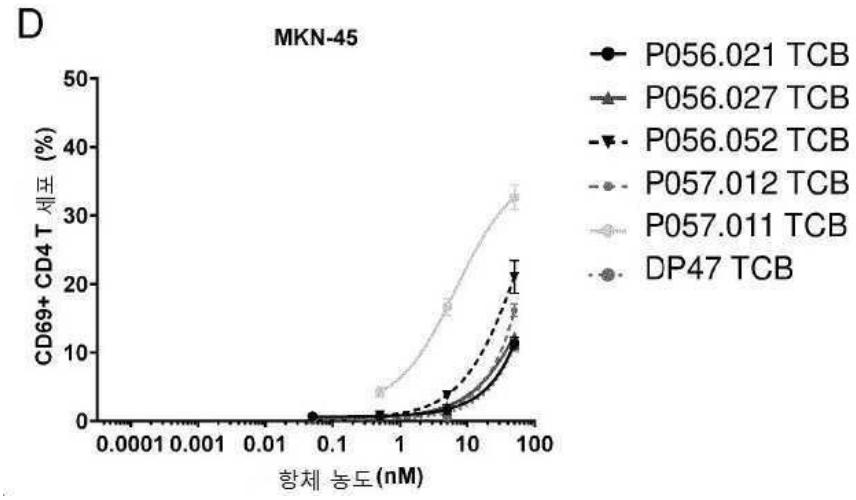

도면17b



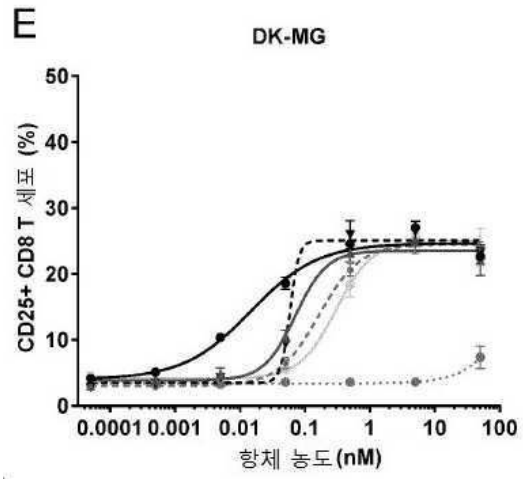

도면17c



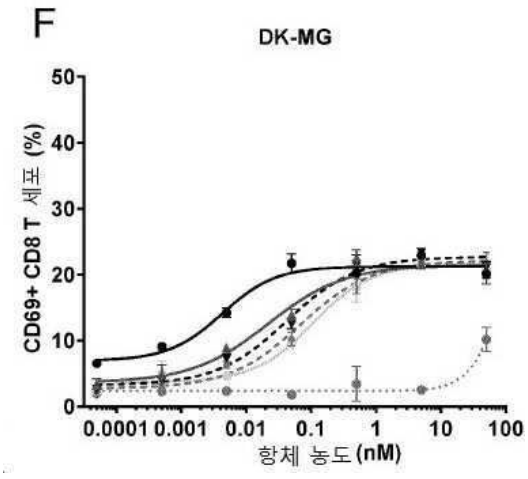
도면17d



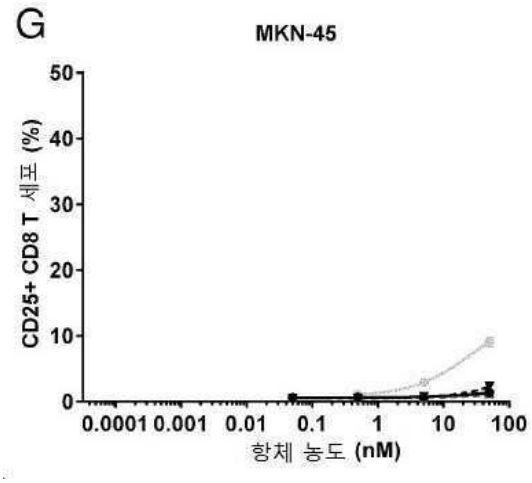

도면17e



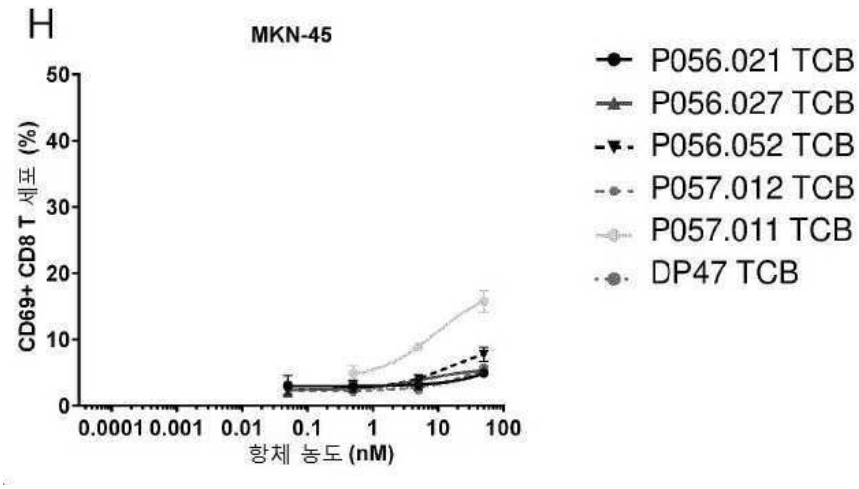

도면17f



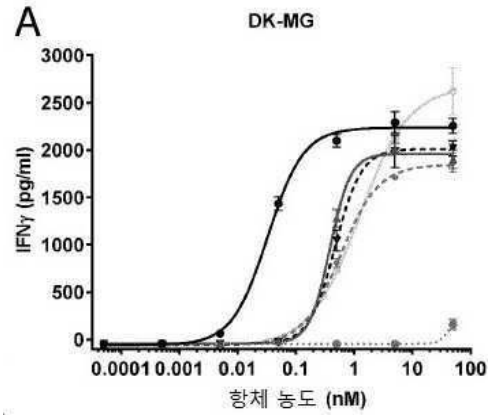
도면17g



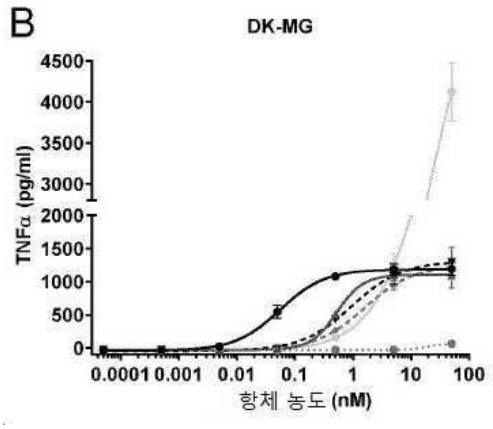

도면17h



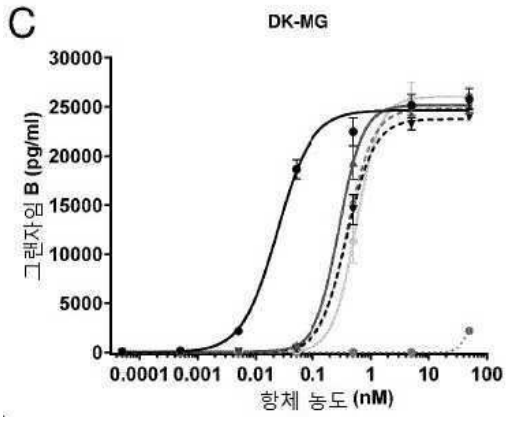

도면18a



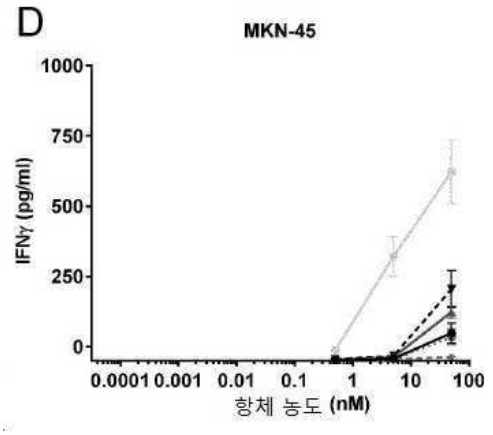
도면18b



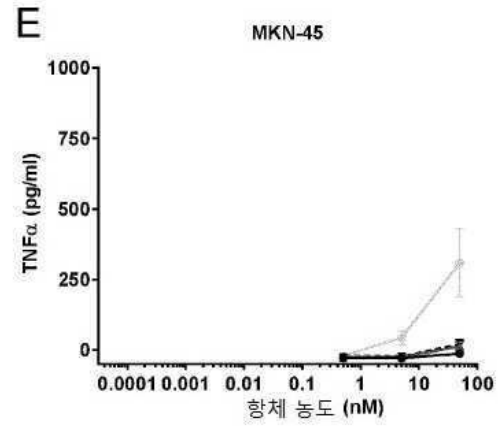

도면18c



