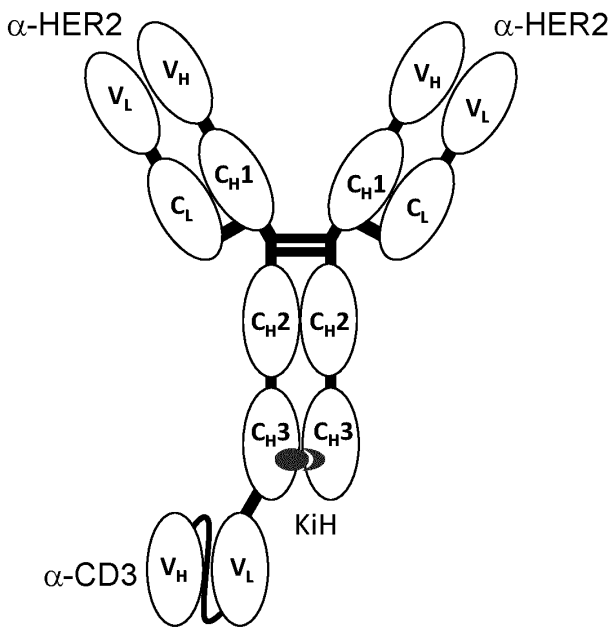
Figure 1

A


α-HER2
α-HER2
VH
VL
CH1
CL
CH2
CH3
KiH
α-CD3

B

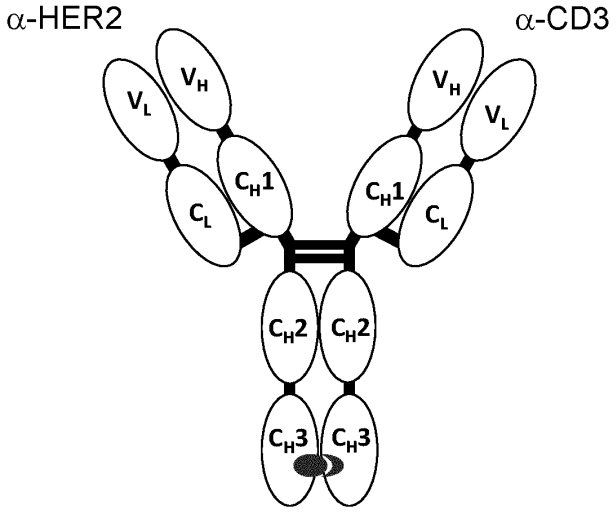

α-HER2
α-CD3
VH
VL
CH1
CL
CH2
CH3

Figure 2

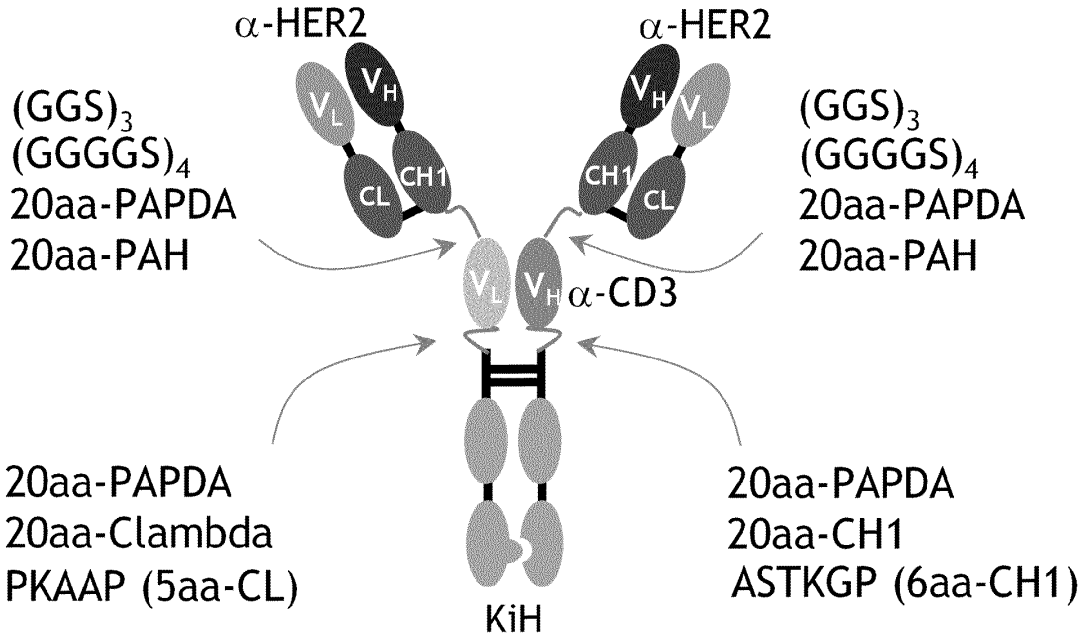

α-HER2
α-HER2
(GGS)3
(GGGGS)4
20aa-PAPDA
20aa-PAH
(GGS)3
(GGGGS)4
20aa-PAPDA
20aa-PAH
VH
VL
CH1
CL
VL
VH
α-CD3
20aa-PAPDA
20aa-Clambda
PKAAP (5aa-CL)
20aa-PAPDA
20aa-CH1
ASTKGP (6aa-CH1)
KiH

