



등록특허 10-2743539



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년12월16일

(11) 등록번호 10-2743539

(24) 등록일자 2024년12월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) G01N 33/533 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/2809 (2013.01)
A61K 47/6849 (2017.08)

(21) 출원번호 10-2020-7000285

(22) 출원일자(국제) 2018년06월08일

심사청구일자 2021년04월19일

(85) 번역문제출일자 2020년01월06일

(65) 공개번호 10-2020-0015713

(43) 공개일자 2020년02월12일

(86) 국제출원번호 PCT/GB2018/051570

(87) 국제공개번호 WO 2018/224844

국제공개일자 2018년12월13일

(30) 우선권주장

1709203.2 2017년06월09일 영국(GB)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020160127130 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

오토러스 리미티드

영국 런던 191 우드 레인 더 미디어웍스 (우편번호: 더블유12 7에프피)

(72) 발명자

코도바 손

영국 더블유12 7알제트 런던 우드 레인 58 포레스트 하우스 오토러스 리미티드 내

토마스 시몬

영국 더블유12 7알제트 런던 우드 레인 58 포레스트 하우스 오토러스 리미티드 내

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 11 항

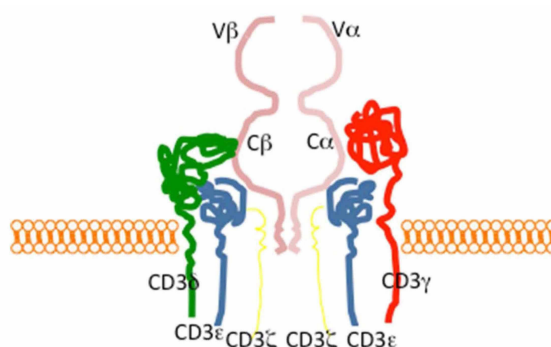
심사관 : 김윤선

(54) 발명의 명칭 항-TRBC1 항원 결합 도메인

(57) 요약

본 발명은 가변 사슬의 서열을 특징으로 하는 항-TRBC1 항원 결합 도메인에 관한 것이다. 가변 사슬의 CDR 서열은 (VH CDR1) GYTFT, (VH CDR2) NPYNDIQS, (VH CDR3) GAGYNFDGAYRFFDF; 및 (VL CDR1) RSSQLVHSNGNTYL, (VL CDR2) RVSNRFP, (VL CDR3) SQSTHVPYT이다. 청구된 인간화된 항체는 무린 JOVI 항체로부터 유래된다. 암 치료에 사용된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
G01N 33/533 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/21 (2013.01)
C07K 2317/34 (2013.01)
C07K 2317/56 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
G01N 2800/7028 (2013.01)

(72) 발명자

오누오하 시모비

영국 더블유12 7알제트 런던 우드 레인 58 포레스
트 하우스 오토러스 리미티드 내

자 람

영국 더블유12 7알제트 런던 우드 레인 58 포레스
트 하우스 오토러스 리미티드 내

립 원 친

영국 더블유12 7알제트 런던 우드 레인 58 포레스
트 하우스 오토러스 리미티드 내

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인;
또는
- b) 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인;
을 포함하는 항-TRBC1 항원 결합 도메인.

청구항 2

제1항에 따른 항-TRBC1 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR).

청구항 3

제1항에 따른 항-TRBC1 항원 결합 도메인을 포함하는 항체.

청구항 4

제1항에 따른 항-TRBC1 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 T 세포 인계이저(BiTE).

청구항 5

제1항에 따른 항-TRBC1 항원 결합 도메인을 포함하는 항체-약물 접합체.

청구항 6

제2항에 따른 CAR을 코딩하는 핵산.

청구항 7

제6항에 따른 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 8

제2항에 따른 CAR을 포함하는 단리된 세포.

청구항 9

제6항에 따른 핵산 또는 제7항에 따른 벡터를 단리된 세포 내로 도입하는 단계를 포함하는 제8항에 따른 단리된 세포의 제조 방법.

청구항 10

제8항에 따른 복수의 단리된 세포, 제3항에 따른 항체, 제4항에 따른 BiTE 또는 제5항에 따른 항체-약물 접합체를 포함하는, 피험자에서 TRBC1 발현 T 세포 림프종 또는 백혈병을 치료하는 데 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, TRBC1 발현 T 세포 림프종 또는 백혈병은 분류불가 말초 T 세포 림프종(PTCL-NOS); 혈관 면역모구 T 세포 림프종(AITL), 역형성 대세포 림프종(ALCL), 장병증 관련 T 세포 림프종(EATL), 간비장 T 세포 림프종(HSTL), 비형 림프절외 NK/T 세포 림프종, 피부 T 세포 림프종, 원발성 피부 ALCL, T 세포 전림프구성 백혈병 및 T 세포 급성 림프모구 백혈병으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 T 세포 림프종 또는 백혈병의 치료에 유용한 작용제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 림프성 악성 종양은 크게 T 세포 또는 B 세포로부터 유래된 것으로 나눌 수 있다. T 세포 악성 종양은 비호지킨 림프종 중 10-20% 및 급성 백혈병 중 20%를 포함하는 임상적 및 생물학적으로 이질적인 장애 그룹이다. 가장 일반적으로 확인된 조직학적 서브타입으로는 분류불가 말초 T 세포 림프종(PTCL-NOS); 혈관 면역모구 T 세포 림프종(AITL) 및 역형성 대세포 림프종(ALCL)이 있다. 모든 급성 림프모구 백혈병(ALL) 중 약 20%는 T 세포 표현형의 것이다.

[0003] 이러한 병태는 전형적으로 B 세포 악성 종양인 경우와 비교하여 5년 생존율이 단지 30%에 불과한 공격적인 양상을 갖는다. T 세포 림프종의 경우, 파종성 질환, 바람직하지 않은 국제 예후 지표(IPI) 점수 및 림프절외 질환의 유병률을 나타내는 높은 환자 비율과 관련이 있다. 화학요법만으로는 통상 효과적이지 않으며 환자의 30% 미만이 현재 치료로 치료되고 있다.

[0004] 또한, 항-CD20 단일클론 항체 리툭시맵과 같은 면역요법이 결과를 극적으로 개선한 B 세포 악성 종양과는 달리, T 세포 악성 종양의 치료에 이용가능한 동등하고 효과적이고 최소 독성인 면역치료제는 현재 존재하지 않는다. T 세포 장애에 대한 면역요법의 개발에서 중요한 어려움은 단일 항원이 클론 (악성) 세포를 명확하게 식별할 수 없기 때문에, 클론 및 정상 T 세포의 마커 발현에서 상당한 중첩이 있다는 것이다.

[0005] B 세포 악성 종양을 치료하기 위해 pan-B 세포 항원을 표적화할 때 동일한 문제가 존재한다. 그러나, 이 경우에는, B 세포 구획의 수반되는 고갈(depletion)은 대부분의 환자가 쉽게 견딜 수 있는 비교적 작은 면역억제를 초래한다. 또한, 정상 B 구획을 특히 장기간 고갈시키는 요법에서, 풀링된 면역글로불린의 투여에 의해 그 손실이 크게 제거될 수 있다. T 세포 악성 종양을 표적으로 할 때 상황은 완전히 다르다. 여기서, T 세포 구획의 수반되는 고갈은 심각한 면역억제 및 심각한 독성을 초래한다. 또한, T 세포 구획의 손실을 완화시키는 만족스러운 방법이 없다.

[0006] 독성은 치료용 단일클론 항체 알렘투주맵의 임상 효과에 의해 부분적으로 설명된다. 이 작용제는 CD52를 발현하는 세포를 용해시키고 T 세포 악성 종양에서 약간의 효능을 갖는다. 이 작용제의 유용성은 주로 T 세포 고갈로 인한 심각한 세포 면역 결핍에 의해 크게 제한되어 감염 위험이 현저히 높아진다.

[0007] 따라서, 상기 단점과 관련이 없는 T 세포 악성 종양의 표적화된 치료를 위한 새로운 방법이 필요하다.

발명의 내용

[0008] 본 발명자들은 인간 TRBC1에 결합하는 일련의 인간화된 항원 결합 도메인을 개발하였다. 항원 결합 도메인은, 피험자의 건강한 TRBC2 발현 T 세포에 영향을 미치지 않으면서 악성 TRBC1 발현 T 세포를 고갈시키기 위해, 키메라 항원 수용체(CAR), 치료 항체, 항체-약물 접합체(ADC) 및 이중특이적 T 세포 인게이지어(BiTE: bi-specific T cell engager)를 포함한 다양한 치료 포맷으로 사용될 수 있다.

[0009] 따라서, 제1 측면에서, 본 발명은

[0010] a) 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17 및 서열번호 18로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH 도메인; 및

[0011] b) 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33 및 서열번호

호 34로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL 도메인

- [0012] 을 포함하는 항-TRBC1 항원 결합 도메인을 제공한다.
- [0013] 제2 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제1 측면에 따른 항-TRBC1 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 제공한다.
- [0014] 제3 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제1 측면에 따른 항-TRBC1 항원 결합 도메인을 포함하는 항체를 제공한다.
- [0015] 제4 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제1 측면에 따른 항-TRBC1 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 T 세포 인게이지(BiTE)를 제공한다.
- [0016] 제5 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제1 측면에 따른 항-TRBC1 항원 결합 도메인을 포함하는 항체-약물 접합체를 제공한다.
- [0017] 제6 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제2 측면에 따른 CAR을 코딩하는 핵산 서열을 제공한다.
- [0018] 제7 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제6 측면에 따른 핵산 서열을 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0019] 제8 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제2 측면에 따른 CAR을 포함하는 세포를 제공한다.
- [0020] 제9 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제6 측면에 따른 핵산 또는 본 발명의 제7 측면에 따른 벡터를 세포 내로 도입하는 단계를 포함하는 본 발명의 제8 측면에 따른 세포의 제조 방법을 제공한다.
- [0021] 제10 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제8 측면에 따른 복수의 세포, 본 발명의 제3 측면에 따른 항체, 본 발명의 제4 측면에 따른 BiTE, 또는 본 발명의 제5 측면에 따른 항체-약물 접합체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0022] 제11 측면에서, 본 발명은 피험자에서 TRBC1 발현 T 세포 림프종 또는 백혈병을 치료하는 데 사용하기 위한 본 발명의 제10 측면에 따른 약학 조성물을 제공한다.
- [0023] 제12 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제10 측면에 따른 약학 조성물을 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는, 피험자에서 TRBC1 발현 T 세포 림프종 또는 백혈병을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0024] 제13 측면에서, 본 발명은 피험자에서 TRBC1 발현 T 세포 림프종 또는 백혈병을 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서 본 발명의 제10 측면에 따른 약학 조성물의 용도를 제공한다.
- [0025] TRBC1 발현 T 세포 림프종 또는 백혈병은 분류불가 말초 T 세포 림프종(PTCL-NOS); 혈관 면역모구 T 세포 림프종(AITL), 역형성 대세포 림프종(ALCL), 장병증 관련 T 세포 림프종(EATL), 간비장 T 세포 림프종(HSTL), 비형 림프절의 NK/T 세포 림프종, 피부 T 세포 림프종, 원발성 피부 ALCL, T 세포 전림프구성 백혈병 및 T 세포 급성 림프모구 백혈병으로부터 선택될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0026] **도 1 : $\alpha\beta$ T 세포 수용체/CD3 복합체의 다이어그램.** T 세포 수용체는 세포 표면에서 발현되도록 소포체에 조립되어야 하는 6개의 상이한 단백질 사슬로부터 형성된다. CD3 복합체의 4개의 단백질(CD3 ζ , CD3 γ , CD3 ϵ 및 CD3 δ)은 T 세포 수용체(TCR)를 둘러싼다. 이 TCR은 복합체에 특정 항원의 특이성을 부여하며 TCR α 와 TCR β 의 두 사슬로 구성된다. 각각의 TCR 사슬은 막의 원위에 가변 성분 및 막의 근위에 불변 성분을 갖는다. 거의 모든 T 세포 림프종 및 많은 T 세포 백혈병은 TCR/CD3 복합체를 발현한다.

도 2 : T 세포 수용체 재배열 동안 T 세포 수용체 β -불변 영역(TRBC)-1 및 TRBC2의 분리. 각각의 TCR 베타 사슬은 특정 베타 가변(V), 다양성(D), 결합(J) 및 불변(TRBC) 영역의 게놈 재조합으로 형성된다. 인간 게놈은 TRBC1 및 TRBC2로 알려진 2개의 매우 유사하고 기능적으로 동등한 TRBC 유전자좌를 함유한다. TCR 유전자 재배열 동안, J 영역은 TRBC1 또는 TRBC2와 재조합된다. 이 재배열은 영구적이다. T 세포는 표면에 단일 TCR의 많은 카피를 발현하므로, 각각의 T 세포는 β 사슬 불변 영역이 TRBC1 또는 TRBC2에 의해 코딩된 TCR을 발현할 것이다.

도 3 : 아미노산 수준에서 인간 TRBC1 및 TRBC2의 정렬. TRBC1 및 TRBC2에 의해 코딩된 TCR β 불변 사슬은 단지 4개의 아미노산 차이에 의해 상이하다: TRBC의 위치 3에서의 K/N; TRBC의 위치 4에서의 N/K; TRBC의 위치 36에서의 F/Y; TRBC의 위치 135에서의 V/E.

도 4 : 인간화된 항-TRBC1 결합체의 생성에서 언급된 상이한 항체 유형을 예시하는 개략도.

도 5 : 중쇄 및 경쇄 그래프트 선택. 다양한 인간 골격 영역과 함께 JOVI-1의 CDR을 포함하는 인간화된 VH 및 VL 도메인이 생성되었다. 무린 VL 도메인을 갖는 인간화된 VH 또는 무린 VH 도메인을 갖는 인간화된 VL을 포함하는 키메라 항체를 생성하고 이를 무린 VH 및 VL을 갖는 대조군 키메라 항체와 비교하였다(Jovi-1 키메라 HC/Jovi-1 키메라 LC). 인간화된 항체는 또한 인간화된 VH 및 VL 조합으로 생성되었다. ELISA에 의해 TRBC1에 결합한 모든 항체를 테스트하였다.

도 6 : 복귀 돌연변이 구성체의 TRBC1/TRBC2 결합. 일련의 복귀 돌연변이된 VH 구성체는 표 1에 나타난 바와 같이 H-AF062256 골격에 기초하여 생성되었다. 이들 VH 도메인은 3aaz 인간 골격을 갖는 VL 도메인과 조합하여 인간화된 항체를 생성하는 데 사용되었다. ELISA에 의해 TRBC1 및 TRBC2에 결합한 항체를 테스트하였다.

도 7 : 항-TRBC1 항체 구성체의 안정성(Tm°C). 3aaz 인간화된 경쇄를 갖는 표 1에 나타난 복귀 돌연변이 구성체를 포함하는 항체의 안정성을 무린 JOVI-1 항체와 비교하였다.

도 8 : 항-TRBC1 항체 구성체의 안정성(Tm°C).

도 9 : 인간화된 항-TRBC1 키메라 항원 수용체(CAR)를 나타내는 개략도

도 10 : TRBC1+ 표적의 CAR 매개 특이적 사멸. 형질감염되지 않은 T 세포, 또는 무린 항-TRBC1 CAR을 발현하는 T 세포(양성 대조군); 인간화된 항-TRBC1 CAR; 또는 항-EGFRvIII CAR(음성 대조군)을 TRBC1 발현 또는 TRBC2 발현 Raji 표적 세포와 공동 배양하고 유세포 분석법을 사용하여 사멸을 분석하였다.

도 11 : 표적 세포와의 공동 배양 후 CAR 발현 T 세포의 증식. 형질감염되지 않은 T 세포, 무린 항-TRBC1 CAR을 발현하는 T 세포; 또는 인간화된 항-TRBC1 CAR을 발현하는 T 세포를 TRBC1 발현 또는 TRBC2 발현 Raji 표적 세포와 72시간 동안 공동 배양하고 T 세포 증식을 측정하였다.

도 12 : CAR 발현 T 세포 및 표적 세포의 공동 배양 후 사이토카인 방출. 형질감염되지 않은 T 세포, 또는 무린 항-TRBC1 CAR을 발현하는 T 세포(양성 대조군); 인간화된 항-TRBC1 CAR; 또는 항-EGFRvIII CAR(음성 대조군)을 TRBC1 발현 또는 TRBC2 발현 Raji 표적 세포와 공동 배양하였다. IFN γ 및 IL-2의 방출은 24시간 후에 측정되었다.