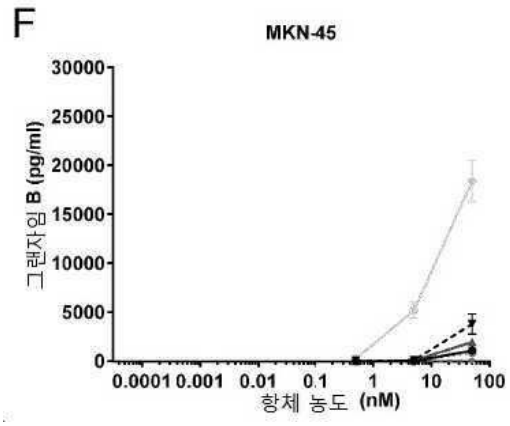

도면18d



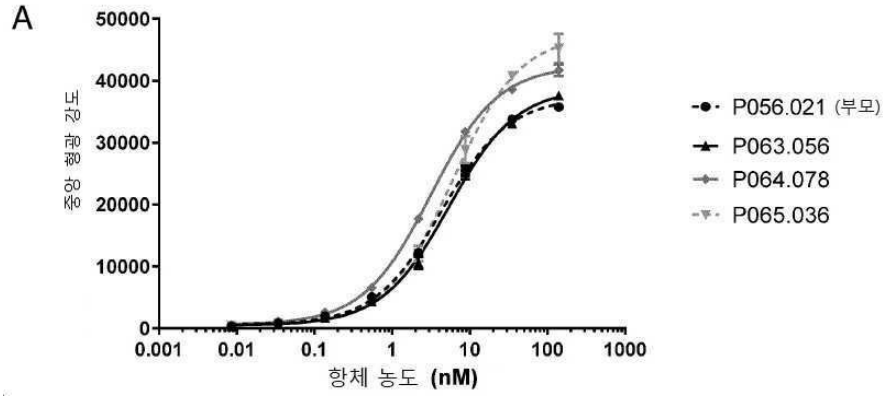
도면18e



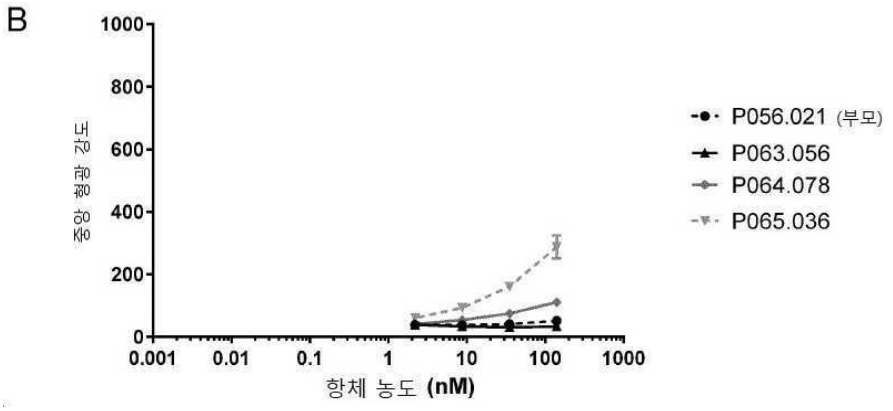

도면18f



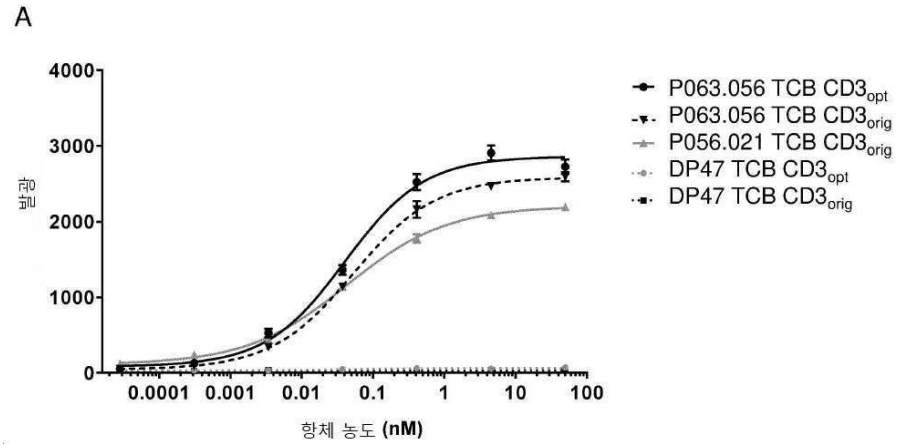

도면19a



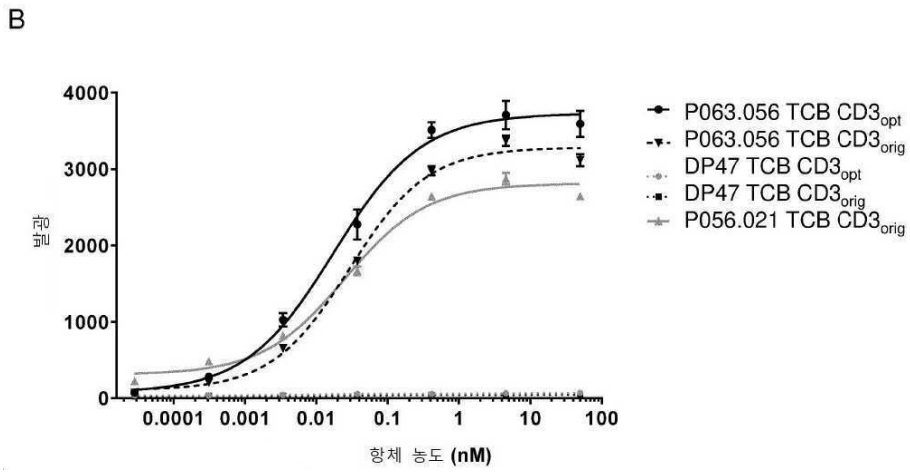
도면19b



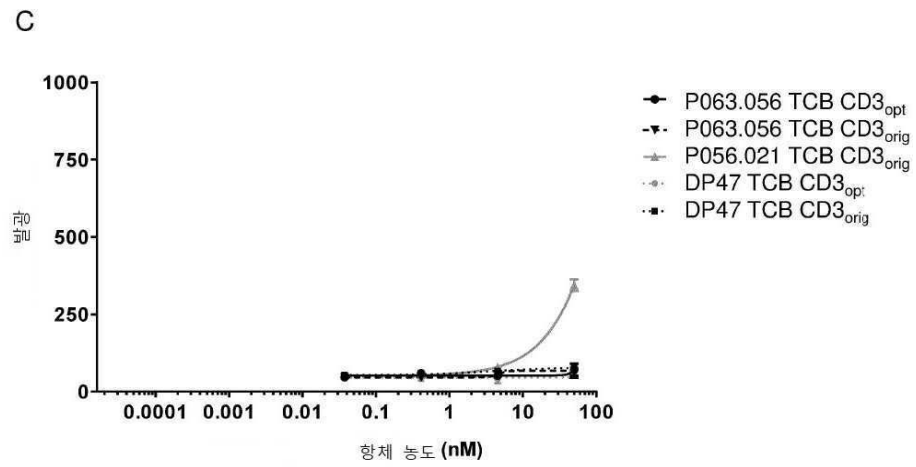

도면20a



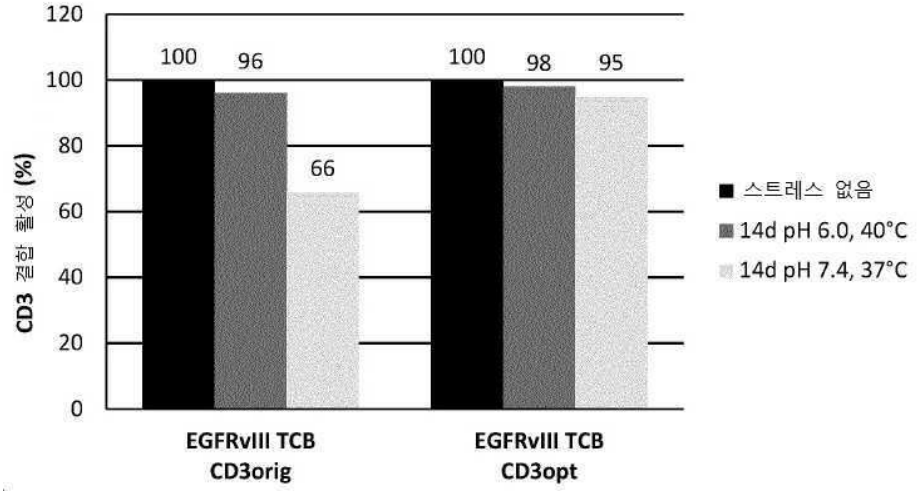

도면20b



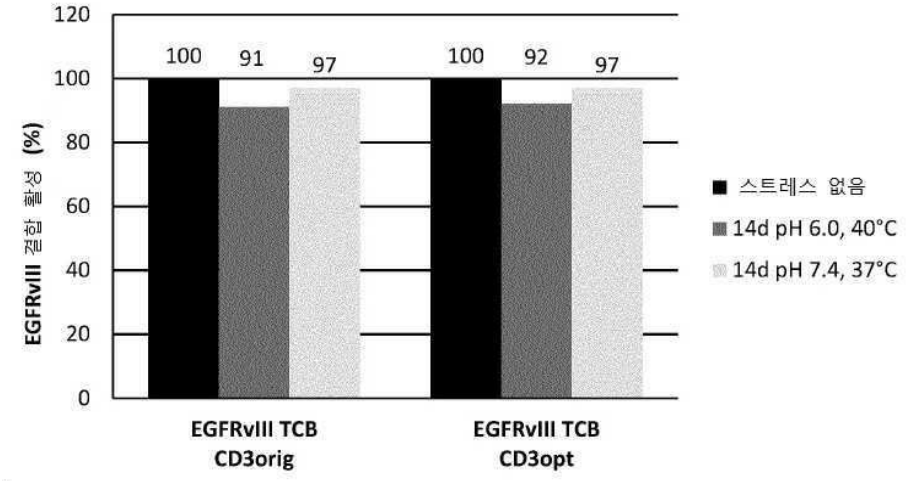
도면20c



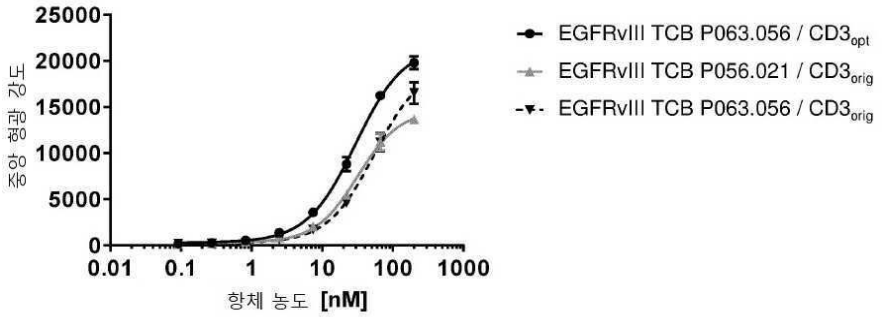

도면21



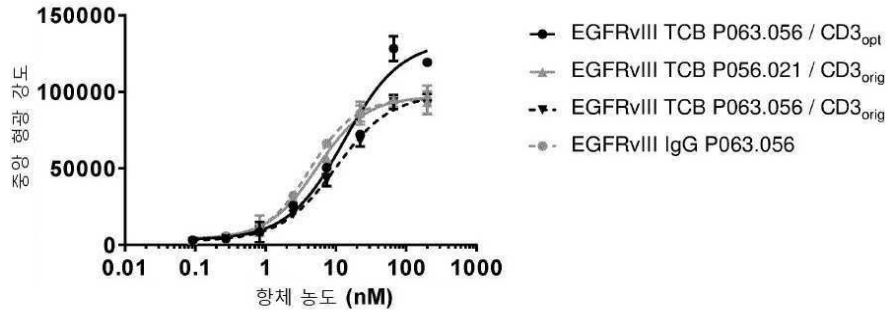