Figure 3

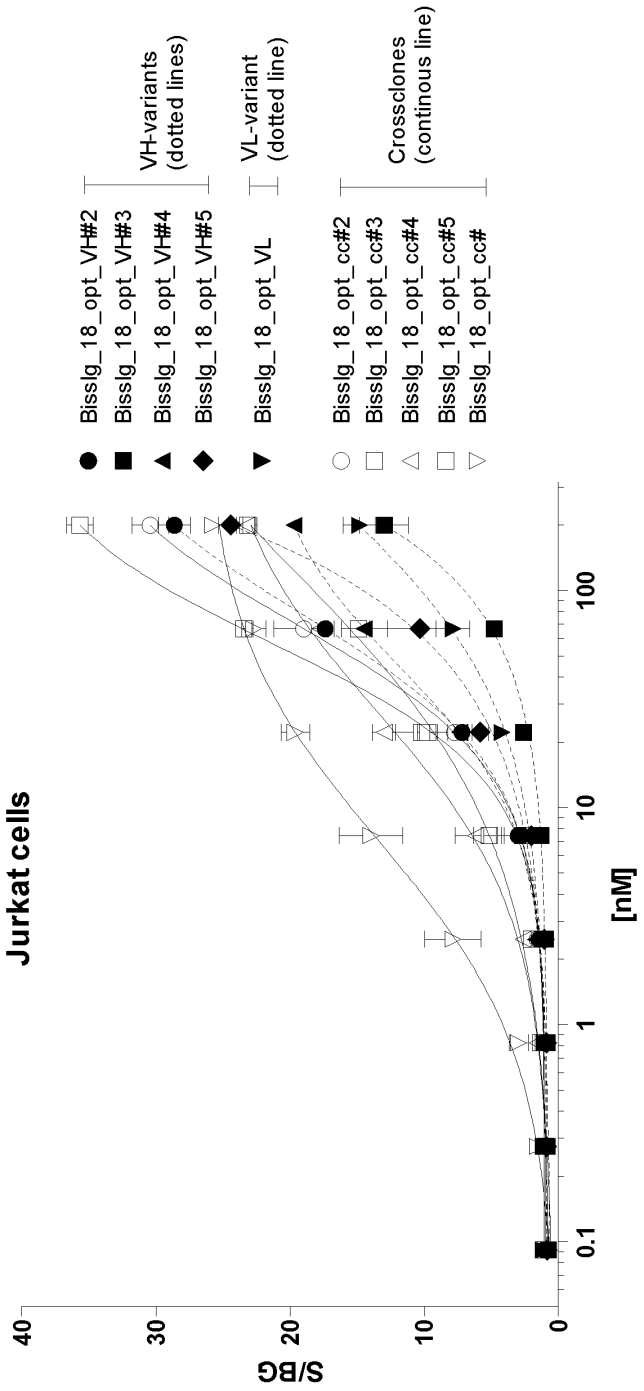
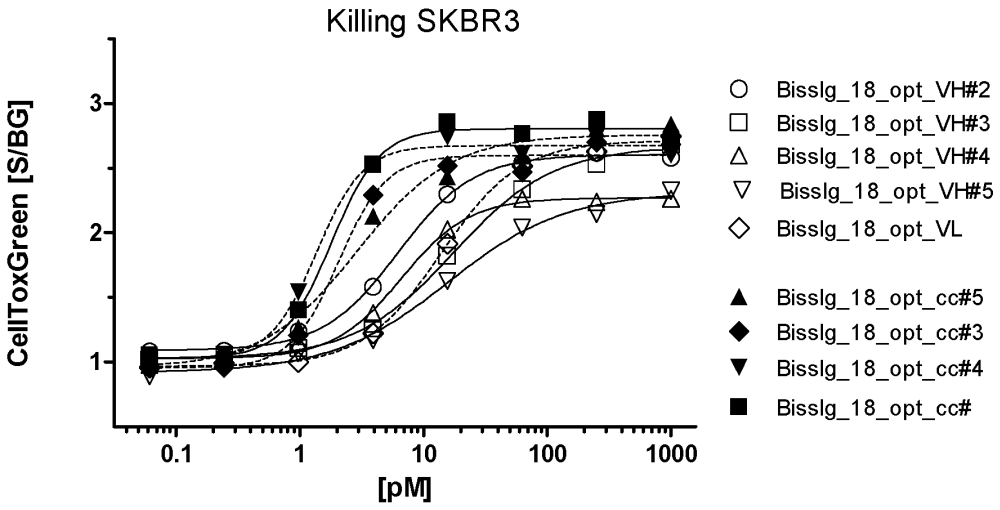

Jurkat cells
S/BG
0
10
20
30
40
0.1
1
10
100
[nM]
VH-variants (dotted lines)
VL-variant (dotted line)
Crossclones (continous line)
Bisslg_18_opt_VH#2
Bisslg_18_opt_VH#3
Bisslg_18_opt_VH#4
Bisslg_18_opt_VH#5
Bisslg_18_opt_VL
Bisslg_18_opt_cc#2
Bisslg_18_opt_cc#3
Bisslg_18_opt_cc#4
Bisslg_18_opt_cc#5
Bisslg_18_opt_cc#

Figure 4

A


Killing SKBR3
CellToxGreen [S/BG]
[pM]
Bisslg_18_opt_VH#2
Bisslg_18_opt_VH#3
Bisslg_18_opt_VH#4
Bisslg_18_opt_VH#5
Bisslg_18_opt_VL
Bisslg_18_opt_cc#5
Bisslg_18_opt_cc#3
Bisslg_18_opt_cc#4
Bisslg_18_opt_cc#

B

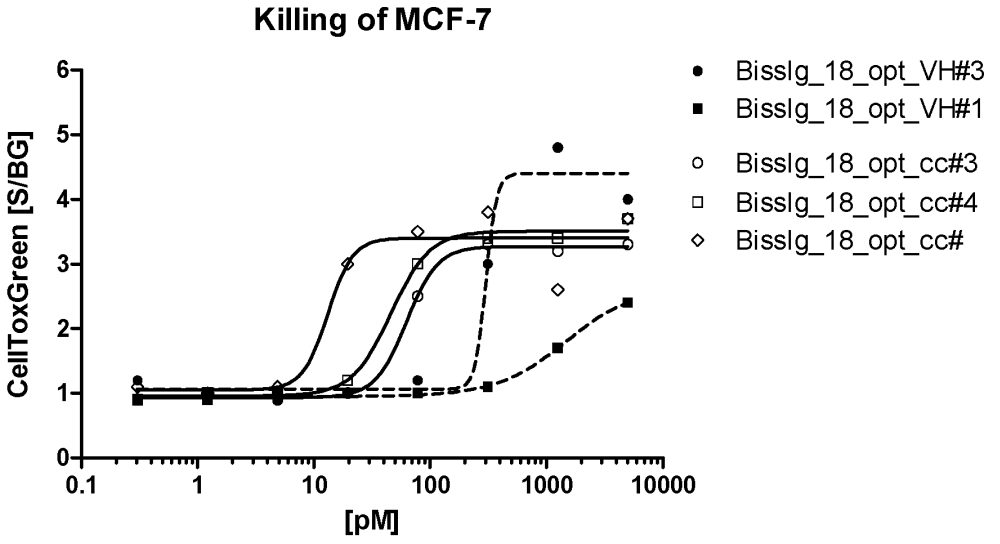

Killing of MCF-7
CellToxGreen [S/BG]
[pM]
Bisslg_18_opt_VH#3
Bisslg_18_opt_VH#1
Bisslg_18_opt_cc#3
Bisslg_18_opt_cc#4
Bisslg_18_opt_cc#