도 13 : NSG 마우스 모델에서 종양 성장에 대한 인간화된 항-TRBC1 CAR의 효과

도 14 : 표적 세포와의 공동 배양 후 탈진(exhaustion) 마커의 발현. 활성화된 PBMC를 무린 JOVI1 CAR(mJOVI) 또는 인간화된 Jovi-1 CAR(H1L 힌지)로 형질도입하고, CD56 발현 세포를 고갈시키고 TRBC1-TCR 발현 Raji 표적 세포와 공동 배양하였다. 96시간 후, 세포를 항-PD1, 항-LAG3 및 항-Tim3 항체로 염색한 후 유세포 분석법으로 분석하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 본 발명은 TRBC1에 선택적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)와 같은 작용제를 제공한다. 이러한 작용제는 피험자에서 T 세포 림프종 또는 백혈병을 치료하는 방법에 유용하다. T 세포 악성 종양은 클론이므로 TRBC1 또는 TRBC2를 발현한다. TCRB1 선택적 작용제를 피험자에게 투여함으로써, 상기 작용제는 TRBC1 발현 정상 T 세포와 함께 TRBC1 발현 악성 T 세포의 선택적 고갈을 유발하지만, TRBC2 발현 정상 T 세포의 고갈을 유발하지는 않는다.
- [0028] TCR β 불변 영역(TRBC)
- [0029] T 세포 수용체(TCR)는 T 림프구의 표면에서 발현되며 주요 조직적합성 복합체(MHC) 분자에 결합된 항원을 인식하는 역할을 한다. TCR이 항원성 펩티드 및 MHC(펩티드/MHC)와 인게이지될 때, T 림프구는 관련된 효소, 공-수용체, 특수화된 어댑터 분자, 및 활성화 또는 방출된 전사 인자에 의해 매개되는 일련의 생화학적 이벤트를 통해 활성화된다.
- [0030] TCR은 불변 CD3 사슬 분자와의 복합체의 일부로서 발현되는 고도 가변 알파(α) 및 베타(β) 사슬로 통상 이루어진 디설피드 연결 막 고정 헤테로이량체이다. 이 수용체를 발현하는 T 세포는 $\alpha:\beta$ (또는 $\alpha\beta$) T 세포(총 T 세포의 약 95%)로 지칭된다. 소수의 T 세포는 가변 감마(γ) 및 델타(δ) 사슬에 의해 형성된 대체 수용체를 발현하고, $\gamma\delta$ T 세포(총 T 세포의 약 5%)로 지칭된다.
- [0031] 각각의 α 및 β 사슬은 2개의 세포외 도메인으로 구성된다: 가변(V) 영역 및 불변(C) 영역, 면역글로불린 슈퍼

패밀리(IgSF) 도메인 둘 다 역평행 β -시트를 형성. 불변 영역은 세포막에 근위이고, 막관통 영역과 짧은 세포 질 꼬리가 뒤 따르는 반면, 가변 영역은 펩티드/MHC 복합체에 결합한다(도 1 참조). TCR의 불변 영역은 시스템 인 잔기가 디설피드 결합을 형성하는 짧은 연결 서열로 이루어지며, 이는 두 사슬 사이의 연결을 형성한다.

[0032] TCR α 사슬 및 β 사슬 둘 다의 가변 도메인은 3개의 추가변 또는 상보성 결정 영역(CDR)을 갖는다. β 사슬의 가변 영역은 또한 추가의 추가변 영역(HV4)을 갖지만, 이는 일반적으로 항원과 접촉하지 않으므로 CDR로 간주되지 않는다.

[0033] TCR은 또한 최대 5개의 불변 사슬 γ , δ , ϵ (통칭하여 CD3으로 지칭됨) 및 ζ 를 포함한다. CD3 및 ζ 서브유닛은 $\alpha\beta$ 또는 $\gamma\delta$ 에 의한 항원 인식 후 제2 메신저 및 어댑터 분자와 상호 작용하는 특정 세포질 도메인을 통한 TCR 신호 전달을 매개한다. TCR 복합체의 세포 표면 발현은 TCR α 및 β 및 CD3 γ 및 δ 의 막관통 및 세포 외 도메인 둘 모두가 역할을 하는 서브유닛의 쌍 단위 조립에 의해 선행된다.

[0034] 따라서 TCR은 일반적으로 CD3 복합체와 TCR α 및 β 사슬로 구성되며, 가변 및 불변 영역으로 구성된다(도 1).

[0035] TCR β 불변 영역(TRBC)을 공급하는 유전자좌(Chr7 : q34)는 진화 역사에서 복제되어 거의 동일하고 기능적으로 동등한 두 유전자, 즉 TRBC1과 TRBC2(도 2)를 생성하며, 이는 각각에 의해 생성된 성숙한 단백질에서 4개의 아미노산만이 다르다(도 3). 각각의 TCR은 상호 배타적인 방식으로 TRBC1 또는 TRBC2를 포함하며, 따라서 각각의 $\alpha\beta$ T 세포는 상호 배타적인 방식으로 TRBC1 또는 TRBC2를 발현한다.

[0036] TRBC1과 TRBC2의 서열 사이의 유사성에도 불구하고, 이들을 구별하는 것이 가능하다. TRBC1 및 TRBC2의 아미노산 서열은 세포, 예를 들어 T 세포의 표면에서 동일계 내에서 구별될 수 있다.

[0037] 항원 결합 도메인

[0038] 본 발명은 하기 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL)를 갖는 인간화된 항-TRBC1 항원 결합 도메인을 제공한다:

VH CDR1: GYTFTGY (서열번호 1);

VH CDR2: NPYNDD (서열번호 2);

VH CDR3: GAGYNFDGAYRFFDF (서열번호 3);

VL CDR1: RSSQRLVHNSNGNTYLH (서열번호 4);

VL CDR2: RVSNRFP (서열번호 5); 및

VL CDR3: SQSTHVPYT (서열번호 6).

[0039]

[0040] 항원 결합 도메인은 인간 골격 영역, 또는 하나 이상의 돌연변이를 갖는 인간 골격 영역을 포함한다. 예를 들어, 골격 영역(들)은 인간 골격 영역 서열과 비교하여 하나 이상의 치환을 포함할 수 있다. 치환은 하나 이상의 아미노산이 무린 항체 서열로부터의 동등한 잔기로 치환된 "복귀 돌연변이"일 수 있다. 무린 항체 가변 중쇄(VH) 서열은 하기에 서열번호 7로 나타내고 가변 경쇄(VL) 서열은 서열번호 8로 나타내었다. 두 서열에서, CDR 서열은 굵게 표시되고 밑줄로 표시된다.

서열번호 7 - 무린 Jovi-1 VH

EVRLQQSGPDLIKPGASVKMSCKASGYTFTGYVMHWWKQRPQGGLGWGFINPYN
DDIQSNFRFRGKATLTSDKSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGAGYNFDGAYRFF
DFWGGQTTLTVSS

서열번호 8 - 무린 Jovi-1 VL

DVVMTQSPLSLPVSLGDQASISCRSSQRLVHNSNGNTYLHWWYLQKPGQSPKLLIYRV
SNRFPGPVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYFCSQSTHVPYTFGGGTKLEIKR

[0041]

[0042] 서열번호 1, 2 및 3으로 나타낸 무린 JOVI-1 CDR을 포함하는 인간화된 VH 서열은 야생형 인간 골격 영역 서열과 비교하여 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 2개 또는 1개의 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0043] 서열번호 4, 5 및 6으로 나타낸 무린 JOVI-1 CDR을 포함하는 인간화된 VL 서열은 야생형 인간 골격 영역 서열과 비교하여 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 2개 또는 1개의 돌연변이를 포함할 수 있다.

- [0044] VH 서열은 인간 골격 H-AF062256과 함께 JOVI-1 VH CDR을 포함할 수 있다. 이 서열은 서열번호 9로 나타낸다. CDR 서열은 밑줄로 표시된다.
- 서열번호 9 - 인간화된 Jovi-1 H-AF062256 골격
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYVMHWVRQAPGQGLEWMGFINPY
NDDIQSNERFRGRVTMTRDTSISTAYMELSLRSDDTAVYYCARGAGYNFDGAYRF
FDFWGQGTMVTVSS
- [0045]
- [0046] VH 서열은 인간 골격 H-EF177999를 갖는 JOVI-1 VH CDR을 포함할 수 있다. 이 서열은 서열번호 10으로 나타낸다. CDR 서열은 밑줄로 표시된다.
- 서열번호 10 - 인간화된 Jovi-1 H-EF177999 골격
EVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYVMHWVRQAPGQGLEWMGFINPY
NDDIQSNERFRGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARGAGYNFDGAYR
FFDFWGQGTTLTVSS
- [0047]
- [0048] VH 서열은 인간 골격 H-KF688165를 갖는 JOVI-1 VH CDR을 포함할 수 있다. 이 서열은 서열번호 11로 나타낸다. CDR 서열은 밑줄로 표시된다.
- 서열번호 11 - 인간화된 Jovi-1 H- H-KF688165 골격
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASEYSFTGYVMHWVRQAPGQGLEWMGFINPY
NDDIQSNERFRGRVTMTRDTSISTAYMEVSSLTSDDAIYYCARGAGYNFDGAYRF
FDFWGQGTLTVSS
- [0049]
- [0050] VH 서열은 복귀 돌연변이와 같은 하나 이상의 돌연변이를 갖는 서열번호 9, 10 또는 11로 나타낸 서열을 포함할 수 있다. VH 서열은 야생형 인간 골격 영역 서열과 비교하여 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 2개 또는 1개의 돌연변이를 포함할 수 있다. 예를 들어, VH 서열은 실시예에서 표 1에 나타낸 복귀 돌연변이 세트 중 하나와 함께 서열번호 9로 나타낸 서열을 포함할 수 있다.
- [0051] VH 서열은 서열번호 12 내지 18로 나타낸 서열 중 하나를 포함할 수 있다. CDR 서열은 밑줄로 표시되고 복귀 돌연변이는 굵게 표시된다.

서열번호 12 - 돌연변이 K73

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYVMHWWRQAPGQGLEWMGFINPY
NDDIQSNERFRGRVTMTRDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGAGYNFDGAYRF
FDFWGQGTMTVTVSS

서열번호 13 - 돌연변이 S71

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYVMHWWRQAPGQGLEWMGFINPY
NDDIQSNERFRGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGAGYNFDGAYRF
FDFWGQGTMTVTVSS

서열번호 14 - 돌연변이 S71, K73

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYVMHWWRQAPGQGLEWMGFINPY
NDDIQSNERFRGRVTMTSDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGAGYNFDGAYRF
FDFWGQGTMTVTVSS

서열번호 15 - 돌연변이 I48

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYVMHWWRQAPGQGLEWMGFINPYN
DDIQSNERFRGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGAGYNFDGAYRFF
DFWGQGTMTVTVSS

서열번호 16 - 돌연변이 I48, K73

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYVMHWWRQAPGQGLEWMGFINPYN
DDIQSNERFRGRVTMTRDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGAGYNFDGAYRFF
DFWGQGTMTVTVSS

서열번호 17 - 돌연변이 M20, S71, K73

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTGYVMHWWRQAPGQGLEWMGFINPY
NDDIQSNERFRGRVTMTSDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGAGYNFDGAYRF
FDFWGQGTMTVTVSS

[0052]

서열번호 18 - 돌연변이 M20, I48

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTGYVMHWWRQAPGQGLEWIGFINPYN
DDIQSNERFRGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGAGYNFDGAYRFF
DFWGQGTMTVTVSS

[0053]

[0054]

VL 서열은 인간 골격 3aaz를 갖는 JOVI-1 VL CDR을 포함할 수 있다. 이 서열은 서열번호 19로 나타낸다. CDR 서열은 밑줄로 표시된다.

서열번호 19

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVS
NRFPGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFGQGTKLEIK

[0055]

[0056]

VL 서열은 복귀 돌연변이와 같은 하나 이상의 돌연변이를 갖는 서열번호 19로 나타낸 서열을 포함할 수 있다. VL 서열은 야생형 인간 골격 영역 서열과 비교하여 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 2개 또는 1개의 돌연변이를 포함할 수 있다. 예를 들어, VL 서열은 서열번호 20 내지 34로 나타낸 서열 중 하나를 포함할 수 있다. CDR 서열은 밑줄로 표시되고 복귀 돌연변이는 굵게 표시된다.

서열번호 20

DIVMTQSPLSLPVTLGEQASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVS
NRFPGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSTHVPYTFGGGTKLEIK

서열번호 21

DIVMTQSPLSLPVTLGEQASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVS
NRFPGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSTHVPYTFGQGTKLEIK

서열번호 22

DIVMTQSPLSLPVTLGEQASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVS
NRFPGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFGGGTKLEIK

서열번호 23

DIVMTQSPLSLPVTLGEQASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVS
NRFPGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFGQGTKLEIK

[0057]

서열번호 24

DIVMTQSP¹SLSPVTLGEPASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVS
NRFP²GV³PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSTHVPYTFGGGTKLEIK

서열번호 25

DIVMTQSP¹SLSPVTLGEPASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVS
NRFP²GV³PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVFYCSQSTHVPYTFGGGTKLEIK

서열번호 26

DIVMTQSP¹SLSPVTLGEPASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVS
NRFP²GV³PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFGGGTKLEIK

서열번호 27

DIVMTQSP¹SLSPVTLGEPASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVS
NRFP²GV³PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFGGGTKLEIK

서열번호 28

DIVMTQSP¹SLSPVTPGEQASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVS
NRFP²GV³PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSTHVPYTFGGGTKLEIK

서열번호 29

DIVMTQSP¹SLSPVTPGEQASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVS
NRFP²GV³PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSTHVPYTFGGGTKLEIK

서열번호 30

DIVMTQSP¹SLSPVTPGEQASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVS
NRFP²GV³PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFGGGTKLEIK

서열번호 31

DIVMTQSP¹SLSPVTPGEQASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVS
NRFP²GV³PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFGGGTKLEIK

서열번호 32

DIVMTQSP¹SLSPVTPGEPASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVS
NRFP²GV³PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSTHVPYTFGGGTKLEIK

서열번호 33

DIVMTQSP¹SLSPVTPGEPASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVS
NRFP²GV³PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSTHVPYTFGGGTKLEIK

서열번호 34

DIVMTQSP¹SLSPVTPGEPASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYRVS
NRFP²GV³PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFGGGTKLEIK

항-TRBC1 항원 결합 도메인은

- a) 인간 골격 H-AF062256을 갖는 JOVI-1 VH CDR 또는 이의 변이체를 포함하는 VH 도메인; 및
 - b) 인간 골격 3aaz를 갖는 JOVI-1 VL CDR 또는 그의 변이체를 포함하는 VH 도메인
- 을 포함할 수 있다.