도면22



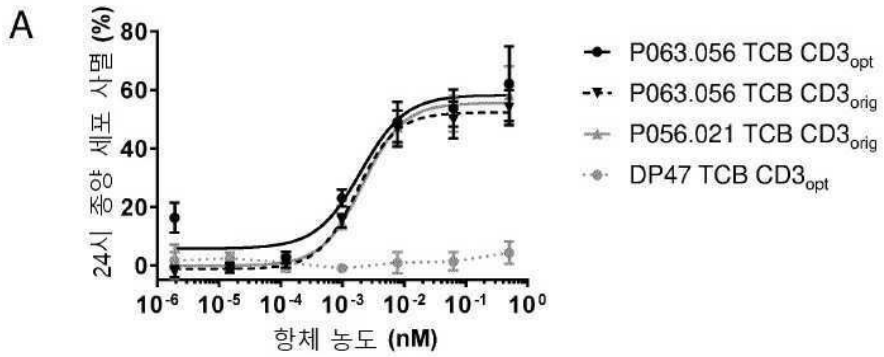
도면23



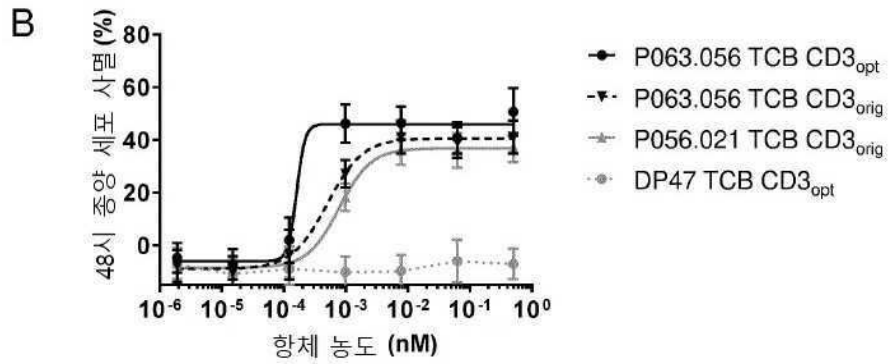

도면24



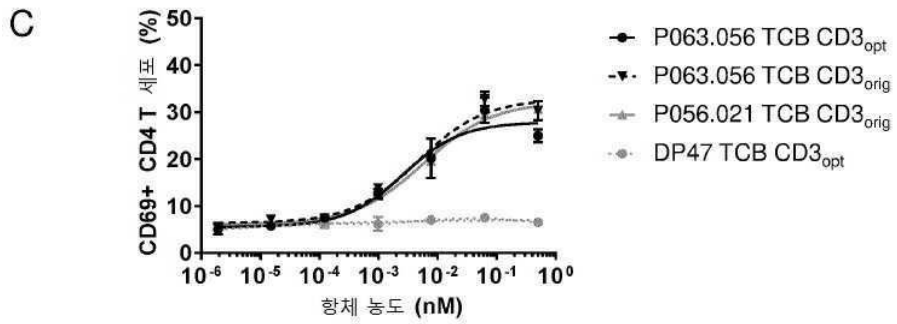

도면25a



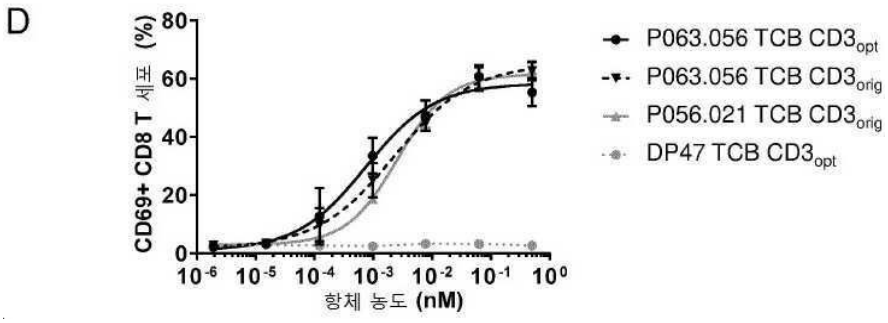

도면25b



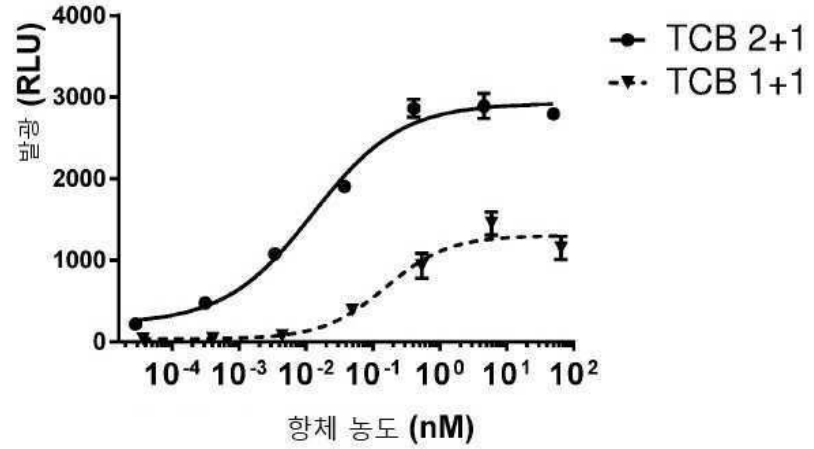
도면25c



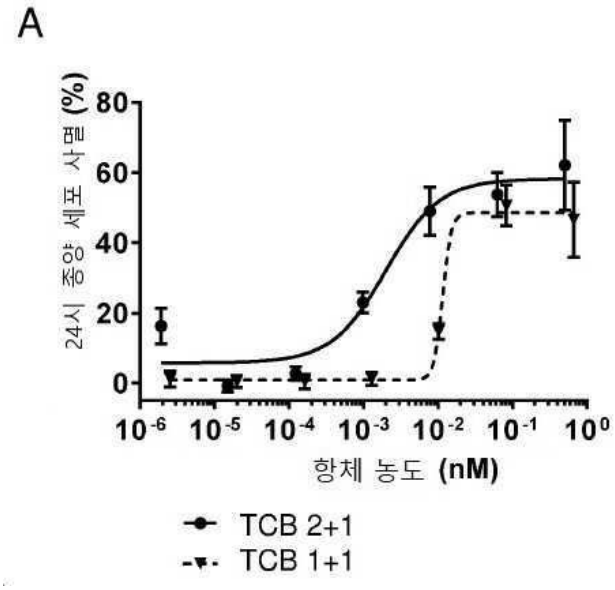

도면25d



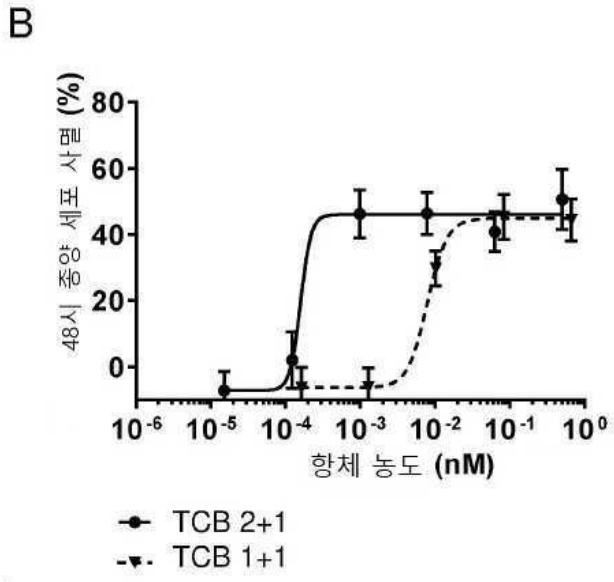

도면26



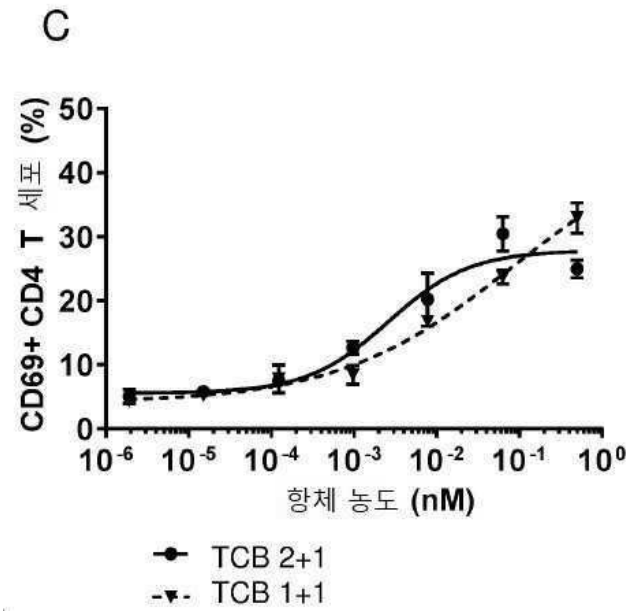
도면27a


A
24시 종양 세포 사멸 (%)
80
60
40
20
0
10-6 10-5 10-4 10-3 10-2 10-1 100
항체 농도 (nM)
TCB 2+1
TCB 1+1