Figure 5

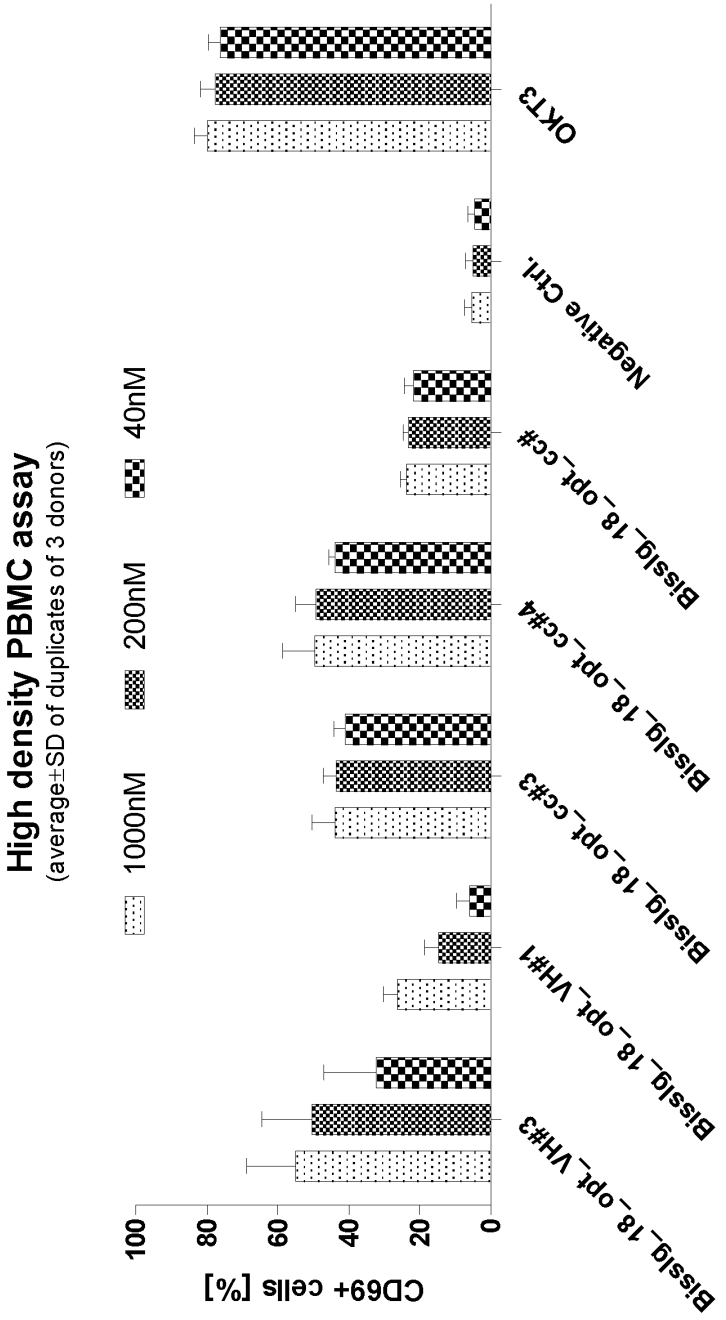

High density PBMC assay
(average±SD of duplicates of 3 donors)
1000nM
200nM
40nM
CD69+ cells [%]
0
20
40
60
80
100
Bissig_18_opt_VH#3
Bissig_18_opt_VH#1
Bissig_18_opt_cc#3
Bissig_18_opt_cc#4
Bissig_18_opt_cc#
Negative Ctrl.
OKT3

Figure 6

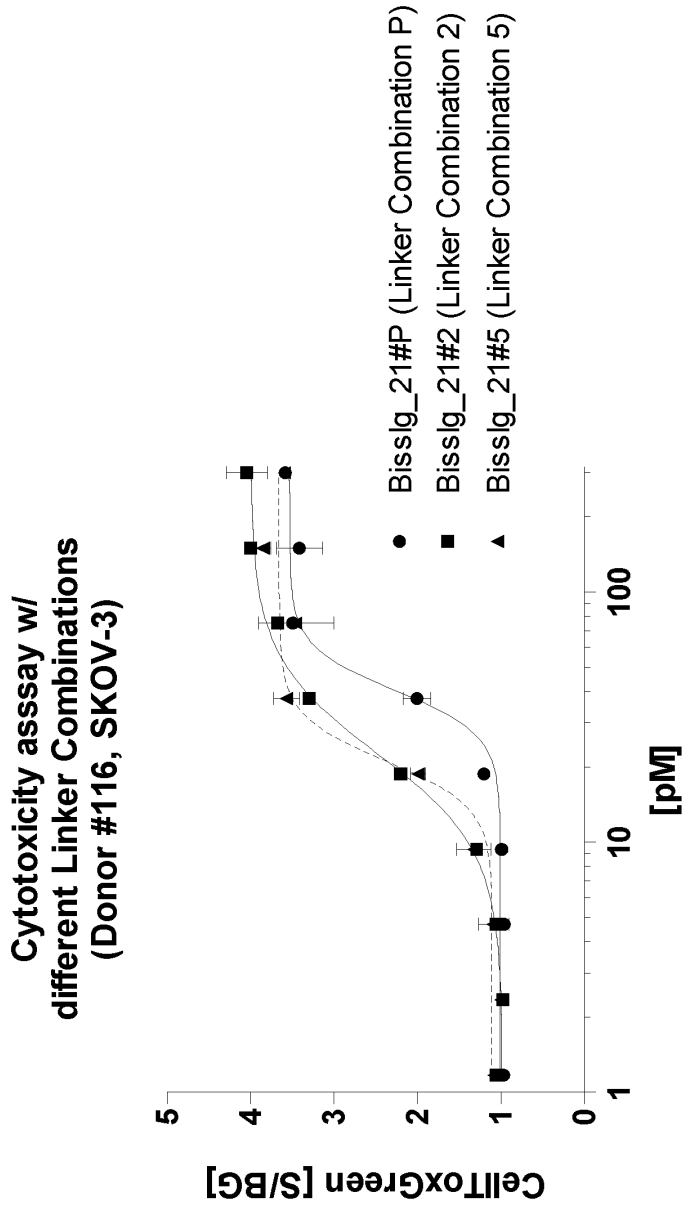
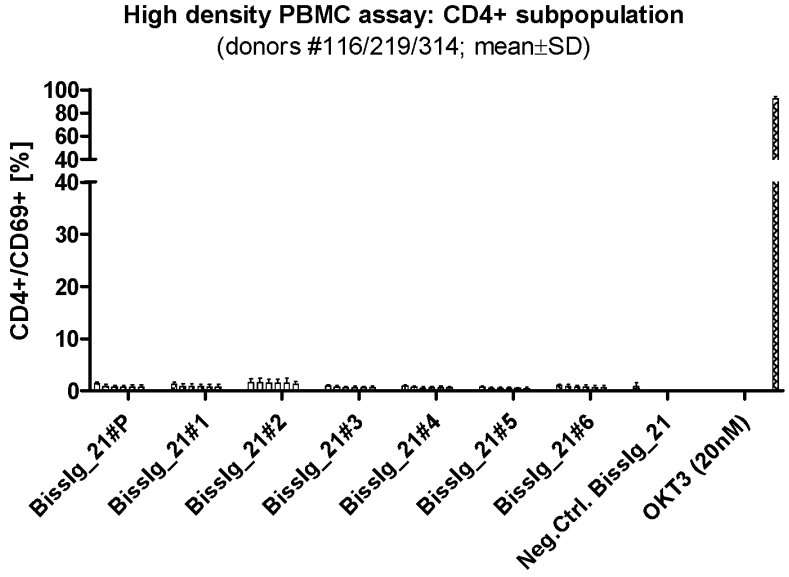