- [0064] 변이체는 야생형 인간 골격 영역 서열과 비교하여 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 2개 또는 1개의 돌연변이를 가질 수 있다.
- [0065] VH 도메인은 서열번호 9, 서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17 또는 서열번호 18로 나타난 서열을 포함할 수 있다. VL 도메인은 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34로 나타난 서열을 포함할 수 있다.
- [0066] 항-TRBC1 항원 결합 도메인은
- [0067] a) 서열번호 9로 나타난 서열을 포함하는 VH 도메인; 및
- [0068] b) 서열번호 19로 나타난 서열을 포함하는 VH 도메인
- [0069] 을 포함할 수 있다.
- [0070] 항체
- [0071] 본 발명의 제1 측면의 항원 결합 도메인은 항체 또는 이의 기능적 단편일 수 있다. 항체는 치료 항체, 예컨대 고갈 항체일 수 있다. 항체는 다른 항원과 함께 TRBC1에 결합하는 이중특이적 항체일 수 있다. 항체는 예를 들어 이중 친화성 재표적화 항체일 수 있다.
- [0072] 용어 '고갈 항체'는 통상적인 의미로 표적 T 세포 상에 제시된 항원(즉, TRBC1)에 결합하고 표적 T 세포의 사멸을 매개하는 항체와 관련되어 사용된다. 따라서, 고갈 항체를 피험자에게 투여하면 표적 항원을 발현하는 피험자 내의 세포의 수가 축소/감소된다.
- [0073] 본원에 사용된 "항체"는 하나 이상의 상보성 결정 영역 CDR을 포함하는 항원 결합 부위를 갖는 폴리펩티드를 의미한다. 항체는 3개의 CDR을 포함할 수 있고 도메인 항체(dAb)의 항원 결합 부위와 동등한 항원 결합 부위를 가질 수 있다. 항체는 6개의 CDR을 포함할 수 있고 전형적인 항체 분자의 항원 결합 부위와 동등한 항원 결합 부위를 가질 수 있다. 폴리펩티드의 나머지는 항원 결합 부위에 적합한 스캐폴드를 제공하고 이를 항원에 결합하기 위한 적절한 방식으로 표시하는 임의의 서열일 수 있다. 항체는 전체 면역글로불린 분자 또는 전체 항체의 항원 특이성을 보유하는 이의 일부, 예컨대 Fab, F(ab)'2, Fv, 단일 사슬 Fv(ScFv) 단편, 및 scFv-Fc 융합 또는 디아바디, 트리아바디 또는 나노바디일 수 있다. 항체는 이작용성 항체일 수 있다. 항체는 비인간, 키메라, 인간화 또는 완전 인간일 수 있다.
- [0074] 접합체
- [0075] 항체는 항체 및 다른 작용제 또는 항체의 접합체일 수 있으며, 예를 들어 접합체는 검출가능한 실체 또는 화학요법 실체일 수 있다.
- [0076] 검출가능한 실체는 형광 모이어티, 예를 들어 형광 펩티드일 수 있다. "형광 펩티드"는 여기 후, 검출가능한 과정에서 광을 방출하는 폴리펩티드를 지칭한다. 형광 단백질의 예는 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 피코에리트린(PE), 알로피코시아닌(APC), 녹색 형광 단백질(GFP), 강화 GFP, 적색 형광 단백질(RFP), 청색 형광 단백질(BFP) 및 mCherry를 포함하지만 이로 제한되지 않는다.
- [0077] 본원에 사용된 화학요법 실체는 세포를 파괴하는 실체를 지칭하며, 즉 실체가 세포의 생존력을 감소시킨다. 화학요법 실체는 세포독성 약물일 수 있다. 고려되는 화학요법제에는 알킬화제, 니트로소우레아, 에틸렌이민/메틸멜라민, 알킬 설포네이트, 항대사제, 피리미딘 유사체, 에피도도필로톡신, 효소, 예컨대 L-아스파라기나제; 생물학적 반응 조절제, 예컨대 IFN α , IL-2, G-CSF 및 GM-CSF; 백금 배위 착물, 예컨대 시스플라틴 및 카보플라틴, 안트라센디온, 치환된 우레아, 예컨대 히드록시우레아, N-메틸히드라진(MIH) 및 프로카바진을 포함하는 메틸히드라진 유도체, 부신피질 억제제, 예컨대 미토타인(o,p'-DDD) 및 아미노글루테티미드; 부신피질스테로이드 길항제를 포함하는 호르몬 및 길항제, 예컨대 프레드니손 및 등가물, 텍사메타손 및 아미노글루테티미드; 프로게스틴, 예컨대 히드록시프로게스테론 카프로에이트, 메드록시프로게스테론 아세테이트 및 메게스트롤 아세테이트; 에스트로겐, 예컨대 디에틸stil베스트롤 및 에티닐 에스트라디올 등가물; 항에스트로겐, 예컨대 타목시펜; 테스토스테론 프로피오네이트 및 플루옥시메스테론/등가물을 포함하는 안드로겐; 항안드로겐, 예컨대 플루타미드, 고나도트로핀 방출 호르몬 유사체 및 류프롤라이드; 및 비스테로이드성 항안드로겐, 예컨대 플루타미드를 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

- [0078] TRBC1 특이적 항체-약물 접합체는 화학요법 실체가 TRBC1을 발현하는 세포로 표적화된 전달을 가능하게 한다.
- [0079] 이중특이적 T 세포 인게이지
- [0080] 2개의 항체 유사 결합 도메인을 갖는 기본 개념에 기초한 다양한 분자가 개발되었다.
- [0081] 이중특이적 T 세포 인게이지 분자는 주로 항암 약물로서 사용하기 위해 개발된 이중특이적 항체 유형 분자의 부류이다. 이들은 암 세포와 같은 표적 세포에 대해 숙주의 면역계, 보다 구체적으로 T 세포의 세포독성 활성을 지시한다. 이들 분자에서, 하나의 결합 도메인은 CD3 수용체를 통해 T 세포에 결합하고, 다른 하나는 (종양 특이적 분자를 통해) 종양 세포와 같은 표적 세포에 결합한다. 이중특이적 분자는 표적 세포 및 T 세포 둘 다에 결합하기 때문에, 표적 세포를 T 세포와 근접하게 하여, T 세포가 그의 효과, 예를 들어 암 세포에 대한 세포독성 효과를 발휘할 수 있게 한다. T 세포:이중특이적 Ab:암 세포 복합체의 형성은 T 세포에서 신호 전달을 유도하여, 예를 들어 세포독성 매개체의 방출을 유도한다. 이상적으로, 상기 작용제는 표적 세포의 존재 하에서 원하는 신호 전달만을 유도하여 선택적 사멸을 유도한다.
- [0082] 이중특이적 T 세포 인게이지 분자는 다수의 상이한 포맷으로 개발되었지만, 가장 흔한 것 중 하나는 상이한 항체의 2개의 단일 사슬 가변 단편(scFv)으로 이루어진 융합이다. 이들은 때때로 BiTE(이중특이적 T 세포 인게이지)로 알려져 있다.
- [0083] 따라서 본 발명은 TRBC1을 선택적으로 인식하고 T 세포를 활성화시킬 수 있는 이중특이적 분자를 제공한다. 예를 들어, 작용제는 BiTE일 수 있다. 작용제는
- [0084] (i) 상기 정의된 바와 같은 항원 결합 도메인을 갖는 TRBC1에 결합하는 제1 도메인; 및
- [0085] (ii) T 세포를 활성화시킬 수 있는 제2 도메인
- [0086] 을 포함할 수 있다.
- [0087] 이중특이적 분자는 그의 생산을 돕기 위해 신호 펩티드를 포함할 수 있다. 신호 펩티드는 이중특이적 분자가 숙주 세포에 의해 분비되도록 하여, 이중특이적 분자가 숙주 세포 상청액으로부터 수확될 수 있게 한다.
- [0088] 신호 펩티드는 분자의 아미노 말단에 있을 수 있다. 이중특이적 분자는 하기 일반식을 가질 수 있다: 신호 펩티드-제1 도메인-제2 도메인.
- [0089] 이중특이적 분자는 제1 도메인을 제2 도메인과 연결하고 2개의 도메인을 공간적으로 분리하기 위해 스페이서 서열을 포함할 수 있다.
- [0090] 스페이서 서열은 예를 들어 IgG1 힌지 또는 CD8 스타크(stalk)를 포함할 수 있다. 링커는 대안적으로 IgG1 힌지 또는 CD8 스타크와 유사한 길이 및/또는 도메인 간격 특성을 갖는 대안적인 링커 서열을 포함할 수 있다.
- [0091] 키메라 항원 수용체(CAR)
- [0092] 본 발명은 TRBC1을 선택적으로 인식하는 CAR을 제공한다.
- [0093] 키메라 T 세포 수용체, 인공 T 세포 수용체 및 키메라 면역수용체로도 알려진 키메라 항원 수용체(CAR)는 조작된 수용체이며, 이는 면역 이펙터 세포에 임의의 특이성을 그래프팅한다. 전형적인 CAR에서, 단일클론 항체의 특이성은 T 세포에 그래프팅된다. CAR 코딩 핵산은 예를 들어 레트로바이러스 벡터를 사용하여 T 세포로 전달될 수 있다. 이러한 방식으로, 임상 세포 전달을 위해 다수의 암 특이적 T 세포가 생성될 수 있다. 이 접근법의 1기 임상 연구는 효능을 보여준다.
- [0094] CAR의 표적-항원 결합 도메인은 일반적으로 세포내 T 세포 신호 전달 도메인을 포함하거나 이와 관련된 엔도도메인에 스페이서 및 막관통 도메인을 통해 융합된다. CAR이 표적-항원에 결합할 때, 이는 활성화 신호가 그것이 발현되는 T 세포로 전송되게 한다.
- [0095] CAR은 또한 막에 걸쳐있는 막관통 도메인을 포함할 수 있다. 소수성 알파 나선을 포함할 수 있다. 막관통 도메인은 우수한 수용체 안정성을 제공하는 CD28로부터 유래될 수 있다.
- [0096] 엔도도메인은 신호 전송에 관여하는 CAR의 부분이다. 엔도도메인은 세포내 T 세포 신호 전달 도메인을 포함하거나 이와 관련된다. 항원 인식 후, 수용체 클러스터 및 신호가 세포로 전송된다. 가장 일반적으로 사용되는 T 세포 신호 전달 성분은 3개의 ITAM을 포함하는 CD3-제타의 것이다. 이것은 항원이 결합된 후 활성화 신호를 T 세포로 전달한다. CD3-제타는 완전히 만족스러운(competent) 활성화 신호를 제공하지 않을 수 있고 추가의 공동-

자극 신호가 필요할 수 있다. 예를 들어, 키메라 CD28 및 OX40을 CD3-제타와 함께 사용하여 증식성/생존 신호를 전송할 수 있거나, 이들 세가지 모두를 함께 사용할 수 있다.

- [0097] CAR의 엔도도메인은 CD28 엔도도메인 및 OX40 및 CD3-제타 엔도도메인을 포함할 수 있다.
- [0098] 대안적으로, 본 발명의 제2 측면의 CAR은 세포내 신호 전달 도메인이 없을 수 있지만, 신호 전달 기능을 제공하는 별도의 분자와 연관될 수 있다.
- [0099] 하기 두 부분을 포함하는 CAR 신호 전달 시스템이 이미 기술되어 있다: 항원 결합 도메인 및 막관통 도메인을 포함하는 CAR; 및 세포내 신호 전달 도메인을 포함하는 세포내 신호 전달 성분. 하나 이상의 공동 자극 도메인은 CAR 및/또는 세포내 신호 전달 성분 상에 위치할 수 있다.
- [0100] CAR과 세포내 신호 전달 성분 사이의 헤테로이량체화는 기능적 CAR 시스템을 생성한다. 헤테로이량체화는 WO2016/124930에 기재된 바와 같이 자발적으로 발생할 수 있거나; 또는 WO2015/150771에 기재된 바와 같이 이량체화 화학 유도제(CID)의 존재 하에서만 발생할 수 있다. 세번째 대안에서, 헤테로이량체화는 특정 소분자와 같은 작용제의 존재에 의해 파괴되므로, CAR 매개 신호 전달은 작용제의 부재 하에서만 발생한다. 이러한 시스템은 WO2016/030691에 기재되어 있다.
- [0101] CAR은 CAR이 T 세포와 같은 세포 내부에서 발현될 때 초기 단백질이 소포체로 향하고 이어서 그것이 발현되는 세포 표면으로 향하도록 신호 펩티드를 포함할 수 있다.
- [0102] CAR은 TRBC 결합 도메인을 막관통 도메인과 연결하고 TRBC 결합 도메인을 막으로부터 공간적으로 분리하기 위한 스페이서 서열을 포함할 수 있다. 가요성 스페이서는 TRBC 결합 도메인이 상이한 방향으로 배향되어 TRBC 결합을 가능하게 한다.
- [0103] 스페이서 서열은 예를 들어 IgG1 Fc 영역, IgG1 힌지 또는 CD8 스타크, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [0104] 핵산
- [0105] 본 발명은 상기 정의된 바와 같은 BiTE 또는 CAR을 코딩하는 핵산을 추가로 제공한다.
- [0106] 본원에 사용된 용어 "폴리뉴클레오티드", "뉴클레오티드" 및 "핵산"은 서로 동의어인 것으로 의도된다.
- [0107] 다수의 상이한 폴리뉴클레오티드 및 핵산이 유전자 코드의 퇴화의 결과로서 동일한 폴리펩티드를 코딩할 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 또한, 당업자는 일상적인 기술을 사용하여, 폴리펩티드가 발현되는 임의의 특정 숙주 유기체의 코돈 사용을 반영하기 위해 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 폴리펩티드 서열에 영향을 미치지 않는 뉴클레오티드 치환을 수행할 수 있음을 이해해야 한다.
- [0108] 본 발명에 따른 핵산은 DNA 또는 RNA를 포함할 수 있다. 이들은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 이들은 또한 합성 또는 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 올리고뉴클레오티드에 대한 다수의 상이한 유형의 변형이 당업계에 공지되어 있다. 이들은 메틸포스포네이트 및 포스포로티오에이트 골격, 분자의 3' 및/또는 5' 말단에 아크리딘 또는 폴리리신 사슬의 첨가를 포함한다. 본원에 기재된 바와 같은 용도의 목적을 위해, 폴리뉴클레오티드는 당업계에서 이용가능한 임의의 방법에 의해 변형될 수 있음을 이해해야 한다. 이러한 변형은 관심 폴리뉴클레오티드의 생체 내 활성 또는 수명을 향상시키기 위해 수행될 수 있다.
- [0109] 뉴클레오티드 서열과 관련하여 용어 "변이체", "동족체" 또는 "유도체"는 서열로부터 또는 서열로 하나(이상)의 핵산을 임의의 치환, 변형, 변성, 대체, 결실 또는 첨가하는 것을 포함한다.
- [0110] 본 발명은 또한 상기 정의된 바와 같은 CAR을 코딩하는 제1 핵산; 및 자살 유전자를 코딩하는 제2 핵산을 포함하는 핵산 구성체를 제공한다.
- [0111] 본 발명의 CAR 발현 세포에 사용하기에 적합한 자살 유전자는 WO2013/153391에 기재된 RQR8; 및 WO2016/135470에 기재된 RapCasp9를 포함한다.
- [0112] 상기 기재된 핵산 구성체에서, 제1 및 제2 핵산 서열은 임의의 순서일 수 있다.
- [0113] 벡터
- [0114] 본 발명은 또한 본 발명의 하나 이상의 핵산 서열(들) 또는 핵산 구성체(들)를 포함하는 벡터 또는 벡터 키트를 제공한다. 이러한 벡터는 핵산 서열(들) 또는 구성체(들)를 예를 들어 숙주 세포 내로 도입하여 본 발명의 제1 측면에 따른 항원 결합 도메인을 갖는 CAR을 발현시키기 위해 사용될 수 있다.