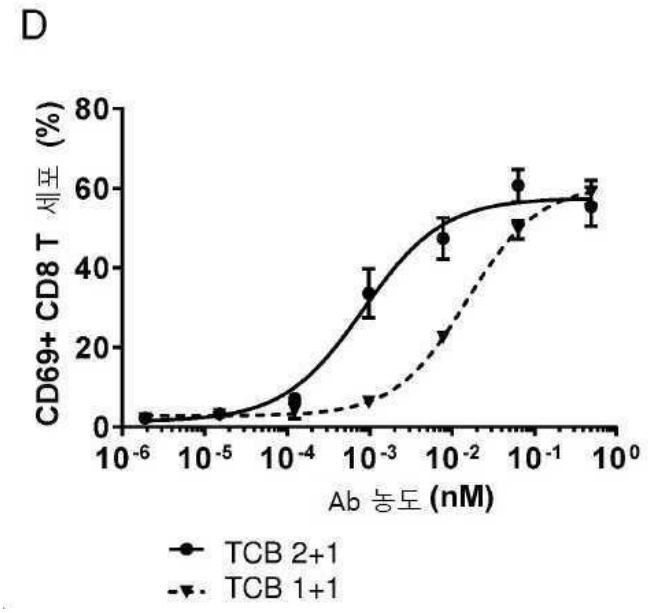
도면27b


B
48시 종양 세포 사멸 (%)
80
60
40
20
0
10-6 10-5 10-4 10-3 10-2 10-1 100
항체 농도 (nM)
TCB 2+1
TCB 1+1