Cytotoxicity assay w/
different Linker Combinations
(Donor #116, SKOV-3)
CellToxGreen [S/BG]
0
1
2
3
4
5
1
10
100
[pM]
BisslgG_21#P (Linker Combination P)
BisslgG_21#2 (Linker Combination 2)
BisslgG_21#5 (Linker Combination 5)

Figure 7

A


High density PBMC assay: CD4+ subpopulation
(donors #116/219/314; mean±SD)
CD4+/CD69+ [%]
100
80
60
40
40
30
20
10
0
BissIg_21#P
BissIg_21#1
BissIg_21#2
BissIg_21#3
BissIg_21#4
BissIg_21#5
BissIg_21#6
Neg.Ctrl. BissIg_21
OKT3 (20nM)

B

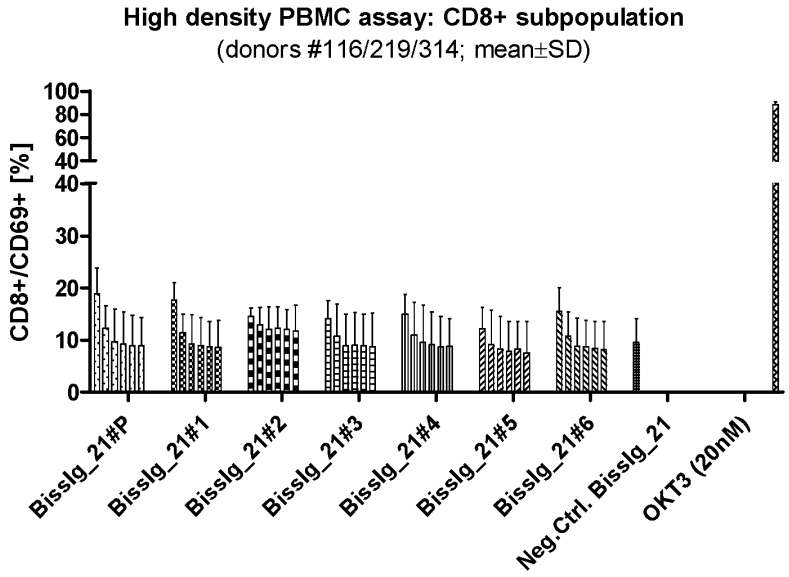

High density PBMC assay: CD8+ subpopulation
(donors #116/219/314; mean±SD)
CD8+/CD69+ [%]
100
80
60
40
40
30
20
10
0
BissIg_21#P
BissIg_21#1
BissIg_21#2
BissIg_21#3
BissIg_21#4
BissIg_21#5
BissIg_21#6
Neg.Ctrl. BissIg_21
OKT3 (20nM)

Figure 8

VH_HCDR3_Parental																	
Pos.	Peptide	Allotypes (Name, %)														Risk Score	H-Line
		DRB1*01:01	DRB1*01:02	DRB1*03:01	DRB1*04:01	DRB1*04:04	DRB1*07:01	DRB1*08:01	DRB1*11:01	DRB1*11:04	DRB1*12:01/12:06/12:10	DRB1*13:01	DRB1*13:02	DRB1*14:01/14:54	DRB1*15:01	DRB1*16:01	
		15	4	24	16	6	23	5	12	6	3	11	8	5	25	5	
90	DTAVYYCARG																
91	TAVYYCARGY																
92	AVYYCARGYS														M		24,5 H
93	VYYCARGYSA			M		M			M	S				S			51,9 H
94	YYCARGYSAE	S	M				M										42,1 H
95	YCARGYSAEF							M									4,9 H
96	CARGYSAEFA																H
97	ARGYSAEFAH														M		24,5 H
98	RGYSAEFAHR																
99	GYSAEFAHRS																
100	YSAEFAHRSG	M															15
101	SAEFAHRSGL																
102	AEFAHRSGLD										M						3,3
103	EFAHRSGLDV																
104	FAHRSGLDVW	M															15
105	AHRSGLDVWG																
106	HRSGLDVWGQ																
107	RSGLDVWGQG																
108	SGLDVWGQGT																
109	GLDVWGQGTL																
110	LDVWGQGTLV										M				M		27,8 H
111	DVWGQGTLVT																H
112	VWGQGTLVTV		M		M	M								M	M	M	60,3 H