- [0115] 벡터는, 예를 들어, 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터와 같은 플라스미드 또는 바이러스 벡터, 또는 트랜스포손 기반 벡터 또는 합성 mRNA일 수 있다.
- [0116] 벡터는 T 세포 또는 NK 세포를 형질감염 또는 형질도입시킬 수 있다.
- [0117] 세포
- [0118] 본 발명은 또한 본 발명의 제1 측면에 따른 CAR을 포함하는 면역 세포와 같은 세포에 관한 것이다.
- [0119] 세포는 본 발명의 핵산, 핵산 구성체 또는 벡터를 포함할 수 있다.
- [0120] 세포는 T 세포 또는 자연 살해(NK) 세포일 수 있다.
- [0121] T 세포는 세포 매개 면역에서 중심적인 역할을 하는 림프구 유형인 T 세포 또는 T 림프구일 수 있다. 이들은 세포 표면에 T 세포 수용체(TCR)의 존재에 의해 B 세포 및 자연 살해 세포(NK 세포)와 같은 다른 림프구와 구별될 수 있다. 하기 요약된 바와 같이 다양한 유형의 T 세포가 있다.
- [0122] 헬퍼 T 헬퍼 세포(TH 세포)는 B 세포의, 형질 세포 및 기억 B 세포로의 성숙, 및 세포독성 T 세포 및 대식세포의 활성화를 포함하는 면역학적 과정에서 다른 백혈구 세포를 보조한다. TH 세포는 그의 표면에 CD4를 발현한다. TH 세포는 항원 제시 세포(APC)의 표면에 MHC 클래스 II 분자에 의해 펩티드 항원이 제시될 때 활성화된다. 이들 세포는 상이한 사이토카인을 분비하여 상이한 유형의 면역 반응을 촉진하는 TH1, TH2, TH3, TH17, Th9 또는 TFH를 비롯한 여러 서브유형 중 하나로 분화될 수 있다.
- [0123] 세포용해성 T 세포(TC 세포 또는 CTL)는 바이러스 감염된 세포 및 종양 세포를 파괴하고, 또한 이식 거부에 연루된다. CTL은 그 표면에 CD8을 발현한다. 이들 세포는 모든 유핵 세포의 표면에 제시되는 MHC 클래스 I과 관련된 항원에 결합함으로써 그들의 표적을 인식한다. IL-10, 아테노신 및 조절 T 세포에 의해 분비되는 다른 분자를 통해, CD8+ 세포는 실험적 자가면역 뇌척수염과 같은 자가면역 질환을 예방하는 아네르기 상태로 불활성화될 수 있다.
- [0124] 기억 T 세포는 감염이 해결된 후에 장기간 지속되는 항원 특이적 T 세포의 서브세트이다. 이들은 동족 항원에 재노출될 때 다수의 이펙터 T 세포로 빠르게 증식하여, 면역 시스템에 과거 감염에 대한 "기억"을 제공한다. 기억 T 세포는 3가지 서브유형, 즉 중심 기억 T 세포(TCM 세포) 및 2가지 유형의 이펙터 기억 T 세포(TEM 세포 및 TEMRA 세포)를 포함한다. 기억 세포는 CD4+ 또는 CD8+일 수 있다. 기억 T 세포는 통상 세포 표면 단백질 CD45RO를 발현한다.
- [0125] 이전에 억제 T 세포로 알려진 조절 T 세포(Treg 세포)는 면역학적 내성을 유지하는데 중요하다. 그들의 주요 역할은 면역 반응이 끝날 때까지 T 세포 매개 면역을 차단하고 흉선에서 음성 선택 과정을 벗어나는 자동 반응성 T 세포를 억제하는 것이다.
- [0126] CD4+ Treg 세포의 2가지 주요 부류, 즉 자연 발생 Treg 세포 및 적응성 Treg 세포가 설명된 바 있다.
- [0127] 자연 발생 Treg 세포(CD4+CD25+FoxP3+ Treg 세포라고도 함)는 흉선에서 발생하며 TSLP로 활성화된 형질세포양(CD123+) 수지상 세포 및 골수(CD11c+)로 T 세포를 발달시키는 것 사이의 상호 작용과 관련이 있다. 자연 발생 Treg 세포는 FoxP3이라는 세포내 분자의 존재에 의해 다른 T 세포와 구별될 수 있다. FOXP3 유전자의 돌연변이는 조절 T 세포 발달을 예방하여 치명적인 자가면역 질환 IPEX를 유발할 수 있다.
- [0128] 적응성 Treg 세포(Tr1 세포 또는 Th3 세포로도 알려져 있음)는 정상적인 면역 반응 동안 발생할 수 있다.
- [0129] 세포는 자연 살해 세포(또는 NK 세포)일 수 있다. NK 세포는 선천적 면역계의 일부를 형성한다. NK 세포는 MHC 독립적인 방식으로 바이러스 감염 세포로부터의 선천적 신호에 대한 빠른 반응을 제공한다.
- [0130] NK 세포(선천성 림프구 세포 그룹에 속함)는 큰 과립 림프구(LGL)로 정의되며 B 및 T 림프구를 생성하는 일반적인 림프구 전구체로부터 분화된 세번째 유형의 세포를 구성한다. NK 세포는 골수, 림프절, 비장, 편도선 및 흉선에서 분화되고 성숙하여 순환계로 진입하는 것으로 알려져 있다.
- [0131] 본 발명의 CAR 세포는 상기 언급된 임의의 세포 유형일 수 있다.
- [0132] 본 발명의 제1 측면에 따른 CAR을 발현하는 T 또는 NK 세포는 생체 외에서 환자 자신의 말초 혈액(제1 자)으로부터, 또는 공여자 말초 혈액(제2 자) 또는 연관되지 않은 공여자로부터의 말초 혈액(제3 자)으로부터 조혈 줄기 세포 이식의 설정에서 생성될 수 있다.

- [0133] 대안적으로, 본 발명의 제1 측면에 따른 CAR을 발현하는 T 또는 NK 세포는 유도성 전구 세포 또는 배아 전구 세포의 T 또는 NK 세포로의 생체 외 분화로부터 유래될 수 있다. 대안적으로, 그의 용해 기능을 유지하고 치료제로서 작용할 수 있는 불멸화된 T 세포주가 사용될 수 있다.
- [0134] 이들 모든 실시양태에서, CAR 세포는 바이러스 벡터에 의한 형질도입, DNA 또는 RNA에 의한 형질감염을 포함하는 많은 수단 중 하나에 의해 CAR에 대한 DNA 또는 RNA 코딩을 도입함으로써 생성된다.
- [0135] 본 발명의 CAR 발현 세포는 피험자로부터의 생체 외 T 또는 NK 세포일 수 있다. T 또는 NK 세포는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 샘플로부터 유래될 수 있다. T 또는 NK 세포는 예를 들어 항-CD3 단일클론 항체로 처리함으로써 본 발명의 제1 측면에 따른 CAR을 코딩하는 핵산으로 형질도입되기 전에 활성화 및/또는 증식될 수 있다.
- [0136] 본 발명의 T 또는 NK 세포는 다음에 의해 제조될 수 있다:
- [0137] (i) 상기 기재된 피험자 또는 다른 공급원으로부터의 T 또는 NK 세포 함유 샘플의 단리; 및
- [0138] (ii) 본 발명의 CAR을 코딩하는 핵산 서열(들)에 의한 T 또는 NK 세포의 형질도입 또는 형질감염.
- [0139] 이어서, T 또는 NK 세포는 예를 들어 항원 결합 폴리펩티드의 항원 결합 도메인의 발현에 기초하여 선택하여 정제될 수 있다.
- [0140] 본 발명은 또한 본 발명의 제1 측면에 따른 CAR을 포함하는 T 또는 NK 세포를 포함하는 키트를 제공한다.
- [0141] 약학 조성물
- [0142] 본 발명은 또한 CAR 발현 세포, 이의 치료 항체 또는 접합체, 또는 본 발명의 이중특이적 T 세포 인계이저와 같은 치료적 실체를 함유하는 약학 조성물에 관한 것이다. 약학 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 약학 조성물은 경우에 따라 하나 이상의 추가의 약학적 활성 폴리펩티드 및/또는 화합물을 포함할 수 있다. 이러한 제제는 예를 들어 정맥내 주입에 적합한 형태일 수 있다.
- [0143] T 세포 림프종 및/또는 백혈병
- [0144] 본 발명은 T 세포 림프종 및/또는 백혈병을 치료하기 위한 작용제, 세포 및 방법에 관한 것이다.
- [0145] T 세포 림프종 및/또는 백혈병을 치료하는 방법은 작용제의 치료적 용도에 관한 것이다. 본원에서, 작용제는 질환과 관련된 적어도 하나의 증상을 완화, 감소 또는 개선시키고/시키거나 질환의 진행을 늦추거나, 감소시키거나 차단하기 위해 기존의 T 세포 림프종 및/또는 백혈병 환자에게 투여될 수 있다.
- [0146] 본 발명의 방법은 TRBC1을 포함하는 T 세포 수용체(TCR)를 발현하는 세포의 클론 증식과 관련된 임의의 림프종 및/또는 백혈병의 치료에 사용될 수 있다.
- [0147] 본 발명의 방법은 악성 T 세포가 TRBC1을 포함하는 TCR을 발현하는 T 세포 림프종을 치료하는 데 사용될 수 있다. '림프종'은 통상 림프절에서 발생하지만 또한 비장, 골수, 혈액 및 기타 장기에 영향을 줄 수 있는 암을 지칭하기 위해 표준 의미에 따라 본원에서 사용된다. 림프종은 일반적으로 림프구 세포의 고형 종양으로 제시된다. 림프종과 관련된 1차 증상은 림프절병증이지만, 2차 (B) 증상에는 발열, 야간 발한, 체중 감소, 식욕 부진, 피로, 호흡 곤란 및 가려움증이 포함될 수 있다.
- [0148] 본 발명의 방법은 악성 T 세포가 TRBC1을 포함하는 TCR을 발현하는 T 세포 백혈병을 치료하는 데 사용될 수 있다. '백혈병'은 혈액 또는 골수의 암을 지칭하는 표준 의미에 따라 본원에서 사용된다.
- [0149] 다음은 본 발명의 방법에 의해 치료될 수 있는 예시적이고 비포괄적인 질환 목록이다.
- [0150] 말초 T 세포 림프종
- [0151] 말초 T 세포 림프종은 비교적 드문 림프종이며 모든 비호지킨 림프종(NHL)의 10% 미만을 차지한다. 그러나, 이는 공격적인 임상 과정과 관련이 있으며 대부분의 T 세포 림프종의 원인과 정확한 세포 기원은 여전히 잘 정의되어 있지 않다.
- [0152] 림프종은 통상 목, 겨드랑이 또는 사타구니에 부종을 우선 나타낸다. 비장에서와 같이 다른 림프절이 위치하는 경우 추가 부종이 발생할 수 있다. 일반적으로, 림프절이 커지면 혈관, 신경 또는 위의 공간에 침입하여 팔과 다리가 부어오르고 따끔거림과 마비가 생기거나 가득찬 느낌이 각각 들 수 있다. 림프종 증상에는 발열, 오한, 불명성 체중 감소, 야간 발한, 무기력 및 가려움증과 같은 비특이적 증상도 포함된다.

- [0153] WHO 분류는 임상적 측면 및 일부 경우 유전자와 관련하여 형태학적 및 면역표현형 특징을 이용하여 말초 T 세포 림프종에 대한 예후적 및 치료적으로 의미있는 분류를 묘사한다(Swerdlow *et al.*; WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, 4th ed.; Lyon: IARC Press; 2008). 중앙성 T 세포의 해부학적 국소화는 부분적으로 제한된 정상 세포 대응물 및 기능에 평행하고, 따라서 T 세포 림프종은 림프절 및 말초 혈액과 관련이 있다. 이 접근법은 세포 분포, 형태의 일부 측면 및 심지어 관련된 임상적 발견을 포함하여 T 세포 림프종의 증상의 일부를 보다 잘 이해하게 한다.
- [0154] T 세포 림프종의 가장 흔한 것은 전체 25%를 포함하는 분류불가 말초 T 세포 림프종(PTCL-NOS)이며, 혈관 면역모구 T 세포 림프종(AITL)이 뒤따른다(18.5%)
- [0155] 분류불가 말초 T 세포 림프종(PTCL-NOS)
- [0156] PTCL-NOS는 모든 말초 T 세포 림프종 및 NK/T 세포 림프종의 25% 이상을 차지하며 가장 흔한 서브유형이다. 이는 현재 WHO 2008에 등재된 임의의 특정 성숙 T 세포 림프종 실체에 해당하지 않는 제외 진단에 의해 결정된다. 따라서, 분류불가 미만성 큰 B 세포 림프종과 유사하다(DLBCL-NOS).
- [0157] 대부분의 환자는 평균 연령이 60세이고 남성 대 여성 비율이 2:1인 성인이다. 대부분의 경우에 림프절에서 발생하지만, 약 13%의 환자는 림프절외에서 발생하며 가장 일반적으로 피부 및 위장관이 관련된다.
- [0158] 세포학적 스펙트럼은 다형성에서 단형성에 이르기까지 매우 광범위하다. 림프상피양(Lennert) 변이체, T 구역 변이체 및 여포 변이체를 포함하여 3가지 형태학적으로 정의된 변이체가 설명되었다. PTCL의 림프상피양 변이체는 풍부한 배경 상피 조직구를 함유하고 일반적으로 CD8에 대해 양성이다. 이는 더 나은 예후와 관련이 있다. PTCL-NOS의 여포 변이체는 잠재적으로 별개의 임상병리학적 실체로 떠오르고 있다.
- [0159] PTCL-NOS의 대다수는 성숙한 T 세포 표현형을 가지며 대부분의 경우 CD4 양성이다. 75%의 사례는 적어도 하나의 pan-T 세포 마커(CD3, CD2, CD5 또는 CD7)의 가변 손실을 나타내며, CD7 및 CD5는 가장 빈번하게 하향조절된다. CD30 및 드물게 CD15가 발현될 수 있으며, CD15는 예후에 부정적인 영향을 미친다. CD56 발현은, 드물지만, 또한 예후에 부정적인 영향을 미친다. 추가적인 불리한 병리학적 예후 인자는 KI-67 발현에 기초하여 25% 초과 증식률 및 70% 초과 형질전환된 세포의 존재를 포함한다. 이 림프종의 면역표현형 분석은 생물학에 대한 통찰력을 거의 제공하지 못했다.
- [0160] 혈관 면역모구 T 세포 림프종(AITL)
- [0161] AITL은 림프절, 두드러진 높은 내피 정맥(HEV) 및 여포 수지상 세포(FDC) 메쉬워크의 혈관 주위 확장을 수반하는 다형성 침윤을 특징으로 하는 전신 질환이다. AITL은 일반적으로 배(germinal) 중심에서 발견되는 여포 헬퍼 유형(TFH)의 $\alpha\beta$ T 세포로부터 유래된 드 노보(de-novo) T 세포 림프종으로 간주된다.
- [0162] AITL은 말초 T 세포 림프종 및 NK/T 세포 림프종 중에서 두 번째로 가장 흔한 실체이며 약 18.5%의 사례를 포함한다. 중년에서 노인까지, 평균 연령은 65세이며 남성과 여성의 발병률은 거의 같다. 임상적으로, 환자는 일반적으로 전신성 림프절병증, 간비대증 및 돌출성 전신 증상을 갖는 진행성 단계 질환을 갖는다. 소양증과 관련된 피부 발진이 일반적으로 나타난다. 자가면역 현상과 관련된 다클론성 고감마글로불린혈증이 종종 있다.
- [0163] AITL에는 세가지 다른 형태적 패턴이 기술되어 있다. AITL의 초기 병변(패턴 I)은 통상 특징적인 과형성 여포를 가진 보존된 구조를 보여준다. 신생물 증식은 여포의 주변에 국한된다. 패턴 II에서, 림프절 구조는 몇몇 퇴행성 여포가 보유되어 부분적으로 제거된다. 피막하동은 보존되고 심지어 확장된다. 겹겹질(paracortex)은 분지(arborizing) HEV를 포함하고 B 세포 여포 너머로 FDC의 증식이 있다. 신생물 세포는 작거나 중간 크기이며, 최소 세포학적 비정형성이 있다. 이는 종종 투명하거나 창백한 세포질을 가지며, 별개의 T 세포막을 보여줄 수 있다. 다형성 염증성 배경이 또한 분명하다.
- [0164] AITL은 T 세포 악성 종양이지만, B 세포 및 형질 세포의 특징적인 증식이 있으며, 이는 TFH 세포로서 신생물 세포의 기능을 반영할 가능성이 있다. EBV-양성 및 EBV-음성 B 세포가 모두 존재한다. 때때로, 비정형성 B 세포는 형태적으로 면역 학적으로 호지킨/리드-스틴버그 유사 세포와 유사할 수 있으며, 때로는 해당 실체와의 진단적 혼란을 초래할 수 있다. AITL에서의 B 세포 증식은 광범위할 수 있고, 일부 환자는 종종 혈장세포 분화를 갖는 2차 EBV 양성 미만성 큰 B 세포 림프종(DLBCL) 또는 (보다 드물게) EBV-음성 B 세포 종양을 발생시킨다.
- [0165] AITL의 신생 CD4-양성 T 세포는 CD10 및 CD279 (PD-1)의 강한 발현을 나타내고 CXCL13에 대해 양성이다. CXCL13은 HEV 부착, B 세포 활성화, 형질세포 분화 및 FDC 메쉬워크의 확장을 통해 림프절에 대한 B 세포 모집을 증가시켜 AITL의 형태학적 및 임상적 특징에 모두 기여한다. 여포주위 종양 세포에서 강렬한 PD-1 발현은

AITL 패턴 I을 반응성 여포 및 부신피질 과형성으로부터 구별하는데 특히 도움이 된다.