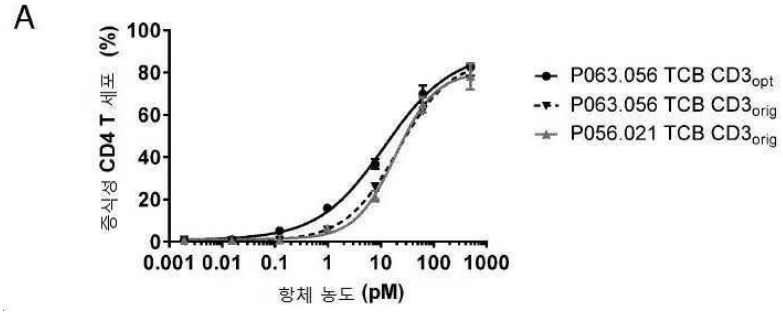
도면27c



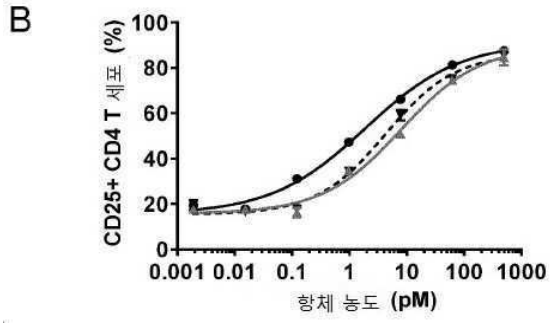

도면27d



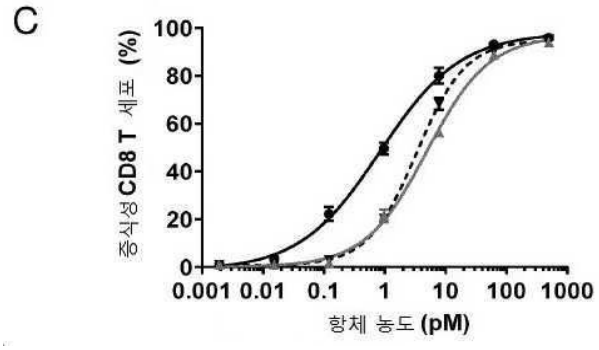

도면28a



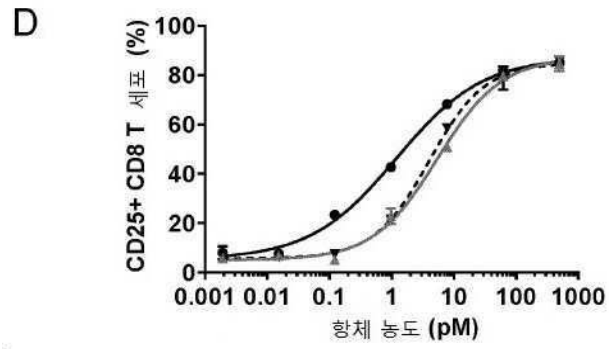
도면28b



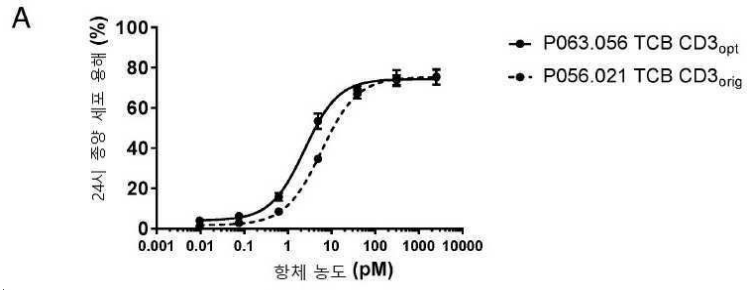

도면28c



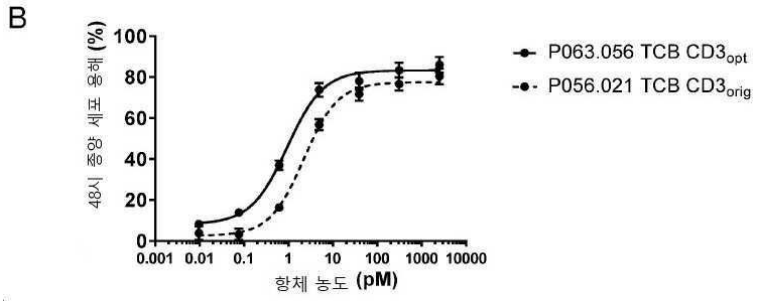

도면28d



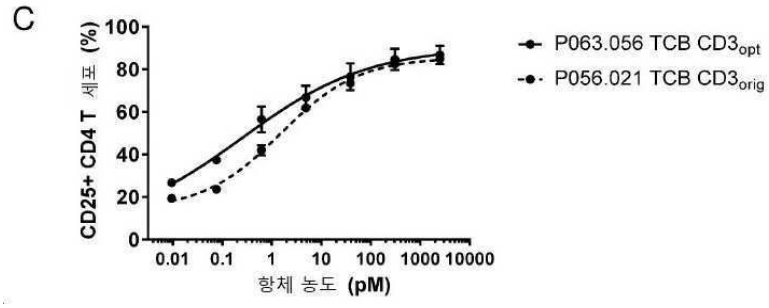

도면29a



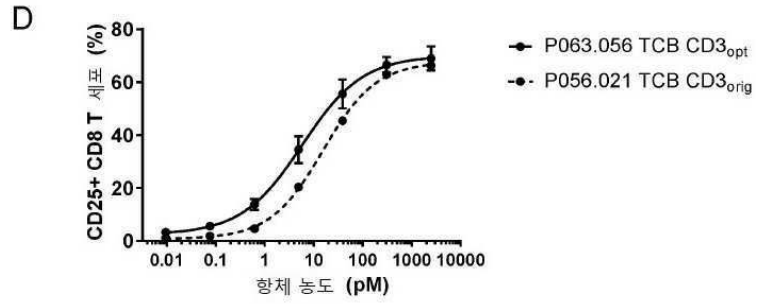
도면29b



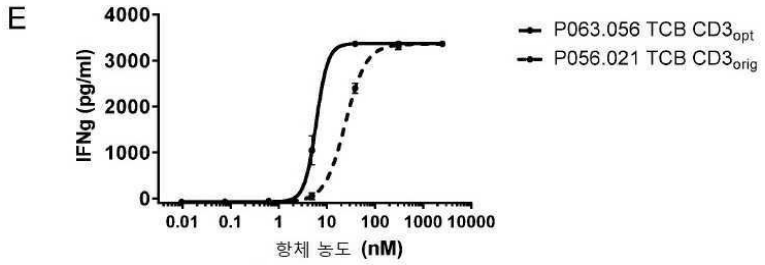

도면29c



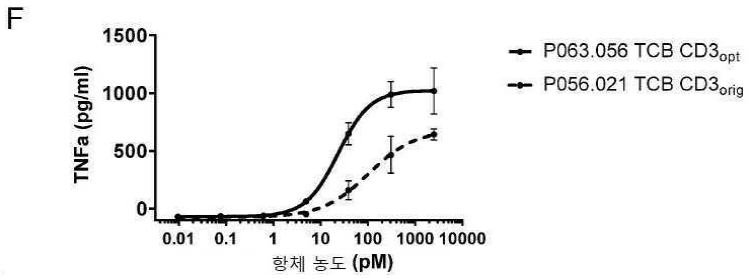

도면29d



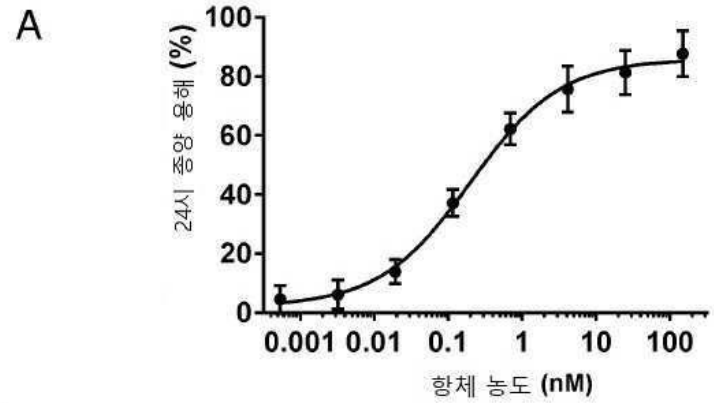

도면29e



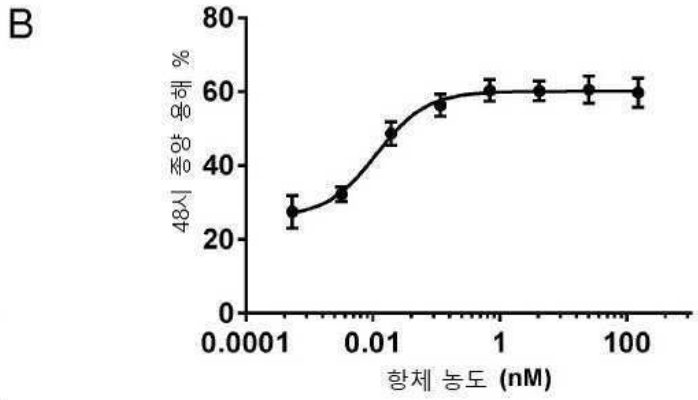
도면29f



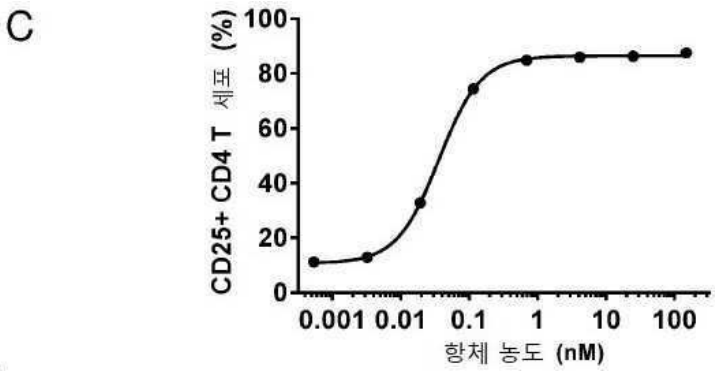

도면30a




도면30b

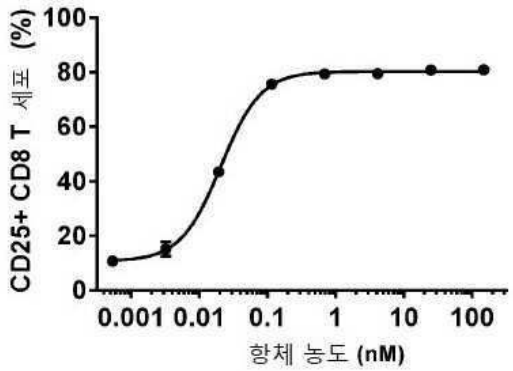



도면30c



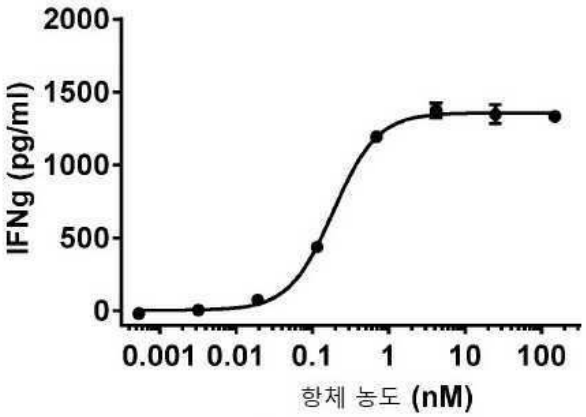
도면30d

D



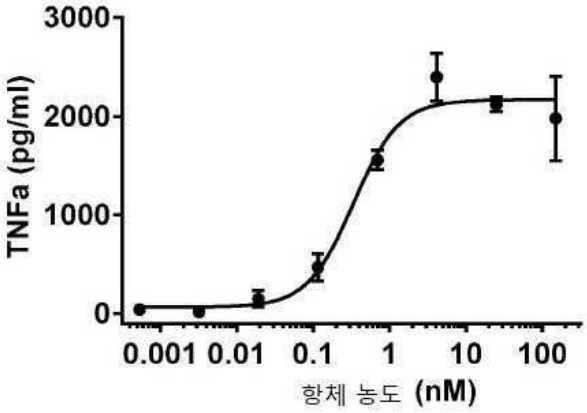

도면30e

E

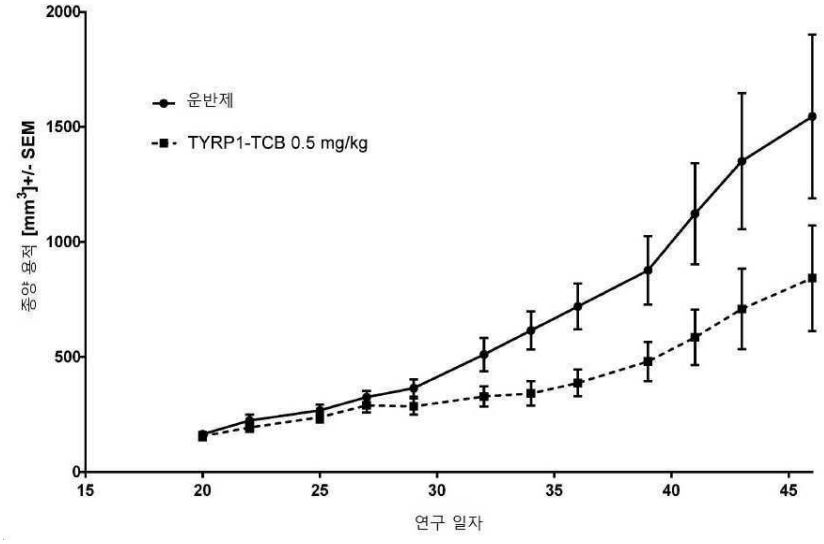



도면30f

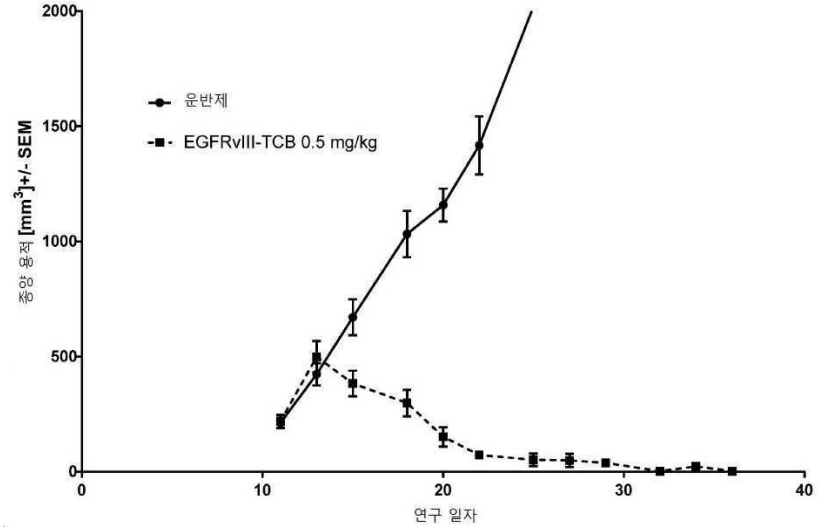
F



도면31




도면32




## 서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Antibodies binding to CD3

<130> P35214

<140> PCT/EP2019/086144

<141> 2019-12-19

<150> EP18214994.8

<151> 2018-12-21

<160> 122

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3orig HCDR1

<400> 1

Thr Tyr Ala Met Asn

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3opt HCDR1

<400> 2

Ser Tyr Ala Met Asn

1 5

<210> 3

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3orig / CD3opt HCDR2

<400> 3

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

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3orig HCDR3

<400> 4

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3opt HCDR3

<400> 5

His Thr Thr Phe Pro Ser Ser Tyr Val Ser Tyr Tyr Gly Tyr

1 5 10

<210> 6

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3orig VH

<400> 6

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110

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

115 120 125

<210> 7

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3opt VH

<400> 7

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Gln Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Thr Thr Phe Pro Ser Ser Tyr Val Ser Tyr Tyr

100 105 110

Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 8

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3orig / CD3opt LCDR1

<400> 8

Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn

1 5 10

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3orig / CD3opt LCDR2

<400> 9

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3orig / CD3opt LCDR3

<400> 10

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val

1 5

<210> 11

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3orig / CD3opt VL

<400> 11

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

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 12

<211> 453

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3orig IgG HC

<400> 12

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro

450

<210

> 13

<211> 453

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3opt IgG HC

<400> 13

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Gln Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

50 55 60

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

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

Tyr Cys Val Arg His Thr Thr Phe Pro Ser Ser Tyr Val Ser Tyr Tyr
100 105 110

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

115 120 125

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

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

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

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

180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
195 200 205
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
210 215 220
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240
Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