Figure 9

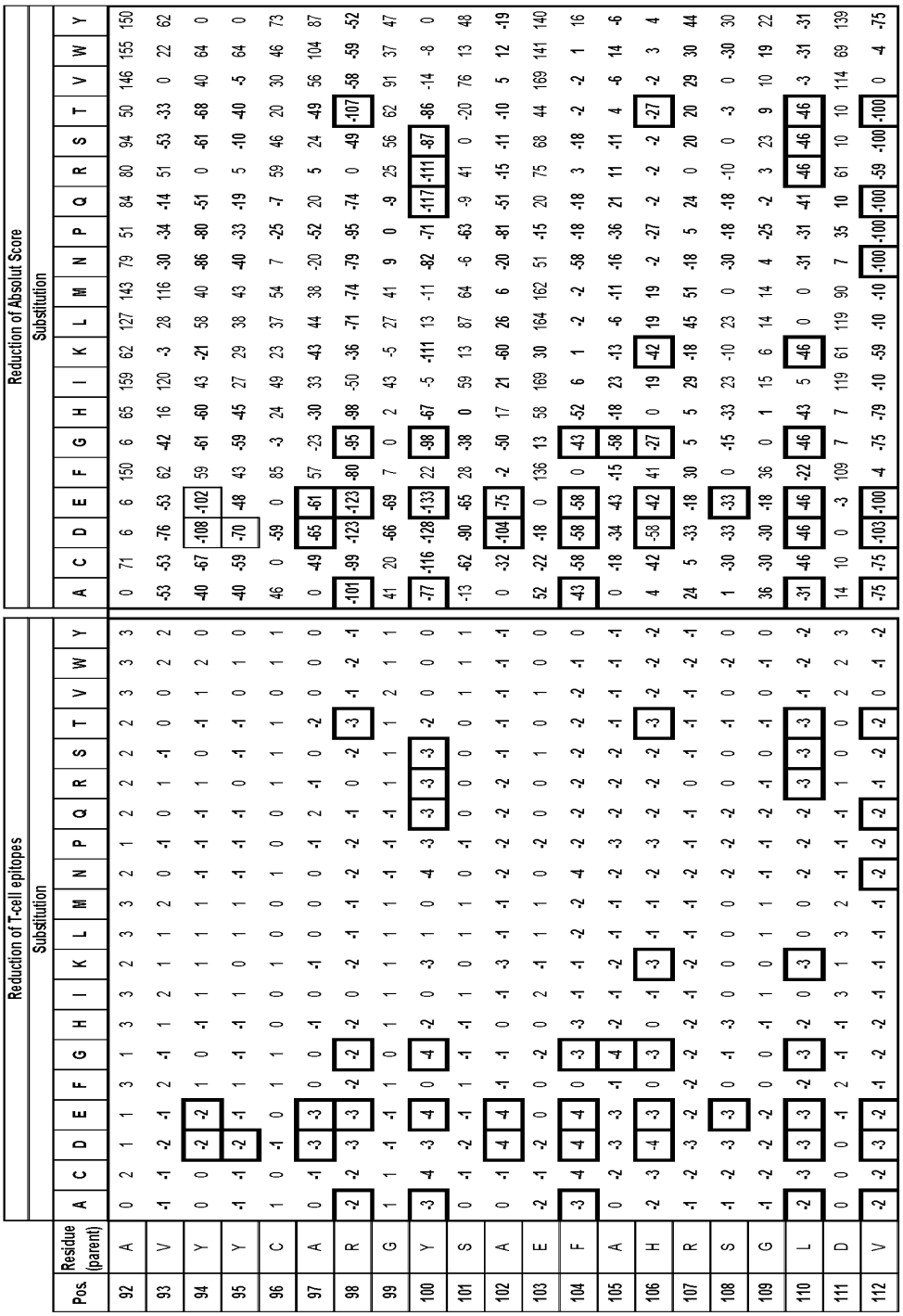

Reduction of T-cell epitopes
Substitution
Reduction of Absolut Score
Substitution
Pos.
Residue (parent)
A C D E F G H I K L M N P Q R S T V W Y

Figure 10

Single point mutant	Mutated Hotspot Region	Reduction H-lines	SEC Monomer Content [%]	Yield per Culture Purified [mg/L]	ELISA on huCD3e EC_{50} est. [nM]	ELISA Sum of S/BG of all tested conc. [S/BG]	Kinetics huCD3e K_D [nM]	Combined variants Epibase analysis
wt (parent.)	wt	n.a.	87.50	44,7	10,9	283	5,4	yes
VL_R94A	LCDR3	-2	87.70	53,7	14,9	197	12	no
VL_R94Q	LCDR3	-3	88.60	41,8	9,4	216	9,5	no
VL_S95D	LCDR3	-4	89.10	47,7	9,6	190	7,8	no
VL_S95E	LCDR3	-4	89.20	44,7	8,1	227	6,4	no
VL_L96Q	LCDR3	-3	86.70	38,8	13,7	144	8	no
VH_Y33W	HCDR1	-1	90,00	47,7	18,7	171	6,6	yes
VH_Y56A	HCDR2_2	-4	90.60	56,7	13,5	277	7	no
VH_Y56E	HCDR2_2	-5	90.80	50,7	9,9	215	9,4	no
VH_Y56S	HCDR2_2	-4	90.70	53,7	6,0	318	5,2	yes
VH_Y56T	HCDR2_2	-4	90.30	53,7	6,0	306	5,3	yes
VH_S57E	HCDR2_2	-2	86.30	23,9	10,0	210	8,8	no
VH_S57T	HCDR2_2	-2	89,00	50,7	5,6	279	5,1	no
VH_S58T	HCDR2_2	-1	88.90	8,9	2,6	329	5,6	no
VH_V61A	HCDR2_2	-3	89.90	50,7	4,5	439	3,3	yes
VH_V61D	HCDR2_2	-6	90.10	38,8	6,4	338	4,4	yes
VH_V61E	HCDR2_2	-6	89.60	44,7	6,7	291	4,4	yes
VH_V61G	HCDR2_2	-5	89.10	47,7	6,6	341	4	yes
VH_A102D	HCDR3_1	-4	88.80	44,7	7,0	285	7,4	yes
VH_A102E	HCDR3_1	-4	87.80	38,8	7,0	310	5,9	yes
VH_F104A	HCDR3_2	-3	88.40	32,8	11,3	219	6,3	yes
VH_A105G	HCDR3_2	-4	89.90	44,7	18,4	109	13	yes
VH_H106G	HCDR3_2	-3	88.80	20,9	13,4	203	6,7	yes
VH_H106K	HCDR3_2	-3	85.90	38,8	7,2	236	5,2	yes
VH_H106T	HCDR3_2	-3	87.40	50,7	6,6	256	5,1	yes