- [0166] PTCL-NOS의 여포 변이체는 TFH 표현형을 갖는 또 다른 실체이다. AITL과 달리, 두드러진 HEV 또는 FDC 메쉬워크의 추가 여포 확장을 갖지 않는다. 신생물 세포는 B 세포 여포 림프종을 모방하여 여포내 응집체를 형성할 수 있지만, 또한 여포간 성장 패턴을 갖거나 확장된 맨틀 구역을 포함할 수 있다. 임상적으로, PTCL-NOS의 여포 변이체는 환자가 부분적으로 림프절 침범된 초기 병을 더 많이 갖고 AITL과 관련된 전신 증상이 결여될 수 있기 때문에 AITL과 구별된다.
- [0167] 역형성 대세포 림프종(ALCL)
- [0168] ALCL은 ALCL-'역형성 림프종 키나제'(ALK)+ 또는 ALCL-ALK-로 세분될 수 있다.
- [0169] ALCL-ALK+는 말굽 형상의 핵을 가지고 ALK 및 CD30을 발현하는 특징적인 "홀마크 세포"를 갖는 말초 T 세포 림프종 내에서 가장 잘 정의된 실체 중 하나이다. 이것은 모든 말초 T 세포 및 NK 세포 림프종의 약 7%를 차지하며, 30대까지 가장 흔하다. 환자는 종종 림프절병증이 있지만, 림프절외 부위(피부, 뼈, 연조직, 폐, 간)의 침범 및 B 증상이 일반적이다.
- [0170] ALCL, ALK+는 5가지 상이한 패턴이 기술된 넓은 형태학적 스펙트럼을 나타내지만, 모든 변이체는 일부 홀마크 세포를 함유한다. 홀마크 세포는 편심 말굽 형상 또는 신장 형상의 핵과 돌출된 핵주변 호산구 골지 영역을 갖는다. 중앙 세포는 부비강 침범에 대한 편향과 응집성 패턴으로 성장한다. 작은 중앙 세포는 작은 세포 변이체에서 우세하고, 림프조직구 변이체에서 풍부한 조직구는 대다수가 작은 중앙 세포의 존재를 가린다.
- [0171] 정의상, 모든 사례는 ALK 및 CD30 양성을 나타내며, 더 작은 중앙 세포에서의 발현은 통상 더 약하다. pan-T 세포 마커의 손실이 종종 있으며, 75%의 사례가 CD3의 표면 발현이 결여된다.
- [0172] ALK 발현은 염색체 2p23 상의 ALK 유전자를 다수의 파트너 유전자 중 하나로 재배열하여 키메라 단백질의 발현을 초래하는 특징적인 반복적인 유전자 변형의 결과이다. 75%의 사례에서 발생하는 가장 흔한 파트너 유전자는 염색체 5q35 상의 뉴클레오포스민(NPM1)으로서, t(2;5)(p23;q35)가 된다. 상이한 전위 변이체에서 ALK의 세포 분포는 파트너 유전자에 따라 달라질 수 있다.
- [0173] ALCL-ALK-는 2008 WHO 분류에서 잠정 카테고리 포함된다. 이는 응집성 성장 패턴 및 홀마크 세포의 존재와 함께 ALCL-ALK+와 형태학적으로 구별할 수 없지만, ALK 단백질 발현이 없는 CD30 양성 T 세포 림프종으로 정의된다.
- [0174] 환자는 통상 40세에서 65세 사이의 성인이며, 어린이와 청소년에게 더 흔한 ALCL-ALK+와 대조적이다. ALCL-ALK-는 림프절 및 림프절외 조직을 모두 포함할 수 있지만, 후자는 ALCL-ALK+보다 덜 일반적인 것으로 보인다. ALCL-ALK-의 대부분의 사례는 전형적인 "홀마크" 특징을 갖는 응집성 신생물 세포 시트에 의한 림프절 구조의 손상을 입증한다. ALCL-ALK+와 대조적으로, 소세포 형태학적 변이체는 인식되지 않는다.
- [0175] ALK+ 대응물과 달리, ALCL-ALK-는 표면 T 세포 마커 발현의 더 큰 보존을 나타내며, 세포독성 마커 및 상피 막 항원(EMA)의 발현은 덜 가능성이 있다. 유전자 발현 시그니처 및 재발성 염색체 불균형은 ALCL-ALK- 및 ALCL-ALK+에서 상이하여 이들이 분자 및 유전자 수준에서 별개의 실체임을 확인한다.
- [0176] ALCL-ALK-는 임상적으로 ALCL-ALK+ 및 PTCL-NOS와 구별되며, 이 세가지 다른 실체 간에 예후가 크게 다르다. ALCL-ALK-의 5년 전체 생존율은 49%로 보고되는데, 이는 ALCL-ALK+의 것(70%)보다 좋지 않지만 동시에 PTCL-NOS(32%)의 것보다는 훨씬 우수하다.
- [0177] 장병증 관련 T 세포 림프종(EATL)
- [0178] EATL은 장의 상피내 T 세포로부터 유래된 것으로 생각되는 공격적인 신생물이다. 2008 WHO 분류에서는 두가지 형태학적으로, 면역조직화학적으로 그리고 유전적으로 구별되는 EATL 유형이 인지된다: I형(대부분의 EATL을 나타냄) 및 II형(10-20%의 사례 포함).
- [0179] I형 EATL은 통상 명백하거나 임상적으로 조용한 글루텐 민감성 장병증과 관련이 있으며, 이 집단에서 셀리악병의 유병률이 높기 때문에 북유럽 추출 환자에서 더 자주 나타난다.
- [0180] 가장 일반적으로, EATL 병변은 공장 또는 회장(90%의 사례)에서 발견되며 십이지장, 결장, 위 또는 위장관 외부 영역에서 드물게 나타난다. 장 병변은 통상 점막 궤양이 있는 다병소이다. EATL의 임상 과정은 공격적이어서 1년 이내에 대부분의 환자가 질병 또는 질병의 합병증으로 사망한다.

- [0181] EATL I형의 세포학적 스펙트럼은 광범위하며, 일부 경우에는 역형성 세포를 포함할 수 있다. 다형성 염증성 배경이 있으며, 일부 경우 신생물 성분을 가릴 수 있다. 종양에 인접한 영역의 장 점막은 종종 용모가 둔화되고 상피내 림프구(IEL)의 수가 증가하여 병변 전구체 세포를 나타낼 수 있는 셀리악병의 특징을 보여준다.
- [0182] 면역조직화학에 의해, 신생물 세포는 종종 CD3+CD4-CD8-CD7+CD5-CD56-βF1+이고 세포독성 과립 관련 단백질(TIA-1, 그랜자임 B, 퍼포린)을 함유한다. CD30은 거의 모든 경우에 부분적으로 발현된다. 점막 귀환 수용체인 CD103은 EATL에서 발현될 수 있다.
- [0183] 또한, 단일형 CD56+ 장 T 세포 림프종으로도 지칭되는 II형 EATL은 CD8 및 CD56 둘 다를 발현하는 중소형 단일형 T 세포로 구성된 장 종양으로 정의된다. 종종 점막 내에 종양이 측면으로 퍼지고 염증성 배경이 없다. 대부분의 경우 γδ TCR을 발현하지만, αβ TCR과 관련된 경우가 있다.
- [0184] II형 EATL은 I형 EATL보다 전세계 분포가 더 많으며 셀리악병이 드문 아시아계 또는 히스패닉계 인구에서 종종 나타난다. 유럽계 혈통 EATL의 개체에서, II형은 장내 T 세포 림프종의 약 20%를 나타내며, 적어도 사례의 서브 세트에서 셀리악병의 병력이 있다. 임상 과정은 공격적이다.
- [0185] 간비장 T 세포 림프종(HSTL)
- [0186] HSTL은 선천성 면역계의 γδ 세포독성 T 세포로부터 일반적으로 유래된 공격적인 전신 신생물이지만, 드문 경우에 αβ T 세포로부터 유래될 수도 있다. 가장 드문 T 세포 림프종 중 하나이며 통상 남성 우세가 강한 청소년과 청년(중년, 35세)에게 영향을 미친다.
- [0187] 비형 림프절외 NK/T 세포 림프종
- [0188] 비형 림프절외 NK/T 세포 림프종은 종종 파괴적인 중간선 병변 및 괴사를 갖는 공격성 질환이다. 대부분의 경우는 NK 세포 유래이지만 일부 경우는 세포독성 T 세포로부터 유래된다. 이는 엡스타인-바 바이러스(EBV)와 보편적으로 관련되어 있다.
- [0189] 피부 T 세포 림프종
- [0190] 본 발명의 방법은 또한 피부 T 세포 림프종을 치료하는 데 사용될 수 있다.
- [0191] 피부 T 세포 림프종(CTCL)은 악성 T 세포가 피부로 이동하여 다양한 병변이 나타나는 것을 특징으로 한다. 이러한 병변은 질환이 진행됨에 따라 형상이 변하는데, 통상 발진으로 보이는 것으로 시작하고 결국 플라크와 종양을 형성한 후 신체의 다른 부분으로 전이된다.
- [0192] 피부 T 세포 림프종은 하기 예시적이고 비전면 목록에 언급된 것들을 포함한다: 균상식육종, 파제트양 세막증, 세자리(Sézary) 증후군, 육아종 이완 피부, 림프종양구진증, 만성 태선양 비강진, CD30+ 피부 T 세포 림프종, 이차 피부 CD30+ 큰세포 림프종, 비-균상식육종 CD30- 피부 큰세포 T 세포 림프종, 다형성 T 세포 림프종, 레너트 림프종, 피하 T 세포 림프종 및 혈관중심 림프종.
- [0193] CTCL의 징후와 증상은 특정 질병에 따라 다르며, 가장 흔한 두 가지 유형은 균상식육종과 세자리 증후군이다. 전형적인 균상식육종은 세 단계로 나뉜다.
- [0194] 패치(위축성 또는 비위축성): 비특이적 피부염, 허부 몸통 및 엉덩이의 패치; 최소/부재 소양증;
- [0195] 플라크: 강렬한 소양성 플라크, 림프절병증; 및
- [0196] 종양: 궤양
- [0197] 세자리 증후군은 홍피증 및 백혈병으로 정의된다. 징후 및 증상으로는 부종 피부, 림프절병증, 손바닥 및/또는 발바닥 각화증, 탈모증, 손발톱 이영양증, 안검외반 및 간비대증이 포함된다.
- [0198] 모든 원발성 피부 림프종 중에서 65%는 T 세포 유형의 것이다. 가장 흔한 면역표현형은 CD4 양성이다. 피부 T 세포 림프종이라는 용어는 광범위한 장애를 포함하기 때문에 이들 질환에 대한 일반적인 병리생리학은 없다.
- [0199] 피부 T 세포 림프종(즉, 균상식육종)의 발달을 위한 주요 병인 메카니즘은 밝혀지지 않았다. 균상식육종은 T 세포 매개 만성 염증성 피부 질환으로 이어질 수 있으며, 때때로 치명적인 림프종으로 진행될 수 있다.
- [0200] 원발성 피부 ALCL(C-ALCL)
- [0201] C-ALCL은 형태에 의해 종종 ALC-ALK와 구별할 수 없다. 이는 CD30을 발현하는 세포의 75% 이상을 갖는 역형성,

다형성 또는 면역모구성 형태를 갖는 큰세포 피부 종양으로 정의된다. 림프종양 구진증(LyP)과 함께, C-ALCL은 원발성 피부 CD30-양성 T 세포 림프구 증식 장애의 스펙트럼에 속하며, 이는 그룹으로서 군상식육종 후 두 번째로 가장 흔한 피부 T 세포 림프구 증식 그룹을 포함한다.

- [0202] 면역조직화학 염색 프로파일은 ALCL-ALK-와 매우 유사하며, 세포독성 마커에 대해 양성으로 염색되는 경우가 더 많다. 종양 세포의 적어도 75%가 CD30에 양성이어야 한다. CD15가 또한 발현될 수 있고, 림프절 침범이 발생할 때, 전형적인 호지킨 림프종과의 차이는 어려울 수 있다. ALCL-ALK+의 드문 경우에는 국소 피부 병변이 있을 수 있으며 C-ALCL과 유사할 수 있다.
- [0203] T 세포 급성 림프모구 백혈병
- [0204] T 세포 급성 림프모구 백혈병(T-ALL)은 소아 및 성인 코호트에서 각각 ALL의 약 15% 및 25%를 차지한다. 환자는 통상 백혈구 수가 많으며 장기비대증, 특히 종격동 확대 및 CNS 침범이 있을 수 있다.
- [0205] 본 발명의 방법은 TRBC1을 포함하는 TCR을 발현하는 악성 T 세포와 관련된 T-ALL을 치료하는 데 사용될 수 있다.
- [0206] T 세포 전림프구성 백혈병
- [0207] T 세포 전림프구성 백혈병(T-PLL)은 혈액, 골수, 림프절, 간, 비장 및 피부 침범에 대한 공격적인 행동 및 선입견을 갖는 성숙한 T 세포 백혈병이다. T-PLL은 주로 30세 이상의 성인에게 영향을 미친다. 다른 이름으로는 T 세포 만성 림프구성 백혈병, "크노비" 유형의 T 세포 백혈병 및 T 전림프구성 백혈병/T 세포 림프구 백혈병을 포함한다.
- [0208] 말초 혈액에서 T-PLL은 단핵구가 있는 중간 크기의 림프구와 간혹 블레브 또는 돌기가 있는 호염기성 세포질로 이루어진다. 핵은 통상 둥글고 타원형이며, 때때로 환자는 세자리 증후군에서 보이는 대뇌양 핵 형상과 유사한 불규칙한 핵 윤곽을 가진 세포를 갖는다. 작은 세포 변이체는 모든 T-PLL 사례의 20%를 포함하고, 세자리 세포 유사(대뇌양) 변이체는 사례의 5%에서 보인다.
- [0209] T-PLL은 성숙한 (홍선후) T 림프구의 면역표현형을 가지며, 신생물 세포는 전형적으로 pan-T 항원 CD2, CD3 및 CD7에 대해 양성이고 TdT 및 CD1a에 대해 음성이다. 면역표현형 CD4+/CD8-은 60%의 사례로 존재하고, CD4+/CD8+ 면역표현형은 25%의 사례로, 그리고 CD4-/CD8+ 면역표현형은 15%의 사례로 존재한다.
- [0210] 약학 조성물
- [0211] 본 발명의 방법은 약학 조성물의 형태로 작용제를 투여하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0212] 작용제는 약학적으로 허용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 보조제와 함께 투여될 수 있다. 약학 담체, 부형제 또는 희석제의 선택은 의도된 투여 경로 및 표준 약학 실무와 관련하여 선택될 수 있다. 약학 조성물은 담체로서 (또는 담체 이외에) 부형제 또는 희석제, 임의의 적합한 결합제(들), 윤활제(들), 현탁제(들), 코팅제(들), 가용화제(들), 및 다른 운반제를 포함할 수 있다.
- [0213] 투여
- [0214] 작용제의 투여는 활성 성분을 생체이용가능하게 하는 임의의 다양한 경로를 사용하여 달성될 수 있다. 예를 들어, 작용제는 경구 및 비경구 경로로, 카테터 또는 스텐트 등에 의한 국소 전달을 통해 복강내, 정맥내, 피하, 경피, 근육 내로 투여될 수 있다.
- [0215] 통상, 의사는 개별 피험자에게 가장 적합한 실제 투여량을 결정하고 이는 특정 환자의 연령, 체중 및 반응에 따라 달라진다. 투여량은 TRBC1을 발현하는 클론성 T 세포의 수를 감소시키거나 고갈시키기에 충분한 양이다.
- [0216] 본 발명은 이제 실시예에 의해 추가로 설명될 것이며, 이는 본 발명을 수행하는 데 당업자에게 도움을 주기 위한 것이며 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위를 제한하려는 것은 아니다.
- [0217] 실시예
- [0218] 실시예 1 - 중쇄 및 경쇄 그래프트 선택
- [0219] 인간화된 VH 도메인은 인간 VH 골격, 즉 H-AF062256, H-EF177999, H-KF688165에 따라 JOVI-1 VH CDR로 구성되었다. 인간화된 VL 도메인은 3aaz 인간 골격으로 구성되었다.
- [0220] 인간화된 VH 도메인 및 뮤린 JOVI-1 VL 도메인; 뮤린 VH 도메인 및 인간화된 VL 도메인; 또는 인간화된 VH 도메

인 및 인간화된 VL 도메인으로 항체를 생성하였다(도 4 참조).

[0221] TRBC1에 대한 결합은 ELISA에 의해 테스트되었고 결과는 도 5에 도시된다.

[0222] 모든 키메라 및 인간화된 결합제 조합은 TRBC1에 결합할 수 있는 것으로 밝혀졌으며 결합은 무린 VH 및 VL 도메인을 갖는 키메라 항체와 유사하였다.

[0223] 실시예 2 - 복귀 돌연변이된 구성체 제조 및 테스트

[0224] 하기 표 1에 나타난 바와 같이, 인간 골격 H-AF062256을 위한 일련의 복귀 돌연변이 결합제가 생성되었으며, 여기서 복귀 돌연변이는 굵게 표시된다.