245 250 255
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

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

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

435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro

450

<210> 14

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3orig / CD3opt IgG LC

<400> 14

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

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Arg Thr Val

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TYRP1 HCDR1

<400> 15

Asp Tyr Phe Leu His

1 5

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TYRP1 HCDR2

<400> 16

Trp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Asn Thr Val Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TYRP1 HCDR3

<400> 17

Arg Asp Tyr Thr Tyr Glu Lys Ala Ala Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 18

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TYRP1 VH

<400> 18

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Asn Thr Val Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Thr Arg Arg Asp Tyr Thr Tyr Glu Lys Ala Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TYRP1 LCDR1

<400> 19

Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TYRP1 LCDR2

<400> 20

Asp Ala Lys Thr Leu Ala Asp

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TYRP1 LCDR3

<400> 21

Gln His Phe Trp Ser Leu Pro Phe Thr

1 5

<210> 22

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TYRP1 VL

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Leu Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 23

<211> 674

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TYRP1 VH-CH1(EE) - CD3orig/CD3opt VL-CH1 - Fc (knob, PGLALA)

<400> 23

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Asn Thr Val Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Thr Arg Arg Asp Tyr Thr Tyr Glu Lys Ala Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr
225 230 235 240

Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr
245 250 255

Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp
260 265 270

Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr
275 280 285

Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu
290 295 300

Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu
305 310 315 320

Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly
325 330 335

Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
340 345 350

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
355 360 365

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
370 375 380

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
385 390 395 400

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
405 410 415

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
420 425 430

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
435 440 445

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

```
    450                 455                 460
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
465                 470                 475                 480
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
                485                 490                 495
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
            500                 505                 510

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

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

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
                645                 650                 655
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
            660                 665                 670
Ser Pro
```

<210> 24

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TYRP1 VH-CH1(EE) -Fc (hole, PGLALA)

<400> 24

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Asn Thr Val Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Thr Arg Arg Asp Tyr Thr Tyr Glu Lys Ala Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 25
<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TYRP1 VL-CL(RK)

<400

> 25

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Leu Pro Phe
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 26

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3orig VH-CL

<400> 26

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val
115 120 125

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
130 135 140

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
145 150 155 160

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
165 170 175

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230

<210> 27

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3opt VH-CL

<400> 27

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Gln Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Thr Thr Phe Pro Ser Ser Tyr Val Ser Tyr Tyr

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

<210> 28
<211> 360
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Human CD3 epsilon stalk - Fc(knob) - Avi

<400> 28
Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys
1 5 10 15
Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Pro Gln Tyr Pro
20 25 30
Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys Asn Ile Gly Gly Asp
35 40 45
Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp His Leu Ser Leu Lys

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

115 120 125

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

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

245 250 255
Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
260 265 270
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
275 280 285
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
290 295 300
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser

305 310 315 320
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
325 330 335
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu
340 345 350
Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
355 360
<210> 29
<211> 325

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human CD3 delta stalk - Fc (hole) - Avi

<400> 29

Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg Val Phe Val Asn Cys
1 5 10 15

Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val Gly Thr Leu Leu Ser
20 25 30

Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile Leu Asp Pro Arg Gly
35 40 45

Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys Asp Lys Glu Ser Thr
50 55 60

Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Arg Ser Glu Gln Leu Tyr Phe Gln
65 70 75 80

Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
85 90 95

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

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
115 120 125

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
130 135 140

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
145 150 155 160

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
165 170 175

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
180 185 190

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
195 200 205

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

210 215 220

Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
225 230 235 240

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
245 250 255

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
260 265 270

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
275 280 285

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
290 295 300

Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys
305 310 315 320

Ile Glu Trp His Glu
325

<210> 30

<211> 351

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cynomolgus CD3 epsilon stalk - Fc (knob) - Avi

<400> 30

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Ser Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Gln
1 5 10 15

Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Ser Gln His Leu
20 25 30

Gly Ser Glu Ala Gln Trp Gln His Asn Gly Lys Asn Lys Glu Asp Ser

35 40 45

Gly Asp Arg Leu Phe Leu Pro Glu Phe Ser Glu Met Glu Gln Ser Gly
50 55 60

Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Asn Pro Glu Asp Ala Ser His
65 70 75 80

His Leu Tyr Leu Lys Ala Arg Val Ser Glu Asn Cys Val Asp Glu Gln

85 90 95

Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Ser Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
340 345 350

<210> 31

<211> 334

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cynomolgus CD3 delta stalk - Fc (hole) - Avi

<400> 31

Phe Lys Ile Pro Val Glu Glu Leu Glu Asp Arg Val Phe Val Lys Cys
1 5 10 15

Asn Thr Ser Val Thr Trp Val Glu Gly Thr Val Gly Thr Leu Leu Thr
20 25 30

Asn Asn Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile Leu Asp Pro Arg Gly
35 40 45

Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys Asp Lys Glu Ser Ala

50 55 60

Val Gln Val His Tyr Arg Met Ser Gln Asn Cys Val Asp Glu Gln Leu
65 70 75 80

Tyr Phe Gln Gly Gly Ser Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys
85 90 95

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
100 105 110

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

115 120 125

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
130 135 140

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
145 150 155 160

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu

325 330

<210> 32

<211> 699

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human TYRP1 ECD - Fc (knob) - Avi

<400> 32

Gln Phe Pro Arg Gln Cys Ala Thr Val Glu Ala Leu Arg Ser Gly Met

1 5 10 15

Cys Cys Pro Asp Leu Ser Pro Val Ser Gly Pro Gly Thr Asp Arg Cys

20 25 30

Gly Ser Ser Ser Gly Arg Gly Arg Cys Glu Ala Val Thr Ala Asp Ser

35 40 45

Arg Pro His Ser Pro Gln Tyr Pro His Asp Gly Arg Asp Asp Arg Glu

50 55 60

Val Trp Pro Leu Arg Phe Phe Asn Arg Thr Cys His Cys Asn Gly Asn
65 70 75 80
Phe Ser Gly His Asn Cys Gly Thr Cys Arg Pro Gly Trp Arg Gly Ala
85 90 95

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

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

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

Arg Asn Pro Ala Gly Asn Val Ala Arg Pro Met Val Gln Arg Leu Pro
290 295 300

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

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

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

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
485 490 495
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
500 505 510
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
515 520 525
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp

675 680 685

Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu

690 695

<210> 33

<211> 698

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cynomolgus TYRP1 ECD - Fc (knob) - Avi

<400> 33

Gln Phe Pro Arg Glu Cys Ala Thr Val Glu Ala Leu Arg Ser Gly Met

1 5 10 15

Cys Cys Pro Asp Leu Ser Pro Met Ser Gly Pro Gly Thr Asp Arg Cys

20 25 30

Gly Ser Ser Ser Gly Arg Gly Arg Cys Glu Ala Val Thr Ala Asp Ser

35 40 45

Arg Pro His Ser Pro Arg Tyr Pro His Asp Gly Arg Asp Asp Arg Glu

50 55 60

Val Trp Pro Leu Arg Phe Phe Asn Arg Thr Cys His Cys Asn Gly Asn

65 70 75 80

Phe Ser Gly His Asn Cys Gly Thr Cys Arg Pro Gly Trp Arg Gly Ala

85 90 95

Ala Cys Asp Gln Arg Val Leu Val Val Arg Arg Asn Leu Leu Asp Leu

100 105 110

Ser Lys Glu Glu Lys Asn His Phe Val Arg Ala Leu Asp Met Ala Lys

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Tyr Asn Tyr Phe Val Trp Thr His Tyr Tyr Ser Val Lys Lys Thr Phe

165 170 175

Leu Gly Ala Gly Gln Glu Ser Phe Gly Glu Val Asp Phe Ser His Glu

180 185 190

Gly Pro Ala Phe Leu Thr Trp His Arg Tyr His Leu Leu Arg Leu Glu

195 200 205

Lys Asp Met Gln Glu Met Leu Gln Glu Pro Ser Phe Ser Leu Pro Tyr

210 215 220

Trp Asn Phe Ala Thr Gly Lys Asn Val Cys Asp Ile Cys Thr Asp Asp

225 230 235 240

Leu Met Gly Ser Arg Ser Asn Phe Asp Ser Thr Leu Ile Ser Pro Asn

245 250 255

Ser Val Phe Ser Gln Trp Arg Val Val Cys Asp Ser Leu Glu Asp Tyr

260 265 270

Asp Thr Leu Gly Thr Leu Cys Asn Ser Thr Glu Ser Gly Pro Ile Arg

275 280 285

Arg Asn Pro Ala Gly Asn Val Ala Arg Pro Met Val Gln Arg Leu Pro

290 295 300

Glu Pro Gln Asp Val Ala Gln Cys Leu Glu Val Gly Leu Phe Asp Thr
305 310 315 320
Pro Pro Phe Tyr Ser Asn Ser Thr Asn Ser Phe Arg Asn Thr Val Glu
325 330 335
Gly Tyr Ser Asp Pro Thr Gly Lys Tyr Asp Pro Ala Val Arg Ser Leu

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

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

465 470 475 480
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
485 490 495
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
500 505 510
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
515 520 525
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

530 535 540
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile

675 680 685

Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu

690 695

<210> 34

<211> 699

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse TYRP1 ECD - Fc (knob) - Avi