Figure 11

Combined Variant	Mutated Region							EpiBase™ Screen			
	HCDR1	HCDR2		HCDR3a	HCDR3b			Δ Absolut Score	Δ Hot-spots	Δ Absolut H-score	Δ Abosolut H-lines
	33	56	61	102	104	105	106				
wt /(parental)	Y33	Y56	V61	A102	104F	105A	106H	653	6	580	25
var_c198	Y33W	wt	V61D	wt	wt	wt	wt	-200,8	-3	-248,6	-12
var_c199	Y33W	wt	V61D	wt	F104A	wt	wt	-243,6	-3	-273,1	-14
var_c200	Y33W	wt	V61D	wt	wt	A105G	wt	-258,6	-3	-273,1	-14
var_c201	Y33W	wt	V61D	wt	wt	wt	H106G	-227,4	-3	-273,1	-14
var_c202	Y33W	wt	V61D	wt	wt	wt	H106K	-242,4	-3	-273,1	-14
var_c203	Y33W	wt	V61D	wt	wt	wt	H106T	-227,4	-3	-273,1	-14
var_c204	Y33W	wt	V61D	A102D	wt	wt	wt	-305,2	-3	-334,7	-15
var_c205	Y33W	wt	V61D	A102D	F104A	wt	wt	-320,2	-3	-334,7	-15
var_c206	Y33W	wt	V61D	A102D	wt	A105G	wt	-320,2	-3	-334,7	-15
var_c207	Y33W	wt	V61D	A102D	wt	wt	H106G	-320,2	-3	-334,7	-15
var_c208	Y33W	wt	V61D	A102D	wt	wt	H106K	-320,2	-3	-334,7	-15
var_c209	Y33W	wt	V61D	A102D	wt	wt	H106T	-320,2	-3	-334,7	-15
var_c210	Y33W	wt	V61D	A102E	wt	wt	wt	-275,6	-3	-305,1	-15
var_c211	Y33W	wt	V61D	A102E	F104A	wt	wt	-290,6	-3	-305,1	-15
var_c212	Y33W	wt	V61D	A102E	wt	A105G	wt	-290,6	-3	-305,1	-15
var_c213	Y33W	wt	V61D	A102E	wt	wt	H106G	-290,6	-3	-305,1	-15
var_c214	Y33W	wt	V61D	A102E	wt	wt	H106K	-290,6	-3	-305,1	-15
var_c215	Y33W	wt	V61D	A102E	wt	wt	H106T	-290,6	-3	-305,1	-15
var_c216	Y33W	wt	V61E	wt	wt	wt	wt	-200,8	-3	-248,6	-12
var_c217	Y33W	wt	V61E	wt	F104A	wt	wt	-243,6	-3	-273,1	-14
var_c218	Y33W	wt	V61E	wt	wt	A105G	wt	-258,6	-3	-273,1	-14
var_c219	Y33W	wt	V61E	wt	wt	wt	H106G	-227,4	-3	-273,1	-14
var_c220	Y33W	wt	V61E	wt	wt	wt	H106K	-242,4	-3	-273,1	-14
var_c221	Y33W	wt	V61E	wt	wt	wt	H106T	-227,4	-3	-273,1	-14
var_c222	Y33W	wt	V61E	A102D	wt	wt	wt	-305,2	-3	-334,7	-15
var_c223	Y33W	wt	V61E	A102D	F104A	wt	wt	-320,2	-3	-334,7	-15
var_c224	Y33W	wt	V61E	A102D	wt	A105G	wt	-320,2	-3	-334,7	-15
var_c225	Y33W	wt	V61E	A102D	wt	wt	H106G	-320,2	-3	-334,7	-15
var_c226	Y33W	wt	V61E	A102D	wt	wt	H106K	-320,2	-3	-334,7	-15
var_c227	Y33W	wt	V61E	A102D	wt	wt	H106T	-320,2	-3	-334,7	-15
var_c228	Y33W	wt	V61E	A102E	wt	wt	wt	-275,6	-3	-305,1	-15
var_c229	Y33W	wt	V61E	A102E	F104A	wt	wt	-290,6	-3	-305,1	-15
var_c230	Y33W	wt	V61E	A102E	wt	A105G	wt	-290,6	-3	-305,1	-15
var_c231	Y33W	wt	V61E	A102E	wt	wt	H106G	-290,6	-3	-305,1	-15
var_c232	Y33W	wt	V61E	A102E	wt	wt	H106K	-290,6	-3	-305,1	-15
var_c233	Y33W	wt	V61E	A102E	wt	wt	H106T	-290,6	-3	-305,1	-15
var_c234	Y33W	wt	V61G	wt	wt	wt	wt	-185,8	-3	-248,6	-12
var_c235	Y33W	wt	V61G	wt	F104A	wt	wt	-228,6	-3	-273,1	-14
var_c236	Y33W	wt	V61G	wt	wt	A105G	wt	-243,6	-3	-273,1	-14
var_c237	Y33W	wt	V61G	wt	wt	wt	H106G	-212,4	-3	-273,1	-14
var_c238	Y33W	wt	V61G	wt	wt	wt	H106K	-227,4	-3	-273,1	-14
var_c239	Y33W	wt	V61G	wt	wt	wt	H106T	-212,4	-3	-273,1	-14
var_c240	Y33W	wt	V61G	A102D	wt	wt	wt	-290,2	-3	-334,7	-15
var_c241	Y33W	wt	V61G	A102D	F104A	wt	wt	-305,2	-3	-334,7	-15
var_c242	Y33W	wt	V61G	A102D	wt	A105G	wt	-305,2	-3	-334,7	-15
var_c243	Y33W	wt	V61G	A102D	wt	wt	H106G	-305,2	-3	-334,7	-15
var_c244	Y33W	wt	V61G	A102D	wt	wt	H106K	-305,2	-3	-334,7	-15
var_c245	Y33W	wt	V61G	A102D	wt	wt	H106T	-305,2	-3	-334,7	-15
var_c246	Y33W	wt	V61G	A102E	wt	wt	wt	-260,6	-3	-305,1	-15
var_c247	Y33W	wt	V61G	A102E	F104A	wt	wt	-275,6	-3	-305,1	-15
var_c248	Y33W	wt	V61G	A102E	wt	A105G	wt	-275,6	-3	-305,1	-15
var_c249	Y33W	wt	V61G	A102E	wt	wt	H106G	-275,6	-3	-305,1	-15
var_c250	Y33W	wt	V61G	A102E	wt	wt	H106K	-275,6	-3	-305,1	-15
var_c251	Y33W	wt	V61G	A102E	wt	wt	H106T	-275,6	-3	-305,1	-15