표 1

구성체	중쇄	중쇄 돌연변이
Jovi Hum 8	H-AF 1	Q3, V20, M48, R71, T73
Jovi Hum 16	H-AF 2	Q3, V20, M48, R71, K73
Jovi Hum 17	H-AF 3	Q3, V20, M48, S71 , T73
Jovi Hum 18	H-AF 4	Q3, V20, M48, S71 , K73
Jovi Hum 19	H-AF 5	Q3, V20, I48 , R71, T73
Jovi Hum 20	H-AF 6	Q3, V20, I48 , R71, K73
Jovi Hum 21	H-AF 7	Q3, V20, I48 , S71 , T73
Jovi Hum 22	H-AF 8	Q3, V20, I48 , S71 , K73
Jovi Hum 23	H-AF 9	Q3, M20 , M48, R71, T73
Jovi Hum 24	H-AF 10	Q3, M20 , M48, R71, K73
Jovi Hum 25	H-AF 11	Q3, M20 , M48, S71 , T73
Jovi Hum 26	H-AF 12	Q3, M20 , M48, S71 , K73
Jovi Hum 27	H-AF 13	Q3, M20 , I48 , R71, T73
Jovi Hum 28	H-AF 14	Q3, M20 , I48 , R71, K73
Jovi Hum 29	H-AF 15	Q3, M20 , I48 , S71 , T73
Jovi Hum 30	H-AF 16	Q3, M20 , I48 , S71 , K73
Jovi Hum 31	H-AF 17	R3 , V20, M48, R71, T73
Jovi Hum 32	H-AF 18	R3 , V20, M48, R71, K73
Jovi Hum 33	H-AF 19	R3 , V20, M48, S71 , T73
Jovi Hum 34	H-AF 20	R3 , V20, M48, S71 , K73
Jovi Hum 35	H-AF 21	R3 , V20, I48 , R71, T73
Jovi Hum 36	H-AF 22	R3 , V20, I48 , R71, K73
Jovi Hum 37	H-AF 23	R3 , V20, I48 , S71 , T73

[0225]

Jovi Hum 38	H-AF 24	R3, V20, I48, S71, K73
Jovi Hum 39	H-AF 25	R3, M20, M48, R71, T73
Jovi Hum 40	H-AF 26	R3, M20, M48, R71, K73
Jovi Hum 41	H-AF 27	R3, M20, M48, S71, T73
Jovi Hum 42	H-AF 28	R3, M20, M48, S71, K73
Jovi Hum 43	H-AF 29	R3, M20, I48, R71, T73
Jovi Hum 44	H-AF 30	R3, M20, I48, R71, K73
Jovi Hum 45	H-AF 31	R3, M20, I48, S71, T73
Jovi Hum 46	H-AF 32	R3, M20, I48, S71, K73

[0226]

[0227] 결합체는 3aaz 골격을 포함하는 인간화된 VL 도메인을 가졌다.

[0228] TRBC1 및 TRBC2에 대한 결합은 ELISA에 의해 테스트되었고 결과는 도 6에 도시된다. TRBC2가 아닌 TRBC1에 결합된 모든 구성체는 뮤린 VH 및 VL 도메인(Jovi-Mu)을 갖는 키메라 항체와 유사한 EC50을 나타냈다. 이는 CDR 그래프팅 후, 뮤린 항체의 특이성 및 친화성이 인간화된 항체에서 유지됨을 보여준다.

[0229] **실시예 3 - 인간화 mAb 및 scFv의 안정성 조사**

[0230] 실시예 2에 기재된 결합체의 안정성을 시차 주사 형광 측정법에 의해 테스트하였다. 단백질은 5000:1의 단백질:염료 비로 시프로 오렌지 염료를 첨가하기 전에 150 ug/ml의 PBS에 저장되었다. 용액을 혼합하여 qPCR 기계에 넣고 FRET 모드에서 작동시켰다. 용액을 15℃에서 10분 동안 유지한 다음, 0.5℃씩 증가시키고 각 단계에서 30초 동안 유지하면서 95℃로 온도 상승시켰다. 각 단계 후에 형광 판독 값을 얻었다. T_m 값(평형 상수; 언폴딩 단백질 = 폴딩 단백질)을 얻기 위해 형광 변화의 첫 번째 유도체($\Delta RFU/\Delta ^\circ C$)를 온도 변화($\Delta ^\circ C$)에 대해 플롯팅하였다.

[0231] 결과는 도 7에 도시된다. 인간 골격의 사용은 mAb 포맷에서 결합체의 안정성을 증가시키는 것으로 밝혀졌다.

[0232] scFv 포맷의 등가 결합체의 안정성을 조사하기 위해 유사한 실험을 수행하였다. 이 연구를 위해 시차 주사 색도계가 사용되었다. CAP DSC 시스템을 사용하여 실험을 수행하였다. 저장 완충액(1 x PBS) 내의 단백질을 열량계 샘플 세포에 넣고, 기준 세포를 저장 완충제 단독으로 채웠다. 세포를 열량계 내부에서 25℃에서 1시간 동안 안정화시킨 후 100℃의 최종 온도까지 시간당 200℃의 속도로 가열하였다. 전이 피크의 최대 값에 해당하는 변성 온도(T_m)는 적어도 두 번의 반복 실행으로 결정되었고 0.25℃ 이하로 변화하였다.

[0233] 하나의 결합체 scFv 비교에 대한 결과는 도 8에 도시된다. 마우스 Jovi-1 scFv의 용융 온도는 61℃였지만, 인간화된 scFv(H-AF1, 3aaz)의 용융 온도는 65℃였다.

[0234] **실시예 4 - 인간화된 항-TRBC1 항원 결합 도메인을 갖는 키메라 항원 수용체(CAR)의 생성**

[0235] 41BB 및 CD3 제타 엔도도메인, 및 도 9에 개략적으로 도시된 바와 같이 인간화된 JOVI-1 scFv(H-AF1, 3aaz)를 포함하는 항원 결합 도메인을 갖는 제2 세대 CAR을 디자인하였다. 정상 공여자로부터의 1차 인간 T 세포를, 항-TRBC1 CAR 또는 무관한 EGFRvIII CAR을 음성 대조군으로서 발현하는 레트로바이러스 벡터에 형질도입하였다. TRBC1 또는 TRBC2 발현 표적 세포를 사멸시키는 세포의 능력을 유세포 분석법을 사용하여 조사하였다.

[0236] 결과는 도 10에 도시된다. 인간화된 TRBC1 CAR을 발현하는 T 세포는 TRBC2 발현 표적 세포가 아닌 TRBC1 발현 표적 세포를 사멸시켰다.

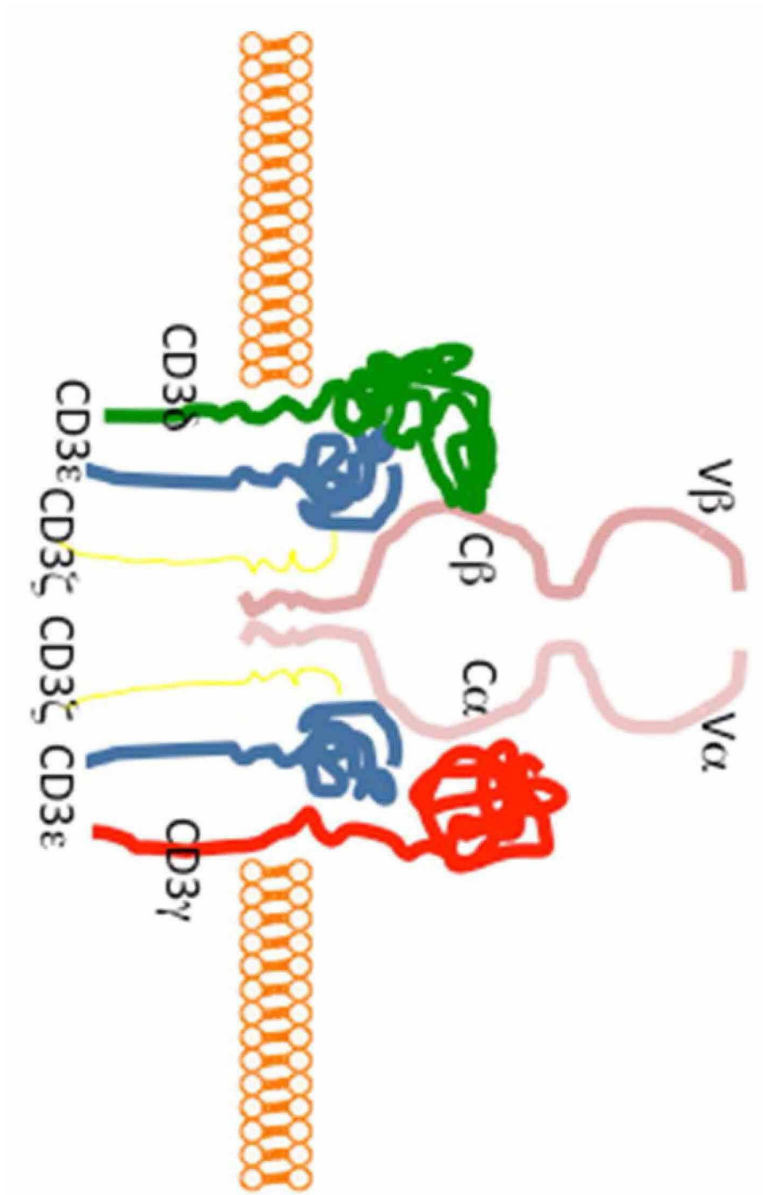
[0237] TRBC1 또는 TRBC2 발현 표적 세포와의 공동 배양 72시간 후 T 세포 증식을 측정하고 그 결과는 도 11에 도시된다. 뮤린 Jovi-1 CAR 또는 인간화된 CAR을 발현하는 T 세포는 TRBC2 발현 표적 세포와는 아니지만 TRBC1 발현 표적 세포와의 공동 배양될 때 증식에 있어 증가를 나타내었다.

[0238] 사이토카인 방출은 TRBC1 또는 TRBC2 발현 표적과의 공동 배양 24시간 후 측정되었다. 결과는 도 12에 도시된다. 뮤린 Jovi-1 CAR 또는 인간화된 CAR을 발현하는 T 세포는 TRBC2 발현 표적 세포가 아닌 TRBC1 발현 표적 세포와 공동 배양될 때 IFN γ 및 IL-2의 방출 증가를 나타내었다.

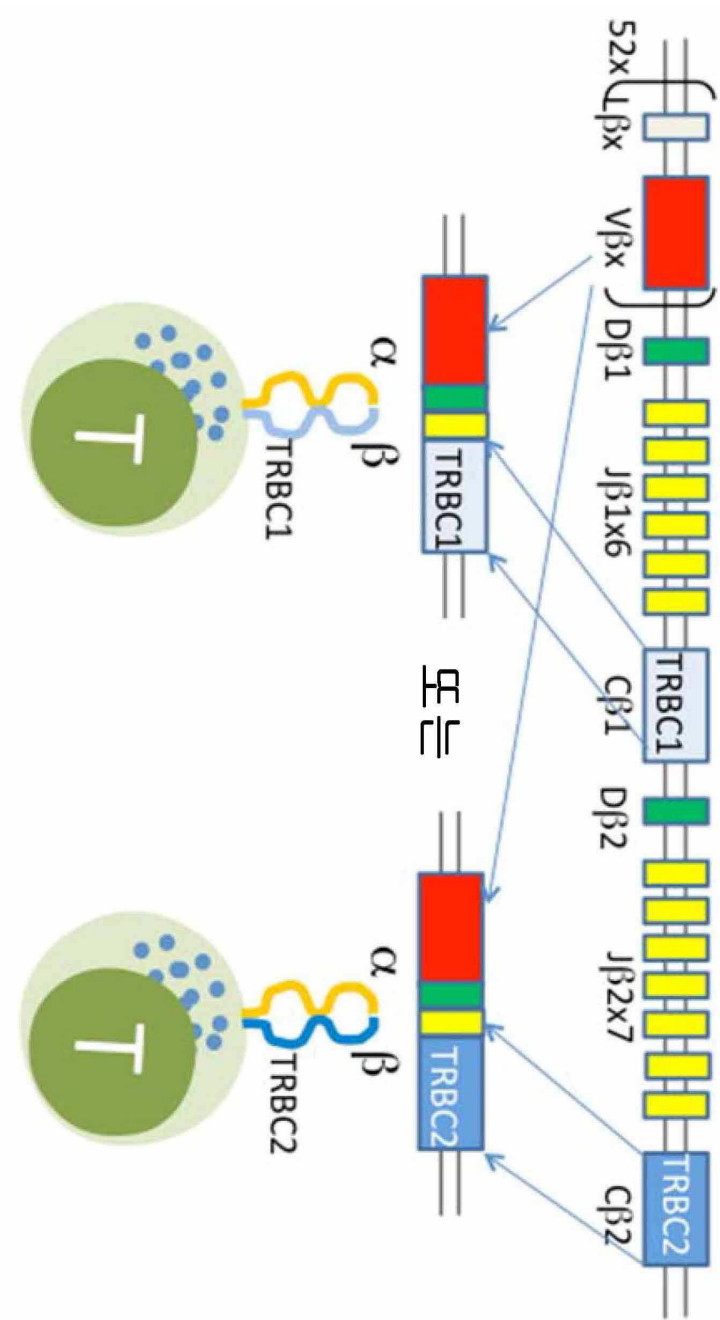
- [0239] **실시예 5** - NSG 마우스 모델에서 인간화된 α TRBC1 CAR이 종양을 제거한다
- [0240] 7-8주령의 암컷 NSG 마우스에 CD19-Fluc(0.1 ml PBS 중의 동물당 3×10^6 세포)를 발현하도록 형질도입된 Jurkat 세포를 이식하였다. 7일째에, 마우스(n = 8/그룹)에 1.0×10^6 α TRBC1 CAR T 세포 또는 모의 형질도입된 세포(NT)를 정맥내 주입하였다. 연구일 6일, 9일, 12일 및 15일째에 생물발광 이미징(BLI)에 의해 종양 성장을 확인하였다. 간략하게, 이미징 15분 전에 마우스에 150 mg/kg D-루시페린을 주사(s.c.)하였다. D-루시페린을 투여하고 10분 후에 마우스를 마취시키고 이미징 챔버에 놓고 발광을 이미징하였다(복면도 및 배면도; 케이지 순서로서로 나란히 배치된 최대 5마리의 마우스). 이미징 획득의 기간 및 비닝(민감도)은 Living Image 4.3.1 소프트웨어를 사용하여 캡처 및 처리되었다.
- [0241] 결과는 도 13에 도시된다. 12일째까지, 인간화된 항-TRBC1 CAR T 세포는 모든 동물에서 종양을 제거하였다.
- [0242] **실시예 6** - 탈진에 대한 무린 및 인간화된 항-TRBC1 CAR T 세포의 효과 비교
- [0243] H-AF062256 VH 골격 영역 및 3aaz VL 골격 영역을 갖는 JOVI-1로부터의 CDR을 포함하는 무린 Jovi-1 CAR 또는 인간화된 Jovi-1 CAR을 발현하는 벡터를 활성화된 PBMC에 형질도입하였다. 2일 후에 세포를 수집하고 추가 2일 동안 50 U/mL IL-2를 갖는 배양 배지에서 유지시켰다. EasySep CD56 양성 선별 키트를 사용하여 형질도입된 T 세포를 CD56 발현 세포에서 고갈시켰다. CAR T 세포와 TRBC1-TCR 발현 Raji 표적의 공동 배양은 다음과 같이 수행되었다: 표적 세포를 96웰 U-바닥 플레이트에서 이펙터:표적 비 1:1로 웰당 50,000개의 세포로 플레이팅하였다. 96시간 후, 공동배양물을 수확하고 세포를 항-PD1, 항-LAG3 및 항-Tim3 항체로 염색한 후 유세포 분석법으로 분석하였다.
- [0244] 결과는 도 14에 도시된다. 인간화된 항-TRBC1 CAR을 발현하는 T 세포는 무린 CAR을 발현하는 T 세포보다 더 낮은 수준의 모든 3개의 탈진 마커를 발현하였다. 이것은 CD4+ 및 CD8+ T 세포 모두에 해당되었다. 따라서, 인간화된 CAR을 발현하는 T 세포는 놀랍게도 무린 Jovi-1 항체로부터 유래된 scFv를 갖는 CAR을 발현하는 T 세포보다 표적 세포에 노출되는 동안 덜 탈진된다.
- [0245] T 세포 탈진은 많은 만성 감염 및 암 동안 발생하는 T 세포 기능 이상의 상태이다. 이펙터 기능이 불량한 것으로 정의된다. CAR-T 세포가 표적 세포를 사멸시키는데 효율적이 되려면, T 세포 탈진 속도를 피하거나 감소시키는 것이 유리하다.
- [0246] 상기 명세서에서 언급된 모든 간행물은 본원에 참고로 포함된다. 기술된 본 발명의 방법 및 시스템의 다양한 수정 및 변형은 본 발명의 범위 및 사상을 벗어나지 않고 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명은 특정 바람직한 실시예와 관련하여 설명되었지만, 청구된 본 발명은 이러한 특정 실시예에 과도하게 제한되어서는 안된다는 것을 이해해야 한다. 실제로, 분자 생물학 또는 관련 분야의 숙련자에게 명백한 본 발명을 수행하기 위해 기술된 방식의 다양한 변형은 하기 청구 범위의 범위 내에 있는 것으로 의도된다.