<400> 34

Gln Phe Pro Arg Glu Cys Ala Asn Ile Glu Ala Leu Arg Arg Gly Val

1 5 10 15

Cys Cys Pro Asp Leu Leu Pro Ser Ser Gly Pro Gly Thr Asp Pro Cys

20 25 30

Gly Ser Ser Ser Gly Arg Gly Arg Cys Val Ala Val Ile Ala Asp Ser

35 40 45

Arg Pro His Ser Arg His Tyr Pro His Asp Gly Lys Asp Asp Arg Glu

50 55 60

Ala Trp Pro Leu Arg Phe Phe Asn Arg Thr Cys Gln Cys Asn Asp Asn
65 70 75 80

Phe Ser Gly His Asn Cys Gly Thr Cys Arg Pro Gly Trp Arg Gly Ala
85 90 95

Ala Cys Asn Gln Lys Ile Leu Thr Val Arg Arg Asn Leu Leu Asp Leu
100 105 110

Ser Pro Glu Glu Lys Ser His Phe Val Arg Ala Leu Asp Met Ala Lys
115 120 125

Arg Thr Thr His Pro Gln Phe Val Ile Ala Thr Arg Arg Leu Glu Asp
130 135 140

Ile Leu Gly Pro Asp Gly Asn Thr Pro Gln Phe Glu Asn Ile Ser Val
145 150 155 160

Tyr Asn Tyr Phe Val Trp Thr His Tyr Tyr Ser Val Lys Lys Thr Phe
165 170 175

Leu Gly Thr Gly Gln Glu Ser Phe Gly Asp Val Asp Phe Ser His Glu
180 185 190

Gly Pro Ala Phe Leu Thr Trp His Arg Tyr His Leu Leu Gln Leu Glu
195 200 205

Arg Asp Met Gln Glu Met Leu Gln Glu Pro Ser Phe Ser Leu Pro Tyr
210 215 220

Trp Asn Phe Ala Thr Gly Lys Asn Val Cys Asp Val Cys Thr Asp Asp
225 230 235 240

Leu Met Gly Ser Arg Ser Asn Phe Asp Ser Thr Leu Ile Ser Pro Asn
245 250 255

Ser Val Phe Ser Gln Trp Arg Val Val Cys Glu Ser Leu Glu Glu Tyr
260 265 270

Asp Thr Leu Gly Thr Leu Cys Asn Ser Thr Glu Gly Gly Pro Ile Arg
275 280 285

Arg Asn Pro Ala Gly Asn Val Gly Arg Pro Ala Val Gln Arg Leu Pro
290 295 300

Glu Pro Gln Asp Val Thr Gln Cys Leu Glu Val Arg Val Phe Asp Thr
305 310 315 320
Pro Pro Phe Tyr Ser Asn Ser Thr Asp Ser Phe Arg Asn Thr Val Glu
325 330 335

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

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

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
465 470 475 480
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
485 490 495
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
500 505 510
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
515 520 525

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
530 535 540
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp

675 680 685

Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu

690 695

<210> 35

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fc (hole)

<400> 35

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro

225

<210> 36

<211> 393

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII ECD - Avi - His

<400> 36

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys

1 5 10 15

Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val

20 25 30

Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val Cys Asn Gly

35 40 45

Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn

50 55 60

Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly

100 105 110

Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala

115 120 125

Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln

130 135 140

Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg

145 150 155 160

Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys

165 170 175

Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr

180 185 190

Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys

195 200 205

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

210 215 220

Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg

225 230 235 240

Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg

245 250 255

Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu

260 265 270

Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys

275 280 285

Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys

290 295 300

Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala

305 310 315 320

Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly

325 330 335

Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile

340 345 350

Pro Ser Val Asp Gly Gly Ser Pro Thr Pro Pro Thr Pro Gly Gly Gly

355 360 365

Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu

370 375 380

Ala Arg Ala His His His His His His

385 390

<210> 37

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P056.021 HCDR1

<400> 37

Ser Tyr Trp Ile Ala

1 5

<210> 38

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P056.021 HCDR2

<400> 38

Val Ile His Pro Tyr Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P056.021 HCDR3

<400> 39

Val Ser Arg Ser Ser Tyr Ala Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 40

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P056.021 VH

<400> 40

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Asp Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P056.021 LCDR1

<400> 41

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P056.021 LCDR2

<400> 42

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 43

<211

> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P056.021 LCDR3

<400> 43

Gln Gln Val His Ser Gly Pro Pro Val Thr

1 5 10

<210> 44

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P056.021 VL

<400> 44

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Val His Ser Gly Pro Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

100 105 110

Ile Lys

<210> 45

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P056.052 HCDR1

<400> 45

Asn Tyr Trp Ile Gly

1 5

<210> 46

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P056.052 HCDR2

<400> 46

Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Arg Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P056.052 HCDR3

<400> 47

Val Ser Arg Ser Ser Tyr Ala Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 48

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P056.052 VH

<400> 48

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Met Asn Tyr

20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Leu Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 49

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P056.052 LCDR1

<400> 49

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P056.052 LCDR2

<400> 50

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P056.052 LCDR3

<400> 51

Gln Gln Val His Ser Gly Pro Pro Val Thr

1 5 10

<210> 52

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P056.052 VL

<400> 52

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Val His Ser Gly Pro Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

100 105 110

Ile Lys

<210> 53

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P047.019 HCDR1

<400> 53

Ser Ile Trp Ile His

1 5

<210> 54

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P047.019 HCDR2

<400> 54

Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P047.019 HCDR3

<400> 55

Thr Gly Pro Gly Leu Ala Phe Asp Tyr

1 5

<210> 56

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P047.019 VH

<400> 56

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Pro Ser Ile

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Thr Gly Pro Gly Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 57

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P047.019 LCDR1

<400> 57

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P047.019 LCDR2

<400> 58

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P047.019 LCDR3

<400> 59

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Ile Thr

1 5

<210> 60

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P047.019 VL

<400> 60

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

Lys

<210> 61
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> EGFRvIII P057.012 HCDR1
<400> 61
Asn Tyr Trp Ile Ala
1 5
<210> 62
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> EGFRvIII P057.012 HCDR2
<400> 62
Ile Ile Tyr Pro Asp Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15
Gly

<210> 63
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P057.012 HCDR3

<400> 63

Ala Thr Asn Ile Ala Ser Gly Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 64

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P057.012 VH

<400> 64

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ala Asn Tyr
20 25 30

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

35 40 45

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 65

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P057.012 LCDR1

<400> 65

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Trp Asn Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 66

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P057.012 LCDR2

<400

> 66

Trp Ala Ser Lys Arg Glu Ser

1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P057.012 LCDR3

<400> 67

Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro Ile Thr

1 5

<210> 68

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P057.012 VL

<400> 68

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Trp Asn

20 25 30

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

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Lys Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

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

100 105 110

Lys

<210> 69

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P057.011 HCDR1

<400> 69

Arg Arg Trp Ile Ala

1 5

<210> 70

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P057.011 HCDR2

<400> 70

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 71

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P057.011 HCDR3

<400> 71

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

1 5 10

<210> 72

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P057.011 VH

<400> 72

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Asn Phe Gly Arg Arg

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 73

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P057.011 LCDR1

<400> 73

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Trp Asn Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 74

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P057.011 LCDR2

<400> 74

Trp Ala Ser Lys Arg Glu Ser

1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P057.011 LCDR3

<400> 75

Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro Ile Thr

1 5

<210> 76

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P057.011 VL

<400> 76

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Trp Asn

20 25 30

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

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Lys Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

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

100 105 110

Lys

<210> 77

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P056.027 HCDR1

<400> 77

Asn Asn Trp Ile Ala

1 5

<210> 78

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P056.027 HCDR2

<400> 78

Val Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 79

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P056.027 HCDR3

<400> 79

Val Ser Arg Ser Ser Tyr Ala Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 80

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P056.027 VH

<400> 80

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Gly Asn Asn
20 25 30

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

Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Ser Arg Ser Ser Tyr Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 81

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P056.027 LCDR1

<400> 81

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 82

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P056.027 LCDR2

<400> 82

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 83

<211

> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P056.027 LCDR3

<400> 83

Gln Gln Val His Ser Gly Pro Pro Val Thr

1 5 10

<210> 84

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P056.027 VL

<400> 84

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Val His Ser Gly Pro Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
100 105 110
Ile Lys

<210> 85
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> EGFRvIII P063.056 HCDR1
<400> 85
Ser Tyr Trp Ile Ala
1 5
<210> 86
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> EGFRvIII P063.056 HCDR2
<400> 86
Val Ile His Pro Tyr Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 87
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> EGFRvIII P063.056 HCDR3
<400> 87
Val Ser Arg Ser Ser Tyr Ala Phe Asp Tyr
1 5 10
<210> 88
<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P063.056 VH

<400> 88

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Asp Ser Tyr

20 25 30

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

Gly Val Ile His Pro Tyr Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Val Ser Arg Ser Ser Tyr Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 89

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P063.056 LCDR1

<400> 89

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 90

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P063.056 LCDR2

<400> 90

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 91

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P063.056 LCDR3

<400> 91

Gln Gln Gln Arg Asp Gly Pro Pro Val Thr

1 5 10

<210> 92

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P063.056 VL

<400> 92

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Gln Arg Asp Gly Pro Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

100 105 110

Ile Lys

<210> 93

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P064.078 HCDR1

<400> 93

Ser Tyr Trp Ile Ala

1 5

<210> 94

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P064.078 HCDR2

<400> 94

Val Ile His Pro Tyr Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 95

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P064.078 HCDR3

<400> 95

Val Ser Arg Leu Ser Tyr Ala Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 96

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P064.078 VH

<400> 96

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Val Ser Arg Leu Ser Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 97

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P064.078 LCDR1

<400> 97

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15
Ala

<210> 98

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P064.078 LCDR2

<400> 98

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 99

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P064.078 LCDR3

<400> 99

Gln Gln Val His Ser Gly Pro Pro Val Thr

1 5 10

<210> 100

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P064.078 VL

<400> 100

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Val His Ser Gly Pro Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

100 105 110

Ile Lys

<210> 101

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P065.036 HCDR1

<400> 101

Ser Tyr Trp Ile Ala

1 5

<210> 102

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P065.036 HCDR2

<400> 102

Val Ile His Pro Tyr Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 103

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P065.036 HCDR3

<400> 103

Val Ser Arg Ser Ser Tyr Ala Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 104

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P065.036 VH

<400> 104

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Asp Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 105