Figure 12

	Mutated Hotspot Region				Epibase™ Screen				Produc.	Binding		Functional Activity	
Combined Variant	HCDR1	HCDR2	HCDR3a	HCDR3b	Δ Absolute Score	Δ Hot-spots	Δ Absolute H-score	Δ Absolute H-lines	SEC Monomer Content [%]	ELISA EC50 [nM] hCD3e	Kinetics KD [nM] hCD3e	RGA (SKOV-3) Signal/BG	
												50nM	0.5nM
wt	wt	wt	wt	wt	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	30,1	4,9	45145	10348
var_c114	wt	V61G	A102D	wt	-245	-2	-245	-11	87	10,2	6,0	32409	7993
var_c118	wt	V61G	A102D	H106K	-260	-2	-245	-11	91,8	10,5	6,0	37235	7592
var_c96	wt	V61E	A102D	wt	-260	-2	-245	-11	89,6	10,1	6,8	26417	6536
var_c78	wt	V61D	A102D	wt	-260	-2	-245	-11	87,5	13,4	6,3	26758	6486
var_c119	wt	V61G	A102D	H106T	-260	-2	-245	-11	91,9	10,8	5,0	36813	5680
var_c240	Y33W	V61G	A102D	wt	-290	-3	-335	-15	90,2	15,4	7,8	35160	5028
var_c102	wt	V61E	A102E	wt	-230	-2	-215	-11	91,2	10,8	6,3	35088	5025
var_c89	wt	V61D	A102E	H106T	-245	-2	-215	-11	89,2	16,3	11,0	26196	4815
var_c124	wt	V61G	A102E	H106K	-230	-2	-215	-11	88,4	18,2	8,0	30771	4760
var_c120	wt	V61G	A102E	wt	-215	-2	-215	-11	91,8	8,3	3,9	39388	4750
var_c84	wt	V61D	A102E	wt	-230	-2	-215	-11	89,3	10,6	5,8	30354	4684
var_c125	wt	V61G	A102E	H106T	-230	-2	-215	-11	88	10,8	9,6	30721	4049
var_c117	wt	V61G	A102D	H106G	-260	-2	-245	-11	90,6	17,8	8,1	24615	3329
var_c246	Y33W	V61G	A102E	wt	-261	-3	-305	-15	n.a.	21,5	7,7	31833	3277
var_c107	wt	V61E	A102E	H106T	-245	-2	-215	-11	90,2	22,3	7,3	21083	2878
var_c115	wt	V61G	A102D	F104A	-260	-2	-245	-11	91,3	16,4	7,9	25488	2728
var_c97	wt	V61E	A102D	F104A	-275	-2	-245	-11	90,3	15,0	9,5	17487	2573
var_c106	wt	V61E	A102E	H106K	-245	-2	-215	-11	90,8	18,4	9,0	24108	2433
var_c88	wt	V61D	A102E	H106K	-245	-2	-215	-11	89,6	14,1	7,3	24540	2363
var_c241	Y33W	V61G	A102D	F104A	-305	-3	-335	-15	88,7	15,7	10,0	28739	2307
var_c101	wt	V61E	A102D	H106T	-275	-2	-245	-11	89,9	9,6	8,0	24690	2123
var_c237	Y33W	V61G	wt	H106G	-212	-3	-273	-14	90,9	27,5	7,9	20839	2026
var_c100	wt	V61E	A102D	H106K	-275	-2	-245	-11	90,3	15,6	10,0	20044	1963
var_c210	Y33W	V61D	A102E	wt	-276	-3	-305	-15	91,4	11,5	11,0	23892	1928
var_c190	Y33W	V61A	A102D	H106K	-200	-2	-277	-12	89,9	23,0	8,8	25368	1808
var_c82	wt	V61D	A102D	H106K	-275	-2	-245	-11	89,4	11,4	9,1	21790	1803
var_c205	Y33W	V61D	A102D	F104A	-320	-3	-335	-15	89,6	22,0	11,0	21524	1728
var_c228	Y33W	V61E	A102E	wt	-276	-3	-305	-15	91,7	28,9	10,0	27263	1706
var_c87	wt	V61D	A102E	H106G	-245	-2	-215	-11	89,7	12,9	10,0	20616	1583
var_c121	wt	V61G	A102E	F104A	-230	-2	-215	-11	88,3	11,9	11,0	25699	1528
var_c85	wt	V61D	A102E	F104A	-245	-2	-215	-11	89,4	16,5	11,0	19242	1293
var_c204	Y33W	V61D	A102D	wt	-305	-3	-335	-15	89,9	21,7	8,7	25498	1198
var_c208	Y33W	V61D	A102D	H106K	-320	-3	-335	-15	90,9	21,9	10,0	16920	448