도면

도면1



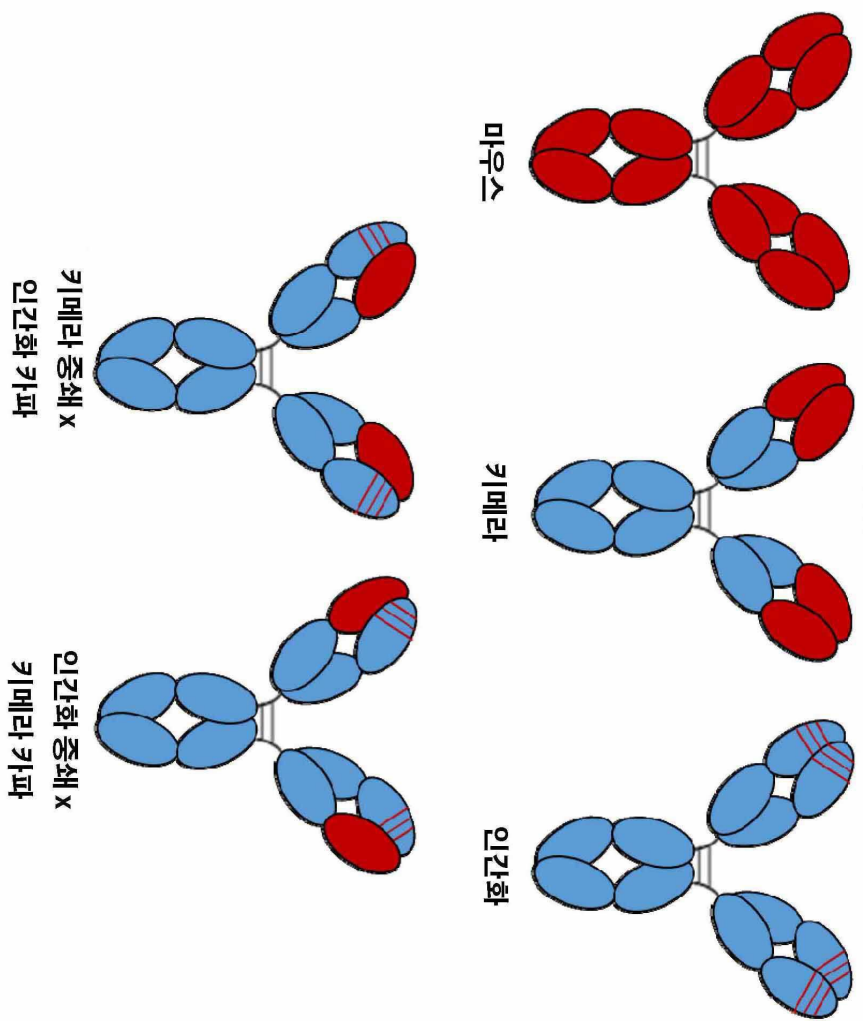
도면2



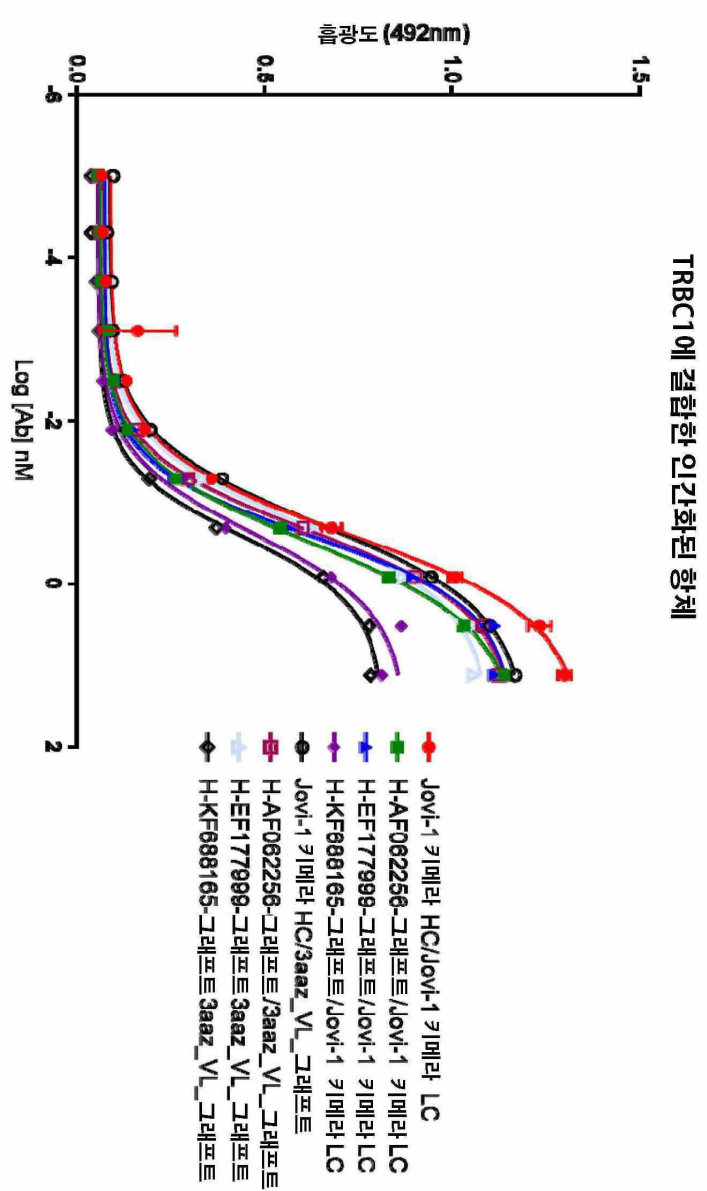
도면3

TRBC1	1	DLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTOKATIVCLATGF	PDHVELSMWVNGKEVHSGVSTDPQ
TRBC2	1	DLKNVPPEVAVFEPSEAEISHTOKATIVCLATGF	PDHVELSMWVNGKEVHSGVSTDPQ
TRBC1	61	PLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWMQNP RNHFR	QVQFYGLSENDEWTOQDRAKPVTQIV
TRBC2	61	PLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWMQNP RNHFR	QVQFYGLSENDEWTOQDRAKPVTQIV
TRBC1	121	SAEAWGRADCGFTS	SYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKD
TRBC2	121	SAEAWGRADCGFTS	SYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKD