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P065.036 LCDR1

<400> 105

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 106

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P065.036 LCDR2

<400> 106

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 107

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P065.036 LCDR3

<400> 107

Gln Gln Val Tyr Ser Gly Pro Pro Val Thr

1 5 10

<210> 108

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII P065.036 VL

<400> 108

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

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

100 105 110

Ile Lys

<210> 109

<211> 672

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII VH-CH1(EE) - CD3orig/CD3opt VL-CH1 - Fc (knob, PGLALA)

<400> 109

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Asp Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile His Pro Tyr Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Ser Arg Ser Ser Tyr Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

210 215 220

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

Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly
245 250 255

Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln
260 265 270

Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys
275 280 285

Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly
290 295 300

Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu
305 310 315 320

Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly
325 330 335

Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
340 345 350

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
355 360 365

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
370 375 380

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
385 390 395 400

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
405 410 415

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
420 425 430

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
435 440 445

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
450 455 460

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
465 470 475 480
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
485 490 495
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
500 505 510
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
515 520 525

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

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

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
660 665 670

<210> 110
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> EGFRvIII VH-CH1(EE) -Fc (hole, PGLALA)
<400> 110

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

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

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

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

<210> 111

<211> 221

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRvIII VL-CL(RK)

<400> 111

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Gln Arg Asp Gly Pro Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

100 105 110

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

115 120 125

Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn

130 135 140

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala

145 150 155 160

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

165 170 175

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp

180 185 190

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu

195 200 205

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215 220

<210> 112

<211> 186

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys
1 5 10 15

Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Pro Gln Tyr Pro
20 25 30

Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys Asn Ile Gly Gly Asp
35 40 45

Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp His Leu Ser Leu Lys
50 55 60

Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg
65 70 75 80

Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg
85 90 95

Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met Ser Val Ala Thr Ile
100 105 110

Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu Leu Leu Leu Val Tyr
115 120 125

Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly
130 135 140

Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro
145 150 155 160

Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp
165 170 175

Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
180 185

<210> 113

<211> 177

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 113

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Ser Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Gln
1 5 10 15

Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Ser Gln His Leu
20 25 30
Gly Ser Glu Ala Gln Trp Gln His Asn Gly Lys Asn Lys Glu Asp Ser
35 40 45

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

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

Ile

<210> 114
<211> 513
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 114
Gln Phe Pro Arg Gln Cys Ala Thr Val Glu Ala Leu Arg Ser Gly Met
1 5 10 15
Cys Cys Pro Asp Leu Ser Pro Val Ser Gly Pro Gly Thr Asp Arg Cys
20 25 30
Gly Ser Ser Ser Gly Arg Gly Arg Cys Glu Ala Val Thr Ala Asp Ser

35 40 45

Arg Pro His Ser Pro Gln Tyr Pro His Asp Gly Arg Asp Asp Arg Glu

50 55 60

Val Trp Pro Leu Arg Phe Phe Asn Arg Thr Cys His Cys Asn Gly Asn

65 70 75 80

Phe Ser Gly His Asn Cys Gly Thr Cys Arg Pro Gly Trp Arg Gly Ala

85 90 95

Ala Cys Asp Gln Arg Val Leu Ile Val Arg Arg Asn Leu Leu Asp Leu

100 105 110

Ser Lys Glu Glu Lys Asn His Phe Val Arg Ala Leu Asp Met Ala Lys

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Tyr Asn Tyr Phe Val Trp Thr His Tyr Tyr Ser Val Lys Lys Thr Phe

165 170 175

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

180 185 190

Gly Pro Ala Phe Leu Thr Trp His Arg Tyr His Leu Leu Arg Leu Glu

195 200 205

Lys Asp Met Gln Glu Met Leu Gln Glu Pro Ser Phe Ser Leu Pro Tyr

210 215 220

Trp Asn Phe Ala Thr Gly Lys Asn Val Cys Asp Ile Cys Thr Asp Asp

225 230 235 240

Leu Met Gly Ser Arg Ser Asn Phe Asp Ser Thr Leu Ile Ser Pro Asn

245 250 255

Ser Val Phe Ser Gln Trp Arg Val Val Cys Asp Ser Leu Glu Asp Tyr

260 265 270

Asp Thr Leu Gly Thr Leu Cys Asn Ser Thr Glu Asp Gly Pro Ile Arg

275 280 285

Arg Asn Pro Ala Gly Asn Val Ala Arg Pro Met Val Gln Arg Leu Pro

290 295 300

Glu Pro Gln Asp Val Ala Gln Cys Leu Glu Val Gly Leu Phe Asp Thr

305 310 315 320

Pro Pro Phe Tyr Ser Asn Ser Thr Asn Ser Phe Arg Asn Thr Val Glu

325 330 335

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

340 345 350

His Asn Leu Ala His Leu Phe Leu Asn Gly Thr Gly Gly Gln Thr His

355 360 365

Leu Ser Pro Asn Asp Pro Ile Phe Val Leu Leu His Thr Phe Thr Asp

370 375 380

Ala Val Phe Asp Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Asn Ala Asp Ile Ser Thr

385 390 395 400

Phe Pro Leu Glu Asn Ala Pro Ile Gly His Asn Arg Gln Tyr Asn Met

405 410 415

Val Pro Phe Trp Pro Pro Val Thr Asn Thr Glu Met Phe Val Thr Ala

420 425 430

Pro Asp Asn Leu Gly Tyr Thr Tyr Glu Ile Gln Trp Pro Ser Arg Glu

435 440 445

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

450 455 460

Leu Val Ala Leu Ile Phe Gly Thr Ala Ser Tyr Leu Ile Arg Ala Arg

465 470 475 480

Arg Ser Met Asp Glu Ala Asn Gln Pro Leu Leu Thr Asp Gln Tyr Gln

485 490 495

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

500 505 510

Val

<210> 115

<211> 919

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 115

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys
1 5 10 15

Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val
20 25 30

Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val Cys Asn Gly
35 40 45

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

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

Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu
85 90 95

Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly
100 105 110

Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala
115 120 125

Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln
130 135 140

Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg
145 150 155 160

Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys
165 170 175

Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr
180 185 190

Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys
195 200 205

Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys
210 215 220

Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg
225 230 235 240

Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg
245 250 255

Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu
260 265 270

Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys
275 280 285

Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys
290 295 300

Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala
305 310 315 320

Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly
325 330 335

Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile
340 345 350

Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val
355 360 365

Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His Ile Val Arg
370 375 380

Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu Val Glu Pro
385 390 395 400

Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu Arg Ile Leu
405 410 415

Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe
420 425 430

Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu Lys Val Lys
435 440 445

Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser Pro Lys Ala
450 455 460

Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser Val Asp Asn

465 470 475 480

Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln

485 490 495

Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp Tyr Val Arg

500 505 510

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

515 520 525

Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg Leu Val His

530 535 540

Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro Gln His Val

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser

595 600 605

Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser Lys Pro Tyr

610 615 620

Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu Lys Gly Glu

625 630 635 640

Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met

645 650 655

Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys Phe Arg Glu

660 665 670

Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Tyr Leu

675 680 685

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

690 695 700

Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp Asp Val Val

705 710 715 720

Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe Phe Ser Ser Pro
725 730 735
Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu Ser Ser Leu Ser Ala Thr Ser Asn
740 745 750

Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp Arg Asn Gly Leu Gln Ser Cys Pro
755 760 765
Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly
770 775 780
Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu
785 790 795 800
Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro Lys Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn
805 810 815

Pro Val Tyr His Asn Gln Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro
820 825 830
His Tyr Gln Asp Pro His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu
835 840 845
Asn Thr Val Gln Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala
850 855 860
His Trp Ala Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp
865 870 875 880

Tyr Gln Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn Gly Ile Phe
885 890 895
Lys Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val Ala Pro Gln
900 905 910
Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala
915

<210> 116
<211> 1186
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 116
Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln

1 5 10 15

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

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

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

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

Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro
260 265 270

Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly
275 280 285

Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys
290 295 300

Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu
305 310 315 320

Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys
325 330 335

Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe
340 345 350

Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu
355 360 365

Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln
370 375 380

Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu
385 390 395 400

Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val
405 410 415

Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile
420 425 430

Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala
435 440 445

Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr
450 455 460

Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln
465 470 475 480

Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro
485 490 495

Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val

500 505 510

Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn

515 520 525

Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn

530 535 540

Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His

545 550 555 560

Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met

565 570 575

Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val

580 585 590

Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly

595 600 605

Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr

610 615 620

Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile

625 630 635 640

Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg

645 650 655

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

660 665 670

Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe

675 680 685

Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys

690 695 700

Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile

705 710 715 720

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

725 730 735

Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg

740 745 750

Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu
755 760 765

Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn
770 775 780

Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly
785 790 795 800

Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala
805 810 815

Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe
820 825 830

Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu
835 840 845

Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His
850 855 860

Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val
865 870 875 880

Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala
885 890 895

Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro
900 905 910

Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met
915 920 925

Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe
930 935 940

Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp
945 950 955 960

Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala
965 970 975

Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr
980 985 990

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

995 1000 1005

Pro Leu Leu Ser Ser Leu Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val

1010 1015 1020

Ala Cys Ile Asp Arg Asn Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu

1025 1030 1035

Asp Ser Phe Leu Gln Arg Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu

1040 1045 1050

Thr Glu Asp Ser Ile Asp Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu Tyr

1055 1060 1065

Ile Asn Gln Ser Val Pro Lys Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn

1070 1075 1080

Pro Val Tyr His Asn Gln Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp

1085 1090 1095

Pro His Tyr Gln Asp Pro His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu

1100 1105 1110

Tyr Leu Asn Thr Val Gln Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp

1115 1120 1125

Ser Pro Ala His Trp Ala Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu

1130 1135 1140

Asp Asn Pro Asp Tyr Gln Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys

1145 1150 1155

Pro Asn Gly Ile Phe Lys Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr

1160 1165 1170

Leu Arg Val Ala Pro Gln Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala

1175 1180 1185

<210> 117

<211> 225

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Pro

225

<210> 118

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 118

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 119

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 119

Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 120

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 120

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> 121

<211> 105

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 121

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

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 122

<211> 328

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 122

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

325