Figure 13

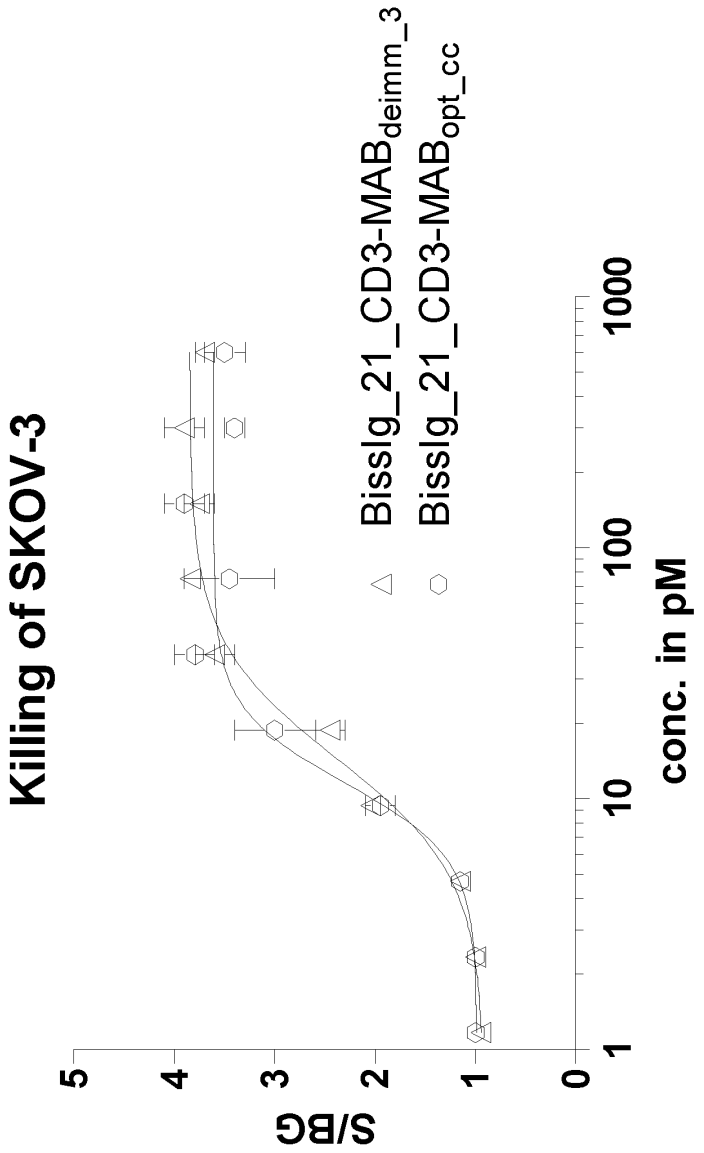
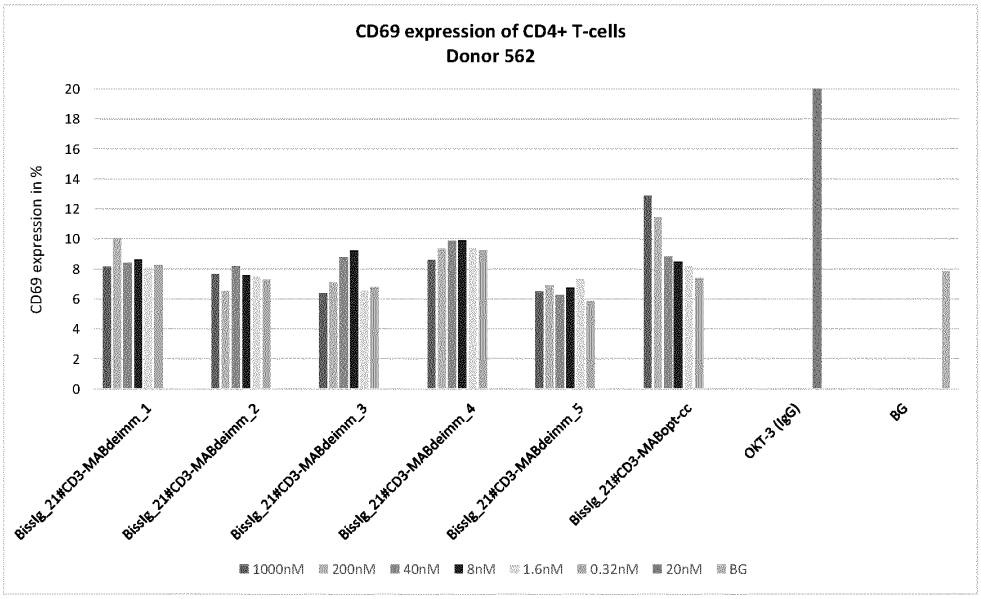
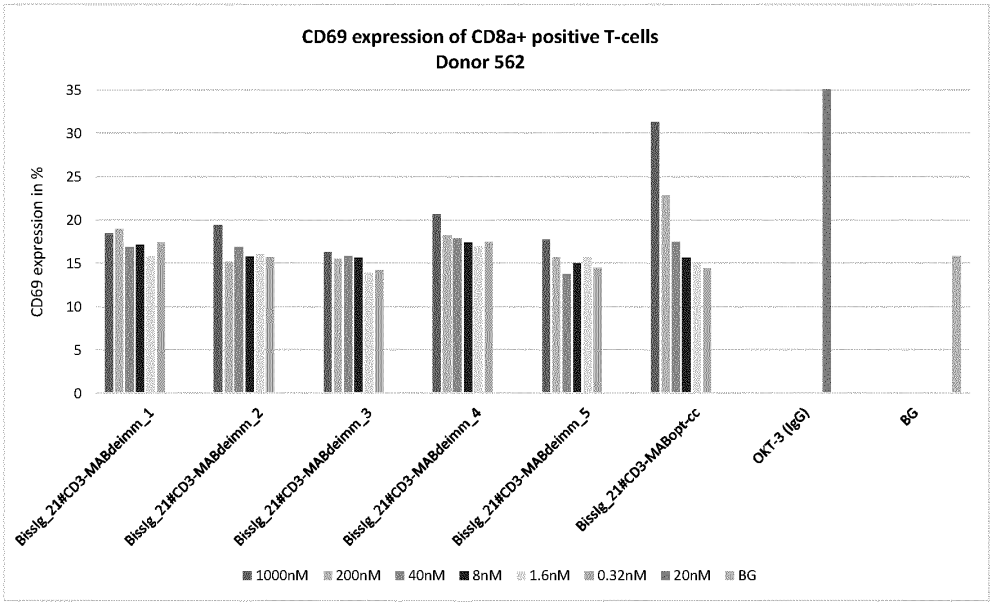

Killing of SKOV-3
S/BG
0
1
2
3
4
5
1
10
100
1000
conc. in pM
Bisslg_21_CD3-MAB$_{deimm_3}$
Bisslg_21_CD3-MAB$_{opt_cc}$

Figure 14

A


CD69 expression of CD4+ T-cells
Donor 562
CD69 expression in %
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Bisslg_21#CD3-MABdeimm_1
Bisslg_21#CD3-MABdeimm_2
Bisslg_21#CD3-MABdeimm_3
Bisslg_21#CD3-MABdeimm_4
Bisslg_21#CD3-MABdeimm_5
Bisslg_21#CD3-MABopt-cc
OKT-3 (IgG)
BG
1000nM
200nM
40nM
8nM
1.6nM
0.32nM
20nM
BG

B


CD69 expression of CD8a+ positive T-cells
Donor 562
CD69 expression in %
0
5
10
15
20
25
30
35
Bisslg_21#CD3-MABdeimm_1
Bisslg_21#CD3-MABdeimm_2
Bisslg_21#CD3-MABdeimm_3
Bisslg_21#CD3-MABdeimm_4
Bisslg_21#CD3-MABdeimm_5
Bisslg_21#CD3-MABopt-cc
OKT-3 (IgG)
BG
1000nM
200nM
40nM
8nM
1.6nM
0.32nM
20nM
BG