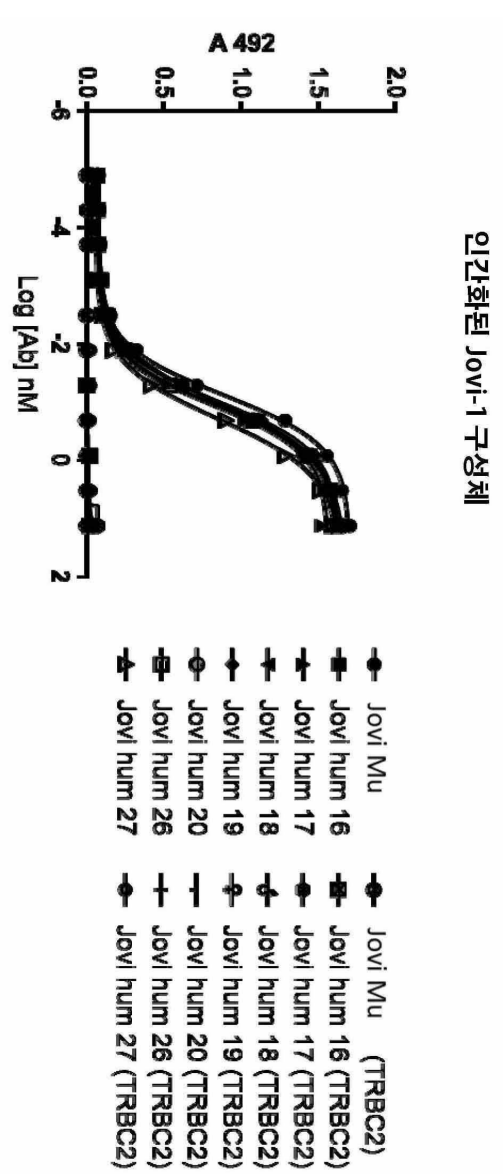
도면4



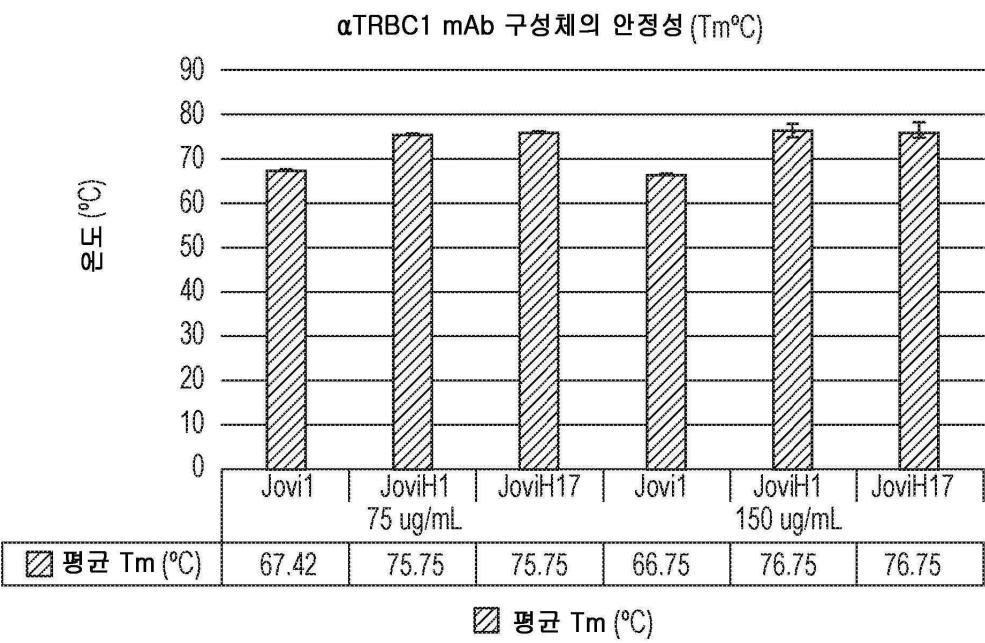
도면5



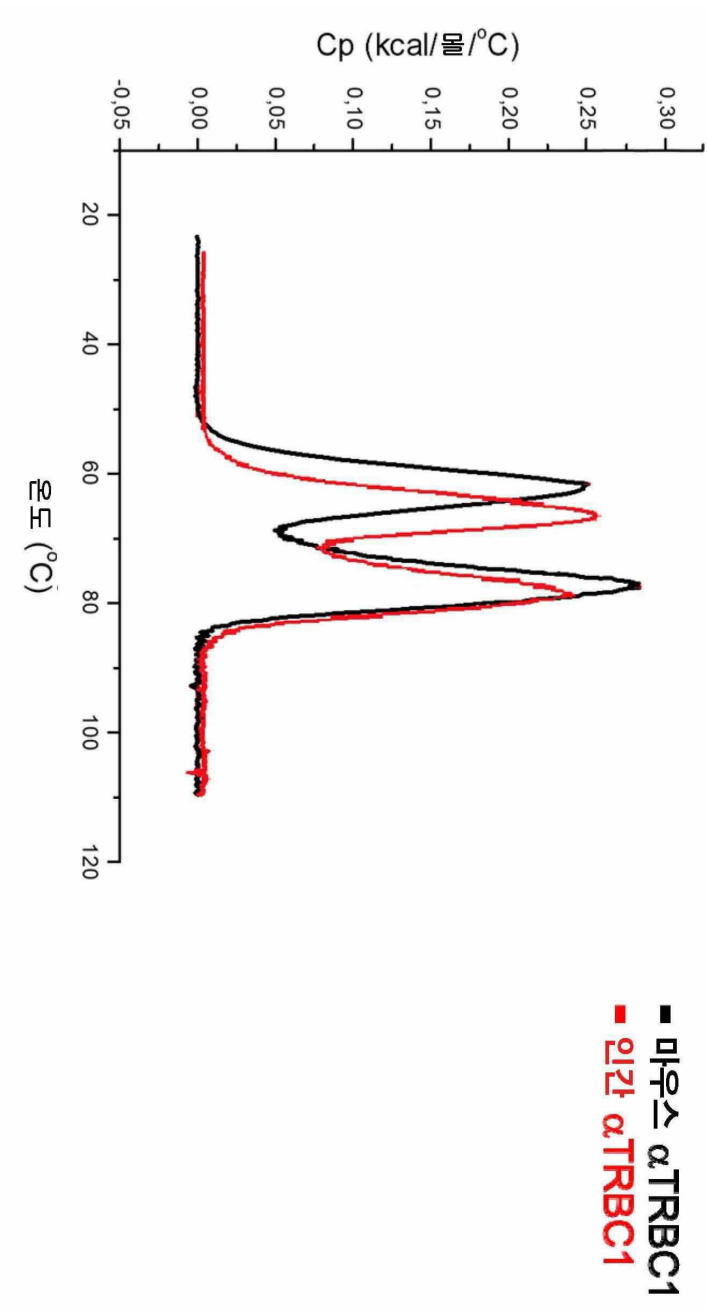
도면6



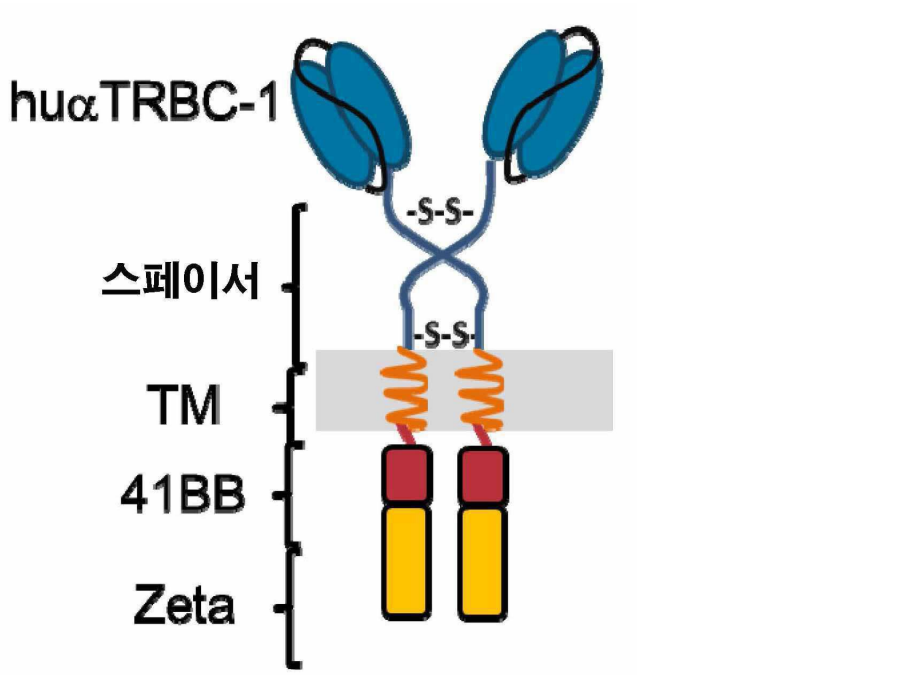
도면7



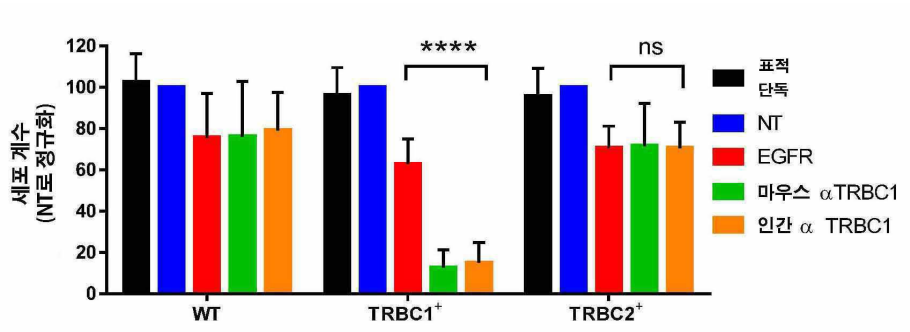
도면8



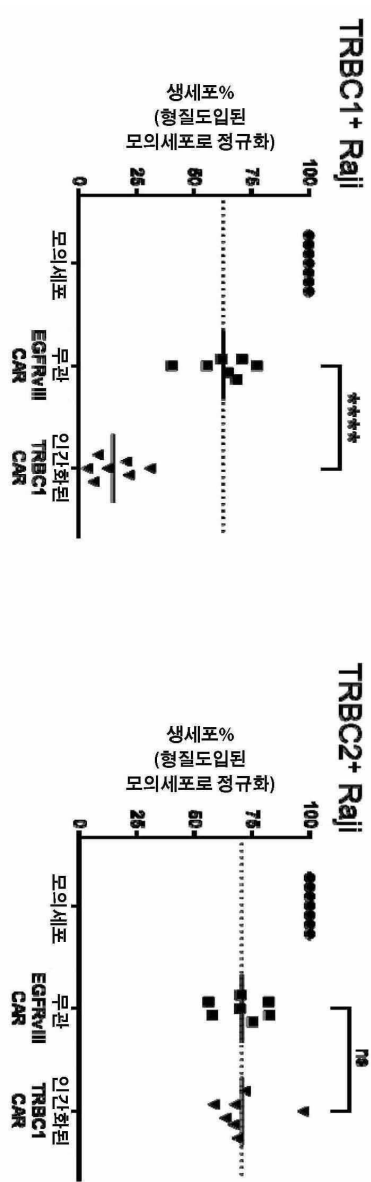
도면9



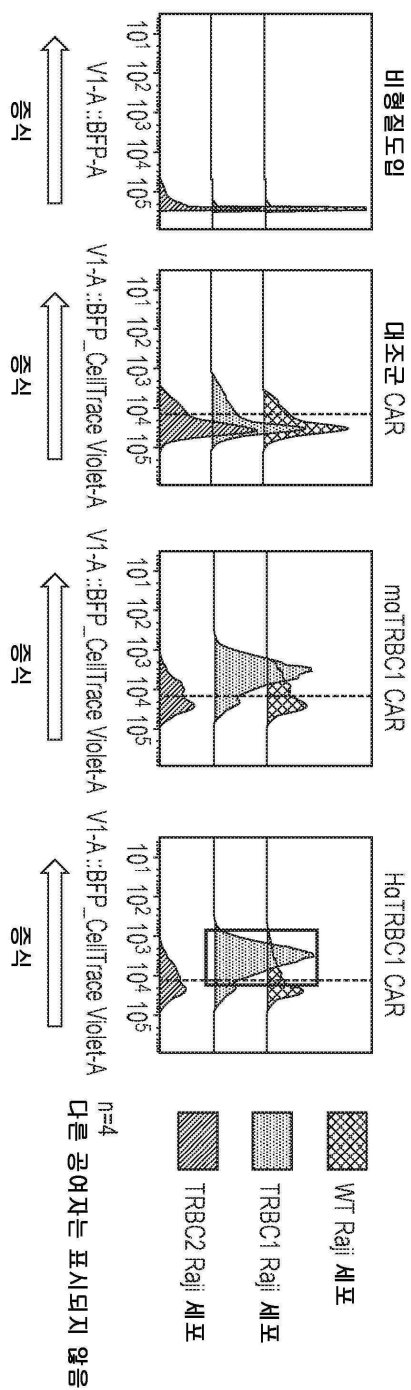
도면10a



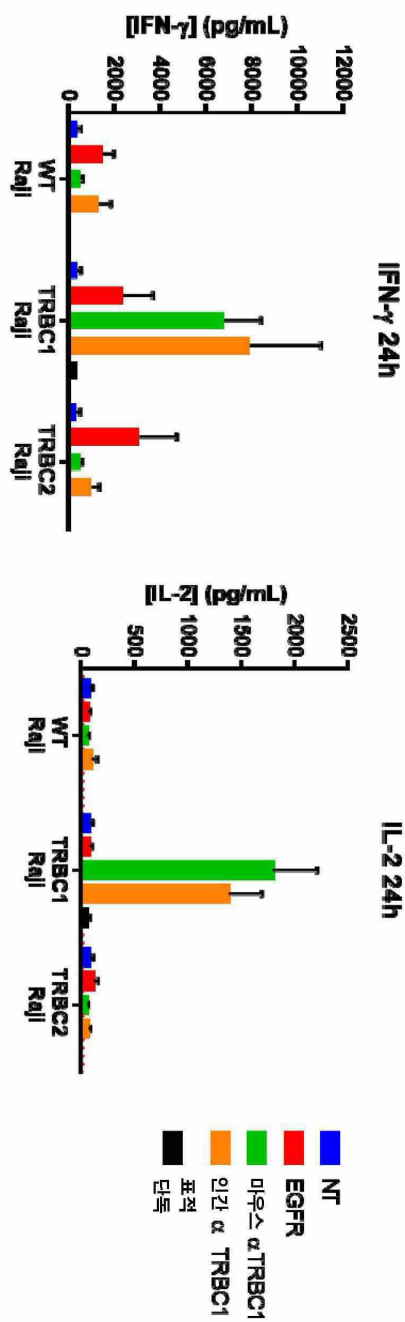
도면10b



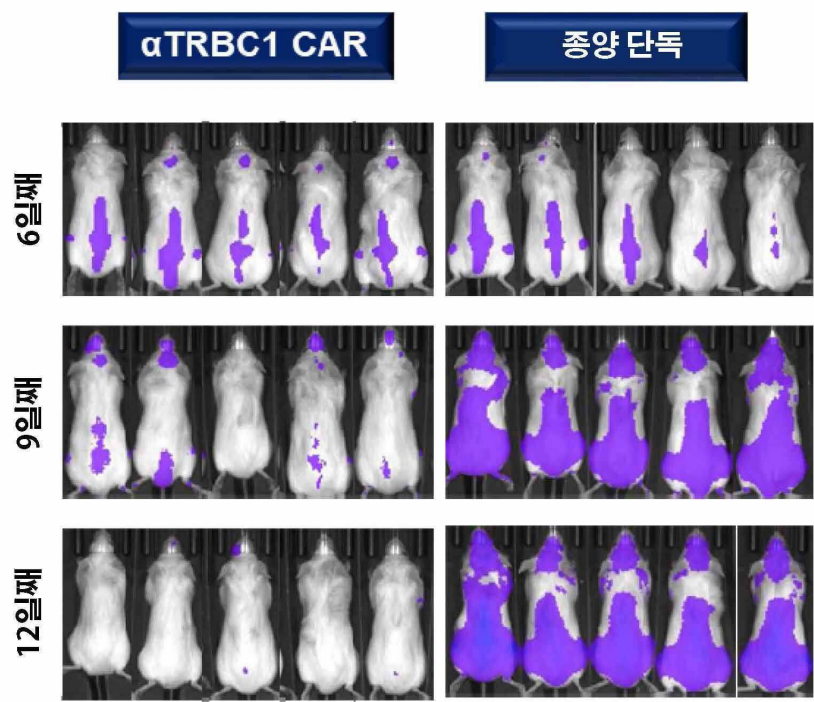
도면11



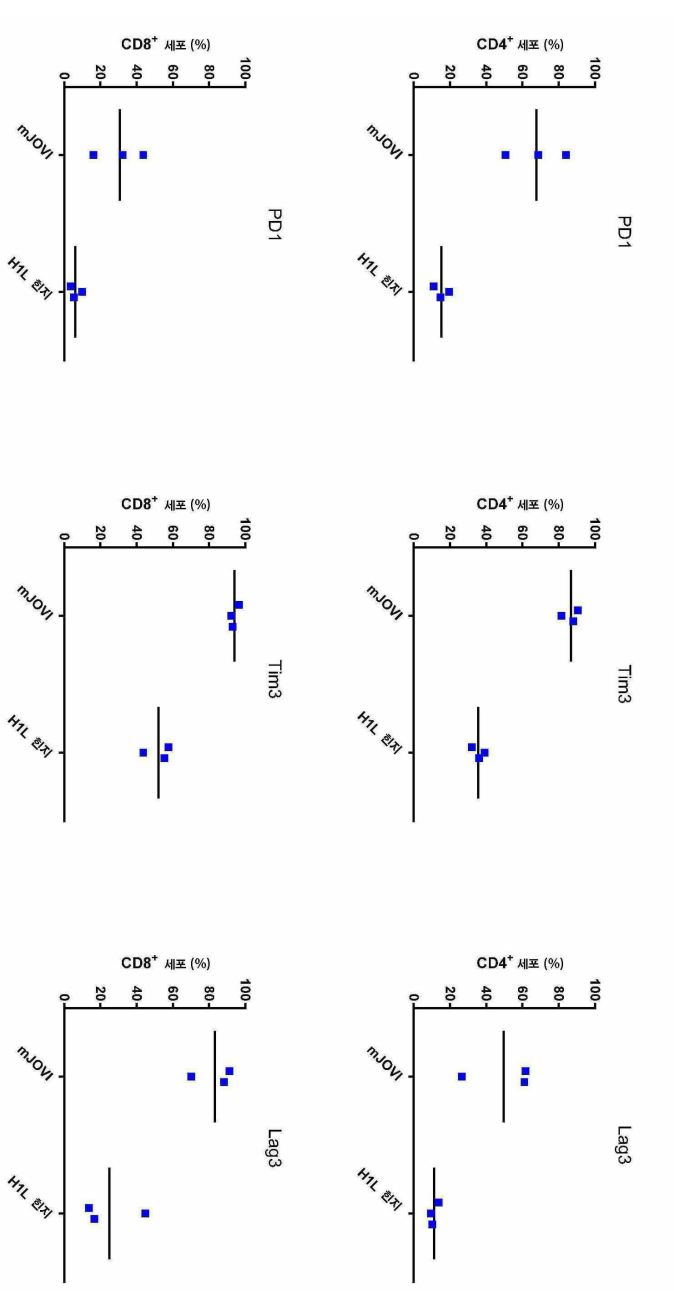
도면12



도면13



도면14



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Autolus Limited
- <120> ANTIGEN-BINDING DOMAIN
- <130> P112494PCT
- <150> GB 1709203.2
- <151> 2017-06-09
- <160> 36
- <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> variable heavy chain (VH) complementarity determining region
 (CDR)1, VH CDR1
 <400> 1
 Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 1 5
 <210> 2
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH CDR2
 <400>
 > 2
 Asn Pro Tyr Asn Asp Asp
 1 5
 <210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH CDR3
 <400> 3
 Gly Ala Gly Tyr Asn Phe Asp Gly Ala Tyr Arg Phe Phe Asp Phe
 1 5 10 15
 <210> 4
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> variable light chain (VL) CDR1
 <400> 4
 Arg Ser Ser Gln Arg Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL CDR2

<400> 5

Arg Val Ser Asn Arg Phe Pro

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL CDR3

<400> 6

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 7

<211> 124

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Glu Val Arg Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Ile Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Phe Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Ile Gln Ser Asn Glu Arg Phe

50 55 60

Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Ala Gly Tyr Asn Phe Asp Gly Ala Tyr Arg Phe Phe Asp
 100 105 110

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Arg Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 9

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanised Jovi-1 H-AF062256 framework

<400> 9

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 Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Phe Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Ile Gln Ser Asn Glu Arg Phe

50 55 60

Arg Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Ala Gly Tyr Asn Phe Asp Gly Ala Tyr Arg Phe Phe Asp

100 105 110

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 10

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanised Jovi-1 H-EF177999 framework

<400> 10

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Phe Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Ile Gln Ser Asn Glu Arg Phe

50 55 60

Arg Gly Arg Val Thr Met Thr Arg 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
Ala Arg Gly Ala Gly Tyr Asn Phe Asp Gly Ala Tyr Arg Phe Phe Asp
100 105 110
Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 11
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> humanised Jovi-1 H- H-KF688165 framework

<400> 11
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 Glu Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Phe Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Ile Gln Ser Asn Glu Arg Phe
50 55 60

Arg Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Val Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ala Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Ala Gly Tyr Asn Phe Asp Gly Ala Tyr Arg Phe Phe Asp
100 105 110
Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 12
<
211> 124
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> variable heavy chain (VH) sequence with back-mutation, mutation

K73

<400> 12

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 Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Phe Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Ile Gln Ser Asn Glu Arg Phe

50 55 60

Arg Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Ala Gly Tyr Asn Phe Asp Gly Ala Tyr Arg Phe Phe Asp

100 105 110

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 13

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH sequence with back-mutation, mutation S71

<400> 13

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 Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Phe Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Ile Gln Ser Asn Glu Arg Phe

50 55 60
 Arg Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Ala Gly Tyr Asn Phe Asp Gly Ala Tyr Arg Phe Phe Asp

100 105 110
 Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 14

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH sequence with back-mutation, mutations S71, K73

<400> 14

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 Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Phe Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Ile Gln Ser Asn Glu Arg Phe

50 55 60

Arg Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Ala Gly Tyr Asn Phe Asp Gly Ala Tyr Arg Phe Phe Asp

100 105 110

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 15

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH sequence with back-mutation, mutation I48

<400> 15

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 Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Phe Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Ile Gln Ser Asn Glu Arg Phe

50 55 60

Arg Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Ala Gly Tyr Asn Phe Asp Gly Ala Tyr Arg Phe Phe Asp

100 105 110

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 16

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH sequence with back-mutation, mutations I48, K73

<400> 16

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 Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45
 Gly Phe Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Ile Gln Ser Asn Glu Arg Phe
 50 55 60
 Arg Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Ala Gly Tyr Asn Phe Asp Gly Ala Tyr Arg Phe Phe Asp
 100 105 110
 Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 17

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH sequence with back-mutation, mutations M20, S71, K73

<400> 17

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Phe Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Ile Gln Ser Asn Glu Arg Phe
 50 55 60

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

115 120

<210> 18

<

211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH sequence with back-mutation, mutations M20, I48

<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 Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Phe Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Ile Gln Ser Asn Glu Arg Phe

50 55 60

Arg Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Ala Gly Tyr Asn Phe Asp Gly Ala Tyr Arg Phe Phe Asp

100 105 110

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 19

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JOVI-1 VL CDRs with the human framework 3aaz

<400> 19

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Arg Leu Val His Ser

20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Pro Gly Val Pro

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

65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser

85 90 95
Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 20

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variable light chain (VL) sequence with back-mutations

<400> 20

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly

1 5 10 15

Glu Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Arg Leu Val His Ser

20 25 30

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

35 40 45
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Pro Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser

85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 21

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL sequence with back-mutations

<400> 21

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly

1 5 10 15

Glu Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Arg Leu Val His Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Pro Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser

85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 22

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL sequence with back-mutations

<400> 22

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly

1 5 10 15

Glu Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Arg Leu Val His Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

<210> 23

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL sequence with back-mutations

<400> 23

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

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

<210> 24

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL sequence with back-mutations

<400> 24

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Arg Leu Val His Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Pro Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser

85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 25

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL sequence with back-mutations

<400> 25

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Arg Leu Val His Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Pro Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Phe Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95
Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 26

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL sequence with back-mutations

<400> 26

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Arg Leu Val His Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Pro Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser

85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 27

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL sequence with back-mutation

<400> 27

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Arg Leu Val His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Pro Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95
Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 28

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL sequence with back-mutations

<400> 28

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Arg Leu Val His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Pro Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95
Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 29

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL sequence with back-mutations

<400> 29

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Arg Leu Val His Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Pro Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser

85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 30

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL sequence with back-mutations

<400> 30

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Arg Leu Val His Ser

20 25 30

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

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

100 105 110

<210> 31

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL sequence with back-mutation

<400> 31

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

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

100 105 110

<210> 32

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL sequence with back-mutations

<400> 32

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Arg Leu Val His Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Pro Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser

85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 33

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL sequence with back-mutation

<400> 33

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Arg Leu Val His Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Pro Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

 100 105 110

<210> 34

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL sequence with back-mutation

<400> 34

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Arg Leu Val His Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Pro Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser

85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 35

<211> 175

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser

1 5 10 15

Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala
20 25 30

Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly
35 40 45

Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu
50 55 60

Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg
65 70 75 80

Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln
85 90 95

Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg
100 105 110

Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala
115 120 125

Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala
130 135 140

Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val
145 150 155 160

Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp
165 170 175

<210> 36

<211> 175

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser
1 5 10 15

Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala
20 25 30

Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly
35 40 45

Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu

50

55

60

Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg

65

70

75

80

Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln

85

90

95

Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg

100

105

110

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

115

120

125

Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala

130

135

140

Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val

145

150

155

160

Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp

165

170

175